

Neue Biomarker zum Nachweis von Nierentoxizität



Dissertation

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

vorgelegt von

Dana Hoffmann

aus Craula

Würzburg 2010

Eingereicht am
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter
2. Gutachter
der Dissertation

1. Prüfer
2. Prüfer
3. Prüfer
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....

Für meine Liebsten - Mama, Papa, Steffi & Marc

„ZUFRIEDENHEIT IST STILLSTAND.“

(Angela, Mally, Eurotox 2009, Dresden)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Organtoxizität als Problem in der Arzneimittelentwicklung	1
1.2	Die Niere als Zielorgan toxischer Wirkung	2
1.2.1	Allgemeine Funktionen der Niere	3
1.2.2	Aufbau der Niere	3
1.2.2.1	Makroskopischer Aufbau	3
1.2.2.2	Mikroskopischer Aufbau	4
1.2.2.3	Der proximale Tubulus	5
1.3	Traditionelle und neue Biomarker für Nephrotoxizität	7
1.3.1	Definition von Biomarkern	7
1.3.2	Traditionelle Biomarker zur Erkennung von Nierentoxizität	8
1.3.3	Initiativen zur Identifizierung und Validierung neuer Biomarker	9
1.3.4	Neue potentielle Biomarker für Nephrotoxizität	12
1.3.4.1	Kidney Injury Molecule-1	12
1.3.4.2	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1	13
1.3.4.3	Osteopontin	14
1.3.4.4	Lipocalin-2	15
1.3.4.5	Clusterin	16
1.3.4.6	Hämoxxygenase-1	17
1.3.4.7	Vimentin	18
1.3.4.8	Calbindin	18
1.3.4.9	α -Glutathion-S-Transferase	19
1.3.4.10	Cystatin-C	19
1.3.4.11	β_2 -Mikroglobulin	19
1.3.4.12	Vascular Endothelial Growth Factor	20
2	Zielsetzung der Arbeit	21
3	Material & Methoden	23
3.1	Tierexperimentelle Studien	23
3.2	Klinische Chemie	23
3.3	Anfertigung von Paraffinschnitten	24
3.4	Anfertigung von Tissue-Microarrays (TMA)	24

3.5	Histopathologie	25
3.6	Immunhistochemische Untersuchungen	26
3.7	Western-Blot-Analyse	29
3.7.1	Proteinisolierung aus Nierengewebe	29
3.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem DC-Assay	30
3.7.3	Probenvorbereitung	30
3.7.4	Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
3.7.5	Western-Blotting	32
3.7.6	Ponceau-S-Färbung der Membranen	33
3.7.7	Detektion von Proteinen	33
3.8	Nachweis neuer Biomarker durch qRT-PCR	35
3.8.1	Gewinnung der RNA aus Nierengewebe	35
3.8.1.1	Allgemeiner Umgang mit RNA	35
3.8.1.2	RNA-Isolierung mittels saurer Phenol-Chloroform-Extraktion (Trizol)	35
3.8.1.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	36
3.8.1.4	Integritätsprüfung der RNA durch Agarosegelelektrophorese	36
3.8.1.5	RNA-Aufreinigung mittels Spinsäulenttechnologie	37
3.8.2	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase	38
3.8.3	Quantitative Real-Time PCR	39
3.9	Quantitative Proteinbestimmung im Urin durch Singleplex-ELISA	41
3.9.1	Lipocalin-2	41
3.9.2	Kim-1	42
3.9.3	Clusterin	43
3.9.4	Timp-1	43
3.9.5	WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel	44
3.10	Statistische Auswertung und ROC-Analyse	44
4	<i>Untersuchung neuer Biomarker Für Nephrotoxizität am Modell der Aristolochiasäure</i>	46
4.1	Struktur, Vorkommen und Verwendung	46
4.2	Nephrotoxizität von Aristolochiasäure	46
4.3	Humantoxizität von Aristolochiasäure	48
4.4	Studiendesign	49
4.5	Ergebnisse	50
4.5.1	Klinische Chemie und Histopathologie	50

4.5.2	Genexpressionsanalyse der potentiellen Biomarker	53
4.5.3	Detektion von Lipocalion-2 im Urin mittels Western-Blot	54
4.6	Diskussion	54
5	<i>Untersuchung neuer Biomarker für Nephrotoxizität am Beispiel von Gentamicin</i>	57
5.1	Struktur und Anwendung von Gentamicin	57
5.2	Toxizität von Gentamicin	58
5.3	Nephrotoxizität von Gentamicin	58
5.4	Studiendesign	59
5.5	Ergebnisse	60
5.5.1	Organgewicht und Histopathologie	60
5.5.2	Klinische Chemie	61
5.5.3	Genexpressionsanalyse potentiellen Biomarker im Nierengewebe	63
5.5.4	Immunlokalisation neuer Biomarkern im Nierengewebe	64
5.5.5	Detektion potentieller Biomarkern im Urin	65
5.5.5.1	Semiquantitative Detektion mittels Western-Blot	65
5.5.5.2	Quantitative Analyse der potentiellen Biomarker mittels Singleplex-ELISA	69
5.5.5.3	Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse	70
5.5.5.4	Quantitative Analyse der Biomarker mit Hilfe des WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel	72
5.6	Diskussion	74
6	<i>Untersuchung neuer Biomarker für Nephrotoxizität im Rahmen präklinischer Studien (InnoMed-PredTox)</i>	80
6.1	Einführung	80
6.2	Studiendesign	81
6.3	Ergebnisse	82
6.3.1	BI-2	82
6.3.1.1	Klinische Chemie und Histopathologie	82
6.3.1.2	Genexpressionsanalyse potentiellen Biomarker im Nierengewebe	83
6.3.1.3	Immunlokalisation neuer Markerproteine auf TMAs	85
6.3.1.4	Detektion potentiellen Urinbiomarkern mit Singleplex-ELISA	87
6.3.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit BI-2	89
6.3.2	BI-3	89
6.3.2.1	Klinische Chemie und Histopathologie	89

6.3.2.2	Genexpressionsanalyse potentiellen Biomarker im Nierengewebe	91
6.3.2.3	Immunlokalisation neuer Markerproteinen auf TMAs	93
6.3.2.4	Detektion potentieller Urinbiomarker mit Singleplex-ELISA	95
6.3.2.5	Western Blot-Analyse neuer Biomarker im Nierengewebe	97
6.3.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit BI-3	97
6.3.3	Gentamicin	97
6.3.3.1	Klinische Chemie und Histopathologie	98
6.3.3.2	Genexpressionsanalyse potentieller Biomarker im Nierengewebe	100
6.3.3.3	Immunlokalisation neuer Markerproteine auf TMAs	102
6.3.3.4	Detektion potentieller Urinbiomarker mit Singleplex-ELISA	104
6.3.3.5	Western-Blot-Analyse neuer Biomarker im Nierengewebe	106
6.3.3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit Gentamicin	107
6.3.4	IMM125	107
6.3.4.1	Klinische Chemie und Histopathologie	108
6.3.4.2	Genexpressionsanalyse potentieller Biomarker im Nierengewebe	110
6.3.4.3	Immunlokalisation neuer Markerproteine auf TMAs	112
6.3.4.4	Detektion potentiellen Urinbiomarker mit Singleplex-ELISA	112
6.3.4.5	Western-Blot-Analyse neuer Biomarker im Nierengewebe	114
6.3.4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit IMM125	114
6.3.5	Receiver Operating Characteristic-Analyse	115
6.3.5.1	Markergene	115
6.3.5.2	Markerproteine im Urin	115
6.4	Diskussion	116
7	Schlussbetrachtung	122
8	Zusammenfassung	127
9	Summary	129
10	Abkürzungsverzeichnis	131
11	Literaturverzeichnis	133
12	Publikationen & Konferenzbeiträge	149
12.1	Publikationen	149
12.2	Konferenzbeiträge	150
13	Danksagung	152

1 EINLEITUNG

1.1 Organtoxizität als Problem in der Arzneimittelentwicklung

Der Prozess von der Entdeckung eines neuen potentiellen Arzneistoffes bis zu dessen Zulassung ist enorm zeit- und kostenintensiv und nur sehr wenige Wirkstoffe erreichen die Zulassung. Man geht davon aus, dass die Dauer für die Entwicklung eines innovativen Arzneistoffes bis zu dessen Zulassung und Produktion mindestens 10 Jahre beträgt und sich die Kosten auf ca. 1 Milliarde Dollar belaufen (DiMasi *et al.*, 2003; Tobinick, 2009). Nach der Entdeckung eines neuen Wirkstoffs wird dieser in der präklinischen Forschung intensiv im Labor und tierexperimentell auf seine Wirkung und Verträglichkeit geprüft. Kann die Unbedenklichkeit des Stoffes in dieser Phase bestätigt werden, gelangt dieser in die klinische Entwicklung. In dieser 3-teiligen Phase, welche die längste Zeit in Anspruch nimmt, wird der potentielle Arzneistoff das erste Mal am Menschen geprüft (Tamimi und Ellis, 2009). In der ersten Phase wird die Pharmakokinetik des Wirkstoffes an einigen gesunden Freiwilligen untersucht, in der zweiten die Wirksamkeit und Dosierung an einer kleinen Anzahl erkrankter Probanden (Tamimi und Ellis, 2009). Im letzten Teil, der dritten Phase wird der Wirkstoff dann einer großen Gruppe erkrankter Patienten verabreicht. Im Anschluss an die Zulassung des Medikamentes wird der Wirkstoff in der sogenannten 4. Phase weiteren Prüfungen unterzogen um so z.B. die Langzeit- und auch die Wechselwirkung mit anderen Medikamenten zu untersuchen. Von ungefähr 10.000 neu synthetisierten Substanzen (*New Chemical Entity*, NCE) erreichen etwa 100 die präklinische Phase. Von diesen gelangen wiederum etwa 5 in die klinische Phase, wovon nur 10 % zur Anwendung am Patienten zugelassen werden (van Gool *et al.*, 2009) (Abb. 1.1)

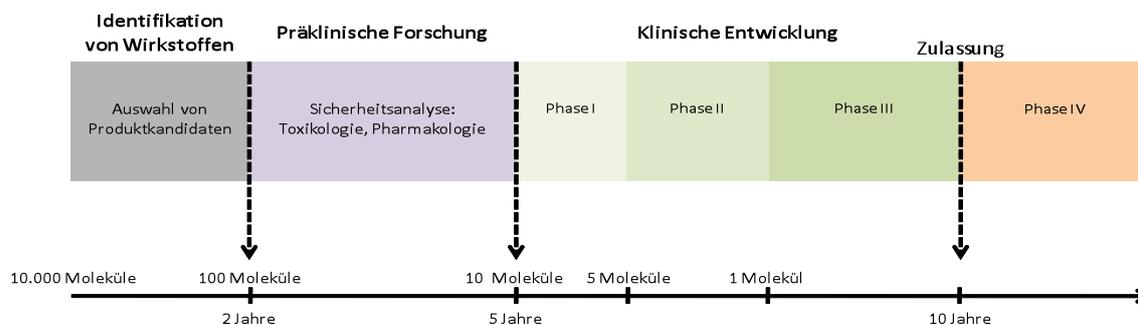


Abb. 1.1 Phasen und Dauer der Arzneimittelentwicklung

Noch bis 1991 führten in der präklinischen Phase sowie der klinischen Phase 1 ungünstige pharmakokinetische Eigenschaften bei 40 % der potentiellen Arzneistoffe zum Abbruch der Weiterentwicklung (Hodgson, 2001; Kola und Landis, 2004). Jedoch konnte durch Entwicklung spezieller Tests zur frühen Erfassung von ADME-Parametern (Adsorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion), einschließlich *In-Silico*-Tests, diese hohe Quote bis 2000 auf rund 10 % gesenkt werden (Boobis *et al.*, 2002; Kola und Landis, 2004). Heutzutage ist die Organtoxizität am Versuchstier in der präklinischen Forschung mit rund 45 % der Hauptgrund für den Entwicklungsstopp von Arzneimitteln, gefolgt von fehlender Wirksamkeit (30%) und Humantoxizität in Phase 2 und 3 (30 %) (Kola und Landis, 2004; Suter *et al.*, 2004). Zu diesen Zeitpunkten wurden schon viele Ressourcen in die Entwicklung des potentiellen Wirkstoffes investiert. Daher haben pharmazeutische Unternehmen sogenannte „in vivo signal generation studies“ in die frühe Phase der präklinische Entwicklung integriert (Kramer *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich in der Regel um Kurzzeitstudien in Ratten, die zur Identifizierung der Dosis-limitierenden Organtoxizität dienen. Da alle Substanzen ab einer bestimmten Dosis giftig sind, gilt es abzuschätzen, ob diese Dosis-limitierende Toxizität durch Sicherheitsfaktoren zu begrenzen ist oder die Entwicklung der Substanz gestoppt werden kann, bevor die Arzneistoffkandidaten in zeitaufwendigen und kostspieligen präklinischen Langzeitversuchen getestet werden. Die am häufigsten von Fremdstoff-induzierter Toxizität betroffenen Organe sind die Leber und die Niere.

1.2 Die Niere als Zielorgan toxischer Wirkung

Die Niere ist eines der empfindlichsten Organe des Körpers (Hart und Kinter, 2005). Für zahlreiche Arzneimittel (Aminoglykoside, nicht-steroidale Analgetika, ACE-Hemmer) und Chemikalien (Schwermetalle) ist die Niere Zielorgan der toxischen Wirkung. Die hohe Anfälligkeit der Niere für toxische Wirkungen von Fremdstoffen kann auf verschiedene Faktoren zurückgeführt werden. Viele Arzneistoffe werden überwiegend renal ausgeschieden und erreichen während der Nephronpassage relativ hohe Konzentrationen. Dies beruht zum einen auf der hohen Durchblutung der Nieren. Beim Menschen beträgt die Nierendurchblutung in Ruhe etwa 1,2 Liter pro Minute (1700 Liter pro Tag), so dass auf die Nieren mit etwa 25 % ein sehr hoher Anteil des Herzzeitvolumens entfällt, obwohl sie weniger als 1 % der Körpermasse ausmachen.

Somit werden die Nieren im Vergleich zu anderen Organen mit einer hohen Konzentration an zirkulierenden Fremdstoffen belastet. Weiterhin sorgen zahlreiche aktive und passive Transportmechanismen der Niere dafür, dass Fremdstoffe aktiv in die Nierenepithelzellen aufgenommen werden und dort akkumulieren können (z.B. Aminoglykoside). Auch durch die Rückresorption von Wasser kann es zur Aufkonzentrierung von gelösten Stoffen im Harn kommen, die folglich aufgrund der Überschreitung ihrer Löslichkeitsprodukte ausfallen und sich im Tubuluslumen absetzen können. Darüber hinaus ist die Niere mit einer Vielzahl fremdstoff-metabolisierender Enzyme ausgestattet, die zur Bioaktivierung von an sich wenig aktiven Stoffen zu reaktiven und somit toxischen Metaboliten beitragen können (Hart und Kinter, 2005).

1.2.1 Allgemeine Funktionen der Niere

Die Niere ist im Organismus das Hauptausscheidungsorgan von Stoffwechselprodukten und Xenobiotika (Medikamente und Umweltgifte). Durch Sekretion und Reabsorption ist die Niere entscheidend an der Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalts im Körper beteiligt. Weiterhin gehört zu ihren Aufgaben die Bildung des Hormons Erythropoetin, welches die Bildung von Erythrozyten stimuliert (Sands und Verlander, 2005). Durch die Synthese der Endopeptidase Renin ist die Niere essentiell an der Regulation des arteriellen Blutdrucks beteiligt.

1.2.2 Aufbau der Niere

1.2.2.1 Makroskopischer Aufbau

Die Nieren sind paarige, bohnenförmige braun-rote Organe, die im Retroperitonealraum liegen und beim Menschen eine Länge von etwa 10-12 cm und eine Breite von circa 5-6 cm besitzen. Das Gewicht einer Niere liegt zwischen 120 und 200 g, wobei die linke Niere im Allgemeinen etwas größer und schwerer ist als die rechte. Die Niere ist von einer bindegewebsartigen Nierenkapsel umgeben und setzt sich zusammen aus einem äußeren Teil, der Nierenrinde (*Cortex renalis*) und einem Innenteil, dem Nierenmark (*Medulla renalis*) (Abb. 1.2). Die nach innen gerichteten Spitzen des Marks werden Papillen genannt und ergeben in ihrer Gesamtheit das Nierenbecken (*Pelvis renalis*), aus dem der Harnleiter (*Ureter*) mündet.

Das relative Nierengewicht einer Ratte beträgt ca. 0,51-1,08 % (Mittelwert ca. 0,65 %) des Körpergewichts und variiert mit dem Alter und Geschlecht der Tiere. Im Gegensatz zum Menschen besitzt die Ratte eine unipapilläre Niere und weist somit auch nur einen Nierenkelch auf (Khan und Alden, 2002).

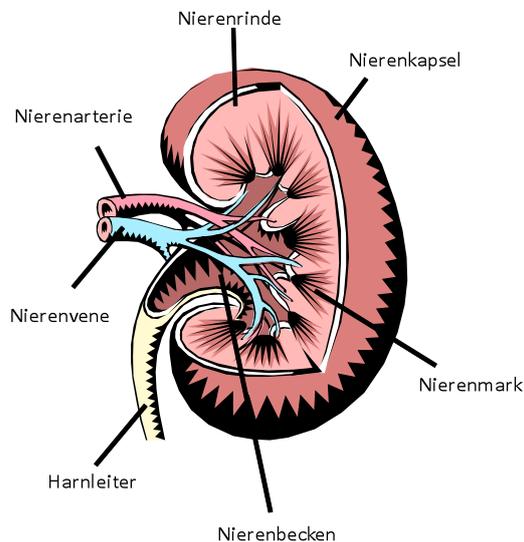


Abb. 1.2 Schematischer Längsschnitt durch eine Niere

1.2.2.2 Mikroskopischer Aufbau

Jede der beiden menschlichen Nieren besteht aus etwa 1 bis 1,2 Millionen kleinen funktionellen Einheiten, die sogenannten Nephrone. Dabei untergliedert sich jedes Nephron selbst in das Nierenkörperchen (*Glomerulus*) und den sich daran anschließenden Nierenkanal (*Tubulus*), der wiederum in das Sammelrohr mündet (Abb. 1.3). Als Glomerulus bezeichnet man ein Gefäßknäuel, welches von der sogenannten doppelwandigen Bowman'schen Kapsel umgeben ist. In diesem Abschnitt erfolgt die Ultrafiltration (glomeruläre Filtration) des Blutes unter Bildung des Primärharns (Ultrafiltrat). Täglich werden etwa 150 l dieses nahezu eiweißfreien Ultrafiltrats gebildet, jedoch werden davon nur 1,5 l als Urin ausgeschieden. Der Primärharn, der aus Wasser und Substanzen mit geringem Molekulargewicht besteht, gelangt anschließend über den Kapselraum in den Tubulusapparat, der aus einem einschichtigen Epithel besteht. Im Tubulus, der aus mehreren morphologisch und funktionell unterschiedlichen Abschnitten besteht, erfolgt die Verarbeitung des Ultrafiltrats zum sogenannten Sekundärharn (Sands und Verlander, 2005). Der an den Glomerulus anschließende Teil wird als proximaler Tubulus bezeichnet und gliedert sich in den gewundenen Teil (*Pars convoluta, proximal convoluted tubule, PCT*) und den geraden Teil (*pars recta, proximal straight tubule, PST*).

Der gewundene Teil kommt ausschließlich in der Rindenzone vor und ist mit ca. 12 mm das längste Segment des Nephrons. Dieses Segment ist für die Reabsorption des größten Teils des Ultrafiltrats verantwortlich. Etwa 70 % Wassers, Glukose, Natrium, Kalium und Chlor werden hier in das Tubuluslumen rückresorbiert. Dem gewundenen Teil des proximalen Tubulus, der sich im Rindenmark befindet, schließt sich der Intermediärtubulus an. Dieser verläuft zunächst als *Tubulus intermedius pars descendens* in das innere Mark und nach einer U-Kurve wieder aufwärts als *Tubulus intermedius pars ascendens* zurück in das äußere Mark und mündet zunächst in den geraden Teil (*pars recta*) und danach in den gewundenen Teil (*pars convoluta*) des distalen Tubulus. Die geraden Abschnitte von proximalen und distalen Tubulus bilden zusammen mit dem Intermediärtubulus die Henle-Schleife. Der verbleibende Sekundärharn gelangt über den Verbindungstubulus (*Tubulus connectivus*) in das Sammelrohr. Von dort aus wird er über den Harnleiter in die Blase abgegeben und als Endharn ausgeschieden.

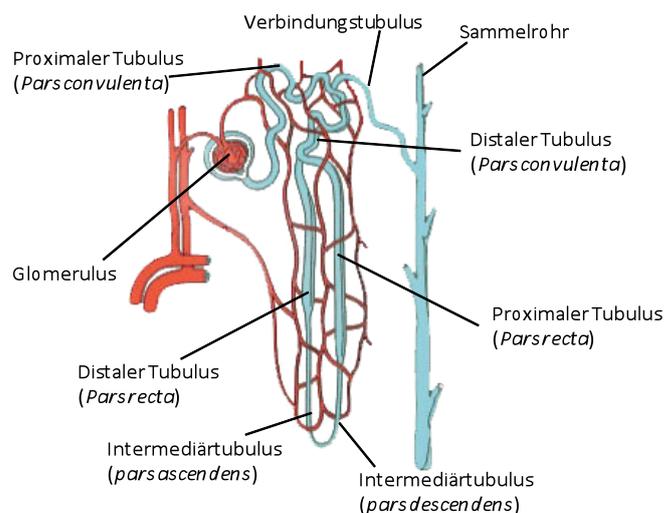


Abb. 1.3 Aufbau eines Nephrons

1.2.2.3 Der proximale Tubulus

Die Hauptaufgabe des Tubulussystem ist die Bildung von Urin aus dem Ultrafiltrat, indem annähernd 99 % des filtrierte Wassers und über 90 % der im Ultrafiltrat gelösten Stoffe (Glucose, Aminosäuren, Elektrolyte, Peptide, Proteine) rückresorbiert werden sowie überflüssige und schädliche Substanzen (harnpflichtige Substanzen) sezerniert werden. Da dieses zum größten Teil im proximalen Tubulus geschieht, ist das einschichtige Epithel der proximalen Tubuluszellen durch einen ausgeprägten Bürstensaum (Mikrovilli)

gekennzeichnet. Diese Mikrovilli sowie die Faltung der Membran dienen der Oberflächenvergrößerung und somit einer erhöhten Resorptionsleistung. Der proximale Tubulus verfügt über eine große Transportkapazität, ist aber nicht in der Lage einen hohen Gradienten aufzubauen. Im proximalen Tubulus werden rund 2/3 des filtrierten Wassers und NaCl, sowie 100 % der filtrierten Glucose und Aminosäuren rückresorbiert.

Der proximale Tubulus wird neben der Unterteilung in PCT und PST in 3 verschiedene Segmente eingeteilt (Sands und Verlander, 2005). Zu Beginn des gewundenen Teils des proximalen Tubulus befindet sich das S₁-Segment. In diesem Bereich besitzen die Zellen einen großen Bürstensaum an der apikalen Seite der Plasmamembran, eine starke Basalmembraneinfaltung sowie ein gut entwickeltes lysosomales System. Da die Zellen des S₁-Segments stark am aktiven Transport beteiligt sind, besitzen sie zahlreiche Mitochondrien, welche vorwiegend an der basolateralen Seite lokalisiert sind. Die Zellen des S₁-Segments haben eine hohe metabolische Aktivität, was sie besonders anfällig für toxische Verbindungen macht. Vor allem kleine Moleküle, wie Schwermetalle und Aminoglykoside, werden aus dem Ultrafiltrat in das Zellinnere reabsorbiert.

In der Überleitung vom PCT zum PST befinden sich die Zellen des S₂-Segments. Diese Zellen sind kleiner als die des S₁-Segments, besitzen weniger Mitochondrien, einen kürzeren Bürstensaum sowie eine weniger stark gefaltete Basalmembran. Ebenso besitzen diese Zellen Lysosomen, die sich aber je nach Geschlecht und Spezies in ihrer Größe unterscheiden.

Der gewundene Teil des proximalen Tubulus enthält neben S₂- vorwiegend S₃-Zellen. Verglichen mit den Zellen des S₁- und S₂-Segments sind die kubischen Zellen des S₃-Segments mit einem sehr langen und gut entwickelten Bürstensaum ausgestattet. Die Mitochondrien und die Lysosomen sind sowohl in der Größe als auch der Anzahl geringer als in den anderen beiden Segmenten. Die Basalmembran ist kaum gefaltet und der endozytotische Apparat ist nur sehr schwach ausgeprägt. In diesem Teil des proximalen Tubulus befindet sich der höchste Anteil an Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (Khan und Alden, 2002).

1.3 Traditionelle und neue Biomarker für Nephrotoxizität

1.3.1 Definition von Biomarkern

Um die Kosten der Arzneimittelentwicklung zu reduzieren und auch die Bereitstellung von sicheren Medikamenten für betroffene Patienten zu beschleunigen, ist ein möglichst frühzeitiges Erkennen von toxischen Wirkungen sehr wichtig. Aus diesem Grund ist es für den Prozess der Arzneimittelentwicklung von großer Bedeutung, neue empfindliche Marker (Biomarker) zu identifizieren, welche die toxischen Wirkungen von Substanzen auf bestimmte Organe in der frühen präklinischen Entwicklungsphase aufzeigen können.

Unter dem Begriff Biomarker versteht man objektiv messbare und auswertbare Indikatoren, die Auskunft über einen physiologischen Prozess, einen pathologischen Prozess oder aber auch über den Verlauf einer therapeutischen Maßnahme geben und somit eine diagnostische oder prognostische Aussagekraft besitzen (Biomarkers Definitions Working, 2001). Dazu zählen Genexpressionsprofile, Lipide, Proteinstmuster oder andere Parameter im Organismus (Hewitt *et al.*, 2004). In der Klinik werden Biomarker nach ihrer Verwendung unterschieden. So eignen sich diagnostische Biomarker zur genauen Diagnose einer bestimmten Krankheit. Durch prognostische Marker ist es möglich, den Krankheitsverlauf bzw. den Heilungsprozess zu beurteilen. Im Gegensatz dazu zeigen prädiktive Marker die Wahrscheinlichkeit an, zu einem späteren Zeitpunkt an einer Krankheit zu erkranken und ermöglichen Aussagen über das voraussichtliche Ansprechen auf eine bestimmte Therapie. Daher ist es von großer Wichtigkeit, dass der entsprechende Biomarker spezifisch für das betroffene Organ ist und empfindlich genug, um selbst geringfügige Störungen zu detektieren. Ebenso sollte der Marker ein Indikator für verschiedene Stadien der Krankheit sein und daher die gemessene Konzentration mit dem Grad der Funktionsstörung korrelieren. Weiterhin ist es wichtig, dass die Biomarker in einem hohen Probendurchsatz mit einer möglichst schnellen, einfachen und kostengünstigen Methode gemessen werden (Hewitt, *et al.*, 2004). Speziell für die Klinik ist es von großer Bedeutung, Biomarker mit nicht-invasiver Probenahme bestimmen zu können, um somit eine Gewebeentnahme zu vermeiden. Eine Vielzahl von Proteinen werden bei pathologischen Prozessen in Körperflüssigkeiten, wie Urin und Blut, sezerniert. Daher eignen sich diese besonders gut zur Messung von Biomarkern, da sie

einfach und teilweise schmerzfrei zu gewinnen sind und in ausreichender Menge zur Verfügung stehen (Hewitt, *et al.*, 2004).

Biomarker haben aber auch für die Arzneistoffentwicklung eine große Bedeutung. Neben Informationen zur Wirksamkeit, werden sie auch zur Diagnose von toxischen Effekten sowohl in der präklinischen als auch in der klinischen Phase der Entwicklung von potentiellen Arzneistoffen eingesetzt und dienen dort als Endpunktmarker für toxische Wirkungen (Hewitt, *et al.*, 2004).

1.3.2 Traditionelle Biomarker zur Erkennung von Nierentoxizität

Die Histopathologie ist in präklinischen Studien heutzutage immer noch der „Goldstandard“ zur Prüfung auf Nierentoxizität. Der Vorteil dieser Methode ist die direkte Lokalisation der geschädigten Areale der Niere. Jedoch benötigt es für eine gute histopathologische Begutachtung sehr gut ausgebildetes Personal.

Die Bestimmung der harnpflichtigen Substanzen Kreatinin und des im Harnstoff enthaltenen Stickstoffs (*Blood Urea Nitrogen*, BUN) dienen derzeit sowohl in der Präklinik als auch in der Klinik als „Standardparameter“ zur Identifizierung von Störungen der Nierenfunktionalität. Diese Stoffwechselprodukte gelangen über das Blut in die Niere, werden im Glomerulus frei filtriert und über den Harn ausgeschieden. Sinkt die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in der Niere, so steigen beide Parameter im Blut an. Die Niere besitzt aber eine enorme funktionelle Reservekapazität, so dass sich Veränderungen im Blutspiegel von Kreatinin bzw. BUN erst nach einem Verlust von rund 2/3 der renalen Epithelmasse oder einer stark eingeschränkten GFR zeigen (Amin *et al.*, 2004; Pfaller und Gstraunthaler, 1998). Da Kreatinin ein Abfallprodukt des Kreatinabbaus ist, ist die Konzentration stark vom Alter, Geschlecht, Gewicht und der Muskelmasse abhängig und zeigt auch bei gastrointestinalen Blutungen erhöhte Spiegel. Ebenso wie Kreatinin ist auch die Konzentration von BUN im Serum bei pathologischen Zuständen (gesteigerter Eiweisskatabolismus) erhöht. Diese Parameter geben aber nur einen allgemeinen Hinweis auf einen Nierenschaden, eine Lokalisation der Schädigung ist durch diese Analyse jedoch nicht möglich.

Auch die Analyse des Urins selbst wird zur Testung herangezogen. Neben visuellen (Urinmenge, -färbung, -trübung) und olfaktorischen (Uringeruch) Parameter, sind ebenso

Osmolalität, pH-Wert, Proteingehalt, Glukosekonzentration und der Gehalt an Elektrolyten für die Urinanalyse wichtig.

Ebenfalls können zur Diagnostik von Nierenschäden die Konzentrationen bestimmter Enzyme im Urin gemessen werden. N-Acetyl-beta-D-Glucosaminidase (NAG) kommt in den Lysosomen und γ -Glutamyltransferase (GGT) im Bürstensaum des proximalen Tubulus vor. Ein erhöhtes Auftreten dieser Enzyme im Urin ist ein Hinweis auf direkte Schädigung des Tubulusepithels (Greco *et al.*, 1985; Liangos *et al.*, 2007).

1.3.3 Initiativen zur Identifizierung und Validierung neuer Biomarker

Ein großer Nachteil der bisher verwendeten traditionellen Biomarker ist die geringe Empfindlichkeit und fehlende Spezifität. Daher ist es von großem Interesse, empfindliche und sensitive Marker zu identifizieren, mit deren Hilfe eine frühzeitige Erkennung einer Nierenschädigung sowie eine Lokalisation des Schadens im Rahmen präklinischer und klinischer Studien möglich ist, um somit die Dauer von Versuchen sowie die Anzahl von Versuchstieren zu reduzieren. In den letzten Jahren haben sich akademische und industrielle Institutionen sowie Behörden zu mehreren gemeinschaftlichen Projekten zusammengeschlossen, um eine verbesserte Vorhersage von Fremdstoff-induzierter Organtoxizität zu liefern und neue Biomarker zu identifizieren.

Die „ILSI/HESI-Nephrotoxicity Working Group“, eine Kooperation zwischen dem „International Life Sciences Institute / Health and Environmental Sciences Institute“ (ILSI/HESI) und Partnern aus der Industrie sowie öffentlichen und universitären Forschungseinrichtungen, hat es sich zum Ziel gemacht, mit Hilfe von Microarray-Analysen nierenspezifische Biomarker auf Ebene der Transkription zu identifizieren. Durch Einführung der Microarrays ist es möglich, die Expression tausender Gene gleichzeitig zu erfassen und damit die Veränderung von komplexen Aktivitätsmustern unter Einwirkung von Fremdstoffen zu beobachten. Weiterhin zählen Genexpressionsänderungen als Antwort auf Toxizität zu den frühesten Ereignissen und gelten somit als besonders sensitiv. Im Rahmen der „ILSI/HESI-Nephrotoxicity Working Group“ wurde die Analyse der Genexpressionsdaten im Vergleich zur Histopathologie und Parametern der klinischen Chemie im Tierversuch anhand von den 3 verschiedenen nephrotoxischen Modellsubstanzen Gentamicin, Cisplatin und Puromycin durchgeführt (Amin, *et al.*, 2004; Kramer *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004). Dafür wurden männlichen Sprague-Dawley-

Ratten entweder 0,3, 1 oder 5 mg/kg KG Cisplatin (einmalige Dosis), 2, 20, 80 oder 240 mg/kg KG Gentamicin (7 Tage) bzw. 5 oder 20 mg/kg KG Puromycin (21 Tage) verabreicht. Der Urin wurde zur Bestimmung der klinische-chemischen Parameter gesammelt und die Nieren wurden nach der Tötung für histopathologische Untersuchungen sowie für Protein- und Genexpressionsstudien entnommen (Amin, *et al.*, 2004). Mit Hilfe von Microarray-Analysen konnte eine Reihe deregulierter Gene detektiert werden, welche im Zusammenhang mit Schädigungen der Nierentubuli stehen, einschließlich Kim-1, Clusterin, Lipocalin-2 und Osteopontin. Die Veränderungen der Expression dieser Gene wurden aufgrund der Ergebnisse der Studie als potentielle sensitive Biomarker zur Erkennung von Nierenschädigungen vorgeschlagen. Weiterhin wurden im Tierexperiment 4 potentielle Urinbiomarkern (Clusterin, GST- α , GST- μ und RPA-1) untersucht. Dazu wurden männlichen Ratten mit verschiedenen Nephrotoxinen (Gentamicin, Cisplatin, N-Phenylanthranilsäure) behandelt und die Konzentrationen von Clusterin, GST- α , GST- μ und RPA-1 im Urin gemessen. Veränderte Urinkonzentrationen traten zum Teil eher auf als Veränderungen in klassischen Marker für Nierentoxizität (z.B. BUN, Serumkreatinin). Daher wurde von der „ILSI-HESI-Nephrotoxicity Working Group“ im Mai 2008 ein Antrag auf Verwendung dieser 4 Markerproteine als potentielle Urinbiomarker für Nephrotoxizität bei der FDA (American Food and Drug Administration) und EMA (European Medicines Agency) eingereicht. Jedoch wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt weder die Daten der Studien, noch die Entscheidung der FDA und EMA veröffentlicht.

Als weiteres Projekt wurde 2006 das „Predictive Safety Testing Consortium“ (PSTC) vom „Critical Path Institute“ (C-Path) ins Leben gerufen (<http://www.c-path.org/pstc.cfm>). In diesem Projekt wurden verschiedene pharmazeutische Unternehmen und öffentliche Einrichtungen zusammen gebracht, um unter FDA und der EMA neue Methoden zur Prüfung der präklinischen Sicherheit zu validieren. Dabei sollten Biomarker für die Prüfung in den 5 Bereichen Kanzerogenität, Nieren-, Leber-, Muskel- und Gefäßschädigung gemeinschaftlich entwickelt und validiert werden. 10 Wissenschaftler der EMA und 19 der FDA als Berater sowie 190 weiteren Wissenschaftlern leiten das Projekt, sammeln die Ergebnisse und fassen die Daten zusammen. Die Mitglieder des Konsortiums teilen sich die Informationen zu neu entwickelten präklinischen Biomarker-Tests und lassen sie von an anderen Mitgliedern begutachten und kreuzvalidieren. Durch diesen Prozess wird erwartet, dass die FDA und die EMA neue Richtlinien und somit

präzisere Verfahren zur Vorhersage der Arzneimittelsicherheit zulassen. Im Bereich der Nierentoxizität wurden anhand von 8 nephrotoxischen Substanzen (Gentamicin, Puromycin, Vancomycin, Doxorubicin, Furosemid, Lithiumcarbonat, Cisplatin und Tacrolimus) sowie 2 hepatotoxischen Negativkontrollen (α -Naphthylisocyanat und Methapyrilen) 23 potentielle Urinbiomarker getestet (Tab. 1.1). Die Substanzen wurden Ratten in 4 verschiedenen Dosen für unterschiedliche Zeiträume (bis zu 14 Tagen) verabreicht und die Konzentration dieser 23 potentiellen Marker im Urin gemessen (Tab. 1.1). Neben der histopathologischen Begutachtung der Organe wurden zusätzlich Daten der klinischen Standardparameter, einschließlich BUN und Serumkreatinin, gesammelt. Daten dieser Studie sind bisweilen noch nicht veröffentlicht.

Tabelle 1.1 23 potentielle Biomarker, welche nach Gabe verschiedener Nephrotoxine im Urin von Ratten gemessen wurden

Albumin	Osteopontin
β_2 -Mikroglobulin (β_2 M)	Podocin
Calbindin	Renal Papillary Antigen-1 (RPA-1)
Clusterin	Trefoil Factor-3 (TFF-3)
Cystatin-C	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (Timp-1)
Epidermal Growth Factor (EGF)	Gesamtprotein im Urin
α -Glutathion-S-Transferase (α GST)	Uromodulin (Tamm-Horsfall)
μ -Glutathion-S-Transferase (μ GST)	Macrophage Migration Inhibitory Factor
Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1)	Monokine induced by Interferon Gamma
Lipocalin-2	Interferon Gamma induced 10 kDa Protein
N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG)	Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)
Osteoactivin	

Als europäisches Konsortium wurde 2005 InnoMed-PredTox (Predictive Toxicology) gegründet. Bei diesem Projekt handelt es sich um eine Kooperation zwischen 12 pharmazeutischen Unternehmen, 3 Universitäten und 2 kleineren technologischen Unternehmen mit dem Bestreben, die Sicherheit von Arzneimitteln zu verbessern (www.innomed-predtox.com). Dabei ist das übergeordnete Ziel, durch Kombination von neuen „Omics“-Technologien und konventionellen Methoden, die Vorhersagekraft präklinischer Toxizitätsstudien zu verbessern und somit Kosten und Dauer der Arzneistoffentwicklung zu senken. Weiterhin gilt es als Ziel, die Mechanismen der Pathologie in der Niere und Leber besser zu verstehen und frühe Biomarker für Nieren-

und Hepatotoxizität in der präklinischen Phase zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden Tierstudien mit 16 verschiedenen Substanzen durchgeführt. Bei diesen Substanzen handelte es sich um 14 Entwicklungssubstanzen, die aufgrund ihrer Leber- bzw. Nierentoxizität in ihrer Entwicklung gestoppt wurden. Desweiteren wurden die bereits bekannten Substanzen Gentamicin und Troglitazon als Referenzen für nieren- bzw. lebertoxische Schädigungen verwendet. Die jeweilige Substanz wurde männlichen Wistar-Ratten in 3 verschiedenen Dosen (Kontrolle, Niedrig- und Hochdosis) für eine Dauer von 1, 3 oder 14 Tagen verabreicht. Umfangreiche Daten aus den Ergebnissen der klinischen Chemie, Histopathologie sowie die der „Omics“-Technologien, einschließlich Toxicogenomics, Proteomics und Metabonomics, wurden gesammelt und ausgewertet. Als Teil des InnoMed-PreTox-Projektes sollten im Rahmen dieser Arbeit neue potentielle Biomarker für Nephrotoxizität identifiziert werden, welche empfindlicher als klinisch-chemische Parameter für Nierentoxizität sind.

1.3.4 Neue potentielle Biomarker für Nephrotoxizität

1.3.4.1 *Kidney Injury Molecule-1*

Eine vermehrte Expression von „Kidney Injury Molecule-1“ (Kim-1) wurde erstmals 1998 von Ichimura infolge eines akuten Nierenversagens bei Ratten beschrieben (Ichimura *et al.*, 1998). Kim-1 ist ein glykosyliertes Typ-1-Transmembranprotein und wird der Familie der T-Zell-Immunglobulin-Muzin-Proteine (Tim-Familie) zugeordnet, weshalb es in der immunologischen Literatur auch als Tim-1 bezeichnet wird (Kuchroo *et al.*, 2003; Meyers *et al.*, 2005). Initial wurde Kim-1 1996 in einem anderen Zusammenhang als Hepatitis-A-Virus-zellulärer-Rezeptor (HAVcr) kloniert (Kaplan *et al.*, 1996).

Alle Tim-Proteine enthalten vom N-Terminus ausgehend eine extrazelluläre Immunglobulin-V-Domäne, eine Muzin-Domäne, eine transmembranäre und eine zytoplasmatische Domäne (Kuchroo, *et al.*, 2003). Für Kim-1 existieren zwei Spleißvarianten der zytoplasmatischen Domäne: Kim-1a ohne Phosphorylierungsmotiv wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, Kim-1b mit Phosphorylierungsmotiv vor allem in der Niere (Bailly *et al.*, 2002).

In gesunden Nieren wird Kim-1 nur auf einem sehr niedrigen Niveau exprimiert, hingegen zeigen humane und tierexperimentelle Studien eine dramatische Steigerung der Gen- und

Proteinexpression nach Schädigung der proximalen Tubulusepithelzellen (Amin, *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2002; Ichimura, *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 2004).

Weiterhin erhöht sich nach Schädigung der proximalen Tubuli der Niere die Exkretion von Kim-1 in den Urin. Durch Abspaltung der Ektodomäne vom membranständigen Kim-1 entsteht das lösliche Kim-1 (sKim-1), welches von den proximalen Tubulusepithelzellen in das Tubulolumen abgegeben und mit dem Urin ausgeschieden wird (Bailly, *et al.*, 2002). Vorangegangene Studien zeigten sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte eine erhöhte Exkretion von Kim-1 in den Urin nach Schädigung der proximalen Tubuli der Niere (Han *et al.*, 2009; Ichimura *et al.*, 2004; Liangos, *et al.*, 2007; Nijboer *et al.*, 2009; Prozialeck *et al.*, 2009; Vaidya *et al.*, 2006; Vaidya *et al.*, 2008; van Timmeren *et al.*, 2007). So führten in tierexperimentellen Studien verschiedene Nephrotoxine (Cisplatin, Folsäure, Cadmium) neben einer gesteigerten Genexpression auch zu erhöhten Konzentrationen von Kim-1 im Urin (Ichimura, *et al.*, 2004; Prozialeck, *et al.*, 2009). Bei Patienten, bei denen es infolge einer Herzoperation zu Nierenschädigungen kam, trat ebenso eine gesteigerte Ausscheidung von Kim-1 in den Urin auf (Han, *et al.*, 2009).

1.3.4.2 Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1

Timps (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase) sind spezifische Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (MMP), welche für den Abbau der Extrazellulären Matrix (ECM) verantwortlich sind (Brew *et al.*, 2000). Dadurch herrscht ein ständiges Fließgleichgewicht zwischen dem Auf- und Abbau der ECM im Organismus. Wird dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu pathologischen Zuständen kommen. Die zur Familie der Kollagenasen gehörenden 4 Timps (Timp-1 bis Timp-4) interagieren in einem nicht-kovalenten 1:1 Komplex mit den aktiven Formen der MMPs. Die stärkste Bindung besteht dabei zwischen Timp-1 und MMP-9. Timp-1 ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von 28,5 kDa, welches von einer Vielzahl von Zelltypen (Fibroblasten, Epithelzellen, Osteoblasten, Tumorzellen) exprimiert wird und in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben nachweisbar ist (Lambert *et al.*, 2004). Die Expression von Timp-1 wird stark durch Zytokine und Wachstumsfaktoren induziert. Neben der inhibitorischen Aktivität besitzt Timp-1 weiterhin eine antiapoptotische Funktion sowie die Fähigkeit, Zellproliferation zu stimulieren (Lambert, *et al.*, 2004).

Durch eine Deregulation von MMPs kann es zur Akkumulation von Timp-1 und infolge dessen zu einer Imbalance zwischen dem Ab- und Aufbau der ECM kommen. Dieses führt zu progressiven Nierenschäden (Schnaper, 1995), welche häufig als Endpunkt eine tubulointerstitielle Fibrose (Gewebevernarbung) aufweisen. Eine erhöhte Expression von Timp-1 in der Niere wurde in verschiedenen Modellen mit interstitieller Fibrose und Tumoren beobachtet, daher wird Timp-1 auch oft als Marker für interstitielle Fibrose bezeichnet (Ahmed *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2008; Eddy, 1996; Johnson *et al.*, 2002). Weiterhin konnte auch eine erhöhte Ausscheidung von Timp-1 in den Urin von Patienten mit einem chronischen Nierenschaden gemessen werden (Horstrup *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2006). Ebenso traten erhöhte Urinkonzentrationen von Timp-1 in Patienten mit ANCA (Anti-Neutrophile cytoplasmatische Antikörper)-assoziiierter Vasculitis auf sowie bei Kindern, welche an einem nephrotischen Syndrom leiden und mit Cyclosporin A behandelt wurden (Sanders *et al.*, 2007; Wasilewska und Zoch-Zwierz, 2008).

1.3.4.3 Osteopontin

Osteopontin (OPN; *sialoprotein; 44-kDa bone phosphoprotein; secreted phosphoprotein 1; uropontin; early T-lymphocyte activation-1, Eta-1*) ist ein multifunktionales Glykoprotein, welches erstmals 1986 aus Osteoblasten isoliert wurde (Oldberg *et al.*, 1986). Aufgrund verschiedener Glykosylierungen und Phosphorylierungen kann das Molekulargewicht stark variieren (Brown *et al.*, 1992). Im Knochen, in dem sich die höchste Konzentration von OPN im Körper befindet, dient es der Regulierung der Knochenmineralisation, indem es die Bildung von Hydroxyapatit inhibiert sowie der Knochenresorption durch die Osteoblasten (Mazzali *et al.*, 2002). Osteopontin wird von Epithelzellen zahlreicher anderer Gewebe wie der weiblichen Brust, Niere, Leber, Lunge, Haut, Harnblase, dem Pankreas sowie im Fettgewebe exprimiert (Brown, *et al.*, 1992) und ist daher im Urin, und anderen Körperflüssigkeiten (z. B. Serum, Galle und Muttermilch) detektierbar (Brown, *et al.*, 1992; Lorenzen *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2001). In der Niere scheint die physiologische Funktion von Osteopontin u.a. darin zu bestehen, das Wachstum von Calciumoxalatkrystallen, welche sich als Nierensteine absetzen, zu hemmen (Kleinman *et al.*, 1995; Min *et al.*, 1998). Darüber hinaus ist OPN an der Akkumulation von Makrophagen und Monozyten sowie an der Regeneration von Zellen beteiligt (Xie, *et al.*, 2001). Außerdem spielt Osteopontin eine Rolle in der Tumorgenese, indem es an

Zelloberflächenrezeptoren oder Integrine bindet, was zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen führt, die wiederum das Wachstum von Tumorzellen fördern (Mazzali, *et al.*, 2002; Rittling und Chambers, 2004; Rodrigues *et al.*, 2007). Durch die Bindung an das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin von Endothelzellen und der daraus folgenden Aktivierung von NF κ B schützt Osteopontin weiterhin Endothelzellen vor der Apoptose (Mazzali, *et al.*, 2002). In der adulten menschlichen Niere ist Osteopontin hauptsächlich im distalen Tubulus lokalisiert (Brown, *et al.*, 1992; Hudkins *et al.*, 1999), während es in Rattennieren im dünnen absteigenden Ast der Henle-Schleife und am Rand der Papilla zu finden ist (Kleinman, *et al.*, 1995).

Eine Induktion der Expression von Osteopontin in der Niere konnte sowohl im Tierversuch, als auch in Patienten mit verschiedenen Nierenerkrankungen, wie Nierensteine, tubulointerstitielle Nephritis und Nierenkarzinome gezeigt werden (Persy *et al.*, 1999; Xie, *et al.*, 2001). Auch die Verabreichung zahlreicher Nephrotoxine (z.B. Cisplatin, Cyclosporin A und Gentamicin) führte zu einer gesteigerten Osteopontin-Expression in der Niere (Iguchi *et al.*, 2004; Lim, *et al.*, 2004; Thukral *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Xie, *et al.*, 2001). Neben der erhöhten Expression in der Niere konnte im Nagermodell eine vermehrte Ausscheidung von Osteopontin in den Urin nachgewiesen werden (Khan *et al.*, 2002; Shui *et al.*, 2007).

1.3.4.4 Lipocalin-2

Lipocalin-2 (*neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL; Protein 24p3; humanes neutrophiles Lipocalin, HNL*) gehört zur Familie der Lipocaline. Die Vertreter dieser Superfamilie sind typischerweise kleine, extrazelluläre Proteine, die als strukturelle Gemeinsamkeit einen aus β -Faltblättern gebildeten Trichter aufweisen, wodurch sie in der Lage sind, kleine, meist hydrophobe Moleküle zu binden und in die Zelle zu transportieren und makromolekulare Komplexe zu bilden (Flower, 1996; Flower *et al.*, 2000; Kjeldsen *et al.*, 1993). Humanes Lipocalin-2 wurde erstmals von Kjeldsen *et al.* aus dem Zellkulturüberstand aktivierter humaner neutrophiler Granulozyten als ein 25 kDa Protein, kovalent gebunden an einen Gelatinase/MMP9-Komplex, isoliert und identifiziert (Kjeldsen, *et al.*, 1993). Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesem 25 kDa Protein um das humane Analoga zum *α_2 -microglobulin-related protein* (neu related lipocalin) der

Ratte bzw. dem murinen Protein 24p3 (Uterocalin) handelt (Kjeldsen *et al.*, 2000; Kjeldsen, *et al.*, 1993).

Lipocalin-2 transportiert u.a. Siderophore. Während einer Infektion nehmen Bakterien ihr Eisen aus der Umgebung auf, indem sie Siderophore bilden, die mit hoher Affinität Eisen binden und es in das Bakterium einschleusen. Lipocalin-2 ist in der Lage, das Siderophor Enterochelin zu binden und es damit dem Bakterium zu entziehen, wodurch das Wachstum der Bakterien gehemmt wird (Flo *et al.*, 2004; Goetz *et al.*, 2002; Soni *et al.*, 2009). Somit spielt Lipocalin-2 eine wichtige Rolle in der Immunabwehr von Krankheitserregern. Auch in Mäusen wurde die Expression als Antwort auf eine virale SV40-Infektion dramatisch hochreguliert (Hraba-Rnevey *et al.*, 1989).

Lipocalin-2 wird von Neutrophilen und Epithelzellen als eine der ersten Antworten auf zellulären Stress exprimiert und stellt somit ein sogenanntes „Akute-Phase-Protein“ dar. Im Mausmodell wurde Lcn2 als eines der aufgrund einer ischämischer Nierenschädigung am stärksten deregulierten Gene identifiziert (Mishra *et al.*, 2003). Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass Lcn2 in gesunden Nieren nur wenig exprimiert wird, jedoch kurze Zeit nach Schädigung in proximalen Tubulusepithelzellen der Niere drastisch ansteigt (Mishra, *et al.*, 2003). Weiterhin konnten sowohl im Tiermodell als auch im Patienten mit Nierenerkrankungen erhöhte Konzentrationen von Lcn2 im Urin nachgewiesen werden (Bennett *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2007; Mishra, *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005; Wagener *et al.*, 2008).

1.3.4.5 Clusterin

Clusterin (Apolipoprotein J (ApoJ); Glycoprotein 80; Serumprotein 40,40 (SP-40,40); *sulfated glycoprotein-2* (SGP-2) wurde erstmals 1983 aus der Flüssigkeit der *Rete Testis* isoliert und bekam seinen Namen aufgrund seiner Fähigkeit, Sertoli-Zellen miteinander zu verbinden (*clustering*) (Blaschuk *et al.*, 1983). Clusterin liegt überwiegend als sezerniertes $\alpha\beta$ -dimeres Glykoprotein (sClu) vor, welches durch proteolytische Abspaltung eines Signalpeptids von einer Polypeptidkette hervorgeht. (Rosenberg und Silkensen, 1995; Shannan *et al.*, 2006). Clusterin wird in fast allen epithelialen Geweben konstitutiv exprimiert und in verschiedene Körperflüssigkeiten, wie Plasma, Muttermilch, Urin und Samen sezerniert (Jones und Jomary, 2002). Die stärkste Expression von Clusterin ist in differenzierenden, proliferierenden Zellen zu sehen. Clusterin ist in eine Reihe von

physiologischen Prozessen einschließlich der Reproduktion, des Lipidtransports, der Regulierung des Komplementsystems sowie der Aggregation von Zellen und somit der Bildung fester Zellkontakte involviert (Rosenberg und Silkensen, 1995). Für Clusterin wurden in verschiedenen Studien sowohl apoptotische als auch anti-apoptotische Eigenschaften beschrieben, abhängig von der intrazellulären Form des Proteins (French *et al.*, 1994; Girton *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2001; Lakins *et al.*, 1998; Trougakos *et al.*, 2005). So ist beispielsweise in humanen Zellen durch Spleißung der mRNA die Bildung einer nucleären Form von Clusterin (nClu) möglich, welcher eine pro-apoptotische Funktion zugeschrieben wird (Shannan, *et al.*, 2006).

Neben der physiologischen konstitutiven Expression von Clusterin wurde aber auch eine Induktion von Clusterin im Verlauf verschiedener Krankheitszustände (z.B. Myokardinfarkt, Neurodegenerative Erkrankungen, Arteriosklerose und Krebs) beschrieben (Rosenberg und Silkensen, 1995). Weiterhin zeigen publizierte Studien einen Anstieg der renalen Clusterin-Expression bei verschiedenen Nierenerkrankungen, einschließlich Glomerulonephritis, Nierentumoren sowie Fremdstoff-bedingter Nierenschäden (Amin, *et al.*, 2004; Aulitzky *et al.*, 1992; Correa-Rotter *et al.*, 1998; Eti *et al.*, 1993; Hidaka *et al.*, 2002; Rosenberg und Silkensen, 1995; Witzgall *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2007). Desweiteren wird bei renaler Schädigung die sezernierte Form von Clusterin vermehrt in den Urin abgegeben und scheint daher ein früher Marker für Nierentoxizität zu sein (Eti, *et al.*, 1993; Hidaka, *et al.*, 2002; Rosenberg *et al.*, 2002; Solichova *et al.*, 2007).

1.3.4.6 Hämoxxygenase-1

Die Hämoxxygenase (HO) ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Hämkatabolismus. Dabei recycelt das Enzym aus alternden oder beschädigten Erythrozyten frei-werdendes Eisen, indem es die Degradation des Häms zu dem linearen Tetrapyrrol Biliverdin unter Freisetzung zweiwertigen Eisens (Fe^{2+}) und der Bildung von Kohlenmonoxid (CO) katalysiert (Abb. 1.4). Durch die zytosolische Biliverdinreduktase wird Biliverdin im Anschluss zu Bilirubin reduziert. Sowohl Biliverdin als auch Bilirubin wirken als endogene Antioxidantien und sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie Hydroxylradikale, Superoxid-Anionen oder Lipidhydroperoxide zu neutralisieren. Desweiteren wirkt CO anti-apoptotisch, sodass eine Hauptaufgabe der HO

der Schutz der Zelle vor oxidativem Stress und damit verbundenem Zelltod zu sein scheint.

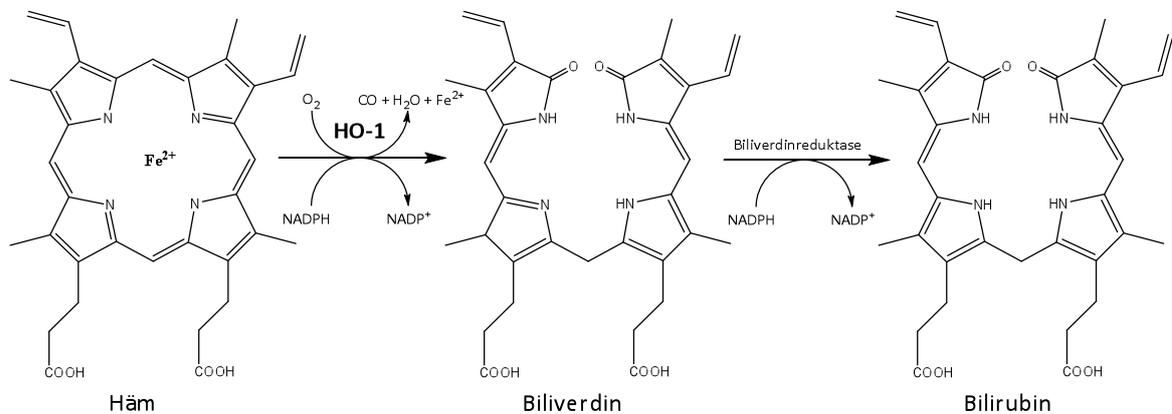


Abb. 1.4 Enzymatischer Abbau von Hämoglobin zu Bilirubin über die Zwischenstufe Biliverdin

Es existieren drei funktionelle Isoformen, wobei Hämoxygenase-1 (HO-1) vermutlich das wichtigste Isoenzym darstellt, da ihre Expression durch verschiedene Stressfaktoren, wie Schwermetalle, UV-Strahlen oder Zytokine, induzierbar ist (Sikorski *et al.*, 2004). Verschiedene Studien zeigen, dass eine Expression von HO-1 sowohl bei akuten Nierenschäden, als auch bei chronischer Nierentoxizität eine schützende Funktion hat (Agarwal und Nick, 2000; Amin, *et al.*, 2004; Bedard *et al.*, 2005).

1.3.4.7 Vimentin

Vimentin (Vim) ist ein Intermediärfilament-Protein vom Typ 3 und dient somit der mechanischen Stabilität der Zelle. Es kommt in allen Zellen und Geweben mesenchymalen Ursprungs (Fibroblasten, Endothelzellen Chondrozyten) sowie in Tumorzellen vor und bildet dort ausgedehnte Filamentnetzwerke aus (Franke *et al.*, 1979; Wallin *et al.*, 1992). In normalen differenzierten Epithelzellen wird Vimentin nicht exprimiert, jedoch wird die Bildung infolge einer Schädigung des Tubulusepithels in undifferenzierten, regenerierenden Zellen induziert. Vimentin wird daher auch als Marker für Zellregeneration bezeichnet (Grone *et al.*, 1987; Witzgall, *et al.*, 1994; Yang, *et al.*, 2007).

1.3.4.8 Calbindin

Calbindin ist ein Vitamin D-abhängiges, Calcium-bindendes Protein und ist in Epithelzellen des distalen Tubulus der Niere lokalisiert. Dort ist es für die Wiederaufnahme von Calcium-Ionen aus dem Ultrafiltrat in die Zelle verantwortlich. In früheren Studien konnte

gezeigt werden, dass die Behandlung von Patienten mit Cisplatin und die Therapie der extrakorporalen Stosswellenlithotripsie und damit einhergehende Schädigung des distalen Tubulus zu erhöhten Konzentrationen von Calbindin im Urin und Serum führte. Somit könnte Calbindin als Biomarker für distale Tubulusschädigung dienen (Hasegawa *et al.*, 1993; Takashi *et al.*, 1998; Takashi *et al.*, 1996).

1.3.4.9 α -Glutathion-S-Transferase

Alpha-Glutathion-S-Transferase (GST- α) ist ein cytosolisches Biotransformationsenzym der Phase-II, welches im Entgiftungsprozess vieler Xenobiotika eine Rolle spielt, indem es die Konjugation eines Fremdstoffes mit Glutathion katalysiert. Es lässt sich in hohen Konzentrationen in Epithelzellen der proximalen Tubuli der Niere nachweisen. Ergebnisse früherer Studien, u.a. der „ILSI/HESI Nephrotoxicity Working Group“, konnten zeigen, dass infolge einer Schädigung des proximalen Tubulusepithels durch Nephrotoxine sowohl im Tier als auch im Menschen GST- α vermehrt in den Urin sezerniert wird (Branten *et al.*, 2000; Bruning *et al.*, 2001; Lebeau *et al.*, 2005; Thukral, *et al.*, 2005; Usuda *et al.*, 1998).

1.3.4.10 Cystatin-C

Der Cysteinprotease-Inhibitor Cystatin-C wird von den meisten kernhaltigen Zellen gebildet. Aufgrund der geringen Molekülmasse von 13 kDa wird Cystatin-C komplett glomerulär filtriert. Daher wird die Erhöhung der Serumkonzentration von Cystatin-C in der Klinik als Marker für eine eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate verwendet (Christensson *et al.*, 2003; Risch und Huber, 2002). Nach der glomerulären Filtration wird Cystatin-C im proximalen Tubulus reabsorbiert und nahezu vollständig katabolisiert. Bei einer Schädigung des proximalen Tubulus ist der Abbau von Cystatin-C gestört und das Protein wird in den Urin abgegeben. Eine Erhöhung von Cystatin-C wurde im Urin von Ratten nach Cadmium-Behandlung gemessen (Colle *et al.*, 1990). Auch Patienten mit tubulärer Dysfunktion zeigten im Gegensatz zu denen mit glomerulärer Erkrankung einen erhöhten Cystatin-C-Gehalt im Urin (Conti *et al.*, 2006).

1.3.4.11 β_2 -Mikroglobulin

Das Plasmaprotein β_2 -Mikroglobulin (β_2 M) wird als Teil des MHC-I Komplexes an der Oberfläche fast aller kernhaltigen Zellen exprimiert und wird von dort ins Blut abgegeben.

Wie Cystatin-C wird auch β_2 M aufgrund seines geringen Molekulargewichts von 12 kDA frei im Glomerulus filtriert, anschließend von den proximalen Tubuluszellen aufgenommen und lysosomal katabolisiert (Miyata *et al.*, 1998). Daher erscheint es ebenso wie Cystatin-C nach tubulärer Schädigung durch Nephrotoxine im Urin und wird daher als Marker für proximale Tubulusschäden geprüft (Gatanaga *et al.*, 2006; Hofstra *et al.*, 2008; Rached *et al.*, 2008).

1.3.4.12 Vascular Endothelial Growth Factor

„Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) ist ein potentes Zellmitogen, welches die Proliferation von Endothelzellen und die Angiogenese induziert sowie die Gefäßpermeabilität erhöht. In der humanen Niere wird es konstitutiv von Podozyten und Tubulusepithelzellen exprimiert (Whittle *et al.*, 1999). Nach Gabe der Nephrotoxine Cyclosporin-A und Tacrolimus an Ratten, waren die Gen- und Proteinexpression in den Nieren erhöht (Ogutmen *et al.*, 2006; Shihab *et al.*, 2001). Weiterhin wurden erhöhte Konzentrationen von VEGF im Urin nach akuter Nierentransplantatabstoßung sowie in Patienten mit akutem Nierenschaden im Vergleich zu Kontrollurinen detektiert (Peng *et al.*, 2007; Vaidya, *et al.*, 2008).

2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die Niere ist eines der wichtigsten Ziele Arzneimittel-induzierter Organtoxizität. Die Ausscheidung von Fremdstoffen erfolgt bei einer Vielzahl von Fremdstoffen renal, wobei während der Passage des Nephrons hohe Fremdstoffkonzentrationen erreicht werden können. Sowohl die hohe Durchblutung der Niere, als auch zahlreiche Transportmechanismen sorgen dafür, dass viele Arzneimittel aktiv in die Nierenepithelzellen aufgenommen werden und dort akkumulieren können (z.B. Gentamicin). Weiterhin besitzt die Niere zahlreiche Fremdstoff-metabolisierende Enzyme, welche an sich nicht toxische Stoffe zu reaktiven Metaboliten verstoffwechseln können. Zu den klassische Methoden zur Erkennung von Nierenschädigung gehören zum einen klinisch-chemische Untersuchungen (z.B. Serum-Kreatinin und Blutharnstoff, Veränderungen in der Ausscheidung von Markerenzymen wie alkalische Phosphatase, N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase), zum anderen die Histopathologie. Ein entscheidender Nachteil der bislang verfügbaren klinisch-chemischen Parameter ist die Tatsache, dass diese wenig sensitiv sind und erst dann Fremdstoff-induzierte Toxizität aufzeigen, wenn die Nierenfunktion bereits erheblich beeinträchtigt ist. Daher ist es für den Prozess der Arzneimittelentwicklung von großer Bedeutung, neue empfindliche Marker zu identifizieren, die toxische Wirkungen auf die Niere früher aufzeigen können.

Mit Hilfe von „omics“ Technologien (Genomics, Proteomics, Metabonomics) wurden in den letzten Jahren bereits eine Reihe potentieller Biomarker identifiziert, von denen es Hinweise gibt, dass sie Nierentoxizität früher und sensitiver voraussagen können als traditionelle Endpunkte für Nephrotoxizität. Zu diesen gehören u.a. Clusterin, Kim 1 (Kidney Injury Molekule-1), HO-1 (Hämoxygenase-1), Vimentin, Osteopontin und Timp-1 (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases-1), deren Expression im Tubulusepithel der Rattenniere nach Exposition gegenüber einer Reihe nephrotoxischer Substanzen, darunter Gentamicin und Cisplatin, im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht war.

Neben der veränderten Expression von Markergenen im Nierengewebe gilt ein besonderes Interesse einer Reihe von Proteinen, die infolge einer Nierenschädigung vermehrt in den Urin ausgeschieden werden und somit als nicht-invasive Biomarker dienen.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten diese potentiellen Biomarker anhand von Modellsubstanzen für Nephrotoxizität (Aristolochiasäure und Gentamicin , Abschnitt 4

und 5) sowie an Arzneistoffkandidaten, die aufgrund ihrer Nephrotoxizität in ihrer Entwicklung gestoppt wurden (Abschnitt 6) auf Gen- und Proteinebene untersucht werden und diese mit den konventionellen Methoden (Histopathologie und klinische Chemie) hinsichtlich ihrer Sensitivität verglichen werden. Zusätzlich sollten in Zusammenarbeit mit Projektpartnern aus der pharmazeutischen Industrie im Rahmen des InnoMed-PredTox-Projektes weitere potentielle neue Biomarker mit Hilfe von „omics“ Technologien identifiziert und anschließend verifiziert werden.

Durch solche frühen Marker hofft man, zeitintensive präklinische Studien zu verkürzen und damit auch die Kosten der Entwicklung der Substanzen sowie die Anzahl an Versuchstieren senken zu können.

3 MATERIAL & METHODEN

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

3.1 Tierexperimentelle Studien

Männliche Wistar-Ratten im Alter von 8-10 Wochen wurden von kommerziellen Anbietern bezogen. Die Tiere wurden nach der Ankunft in 5er-Gruppen in Makrolon-IV-Käfigen (Bayer Makrolon, Leverkusen, Deutschland) unter Standardbedingungen (Temperatur 21-23 °C, relative Luftfeuchtigkeit 45-55 %, 12-stündiger Tag-/Nacht-Rhythmus) gehalten. Wasser und Standardfutter (Ssniff, Soest, Deutschland) wurden ad libitum zur Verfügung gestellt. Die Behandlung der Tiere wird detailliert im jeweils dazugehörigen Kapitel beschrieben. Am darauffolgenden Tag der jeweils letzten Behandlung wurden die Tiere mit CO₂ narkotisiert und über Herzpunktion bzw. Genickbruch getötet. Urin wurde über 16 oder 24 h gesammelt, aliquotiert und bei -20°C für spätere Analysen gelagert. Blutproben wurden während des Versuches über die Schwanzvene oder retro-orbital bzw. am Tag der Tötung über Herzpunktion entnommen und das daraus gewonnene Serum ebenfalls in Aliquoten bei -20 °C gelagert. Nach Entnahme von Nieren und Leber, wurden diese mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung gewaschen. Aliquote der Leber und Nieren wurden in 4 % Formalinlösung eingelegt bzw. in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2 Klinische Chemie

Die Analyse der Parameter der klinischen Chemie wurde von den beteiligten Pharmaunternehmen und im Zentrallabor des Universitätsklinikums Würzburg (Universität Würzburg) am Vitros 700XR (Ortho-Clinical Diagnostics, Neckarsgemünd, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden Standardprotokolle unter Anweisung des Herstellers verwendet. Folgende Parameter wurden im Urin bestimmt: pH-Wert, Glucose, γ -Glutamyltransferase (GGT), Gesamtprotein, Kreatinin und die Osmolarität. Desweiteren wurde im Serum Kreatinin, Harnstoff, Gesamtbilirubin, Aspartat-Aminotransferase (AST),

Alanin-Aminotransferase (ALT), Alkalische Phosphatase (ALP), γ -Glutamyltransferase (GGT) und Gesamtprotein gemessen.

3.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Nieren- und Lebergewebe wurde sofort nach der Entnahme in Roti® Histofix 4 % (Phosphat-gepufferter 4 % Formaldehyd) fixiert. Danach wurde das Gewebe am Institut für Pathologie, Universität Würzburg, in Paraffin eingebettet.

Sowohl für die histopathologische Beurteilung als auch die immunhistochemischen Untersuchungen wurden Paraffinschnitte mit einer Schichtdicke von 4 μ m am Rotationsmicrotome (Leica RM 2165, Wien, Österreich) angefertigt. Um eine günstige Block-Konsistenz und somit eine bessere Schnittqualität zu erhalten, wurden die Paraffinblöcke auf -10 °C heruntergekühlt. Der hergestellte Schnitt wurde schwimmend in destilliertem Wasser auf einen 25 x 75 x 1,0 mm Objektträger (Superfrost® Plus, Menzel GmbH und Co KG, Braunschweig, Deutschland) positioniert, in einem ca. 40 °C warmen Wasserbad gestreckt und bei 40 °C im Brutschrank über Nacht getrocknet.

3.4 Anfertigung von Tissue-Microarrays (TMA)

Im Rahmen der PredTox-Studien wurden von Projektpartnern (Conway Institute, Universität College Dublin, Irland) Tissue-Microarrays (TMAs) angefertigt und für immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Durch die TMAs ist es möglich, verschiedene Gewebeproben einer Studie in einem einzigen Paraffinblock zu vereinigen. Dadurch ist es möglich, eine Vielzahl von Proben auf einem Objektträger zu untersuchen und somit den Materialverbrauch deutlich zu verringern. Weiterhin wird die Auswertung erleichtert, da die Färbeunterschiede zwischen den einzelnen Proben verringert sind. Ein weiterer Vorteil ist, dass der entsprechende Pathologe nur einen Objektträger begutachten muss.

Zur Herstellung der TMAs für eine Studie wurde pro Tier ein kleiner Gewebezylinder (Durchmesser: 0,6-2 mm) aus dem in Paraffin eingebetteten Nierengewebe ausgestanzt. Die erhaltenen 45 Nierenstücke wurden zusammen in einen neuen leeren Paraffinblock überführt (Abb. 3.1) (Mulrane *et al.*, 2008).

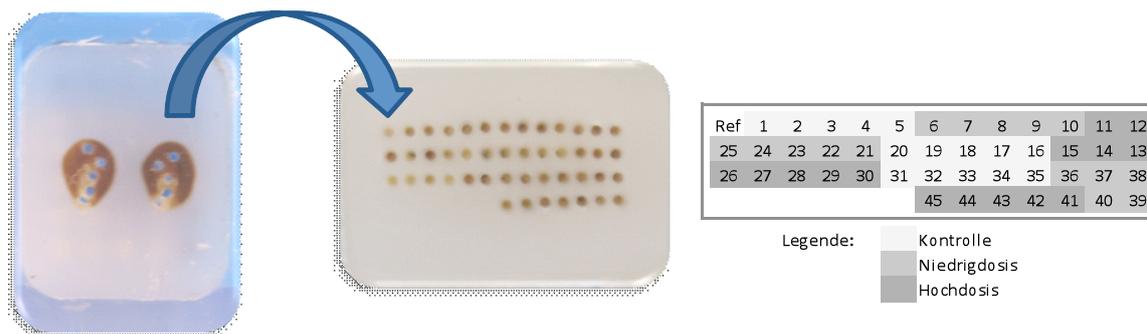


Abb. 3.1 Anfertigung und Layout der Tissue-Microarrays

3.5 Histopathologie

- **Roti®Histol** (Xylol-Ersatz)
- **100 % Ethanol**
- **70 % Ethanol** (verdünnt mit Millipore-H₂O)
- **Hämatoxylin:** 1 g Hämatoxylin, 200 mg NaIO₃, 50 g KAl(SO₄)₂, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure ad 1000 ml H₂O
- **Eosin**
- **Eukitt®** (Einschlussmedium) (Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

4 µm dicke Paraffinschnitte wurden für die histopathologische Begutachtung mit Hämatoxylin und Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt. Mit diesem Gemisch lassen sich acidophile und basophile Strukturen in biologischen Geweben darstellen. Dabei werden die Zellkerne blauviolett und Zytoplasma und Kollagenfasern durch Eosin rosa gefärbt. Dazu wurden die Schnitte über eine absteigende Ethanolreihe (3 x 4 min Roti®Histol, 3 x 2 min 100 % Ethanol, 1 x 2 min 70 % Ethanol) entparaffiniert. Nach 4-maligem Waschen mit demineralisiertem Wasser wurden die Objektträger für 10 min in Hämatoxylin-Lösung überführt und erneut für 10 min mit fließendem Leitungswasser gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Schnitte für 40 sec in Eosinlösung gefärbt und 2 x je 30 sec in demineralisiertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Objektträger über eine aufsteigende Ethanolreihe (1 x 1 min 70 % Ethanol, 4 x 2 min 100 % Ethanol, 2 x 3 min Roti®Histol) entwässert und mit Eukitt® unter Verwendung von Deckgläsern eingebettet. Die mikroskopische Beurteilung der HE-Schnitte erfolgte durch die Pathologen Dr. Gordon Hard (Aristolochiasäure) (Private Consultant, Tairua, Neuseeland) und Dr. John Callanan

(Gentamicin) (Universität College, Dublin, Irland). Nierenschnitte der PredTox-Studien wurden von Firmen-internen Pathologen begutachtet.

3.6 Immunhistochemische Untersuchungen

- **Roti®Histol** (*Xylol-Ersatz*)
- **100 % Ethanol**
- **70 % Ethanol** (hergestellt mit Millipore-H₂O)
- **10 x PBS (pH 7,4)** (*Phosphate Buffered Saline*): 2 g KCl, 82 g NaCl, 5,72g Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 2 g KH₂PO₄ ad 1000 ml H₂O
- **1 x PBS**: 100 ml PBS ad 1000 ml H₂O
- **Citratpuffer (pH 6,0)**: 2,1 g Zitronensäure x H₂O ad 1000 ml H₂O
- **0,1 % Trypsin**: 1 Trypsin-Tablette (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) / ml Millipore-H₂O
- **30 % H₂O₂**
- **0,05 % Avidin**: 1 mg Avidin (Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 2 ml 1 x PBS
- **0,05 % Biotin**: 1 mg Biotin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 2 ml 1 x PBS
- **Albumin Fraktion V**
- **Ziegenserum** (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
- **Esenserum** (Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)
- **Vectastain®-Elite ABC Reagenz** (Vector Laboratories; Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)
- **DAB Substrate Kit** (Vector Laboratories; Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)
- **Hämatoxylin**: 1 g Hämatoxylin, 200 mg NaIO₃, 50 g KAl(SO₄)₂, 50 g Chloralhydrat, 1 g Zitronensäure ad 1000 ml H₂O
- **Eosin**
- **Dakopen®** (*Fettstift*) (DAKO, Hamburg, Deutschland)

Tabelle 3.1 Verzeichnis der für die Immunohistochemie verwendete Primärantikörper

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung	DAB-Einwirkzeit
Kim-1	R&D Systems	Ziege	1 : 200	60 s
Clusterin	Santa Cruz	Ziege	1 : 200	120 s
Lipocalin-2	R&D Systems	Ziege	1 : 150	70 s
Timp-1	Acris	Kaninchen	1 : 400	90 s
Vimentin	Santa Cruz	Maus	1 : 800	60 s

Tabelle 3.2 Verzeichnis der für die Immunohistochemie verwendeten Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung
Kaninchen IgG	Vector Lab.	Ziege	1 : 200
Maus IgG	Santa Cruz	Ziege	1 : 200
Ziege IgG	Santa Cruz	Esel	1 : 200

Für die immunhistochemische Detektion wurden die angefertigten Schnitte (Vgl. Kapitel 3.1.) und TMAs (Vgl. Kapitel 3.2.) für 1 Stunde im Trockenschrank (Memmert, Schwabach) bei 60 °C angetrocknet, um ein Ablösen vom Objektträger zu vermeiden. Diese beiden Schritte wurden bei der Detektion von Vimentin, Kim-1 und Clusterin nicht durchgeführt. Danach wurden die Schnitte je 4 x 3 Minuten in Roti®-Histol entparaffiniert, je 2 Minuten in 2 x 100 % Ethanol und 70 % Ethanol rehydriert und anschließend dreimal für je 5 Minuten in 1 x PBS gewaschen. Da aufgrund von Quervernetzungsreaktionen durch die Fixierung mit Formaldehyd der Zugang des primären Antikörpers zu seinem Reaktionspartner erschwert wird, wurde eine Demaskierung der Antigene durch 4 minütiges Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) in einem Schnellkochtopf durchgeführt. Danach wurden die Objektträger durch langsamen Zulauf von kaltem Wasser abgekühlt und dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Zwischen dem ersten und zweiten Waschschrift wurde die Schnitte mit einem Fettstift (Dako Pen®, Dako, Hamburg, Deutschland) umfahren, damit sich die folgenden Lösungen anstatt auf dem gesamten Objektträger nur auf dem Präparat verteilen (hydrophobe Abgrenzung). Anschließend wurde eine weitere Demaskierung mittels enzymatischem Verdau durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte mit einer 0,1 % Trypsinlösung für exakt 2 Minuten bei 37 °C im Trockenschrank behandelt. Zum Abstoppen der Enzymaktivität wurden die Schnitte mehrmals in 1 x PBS getaucht,

vorsichtig abgetropft und in ein feuchte Kammer (Rotilabo®-Färbekammer, Roth, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Um unspezifische Bindungsreaktionen des Primärantikörpers an freien reaktiven Gewebsantigenen zu blockieren, wurden die Schnitte im Anschluss für 1 Stunde bei Raumtemperatur (RT) mit 10 % Ziegen Serum bzw. 5 % Esel Serum in PBS inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit 1 x PBS zu je 3 Minuten wurden die Schnitte mit 3 % H₂O₂ in 1 x PBS bei RT für 15 Minuten inkubiert, um die endogene Peroxidaseaktivität in den Geweben zu blockieren und zu inaktivieren. Aufgrund eines hohen Gehaltes von endogenem Biotin in Nierengewebe wurde dieses mit Hilfe von Avidin und Biotin blockiert, um die Hintergrundfärbung zu minimieren. Dazu wurden die Präparate jeweils für 15 Minuten mit 0,001 % Avidinlösung und 0,001 % Biotinlösung bei RT inkubiert. Zwischen den einzelnen Behandlungsschritten wurden die Schnitte jeweils 2 x 5 Minuten in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte das Aufbringen des primären Antikörpers in der entsprechenden Verdünnung in 5 % Ziegen Serum/PBS bzw. 5 % Esel Serum/PBS (Tab. 3.1) und Inkubation in der feuchten Kammer bei 4°C über Nacht. Als Negativkontrolle diente Normalserum.

Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS gespült und mit dem biotinylierten sekundären Antikörper (Tab. 3.2) in einer Verdünnung von 1:200 in PBS für 45 Minuten bei RT inkubiert. Nach 3 x 5 Minuten Waschen in PBS wurden die Schnitte mit Avidin-Biotinylierter-Meerrettichperoxidase-Komplex (Vectstain®-Elite ABC Reagent) für 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend erneut 2 x 5 Minuten mit PBS gewaschen. Durch die außergewöhnlich hohe Affinität und Bindungskapazität des Proteins Avidin zu dem niedermolekularen Vitamin Biotin wird an dieser Stelle eine große Anzahl von Peroxidase-Molekülen eingebracht und damit eine Verstärkung der Farbreaktion hervorgerufen. Anschließend wurden die Präparate mit DAB-Chromogen (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid) (Zeitangabe siehe Tab. 3.2) gefärbt. Dabei reagiert die Peroxidase nun mit dem Wasserstoffperoxid und dem Chromogen (DAB) zu braunen Farbmolekülen, die am Ort des Antigens präzipitieren und letztendlich Lokalisation des Proteins im Gewebe sichtbar machen. Nachdem die Schnitte kurz in Leitungswasser gespült wurden, wurden sie zweimal für 3 Minuten mit demineralisiertem Wasser gewaschen und dann zur Färbung der Zellkerne für 5 Minuten in Hämatoxylin-Lösung getaucht. Im Anschluss wurden die Schnitte für 5 Minuten mit fließendem Leitungswasser und demineralisiertem Wasser gespült. Abschließend erfolgte

die Dehydrierung über eine aufsteigende Ethanolreihe. Dazu wurden die Präparate zunächst für 1 Minute in 70 % Ethanol und viermal je 2 Minuten in 100 % Ethanol getaucht. Nach der Reinigung mit Roti®-Histofix (2 x 3 Minuten) wurden die Schnitte unter Verwendung von 24 x 60 mm Deckgläsern (Roth, Karlsruhe, Deutschland) sofort mit Eukitt® eingedeckt.

3.7 Western-Blot-Analyse

Beim Western-Blot-Verfahren werden isolierte Proteine auf einer Membran immobilisiert, um sie danach mit spezifischen Antikörpern detektieren zu können. Dazu werden die aus dem Gewebe isolierten Proteine mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt, anschließend auf eine geeignete Matrix transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

3.7.1 Proteinisolierung aus Nierengewebe

- **Ripa-Lysepuffer (pH 7,4):** 88 mg Tris-HCl, 877 mg, 1 ml Nonidet P-40, 250 mg Nadesoxycholat, 1 ml 100 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) ad 100 ml H₂O (am Versuchstag werden noch 5 µl 200 mM NaF, 5 µl 200 mM Na₃VO₄ µl Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) / 1 ml RIPA-Lysepuffer zugegeben)

Zum Nachweis der Biomarker mittels Western-Blot-Analyse, wurden circa 200 mg gefrorenes Nierengewebe mit 1 ml eiskaltem RIPA-Lysepuffer versetzt und mit dem Ultra-Turrax-T8 (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend 5-mal durch eine 26G Nadel (Hartenstein, Würzburg, Deutschland) gezogen und danach für 15 Minuten bei 4 °C mit einer Umdrehung von 14000 U/min zentrifugiert (Zentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem DC-Assay

- **Rinderserumalbumin-Stammlösung (BSA):** 1,49 mg/ml
- **DC-Assay** (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)

Der Proteingehalt des Homogenats wurde mit Hilfe des DC Protein Assays nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951) bestimmt. Dabei handelt es sich um eine zweiphasige kolorimetrische Proteinbestimmung. Im ersten Schritt reagieren die Proteine im alkalischen Milieu mit Kupfer(II)-Ionen unter Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes. Daraufhin wird das zwei-wertige Kupfer zu ein-wertigem reduziert. Dieses wiederum reduziert die im gelben Folin-Reagenz enthaltenen Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren zum vier-wertigen Molybdänblau, dessen gemessene Absorption annähernd proportional zur Proteinkonzentration ist. Vom Proteinstandard Rinderserumalbumin (BSA) wurde eine Eichgerade mit 5 Verdünnungen im Bereich von 0-1490 µg/ml hergestellt. Nach Zugabe aller Reagenzien und 15 minütigen Inkubation wurde die Absorption am UV/VIS Spectrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) gegen einen Leerwert bei einer Wellenlänge von 750 nm photometrisch gemessen.

3.7.3 Probenvorbereitung

- **2 x Laemmli-Probenpuffer** (Laemmli, 1970)(Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- **6 x Probenpuffer (pH 6,8):** 12% SDS, 50% Glycerol, 25 % 2-Mercaptoethanol, 0,002 % Bromphenolblau, 250 mM Tris-HCl

Die Gewebekomogenate wurden mit Lysepuffer auf eine Proteinkonzentration von 4 µg/ml eingestellt. Danach wurden sie in 2 x Laemmli-Proben-Puffer aufgenommen.

Zum Nachweis der Proteinbiomarker im Urin wurden die Urinproben mit Millipore-H₂O auf einen einheitlichen Kreatininwert von 20 mg/dl eingestellt und mit 6 x Probenpuffer verdünnt. Anschließend wurden die Proben für 5 min aufgekocht, abzentrifugiert und auf Eis abgekühlt.

3.7.4 Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

- **Rotiphorese-Protogel (Roth):** 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid
- **Sammelgelpuffer (pH 6,8):** 0,5 M Tris
- **Trenngelpuffer (pH 8,8):** 1,5 M Tris
- **10 x Laufpuffer (pH 8,3):** 250 mM Tris-Base, 1,92 M Glycin, 1 % SDS
- **1 x Laufpuffer:** 100 ml Laufpuffer ad 1000 ml H₂O
- **10 % Ammoniumpersulfat (APS)**
- **10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)**
- **Temed** (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin)
- **peqGOLD Protein Marker IV** (*Molekulargewichtstandard für Proteine*) (PeqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)
- **Isopropanol**

Die Auftrennung des Gesamtproteins erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels vertikaler SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Dabei werden die Proben in einem 6 % Sammelgel konzentriert und im Anschluss in einem höher konzentrierten Trenngel elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die 1 mm dicken Gele wurden in 2 Arbeitsschritten mit dem Dual-Gel-Caster (Hoefer San Francisco, USA) hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel (Tabelle 3.3) bis circa 3 cm unter den Plattenrand gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde der Isopropanol abgenommen, das Sammelgel (Tabelle 3.3) auf das Trenngel gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Die auspolymerisierten Gele wurden in die Minigel-Apparatur (BioRad, München, Deutschland) überführt und mit 1 x Laufpuffer überschichtet.

Jede Geltache wurde mit 10 µg Protein bzw. 10 µl Urinlösung beladen. Zur Größenbestimmung diente ein Molekulargewichtstandard in einem Bereich von 10-170 kDa. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V, wobei sich die Dauer des Laufes nach der Proteingröße und Zusammensetzung des Gels richtete.

Tabelle 3.3 Zusammensetzung eines Polyacrylamidgeles für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Reagenz	Sammelgel (6 %)	Trenngel (12,5 %)	Trenngel (16 %)
Demineralisiertes H ₂ O	4,0 ml	6,2 ml	3,9 ml
0,5 M Tris (pH 6,8)	0,125 ml	-	-
1,5 M Tris (pH 8,8)	-	5,0 ml	5,0 ml
Acylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	0,80 ml	8,3 ml	10,60 ml
SDS (10%)	0,05 ml	0,2 ml	0,2 ml
APS (10%)*	0,05 ml	0,2 ml	0,2 ml
TEMED*	0,005 ml	0,02 ml	0,02 ml

(*Starter der Polymerisation)

3.7.5 Western-Blotting

- **Transferpuffer:** 3 g/l Tris-Base, 14,4 g/l Glycin, 20 % Methanol

Im Anschluß an die SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Protran® Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher & Schuell, Hartenstein, Würzburg, Deutschland) übertragen. Der Transfer auf die Membranoberfläche erfolgte auf elektrochemischem Wege, wobei die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran interagieren. Die Polyacrylamid-Gele, Schwämme, Filterpapiere und Nitrocellulosemembranen wurden zunächst für 15 Minuten in Transferpuffer eingelegt. Danach wurde die sandwichartige Transferapparatur (Abb. 3.2) aufgebaut.

**Abb. 3.2** Schematische Darstellung der „Sandwich“-Apparatur für den Nassblot

Der Proteintransfer erfolgte unter Rühren und Kühlung in einer mit Transferpuffer gefüllten Blot-Apparatur (Mini Protean II, BioRad, München, Deutschland) bei 100 V für 75 Minuten.

3.7.6 Ponceau-S-Färbung der Membranen

- **Ponceau-Lösung:** 0,1 g Ponceau-S-Farbstoff, 5 ml Essigsäure ad 100 ml H₂O

Der Erfolg des Proteintransfers auf die Membran wurde anschließend durch eine reversible Ponceau-Färbung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) visualisiert. Dazu wurden die Nitrocellulosemembranen für 1 min in der Färbelösung belassen und solange mit demineralisiertem Wasser schrittweise entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden sichtbar waren. Zur Dokumentation wurden die angefärbten Membranen fotokopiert und anschließend vollständig mit demineralisiertem Wasser entfärbt.

3.7.7 Detektion von Proteinen

- **10 x TBS (pH 7,4)** (*Tris Buffered Saline*): 50 mM Tris, 150 mM NaCl
- **TBST:** 100 ml 10 x TBS, 1 ml Tween 20 ad 1000 ml H₂O
- **Blockierungslösung:** 5 % Milchpulver in TBST
- **ECL-Detection Reagent 1 und 2** (GE-Healthcare, München, Deutschland)

Tabelle 3.4 Verzeichnis der verwendeten primären Antikörper für die Western-Blot-Analyse

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung
Kim-1	ICL Lab	Ziege	1 : 1000
Clusterin	Santa Cruz	Ziege	1 : 1000
Lipocalin-2	R&D Systems	Ziege	1 : 1000
β-Aktin	Sigma-Aldrich	Maus	1 : 20000
AGAT	Prof. Theo Wallimann, ETH Zürich	Kaninchen	1 : 2000
Peroxiredoxin-1	R&D Systems	Ziege	1 : 5000
Catalase	Calbiochem	Kaninchen	1 : 1000
Gluthathion- peroxidase-1	R&D Systems	Ziege	1 : 1000
PEPCK-1	Cayman	Kaninchen	1 : 1000
PRBP-4	Alexis	Kaninchen	1 : 2000
Moesin	AbD Serotec	Ziege	1 : 500

Tabelle 3.5 Verzeichnis für die verwendeten Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörper

Antikörper	Firma	Spezies	Verdünnung
Kaninchen IgG	Santa Cruz	Ziege	1 : 5000
Maus IgG	Santa Cruz	Ziege	1 : 5000
Ziege IgG	Santa Cruz	Esel	1 : 5000

Um die freien Bindungsstellen zu sättigen wurde die Membran für 2 Stunden bei RT in Blockierlösung geschüttelt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C (Schüttler). Dafür wurde die entsprechende Menge Antikörper (Tab. 3.4) in 10 ml Blockierlösung verdünnt.

Der überschüssige und nicht gebundene Antikörper wurde in drei aufeinanderfolgenden Waschsritten zu je 15 min mit 0,1 % TBST auf dem Schüttler bei RT entfernt. Nach Zugabe des sekundären, an Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten Zweitantikörpers (Tab. 3.5) erfolgte die Inkubation für 1 Stunde bei RT auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut dreimal mit der Waschlösung 0,1 % TBST gewaschen.

Um den Komplex aus Zielprotein und Antikörper visualisieren zu können, wurde ECL-Detection Reagent 1 und 2 (GE-Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Bei dieser sogenannten *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) wandelt die am sekundären Antikörper gebundene Peroxidase das Substrat Luminol in seine oxidierte Form um, wobei es zu einer Lichtemission kommt, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden kann.

Für die Detektion wurden die Reagenzien 1 und 2 zu gleichen Teilen gemischt und für 1 min auf die Membran aufgetragen. Danach wurde in der Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Hyperfilm™, GE Healthcare, München, Deutschland) auf die Membran gelegt, für einige Zeit belichtet und automatisch über die Entwicklungsappartur (Kodak X-OMAT 1000, Stuttgart, Deutschland) entwickelt. Für die densitometrische Auswertung der sichtbaren Banden, wurde die Geldokumentationsanlage (GelDoc 2000, Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Dazu wurden die Proteinbanden markiert und die Pixeldichte unter Berücksichtigung des Hintergrundes mit Hilfe der Software berechnet. Die Pixeldichte (OD) der behandelten Tiere wurde auf die dazugehörigen Kontrollen normalisiert.

3.8 Nachweis neuer Biomarker durch qRT-PCR

3.8.1 Gewinnung der RNA aus Nierengewebe

3.8.1.1 Allgemeiner Umgang mit RNA

RNA ist im Gegensatz zu DNA sehr instabil. Daher ist es bei der Isolation besonders wichtig, die sehr stabilen RNasen möglichst schnell zu inaktivieren und somit die Qualität und Ausbeute der RNA zu erhöhen. Alle Lösungen wurden in RNase-freien Gefäßen angesetzt. Dazu wurde Glasmaterial für die Dauer von 3 h einer Temperatur von 200 °C ausgesetzt. Weiterhin wurden zum Pipettieren ausschließlich RNase-freie Filterspitzen verwendet und alle Oberflächen und Laborausrüstungen mittels RNase Away (Molecular BioProducts, San Diego, USA) gereinigt. Alle Arbeitsschritte wurden, soweit nicht anders erwähnt, auf Eis durchgeführt.

3.8.1.2 RNA-Isolierung mittels saurer Phenol-Chloroform-Extraktion (Trizol)

- **Total-RNA-Isolierungsreagenz (TRIR, Trizol)** (Thermo Fisher Scientific, Hamburg, Deutschland)
- **Chloroform**
- **Isopropanol**
- **75 % Ethanol**
- **RNase-freies DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H₂O**
- **RNase AWAY (Dekontaminationsmittel)** (Molecular BioProducts, San Diego, USA)

Zunächst wurde 50-100 mg gefrorenes Nierengewebe in einen manuellen Teflon-Glas-Homogenisator gegeben, mit 1 ml Total-RNA-Isolierungsreagenz (TRIR) versetzt und homogenisiert. Dieses Aufschlussreagenz enthält zum einen Guanidinthiocyanat (GITC), welches durch seinen chaotropen Charakter die Zellen des Gewebes lysiert und RNasen inaktiviert, sowie Phenol, in dem sich DNA und Proteine lösen. Das Gewebehomogenat wurde in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und für 10 Minuten 10800 U/min unter Kühlung (4 °C) zentrifugiert (Hettich® Universal 16R, Tuttingen, Deutschland). Nach Überführung des Überstandes in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß, wurden 200 µl Chloroform hinzugeben, diese Lösung 5 min inkubiert und erneut für 15 min zentrifugiert, wodurch sich das Homogenat in 3 Phasen auftrennte. In der unteren hydrophoben

Phenol-Chloroform-Phase befinden sich die Proteine und DNA, während die RNA in der oberen hydrophilen Phase gelöst vorliegt. Diese klare wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein autoklaviertes 2 ml-Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 450 µl Isopropanol wurde die RNA präzipitiert. Dafür wurden die Proben gut vermischt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 10800 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das sich am Boden befindende braune gelartige RNA-Präzipitat 2 x mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen (7000 U/min, 4 °C, 5 min), um Isopropanol- und Salzreste zu entfernen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Ethanol komplett abgenommen und noch vorhandene Flüssigkeit mit einem sterilen Wattestäbchen aufgesaugt. Danach wurde das Pellet für 15 Minuten unter dem Abzug luftgetrocknet, in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und im Anschluss für 10 min im Heizblock (Dri-Block DB-2A, Techne, Burlington, USA) auf 60 °C erhitzt. Die gelöste RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.8.1.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte am Spektralphotometer (UV-1601, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) durch Messung der optischen Dichte in Quarzküvetten. Dafür wurde die isolierte RNA 1:70 mit RNase freiem H₂O verdünnt und anschließend bei einer Extinktion von 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine) gegen den Leerwert gemessen. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm dient zur Beurteilung eventueller Proteinkontaminationen und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Da die optische Dichte bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht, wurde zur Berechnung der RNA-Konzentration [µg/ml] folgende Formel verwendet:

$$\text{RNA } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40 \times V$$

(A = Extinktion bei 260 nm; V = Verdünnungsfaktor [70])

3.8.1.4 Integritätsprüfung der RNA durch Agarosegelelektrophorese

- **Agarose NEE0**
- **10 x MOPS (pH 7,0)** (*Morpholinopropansulfonsäure-Puffer*): 41,9 g MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure), 4,10 g Natriumacetat, 3,72 g ETDA ad 1000 ml H₂O
- **1 x MOPS**

- **RNA-Probenpuffer:** 1 ml 10 x MOPS, 5 ml Formamid, 37 % Formaldehyd
- **10 x RNA-Ladepuffer (pH 8,0):** 2,5 ml Glycin, 250 µl Bromphenolblaulösung, 10 µl EDTA ad 5 ml H₂O
- **37 % Formaldehyd**

Zur Herstellung des Agarosegels wurden 1,2 g Agarose in 85 ml autoklaviertem Wasser gelöst, kurz in der Mikrowelle (30 sec, 600 W) aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Danach wurden 5 ml 37 % Formaldehyd und 10 ml 10 x MOPS zugegeben. Durch kurzes Schwenken wurde die Gellösung gemischt, in die Gelkammer gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Das Gel wurde nach der Polymerisation in eine horizontale Laufkammer eingesetzt und mit 1 x MOPS überschichtet.

Je 2 µg RNA (gelöst in 4,7 µl H₂O) wurden mit 15,3 µl RNA-Probenpuffer und 2 µl RNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Im Anschluss daran erfolgte die 1-stündige Gelelektrophorese bei 80 V. Nach der Auftrennung der RNA wurde das Gel für 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (5 µl/100 µl H₂O) gefärbt und die visualisierten Banden unter UV-Licht detektiert (Geldokumentationsanlage, GelDoc 2000, Bio-Rad, Deutschland).

3.8.1.5 RNA-Aufreinigung mittels Spinsäulenttechnologie

- **RNeasy Mini Kit:** (Qiagen, Hilden, Deutschland)
(vor Beginn wurde der RPE-Puffer (5 x Konzentrat) mit Ethanol 1:5 verdünnt und dem RLT-Puffer noch 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml Puffer zugesetzt)
- **RNase free DNase Set** (Quiagen, Hilden, Deutschland)
- **RNase freies Wasser**
- **99 % Ethanol**
- **RNase AWAY** (Molecular BioProducts, San Diego, USA)
- **β-Mercaptoethanol**

Eine Methode zur weiteren Aufreinigung von RNA bietet das RNeasy Mini Kit (Firma Qiagen, Hilden Deutschland). Diese beruht auf der Bindung der RNA an eine Silika-Gel-Membran.

Dazu wurden zunächst 70-90 µg isolierte Gesamt-RNA (s. Kap. 3.8.1.2) verwendet und diese mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Als nächstes

wurden 350 µl GITC-haltiger Lysepuffer RLT und 250 µl 99 % Ethanol zugegeben und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vermischt. Dabei werden RNasen inaktiviert und eine selektive Bindung der RNA an die Kieselgel-Membran unterstützt. Danach wurde die RNeasy-Spin-Säule mit der Probe (700 µl) beladen und bei 8000 U/min für 15 sec bei RT zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Dabei bindet die RNA an die Membran und das Eluat wird verworfen. Um zusätzlich noch letzte DNA-Kontaminationen zu entfernen, erfolgte als nächstes ein *on column* (auf der Säule) DNA-Verdau mit dem RNase free DNase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dafür wurde zuerst 350 µl RW1-Puffer (15 sec, 8000 U/min) und dann 80 µl DNase (1:8 in RDD-Puffer verdünnt) auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und zentrifugiert (15 sec, 8000 U/min). Nun wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt und mehreren Waschschritten unterzogen. Diesbezüglich wurde zunächst mit 500 µl (5 sec, 8000 U/min) und dann mit 350 µl RPE-Puffer gewaschen (1 min, 8000 U/min). Die Säule wurde auf ein neues Sammelröhrchen gesteckt und zur Trocknung der Kieselgel-Membran für 1 min bei 14000 zentrifugiert. Für die Elution der RNA wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß gesetzt und nach zweimaliger Zugabe von je 30 µl RNase-freiem Wasser (im Kit enthalten) auf die Membran für je 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Abschließend erfolgte erneut die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration (Vgl. Kap. 3.8.1.3). Die gereinigte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.8.2 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase

- **1st Strand Synthesis Kit** (Thermo Fisher Scientific, Hamburg, Deutschland)

Die Umschreibung der RNA in cDNA wurde mit dem 1st Strand Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Dazu wurde 1 µg total-RNA (s. Kap. 3.8.1.5) je Reaktionsansatz eingesetzt und in einem PCR-Tube mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 11 µl aufgefüllt. Weiterhin wurde 1 µl *Random decamers* zupipettiert, die Probe vorsichtig gemischt und anschließend für 5 min bei 70 °C Thermocycler (PTC-100™ Programmable Thermal Controller MJ Research, Waltham, USA) inkubiert. Die PCR-Gefäße wurden sofort auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde zu jeder Probe 8 µl Mastermix (Zusammensetzung: Tabelle 3.6) gegeben und erneut gut gemischt. Für die

Reverse Transkription (cDNA-Synthese) wurden die Proben für 50 min auf 47 °C im Cycler erhitzt. Danach wurde die Temperatur für 10 min auf 75 °C erhöht, um das Enzym „Reverse Transkriptase“ zu inaktivieren. Die entstandenen cDNA-Proben wurden abschließend durch Zugabe von 80 µl RNase-freiem Wasser 1:5 verdünnt. Die Negativkontrolle wurde in der gleichen Weise behandelt, jedoch wurde in dem Maternix das Enzym Reverse Transkriptase durch 1 µl RNase-freies Wasser ersetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bis zur Weiterverwendung bei -20°C.

Table 3.6 Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

Reagenz	Volumen / Reaktion
5 x 1 st strand buffer	4 µl
dNTP mix	2 µl
Reverse-iT TM RTase blend	1 µl
DTT 100 mM	1 µl

3.8.3 Quantitative Real-Time PCR

- **2 x Absolute QPCR SYBR Green Mix** (Thermo Fisher Scientific, Hamburg, Deutschland)
- **RNase freies Wasser**
- **14 µM Vorwärts-Primer (FW)**
- **14 µM Rückwärts-Primer (RV)**

Table 3.7 Zusammensetzung des Mastermixes für die Real-Time-PCR (pro Probe)

Reagenz	Volumen / Reaktion	Endkonzentration
2 x Absolute QPCR SYBR Green Mix	10,00 µl	1 x
FW Primer (14 µM)	0,15 µl	0,105 µM
RV Primer (14 µM]	0,15 µl	0,105 µM
Rnase-freies H2O	7,70 µl	

Tabelle 3.8 Oligonukleotide für die Real-Time-PCR; Abkürzungen: FW, forward (vorwärts), RV, reverse (rückwärts)

Gen-Symbol	Gen-Name	Primersequenz (5'-3')	Referenz
Lcn2	Lipocalin-2	FW: TCTGGGCCTCAAGGATAACAAC RV: TCTGGGCCTCAAGGATAACAAC	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
Kim-1	Kidney Injury of Molecule-1	FW: GTGAGTGGACCAGGCACACA RV: AATCCCTTGATCCATTGTTTTCTT	(Zhou <i>et al.</i> , 2008)
Timp-1	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1	FW: AATCAAGATGACTAAGATGCTCAAAGG RV: GGCCGCGATGAGAACT	(Bolbrinker <i>et al.</i> , 2006)
Clu	Clusterin	FW: CACTACGGGCCTCTGAGCTT RV: ACGTCCATGGCCTGTTGAG	(Luhe <i>et al.</i> , 2003)
HO-1	Hämoxygenase-1	FW: CTAAGACCGCCTTCTGCT RV: CCTCTGGCGAAGAACTCTG	(Rached, <i>et al.</i> , 2008)
OPN	Osteopontin	FW: CCAGCACACAAGCAGACGTTT RV: CAGTCCGTAAGCCAAGCTATCA	(Amin, <i>et al.</i> , 2004)
Vim	Vimentin	FW: GATGCTCCAGAGGGAAG RV: AAGGTCAAGACGTGCCAGAG	(Rached, <i>et al.</i> , 2008)
Actb	β -Aktin	FW: GGGAAATCGTGCCTGACATT RV: GCGGCAGTGGCCATCTC	(Depreter <i>et al.</i> , 2002)
18s rRNA	18s ribosomale RNA	FW: GTAACCCGTTGAACCCATT RV: CCATCCAATCGTTAGTAGCG	designed mittels Primer Express® Software, Applied Biosystems, Forster City, USA

In einer 96-well Platte (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden pro well 2 μ l cDNA vorgelegt und mit 18 μ l Mastermix, (Zusammensetzung Tab. 3.7) versetzt. Der im Mastermix enthaltene Cyanin-Farbstoff SYBR-Green bindet an doppelsträngige DNA und die Fluoreszenz des resultierenden DNA-Farbstoff-Komplexes wird gemessen.

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 3.8 angegeben.

Anschließend wurde die Platte mit einer Klebefolie verschlossen, für 15 sec bei 2000 U/min zentrifugiert (Labofuge GL, Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland) und in den LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) überführt. Den Amplifikationszyklen ging eine Aktivierung der Taq-Polymerase für 15 Minuten bei 95 °C voraus. Der eigentliche Amplifizierungszyklus bestand aus der Denaturierung für 15 Sekunden bei 95 °C, der Primer-Hybridisierung (*Annealing*) bei 60 °C für 30 Sekunden und der anschließenden Strangsynthese (*Elongation*) für 30 Sekunden bei 72 °C. Im Anschluss an die 45 Amplifikationszyklen wurde das entstandene Produkt einer Schmelzkurvenanalyse unterzogen. Dazu wurde es erneut bei 55 °C hybridisiert und anschließend mit einer Heizrate von 0,5 °C/5 sec auf 95 °C erwärmt. Die PCR-Produkte wurden bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur denaturiert und der temperaturabhängige

Fluoreszenzabfall gemessen. Zur Analyse der Daten wurde die LightCycler® 480 Software von Roche (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels $\Delta\Delta$ ct-Methode.

3.9 Quantitative Proteinbestimmung im Urin durch Singleplex-ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) ist ein quantitatives immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Dabei ist der Sandwich-ELISA der am häufigsten benutzte Immunassay. Bei dieser Methode werden 2 Antikörper verwendet, die beide spezifisch an das Antigen binden. Der Primärantikörper (Einfang-Antikörper) wird auf eine spezielle Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden (*gecoatet*), danach wird die Probe mit dem zu untersuchenden Antigen (Protein) zugegeben und anschließend mit einem Sekundärantikörper (Detektions-Antikörper) versetzt. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym (Peroxidase) gekoppelt, welches im letzten Schritt des ELISAs ein Substrat (TMB, Tetramethylbenzidin) umsetzt und damit zu einem sichtbaren Farbumschlag führt. Nach einer definierten Zeit wird die Farbentwicklung durch Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt. Die Platte wird im Anschluss in einem Spektralphotometer ausgewertet. Durch die Farbentwicklung und die vorhandene Standardkurve können verschiedene Proben quantitativ auf den Gehalt des gesuchten Proteins untersucht werden.

3.9.1 Lipocalin-2

- **Coating-Puffer (pH 9,6):** 3,03 g Na_2CO_3 , 6,09 g NaHCO_3 ad 1000 ml H_2O
- **PBS (pH 7,4):** 1,16 g Na_2HPO_4 , 0,1 g KCl, 0,1 g K_3PO_4 , 4,00 g NaCl ad 500 ml H_2O
- **Blockierungspuffer:** 1 % BSA in PBS
- **Verdünnungspuffer:** 1 % BSA in PBS
- **PBS-T-Waschpuffer:** 0,05 % Tween 20 in PBS
- **Primärantikörper:** Monoklonal Maus-NGAL (anti-Maus, anti-Ratte) (Bioporto Diagnostic, Dianova, Hamburg, Deutschland)
- **Sekundärantikörper:** Monoklonal biotinyliert anti-Ratte-NGAL (Bioporto Diagnostic, Dianova, Hamburg, Deutschland)
- **Rekombinantes NGAL-Protein** (R&D Systems, Wiesbaden-Norderstadt, Deutschland)

- **Streptavidin-HRP-Konjugat:** 1 µg/ml (Vector Laboratories; Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland)
- **TMB-Substrat-Lösung** (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- **2 N H₂SO₄ (Stopplösung)** (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Der Primärantikörper wurde mit dem Coatingpuffer auf eine Konzentration von 2,5 µl/ml eingestellt und die ELISA-Platte mit jeweils 50 µl (entspricht 125 µg) Antikörperlösung pro Well bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung entfernt und die Wells 2-mal mit PBS-T gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu hemmen, wurden die Wells jeweils mit 200 µl Blockierungspuffer für 2 h bei RT versetzt. Danach wurden je 100 µl der in 1 % BSA/PBS verdünnten Proben (Urin 1:1600) in die Wells pipettiert, die Platte verschlossen und für 2 Stunden bei RT geschüttelt. Nach wiederholtem Waschen wurden je 100 µl Sekundärantikörper (Verdünnung 1:4000 in Verdünnungspuffer) zugegeben. Nach 90 min Inkubation wurde erneut für 4-mal mit Waschpuffer gewaschen. Nachdem je 50 µl Steptavidin-HRP-Konjugat zugesetzt (30 min, RT) und 4-mal gewaschen wurde, wurden die Wells mit je 100 µl TMB-Substrat-Lösung versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss (Aluminiumfolie) wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 100 µl Stopplösung unterbrochen. Im ELISA-Reader (SpectraMax 190 microplate reader Molecular Devices, Sunnyvale, USA) wurde die Extinktion bei 450 nm bestimmt. Die Standardkurven und Probenkonzentrationen wurden mit der Software SOFTmax PRO ermittelt.

3.9.2 Kim-1

Die Konzentration von Kim-1 im Urin wurde im Labor von Vishal S. Vaidya und Joseph V. Bonventre (Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA) unter Verwendung von Microsphäre-basierter Luminex xMAP Technologie gemessen (Vaidya, *et al.*, 2006).

3.9.3 Clusterin

- **Rat Clusterin ELISA** (BioVendor, Heidelberg, Deutschland)
- **Demineralisiertes Wasser**

Für die Bestimmung von Clusterin im Urin wurde der Rat-Clusterin-ELISA (BioVendor, Heidelberg, Deutschland) herangezogen. Alle Arbeitsschritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Urinproben 1:10 mit dem Verdünnungspuffer (im Kit enthalten) verdünnt. Eine 8-Punkt-Standardkurve wurde im Bereich von 1-128 ng/ml erstellt. Proben und Standardkurve wurden jeweils für eine Doppelbestimmung angesetzt.

Nachdem die Proben verdünnt wurden, wurden je 100 µl auf die bereits mit Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur und 300 U/min geschüttelt. Danach wurde 3-mal mit je 350 µl Waschlösung gewaschen und 100 µl des biotinylierten Antikörpers in jedes Well gegeben (1h, RT, 300 U/min). Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde 100 µl Streptavidin-HRP-Konjugat dazugegeben und für 30 min bei RT und 300 U/min geschüttelt. Daraufhin wurde noch einmal gewaschen und 100 µl Substratlösung zugegeben. Im Anschluss an eine Wartezeit von 20 min und unter Ausschluss von Licht wurde die Farbentwicklung durch 100 µl Stopplösung unterbrochen. Die Extinktion der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (SpectraMax 190 microplate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Die Daten wurden direkt einem Rechner übermittelt, der mit Hilfe der Software SOFTMax PRO die Standardkurven bestimmte und die Ergebnisse einer einzelnen Verdünnung im linearen Bereich der Standardkurve auf die Ursprungskonzentration zurückrechnete.

3.9.4 Timp-1

- **Rat Timp-1 DouSet** (R&D Systems, Wiesbaden-Norderstadt, Deutschland)
- **PBS (pH 7,4):** 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄
- **Verdünnungspuffer: 1% BSA in PBS**
- **PBS-T-Waschpuffer: 0,05 % Tween 20 in PBS**
- **TMB-Substrat-Lösung** (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- **2 N H₂SO₄ (Stopplösung)** (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Jedes Well wurde mit 100 µl 2 µg/ml *Capture*-Antikörper (gelöst in PBS) versehen, verschlossen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert (Coaten). Am darauffolgenden Tag wurden die Proben vorbereitet. Dazu wurden sie 1:100 mit Verdünnungspuffer verdünnt. Eine Standardkurve wurde im Bereich von 2000-31,25 pg/ml hergestellt und ebenso wie die Proben im Duplikat erstellt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, wurde 3-mal mit Waschpuffer gespült und die Wells mit je 100 µl Verdünnungspuffer für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde erneut 3-mal gewaschen und 100 µl Detektions-Antikörper (in Verdünnungspuffer) für 2 h zugegeben. Nach weiterem Waschen wurden 100 µl Streptavidin-HRP-Konjugat dazu pipettiert (20 min, RT), gewaschen und anschließend mit 100 µl TMB-Substratlösung für 20 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch 50 µl Stopplösung angehalten und die Extinktion am SpectraMax 190 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bei 450 nm bestimmt. Die Standardkurven und Probenkonzentrationen wurden erneut mit der Software SOFTmax PRO ermittelt.

3.9.5 WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel

- **WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel 1** (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- **WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel 2** (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Die Urinkonzentrationen von β_2 -Mikroglobulin, α -Glutathion-S-Transferase, Kim-1, Timp-1 wurden mittels der „WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel 1“ und die Konzentrationen von VEGF, Calbindin, Clusterin, Cystatin C, NGAL und Osteopontin mit Hilfe des „WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel 2“ von der Firma Merck in Darmstadt vermessen. Dazu wurde nach Anleitung des Herstellers gearbeitet und die Proben mit Hilfe der Luminex®-xMAP-Technologie vermessen. Diese Methode ermöglicht die simultane quantitative Bestimmung von bis zu 100 Parametern in einer einzelnen Probe.

3.10 Statistische Auswertung und ROC-Analyse

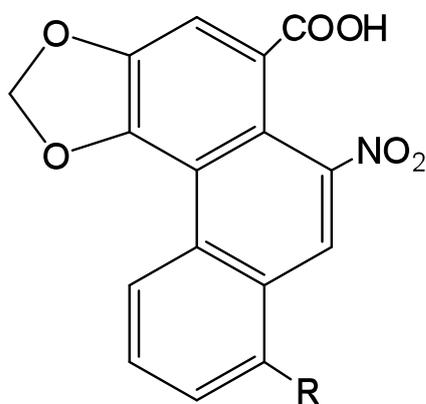
Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit ANOVA und anschließendem „Dunnett’s post hoc Test“ mit Hilfe der Software Graph Prism® 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Das Signifikanzniveau wurde mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 festgelegt.

„Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Analysen werden erstellt, um die Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher Referenzwerte graphisch darzustellen und zu vergleichen. Dabei dient die Kurve im Allgemeinen dazu, gesunde (unbehandelte) von erkrankten (behandelten) Tieren zu unterscheiden. In einem Diagramm werden auf der Ordinate (y-Achse) die Sensitivität und auf der Abszisse (x-Achse) 1-Spezifität aufgetragen. Die Fläche unter der Kurve (AUC) ist hierbei das Maß für die Güte des Tests und kann Werte ≤ 1 annehmen. Je höher der Wert ist, desto sensitiver und empfindlicher ist der jeweilige Test. Alle ROC Kurven wurden ebenfalls mit Hilfe der Software von Graph Pad Prism® 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) erstellt.

4 UNTERSUCHUNG NEUER BIOMARKER FÜR NEPHROTOXIZITÄT AM MODELL DER ARISTOLOCHIASÄURE

4.1 Struktur, Vorkommen und Verwendung

Aristolochiasäure (AA) ist ein natürlicher Pflanzeninhaltsstoff der Gattung *Aristolochia* (Pfeifenblume) und *Asarum* (Haselwurz) (Chen, *et al.*, 2006). Beide Gattungen gehören zu der Familie der Aristolochiaceae (Osterluzeigewächse). AA ist ein Gemisch, das im Wesentlichen aus den Nitrophenanthrencarbonsäuren Aristolochiasäure I und Aristolochiasäure II besteht (Abb. 4.1). Die Osterluzeigewächse wurden seit dem Altertum als Heilpflanzen während der Geburt sowie gegen Schlangenbisse verwendet (Moser, 1934). Weiterhin war es früher in einigen Schlankheitsmitteln, sowie im Herz-Kreislaufstärkungs-Tonikum Frauengold® enthalten. Aufgrund der Fähigkeit von AA zur Steigerung der Phagozytoseaktivität (Norpoth und Deppe, 1965) wurde sie zur Infektionsabwehr als Tardolyt® auf den Markt gebracht. Auch heute noch tritt AA immer wieder in Präparaten im Rahmen der traditionellen chinesischen Medizin auf.



Aristolochiasäure	-R
I	-OCH ₃
II	-H

Abb. 4.1 Strukturformel von Aristolochiasäure

4.2 Nephrotoxizität von Aristolochiasäure

Aristolochiasäure (AA) ist sowohl in Nagern als auch im Menschen nierentoxisch. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass es durch die Behandlung mit AA zu atrophierten und nekrotischen Tubuluszellen sowie zum Verlust des Bürstensaums kommt (Lebeau, *et al.*, 2005). Eine massive Inflammation, charakterisiert durch aktivierte Makrophagen und Monocyten, wurde ebenfalls in der Niere männlicher Ratten nach Verabreichung von AA gezeigt (Pozdzik *et al.*, 2008). Weiterhin induziert AA Apoptose in

der Niere. Im Tierversuch wurde AA als mutagen (Arlt *et al.*, 2007) und kanzerogen (Arlt *et al.*, 2001; Arlt *et al.*, 2002; Mengs, 1988) eingestuft. AA wird hauptsächlich durch CYP1A1, CYP1A2 sowie in der Niere auch durch Prostaglandin-H-Synthase über die Zwischenstufe eines reaktiven cyclischen Nitreniumions zum Aristolactam metabolisiert (Debelle *et al.*, 2008; Stiborova *et al.*, 2005). Diese reaktive Zwischenstufe bildet Addukte mit Proteinen und der DNA (Abb. 4.2), die sowohl in der Niere als auch in der Leber nachweisbar sind (Fernando *et al.*, 1993; Lebeau, *et al.*, 2005; Lord *et al.*, 2004; Pfau *et al.*, 1990; Schmeiser *et al.*, 1986). In männlichen Ratten führte die 3-monatige Gabe von 10 mg/kg KG AA zu Nierenbecken- und Blasenkrebs (Menges *et al.*, 1982). Obwohl die Leber das Hauptorgan für Biotransformationen ist, werden Tumore durch AA nur in der Niere induziert. In einer Studie an Ratten konnte gezeigt werden, dass sich das Genexpressionsmuster in der Leber und Niere nach Gabe von AA unterschiedlich veränderte. In der Niere, nicht aber in der Leber, konnten Expressionsänderungen von Genen detektiert werden, die im Zusammenhang mit Kanzerogenese, Apoptose und Schutzmechanismen stehen, und somit als möglicher Grund für die organspezifische Toxizität von Aristolochiasäure dienen (Chen, *et al.*, 2006).

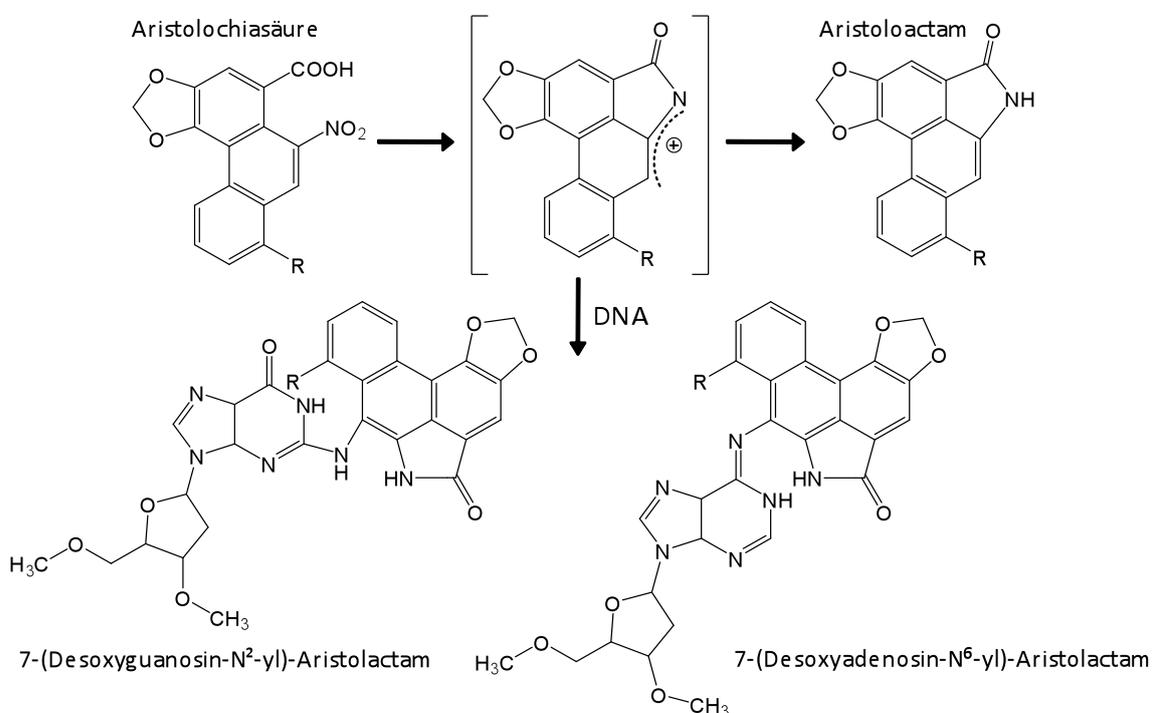


Abb. 4.2 Metabolismus von Aristolochiasäure und Bildung von DNA-Addukten über das Zwischenprodukt des cyclischen Nitreniumions

4.3 Humantoxizität von Aristolochiasäure

1991 berichtete das Institut für Nephrologie (Universite Libre de Bruxelles, Belgien) von Frauen im Alter von circa 50 Jahren, die alle die gleiche Art einer Nierenschädigung aufwiesen (Vanhaelen *et al.*, 1994; Vanherweghem *et al.*, 1993; Vanherweghem, 1998). Die Nieren der Patienten zeigten fortschreitende interstitielle Fibrose mit Atrophie und Verlust der Nierentubuli. Diese sogenannte Chinesische Heilkräuter-Nephropathie (CHN) reichte bis tief in die Nierenrinde hinein (Depierreux *et al.*, 1994). Weiterhin konnte ein Verlust des Bürstensaums sowie erhöhte Ausscheidungen von N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase und neutraler Endopeptidase (NEP) beobachtet werden (Nortier *et al.*, 1997). Auch ein gehäuftes Auftreten von Harnleiterkrebs konnte in der belgischen Patientengruppe beobachtet werden. Es zeigte sich, dass diese Frauen alle mit einem pflanzlichen Schlankheitspräparat behandelt wurden, welches AA enthielt. So stellte sich heraus, dass vermutlich aufgrund einer fehlerhaften Übersetzung anstatt der Pflanze Hang Fang Ji (*Stephania tetrandra*), Guang Fang Ji (*Aristolochia fangchi*), welche Aristolochiasäure enthält, in dem pflanzlichen Schlankheitscocktail verwendet wurde.

Ein ähnliches Krankheitsbild wurde in ländlichen Gebieten auf dem Balkan (Rumänien, Kroatien, Serbien, Bosnien und Bulgarien) beobachtet. Eine kroatisch-amerikanische Forschergruppe stellte die Hypothese auf, dass die in der Donauregion endemische Balkan-Nephropathie (BEN), die bis zu einer tödlichen Niereninsuffizienz führen kann, die Folge einer chronischen Vergiftung mit Aristolochiasäure sein könnte. In Getreidefeldern der Region wurden *Aristolochia clematitis* Pflanzen gefunden, deren Samen sich mit Getreidekörnern vermischt und somit über das Mehl in das Brot gelangt (Grollman *et al.*, 2007). Die Patienten leiden neben der Nephropathie zusätzlich an einem seltenen Krebs des Urethelgewebes der oberen Harnwege.

2001 hatte die amerikanische Gesundheitsbehörde FDA (US Food and Drug Administration) vor der Verwendung von im Rahmen traditioneller Medizin angebotenen pflanzlichen Schlankheitsmitteln gewarnt, da diese im Verdacht stehen AA als Inhaltsstoff zu enthalten. Grund dafür waren Berichte von Patientinnen, die nach Einnahme pflanzlicher Produkte an schweren Nierenschäden mit teilweise anschließender Dialyse und Nierentransplantation, litten. Weiterhin entwickelten ein Teil dieser Patienten eine besondere Krebsart, die meist im Urinaltrakt auftrat. 2002 wurden dann aufgrund dieser

Fälle die Heilkräuter, welche Pflanzenarten der Gattung Aristolochia enthalten, von der IARC (International Agency for Research on Cancer) als krebserregend für den Menschen eingestuft. Trotz dieser Warnungen werden auch heute noch viele Produkte mit dem Inhaltsstoff Aristolochiasäure identifiziert (Gold und Slone, 2003). Schon 1981 wurden in Deutschland vom damaligen Bundesgesundheitsamt (BGA) pflanzliche Arzneimittel verboten, die Aristolochiasäure enthalten (z.B. Frauengold®, Tardolyt®). Das BGA stützte seine Maßnahme damals auf die Ergebnisse aus Tierversuchen, die eine unerwartet starke krebserzeugende Wirkung von Aristolochiasäure zeigten und es keinen Grenzwert gibt, ab dem die Einnahme als sicher angesehen werden kann.

4.4 Studiendesign

20 männliche Wistar-Ratten im Alter von 8-10 Wochen wurden von der Firma Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) geliefert. Zur Kontrolle der Gewichtszunahme wurden die Tiere mindestens alle 2 Tage gewogen. Nach einer 1-wöchigen Akklimatisierungsperiode, erfolgte die Behandlung der Tiere mit Aristolochiasäure (LOT 054K06551, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 3 Dosisgruppen zu je 5 Tieren sowie einer Kontrollgruppe über 2 Wochen (Tab. 4.1). Die Expositionsbedingungen basieren auf einer 4-wöchigen Studien, in denen der NOAEL für Nephrotoxizität von Aristolochiasäure nach oraler Gabe mit 0,2 mg/kg KG angegeben ist und geringe Effekte in den Parametern der klinischen Chemie und Histopathologie bei einer Dosis von 1 mg/kg KG beobachtet wurden (Mengs und Stotzem, 1992). Dazu wurden den Tieren 5 Tage pro Woche AA-Lösung oral via Schlundsonde verabreicht.

Tabelle 4.1 Gruppeneinteilung der Tiere und Dosierung (mg/kg KG pro Tag) der Aristolochiasäure

Gruppe	1	2	3	4
Tiernummer	01 – 05	06 – 10	11 – 15	16 – 20
Aristolochiasäure	0 mg/kg KG	0,1 mg/kg KG	1 mg/kg KG	10 mg/kg KG

Der Kontrollgruppe wurde autoklaviertes Wasser ebenfalls per Schlundsonde verabreicht. Nach der ersten, dritten und letzten Gabe wurde jedes Tier in einen Stoffwechsellkäfig überführt und der Urin über 24 Stunden auf Eis gesammelt. Die Blutentnahme der Tiere erfolgt 24 Stunden nach der ersten und dritten Behandlung retro-orbital (über das Auge)

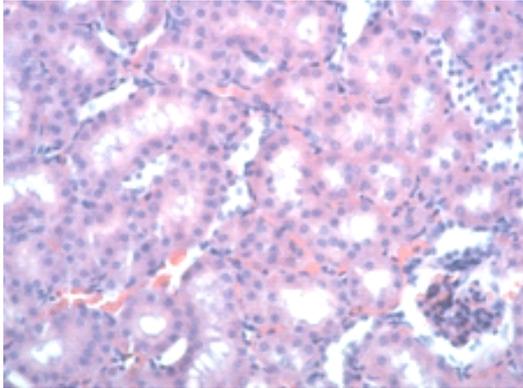
sowie am Tag der Tötung. Dazu wurden die Tiere in einer Kammer mit CO₂ sediert und anschließend über Herzpunktion getötet. Die Leber und Nieren wurden direkt nach der Entnahme mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung gewaschen und anschließend geteilt. 1/3 des linken Leberlappens, eine Nierenhälfte sowie die Blase wurden in eine 4 %-ige Formalinlösung gegeben. Die restliche Leber und Nieren wurden sofort in flüssigem Stickstoff in Aliquoten schockgefroren. Der Urin wurde aliquotiert und für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren. Die Blutproben wurden 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, anschließend 2 min zentrifugiert, das Serum abgenommen und ebenfalls bei -20 °C gelagert. Die anfallenden Tierkadaver wurden gemäß §8 Abs. 1 und 2 des Tierkörperbeseitigungsgesetzes⁶¹ vorschriftsmäßig entsorgt.

4.5 Ergebnisse

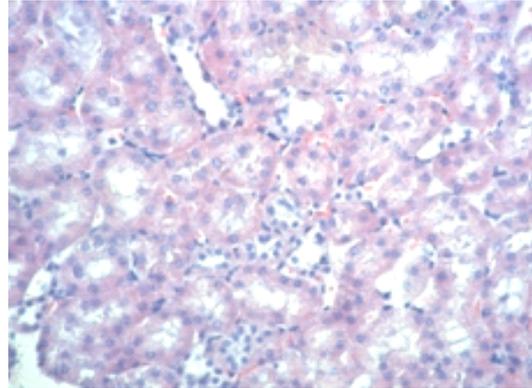
4.5.1 Klinische Chemie und Histopathologie

Die histopathologische Auswertung erfolgte mikroskopisch durch Dr. Gordon Hard (Tairua, Neuseeland) an HE-gefärbten Nierenparaffinschnitten. Die Abbildung 4.3 zeigt, dass Ratten, welche für 12 Tage mit 0,1, 1 und 10 mg/kg KG Aristolochiasäure behandelt wurden, keine erkennbaren histopathologischen Veränderungen der Niere im Vergleich zu den Kontrolltieren aufwiesen. Die 2-wöchige Gabe von 10 mg/kg KG AA führte zu einer leichten, aber nicht signifikanten Reduzierung des Körpergewichtes. Hingegen zeigte sich aber keine Veränderung im relativen Nierengewicht (Tab. 4.2). In den Tieren, die mit 0,1, 1 und 10 mg/kg KG AA behandelt wurden, kam es zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Glucose-Werte im Serum am Tag 1, welche sich dann aber nach weiterer Gabe wieder auf den Wert der Kontrolltiere einstellten (Tab. 4.2). Alle weiteren gemessenen klinischen Parameter, sowohl im Urin als auch im Serum, waren während des gesamten Behandlungszeitraumes im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert.

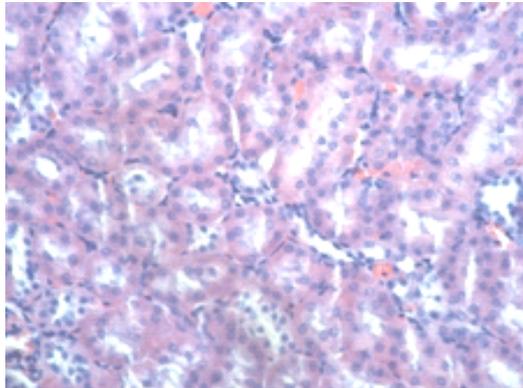
(a) 0 mg/kg AA



(b) 0,1 mg/kg AA



(c) 1 mg/kg AA



(d) 10 mg/kg AA

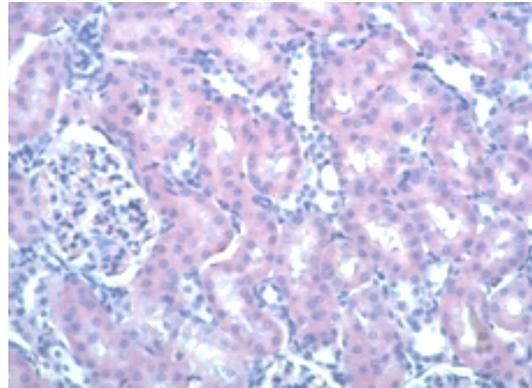


Abb. 4.3 Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Nierenschnitte von Ratten, die für 2 Wochen mit (a) 0, (b) 0,1, (c) 1 und (d) 10 mg/kg KG AA behandelt wurden. Die Behandlung mit AA führte zu keiner renalen histopathologischen Veränderung der Niere.

Tabelle 4.2 Parameter der klinischen Chemie männlicher Wistar-Ratten nach Behandlung mit 0, 0,1, 1 und 10 mg/kg KG Aristolochiasäure. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

	Tag	Aristolochia Säure [mg/kg KG]			
		0	0,1	1	10
Körpergewicht [g]	1	238 \pm 9	239 \pm 7	245 \pm 5	244 \pm 2
	5	253 \pm 16	251 \pm 11	258 \pm 5	249 \pm 3
	12	291 \pm 21	291 \pm 18	296 \pm 12	274 \pm 8
rel. Nierengewicht [%]	12	0,68 \pm 0,06	0,66 \pm 0,06	0,66 \pm 0,05	0,65 \pm 0,04
rel. Lebergewicht [%]	12	3,01 \pm 0,23	3,23 \pm 0,16	3,12 \pm 0,12	3,33 \pm 0,08
Urin					
Urinvolumen [ml]	1	29 \pm 12	24 \pm 13	19 \pm 7	17 \pm 6
	5	31 \pm 8	24 \pm 8	19 \pm 9	20 \pm 11
	12	28 \pm 14	31 \pm 10	21 \pm 13	27 \pm 10
pH	1	7,0 \pm 0,0	7,0 \pm 0,0	7,2 \pm 0,5	7,0 \pm 0,0
	5	7,0 \pm 0,0	7,0 \pm 0,0	6,9 \pm 0,2	6,8 \pm 0,3
	12	6,9 \pm 0,3	6,9 \pm 0,2	7,1 \pm 0,6	6,9 \pm 0,2
spezifisches Gewicht [g/ml]	1	1,01 \pm 0,01	1,01 \pm 0,01	1,02 \pm 0,01	1,02 \pm 0,01
	5	1,01 \pm 0,00	1,01 \pm 0,01	1,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
	12	1,02 \pm 0,01	1,01 \pm 0,00	1,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01
Kreatinin [mg/l]	1	22 \pm 8	28 \pm 12	33 \pm 11	34 \pm 12
	5	22 \pm 7	30 \pm 13	30 \pm 14	33 \pm 24
	12	36 \pm 21	28 \pm 7	48 \pm 22	33 \pm 17
Osmolalität [mosmol/kg]	1	340 \pm 159	434 \pm 181	583 \pm 192	505 \pm 160
	5	296 \pm 116	394 \pm 154	388 \pm 184	415 \pm 267
	12	553 \pm 351	411 \pm 121	687 \pm 318	489 \pm 279
Gesamt-Protein [mg/mg Kreatinin]	1	0,76 \pm 0,37	0,84 \pm 0,41	0,52 \pm 0,15	0,69 \pm 0,36
	5	0,72 \pm 0,42	0,86 \pm 0,27	0,67 \pm 0,16	0,58 \pm 0,42
	12	1,45 \pm 0,15	1,18 \pm 0,2	1,14 \pm 0,34	1,3 \pm 0,36
γ-Glutamyltransferase (GGT) [U/mg Kreatinin]	1	3,4 \pm 0,7	3,0 \pm 0,7	3,2 \pm 0,9	3,2 \pm 0,7
	5	4,3 \pm 0,8	4,1 \pm 0,6	4,2 \pm 0,8	3,6 \pm 0,6
	12	3,0 \pm 0,6	3,5 \pm 0,9	2,9 \pm 0,5	2,2 \pm 0,4
Serum					
Glucose [mg/dl]	1	148 \pm 14	75 \pm 13	83 \pm 7	74 \pm 8
	5	118 \pm 32	88 \pm 48	132 \pm 15	114 \pm 19
	12	115 \pm 18	105 \pm 18	114 \pm 10	125 \pm 16
Kreatinin [mg/dl]	1	0,24 \pm 0,05	0,24 \pm 0,05	0,30 \pm 0,00	0,28 \pm 0,04
	5	0,30 \pm 0,00	0,24 \pm 0,05	0,28 \pm 0,04	0,30 \pm 0,00
	12	0,26 \pm 0,05	0,26 \pm 0,05	0,30 \pm 0,00	0,28 \pm 0,04
Harnstoff [mg/dl]	1	35 \pm 2	28 \pm 5	30 \pm 2	29 \pm 5
	5	44 \pm 4	30 \pm 5	36 \pm 8	44 \pm 7
	12	32 \pm 4	30 \pm 4	37 \pm 6	37 \pm 6
Bilirubin [mg/dl]	1	0,06 \pm 0,05	0,08 \pm 0,04	0,08 \pm 0,04	0,06 \pm 0,05
	5	0,04 \pm 0,05	0,06 \pm 0,05	0,04 \pm 0,05	0,08 \pm 0,04
	12	0,10 \pm 0,00	0,08 \pm 0,04	0,10 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00
Aspartat-Aminotransferase (AST) [U/l]	1	91 \pm 7	98 \pm 8	101 \pm 27	91 \pm 26
	5	11 \pm 41	64 \pm 9	88 \pm 13	89 \pm 11
	12	75 \pm 8	86 \pm 16	98 \pm 24	81 \pm 11
Alanin-Aminotransferase (ALT) [U/l]	1	31 \pm 9	28 \pm 4	27 \pm 5	25 \pm 5
	5	33 \pm 6	32 \pm 6	26 \pm 5	21 \pm 1
	12	30 \pm 2	35 \pm 6	31 \pm 10	30 \pm 3
γ-Glutamyltransferase (GGT) [U/l]	1	0,48 \pm 0,47	0,40 \pm 0,37	0,24 \pm 0,32	0,10 \pm 0,00
	5	0,28 \pm 0,40	0,08 \pm 0,04	0,12 \pm 0,04	0,16 \pm 0,13
	12	0,10 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00
Alkalische Phosphatase (ALP) [U/l]	1	267 \pm 51	237 \pm 20	267 \pm 55	239 \pm 23
	5	247 \pm 62	237 \pm 29	262 \pm 48	211 \pm 27
	12	211 \pm 44	185 \pm 21	109 \pm 40	164 \pm 33
Gesamt-Protein [mg/dl]	1	5,9 \pm 0,2	5,9 \pm 0,2	5,9 \pm 0,1	5,9 \pm 0,1
	5	6,3 \pm 0,2	6,4 \pm 0,2	6,1 \pm 0,2	5,8 \pm 0,3
	12	6,1 \pm 0,2	6,1 \pm 0,2	6,0 \pm 0,2	5,9 \pm 0,2

4.5.2 Genexpressionsanalyse der potentiellen Biomarker

Die Gesamt-RNA der Niere wurde isoliert und die Veränderungen der Genexpression von Kim-1, Timp-1, Lipocalin-2, Clusterin, Osteopontin und Vimentin mit Hilfe von SYBR-Green am Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) untersucht. Die Auswertung zeigte eine geringfügige, statistisch signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von Kim-1, Timp-1 und Lipocalin-2 in den Nieren der Ratten, welche für 2 Wochen mit der Hochdosis (10 mg/kg KG) Aristolochiasäure behandelt wurden (Abb. 4.4). Im Gegensatz dazu war die Genexpression von Clusterin, Osteopontin und Vimentin in allen Dosisgruppen nach Verabreichung von Aristolochiasäure unverändert.

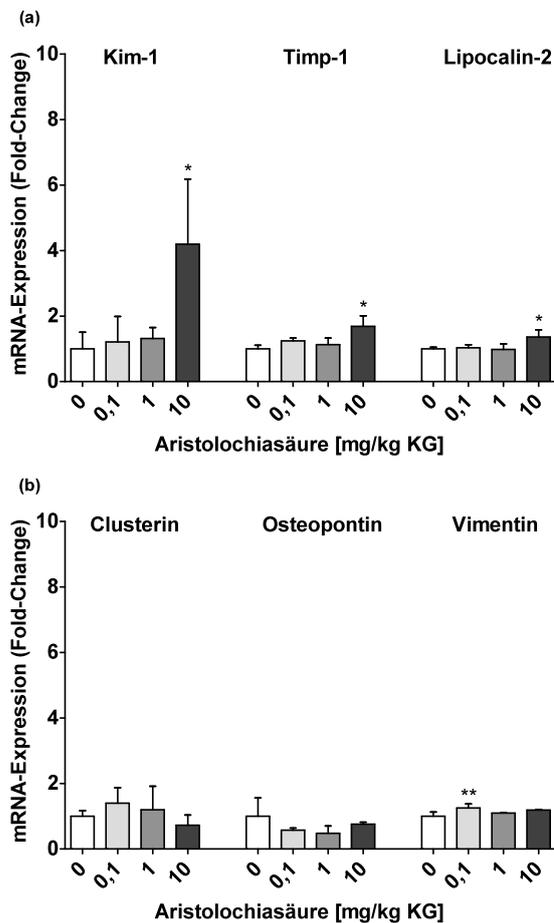


Abb. 4.4 Änderung der mRNA-Expression von (a) Kim-1, Timp-1, Lcn2 und (b) Clu, OPN und Vim in der Niere von männlichen Wistar-Ratten nach Behandlung mit 0, 0,1, 1 oder 10 mg/kg KG für 2 Wochen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung relativ zur Kontrollgruppe angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

4.5.3 Detektion von Lipocalin-2 im Urin mittels Western-Blot

Aufgrund verschiedener Veröffentlichungen, in denen beschrieben wurde, dass Lipocalin-2 bei einem Nierenschaden in den Urin abgegeben wird (Mishra *et al.*, 2005; Mishra, *et al.*, 2003; Mishra, *et al.*, 2004), wurde die Lcn2-Ausscheidung mit einem spezifischen Antikörper im Urin nach 1-, 5- und 12-tägiger Aristolochiasäuregabe mittels Western-Blot untersucht. In der Abbildung 4.5 ist zu sehen, dass die Gabe von Aristolochiasäure zu einem dosis- und zeitabhängigen Anstieg von Lcn2 im Urin führt. Selbst nach einmaliger Dosis war die Konzentration von Lcn2 im Urin erhöht.

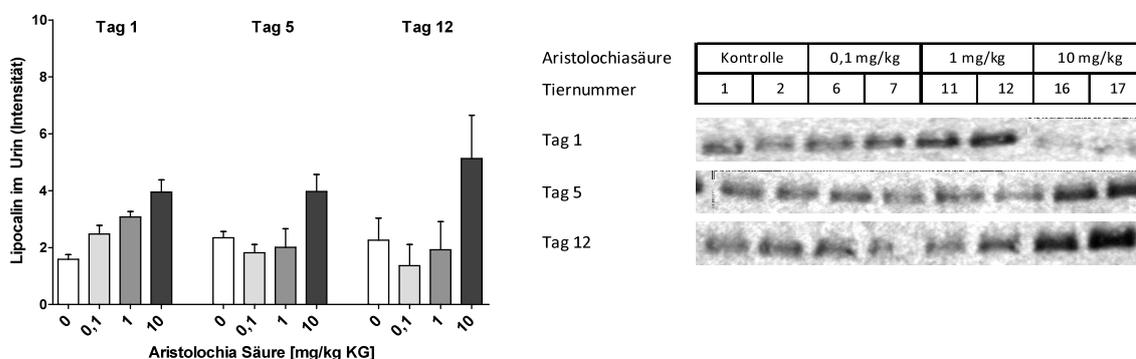


Abb. 4.5 Exkretion von Lipocalin-2 nach 1, 5 und 12 Tagen im Urin von männlichen Wistar-Raten, die mit 0, 0,1, 1 oder 10 mg/kg KG AA behandelt wurden. Die Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben ($n=2$).

4.6 Diskussion

Die Behandlung männlicher Wistar-Ratten führte histologisch zu keiner sichtbaren Veränderung im Nierengewebe. Ebenfalls waren auch die Parameter der klinischen Chemie über die gesamte Behandlungsdauer im Vergleich zur Kontrolle nahezu unverändert. Im Gegensatz dazu berichten frühere Studien, in denen ebenfalls Ratten mit 10 mg/kg KG Aristolochiasäure behandelt wurden, von einer vermehrten Proteinausscheidung in den Urin sowie von erhöhten Kreatininspiegel im Serum am Tag 5 bzw Tag 10 (Debelle *et al.*, 2002; Lebeau, *et al.*, 2005). Ebenso zeigten sich in diesen Studien veränderte Enzymlevel von N-Acetyl- β -D-Glucosamidase (NAG) bzw. Leucinaminopeptidase (LAP) im Urin. Auch histologisch konnten Veränderungen in Form von atrophierte und nekrotische Tubuli, Lymphozyteninfiltrate sowie der Rückgang des Bürstensaums (hauptsächlich im S₃-Segment) gezeigt werden (Lebeau, *et al.*, 2005). Eine Langzeitgabe dieser Dosis AA für 35 Tagen führte zu einer renalen Fibrose (Pozdzik, *et al.*,

2008). Im Rahmen unserer Studie konnte in allen 3 Behandlungsgruppen eine erniedrigte Glucosekonzentration im Blut nach der ersten AA-Behandlung gemessen werden. Glucose wird zu 100 % im proximalen Tubulus reabsorbiert. Aufgrund der toxischen Wirkung von Aristolochiasäure speziell auf den Bürstensaum des proximalen Tubulus ist es den Epithelzellen nicht möglich, die Glucose vollständig zu resorbieren. Im Urin konnte mittels ¹H-NMR-Messung eine erhöhte Glucosekonzentration detektiert werden (Sieber, 2009). Dieser Effekt war aber nach 5 Tagen AA-Behandlung nicht mehr zu sehen, möglicherweise aufgrund der hohen Regenerationsfähigkeit der Tubulusepithelzellen. In den Tieren, die mit der hohen Dosis führte die orale Gabe von AA während der gesamten Versuchszeit zu einer Reizung des Ösophagus. Auch in früheren Studien konnten Reizungen im Gastrointestinaltrakt von Ratten nach Gabe von 10 mg/kg KG beobachtet werden (Mengs, 1983). Durch die gereizte Speiseröhre kam es möglicherweise zur verminderten Nahrungsaufnahme und somit zur Gewichtsreduktion der Hochdosistiere. Desweiteren ist es möglich, dass die erniedrigte Nahrungsaufnahme für die schon erwähnte geringe Glucosekonzentration im Blut verantwortlich ist.

Im Einklang mit den histopathologischen Untersuchungen zeigte sich nur eine geringe Veränderung in der Genexpression der potentiellen Nierenmarker. Die mRNA-Expression von Kim-1 war nach 2-wöchiger Behandlung mit 10 mg/kg AA vierfach höher als die der Kontrolltiere. In der Literatur wird Kim-1 als sehr früher Marker für Nephrotoxizität bezeichnet (Prozialeck *et al.*, 2007; Vaidya, *et al.*, 2006). Es wird sowohl beim Menschen als auch der Ratte bei akuter Nierenschädigung an der apikalen Zellmembran von Epithelzellen im S₃-Segment der proximalen Tubuli exprimiert (Ichimura, *et al.*, 2004; Vaidya, *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass Kim-1 in Zusammenhang mit Reparaturprozessen im proximalen Tubulus der Niere steht und somit Kim-1 als Antwort auf geringe Nierenschäden durch AA-Gabe vermehrt exprimiert wird (Ichimura und Mou, 2008).

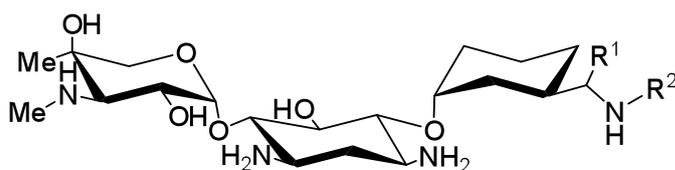
Als weiterer früher Hinweis für tubuläre Schädigung wird eine erhöhte Expression von Lipocalin-2 in der Niere beschrieben (Mishra, *et al.*, 2005). Lipocalin-2 ist ein Akute-Phase-Protein, das von Neutrophilen und einer Vielzahl von Epithelzellen exprimiert wird und infolge von zellulärem Stress und bei Entzündungen schnell über die Aktivierung von NFκB freigesetzt wird (Bu *et al.*, 2006; Cowland *et al.*, 2006). Die Genexpression von Lipocalin-2 war in den Nieren der Ratten nach Gabe von 10 mg/kg Aristolochiasäure um

den Faktor 2 erhöht. Darüber hinaus konnte bereits nach einmaliger AA-Verabreichung eine gesteigerte Konzentration von Lipocalin-2 im Urin der Hochdosistiere detektiert werden, welche sich auch nach weiterer AA-Gabe bestätigte. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien überein, in denen erhöhte Lcn2 Level in der Niere, im Urin oder im Serum nach chemisch-induzierten Tubulusschaden bzw. in Patienten mit akuter oder chronischer Nierenerkrankung auftraten (Malyszko *et al.*, 2008; Mishra, *et al.*, 2004; Mori und Nakao, 2007; Nickolas *et al.*, 2008; Wagener, *et al.*, 2008; Wheeler *et al.*, 2008) und Lcn2 als ein vielversprechender sensitiver Marker für Nierentoxizität identifizierten. Zusammenfassend muss man aber sagen, dass die Studie mit Aristolochiasäure aufgrund der fehlenden histopathologischen Veränderung in der Niere als wenig geeignet schien, um Biomarker zu identifizieren oder zu validieren.

5 UNTERSUCHUNG NEUER BIOMARKER FÜR NEPHROTOXIZITÄT AM BEISPIEL VON GENTAMICIN

5.1 Struktur und Anwendung von Gentamicin

Das Breitspektrum-Antibiotika Gentamicin wird als sekundäres Stoffwechselprodukt von den Pilzen *Mikromonospora purpurea* und *Mikromonospora echinospora* gebildet. Es ist ein Gemisch aus 3 verschiedenen Substanzen Gentamicin C1 (ca. 20-40 %), C1a (ca. 10-30 %) und C2 (ca. 40-60 %) und gehört strukturell zu der Gruppe der Aminoglykosidantibiotika (Abb. 5.1), bei dem das zentrale Desoxystreptamin glykosidisch mit 2 Aminozuckern verbunden ist (Aktories *et al.*, 2009). Aufgrund der OH-Gruppen sind die Aminoglykoside hydrophil, gelangen dadurch praktisch nicht, mit Ausnahme der proximalen Tubuluszellen der Nieren, in die Körperzellen und wirken somit ausschließlich gegen extrazelluläre Keime. Weiterhin haben sie im neutralen und alkalischen Milieu durch die NH₂-Gruppen leichte basische und nucleophile Eigenschaften, die für die antibakterielle Aktivität entscheidend sind. Das breite Wirkungsspektrum reicht von gram-negativen Stäbchen bis hin zu gram-positiven Kokken. In niedrigen Konzentrationen wird durch Gentamicingabe das Keimwachstum gehemmt (Bakteriostase), allerdings nimmt mit zunehmender Konzentration die Bakterizidie sowohl im Ausmaß, als auch in der Geschwindigkeit zu.



Gentamicin	-R ¹	-R ²
C1	-CH ₃	-CH ₃
C1a	-H	-H
C2	-CH ₃	-H

Abb. 5.1 Strukturformel des Aminoglykosids Gentamicin

Infolge der fehlenden Resorption nach oraler Gabe ist Gentamicin nur lokal wirksam, im Gegensatz dazu werden nach intramuskulärer Injektion ca. 90 % der Dosis rasch resorbiert (Mutschler *et al.*, 2008). Die Plasmaproteinbindung und die Liquorgängigkeit von Gentamicin sind verhältnismäßig gering. Es wird vorwiegend unverändert durch glomeruläre Filtration über die Niere ausgeschieden (Aktories, *et al.*, 2009). Die Eliminationshalbwertszeit im Plasma beträgt circa 2 Stunden, hingegen in der Nierenrinde bis zu über 100 Stunden (Marquardt und Schäfer, 2004). Daher kann es noch nach Wochen im Harn nachgewiesen werden.

Die Aminoglykoside gelangen durch Porine in den periplasmatischen Raum der gram-negativen Bakterien und werden über die zweite Barriere, die Cytoplasmamembran aktiv transportiert (Mutschler, *et al.*, 2008). Im Cytoplasma der Bakterien binden sie irreversibel an ein Rezeptor-Protein auf der 30S-Untereinheit der Ribosomen, verhindern dadurch die Bindung des Formyl-Methionin-Transfer-RNA an das Ribosom und somit die Aktivität des Initiationskomplexes. Dadurch wird die mRNA falsch abgelesen und es kommt zum Einbau einer falschen Aminosäure in die Peptidkette (Mutschler, *et al.*, 2008). Diese damit erhaltenen defekten Proteine („Nonsense“-Proteine) lösen irreversible Membranschäden aus.

5.2 Toxizität von Gentamicin

Die wichtigsten dosislimitierenden Nebenwirkungen der Aminoglykoside äußern sich in der Nephro- und Ototoxizität (Appel, 1990; Humes, 1988; Whelton, 1984). Aufgrund der geringen therapeutischen Breite der Aminoglykoside kommt es infolge erhöhter Plasmakonzentrationen zu teils irreversiblen Schäden. Dieses kann aus einer Überdosierung folgen, aber auch durch Vorliegen einer Niereninsuffizienz. Da Aminoglykoside zu fast 100 % über die Niere ausgeschieden werden, erhöht sich bei einer bestehenden Niereninsuffizienz das Risiko der Akkumulation der Aminoglykoside, vor allem im Innenohr und in der Nierenrinde. Angesichts der Regenerationsfähigkeit des Tubulusepithels sind Nierenschäden oft reversibel, hingegen kommt es durch den Verlust der Sinneshärchen im Ohr zu irreversiblen Gleichgewichts- und Hörstörungen.

5.3 Nephrotoxizität von Gentamicin

Die Behandlung mit Aminoglykosiden führt bei rund 10-20 % der Patienten zu einer Schädigung der Niere (Martinez-Salgado *et al.*, 2007). Aminoglykoside werden ohne vorherige Metabolisierung renal ausgeschieden. Ein Teil der kationischen Aminoglykoside binden an Phospholipidrezeptoren im Bürstensaum des proximalen Tubulus und werden durch Pinozytose aktiv in die Zellen aufgenommen und in Lysosomen gespeichert (Silverblatt und Kuehn, 1979). Da sie nicht durch lysosomale Enzyme abgebaut werden und aufgrund ihres hydrophilen Charakters nur sehr langsam aus den Tubuluszellen eliminiert werden, erreichen sie in der Nierenrinde hohe Konzentrationen. In den

Lysosomen inhibieren sie Phospholipasen, die für den Abbau der zellulären Membran zuständig sind und führen dadurch zu Phospholipidose, gekennzeichnet durch eine erhöhte Phospholipidausscheidung im Urin (Giuliano *et al.*, 1984; Laurent *et al.*, 1990). Es kommt zur Anhäufung und Akkumulation von Lipiden, wodurch die Lysosomen an Größe zunehmen und in ihrer Funktion eingeschränkt werden. Weiterhin wird durch die Schädigung der Mitochondrien die ATP-Bildung vermindert. Durch Ruptur der Lysosomen kommt es zum Freisetzen von Proteasen, welche eine direkte Zellschädigung verursachen. Dieses führt schließlich zur Zellnekrose und kann in einem akuten Nierenversagen enden. Die nephrotoxischen Nebenwirkungen spiegeln sich in einem langsamen Anstieg der Kreatininkonzentration im Serum der Patienten wider (Martinez-Salgado, *et al.*, 2007). Obwohl die Behandlung mit Aminoglykosiden nicht zu einer pathologischen Veränderung der Glomeruli führt, ist die glomeruläre Filtrationsrate erniedrigt, was zu einer Potenzierung der Nephrotoxizität führt (Laurent, *et al.*, 1990; Martinez-Salgado, *et al.*, 2007). Eine Reihe von tierexperimentellen Studien konnte zeigen, dass die Behandlung mit Aminoglykosiden vorrangig im S₁- und S₂-Segment des gewundenen proximalen Tubulus zur Nekrose führt (Shanley und Burke, 1990; Verstrepen *et al.*, 1993). Weiterhin zeigte sich aber auch in Ratten, welche für 10 Tage mit 40 mg/kg KG Gentamicin behandelt wurden, eine fast vollständige Regeneration der proximalen Tubuluszellen nach 4 Wochen (Houghton *et al.*, 1976; Verstrepen, *et al.*, 1993). Diese konnte auch im Patienten nach Absetzen der Aminoglykosidtherapie aufgrund der ausgeprägten Regenerationsfähigkeit der proximalen Tubuluszellen beobachtet werden.

5.4 Studiendesign

15 männliche Wistar-Ratten (Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland) im Alter von 8 bis 10 Wochen wurden für 7 Tage mit Gentamicin behandelt. Dazu wurden die Ratten nach einer 7-tägigen Akklimatisierungsperiode einzeln in Stoffwechsellkäfigen gehalten. Die Behandlung der Tiere erfolgte in 2 Dosisgruppen zu je 5 Tieren (Tab. 5.1).

Tabelle 5.1 Gruppeneinteilung der Tiere und Dosierung von Gentamicin

Gruppe	1	2	3
Tiernummer	01 – 05	06 – 10	11 – 15
Gentamicin	0 mg/kg KG	60 mg/kg KG	120 mg/kg KG

Das Studiendesign richtete sich nach der Studie von Lenz (*Lenz et al., 2005*). Diese Studie zeigte histologisch eine Schädigung im geschwungenen Teil der proximalen Tubuli in den Nieren männlicher Wistar-Ratten, welche für 7 Tage 2 x täglich mit 60 mg/kg KG Gentamicin behandelt wurden (*Lenz, et al., 2005*). Zusätzlich wurde aber noch eine Niedrigdosisgruppe mit in den Versuch einbezogen, um die Empfindlichkeit der neuen Biomarker besser beurteilen zu können. Dabei wurde den Tieren die Tagesdosis an Gentamicin (LOT 057K2371, Sigma-Aldrich-Taufkirchen, Deutschland) auf 2 Dosen verteilt (8:00 und 16:00 Uhr) subkutan verabreicht, um einen konstanten Talspiegel von Gentamicin zu erhalten. Als Kontrollgruppe dienten 5 Ratten, welche mit dem Vehikel 0,9 %-iges Natriumchlorid ebenfalls 2-mal pro Tag behandelt wurden. Der Urin wurde sowohl am Versuchsvortag (Null-Urin) als auch an allen 7 Versuchstagen über 24 Stunden auf Eis gesammelt. Blut wurde sowohl nach der ersten und dritten Gentamicingabe retro-orbital und nach der siebten Gabe am Tag der Tötung durch CO₂ und anschließender Herzpunktion genommen. Nach der Entnahme der Leber und Nieren wurden diese kurz mit 0,9 %-iger Kochsalzlösung gespült. Ein Teil des linken Leberlappens sowie eine Nierenhälfte wurde in 4 % Formalinlösung überführt. Die restlichen Nieren und Leber wurden in Aliquoten mittels flüssigen Stickstoffs gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Blutproben ruhten für 30 Minuten bei RT, wurden anschließend bei 4 °C für 2 min zentrifugiert und das so gewonnene Serum h bei -20 °C aufbewahrt. Der Urin wurde aliquotiert, wobei ein Teil zusammen mit einem Teil des Serums in das Zentrallabor der Universität Würzburg zur Analyse der klinischen Chemie gegeben und der Rest bei -20 °C gelagert wurde.

5.5 Ergebnisse

5.5.1 Organgewicht und Histopathologie

Die Organgewichte wurden am Tag 7, dem Tag der Tötung bestimmt. Dabei war das relative Nierengewicht in der Gruppe der Ratten, welche mit 120 mg/kg KG Gentamicin behandelt wurden, signifikant erhöht. Weiterhin war makroskopisch in beiden Behandlungsgruppen eine starke Aufhellung der Nieren zu erkennen. Die mikroskopischen histopathologischen Befunde der Niere wurden von Dr. John Callanan (University College Dublin, Irland) nach Hämatoxylin- und Eosin-Färbung erhoben.

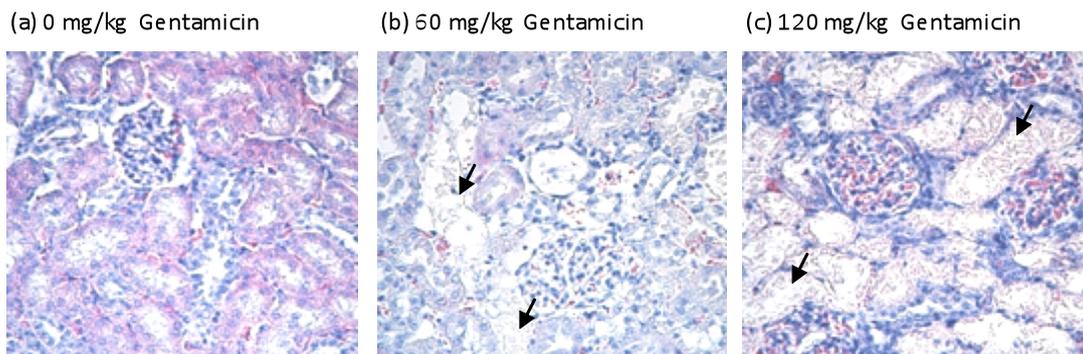


Abb. 5.2 Hämatoxylin und Eosin gefärbte Nierenschnitten von männlichen Wistar-Ratten, die für 7 Tage mit (a) 0, (b) 60 und (c) 120 mg/kg KG Gentamicin behandelt wurden. Die Behandlung führte in der Nierenrinde zu Schädigungen im geschwungenen Teil des proximalen Tubulus.

Abb. 5.2a zeigt den Bereich des Nierencortex einer Kontrollratte, der keine histopathologischen Veränderungen aufweist. Die histopathologischen Veränderungen in den mit 60 mg/kg KG behandelten Ratten (Abb. 5.2b) variierte vom kompletten Verlust der Tubuluszellen bis hin zu Tubuli, welche Zellen mit pyknotische, karyohektische und karyolytische Kernen enthielten. In der Gruppe der Niedrigdosistiere trat Zellnekrose von mild (2 Tiere) über moderat (2 Tiere) bis zu ausgedehnter Nekrose (1 Tier) der proximalen Tubuli auf. Zusätzlich wurden in 2 Tieren dieser Gruppe multifokale interstitielle mononucleäre Zellinfiltrate beobachtet. Die Behandlung der Ratten mit 120 mg/kg Gentamicin (Abb. 5.2c) für 7 Tage führte in allen 5 Tieren der Gruppe zu starker Nekrose mit teilweise komplettem Verlust der proximalen Tubuli begleitet von Proteinablagerungen in einigen Tubuli. In nekrotischen Regionen trat keine Inflammation auf. Im Gegensatz zur Niere konnten in der Leber keine histopathologischen Veränderungen festgestellt werden.

5.5.2 Klinische Chemie

Das Körpergewicht der Tiere war nach Behandlung mit 120 mg/kg KG Gentamicin von Tag 6 an im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (Tab. 5.2). An Tag 3 waren nach Gabe von 120 mg/kg KG Gentamicin sowohl Harnstoff als auch Kreatinin im Serum gering erhöht. Darüber hinaus zeigte sich am Tag 6 eine Reduktion der Kreatinin-Konzentration im Urin. Signifikant erhöhte Glucosekonzentrationen, welche Hinweise auf eine Schädigung des proximalen Tubulus geben, wurden in den Tieren der Hochdosisgruppe bereits nach einem Tag beobachtet. Proteinurie und Glucosurie begleitet von erniedrigter

Osmolalität waren in beiden Dosisgruppen am Tag 6 deutlich erkennbar, obwohl sich statistisch signifikante Veränderungen hauptsächlich auf die Tiere der Hochdosisgruppe beschränkten. Weiterhin war im Urin die Aktivität des Bürstensaumenzym γ -Glutamyltransferase (GGT) in beiden Gruppen nach einem Behandlungstag erhöht, welches sich aber nach weiterer Behandlung wieder normalisierte.

Tabelle 5.2 Klinischen-chemische Parameter nach Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit 0, 60 und 120 mg/kg KG Gentamicin. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

	Tag	Gentamicin [mg/kg KG]			
		0	60	120	
Körpergewicht [g]	1	234 \pm 3	230 \pm 12	226 \pm 3	
	2	236 \pm 3	232 \pm 12	224 \pm 6	
	3	239 \pm 4	237 \pm 16	224 \pm 7	
	6	247 \pm 6	239 \pm 21	206 \pm 12	**
rel. Nieregewicht [%]	7	0,81 \pm 0,07	0,93 \pm 0,06	0,97 \pm 0,11	*
rel. Lebergewicht [%]	7	4,44 \pm 0,3	4,01 \pm 0,51	3,58 \pm 0,89	
Urin					
Urinvolumen [ml/24h]	1	11 \pm 2	8 \pm 2	8 \pm 1	*
	2	10 \pm 2	7 \pm 1	8 \pm 4	
	3	11 \pm 3	9 \pm 2	10 \pm 3	
	6	10 \pm 3	14 \pm 4	12 \pm 6	
Kreatinin [mg/24h]	1	5,6 \pm 0,7	5,6 \pm 0,7	5,9 \pm 0,5	
	2	5,4 \pm 0,5	4,9 \pm 0,9	5,2 \pm 0,3	
	3	5,7 \pm 0,8	5,0 \pm 0,7	5,5 \pm 0,8	
	6	6,1 \pm 1,0	6,2 \pm 0,5	2,7 \pm 1,1	***
Osmolalität [mosmol/kg]	1	1457 \pm 385	1477 \pm 147	1728 \pm 370	
	2	1568 \pm 411	1615 \pm 327	1563 \pm 717	
	3	1551 \pm 347	1472 \pm 165	1216 \pm 500	
	6	1959 \pm 614	1171 \pm 434	377 \pm 61	***
Glucose [mg/24h]	1	29 \pm 4	28 \pm 3	62 \pm 24	**
	2	25 \pm 3	35 \pm 6	51 \pm 10	***
	3	24 \pm 3	31 \pm 5	40 \pm 11	*
	6	31 \pm 10	195 \pm 308	263 \pm 245	
Gesamt-Protein [mg/24h]	1	11,3 \pm 4,9	12,0 \pm 3,8	14,4 \pm 3,1	
	2	10,7 \pm 4,1	9,9 \pm 4,2	12,6 \pm 3,2	
	3	10,4 \pm 3,4	9,5 \pm 0,7	13,6 \pm 4,7	
	6	12,7 \pm 5,3	24,6 \pm 7,5	28,2 \pm 16,2	
γ-Glutamyltransferase (GGT) [U/24h]	1	936 \pm 238	1513 \pm 276	1534 \pm 527	**
	2	1273 \pm 185	1939 \pm 385	2442 \pm 585	
	3	1451 \pm 343	1633 \pm 432	1757 \pm 522	
	6	1535 \pm 368	2015 \pm 475	622 \pm 528	
Serum					
Kreatinin [mg/dl]	1	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	
	3	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	*
	7	0,2 \pm 0,0	0,6 \pm 0,6	5,0 \pm 1,6	***
Harnstoff [mg/dl]	1	38 \pm 4	44 \pm 2	46 \pm 9	
	3	38 \pm 7	42 \pm 5	50 \pm 6	*
	7	39 \pm 4	90 \pm 55	496 \pm 145	***
Bilirubin [mg/dl]	1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	
	3	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	
	7	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	**
Aspartat-Aminotransferase (AST) [U/l]	1	134 \pm 79	14 \pm 28	135 \pm 38	
	3	88 \pm 14	161 \pm 45	139 \pm 42	*
	7	130 \pm 61	174 \pm 55	278 \pm 77	**
Alanin-Aminotransferase (ALT) [U/l]	1	49 \pm 9	43 \pm 5	47 \pm 4	
	3	46 \pm 2	53 \pm 5	43 \pm 7	
	7	84 \pm 37	62 \pm 12	49 \pm 10	
γ-Glutamyltransferase (GGT) [U/l]	1	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,3	
	3	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,2	
	7	0,4 \pm 0,6	0,9 \pm 0,6	49,1 \pm 60,6	
Alkalische Phosphatase (ALP) [U/l]	1	250 \pm 33	230 \pm 31	228 \pm 24	
	3	234 \pm 25	199 \pm 20	194 \pm 13	*
	7	266 \pm 28	218 \pm 34	160 \pm 26	***
Gesamt-Protein [mg/dl]	1	5,8 \pm 0,1	5,8 \pm 0,2	5,8 \pm 0,3	
	3	5,7 \pm 0,2	5,6 \pm 0,3	5,7 \pm 0,2	
	7	6,5 \pm 0,1	6,1 \pm 0,2	5,3 \pm 0,2	***

5.5.3 Genexpressionsanalyse potentiellen Biomarker im Nierengewebe

Die Genexpression der potentiellen Biomarker Kim-1, Lcn2, Clusterin und Timp-1 im Nierengewebe männlicher Wistar-Ratten wurde mit Hilfe der auf SYBR-Green basierenden quantitativen Real-Time PCR untersucht. Dafür wurden die Tiere 7 Tage mit Gentamicin behandelt, die Nieren entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde dann in die komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt und die Expressionsänderung der 4 oben genannten Gene bestimmt. Dazu wurden die erhaltenen Expressionswerte relativ zur Kontrolle (*Fold-Change*) dargestellt. Die Behandlung mit Gentamicin führte zu einem dosisabhängigen Anstieg der Expression von allen 4 Markergenen (Abb. 5.3). Aufgrund der hohen biologischen Varianz waren jedoch nur die Veränderungen in der Hochdosisgruppe (120 mg/kg KG Gentamicin) statistisch signifikant. Kim-1 zeigte mit einem Anstieg von $1782,6 \pm 570,2$ die stärkste Expressionserhöhung nach 7-tägiger Gentamicingabe.

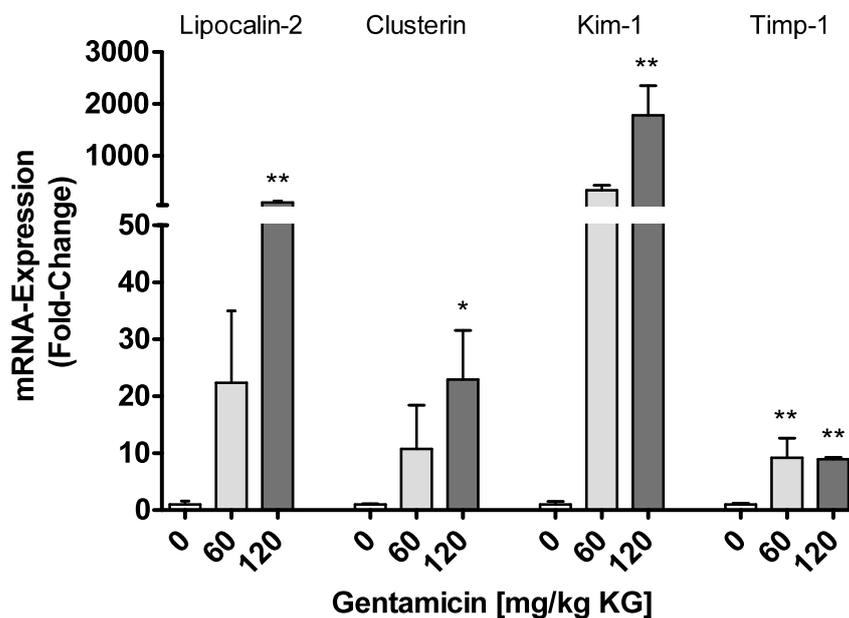


Abb. 5.3 Änderung der mRNA-Expression von Lcn2, Clusterin, Kim-1 und Timp-1 in den Nieren männlicher Wistar-Ratten, die für 7 Tage mit 0, 60 oder 120 mg/kg KG behandelt wurden. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung relativ zur Kontrollgruppe angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.5.4 Immunlokalisation neuer Biomarkern im Nierengewebe

Erwartungsgemäß wurde Kim-1 in den proximalen Tubulusepithelzellen gesunder bzw. unbehandelter Ratten nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert. Die Behandlung mit Gentamicin für 7 Tage führte sowohl nach Gabe von 60 mg/kg KG als auch 120 mg/kg KG zu einer deutlich gesteigerten Expression von Kim-1 in proximalen Tubuluszellen, v. a. an der apikalen Seite der Zellen (Abb. 5.4b).

Im Gegensatz zu Kim-1 konnte Lipocalin-2 auch in Kontrolltieren detektiert werden, wobei es überwiegend in intrazellulären Vesikeln lokalisiert war. Jedoch waren in den Kontrolltieren nur wenige Tubuli Lipocalin-2 positiv. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit 60 mg/kg KG Gentamicin zu einer erhöhten vesikulären Färbung von Lipocalin-2 (Abb. 5.4c). Da in den Hochdosistieren die meisten proximalen konvoluten Tubuli am Ende der 7-tägigen Gentamicin Gabe zerstört waren, konnte dieser Effekt der Lipocalin-2-Expression in den Nieren dieser Ratten nicht beobachtet werden.

Ebenso wie Kim-1, war auch Clusterin in Kontrolltieren kaum detektierbar. Verabreichung von Gentamicin an Ratten führte zur Expression von Clusterin im Bereich der proximalen Tubuli, wobei Clusterin hauptsächlich in toten Zellen und Zelltrümmern gefunden wurde (Abb. 5.4a).

Nach Behandlung mit Gentamicin wurde Timp-1 in intrazellulären Vesikeln von proximalen Tubulus-Konvoluten detektiert. In Nierenschnitten der Kontrolltiere zeigte sich eine hohe Expression dieses Proteins, jedoch nahm die Zahl der Timp-1 positiven Zellen als Folge des Untergangs der proximalen Tubuluszellen nach Verabreichung von 120 mg/kg Gentamicin ab (Abb. 5.4d).

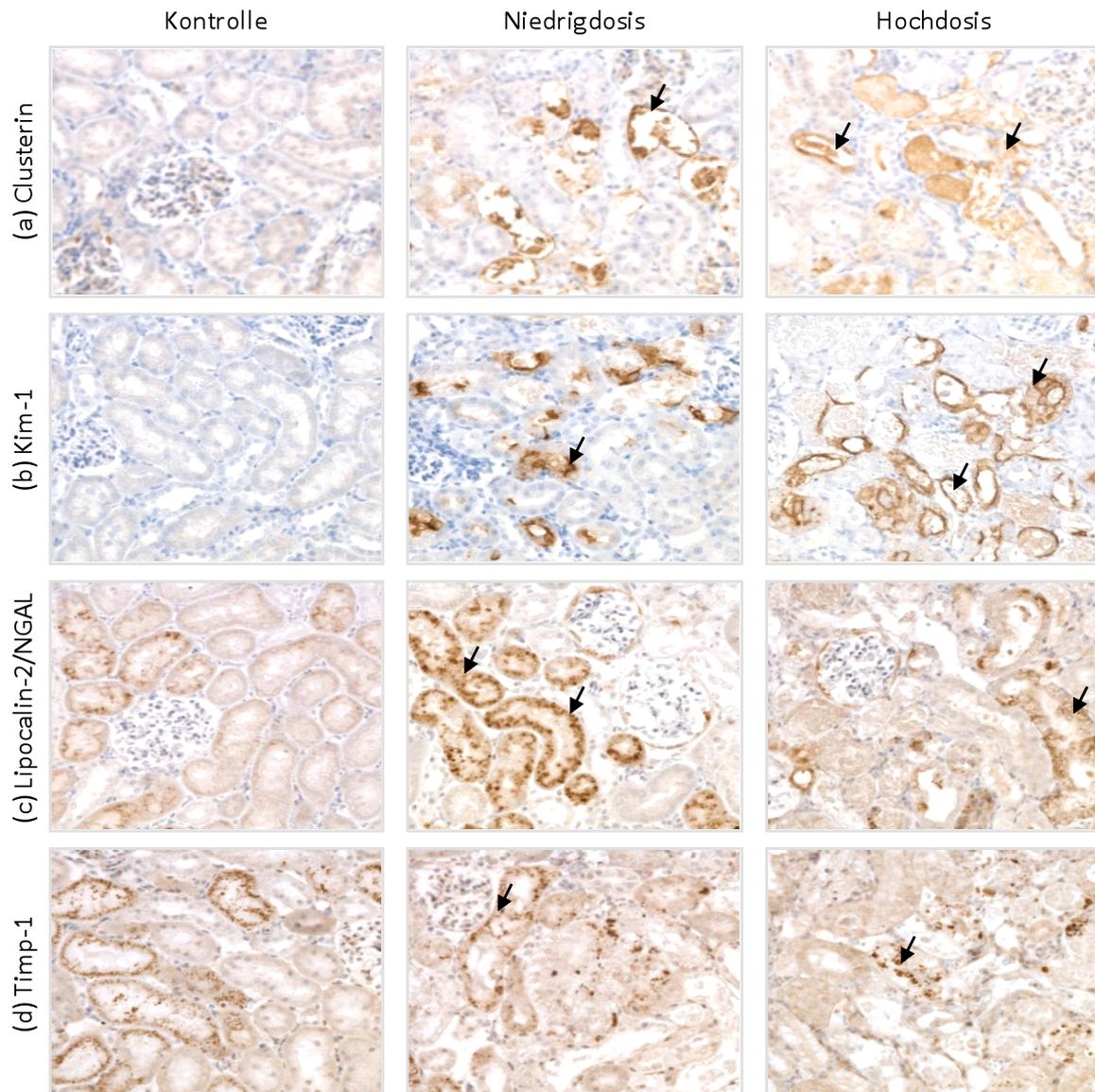


Abb. 5.4 Expression von (a) Clusterin, (b) Kim-1, (c) Lcn2 und (d) Timp-1 in der äußeren Nierenrinde nach 7-tägiger Gabe von 0, 60 oder 120 mg/kg KG Gentamicin. Gentamicin führte zu einer Hochregulierung der Expression von Clusterin, Kim-1 und Lcn2. Clusterin wurde hauptsächlich in toten Zellen, Kim-1 an der apikalen Seite abgeflachter Tubulusepithelzellen und Lcn2 in intrazellulären Vesikeln detektiert. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung zum Verlust von Timp-1 positiven Zellen.

5.5.5 Detektion potentieller Biomarkern im Urin

5.5.5.1 Semiquantitative Detektion mittels Western-Blot

Um einen ersten schnellen Eindruck der veränderten Proteinausscheidung nach Gentamicingabe zu bekommen, wurden die potentiellen Biomarker mit einem spezifischen Antikörper mittels Western-Blot nachgewiesen.

Lipocalin-2

Abbildung 5.5 zeigt die zeitabhängige Veränderung der Lipocalin-2-Ausscheidung eines Kontrolltieres (Nr. 2), sowie eines mit 60 mg/kg KG (Nr. 6) bzw. 120 mg/kg KG (Nr. 15) Gentamicin behandelten Tieres an den 7 aufeinander folgenden Behandlungstagen. Dabei sind alle Werte als optische Dichte (OD) relativ zum Nullurin, bei der keine Gentamicingabe erfolgte, angegeben. In den Urinen der Kontrolltiere konnte über die gesamte Versuchsdauer eine konstante Lipocalin-2-Ausscheidung detektiert werden. Schon nach Behandlung mit 60 mg/kg KG Gentamicin erhöhte sich die Ausscheidung von Lipocalin-2 am ersten Behandlungstag und nahm mit jeder weiteren Behandlung zu. Dieses wurde auch in der Hochdosisgruppe beobachtet.

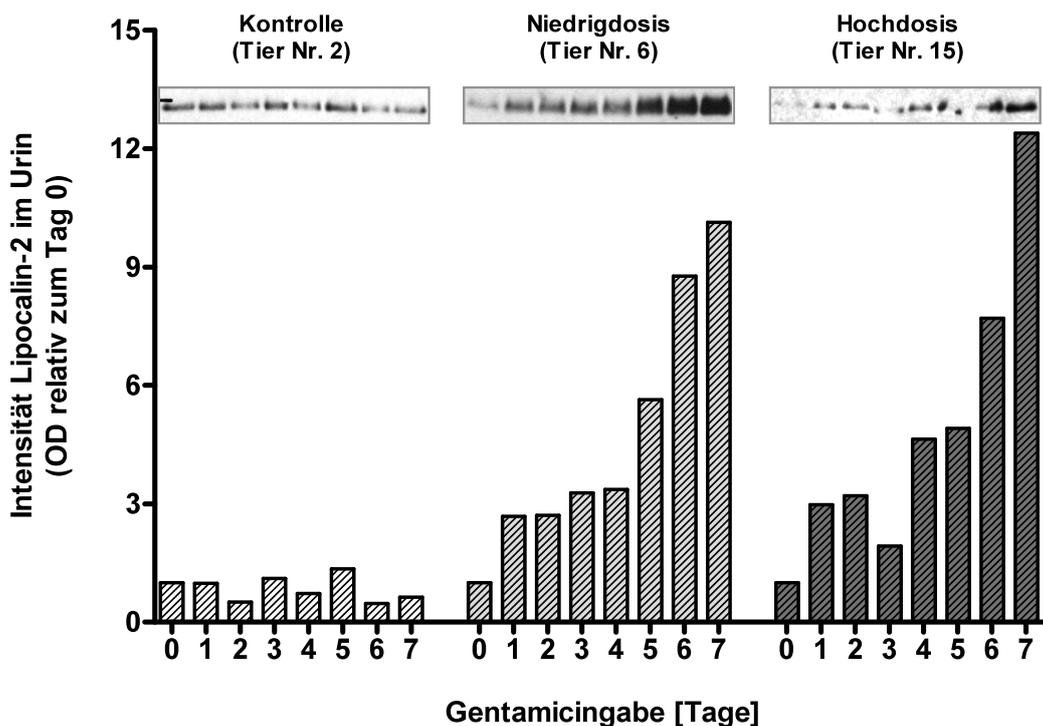


Abb. 5.5 Verlauf der Exkretion von Lcn2 in den Urin nach Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit 0, 60 und 120 mg/kg KG Gentamicin.

Weiterhin ist in Abbildung 5.6 die dosis-abhängige Zunahme von Lipocalin-2 im Urin nach Behandlung mit Gentamicin dargestellt. Die Urinkonzentration von Lipocalin-2 war in der Hochdosis am Tag 1 und in der Niedrigdosis am Tag 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

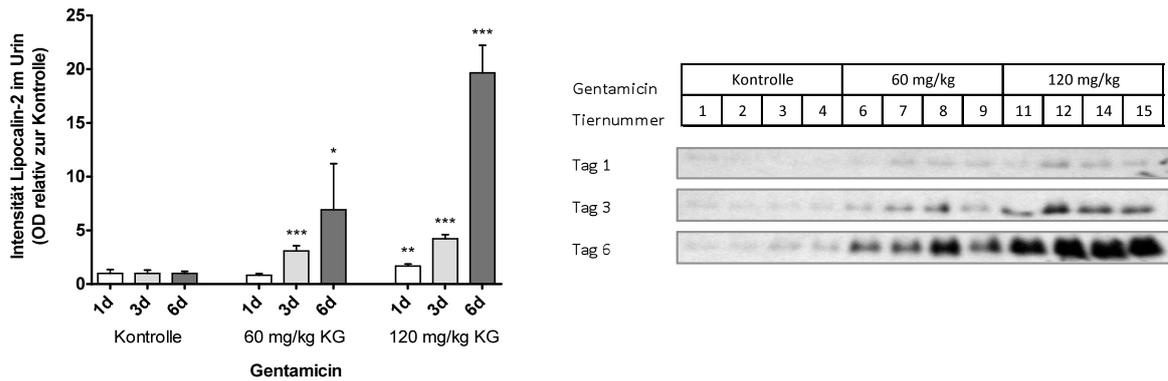


Abb. 5.6 Exkretion von Lipocalin-2 in den Urin nach 1, 3 und 6 Tagen Gentamicinbehandlung. Die Daten sind als Mittelwerte ($n=4$) \pm SD relativ zur Kontrollgruppe angegeben.

Clusterin

Auch die Clusterinkonzentration erhöhte sich sowohl dosisabhängig (Abb. 5.7) als auch zeitabhängig im Urin der Ratten nach Behandlung mit Gentamicin. In beiden Dosisgruppen nahm die Exkretion bereits am Tag 3 statistisch signifikant zu. Abb. 5.8 zeigt den Verlauf der steigenden Clusterinausscheidung eines repräsentativen Hochdosistieres (Nr. 15) nach Gabe von 120 mg/kg KG Gentamicin.

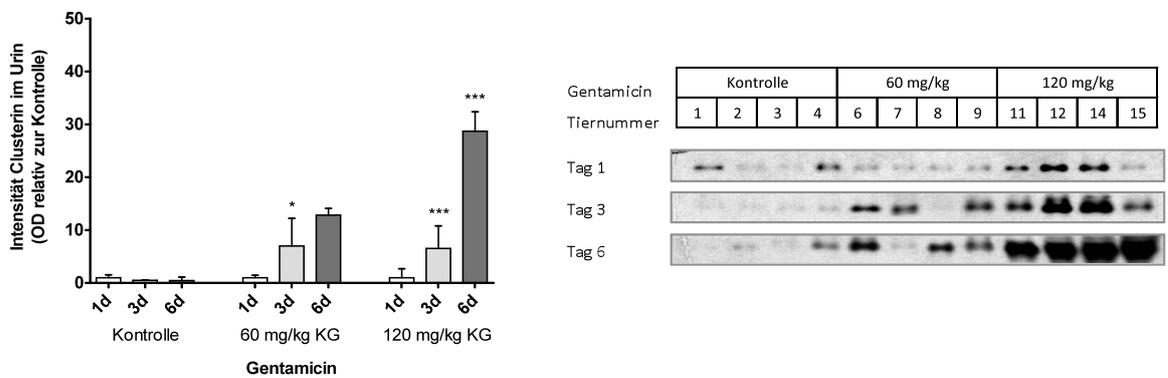


Abb. 5.7 Exkretion von Clusterin in den Urin nach 1, 3 und 6-tägiger Behandlung mit Gentamicin. Die Daten sind als Mittelwerte ($n=4$) \pm SD relativ zur Kontrollgruppe angegeben.

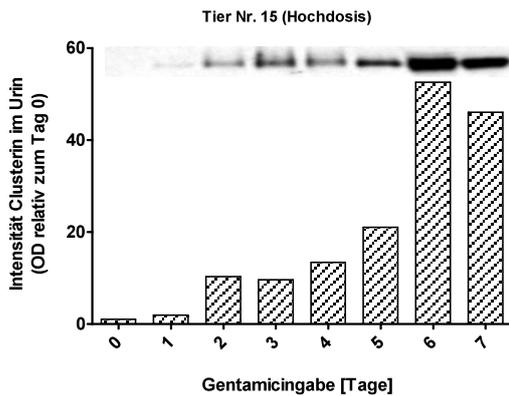


Abb. 5.8 Ausscheidung von Clusterin in den Urin über 7 Tage nach Gabe von 120 mg/kg KG Gentamicin. Die Daten sind relativ zur Konzentration am Tag 0 angegeben.

Kim-1

Weiterhin wurde die Ausscheidung von Kim-1 im Urin mit einem spezifischen Antikörper untersucht. Kim-1 konnte weder im Urin von Kontrolltieren noch nach 4-tägiger Behandlung mit Gentamicin nachgewiesen werden. Erst ab Tag 5 wurde Kim-1 im Urin der Hochdosistiere detektiert und stieg in seiner Konzentration an den darauffolgenden 2 Behandlungstagen (Abb. 5.9).

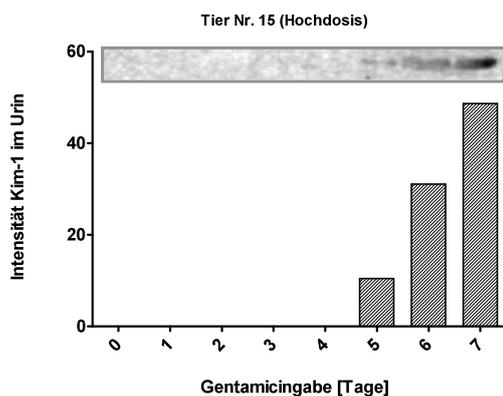


Abb. 5.9 Ausscheidung von Kim-1 in den Urin nach Gabe von 120 mg/kg KG Gentamicin über 7 Tage. Die Daten sind als densitometrische Intensität angegeben

Nach 6 Tagen wurde Kim-1 auch im Urin der mit 60 mg/kg Gentamicin behandelten Tiere detektiert (Abb. 5.10).

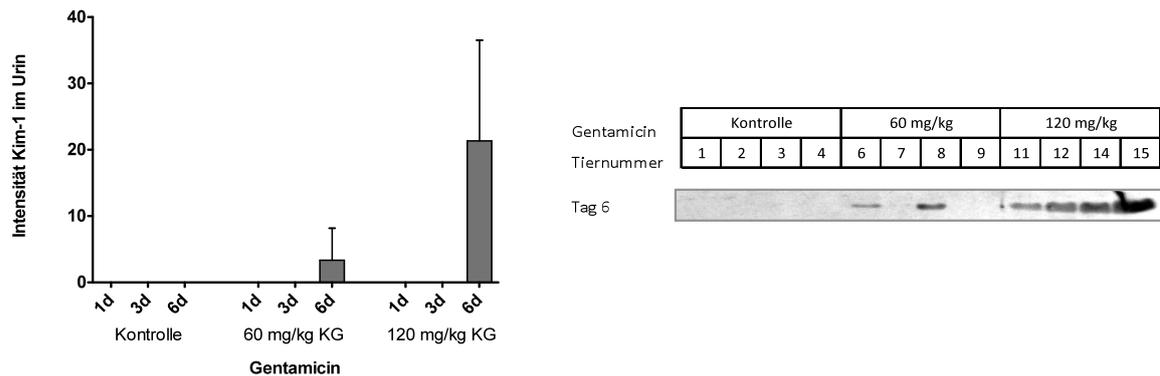


Abb. 5.10 Exkretion von Kim-1 in den Urin nach Gentamicinbehandlung am Tag 6. Die Daten sind als densitometrische Intensität angegeben.

5.5.5.2 Quantitative Analyse der potentiellen Biomarker mittels Singleplex-ELISA

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wurde die qualitative Veränderung der potentiellen Urinbiomarker untersucht. Die erhöhte Exkretion der Urinmarker sollte nun mittels Singleplex-ELISA quantitativ erfasst werden und somit die Ergebnisse des Western-Blot verifiziert werden. Die Vorteile eines ELISA liegen in einer besonders hohen Sensitivität und Spezifität des Systems, das bei einer einfachen und schnellen Durchführbarkeit einen hohen Probendurchsatz in der Routine-Diagnostik ermöglicht.

Dazu wurde die Konzentration von Kim-1, Lipocalin-2, Clusterin und zusätzlich Timp-1 im Urin nach 1, 2, 3 und 6 Tagen Gentamicingabe gemessen. Die erhaltenen Konzentrationen wurden mit Hilfe der Urinvolumina auf die Ausscheidung pro 24 Stunden umgerechnet. Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Verabreichung von Gentamicin stieg die Konzentration von Lipocalin-2 sowohl nach Behandlung mit der hohen, als auch mit der niedrigen Dosis, welche dann am Tag 2 in beiden Gruppen statistisch signifikant war (Abb. 5.11a). Weiterhin zeigte die Analyse am Tag 2 erhöhte Clusterinwerte im Urin der Tiere, welche mit 120 mg/kg KG Gentamicin behandelt wurden, sowie am Tag 3 nach Gabe von 60 mg/kg KG (Abb. 5.11b).

Ebenso konnte nach Gentamicingabe auch am Tag 1 ein erhöhter Level von Kim-1 im Urin im Vergleich zur Kontrollgruppe detektiert werden, der jedoch auf Grund der großen biologischen Varianz innerhalb der Tiere einer Gruppe zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant war (Abb. 5.11c). Aufgrund der hohen Sensitivität der ELISA-Methode war es im Gegensatz zur Western-Blot-Analyse möglich, geringe Mengen des Proteins in den Kontrolltieren nachzuweisen. Auch Timp-1 wurde nach Gentamicinverabreichung

vermehrt in den Urin abgegeben. Die Konzentration an Timp-1 im Urin erhöhte sich signifikant ab dem dritten Tag in der Hochdosisgruppe und ab dem 6. Tag nach Behandlung mit der niedrigen Dosis von 60 mg/kg KG Gentamicin (Abb. 5.11d).

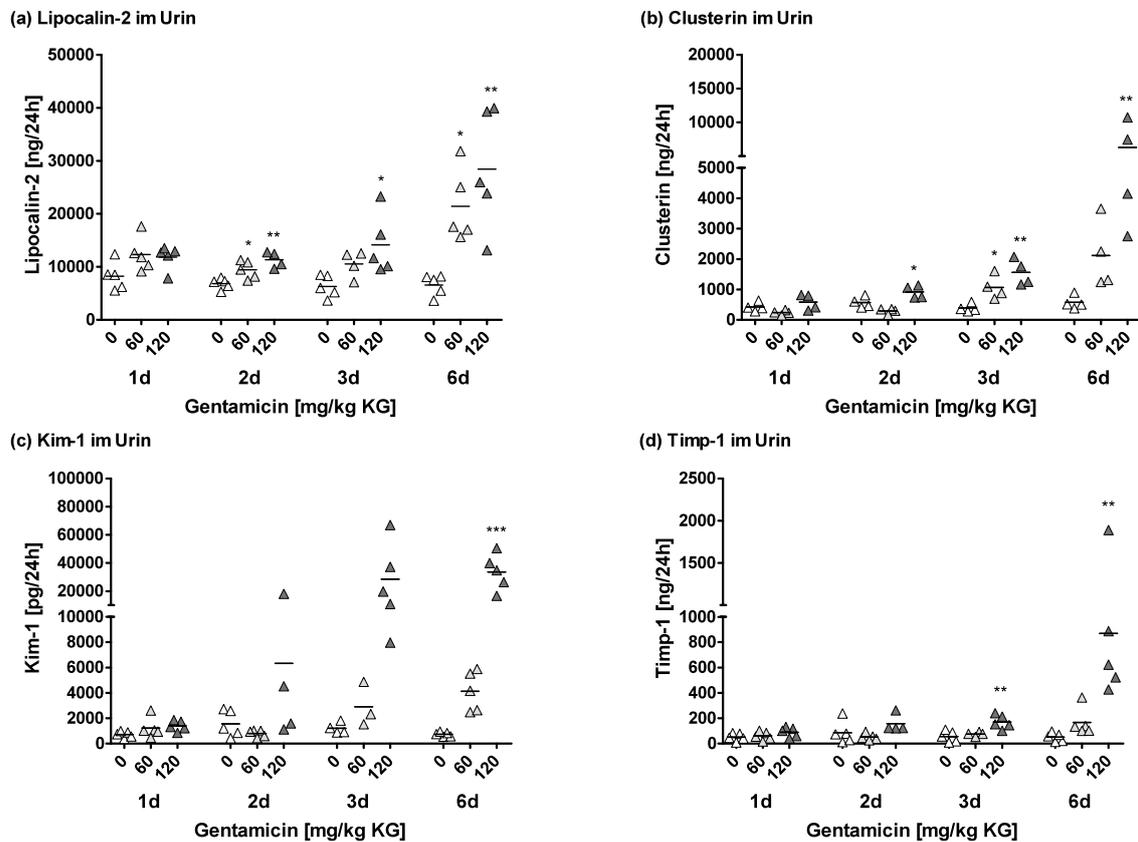


Abb. 5.11 Ausscheidung von (a) Lipocalin-2, (b) Clusterin, (c) Kim-1 und (d) Timp-1 nach 1, 2, 3 und 6 Tagen Gentamicingabe. In der Graphik sind die Werte der Einzeltiere aufgetragen. Der Balken entspricht dem Mittelwert der jeweiligen Gruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.5.5.3 Receiver Operating Characteristic (ROC)-Analyse

Die Genauigkeit eines Tests (in diesem Fall Biomarker) ist durch seine Sensitivität und Spezifität gekennzeichnet. Die graphische Darstellung mittels „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Kurven ist eine akzeptierte Methode um die Präzision verschiedener Tests zu vergleichen und somit Aussagen zu treffen, welcher Test/Biomarker besser für die jeweilige Analyse ist (Akobeng, 2007). Die Fläche unter der Kurve zeigt, wie gut der jeweilige Marker zwischen behandelten (erkrankten) und nicht-behandelten (gesunden) Tieren unterscheiden kann. Ein perfekter Marker würde dabei den Wert 1 erhalten. AUC-Werte über 0,9 weisen auf einen sehr sensitiven und empfindlichen Marker hin, während Werte zwischen 0,7 und 0,9 nur eine moderate

Sensitivität und Spezifität aufweisen. Ist die AUC kleiner als 0,7, so ist der Marker unspezifisch und unempfindlich (Akobeng, 2007).

Die ROC-Kurven wurden von den Daten für Kim-1, Clusterin, Lipocalin-2 und Timp-1 im Urin, sowie von Glucose und γ -Glutamyltransferase im Urin und Harnstoff und Kreatinin im Serum erstellt (Abb. 5.12) und die jeweilige AUC berechnet (Tab. 5.3). Die AUC der Kurven von Lipocalin-2 (0,95) und Kim-1 (0,92) zeigt die höchsten Werte und deutet darauf hin, dass eine erhöhte Ausscheidung dieser beiden Proteine in den Urin die spezifischsten und sensitivsten Marker für die Gentamicin-induzierte Nierentoxizität sind. Im Gegensatz dazu sind die AUC-Werte für Timp-1 (0,84) und Clusterin (0,77) geringer und liegen sogar unter denen von Glucose (0,86) und Serumharnstoff (0,88). Somit sind Timp-1 und Clusterin im Urin nach ROC-Analyse weniger sensitive und spezifische Biomarker für Nephrotoxizität. Serumkreatinin und γ -Glutamyltransferase reagieren als letztes mit einer Konzentrationsveränderung als Antwort auf die toxische Wirkung von Gentamicin, sichtbar an den niedrigen AUC-Werten (<0,7).

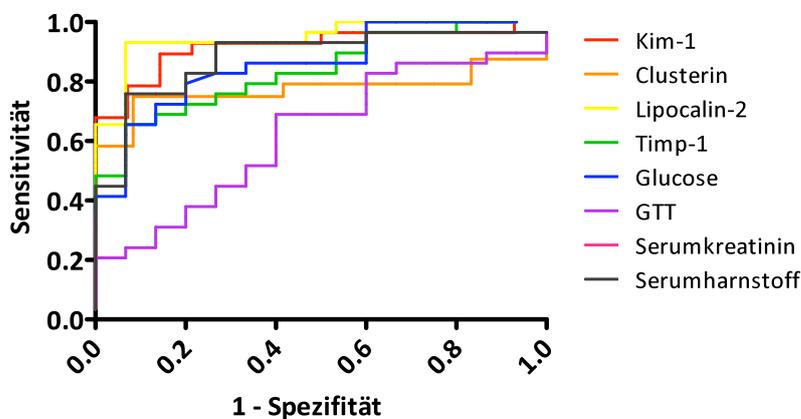


Abb. 5.12 „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Kurven für die potentiellen Urinbiomarker im Vergleich zu den traditionellen Parametern der Klinische Chemie. Die Fläche unter der Kurve (AUC) steht als Maß für die Qualität des jeweiligen Parameters.

Tabelle 5.3 „Receiver Operating Characteristic“ (ROC)-Analyse der potentiellen Urinbiomarker im Vergleich zu den traditionellen klinisch-chemischen Parametern

Nierenbiomarker	AUC	95 % Konfidenzintervall	p-value
Serumharnstoff	0,88	0,78-0,99	< 0,0001
Serumkreatinin	0,68	0,52-0,84	0,0687
Glucose	0,86	0,75-0,97	0,0001
GGT	0,63	0,46-0,80	0,1773
Kim-1	0,92	0,83-1,00	< 0,0001
Clusterin	0,77	0,62-0,93	0,0080
Lipocalin-2	0,95	0,88-1,01	< 0,0001
Timp-1	0,84	0,72-0,95	0,0003

5.5.5.4 Quantitative Analyse der Biomarker mit Hilfe des WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel

Von der Firma Merck wurde 2008 ein Multiplex-ELISA-Assay für potentielle Nierentoxizitätsmarker entwickelt. Mit diesem Kit wurden die Konzentrationen von den 10 potentiellen Nierenbiomarkern β_2 M, α -GST, Kim-1, Timp-1, VEGF, Calbindin, Cystatin-C, Clusterin, NGAL und Osteopontin in den Urinen der mit Gentamicin behandelten Ratten vom Tag 0, 1, 3 und 7 mittels Multiplex-Analyse untersucht (Abb. 5.13). Die Verabreichung von Gentamicin führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Konzentrationszunahme von NGAL, Cystatin-C, Calbindin, Kim-1, VEGF, Timp-1, β_2 M und Clusterin, wobei die Konzentrationen von Cystatin-C und NGAL im Urin schon nach einem Tag nach Behandlung mit 60 mg/kg KG Gentamicin im Vergleich zur Kontrolle stiegen. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der Osteopontinausscheidung beobachtet werden. Die Konzentration von α -GST konnte zu keinem Zeitpunkt im Urin bestimmt werden, da sie unter dem Detektionslimit lag.

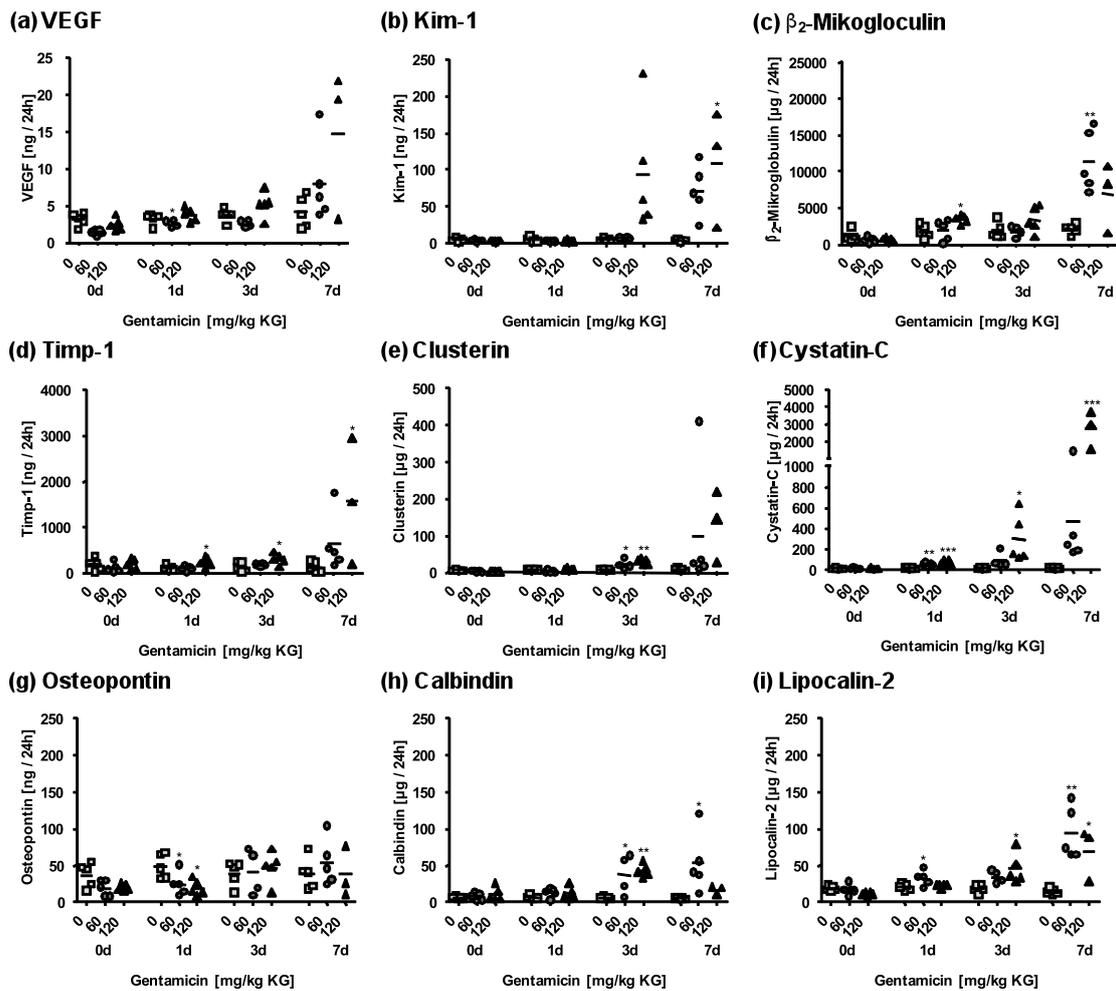


Abb. 5.13 Konzentration von (a) VEGF, (b) Kim-1, (c) β_2 M, (d) Timp-1, (e) Clu, (f) Cystatin-C, (g) OPN, (h) Calbindin und (i) Lcn-2 im Urin männlicher Ratten nach Behandlung mit 0,60 oder 120 mg/kg KG für 0, 1, 3 und 7 Tage. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Auch von diesen Daten wurden die entsprechenden ROC-Kurven der einzelnen Proteine erstellt und die dazugehörigen AUC-Werte berechnet. Den Ergebnissen dieser Analyse zu folge ist Cystatin-C mit einer AUC von 1,0 der sensitivste und spezifischste Marker zur Erkennung der durch Gentamicin-induzierten Nierentoxizität. Auch Calbindin und Lipocalin-2 scheinen mit einer AUC größer 0,9 sehr empfindliche Marker für Nierentoxizität darzustellen.

Tabelle 5.4 ROC-Analyse der potentiellen Biomarker nach Gentamicingabe. Die AUC-Werte stehen für die Güte des Tests

Nierenbiomarker	AUC	95 % Konfidenzintervall	p-value
Serumharnstoff	0,88	0,78-0,99	< 0,0001
Serumkreatinin	0,68	0,52-0,84	0,0687
Calbindin	0,92	0,83-1,01	< 0,0001
Clusterin	0,74	0,59-0,90	0,0098
Cystatin-C	1,00	1,00-1,00	< 0,0001
Kim-1	0,73	0,58-0,88	0,0152
Lipocalin-2	0,95	0,89-1,00	< 0,0001
β_2 M	0,70	0,55-0,85	0,0303
OPN	0,60	0,43-0,77	0,2760
Timp-1	0,78	0,63-0,93	0,0032
VEGF	0,55	0,38-0,73	0,5636

5.6 Diskussion

Die Gentamicin-Studie wurde durchgeführt, um die verbesserte Vorhersagekraft neuer potentieller Nierenbiomarker (Kim-1, Lipocalin-2, Clusterin und Timp-1) im Vergleich zu traditionellen Methoden (Histopathologie, Klinische Chemie) zu bewerten. Ein besonderes Interesse dieser Studie galt dabei der möglichen Exkretion dieser Proteine in den Urin und somit dem Nutzen dieser Proteine als nicht-invasive Biomarker.

Als Modellsubstanz wurde Gentamicin verwendet. Es führt sowohl im Menschen als auch im Tier im gewundenen und geraden Teil des proximalen Tubulus zu tubulären Nekrosen. Die Niere ist das Hauptausscheidungsorgan für Gentamicin. Es wird im Glomerulus frei filtriert, bindet dann im S₁- und S₂-Segment des proximalen Tubulus an die Bürstensaummembran und gelangt über adsorptive Endozytose in die Tubuluszelle. Dort wird es in Lysosomen gespeichert und akkumuliert.

In dieser Studie wurden männlichen Wistar-Ratten auf 2 Einzeldosen verteilt täglich 60 mg/kg KG (Niedrigdosis) bzw. 120 mg/kg KG (Hochdosis) Gentamicin für 7 Tage subkutan verabreicht. Um den Verlauf der Ausscheidung neuer Markerproteine infolge der Gentamicinbehandlung zu verfolgen, wurde der Urin der Ratten in 24 h Intervalle gesammelt.

Histopathologisch führte die Behandlung wie erwartet in der Nierenrinde zu toxischen Effekten (Zelltod), v. a. im gewundenen Teil des proximalen Tubulus. Die kontinuierliche Gabe von Gentamicin führte in den Ratten zu einer erhöhten Ausscheidung der potentiellen Biomarker im Urin. Somit konnte eine vermehrte Exkretion der Urinbiomarker als sensitiver Endpunkt für die Erkennung von Nierenschäden identifiziert werden. Im Einklang mit der erhöhten Ausscheidung der potentiellen Biomarker in den Urin konnte auch eine erhöhte Gen- und Proteinexpression dieser Marker im proximalen Tubulus diagnostiziert werden und kann daher als Bestätigung der Proteinausscheidung herangezogen werden. Ebenso erhält man dadurch zusätzliche Informationen zur Lokalisation der Markergene im Nierengewebe.

Im Einklang mit Ergebnissen früher tierexperimenteller und Humanstudien, erwies sich auch Kim-1 in dieser Arbeit als wesentlich sensitiverer Nierentoxizitätsmarker als bisher verwendete klinisch-chemische Parameter, wobei die Menge des Proteins im Urin parallel zum Grad des Nierenschadens und der Expression von Kim-1 in der Niere stieg (Ichimura, *et al.*, 2004; Prozialeck, *et al.*, 2007; Rached, *et al.*, 2008; Zhou, *et al.*, 2008). Übereinstimmend mit anderen Studien, konnte Kim-1 in gesunden Nierenzellen nur minimal detektiert werden, hingegen stieg die Expression infolge der tubulären Nierenschädigung drastisch an (Ichimura, *et al.*, 1998). Das Protein war hauptsächlich an der apikalen Seite der abgeflachten (dedifferenzierten) Tubulusepithelzellen lokalisiert. (Ichimura, *et al.*, 2004; Vaidya, *et al.*, 2006). Über die Funktion von Kim-1 ist bisher noch wenig bekannt. Ichimura *et al.* zeigte kürzlich, dass Kim-1 möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Beseitigung toter Zellen und Zelltrümmern spielt (Ichimura *et al.*, 2008). Apoptotische Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche Phosphatidylserin, welches von Makrophagen erkannt wird (Hoffmann *et al.*, 2001). Diese nehmen die apoptotischen Körper über Phagozytose auf, ohne dabei eine Entzündung hervorzurufen. Geschädigte Tubuli enthalten aber nur sehr wenige Makrophagen, daher werden andere Mechanismen zur Beseitigung benötigt. Interessanterweise weisen Kim-1-exprimierende Epithelzellen ähnliche phagozytierende Eigenschaften wie Makrophagen auf. Kim-1 scheint dabei als Phosphatidylserin-Rezeptor zu wirken und Tubulusepithelzellen zur Aufnahme der apoptotischen Körperchen und Zelltrümmer zu befähigen. Somit fördert die Expression von Kim-1 die Regeneration des Tubulusepithels infolge einer Schädigung, welches histologisch auch in dieser Studie beobachtet wurde. Auch die Funktion der

löslichen Form von Kim-1 ist bisher kaum erforscht, jedoch gibt es Hinweise, dass sezernierendes Kim-1 über seine Ig-Domäne Eiweißablagerungen im Tubuluslumen bindet und somit einer Obstruktion des Lumens entgegenwirkt (Bailly, *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2007). Proteinablagerungen konnten histologisch auch in den Nieren der Hochdosistiere nachgewiesen werden. Somit bestätigen die Daten dieser Studie Kim-1 als vielversprechenden sensitiven und auch spezifischen Marker für tubuläre Nierenschädigung. Ein großer Vorteil dieses Markers ist dabei die aufgrund der Stabilität des Proteins mögliche Detektion im Urin und damit die Verwendung von Kim-1 als nicht-invasiven Biomarker für Schädigungen im Bereich der proximalen Tubuli.

Ebenso wie in anderen Studien (Mishra, *et al.*, 2003; Mishra, *et al.*, 2004), war eine signifikante Erhöhung der Lipocalin-2 Ausscheidung einer der frühesten Effekte nach Verabreichung von Gentamicin und konnten schon nach 2-tägiger Behandlung mit der Hoch- und auch Niedrigdosis detektiert werden. Die ROC-Analyse der Singleplex-ELISA zeigt, dass Lipocalin-2 mit einem AUC-Wert von 0,95 in dieser Studie sogar noch sensitiver ist als Kim-1 (AUC=0,92). Unterstützend zur erhöhten Lcn2-Exkretion zeigte sich immunhistochemisch eine erhöhte Expression von Lcn2 in der Nierenrinde von mit Gentamicin behandelten Ratten sowie eine gesteigerte mRNA-Expression. Lcn2 wurde in proximalen Tubulusepithelzellen in intrazellulären Vesikeln lokalisiert. Zwar zeigten einige Tubuli der Kontrollnieren ebenfalls eine positive Lcn2-Färbung, jedoch stieg diese vesikuläre Färbung in den Nieren der mit 60 mg/kg Gentamicin behandelten Ratten drastisch an. Dieses deckt sich mit Ergebnissen früherer Studien, bei denen ein Anstieg der Expression von Lipocalin-2 in Nieren von Patienten mit tubulointerstitieller Schädigung auftrat (Ding, *et al.*, 2007). In den Tieren der Hochdosisgruppe konnte dieser Effekt nicht ganz so stark beobachtet werden, da die meisten gewundenen Tubuli aufgrund der Gentamicingabe am Ende der Studie zerstört waren.

Als weiterer potentieller, nicht-invasiver Biomarker wird Clusterin beschrieben. Durch Gentamicin wurde die Expression von Clusterin auf mRNA- und Proteinebene induziert. Wie auch Kim-1 wurde Clusterin in Kontrolltieren nur auf einem sehr niedrigen Level in den Glomeruli lokalisiert. Gentamicin führte zu einer gesteigerten Expression im Bereich der proximalen Tubuli, wobei das Protein überwiegend in toten Zellen und Zelltrümmern detektiert wurde (Hidaka, *et al.*, 2002; Rosenberg, *et al.*, 2002; Witzgall, *et al.*, 1994). Obwohl sich die Konzentration von Clusterin schon am Tag 2 nach Gabe von 120 mg/kg

KG bzw. Tag 3 nach 60 mg/kg KG Gentamicin im Urin erhöhte und auch im weiteren Verlauf mit fortschreitender Tubulusschädigung anstieg, wurde Clusterin im Urin im Rahmen der ROC-Analyse als deutlich weniger sensitiv eingestuft. Die Fläche unter der Kurve (AUC) war mit 0,77 deutlich geringer als bei Kim-1 (AUC = 0,92), Lcn2 (AUC = 0,95) und sogar Glucose (AUC = 0,86). Von Hidaka *et al.* wurde die These aufgestellt, dass sezernierendes Clusterin zwischen tubulärer und glomerulärer Nierenschädigung unterscheiden kann (Hidaka, *et al.*, 2002). Dazu wurde die Urinkonzentration von Clusterin an tubulär- und glomerulär-erkrankten Ratten gemessen. Bei den Tieren, welche an einer Schädigung des Tubulus litten, konnte eine deutlich höhere Exkretion von Clusterin im Urin gemessen werden. In einer späteren Studie an Patienten konnte dies nicht bestätigt werden (Solichova, *et al.*, 2007). Die molekularen Mechanismen, die der Regulation von Clusterin zugrunde liegen, sind bisweilen weitestgehend unklar. Offenbar gibt es einen Zusammenhang zwischen der Induktion der sezernierenden Form von Clusterin in der Zelle mit dem Schutz vor Apoptose und Stress (Shannan, *et al.*, 2006). Da ebenfalls eine erhöhte Clusterin-Konzentration im Urin von Patienten mit Blasenkrebs auftrat, wurde Clusterin auch als Labormarker für die Diagnose von Blasenkrebs vorgeschlagen (Stejskal und Fiala, 2006). Möglicherweise können neben renalen Tubuluszellen auch andere Zellen Clusterin sezernieren. Somit führt eine erhöhte Konzentration im Urin nicht zwangsläufig auf einen Nierenschaden zurück.

Nach 7-tägiger Gentamicinbehandlung stieg die mRNA-Expression von Timp-1 in der Niere. Dieser Effekt konnte sich auf Proteinebene im Nierengewebe allerdings nicht bestätigen. Zwar wurde das in intrazellulären Vesikeln eingeschlossene Protein in den Kontrollnieren in zahlreichen Zellen vom proximalen Tubulus lokalisiert, jedoch führte die Behandlung, wahrscheinlich durch die Zerstörung der proximalen Tubuli, zu einem Verlust an Timp-1-positiven Zellen. Ähnlich wie auch Clusterin ist Timp-1 in eine Vielzahl von zellulären Prozessen involviert. Neben der antiapoptotische Wirkung ist Timp-1 auch in der Lage, das Zellwachstum zu regulieren (Stetler-Stevenson, 2008). Desweiteren gibt es Hinweise, dass bei Nierenschäden Timp-1 die Lebensdauer von Granulozyten innerhalb entzündlicher Prozesse verlängert. Zusätzlich gilt Timp-1 als Marker für Fibrose, indem es den Abbau der extrazellulären Matrix (ECM) durch Inhibierung der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) hemmt (Tang *et al.*, 1994). Jedoch konnten im Rahmen unserer Arbeit keine Anzeichen einer Fibrose festgestellt werden. Es existieren Ergebnisse

von Studien, in denen Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen sowie mit Cyclosporin-behandelte SDNS-(*steroid-dependent nephrotic syndrome*) Kinder erhöhte Timp-1 Konzentrationen im Urin auftraten (Horstrup, *et al.*, 2002; Liu, *et al.*, 2006; Sanders, *et al.*, 2007; Wasilewska und Zoch-Zwierz, 2008). Dieses konnte auch nach Gentamicingabe gezeigt werden. Allerdings konnte in unserer Studie die erhöhte Ausscheidung des Proteins erst nach 3 Tagen Hochdosis- bzw. 6 Tagen Niedrigdosisbehandlung beobachtet werden, welches möglicherweise durch den Verlust der proximalen Tubuluszellen zustande kam. Somit wurde auch die Exkretion von Timp-1 anhand der AUC von 0,84 im Vergleich zu Kim-1 und Lipocalin-2 als wenig empfindlicher, nicht-invasiver Biomarker identifiziert.

Zusätzlich wurden Urine der mit Gentamicin behandelten Ratten mit dem „WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel 1 and 2“ (Merck, Darmstadt, Deutschland) analysiert. Mit diesem Multiplex-Assay ist es möglich, die Konzentration von 10 potentiellen Biomarkern im Urin mittels Luminex®-Technologie zu messen. Das Panel 1 besteht dabei aus den Markern β_2 -Mikroglobulin (β_2 M), α -Glutathion-S-Transferase (GST- α), „Kidney Injury Molecule-1“ (Kim-1), „Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1“ (Timp-1) sowie „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) und das Panel 2 aus den Markern Calbindin, Clusterin, Cystatin-C, NGAL (Neutrophil gelatinase-associated Lipocalin) und Osteopontin. Mit Ausnahme von Osteopontin und GST- α konnte nach Gentamicingabe ein signifikanter Anstieg aller potentiellen Marker detektiert werden. Es ist denkbar, dass einige Proteine, wie OPN und GST- α sich im Urin zersetzen bzw. abgebaut werden und somit nicht mehr gemessen werden können (Christensen *et al.*, 2008). Im Fall von GST- α empfehlen einige Hersteller kommerzieller Assays den Urinproben einen geeigneten Stabilisierungspuffer zuzusetzen. (<http://www.argutusmed.com>).

Wie auch mittels des Singleplex-ELISAs wurde Lcn-2 (neben Cystatin-C (AUC = 1,00) und Calbindin (AUC = 0,95)) mit dem Multiplex-ELISA als eines der besten Marker für Gentamicin-induzierte Nierenschädigung mit einer AUC von 0,95 identifiziert. Cystatin-C ist ein extrazellulärer Cysteinproteinase-Inhibitor mit einer molekularen Masse von ungefähr 15 kDa und wird von allen kernhaltigen Zellen gebildet. Es wird im Glomerulus frei filtriert, vom proximalen Tubuluszellen resorbiert und degradiert. Aufgrund der durch Gentamicin geschädigten Tubuli wird das Protein nicht mehr in die Zellen aufgenommen und somit vermehrt in den Urin abgegeben. In zahlreiche Studien wird eine erhöhte

Konzentration von Cystatin-C im Serum als Marker für eine eingeschränkte glomeruläre Filtrationsrate verwendet (Christensson, *et al.*, 2003), hingegen gibt es bisher noch wenige Daten, die die Verwendung von Cystatin-C im Urin als potentiellen Marker für tubuläre Schädigungen unterstützen (Colle, *et al.*, 1990; Conti, *et al.*, 2006; Liangos *et al.*, 2009; Uchida und Gotoh, 2002). So konnte im Tierexperiment als auch bei Patienten mit tubulärer Schädigung ein Anstieg der Cystatin-C Konzentration im Urin detektiert werden (Colle, *et al.*, 1990; Conti, *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu blieb die Exkretion von Cystatin-C in Patienten mit glomerulärer Dysfunktion unverändert (Conti, *et al.*, 2006).

Calbindin wurde zu allen Zeitpunkten von den Hochdosistieren vermehrt mit dem Urin ausgeschieden. Das Calcium-bindende Calbindin ist im distalen Tubulus lokalisiert und spielt neben der Calciumresorption auch eine wichtige Rolle beim Schutz der Zellen vor toxischen Konzentrationen an intrazellulärem Calcium. Da bekannterweise die Expression von Calbindin von Faktoren wie Vitamin D und Calcium abhängt, ist die erhöhte Exkretion nicht zwingendermaßen auf eine Schädigung des Tubulus zurückzuführen.

Generell lässt sich sagen, dass die Analyse der Konzentrationen von Lipocalin-2, Clusterin und Timp-1 mittels der „WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel“ gut mit denen der Singleplex-ELISA überein stimmten. Im Gegensatz dazu scheint es, dass der Singleplex Assay für Kim-1 im Urin, welcher im Labor von Vaidya/Bonventre entwickelt wurde, sensitiver als der „WideScreen Assay“ ist (AUC = 0,92 vs. AUC = 0,73).

Auf der einen Seite ist zwar der analytische Aufwand beim Multiplex-ELISA geringer, jedoch kann es bei der großen Anzahl von Analyten zu Interaktionen zwischen den einzelnen Bindungspartnern kommen, wodurch der Assay an Sensitivität verliert. Ebenso können Unterschiede auch an der Spezifität und Sensitivität des jeweils verwendeten Antikörpers liegen. Dieser sollte in der Lage sein, nur sein spezifisches Antigen zu binden und frei von Kreuzreaktionen sein. Daher sollte ein guter Assay vor der Zulassung mittels verschiedener Studien und Probenbeispiele validiert werden.

6 UNTERSUCHUNG NEUER BIOMARKER FÜR NEPHROTOXIZITÄT IM RAHMEN PRÄKLINISCHER STUDIEN (INNOMED-PREDTOX)

6.1 Einführung

InnoMed-PredTox ist ein von der Europäischen Union geförderter Zusammenschluss zwischen industriellen pharmazeutischen Unternehmen und wissenschaftlichen Einrichtungen mit dem Ziel einer verbesserten Arzneimittelsicherheit durch die Kombination neuer „Omics“-Technologien und traditioneller Methoden. Da Leber- und Nierentoxizität eine der Hauptursachen für Xenobiotika-induzierte Organtoxizität sind, galt es, verbesserte Vorhersagen für die Toxizität dieser beiden Organe in präklinischen Studien zu erhalten.

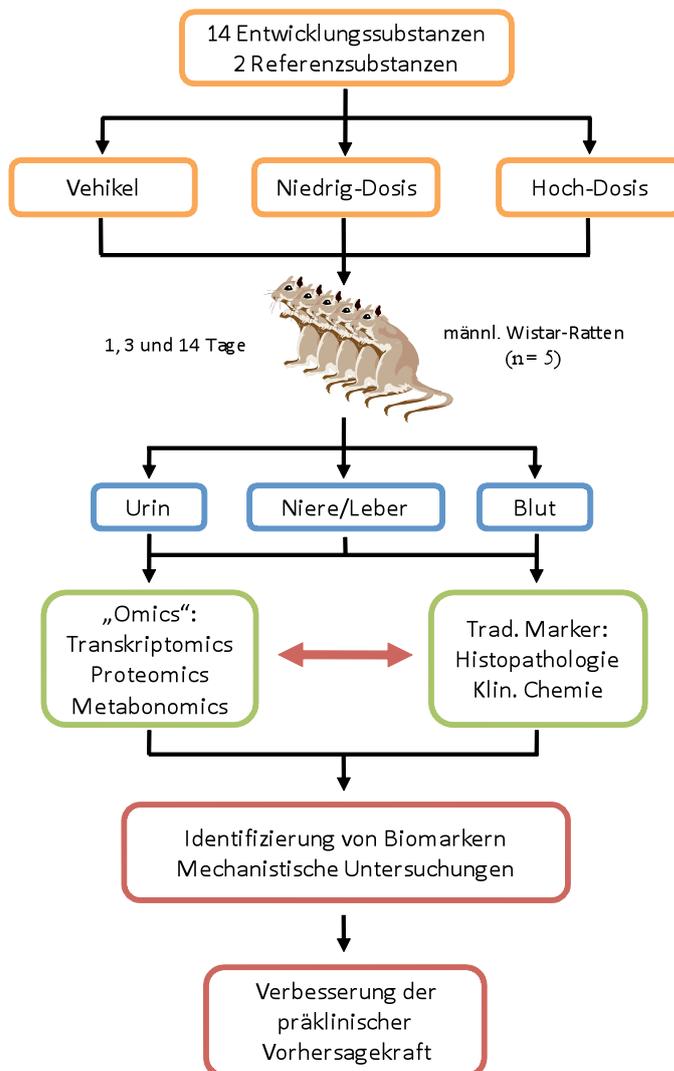


Abb. 6.1 Allgemeines Studiendesign des InnoMed-PredTox-Projektes

Ein weiteres Bestreben war es, Mechanismen, die zur Entwicklung von Nieren- und Leberschäden führen, zu untersuchen und neue Biomarker für die Vorhersage der Organtoxizität zu identifizieren. Dazu wurden männliche Wistar-Ratten 14 Substanzen verabreicht, die in ihrer Entwicklung aufgrund von Leber- oder Nierentoxizität gestoppt wurden. Weiterhin wurden als Referenzsubstanzen Gentamicin und Troglitazon verabreicht. Die Tiere wurden in 2 verschiedenen Dosen plus Kontrollgruppe für 1, 3 und 14 Tage behandelt (Abb. 6.1).

Aufgrund der histopathologischen Befunde wurden die Substanzen in die 3 verschiedenen Gruppen Leberhypertrophie, Schädigungen der Gallengänge und Nephrotoxizität eingeteilt.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur die Studien des PredTox-Projektes bearbeitet, in denen Hinweise auf Nierentoxizität auftraten. Histopathologische Veränderungen der Niere traten nach 14-tägiger Hochdosisbehandlung in Form von Schädigungen der proximalen Tubuli einschließlich Degeneration, Regeneration und Nekrose sowie mononukleären Zellinfiltraten und hyalinen Ablagerungen auf. Bei den nephrotoxischen Studien handelte es sich um die Substanzen BI-2, BI-3, Gentamicin und IMM125. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die Studien mit den Substanzen BI-3, Gentamicin und IMM125 gelegt, welche Schädigungen im Bereich der proximalen Tubuli aufwiesen.

Anhand dieser 4 Nierentoxizitätsstudien wurden die aus der Literatur bekannten potentiellen Biomarker im Gewebe und Urin gemessen. Ein weiteres Ziel eines Projektpartners war es, neue Marker im Gewebe mit Hilfe von 2D-DIGE zu identifizieren. Veränderungen in der Expression von Proteinen, die dabei in mindestens 2 Nierentoxizitätsstudien auftraten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf ihre Dosis-Abhängigkeit mittels Western-Blot untersucht.

6.2 Studiendesign

Im Rahmen des PredTox-Projektes wurden alle Tierversuche nach einheitlichem Studienprotokoll durchgeführt. 8-10 Wochen alte männliche Wistar-Ratten wurden von kommerziellen Lieferanten bezogen. Die Tiere wurden zufällig auf 9 Gruppen à 5 Tiere verteilt (Tab. 6.1). BI-2 (0, 2,5, 15 mg/kg KG), BI-3 (0, 100, 1000 mg/kg KG), Gentamicin (0, 25, 75 mg/kg KG) und IMM125 (0, 30, 100 mg/kg KG) wurden für 1, 3 oder 14 Tage oral via Schlundsonde (BI-2, BI-3 IMM125) bzw. subkutan (Gentamicin) verabreicht.

Tabelle 6.1 Gruppeneinteilung und Dosierung männlicher Wistar-Ratten der PredTox-Studien (Veh, Vehikel; ND, Niedrigdosis; HD, Hochdosis)

Gruppe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Tiernummer	01–05	06–10	11–15	16–20	21–25	26–30	31–25	36–40	41–45
Dosis	Veh	ND	HD	Veh	ND	HD	Veh	ND	HD
Behandlungsdauer [d]	1	1	1	3	3	3	14	14	14

Die Tiere der Gruppen G-I wurden jeweils nach der ersten, dritten und 12. Substanzgabe für 16 Stunden in einen Stoffwechsellkäfig gesetzt und der Urin auf Eis gesammelt. Dieser wurde in Aliquoten bei -80 °C gelagert. Nach der Tötung der Tiere, wurden Teile der Leber und Niere in Formalin-Lösung überführt. Der Rest sowie das Blut wurden in Anteilen bei -80 °C gelagert.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 BI-2

Männlichen Wistar-Ratten wurde die Substanz BI-2 in Dosen von 0, 2,5 und 15 mg/kg KG für 1, 3 und 14 Tage verabreicht (Strukturformel vom Hersteller nicht bekannt gegeben). Die Substanz wurde als Nierentoxin ausgewählt, da aus früheren Studien bekannt ist, dass die Behandlung von Ratten mit 15 mg/kg KG BI-2 für 4 Wochen zur Nekrose im Bereich der Nierenpapilla führt.

6.3.1.1 Klinische Chemie und Histopathologie

Minimale histopathologische Effekte in Form von hyalinen Droplets traten in den Nieren der Tiere auf, welche für 14 Tage mit der Hochdosis (15 mg/kg KG) behandelt wurden. Die erwartete papilläre Nekrose konnte nach 2-wöchiger Verabreichung nicht beobachtet werden. Die Leber zeigte wie erwartet keine histopathologischen Veränderungen. Über die gesamte Behandlungsdauer von 14 Tagen war in den Hochdosistieren das Körpergewicht (94 %) im Vergleich zur Kontrolle leicht, aber statistisch signifikant reduziert. Nach Angaben des Herstellers Boehringer Ingelheim ist dieses aber auf die uns nicht bekannten pharmakologischen Eigenschaften der Substanz zurückzuführen. Die Daten der klinischen Chemie deuteten nicht auf Nierentoxizität hin. Dagegen stieg die Zahl der neutrophilen Granulozyten nach 14-tägiger BI-2 Gabe signifikant von $0,57 \pm 0,13$

$\times 10^9$ in den Kontrolltieren auf $1,98 \pm 0,29 \times 10^9$ in den Hochdosistieren an, was auf eine Entzündung hinweist (Tab. 6.2)

Tabelle 6.2 Klinisch-chemische Parameter nach Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit 0, 2,5 und 15 mg/kg BI-2. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

	Tag	BI-2		
		0 mg/kg KG	2,5 mg/kg KG	15 mg/kg KG
Urin				
Kreatinin [mg/16h]	1	4,3	3,9	4,4 \pm 0,8
	3	5,1 \pm 0,5	4,0 \pm 0,0 *	3,7 \pm 0,1 *
	12	5,6 \pm 0,6	4,8 \pm 0,7	4,5 \pm 0,3
Serum				
Kreatinin [mg/dl]	1	0,43 \pm 0,13	0,42 \pm 0,05	0,37 \pm 0,06
	3	0,41 \pm 0,04	0,44 \pm 0,05	0,43 \pm 0,07
	14	0,46 \pm 0,07	0,41 \pm 0,05	0,45 \pm 0,04
Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) [mg/dl]	1	25 \pm 3	27 \pm 2	25 \pm 2
	3	25 \pm 4	28 \pm 3	31 \pm 7
	14	26 \pm 2	26 \pm 1	29 \pm 4
γ-Glutamyltransferase (GGT) [U/l]	1	0,40 \pm 0,14	1,95 \pm 2,19	0,90
	3	1,00 \pm 0,85	0,88 \pm 0,29	0,35 \pm 0,21
	14	1,15 \pm 0,21	0,20 \pm -	0,62 \pm 0,30
Gesamt-Protein [g/l]	1	55 \pm 2	54 \pm 4	54 \pm 2
	3	55 \pm 1	55 \pm 1	53 \pm 2
	14	56 \pm 3	55 \pm 2	52 \pm 2 *
Aspartat-Aminotransferase (AST) [U/l]	1	53 \pm 12	61 \pm 32	60 \pm 12
	3	66 \pm 14	75 \pm 40	62 \pm 8
	14	62 \pm 20	65 \pm 9	62 \pm 6
Alkalische Phosphatase (ALP) [U/l]	1	99 \pm 21	98 \pm 10	104 \pm 25
	3	120 \pm 30	87 \pm 8 *	89 \pm 10 *
	14	86 \pm 17	87 \pm 25	57 \pm 5
Alanin-Aminotransferase (ALT) [U/l]	1	26 \pm 4	28 \pm 8	27 \pm 6
	3	29 \pm 6	45 \pm 41	26 \pm 7
	14	34 \pm 15	30 \pm 6	27 \pm 2
Bilirubin [mg/dl]	1	0,10 \pm 0,02	0,09 \pm 0,05	0,09 \pm 0,02
	3	0,11 \pm 0,04	0,11 \pm 0,03	0,11 \pm 0,01
	14	0,07 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02	0,06 \pm 0,02
Glucose [mg/dl]	1	175 \pm 14	188 \pm 9	180 \pm 29
	3	154 \pm 9	176 \pm 17 *	169 \pm 13
	14	171 \pm 35	191 \pm 21	192 \pm 14
Blut				
Neutrophile [$10^9/l$]	1	0,53 \pm 0,29	0,71 \pm 0,41	0,57 \pm 0,13
	3	0,51 \pm 0,23	0,55 \pm 0,15	0,61 \pm 0,16
	14	0,59 \pm 0,17	0,66 \pm 0,29	1,98 \pm 0,29 ***

6.3.1.2 Genexpressionsanalyse potentiellen Biomarker im Nierengewebe

Die quantitative Real-Time-PCR zeigte keine Veränderungen in der Expression der Gene, welche mit einem proximalen Tubulusschaden in Verbindung gebracht werden. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit dem histopathologischen Befund, welcher keine Schädigung der proximalen Nierentubuli aufwies. In der Abbildung 6.2 ist zu sehen, dass

die Behandlung mit BI-2 während der gesamten Studiendauer zu keiner Veränderung der mRNA Expression von Kim-1, Lipocalin-2, Timp-1, Osteopontin, HO-1 und Vimentin in den Nieren der männlichen Wistar-Ratten führte.

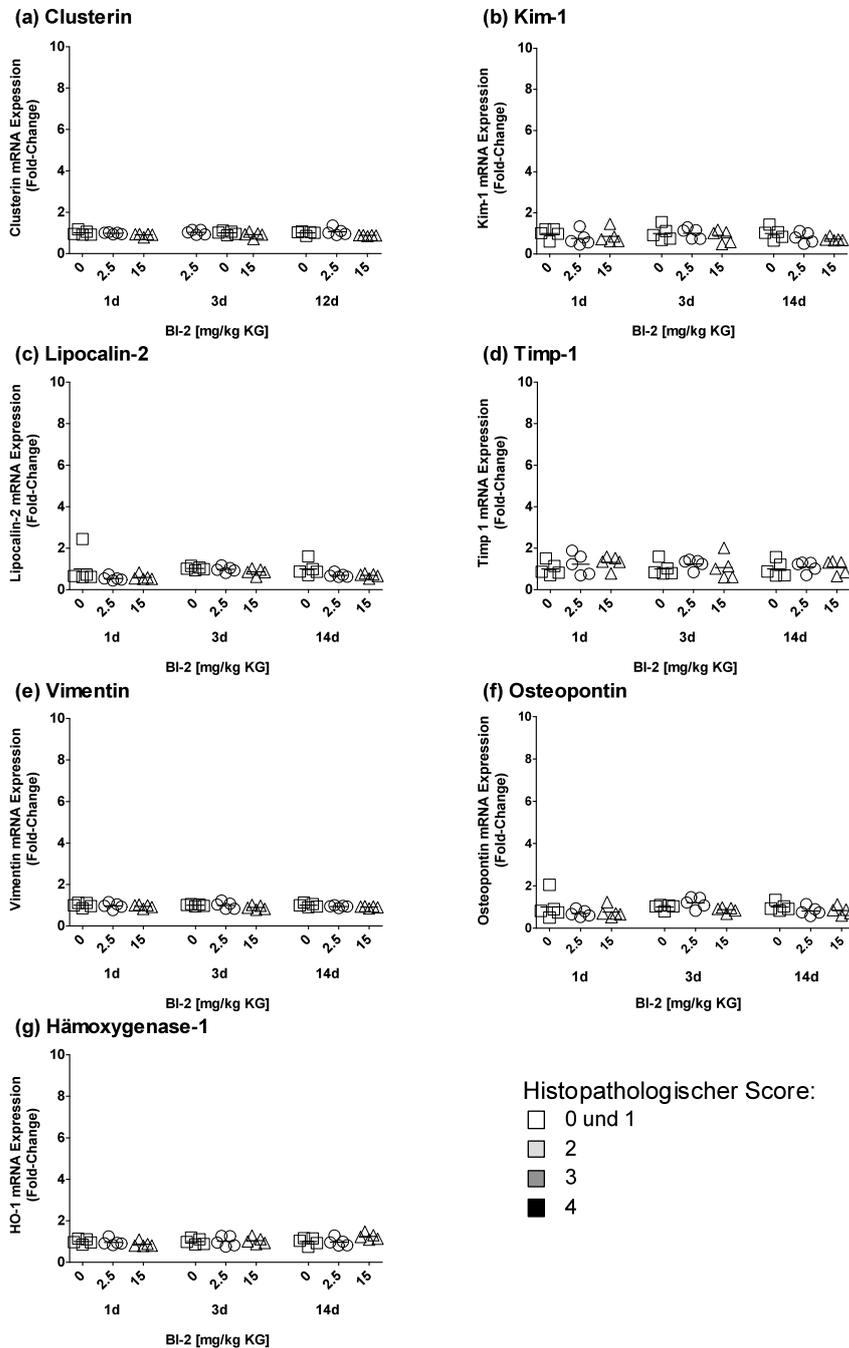


Abb. 6.2 mRNA-Expression von (a) Clusterin, (b) Kim-1, (c) Lcn2, (d) Timp-1, (e) Vimentin, (f) Osteopontin und (g) HO-1 in der Niere männlicher Ratten, welche mit 0, 2,5 oder 15 mg/kg KG BI-2 behandelt wurden. Die Daten sind als Einzelwerte relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe angegeben. Die Farbe der einzelnen Tiere richtet sich nach dem Grad der Schädigung des proximalen Tubulus. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sind als Balken gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.3.1.3 Immunlokalisation neuer Markerproteine auf TMAs

Für den immunhistochemischen Nachweis der Markerproteine wurden TMAs mit dem jeweils spezifischen Antikörper angefärbt. Die Abb. 6.3a, b, d und e zeigt die Detektion der Proteine Kim-1, Clusterin, Vimentin und Timp-1. Es konnte kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den beiden behandelten Gruppen hinsichtlich ihrer Expression festgestellt werden. Sowohl die Expression als auch die Lokalisation der Proteine waren in der Niere der mit BI-2 behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 14 Tagen unverändert. Dies korreliert mit den Ergebnissen der Genexpression, welche ebenso keine veränderte Expression nach 14 Tagen aufwies. Überraschenderweise zeigte sich im Gegensatz zur Genexpression jedoch ein deutlicher Anstieg der Immunreaktivität gegenüber Lcn-2 in der Nierenrinde der Hochdosistiere nach 14 Tagen (Abb. 6.3c).

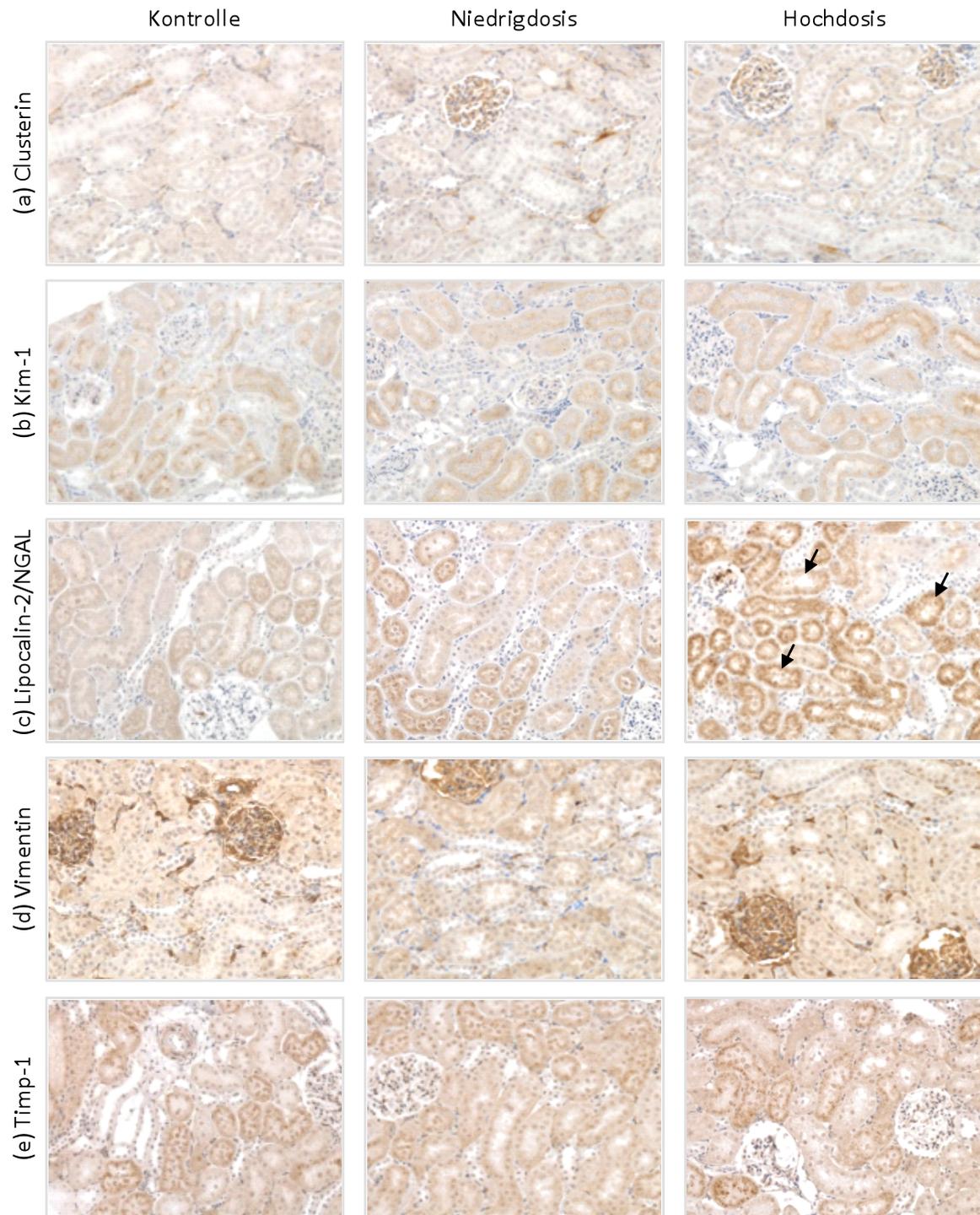


Abb. 6.3 Expression von (a) Clusterin, (b) Kim-1, (c) Lcn2, (d) Vimentin und (e) Timp-1 in der äußeren Nierenrinde nach Verabreichung von 0, 2,5 oder 15 mg/kg KG BI-2 für 14 Tage. Die Gabe von BI-2 führte zu einer verstärkten Lcn2-Expression im Nierencortex.

6.3.1.4 Detektion potentiellen Urinbiomarkern mit Singleplex-ELISA

In Abbildung 6.4 sind die Exkretion von Kim-1, Clusterin, Lipocalin-2 und Timp-1 im Urin sowie die traditionellen Nierentoxizitätsmarker BUN und Kreatinin dargestellt. Übereinstimmend mit den immunhistochemischen Ergebnissen wurde im Urin der Hochdosistiere nach 12 Tagen eine gesteigerte Konzentration von Lipocalin-2 beobachtet. Die erhöhte Abgabe von Lipocalin-2 in den Urin konnte weder zu einem früheren Zeitpunkt noch in der Niedrigdosisgruppe beobachtet werden. Die quantitativen Messungen von Clusterin, Kim-1 und Timp-1 zeigten dagegen keinen Anstieg der jeweiligen Proteine im Urin nach 12-tägiger BI-2 Gabe und stehen somit im Einklang mit den Ergebnissen der Gen- und Proteinexpression.

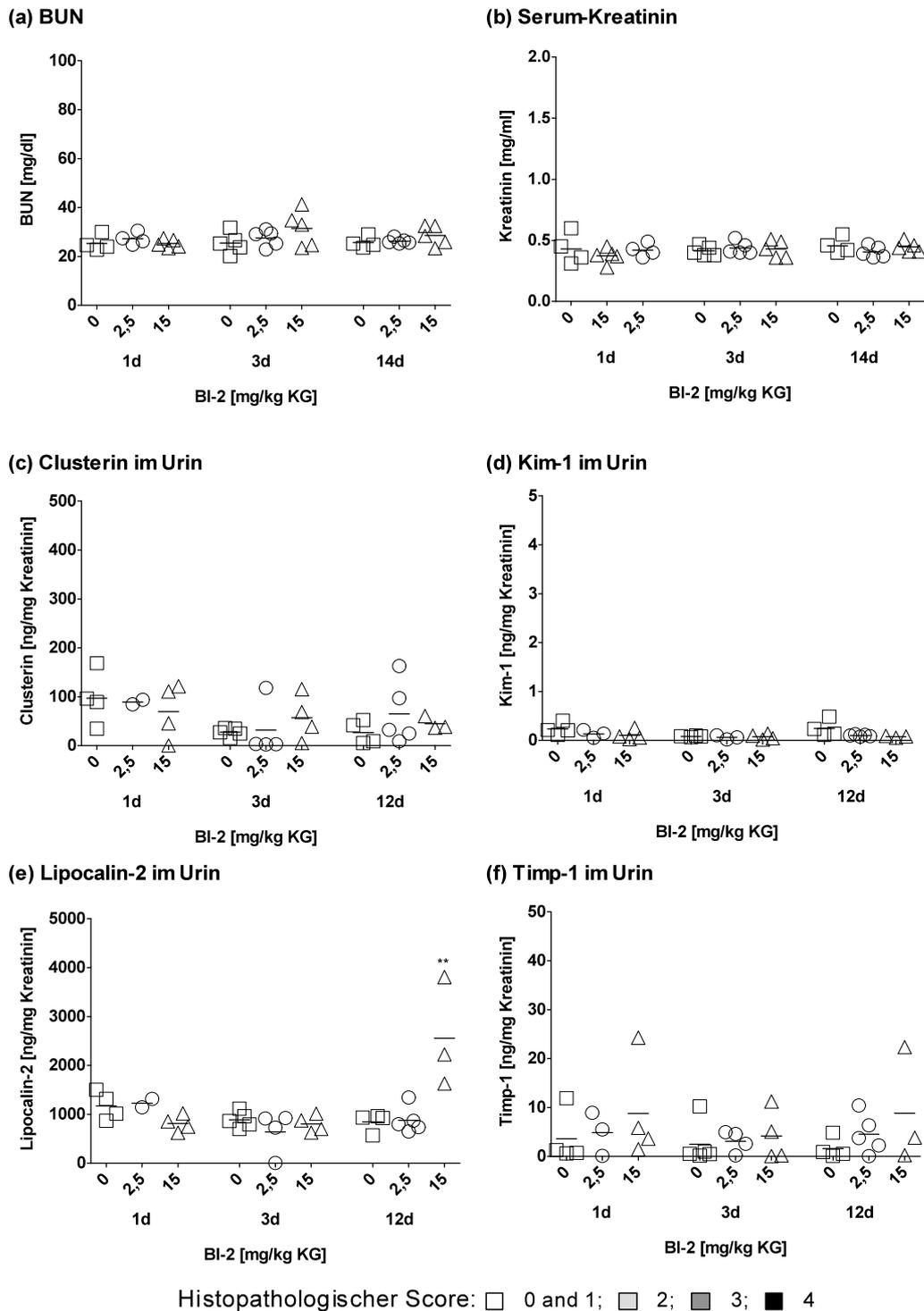


Abb. 6.4 Serumkonzentrationen von BUN und Kreatinin, sowie Ausscheidungen von Clusterin, Kim-1, Lcn-2 und Timp-1 mit dem Urin männlicher Ratten nach Gabe von 0, 2,5 oder 25 mg für 1, 3 oder 12/14 Tagen. Die Farbe der einzelnen Tiere richtet sich nach dem Grad der Schädigung des proximalen Tubulus. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sind als Balken gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit BI-2

Die Gabe von BI-2 führte nur zu minimalen histopathologischen Effekten in der Nierenpapilla, proximale Tubulusschäden wurden dagegen nicht beobachtet. In der Niere kam es auf Transkriptionsebene nicht zu einer Veränderung der potentiellen Nierentoxizitätsmarker, welches mit dem Fehlen von tubulären Nierenschäden übereinstimmt. Mit Ausnahme von Lipocalin-2 konnte auch keine Veränderung der Proteinmenge im Nierengewebe beobachtet werden. Nach 14-tägiger Hochdosisbehandlung mit BI-2 zeigte sich neben der erhöhten Proteinexpression von Lipocalin-2 auch eine gesteigerte Ausscheidung des Proteins in den Urin.

6.3.2 BI-3

Als weiteres Nierentoxin wurde die Substanz BI-3 ausgewählt und männlichen Wistar-Ratten oral in Dosen von 100 mg/kg oder 1000 mg/kg für eine Behandlungsdauer von 1, 3 und 14 Tagen verabreicht (Strukturformel vom Hersteller nicht bekannt gegeben). Die Kontrollgruppe erhielt als Vehikel 5 %iges Natrosol. Basierend aus den Kenntnissen einer früheren *In-house*-Studie ist neben der Niere auch die Leber Zielorgan der Toxizität von BI-3. Weiterhin konnten durch 2D-DIGE unter anderem Glycin-Amidino-transferase (AGAT), Catalase und Glutathionperoxidase-1 als deregulierte Proteine nach Gabe von BI-3 identifiziert werden (Gautier, J.C. unveröffentlichte Ergebnisse).

6.3.2.1 Klinische Chemie und Histopathologie

Die Behandlung der Ratten mit BI-3 führte zu histopathologischen Veränderungen in den beiden Zielorganen Niere und Leber. Über den gesamten Behandlungszeitraum kam es zu Entzündungen und Hyperplasie der Gallengänge und ferner nach Behandlung für 14 Tage zu Cholestase. Das absolute und relative Lebergewicht war nach 1-, 3- und 14-tägiger BI-3-Gabe im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die histopathologischen Effekte in den Nieren traten im Bereich der proximalen Tubuli in Form von Tubuluszellnekrose und Basophilie in 3 Hochdosistieren nach 14-tägiger Behandlung auf. Die wichtigsten Parameter der klinischen Chemie sind in der Tabelle 6.3 angegeben. Die Auswertung dieser Daten verzeichnete in der Hochdosisgruppe einen geringen Anstieg des Kreatinin- und Harnstoffgehaltes im Serum, der aber aufgrund der großen biologischen Varianz der Tiere innerhalb der Hochdosisgruppe nicht signifikant war. Desweiteren waren die Aktivitäten

der Leberenzyme ALP, AST, ALT und GGT signifikant erhöht sowie der Proteingehalt im Serum erniedrigt, welches als Folge des Leberschadens zu werten ist. Ebenso wie in den Tieren, welche mit der Substanz BI-2 behandelt wurden, stieg auch die Zahl der neutrophilen Granulozyten von $1,3 \pm 0,20 \times 10^9$ in der Kontrollgruppe auf $4,11 \pm 4,23 \times 10^9$ in den Hochdosistieren nach 14-tägiger BI-3 Gabe an.

Tabelle 6.3 Klinisch-chemische Parameter nach Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit 0, 100 und 1000 mg/kg BI-3. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

	Tag	BI-3		
		0 mg/kg KG	100 mg/kg KG	1000 mg/kg KG
Urin				
Kreatinin [mg/15h]	1	7,9 \pm 1,3	8,5 \pm 0,8	6,8 \pm 1,6
	3	8,1 \pm 1,5	8,9 \pm 1,3	6,3 \pm 1,1
	12	7,7 \pm 1,2	7,7 \pm 2,0	5,5 \pm 1,8
Protein [mg/mg Kreatinin]	1	0,5 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,6
	3	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2	1,1 \pm 0,9
	12	0,7 \pm 0,6	1,1 \pm 0,9	0,6 \pm 0,4
Serum				
Kreatinin [mg/dl]	1	0,51 \pm 0,03	0,46 \pm 0,03	0,47 \pm 0,03
	3	0,52 \pm 0,04	0,45 \pm 0,04 *	0,48 \pm 0,04
	14	0,52 \pm 0,07	0,53 \pm 0,05	0,65 \pm 0,32
Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) [mg/dl]	1	49 \pm 6	53 \pm 17	46 \pm 9
	3	50 \pm 7	48 \pm 7	67 \pm 19
	14	45 \pm 6	60 \pm 6	110 \pm 72
γ-Glutamyltransferase (GGT) [U/l]	1	0,00 \pm 0,00	0,01 \pm 0,03	1,75 \pm 1,38 **
	3	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,60 \pm 2,44
	14	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,65 \pm 1,31 **
Gesamt-Protein [g/l]	1	59 \pm 1	58 \pm 2	61 \pm 2
	3	59 \pm 1	58 \pm 3	56 \pm 3
	14	58 \pm 2	55 \pm 2	45 \pm 6 ***
Aspartat-Aminotransferase (AST) [U/l]	1	193 \pm 37	167 \pm 38	298 \pm 195
	3	190 \pm 25	172 \pm 22	215 \pm 43
	14	157 \pm 19	151 \pm 27	144 \pm 40
Alkalische Phosphatase (ALP) [U/l]	1	182 \pm 25	149 \pm 32	513 \pm 289 *
	3	197 \pm 47	177 \pm 36	425 \pm 77 ***
	14	114 \pm 11	116 \pm 13	262 \pm 90 **
Alanin-Aminotransferase (ALT) [U/l]	1	31 \pm 5	28 \pm 14	169 \pm 185
	3	24 \pm 4	22 \pm 2	43 \pm 14 **
	14	24 \pm 4	28 \pm 10	24 \pm 4
Glucose [mg/dl]	1	147 \pm 11	132 \pm 23	152 \pm 20
	3	144 \pm 20	143 \pm 8	122 \pm 6 *
	14	148 \pm 14	163 \pm 4	128 \pm 47
Blut				
Neutrophile [10^9 /l]	1	1,04 \pm 0,40	0,91 \pm 0,10	1,56 \pm 0,25 *
	3	1,30 \pm 0,15	1,21 \pm 0,50	1,47 \pm 0,54
	14	1,30 \pm 0,20	1,54 \pm 0,94	4,11 \pm 4,23

6.3.2.2 Genexpressionsanalyse potentiellen Biomarker im Nierengewebe

Die Behandlung von Ratten mit der Substanz BI-3 führte zu einer deutlichen Induktion der mRNA-Expression der gemessenen Marker in der Niere. Wie aus Abbildung 6.5 ersichtlich ist, beschränkte sich dabei die Induktion der Gene auf die 3 Hochdosistiere (41, 43, 45) nach 14-tägiger Behandlung, welche auch histopathologische Veränderungen in den Nierentubuli zeigten. Kim-1 zeigte die stärkste Induktion mit einem > 300-fachen Anstieg im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6.5b). Auch die mRNA-Expression von Clusterin, Lipocalin-2 und Osteopontin war im Vergleich zu den Kontrolltieren stark erhöht. Weiterhin zeigten die 3 Hochdosistiere eine gesteigerte Expression von Timp-1, HO-1 und Vimentin. Wegen der beachtlichen biologischen Varianz innerhalb der Gruppe der Hochdosis waren Veränderungen nur bei Timp-1 und Osteopontin statistisch signifikant. Ebenfalls zeigte das Hochdosistier Nr. 29, welches für 3 Tage mit BI-3 behandelt wurde, im Vergleich zu Kontrolltieren eine gesteigerte mRNA-Expression aller gemessenen Gene in der Niere, obwohl es keine renalen histopathologischen Veränderungen aufwies.

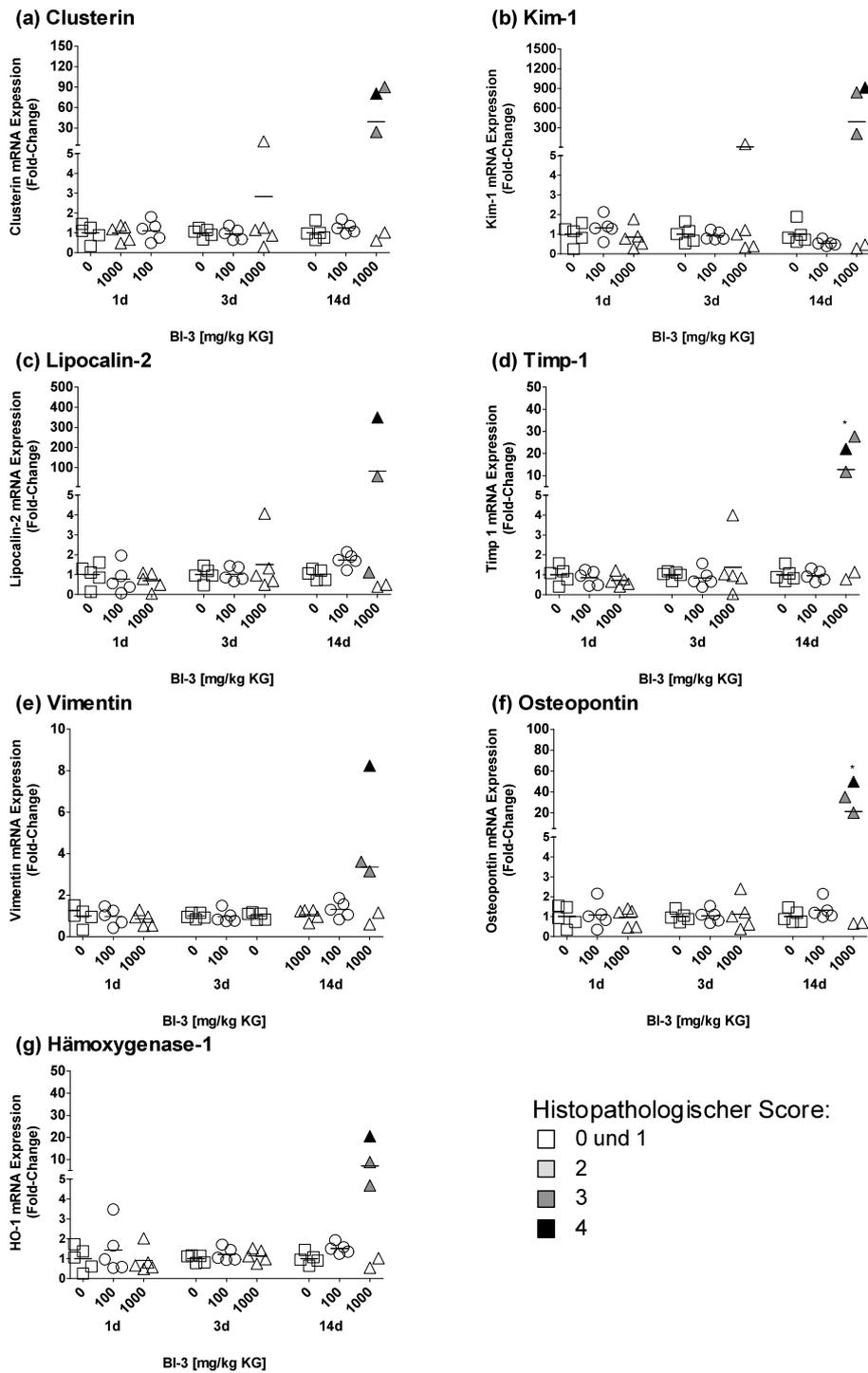


Abb. 6.5 mRNA-Expression von (a) Clusterin, (b) Kim-1, (c) Lcn2, (d) Timp-1, (e) Vimentin, (f) Osteopontin und (g) HO-1 in der Niere männlicher Ratten, denen wiederholt 0, 100 oder 1000 mg/kg KG BI-3 verabreicht wurde. Die Daten sind als Einzelwerte relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe angegeben. Die Farbe der einzelnen Tiere richtet sich nach dem Grad der Schädigung des proximalen Tubulus. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sind als Balken gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.3.2.3 Immunlokalisation neuer Markerproteinen auf TMAs

Übereinstimmend mit den Daten der Genexpression war die Proteinexpression von Kim-1 in der Niere der Tiere 41, 43 und 45 nach 14-tägiger BI-3 Behandlung stark erhöht, wobei Kim-1 dabei an der apikalen Seite der proximalen Tubulusepithelzellen detektiert wurde (Abb. 6.6b). Auch das Tier Nr. 29 zeigte Kim-1-positive Nierentubuli in dieser Region. Weder in den Tieren Nr. 42 und 44 noch in denen mit 100 mg/kg KG behandelten Tieren war ein Expressionsunterschied im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. Ebenso war die Proteinexpression von Clusterin in den stark erweiterten Nierentubuli der 3 Hochdosistiere, welche nach 14-tägiger BI-3-Behandlung renale histopathologische Veränderungen aufwiesen, im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Abb. 6.6.a). Auch Lipocalin-2 wurde in der cortikalen Nierenregion in je 2 mit 1000 mg/kg KG BI-3 behandelten Tieren nach 3 Tagen (Nr. 29 und 30) und nach 14 Tagen (Nr. 41 und 43) verstärkt exprimiert (Abb. 6.6c). Tier Nr. 45 hingegen zeigte keine positive Lipocalin-2-Färbung, übereinstimmend mit den Daten der Lcn2-Genexpression dieses Tieres. Desweiteren konnte auch eine verstärkte Immunreaktivität gegenüber Vimentin in den 3 Hochdosistieren nach 14-tägiger Behandlung beobachtet werden (Abb. 6.6d). Hingegen führte die 14-tägige Gabe von BI-3 zu einem Verlust von Timp-1 positiven Zellen (Abb. 6.6e).

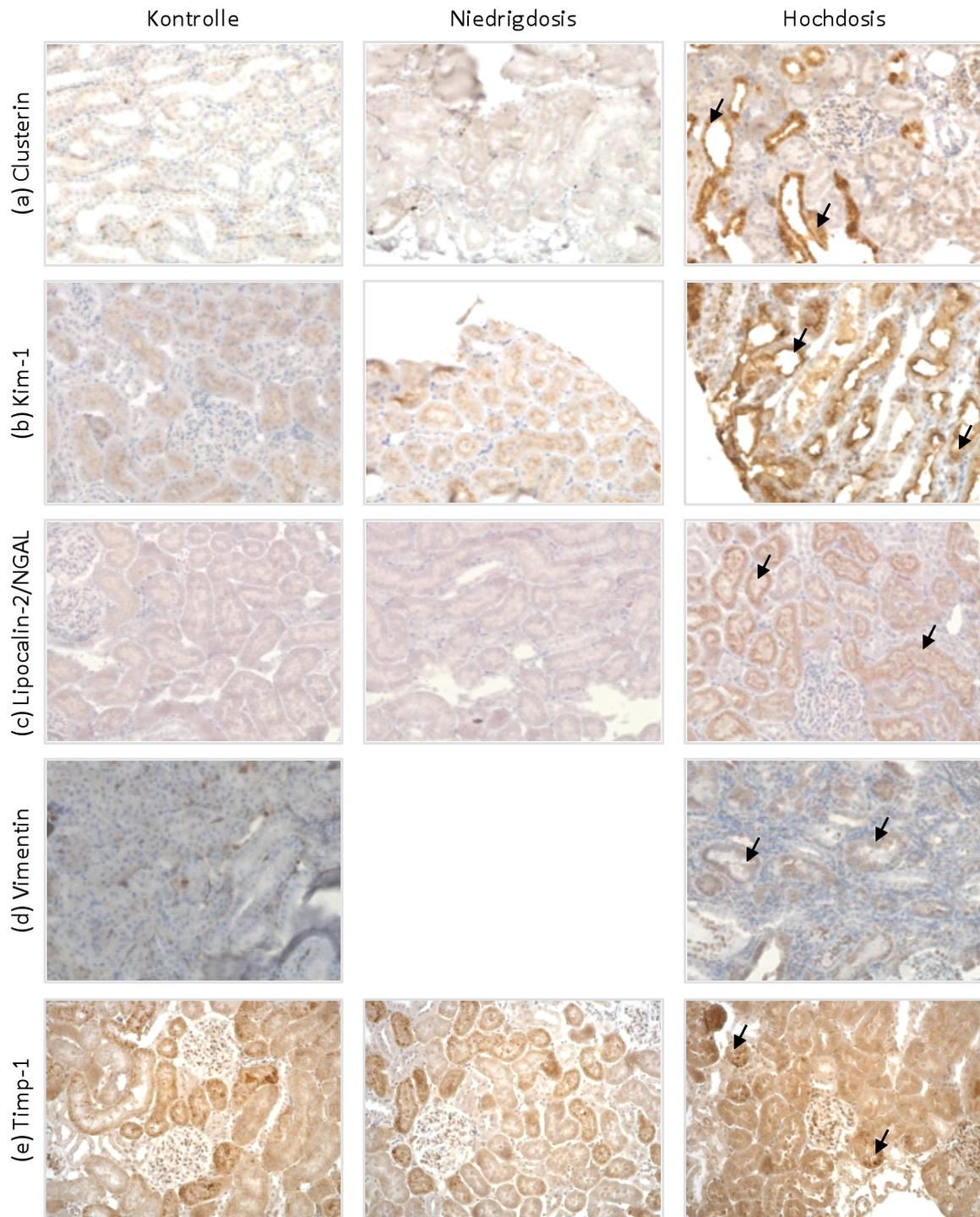


Abb. 6.6 Expression von Clusterin, Kim-1, Lcn2, Vimentin und Timp-1 in der äußeren Nierenrinde männlicher Ratten, welchen wiederholt für 14 Tage 0, 100 oder 1000 mg/kg KG BI-3 verabreicht wurde. Während BI-3 zu einer gesteigerten Expression von Clusterin, Kim-1, Lcn2 und Vimentin führte, führte die Behandlung zu einem Verlust Timp-1 positiver proximaler Tubuluszellen.

6.3.2.4 Detektion potentieller Urinbiomarker mit Singleplex-ELISA

Wie aus Abbildung 6.7 ersichtlich ist, führte die wiederholte Gabe von 1000 mg/kg KG zu einem Anstieg der Konzentration der untersuchten Biomarker im Urin. Sowohl Kim-1 als auch Clusterin wurden bereits nach 3 Tagen sowie nach 12 Tagen vermehrt im Urin detektiert. Die Veränderung der Konzentration von Kim-1 und Clusterin scheint somit sensitiver zu sein, als die Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression, welche erst nach 12-tägiger Behandlung auftraten. Jedoch ist zu erwähnen, dass die Urindaten zu den früheren Zeitpunkten (Tag 1 und 3) nicht direkt mit denen der Histopathologie, Gen- und Proteinexpression zu vergleichen sind, da diese von unterschiedlichen Tieren stammen. Eine erhöhte Exkretion von Lipocalin-2 und Timp-1 wurde ebenfalls detektiert, allerdings erst nach 12-tägiger Behandlung mit BI-3, wobei auch diese Ergebnisse aufgrund der biologischen Varianz nicht signifikant waren. In Tieren, die mit der niedrigen Dosis von 100 mg/kg KG BI-3 behandelt wurden, konnten keine Unterschiede zu den Kontrolltieren verzeichnet werden.

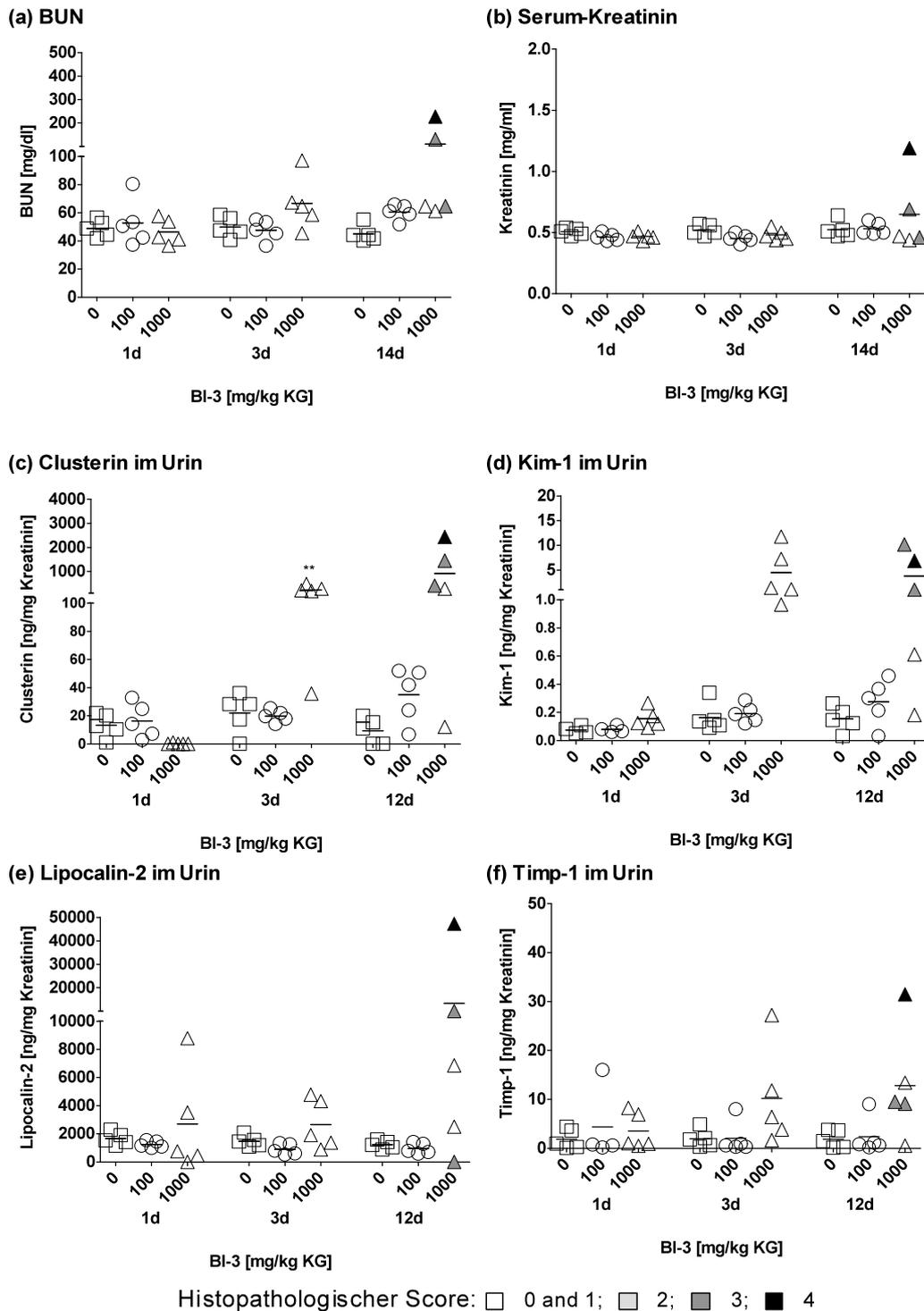


Abb. 6.7 Effekte von BI-3 auf die Konzentrationen von BUN und Serumkreatinin sowie Clusterin, Kim-1, Lcn2 und Timp-1 im Urin von Ratten, welche für 1,3 oder 12/14 Tagen mit 0, 100, 1000 mg/kg KG BI-3 behandelt wurden. Die Farbe der einzelnen Tiere richtet sich nach dem Grad der Schädigung des proximalen Tubulus. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sind als Balken gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.3.2.5 Western Blot-Analyse neuer Biomarker im Nierengewebe

Übereinstimmend mit den Ergebnisse der 2D-DIGE-Analyse (Gautier, J.C., unveröffentlichte Daten) konnte in den Nieren der Ratten, welche nach 14-tägiger Behandlung mit 1000 mg/kg KG BI-3 schwere histopathologische Schädigungen des proximalen Tubulusepithels aufwiesen (Nummer 41, und 45), eine deutlich verminderte Expression der antioxidativen Enzyme AGAT, Catalase und Glutathionperoxidase-1 (Gpx-1) (Abb. 6.8) mittels Western-Blot detektiert werden. Tier Nummer 43, dessen proximaler Tubulus ebenfalls geschädigt war, zeigte allerdings keine Veränderung dieser Enzyme im Vergleich zur Kontrolle.

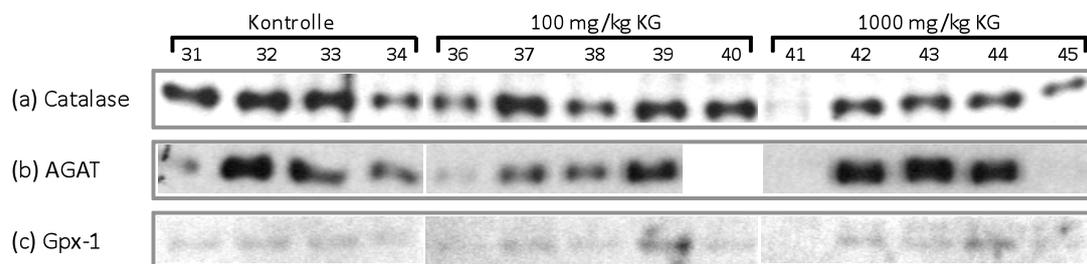


Abb. 6.8 Western-Blot-Analyse von (a) Catalase, (b) AGAT und (c) Gpx-1 in Nieren von männlichen Ratten, denen für 14 Tage 0, 100 oder 1000 mg/kg KG BI-3 verabreicht wurde. In den Nieren der Tiere 41 und 45 kam es infolge der Behandlung zu einer verminderten Expression der Proteine.

6.3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit BI-3

Die Ergebnisse der Gen- und Proteinexpression der Markergene korrelieren gut mit den renalen histopathologischen Veränderungen. Im Gegensatz dazu wurde schon nach 3-tägiger Gabe von 1000 mg/kg KG BI-3 eine erhöhte Ausscheidung von Clusterin und Kim-1 im Urin detektiert. Folglich scheinen der Anstieg von Kim-1 und Clusterin im Urin somit sensitiver zu sein, als die Veränderung in der Gen- und Proteinexpression, welche erst nach 14-tägiger Behandlung auftrat. Jedoch ist zu sagen, dass die Daten zu den frühen Zeitpunkten (Tag 1 und 3) der Urinanalyse nicht direkt mit denen der Histopathologie, Gen- und Proteinexpression zu vergleichen sind, da diese von unterschiedlichen Tieren stammen.

6.3.3 Gentamicin

Als nierentoxische Referenzsubstanz wurde auch im Rahmen des InnoMed-PredTox-Projektes das Aminoglykosidantibiotikum Gentamicin (Vgl. Kapitel 6) verwendet. Den

Tieren wurde als niedrige Dosis 25 mg/kg KG und als Hochdosis 75 mg/kg KG Gentamicin subkutan für 1, 3 oder 14 Tage injiziert. Die Behandlung führte nach 14 Tagen in den Nieren der Hochdosistiere zu einer veränderten Proteinexpression von Plasma-Retinolbindendem Protein 4 (PRBP 4), Glycinamidinotransferase (AGAT), Catalase, Glutathionperoxidase-1 (Gpx-1), Peroxiredoxin-1, Moezin und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1 (PEPCK-1) (Gautier, J.C, unveröffentlichte Daten).

6.3.3.1 *Klinische Chemie und Histopathologie*

Die kontinuierliche Gabe von Gentamicin führte zu minimaler bis leichter tubulärer Degeneration/Nekrose begleitet von leichter bis moderater tubulärer Regeneration in der Niere aller Hochdosistiere nach 14 Tagen. Zusätzlich traten mononukleäre Zellinfiltrate in den Nieren dieser Tiere auf. Dieser Befund wurde auch in abgeschwächter Form in 2 Tieren (36 und 37) beobachtet, welche für 14 Tage mit der niedrigen Dosis Gentamicin behandelt wurden. Eine verminderte Gewichtszunahme wurde in der 75 mg/kg KG Gruppe nach 14 Tagen Behandlung beobachtet. In Tabelle 6.4 sind die wichtigsten klinisch-chemischen Parameter zusammengefasst. Aus der 14-tägigen Behandlung mit Gentamicin folgte in der Hochdosisgruppe (75 mg/kg KG) eine minimale Erhöhung des Kreatinins und Harnstoffs im Serum. Auch der Proteingehalt im Urin war in dieser Gruppe leicht erhöht. Weitere biologisch relevante Veränderungen in Parametern der klinischen Chemie traten unter Gentamicingabe nicht auf.

Tabelle 6.4 Klinisch-chemische Parameter nach Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit 0, 25 und 75 mg/kg KG Gentamicin. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

	Tag	Gentamicin		
		0 mg/kg KG	25 mg/kg KG	75 mg/kg KG
Urin				
Kreatinin [mg/15h]	1	2,4 \pm 0,2	2,6 \pm 0,3	2,3 \pm 0,1
	3	2,7 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3	2,6 \pm 0,3
	12	3,9 \pm 0,7	3,8 \pm 0,6	3,8 \pm 0,3
Protein [mg/mg Kreatinin]	1	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3
	3	1,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3
	12	1,4 \pm 0,3	2,3 \pm 0,7	2,7 \pm 0,6 *
Serum				
Kreatinin [mg/dl]	1	0,17 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02	0,16 \pm 0,02
	3	0,19 \pm 0,01	0,19 \pm 0,04	0,21 \pm 0,02
	14	0,21 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03	0,26 \pm 0,02 *
Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) [mg/dl]	1	41 \pm 4	39 \pm 5	43 \pm 6
	3	47 \pm 7	46 \pm 7	48 \pm 7
	14	38 \pm 6	41 \pm 5	48 \pm 4 *
γ-Glutamyltransferase (GGT) [U/l]	1		< Detektionslimit	
	3		< Detektionslimit	
	14		< Detektionslimit	
Gesamt-Protein [g/l]	1	54 \pm 2	54 \pm 2	54 \pm 1
	3	56 \pm 2	56 \pm 1	57 \pm 0
	14	54 \pm 1	55 \pm 2	55 \pm 3
Aspartat-Aminotransferase (AST) [U/l]	1	94 \pm 18	93 \pm 7	102 \pm 12
	3	94 \pm 10	91 \pm 11	87 \pm 15
	14	89 \pm 16	88 \pm 19	97 \pm 17
Alkalische Phosphatase (ALP) [U/l]	1	577 \pm 129	536 \pm 105	592 \pm 156
	3	712 \pm 179	666 \pm 241	561 \pm 169
	14	510 \pm 120	455 \pm 94	398 \pm 131
Alanin-Aminotransferase (ALT) [U/l]	1	25 \pm 4	24 \pm 5	23 \pm 1
	3	24 \pm 4	21 \pm 2	22 \pm 4
	14	26 \pm 5	24 \pm 2	31 \pm 10
Bilirubin [mg/dl]	1	0,08 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01
	3	0,08 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01
	14	0,06 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01 *
Glucose [mg/dl]	1	123 \pm 9	119 \pm 14	122 \pm 13
	3	138 \pm 22	126 \pm 16	132 \pm 12
	14	123 \pm 25	117 \pm 12	130 \pm 11
Blut				
Neutrophile [10 ⁹ /l]	1	0,20 \pm 0,05	0,25 \pm 0,06	0,18 \pm 0,06
	3	0,26 \pm 0,08	0,20 \pm 0,08	0,24 \pm 0,03
	14	0,46 \pm 0,40	0,30 \pm 0,11	0,32 \pm 0,08

6.3.3.2 Genexpressionsanalyse potentieller Biomarker im Nierengewebe

Die Behandlung mit Gentamicin induzierte eine gesteigerte mRNA-Expression von Hämoxygenase-1, Lipocalin-2 und Osteopontin in den Nieren der Hochdosisgruppe nach 14 Tagen, sowie einem Anstieg von Kim-1, dessen Expression schon in der 25 mg/kg KG Gruppe erhöht war (Abb. 6.9). Verglichen mit den Veränderungen der Genexpression nach Behandlung mit BI-3 waren die Effekte jedoch weniger stark ausgeprägt. In der Expression von Timp-1, Vimentin und Clusterin war im Vergleich zur Kontrolle kein Unterschied zu verzeichnen. Ferner war ein geringer Anstieg der Expression von Kim-1, Osteopontin, Lipocalin-2, Clusterin und Timp-1 im Niedrigdosistier Nr. 36 zu sehen, korrelierend mit der minimalen histopathologischen Veränderung in der Niere dieses Tieres.

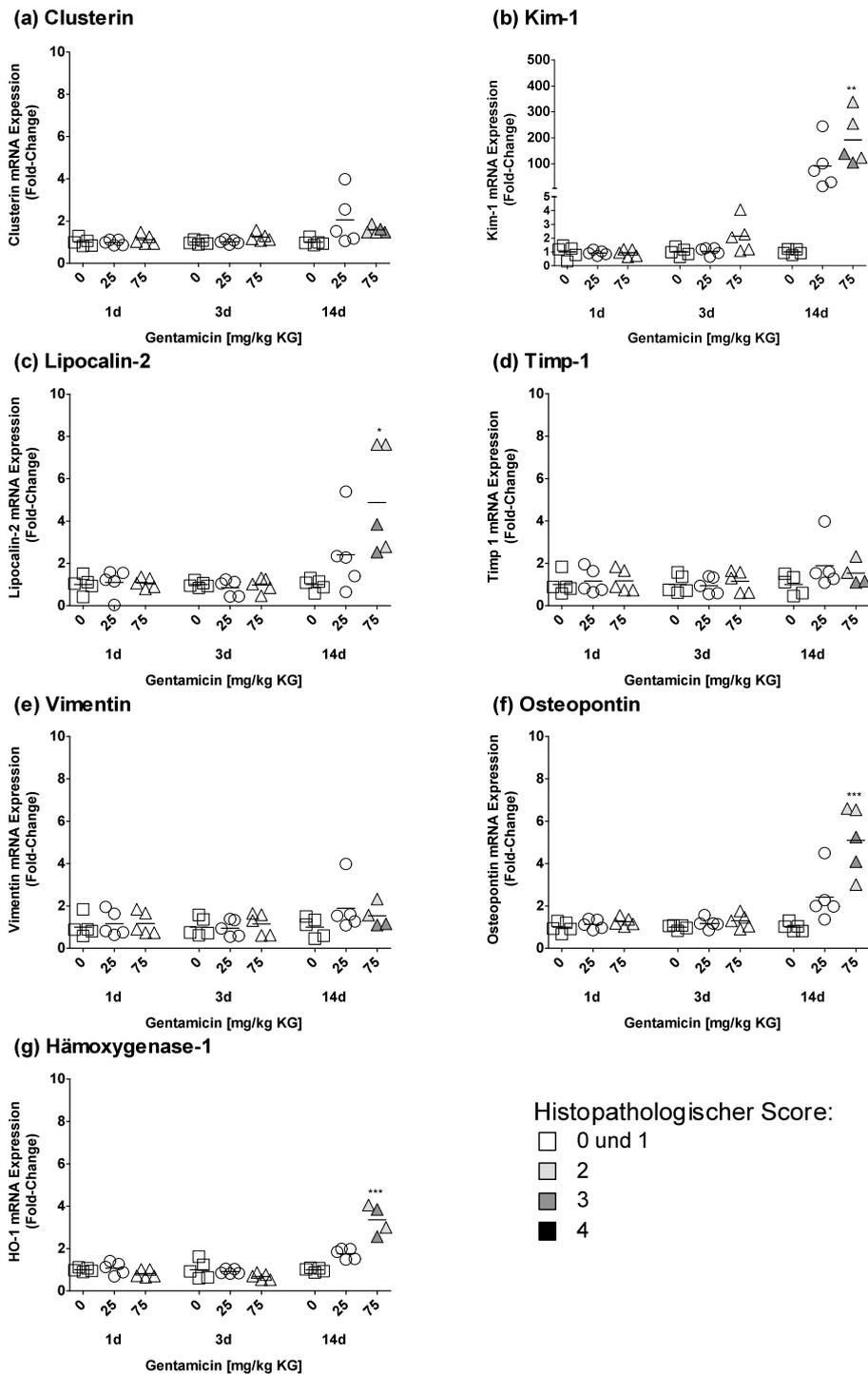


Abb. 6.9 Effekte von Gentamicin auf die Genexpression von (a) Clusterin, (b) Kim-1, (c) Lcn2, (d) Timp-1, (e) Vimentin, (f) OPN und (g) HO-1 in Nieren von Ratten nach Gabe von 0, 25 oder 75 mg/kg KG Gentamicin für 1, 3 oder 14 Tage. Die Daten sind als Einzelwerte relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe angegeben. Die Farbe der einzelnen Tiere richtet sich nach dem Grad der Schädigung des proximalen Tubulus. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sind als Balken gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.3.3.3 Immunlokalisation neuer Markerproteine auf TMAs

Wie in Abbildung 6.10b und 6.10d ersichtlich ist, führte die Behandlung mit 75 mg/kg KG Gentamicin nach 14 Tagen zu einer gesteigerten Expression von Kim-1 und Vimentin in proximalen Tubuluszellen der äußereren Nierencortex. Zusätzlich trat eine Induktion von Kim-1 schon nach Behandlung mit der niedrigen Dosis Gentamicin auf. Weiterhin führte die Gabe von Gentamicin über 14 Tage in einigen proximalen Tubuli der äußeren Nierenrinde zu einer leichten Expressionserhöhung von Lipocalin-2 (Abb. 6.10c). Eine starke Expression von Timp-1 wurde sowohl in den Nieren der Kontrolltiere, als auch in denen der behandelten Tiere detektiert (Abb. 6.10e). Dabei war es in den Nieren der Kontrolltieren gleichmäßig in kleinen Vesikeln verteilt. Hingegen war es in den Hochdosistieren in größeren Vesikeln in den durch Gentamicingabe betroffenen Tubuli lokalisiert. Jedoch konnte kein Unterschied im Proteinlevel von Timp-1 zwischen den Gruppen verzeichnet werden. Im Einklang mit der Genexpression konnte auch auf Proteinebene keine gesteigerte Expression von Clusterin in den Nieren nach 14-tägiger Gabe von Gentamicin detektiert werden (Abb. 6.10a).

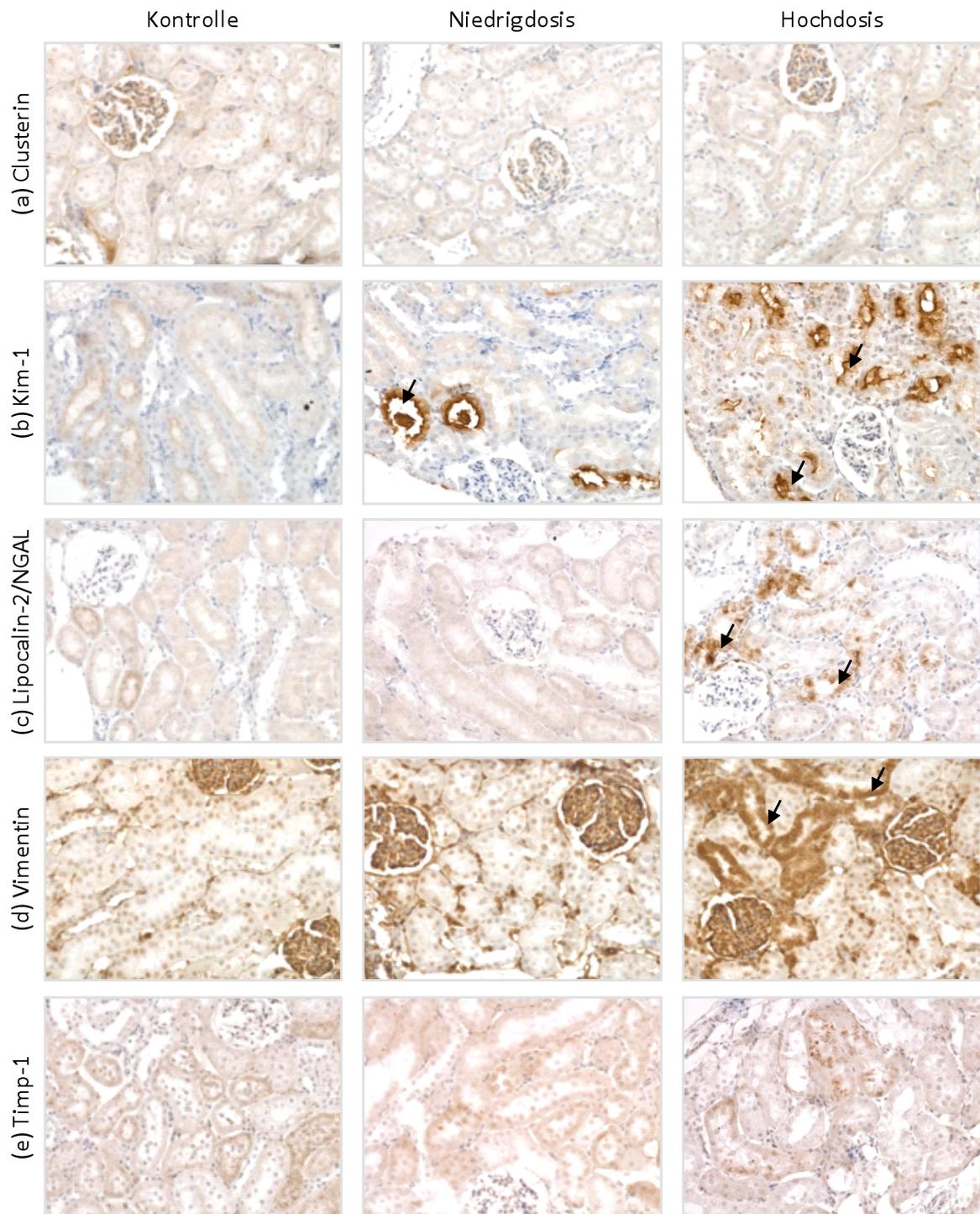


Abb. 6.10 Expression von Clusterin, Kim-1, Lcn2, Vimentin und Timp-1 in den Nieren männlicher Ratten nach 14-tägiger Behandlung mit 0, 25 oder 75 mg/kg KG Gentamicin. Die Hochdosis von Gentamicin führte zur gesteigerten Proteinexpression von Kim-1, Lcn2 und Vimentin in den proximalen Tubuluszellen in der äußeren Nierenrinde.

6.3.3.4 ***Detektion potentieller Urinbiomarker mit Singleplex-ELISA***

Effekte von Gentamicin auf die Ausscheidung potentieller Marker mit dem Urin sind in Abb. 6.11 dargestellt. Eine leichte Erhöhung der Konzentration von Kim-1 im Vergleich zur Kontrolle wurde schon nach 3-tägiger Gabe von 75 mg/kg KG festgestellt. Diese nahm nach 12 Tagen weiter zu. Auch einzelne Tiere der Niedrigdosisgruppe gaben Kim-1 nach 12 Tagen vermehrt in den Urin ab. Trotz der fehlenden Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression erhöhte sich auch die Ausscheidung von Clusterin signifikant nach Behandlung mit 75 mg/kg KG über 3 und 12 Tage. Wie auch nach Behandlung mit BI-3 konnte eine erhöhte Ausscheidung von Kim-1 und Clusterin bereits nach 3 Tagen detektiert werden, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch kein histopathologischer Schaden zu erkennen war. Nach 12-tägiger Gentamicingabe erhöhte sich weiterhin die Lipocalin-2-Exkretion, hingegen blieb die Konzentration von Timp-1 unverändert, welches der Protein- und Genexpression im Nierengewebe dieser Ratten entspricht.

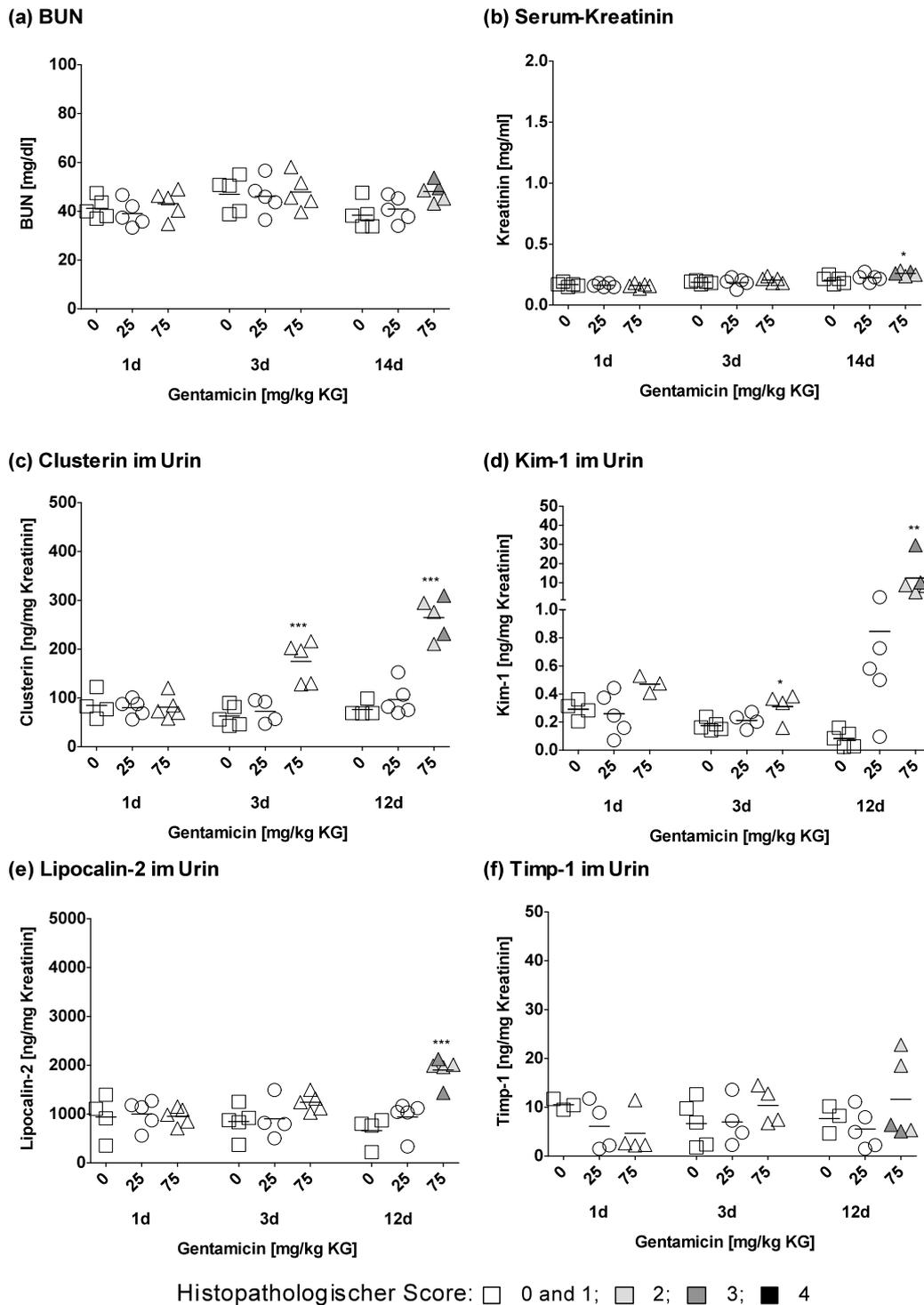


Abb. 6.11 BUN und Serumkreatinin sowie Ausscheidung von Clusterin, Kim-1, Lcn2 und Timp-1 über den Urin nach Behandlung männlicher Ratten, die mit 0, 25 oder 75 mg/kg KG Gentamicin über 1,3 oder 12/14 Tage behandelt wurden. Die Farbe der einzelnen Tiere richtet sich nach dem Grad der Schädigung des proximalen Tubulus. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sind als Balken gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.3.3.5 Western-Blot-Analyse neuer Biomarker im Nierengewebe

Übereinstimmend mit den Ergebnissen der 2D-DIGE (Gautier, J.C., unveröffentlichte Daten) konnten die Proteine PRBP-4, Moesin, PEPCK-1, AGAT, Catalase, Gpx-1 und Pxr-1 auch mit Hilfe der Western-Blot-Analyse als stark dereguliert identifiziert werden. Die 14-tägige Gabe von Gentamicin führte zu einer signifikant verstärkten Proteinexpression von PRBP-4 und Moesin in der Niere, die sogar schon nach Behandlung mit 25 mg/kg KG auftrat. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Nieren der Ratten (teilweise sogar nach Behandlung mit der niedrigen Dosis von 25 mg/kg KG) eine verminderte Expression von AGAT, Catalase, Peroxiredoxin-1, Glutathionperoxidase-1 und PEPCK-1 durch Gentamicingabe (Abb. 6.12).

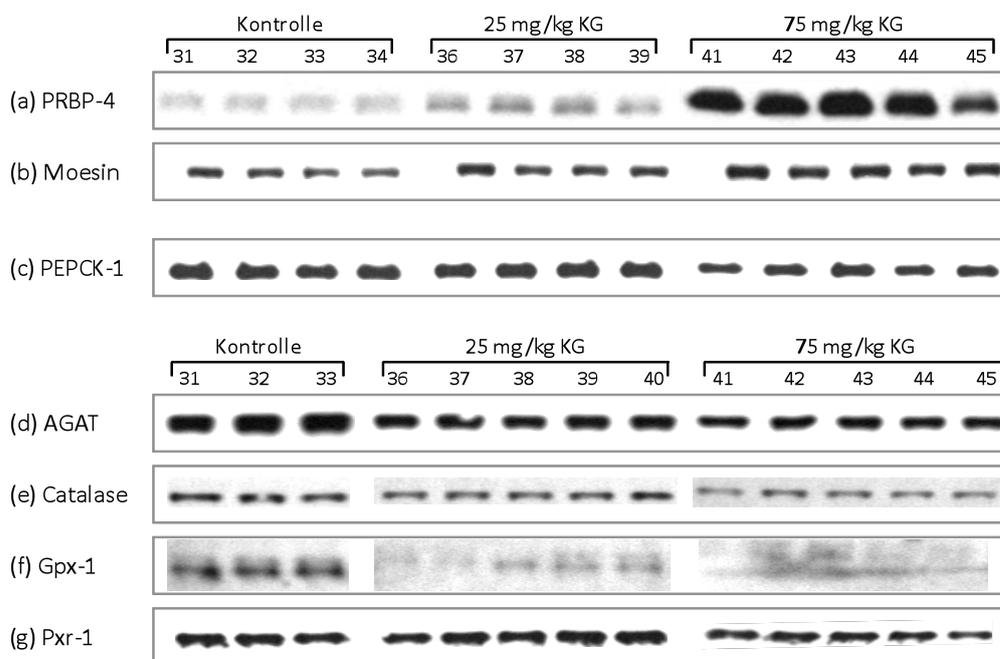


Abb. 6.12 Western Blot-Analyse von (a) PRBP-4, (b) Moesin, (c) PEPCK-1, (d) AGAT, (e) Catalase, (f) Gpx-1 und (g) Pxr-1 in Nieren männlicher Ratten, welche für 14 Tage mit 0, 25 oder 75 mg/kg KG Gentamicin behandelt wurden relativ.

Tabelle 6.5 zeigt die quantitative Auswertung mittels Densitometrie sowie die Expressionsänderung in der Hochdosisgruppe, welche mittels 2D-DIGE gemessen wurde. Dabei ist der Mittelwert der Intensität der Proteinbanden der behandelten Tiere als Vielfaches zum Mittelwert der Kontrollgruppe angegeben.

Tabelle 6.5 Expression potentieller Proteinmarker in der Niere von Ratten nach 14-tägiger Behandlung mit 25 oder 75 mg/kg KG Gentamicin. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD relativ zur Kontrolle angegeben. Zusätzlich sind die durch 2D-DIGE ermittelten Expressionsänderungen angegeben (Gautier, J.C., unveröffentl. Daten). Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Protein	Gentamicin [mg/kg KG]			
	0 mg/kg	25 mg/kg	75 mg/kg	75 mg/kg KG
		Western Blot		2D-DIGE
(a) PRBP-4:	1,00 \pm 0,08	2,08 \pm 0,48	9,11 \pm 2,36 ***	5,45
(b) Moezin:	1,00 \pm 0,23	1,41 \pm 0,24	1,79 \pm 0,36 **	1,51
(c) PEPCK-1:	1,00 \pm 0,10	0,99 \pm 0,06	0,75 \pm 0,11 **	0,34
(d) AGAT:	1,00 \pm 0,13	0,65 \pm 0,03 ***	0,56 \pm 0,04 ***	0,19
(e) Catalase:	1,00 \pm 0,09	0,69 \pm 0,14 **	0,43 \pm 0,07 ***	0,49
(f) Gpx-1:	1,00 \pm 0,14	0,26 \pm 0,13 ***	0,14 \pm 0,10 ***	0,70
(g) Pxr-1:	1,00 \pm 0,10	0,98 \pm 0,19	0,78 \pm 0,15	0,27

6.3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit Gentamicin

Die Ergebnisse der Gen- und Proteinexpression der Markergene korrelieren gut mit den renalen histopathologischen Veränderungen, ebenso wie die erhöhte Konzentration von Lipocalin-2 im Urin. Eine veränderte Expression von Clustern konnte auf Transkriptions- und Proteinebene im Nierengewebe nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu trat aber auch in dieser Studie bereits nach 3-tägiger Behandlung mit 75 mg/kg KG Gentamicin eine erhöhte Abgabe von Clusterin und Kim-1 in den Urin auf. Ebenfalls scheint auch hier die gesteigerte Ausscheidung von Kim-1 und Clusterin im Urin sensitiver als Veränderungen in der Gen- und Proteinexpression zu sein, welche erst nach 12-tägiger Behandlung auftraten. Jedoch ist auch in diesem Fall zu erwähnen, dass die Daten zu den frühen Zeitpunkten (Tag 1 und 3) der Urinanalyse nicht direkt mit denen der Histopathologie, Gen- und Proteinexpression zu vergleichen sind, da diese, wie schon erwähnt, von unterschiedlichen Tieren stammen.

6.3.4 IMM125

Die Substanz IMM125 ist ein O-Hydroxyethylderivat von D-Serin-8-Cyclosporin mit einer molekularen Masse von 1262,7 g/mol, das als orales Immunsuppressiva zur Therapie von Autoimmun-Erkrankungen und Behandlung transplantierte Patienten entwickelt wurde (Abb. 6.13). Die pharmakologische Wirkung von IMM125 wurde in verschiedenen *In-vitro*-Tests bestimmt und entsprach der von Cyclosporin A, jedoch ohne zytotoxische und

zytostatische Effekte (Potier *et al.*, 1998). Jedoch wies die Substanz wie Cyclosporin A nephrotoxische und zusätzlich hepatotoxische Eigenschaften auf. Mit Hilfe der 2D-DIGE wurde auch eine veränderte Expression von AGAT und Peroxiredoxin-1 infolge IMM125-Gabe identifiziert (Gautier, J.C, unveröffent. Daten).

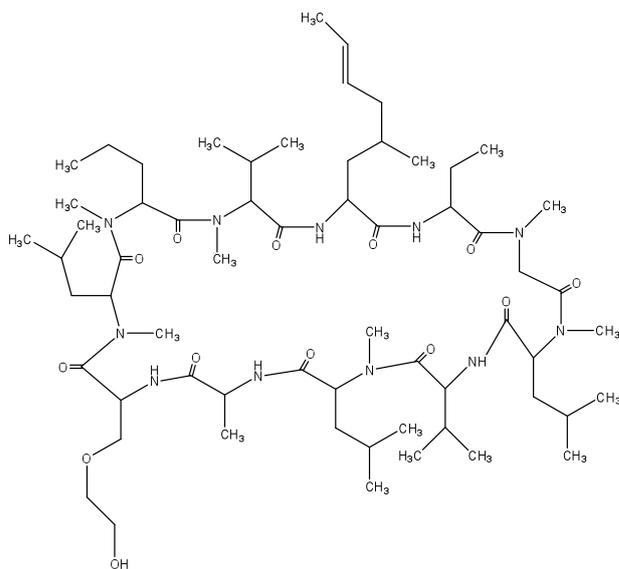


Abb. 6.13 Strukturformel des Cyclosporin-A-Derivats IMM125

6.3.4.1 **Klinische Chemie und Histopathologie**

Die 2-wöchige Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit IMM125 führte zu Leber- und Nierentoxizität. In der Niere wurde in beiden Dosisgruppen bereits ab Tag 3 eine leichte Hypertrophie der Tubuli beobachtet. Weiterhin führte die Behandlung zu Basophilie der renalen proximalen Tubuli in 4 Tieren der Hochdosisgruppe nach 14 Tagen und einer gesteigerten Inzidenz an interstitiellen mononukleären Zellinfiltraten. In allen unbehandelten und behandelten Tieren wurde nach einem Tag eine erhöhte Glykogenablagerung in der Leber notiert, welche aber an den darauffolgenden Tagen nicht mehr zu sehen war. Darüber hinaus wurde ein erhöhtes Auftreten mit teilweise zunehmendem Schweregrad von Vakuolisierung der Hepatozyten beobachtet. Damit verbunden war eine dosisabhängige Abnahme der Gesamtproteinmenge im Serum und der Aktivitäten der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Alkalische Phosphatase (ALP), Kreatinkinase (CK) und Lactatdehydrogenase (LDH) (Tab. 6.6). Über die ganze 2-wöchige Behandlungsdauer hinweg waren die peripheren Blutmonocyten und die Bilirubinlevel in beiden Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Tab. 6.6).

Tabelle 6.6 Klinisch-chemische Parameter nach Behandlung männlicher Wistar-Ratten mit 0, 30 und 100 mg/kg KG IMM125. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

	Tag	IMM125				
		0 mg/kg KG	30 mg/kg KG	100 mg/kg KG		
Urin						
Kreatinin [mg/15h]	1	4,3 \pm 1,1	4,7 \pm 0,7		5,3 \pm 0,7	
	3	4,8 \pm 1,4	5,5 \pm 0,8		6,0 \pm 1,1	
	12	6,1 \pm 1,0	6,9 \pm 1,2		7,0 \pm 0,6	
Protein [mg/mg Kreatinin]	1	0,1 \pm 0,1	0,5 \pm 0,4		0,6 \pm 0,5	
	3	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,3		0,4 \pm 0,7	
	12	0,4 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1		0,5 \pm 0,2	
Serum						
Kreatinin [mg/dl]	1	0,28 \pm 0,05	0,29 \pm 0,07		0,22 \pm 0,02	
	3	0,25 \pm 0,04	0,27 \pm 0,05		0,30 \pm 0,08	
	14	0,32 \pm 0,02	0,32 \pm 0,04		0,35 \pm 0,04	
Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) [mg/dl]	1	13 \pm 3	13 \pm 4		13 \pm 3	
	3	14 \pm 2	14 \pm 3		15 \pm 4	
	14	15 \pm 1	17 \pm 3		17 \pm 3	
γ-Glutamyltransferase (GGT) [U/l]	1	1,86 \pm 1,90	1,02 \pm 1,42		1,54 \pm 2,21	
	3	1,60 \pm 3,58	2,54 \pm 3,69		2,20 \pm 3,73	
	14	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00		0,00 \pm 0,00	
Gesamt-Protein [g/l]	1	61 \pm 1	58 \pm 2	*	56 \pm 2	**
	3	64 \pm 2	59 \pm 3	*	52 \pm 3	***
	14	64 \pm 2	58 \pm 2	***	53 \pm 1	***
Aspartat-Aminotransferase (AST) [U/l]	1	132 \pm 10	107 \pm 13	*	80 \pm 17	***
	3	108 \pm 15	90 \pm 10		69 \pm 26	*
	14	138 \pm 22	95 \pm 7	**	72 \pm 9	***
Alkalische Phosphatase (ALP) [U/l]	1	213 \pm 49,3	228 \pm 61,8		191 \pm 26	
	3	245 \pm 69,13	155 \pm 27,13	*	123 \pm 12	**
	14	176 \pm 20,51	116 \pm 24,88	**	95 \pm 24	***
Alanin-Aminotransferase (ALT) [U/l]	1	57 \pm 9	49 \pm 6		33 \pm 12	**
	3	54 \pm 11	22 \pm 9	***	22 \pm 6	***
	14	52 \pm 7	46 \pm 8		34 \pm 8	**
Bilirubin [mg/dl]	1	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02		0,17 \pm 0,05	**
	3	0,09 \pm 0,03	0,14 \pm 0,03		0,45 \pm 0,10	***
	14	0,10 \pm 0,03	0,17 \pm 0,02	*	0,28 \pm 0,07	***
Glucose [mg/dl]	1	95 \pm 16	114 \pm 12		120 \pm 23	
	3	74 \pm 4	84 \pm 9		101 \pm 14	**
	14	80 \pm 14	92 \pm 15		111 \pm 8	**
Blut						
Neutrophile [10 ⁹ /l]	1	1,00 \pm 0,14	1,04 \pm 0,20		1,04 \pm 0,39	
	3	0,91 \pm 0,15	0,73 \pm 0,09		1,14 \pm 0,24	
	14	0,99 \pm 0,31	0,95 \pm 0,30		1,29 \pm 0,50	

6.3.4.2 Genexpressionsanalyse potentieller Biomarker im Nierengewebe

In Abbildung 6.13 ist die Änderung der mRNA-Expression der potentiellen Markergene Kim-1, Clusterin, Lipocalin-2, Timp-1, Osteopontin, Vimentin, Timp-1 und Hämoxygenase in der Niere von IMM125-behandelten Ratten zu den verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass die Expression von Kim-1, Timp-1, HO-1 und Lipocalin-2 schon nach der ersten Verabreichung der Hochdosis des Cyclosporinderivats im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht war. Selbst nach Behandlung mit der niedrigen Dosis von 30 mg/kg KG konnte schon eine gesteigerte Expression der Gene beobachtet werden, die aber aufgrund der großen Schwankungen zwischen den Tieren zu keinem signifikanten Ergebnis führten. Im Gegensatz führte die Gabe von IMM125 erst nach 14 Tagen zu einer Induktion der mRNA-Expression von Clusterin, Osteopontin und Vimentin. Die ausgeprägtesten Effekte zeigten sich v. a. in den Tieren der Hochdosisgruppe, welche nach 14-tägiger IMM125-Verabreichung einen moderaten proximalen Tubulusschaden aufwiesen.

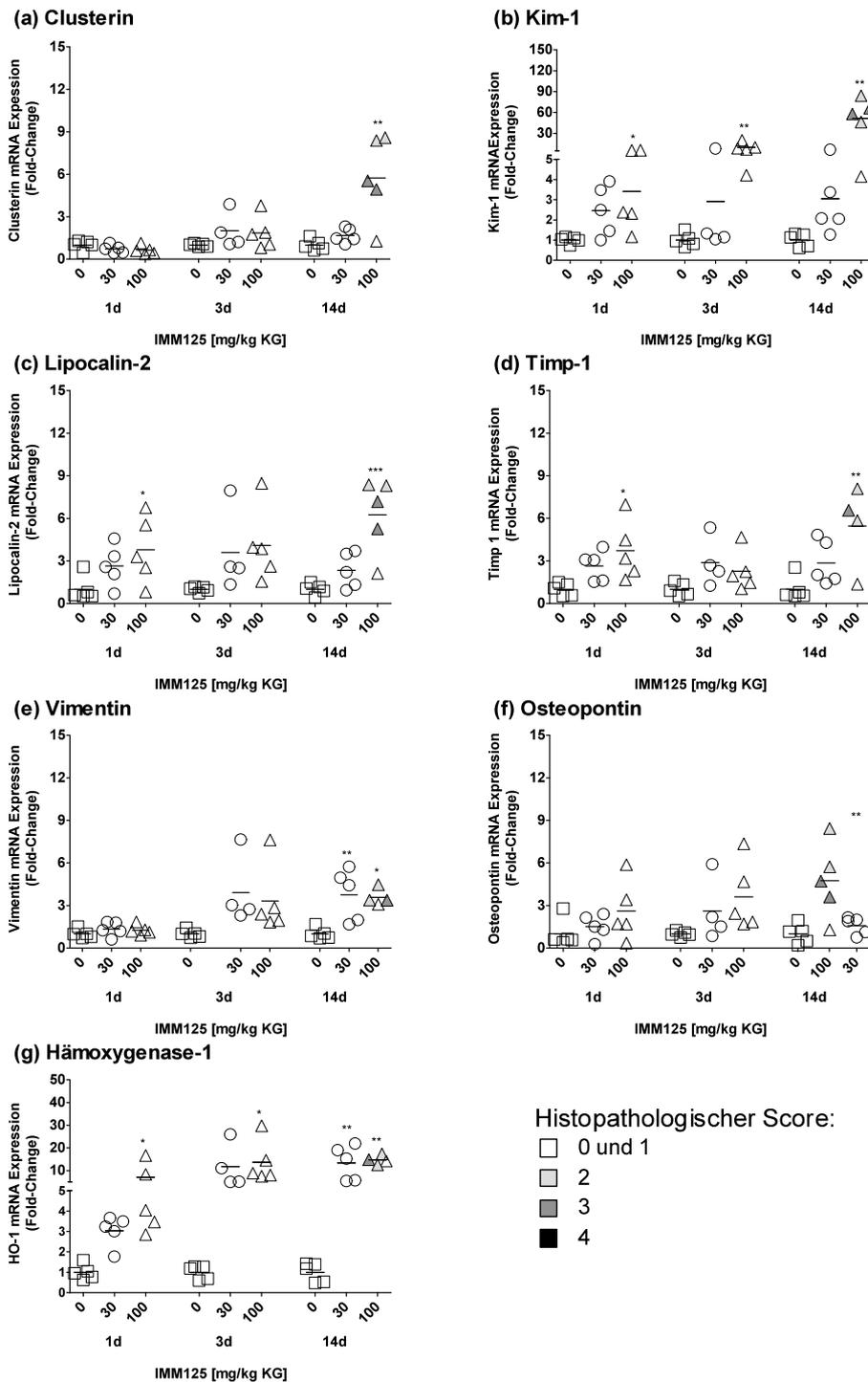


Abb. 6.14 mRNA-Expression von (a) Clusterin, (b) Kim-1, (c) Lcn2, (d) Timp-1, (e) Vimentin, (f) OPN und (g) HO-1 nach Verabreichung von 0, 30 oder 100 mg/kg KG IMM125 für 1, 3 oder 14 Tage. Die Daten sind als Einzelwerte relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe angegeben. Die Farbe der einzelnen Tiere richtet sich nach dem Grad der Schädigung des proximalen Tubulus. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sind als Balken gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.3.4.3 Immunlokalisation neuer Markerproteine auf TMAs

Die immunhistochemische Analyse der Proteinexpression von Kim-1, Clusterin, Lipocalin-2, Timp-1 und Vimentin in den Nieren ergab sowohl in den Kontrollen als auch in denen mit IMM125 behandelten Tieren keine positive Färbung. Die Nierengewebe der Ratten waren wahrscheinlich überfixiert und somit unbrauchbar für den Nachweis der Proteine.

6.3.4.4 Detektion potentiellen Urinbiomarker mit Singleplex-ELISA

Die quantitative Urinanalyse zeigte eine erhöhte Konzentration von Kim-1, Clusterin und Lipocalin-2 nach 12-tägiger Verabreichung von 100 mg/kg KG des Cyclosporinderivats IMM125 in den Tieren, welche starke histopathologische Veränderungen aufwiesen (Abb. 6.14). Weiterhin scheint es so, als wäre die Konzentration von Kim-1 im Urin bereits nach 3-tägiger Gabe von 30 mg/kg KG IMM125 erhöht. Dieses war aber statistisch nicht auswertbar, da zu diesem Zeitpunkt nur von einem Kontrolltier Urin zur Verfügung stand. Jedoch liegt die Konzentration von Kim-1 bei diesem Kontrolltier in einem Bereich, in dem auch die Konzentrationen der Kontrolltiere nach 1 und 14 Tagen liegen. Weiterhin korreliert die erhöhte Ausscheidung von Kim-1 nach 3 Tagen mit der gesteigerten mRNA-Expression von Kim-1 in der Niere nach Behandlung mit IMM125.

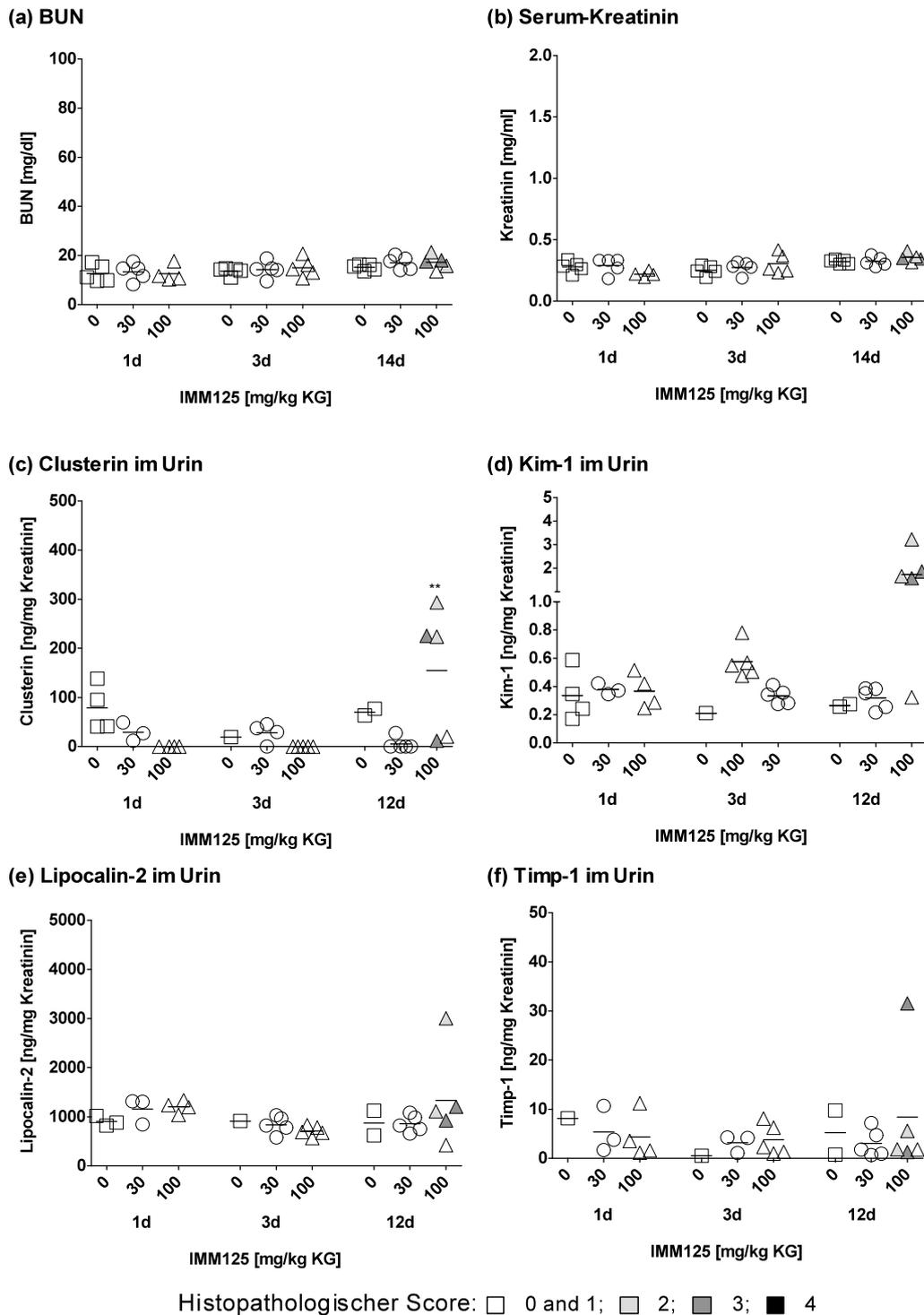


Abb. 6.15 Analyse von BUN, Kreatinin im Serum sowie die Veränderung der Ausscheidung von Clusterin, Kim-1, Lcn2 und Timp-1 in den Urin männlicher Ratten nach Gabe von 0, 30 oder 100 mg/kg KG IMM125 für 1, 3 oder 12/14 Tage. Die Farbe der einzelnen Tiere richtet sich nach dem Grad der Schädigung des proximalen Tubulus. Die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen sind als Balken gekennzeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

6.3.4.5 Western-Blot-Analyse neuer Biomarker im Nierengewebe

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse bestätigten die Ergebnisse der 2D-DIGE (Gautier, J.C, unveröffent. Daten). Neben der verminderten Expression nach 14-tägiger Behandlung mit 100 mg/kg KG IMM125 konnte dieser Effekt auch schon in Nieren der Niedrigdosisgruppe beobachtet werden. Die Proteinexpression von Peroxiredoxin-1 veränderte sich zwar ebenfalls, jedoch wurde das Protein nicht wie beschrieben heruntersondern durch die Gabe von IMM125 hochreguliert.

Tabelle 6.7 Expression potentieller Marker in der Niere von Ratten, die für 14 Tagen mit 0, 30 oder 100 mg/kg KG IMM125 behandelt wurden. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD relativ zur Kontrolle angegeben. Zusätzlich sind die durch 2D-DIGE ermittelten Expressionsänderungen angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Protein	IMM125 [mg/kg KG]			
	0 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg	100 mg/kg KG
		Western Blot		2D-DIGE
(a) AGAT	1,00 \pm 0,18	0,66 \pm 0,05 *	0,51 \pm 0,24 **	0,50
(b) Pxr-1	1,00 \pm 1,1	1,3 \pm 1,3	1,7 \pm 0,9	0,19

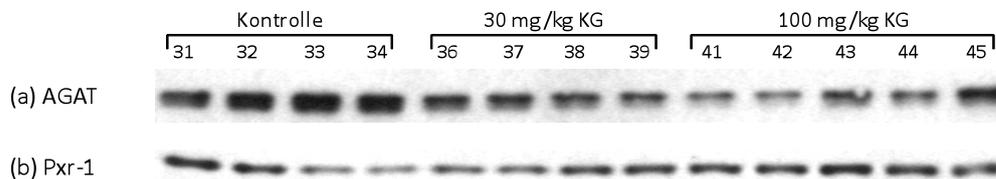


Abb. 6.16 Western-Blot-Analyse von (a) AGAT und (b) Pxr-1 in Nieren männlicher Ratten, welche für 14 Tage mit 0, 30 oder 100 mg/kg KG IMM125 behandelt wurden.

6.3.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit IMM125

Die gesteigerte Genexpression der verschiedenen renalen Biomarker scheint in dieser Studie am sensitivsten zu sein, da die erhöhte Expression zum Teil schon nach der ersten Behandlung beobachtet werden konnte (z.B. Kim-1). Weiterhin führte die Behandlung mit IMM125 schon nach 3 Tagen zu einer erhöhten Ausscheidung von Kim-1 in den Urin. Leider war es aufgrund der schlechten Qualität der Nierenschnitte nicht möglich, die Ergebnisse der Genexpression immunhistochemisch auf Proteinebene zu bestätigen.

6.3.5 Receiver Operating Characteristic-Analyse

Die ROC-Analysen wurden durchgeführt, um die Empfindlichkeit der neuen potentiellen Biomarkern mit denen der traditionellen klinisch-chemischen Parameter zu vergleichen.

6.3.5.1 Markergene

Die AUC von Kim-1, Clusterin, Lipocalin-2, Osteopontin und HO-1 lag jeweils über 0,90. Somit eignen sich diese Marker sehr gut als sensitive Marker für die Nephrotoxizität und scheinen sensitiver als die traditionellen Marker BUN und Serumkreatinin zu sein. Im Gegensatz dazu eignen sich Timp-1 und Vimentin weniger gut als Genexpressionsmarker zur Identifizierung von Nephrotoxizität, jedoch ist ihre Sensitivität höher als die der herkömmlichen Parameter BUN und Serumkreatinin sind (Tab. 6.8)

Tabelle 6.8 ROC-Analyse der potentiellen Genexpressionsmarker für Nephrotoxizität

Nierenbiomarker	AUC	95 % Konfidenzintervall	p-value
BUN	0,65	0,46-0,83	0,0927
Serumkreatinin	0,54	0,39-0,68	0,6920
Kim-1	0,99	0,98-1,00	< 0,0001
Clusterin	0,96	0,93-0,99	< 0,0001
Lipocalin-2	0,94	0,88-1,00	< 0,0001
Timp-1	0,87	0,75-0,99	< 0,0001
Osteopontin	0,99	0,97-1,00	< 0,0001
Hämoxygenase-1	0,92	0,88-0,97	< 0,0001
Vimentin	0,79	0,63-0,94	0,0024

6.3.5.2 Markerproteine im Urin

Weiterhin offenbart die ROC-Analyse die Ausscheidung von Kim-1 (AUC = 0,99) und Clusterin (AUC = 0,93) als sehr sensitive und spezifische Marker für Nierentoxizität. Obwohl die AUC von Lipocalin-2 (0,77) und Timp-1 (0,79) wesentlich geringer sind und somit weniger sensitiv, sind sie besser zur Erkennung von Nierenschäden geeignet als die traditionellen Marker BUN und Serumkreatinin (Tab. 6.9).

Table 6.9 ROC-Analyse der potentiellen Urinbiomarker im Vergleich zu klinisch-chemischen Parametern für Nephrotoxizität

Nierenbiomarker	AUC	95 % Konfidenzintervall	p-value
BUN	0,65	0,46-0,83	0,0927
Serumkreatinin	0,54	0,39-0,68	0,6920
Kim-1	0,99	0,97-1,01	< 0,0001
Clusterin	0,93	0,81-1,05	< 0,0001
Lipocalin-2	0,77	0,60-0,94	0,0044
Timp-1	0,79	0,65-0,92	0,0027

6.4 Diskussion

Die in Kapitel 4 und 5 beschriebenen potentiellen Biomarker wurden weiterhin im Zielorgan Niere und im Urin der Proben der PredTox-Studie untersucht. In diese Studie flossen Substanzen ein, welche in ihrer Entwicklung aufgrund von nieren- oder lebertoxischer Eigenschaften gestoppt wurden sowie jeweils eine Referenzsubstanz für Nieren- (Gentamicin) bzw. Lebertoxizität (Troglitazon). Männlichen Wistar-Ratten wurde für 1, 3 oder 14 Tage eine niedrige bzw. hohe Dosis der jeweiligen Substanz verabreicht.

Die Gabe von 4 der 16 verwendeten PredTox-Substanzen führte zu histopathologischen Veränderungen in der Niere in Form von proximalen Tubulusschäden (Degeneration, Nekrose, Regeneration), erhöhten interstitiellen mononukleären Zellinfiltraten und hyalinen Ablagerungen. Obwohl minimale Veränderungen teilweise schon am Tag 1 und 3 sowie in den Niedrigdosisgruppen beobachtet wurden, zeigten sich Läsionen im proximalen Tubulus erst nach 14-tägiger Hochdosisbehandlung mit BI-3, Gentamicin und IMM125. Die Behandlung mit der Substanz BI-2 resultierte in einer Akkumulation von hyalinen Ablagerungen, führte jedoch nicht zur Schädigung des proximalen Tubulus. Die ROC-Kurven-Analyse zeigte, dass die Empfindlichkeit der traditionellen Nierenmarker BUN und Serumkreatinin für die Erkennung von proximalen Tubulusschäden sehr gering ist.

Auch in dieser Studie konnte generell eine gute Übereinstimmung der Gen- und Proteinexpression der potentiellen Nephrotoxizitätsmarker mit den histopathologischen Veränderungen in der Niere beobachtet werden. Meist traten Aberrationen der Expression der Marker sogar noch vor Veränderungen in klinisch-chemischen Parametern auf.

Eine gesteigerte Expression sowie Exkretion von Kim-1 war auch in dieser Studie einer der frühesten Effekte nach Behandlung mit Substanzen, welche eine Schädigung des proximalen Tubuli bewirkten. Wie auch schon in der in Kapitel 5 beschriebenen Gentamicinstudie gezeigt, konnte eine erhöhte Ausscheidung von Kim-1 (AUC = 0,99) als sensitiver, nicht-invasiver Biomarker für proximale Nierenschädigung bestätigt werden.

Wie erwartet zeigte sich nach wiederholter Gabe der 3 Substanzen, welche Schäden im proximalen Tubulus verursachten (BI-3, Gentamicin und IMM125) ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression von Lipocalin-2. Ebenfalls konnte das Protein vermehrt im Nierengewebe der behandelten Tiere nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde auch nach Gabe der Substanz BI-2, die keine Schäden am proximalen Tubulus induziert, ein Anstieg von Lipocalin-2 im Gewebe und Urin beobachtet. Eine erhöhte Proteinkonzentration im Gewebe und Urin scheint somit nicht zwingend mit einem Nierenschaden assoziiert zu sein. In dieser Hinsicht ist bedeutsam, dass die Behandlung mit BI-2 zu einem Anstieg der Neutrophilenzahl führte.

Lipocalin-2 ist ein Akute-Phase-Protein, das neben einer Vielzahl von Epithelzellen aber auch von Neutrophilen gebildet und infolge von zellulärem Stress und bei Entzündungen schnell über die Aktivierung von NF κ B freigesetzt wird (Bu, *et al.*, 2006; Cowland, *et al.*, 2006). Aufgrund des geringen Molekulargewichtes wird Lipocalin-2 glomerulär frei filtriert und von den Epithelzellen des proximalen Tubulus wieder resorbiert. Daher ist anzunehmen, dass die gesteigerte Konzentration von Lipocalin-2 im Gewebe und Urin infolge der Behandlung mit BI-2 vielmehr im Zusammenhang mit der Erhöhung der Neutrophilenzahl im Blut steht, als dass sie als frühes Zeichen für Schädigung des Tubulusepithels zu werten ist. Für die fehlende Spezifität für Nephrotoxizität sprechen auch Ergebnisse anderer tierexperimenteller Studien, in denen Ratten mit verschiedenen Lebertoxinen behandelt wurden. Obwohl keine histopathologischen Veränderungen in der Niere nachgewiesen wurden, konnte eine erhöhte Konzentration von Lipocalin-2 im Urin detektiert werden (Adler *et al.*, 2010; Smyth *et al.*, 2008). Ebenso zeigte sich eine erhöhte immunhistochemische Färbung in den Nieren, jedoch keine veränderte Expression der mRNA. Obgleich Lcn2 im Urin in der Literatur als spezifischer Nierenmarker bezeichnet wird (Ding, *et al.*, 2007; Mishra, *et al.*, 2005; Mishra, *et al.*, 2004; Wagener, *et al.*, 2008), scheint eine gesteigerte Genexpression von Lcn2 in der Niere (AUC = 0,94) spezifischer für eine Nierenerkrankung zu sein als eine vermehrte

Proteinexkretion in den Urin (AUC = 0,77). Jedoch eignet sich die erhöhte Lcn2-Ausscheidung aufgrund der sehr frühen Antwort auf Entzündungen und Gewebeschaden als sehr sensitiver Marker und könnte eine sinnvolle Ergänzung der derzeitigen Batterie an Markern darstellen.

Im Unterschied zur Gentamicin-Studie zeichnete sich Clusterin sowohl auf mRNA-Ebene als auch im Urin als sensitiver Marker für tubuläre Schädigung aus. Die erhöhten Expressionsdaten spiegeln die histopathologische Veränderung im Zielorgan Niere sehr gut wider. Darüber hinaus wurde die sezernierte Form des Proteins schon zu Zeitpunkten bzw. nach niedrigen Dosen vermehrt in den Urin abgegeben, bei denen noch keine histopathologischen Veränderungen in den Nieren auftraten. Die durch die ROC-Kurve errechnete AUC von 0,93 bekräftigt frühere Studien, in denen Clusterin als sensitiver Marker für akute Nierenschädigung beschrieben wird und besser geeignet ist als traditionelle klinische Parameter (Eti, *et al.*, 1993).

Timp-1 hingegen wurde auch in dieser Studie als nicht sensitiv bewertet. Zwar zeigte sich teilweise eine erhöhte Expression von Timp-1 auf Transkriptionsebene, jedoch konnte die in früheren Studien beschriebene erhöhte Exkretion nach Nierenschädigung nicht beobachtet werden (Sanders, *et al.*, 2007; Wasilewska und Zoch-Zwierz, 2008). Auch auf Proteinebene führte die Behandlung mit Tubulus-schädigenden Substanzen eher zu einem Verlust von Timp-1-positiven Zellen.

Die Genexpression von Osteopontin korrelierte ebenfalls gut mit den histopathologischen Läsionen in den Studien, in denen Schädigungen der proximalen Tubuli beobachtet wurden und stellt somit auf mRNA-Ebene einen vielversprechenden Marker für Nephrotoxizität dar. Dieses Ergebnis wird auch durch die ROC-Analyse mit einer AUC von 0,99 bestätigt. Dennoch konnte Osteopontin nicht mittels Antikörper immunchemisch im Nierengewebe auf Proteinebene detektiert und lokalisiert werden. Neben der erhöhten Expression von Osteopontin sollte auch die Exkretion des Proteins in den Urin gemessen werden. Diese wurde bei Kindern mit Steroid-resistenten nephrotischem Syndrom sowie bei Mäusen mit fokaler segmentaler Glomerulosklerose beobachtet (Lorenzen, *et al.*, 2008; Shui, *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde für die Messung von Osteopontin im Urin ein kommerziell verfügbarer Assay (TiterZyme® EIA rat osteopontin, Biomol, Hamburg, Deutschland) verwendet. In den Urinproben der Studien mit proximalen Tubulusschäden konnte Osteopontin jedoch nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses

könnte möglicherweise auf der geringen Stabilität von OPN im Urin beruhen, da es in der Literatur Hinweise auf eine proteolytische Spaltung von OPN im Urin gibt (Christensen, *et al.*, 2008). Daher scheint es sinnvoll, Urinproben bereits bei der Probengewinnung mit einem Stabilisierungspuffer zu versetzen, um dem Abbau von OPN und anderen potentiellen instabilen Proteinen entgegenzuwirken und somit OPN im Urin möglicherweise als nicht-invasiven Nierenbiomarker verwenden zu können. Für zukünftige Versuche sollte daher die Methodik einschließlich Probenahme optimiert werden.

Vimentin wird in differenzierten Epithelzellen kaum gebildet und gilt als Marker für Zelldifferenzierung während der Regenerationsphase von verletztem Gewebe (Wallin, *et al.*, 1992; Witzgall, *et al.*, 1994). In den Kontrollnieren beschränkte sich die Lokalisation von Vimentin auf die Glomeruli. Nach Gabe von BI-3, Gentamicin und IMM125 konnte Vimentin auch in proximalen regenerierenden Tubuluszellen detektiert werden. Erwartungsgemäß trat dieses nach Behandlung mit BI-2, welche nicht den proximalen Tubulus schädigt, nicht auf. Im Gegensatz zur sichtbar erhöhten Proteinexpression wurde die mRNA-Expression von Vimentin in den Nieren der mit BI-3 und IMM125 behandelten Tiere nur geringfügig induziert. Die Gabe von Gentamicin führte dagegen zu keinem signifikanten Effekt auf die Genexpression. Somit scheint, dass sich Vimentin auf mRNA-Ebene (AUC = 0,79) weniger gut als Marker für Nierentoxizität eignet, als auf Proteinebene. Die geringe Änderung der Genexpression von Vimentin im Vergleich zur Proteinexpression konnte auch nach Gabe des Nierentoxins Ochratoxin A gezeigt werden (Rached, *et al.*, 2008). und steht im Einklang mit Untersuchungen, die zeigen, dass die Proteinexpression von Vimentin translational reguliert wird (Thomas, 1986).

Ebenfalls zeigten sich Effekte auf die Genexpression von Hämoxigenase-1, die sehr gut mit den histopathologischen Veränderungen in den Nieren übereinstimmen. Die gesteigerte Expression von HO-1 kann daher als sehr früher Marker angesehen werden (AUC = 0,92), da die Expression der mRNA bereits nach einem Tag Behandlung mit 30 mg/kg KG IMM125 induziert wurde. Dieses Ergebnis korreliert gut mit anderen Studien, in denen HO-1 infolge von Nierenschädigung vermehrt exprimiert wurde (Amin, *et al.*, 2004).

Die Behandlung der Ratten mit der Hochdosis der jeweiligen nierentoxischen Substanzen führte nach 14 Tagen zu einer veränderten Expression verschiedener Protein im Nierengewebe, die mit Hilfe der 2D-DIGE identifiziert wurde (Gautier, J.C., unveröffentl.

Daten). Die am stärksten deregulierten Proteine wurden mit einem spezifischen Antikörper in Nieren der Ratten, welche mit der Hoch- und zusätzlich der Niedrigdosis für 14 Tage behandelt wurden, mittels Western-Blot nachgewiesen. Im Allgemeinen bestätigen die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse die Daten der 2D-DIGE. Zusätzlich konnte eine Veränderung der Proteinexpression schon nach Verabreichung der niedrigen Dosis gezeigt werden. Auffällig war, dass das Enzym Glycinamidinotransferase (AGAT) in allen 3 Studien, welche proximale Tubulusschäden verursachten, nach Verabreichung der jeweiligen Hochdosis herunter reguliert wurde. Somit könnte AGAT als potentieller Biomarker für Nierenschädigung agieren. Desweiteren konnte zusätzlich eine Herunterregulierung des Proteins nach Gabe von den Niedrigdosen 25 mg/kg KG Gentamicin und 30 mg/kg KG IMM125 beobachtet werden.

AGAT ist in den Mitochondrien der proximalen Tubuluszellen lokalisiert und katalysiert die Übertragung der Guanidingruppe von Arginin auf Glycin unter Bildung von Ornithin und Guanidinacetat (GAA) (Wyss und Kaddurah-Daouk, 2000). Dieses wird im zweiten Schritt in Abhängigkeit von S-Adenolsylmethionin (SAM) durch die Guanidinoacetat-Methyltransferase (GAMT) zu Kreatin methyliert, welches zur Energieversorgung der Muskeln dient (Abb. 6.16).

Auch in anderen tierexperimentellen Studien mit nephrotoxischen Substanzen konnte früh eine verminderte mRNA-Expression von AGAT in Nieren behandelter Ratten gezeigt werden (Amin, *et al.*, 2004; Ozaki *et al.*, 2009). Neben der verringerten mRNA-Expression von AGAT wurde interessanterweise auch die verminderte GAA-Ausscheidung in den Urin als sensitiver Marker für Gentamicin-induzierte Nephrotoxizität beschrieben (Kiyatake *et al.*, 2004; Takeda *et al.*, 1995). Möglicherweise führen erhöhte Serumkreatininspiegel infolge einer erniedrigter glomerulären Filtrationsrate durch Schädigung des proximalen Tubulus über negative Rückkopplung zur reduzierten Expression von AGAT sowie auch von GAMT und damit zu einer Abnahme von GAA (Guthmiller *et al.*, 1994; Kramer, *et al.*, 2004). Interessanterweise traten in den niedrigen Dosen, in denen vermindert AGAT exprimiert wurde, noch keine Veränderungen im Serumkreatininspiegel auf. Die Ergebnisse lassen darauf hindeuten, sowohl AGAT im Gewebe, als auch GAA im Urin als empfindliche Biomarker für Nephrotoxizität zu verwenden.

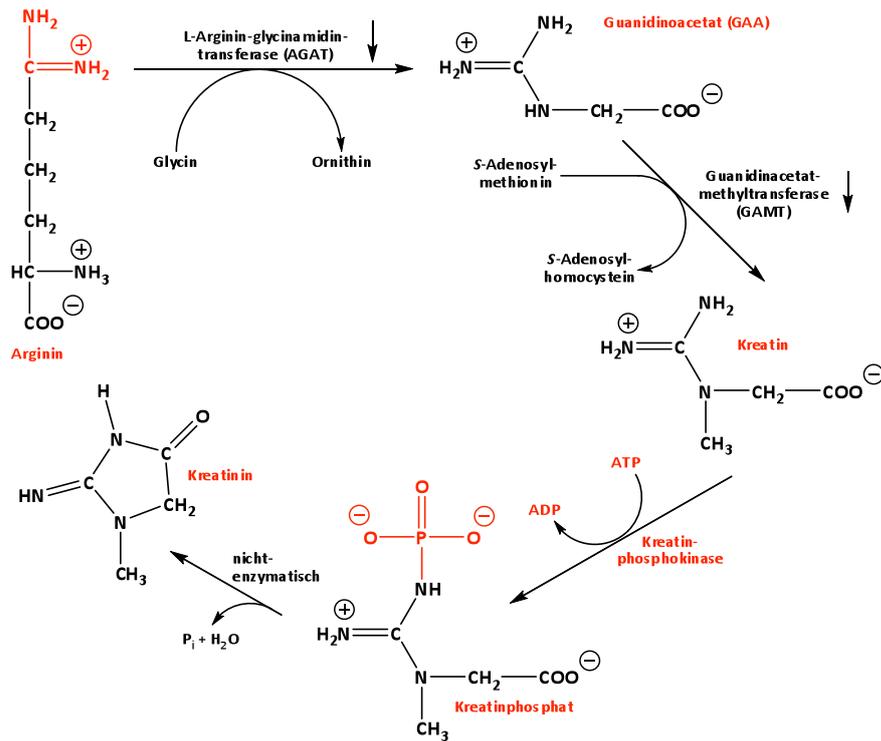


Abb. 6.17 Die Rolle von L-Arginin-Glycinamidintransferase (AGAT) in der Biosynthese von Kreatinin

7 SCHLUSSBETRACHTUNG

Von der Entwicklung eines innovativen Arzneistoffes bis zu dessen Markteinführung ist es ein extrem langwieriger und kostspieliger Prozess und nur wenige Wirkstoffe erreichen die Zulassung. Die Entwicklung vieler Substanzen wird aufgrund unzureichender Wirksamkeit sowie nicht-akzeptablen Nebenwirkungen in der präklinischen und klinischen Phase gestoppt. Dabei ist die Niere eines der häufigsten Ziele Arzneimittel-induzierter Organtoxizität. Jedoch ist die frühzeitige Erkennung toxischer Wirkungen auf die Niere relativ schwierig, da traditionelle Marker für Nierentoxizität, einschließlich BUN und Serumkreatinin, Nierenschäden erst nach erheblicher Beeinträchtigung der Nierenfunktion aufzeigen.

Ziel dieser Arbeit war, anhand von Modellsubstanzen für Nephrotoxizität sowie nephrotoxischen Entwicklungssubstanzen, deren Mechanismus unbekannt ist, Biomarker zu identifizieren, welche empfindlich genug sind, in präklinischen Studien eine frühzeitige Diagnose auf Nierenschädigung zu erstellen. In den letzten Jahren wurden durch verschiedene Konsortien mit Hilfe der „omics“-Technologien eine Reihe von potentiellen Biomarkern für Nierentoxizität identifiziert, von denen erwartet wird, dass sie empfindlicher für die Erkennung von Nierenschäden sein könnten als Histopathologie und traditionelle Parameter der klinischen Chemie (z.B. u.a. BUN und Serumkreatinin).

Generell sollten ideale Biomarker eine hohe Reproduzierbarkeit, Sensitivität und Spezifität besitzen und auch als Indikator für verschiedene Stadien der Erkrankung bzw. Schädigung geeignet sein. Sie sollten mit möglichst wenig analytischem Aufwand und hohem Probendurchsatz sensitiv zu analysieren sein. Ein besonderes Interesse bei dieser Arbeit galt potentiellen Biomarkern im Urin, da diese im Gegensatz zu histopathologischen Untersuchungen keine Entnahme von Gewebe erfordern. Urin ist eine gut zugängliche Körperflüssigkeit, die relativ leicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Durch die Messung der Marker im Urin wäre es möglich, den Verlauf der Proteinexkretion und somit den Verlauf der Schädigung zu verfolgen. Dadurch könnte unter Umständen auch die Anzahl der Tiere in präklinischen Studien reduziert werden.

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Allgemeinen die gesteigerte Expression der analysierten potentiellen Biomarker sehr gut mit den histopathologischen Veränderungen in den Nieren der mit Nephrotoxinen-behandelten Tiere übereinstimmen. Größtenteils

konnte eine Veränderung der Expression noch vor Veränderungen der klinisch-chemischen Parameter beobachtet werden. In allen 3 tierexperimentellen Studien (Aristolochiasäure, Gentamicin, PredTox) war eine gesteigerte Expression von Kim-1 sowohl auf mRNA- und als auch auf Proteinebene der früheste Effekt nach Toxingabe. Korrelierend mit der gesteigerten Expression konnte auch eine vermehrte Abgabe des Proteins in den Urin zu sehr frühen Zeitpunkten beobachtet werden. Da Kim-1 in gesunden Nieren nicht exprimiert wird, jedoch die Expression infolge geringster Nierenschädigung im Nierengewebe drastisch ansteigt, stellt Kim-1 einen sehr empfindlichen und spezifischen Biomarker für Nephrotoxizität dar, der aufgrund der hohen Stabilität des Proteins im Urin nicht-invasiv bestimmt werden kann.

Auch die veränderte Expression und Ausscheidung von Lipocalin-2 konnte zum Teil früher als traditionelle Marker detektiert werden. Im Gegensatz zu Kim-1 traten aber bei Lcn2 erhöhte Konzentrationen nicht nur nach Nierenschädigungen, sondern auch nach Schädigungen anderer Organe auf. Die Ergebnisse der Studien bestätigen Lipocalin-2 zwar als einen sehr sensitiven Marker, jedoch zeigte sie auch, dass erhöhte Konzentrationen nicht zwangsläufig auf Schädigungen der Niere hindeuten.

Ebenso zeigte auch Clusterin in den Studien kontroverse Ergebnisse. Während die vermehrte Exkretion von Clusterin in den Urin nach Gabe der PredTox-Substanzen als eines der frühesten und empfindlichsten Antworten auf tubuläre Schädigung auftrat, stellte es in der Gentamicin-Studie einen weniger empfindlichen Marker dar. Am Beispiel von Lcn2 und Clusterin ist daher ersichtlich, dass die Messung eines einzelnen Biomarkers nicht unweigerlich auf eine bestehende oder sich entwickelnde Nierenschädigung deuten kann. Die mechanistischen Hintergründe, die zur Expressionssteigerung der Proteine führen, sind für einen Großteil der potentiellen Biomarker noch nicht aufgeklärt. Daher ist es sinnvoll, eine Kombination von verschiedenen Biomarkern zu wählen um die Schwankungen der einzelnen Parameter zu minimieren. Die Messung der verschiedenen Biomarker mittels Singleplex-ELISA ist zudem zeitaufwendig und sehr teuer. Durch die Entwicklung von Multiplex-Assays (z.B. WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel, Merck, Darmstadt) ist es möglich, mehrere potentielle Nierentoxizitätsmarker in einer einzelnen Probe zu vermessen, wodurch wiederum an Zeit und auch an Probenmaterial gespart werden kann. Jedoch werden an solche Testsysteme hohe Anforderungen gestellt, zudem liegen auch die Anschaffungskosten der Messgeräte sehr hoch. Jeder einzelne Analyt

sollte mit einer möglichst hohen Spezifität und Sensitivität erfasst werden und nach Möglichkeit nicht mit den anderen im System befindenden Analyten wechselwirken bzw. diese inhibieren. Daher ist eine gründliche Validierung des Systems von hoher Wichtigkeit. Ebenso ist es wichtig, auf eine geeignete Stabilisierung der Proben zu achten, da manche Proteine im Urin zersetzt oder abgebaut werden können.

Damit sich ein potentieller Biomarker als diagnostischer Test durchsetzen kann, muss er biologisch und analytisch validiert und letztlich von den Zulassungsbehörden (FDA, EMA) anerkannt werden. Ein erster Fortschritt in diese Richtung wurde vor kurzem durch das „Predictive Safety Testing Consortium“ (PSTC) erreicht. Anhand der Ergebnisse der tierexperimentellen Studien mit verschiedenen Nephrotoxinen wurden 2008 7 von 23 potentiellen Urinbiomarkern (Albumin, β_2 -Mikroglobulin, Clusterin, Cystatin C, Kim-1, TFF-3 und der Gesamtproteingehalt) zur Identifizierung von Nierenschäden in präklinischen Toxizitätsstudien von der FDA und EMA anerkannt. Somit ist es den pharmazeutischen Firmen erlaubt, zusätzlich zu den Ergebnissen der klinisch-chemischen Chemie und Histopathologie, die Messung dieser 7 Urinbiomarkern für die Untersuchung auf akute Nierentoxizität zu verwenden.

Neben der Verwendung der potentiellen Biomarker für akute Nierenschädigung stellt sich auch die Frage, ob die Anwendung dieser Marker ebenfalls zur Diagnose von chronischen Nierenerkrankungen möglich ist, da diese meist langsam fortschreitende Nierenschädigungen bislang erst sehr spät durch die Veränderung der traditionellen klinisch-chemischen Parameter erkannt werden (Hart und Kinter, 2005). Nach Behandlung männlicher Ratten mit dem nephrotoxischen Mykotoxin Ochratoxin A für 90 Tage konnte bereits nach einer geringfügigen Schädigung des Gewebes eine dramatische Expression der mRNA von Kim-1 sowie eine deutlich erhöhte Ausscheidung von Kim-1 in den Urin beobachtet werden (Rached, *et al.*, 2008). Diese deutet darauf hin, dass Kim-1 auch gut als Marker für chronische Toxizität geeignet ist. Weiterhin konnte eine gesteigerte mRNA-Expression anderer potentieller Marker (Lipocalin-2 und Timp-1) in den Nieren der mit Ochratoxin A-behandelten Ratten festgestellt werden (Rached, *et al.*, 2008). Desweiteren konnte im Urin von Patienten, welche an einer chronischen Nierenerkrankung litten, eine erhöhte Konzentration von Timp-1 detektiert werden (Horstrup, *et al.*, 2002). Somit unterstützen die Ergebnisse aus diesen Studien den Einsatz

der potentiellen Marker neben der Identifizierung akuter Nephrotoxizität auch die Erkennung von chronischer Nierentoxizität.

Ein weiteres wichtiges Anliegen ist es, die Biomarker in *In-vitro*-Testsystemen zu verwenden. Einzelne Zellkulturstudien zeigten bereits gesteigerte mRNA-Expressionen der potentiellen Biomarker nach Behandlung mit bestimmten Nephrotoxinen (Huang *et al.*, 2001; Mishra, *et al.*, 2003; Rached, *et al.*, 2008). Lipocalin-2 wurde dabei auch schon als nützlicher *In-vitro*-Biomarker für die Erkennung von oxidativen Stress bezeichnet (Roudkenar *et al.*, 2007).

Zu diesem Zweck wurde im Jahr 2008 das von der EU-koordinierte Projekt Predict-IV gegründet (www.predict-iv.toxi.uni-wuerzburg.de), dessen Ziel die Etablierung von *In-vitro*-Testsystemen zur Erkennung von Nieren-, Leber und Neurotoxizität ist. Ähnlich wie im InnoMed-PredTox-Projekt werden ausgewählte Zellkultursysteme mit Modellschubstanzen der jeweiligen Organtoxizität sowie Entwicklungsschubstanzen behandelt und die veränderte Expression der potentiellen Biomarker gemessen. Durch dieses Projekt erhofft man sich durch geeignete *In-vitro*-Testsysteme die Zahl der Tiere in der präklinischen Forschung zu verringern bzw. einige Tierstudien komplett durch Alternativmethoden zu ersetzen.

Ein weiteres wichtiges Anliegen der Biomarkerentwicklung ist es, die potentiellen Marker in der Klinik zur schnellen Diagnose von Nierenerkrankungen beim Patienten einzusetzen. Eine frühe Diagnose einer akuten Nierenschädigung kann helfen, ein drohendes Nierenversagen rechtzeitig zu erkennen und somit hinsichtlich der Behandlung eine schnelle Entscheidung zu treffen. Publierte Studien belegen, dass einige der potentiellen Biomarker nach Schädigung der Nieren vermehrt in den Urin von Patienten abgegeben werden (Han *et al.*, 2008; Vaidya, *et al.*, 2008). Lipocalin-2-Konzentrationen oberhalb des für den Patienten typischen Basalspiegels (0,7-9,6 ng/ml) traten im Urin von Kindern mit akuter Nierenschädigung nach Herzoperationen früher auf, als erhöhte Serumkreatininspiegel (Mishra, *et al.*, 2005). Mit einem AUC-Wert von > 0,99 erwies sich Lcn2 in dieser Studie als äußerst empfindlicher Biomarker für akute Nierenschädigung (Mishra, *et al.*, 2005). Auch bei erwachsenen Patienten konnten Anstiege von Lcn2 im Urin schon sehr früh und sensitiv detektiert werden (Nickolas, *et al.*, 2008). Seit kurzem stehen mehrere Assays zur Messung von Lcn2 im Urin zur Verfügung und werden zum Teil als Diagnose akuter Nierenschädigung eingesetzt. Da aber die Durchführung eines ELISAs

eine Zeit von 2-4 h in Anspruch nimmt und auch die Anschaffung der jeweiligen Testgeräte sehr teuer ist, wurde kürzlich der RenaStick® zur routinemässigen Messung von Kim-1 im Urin von Ratten und Patienten entwickelt (Vaidya *et al.*, 2009). Durch die Anwendung dieses Teststreifen ist es möglich, eine Erhöhung von Kim-1 infolge einer Nierenschädigung innerhalb weniger Minuten zu messen. In den Kontrollurinen von Ratten zeigte sich keine Bande für Kim-1, jedoch nahm die Intensität der Kim-1-Bande mit steigender Nierenschädigung zu (Vaidya, *et al.*, 2009). Somit ist die Anwendung eines solchen Teststreifens eine schnelle und kostengünstige Methode zur Überprüfung der Nierenfunktion in der Routinediagnostik, welche auch kein invasives Eingreifen erfordert und auch von nicht-laborgeschultem Personal durchgeführt werden kann.

Es ist denkbar, dass in näherer Zukunft noch weitere solcher Teststreifen für andere Biomarker entwickelt und validiert werden. Ebenso ist auch die Entwicklung von kombinierten Schnelltests vorstellbar, welche beispielsweise in der forensischen Drogenanalytik verwendet werden.

Durch den Einsatz der potentiellen Biomarker mittels dieser Testsysteme ist es möglich, mit einem geringeren Zeit- und Kostenaufwand die Vorhersage von Fremdstoff-induzierten Nephrotoxizität in präklinischen Studien zu verbessern und damit die Anzahl von neuzugelassenen von Arzneimitteln entscheidend zu erhöhen.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Der Prozess von der Entdeckung und Entwicklung eines potentiellen Arzneistoffs bis zu dessen Zulassung ist extrem kosten- und zeitintensiv und eine Vielzahl dieser Stoffe kann aufgrund toxischer Nebenwirkungen in präklinischen Studien nicht weiterentwickelt werden. Dabei ist die Niere eines der Hauptziele von Xenobiotika-induzierter Organtoxizität, jedoch ist eine frühe Detektion von Nierenschäden schwierig. Den derzeitigen verwendeten klinischen Parameter, wie Blutharnstoff (BUN) und Serumkreatinin fehlt es an Sensitivität und Spezifität, da sie Fremdstoff-induzierte Toxizität meist erst aufzeigen, wenn schon ein erheblicher Teil der Nierenfunktion beeinträchtigt ist.

Daher ist es notwendig, empfindlichere und zuverlässigere Biomarker zu identifizieren und zu validieren, welche kleinste Nierenschädigungen früher als traditionelle Parameter erkennen. In den letzten Jahren wurden in der Literatur aber auch von verschiedenen Projekten eine Reihe neuer gen-basierender und Urinbiomarker (Kim-1, Clusterin, Lipocalin-2, Timp-1) identifiziert.

Ziel dieser Dissertation war es die Aussagekraft dieser Marker im Vergleich zu traditionellen Endpunkten, einschließlich klinische Chemie und Histopathologie an Gewebe-, Urin- und Serumproben von männlichen Ratten, welche mit Modellsubstanzen für Nephrotoxizität (Aristolochiasäure und Gentamicin) oder nephrotoxischen Arzneistoffkandidaten (PredTox Projekt) behandelt wurden, mittels qRT-PCR, Immunhistochemie und ELISA zu untersuchen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Effekte auf Ebene der Gen- und Proteinexpression generell sehr gut mit den histopathologischen Veränderungen korrelieren. Sie konnten meist früher oder in niedrigeren Dosierungen als die traditionellen Nierenmarker BUN und Serumkreatinin detektiert werden. Eine erhöhte Expression und Exkretion von Kim-1 zeigte sich in allen Studien als eine der frühesten Antworten auf Schädigung der proximalen Tubuli und stellt somit den empfindlichsten Biomarker dar. Die erhöhte Ausscheidung von Clusterin konnte teilweise vor einer veränderten Gen- und Proteinexpression im Gewebe detektiert werden und unterstützen die Verwendung von Clusterin als nicht-invasiven Biomarker. Obwohl eine gesteigerte Exkretion von Lipocalin-2 sehr früh nach Schädigung des proximalen Tubulus detektiert werden konnte, ist diese nicht spezifisch für einen Nierenschaden. Dennoch könnte die vermehrte Expression/Ausscheidung von Lipocalin-2 als frühe Antwort auf eine

Entzündung oder einen Gewebeschaden eine sinnvolle Ergänzung der routinemäßigen Testung auf Toxizität darstellen. Ebenfalls konnte ein dosis- und zeitabhängiger Konzentrationsanstieg von einem Großteil der potentiellen Biomarker des „WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panels 1 and 2“ im Urin beobachtet werden. Da jedoch die potentiellen Biomarker unterschiedliche Empfindlichkeiten besitzen und unter Umständen auch vom Mechanismus der Toxizität von Verbindungen abhängen, erscheint eine Kombination von verschiedenen Biomarkern zur frühzeitigen Erkennung von proximalen Nierenschäden sowie zur Verlaufskontrolle von Nierenerkrankungen sinnvoll. Durch die einfache Probenahme und leichte Bestimmung ist die Messung der neuen potentiellen Nierenbiomarker im Urin neben der Bestimmung der traditionellen Parameter der klinischen Chemie sowie der Histopathologie sinnvoll für die Identifizierung von Nierenschädigungen in präklinischen Studien.

9 SUMMARY

The discovery and development of new drugs is very costly and time-consuming and the rate of drug failure due to late-breaking findings in preclinical toxicity studies is high. The kidney is a major target of xenobiotic induced organ toxicity but early detection of renal damage or minor effects on renal function is challenging due to the functional reserve of the kidney. Current clinical pathology parameters of nephrotoxicity such as blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine are relatively insensitive and non specific, revealing kidney damage not until 70-80 % of the renal epithelial mass has been lost.

There is a clear need for the identification and validation of more sensitive and reliable biomarkers, which are indicators of minimal kidney damage rather than impaired kidney function. Recently a range of novel gene-based and urinary kidney biomarker (Kim-1, clusterin, lipocalin-2 and Timp-1) was identified from literature and various collaborative projects. The aim of this work was to investigate the performance of these markers compared to traditional endpoints, such as clinical chemistry and histopathology in tissue, urine and serum samples collected from studies, in which male Wistar rats were treated either with model compounds of nephrotoxicity (aristolochic acid and gentamicin) or drug candidates (PredTox) using qRT-PCR, immunohistochemistry and ELISA.

In summary, effects on marker gene and protein expression generally correlated well with the renal histopathology alterations and were frequently detected at earlier time-points or lower doses than the traditional clinical parameters BUN and serum creatinine. Overexpression and enhanced urinary excretion of Kim-1 was one of the earliest responses to proximal tubule damage and might be seen as the most sensitive marker of nephrotoxicity. Furthermore, urinary Clusterin was increased before changes in gene and protein expression or even histopathological alterations were evident, confirming urinary clusterin as a sensitive, non-invasive marker for renal injury. Although changes in urinary lipocalin-2 occurred very early after proximal tubule damage, lipocalin-2 may not specific for kidney injury. However, its rapid response to inflammation and tissue damage in general may reinforce its use in routine toxicity testing. A dose- and time-dependent increase in most of the novel urinary biomarkers was evident using the "WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panels 1 and 2". Due to the the variable sensitivity of a single biomarker, a combination of many different biomarkers to detect kidney injury appears to be useful. Concerning of the easy sampling and measurement, the additional determination of

potential urinary biomarkers of nephrotoxicity next to the traditional clinical chemistry parameters and histopathological changes is helpful to identify kidney damage at early time-points.

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

β_2 M	Beta-2-Mikroglobulin
2D-DIGE	<i>2-dimensional differential gel electrophoresis</i>
AA	Aristolochiasäure
AGAT	L-Glycin-Amidino-transferase
ALP	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammoniumpersulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i>
cDNA	complementary DNA
Clu	Clusterin
C-Path	<i>Critical Path Institute</i>
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>American Food and Drug Administration</i>
GAA	Guanidinoacetat
GFT	glomeruläre Filtrationsrate
GGT	γ -Glutamyltransferase
Gpx-1	Glutathionperoxidase-1
GST	Glutathion-S-Transferase
HESI	<i>Health and Environmental Sciences Institute</i>
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
ILSI	<i>International Life Sciences Institute</i>
InnoMed	<i>Innovative Medicines</i>

KG	Körpergewicht
Kim-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
Lcn2	Lipocalin-2
LDH	Lactatdehydrogenase
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
β-NAG	Beta-N-Acetyl-Glucosaminidase
NGAL	<i>neutrophil gelatinase associated lipocalin</i>
OPN	Osteopontin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaktion</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PCT	<i>proximal convoluted tubule</i>
PEPCK-1	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-1
PRBP-4	<i>Plasma Retinol Binding Protein-4</i>
PredTox	<i>Predictive Toxicology</i>
PST	<i>proximal straight tubule</i>
Pxr-1	Peroxiredoxin-1
qRT-PCR	quantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
RPA-1	<i>Renal Papillary Antigen-1</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SDS-Page	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TBST	TBS mit Tween 20
TFF-3	<i>Trefoil Facto- 3</i>
Timp-1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TRIS	tris-Hydroxymethylaminoethan
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vim	Vimentin

11 LITERATURVERZEICHNIS

Adler, M., Hoffmann, D., Ellinger, H., Hewitt, P., Matheis, K., Mulrane, L., Gallagher, W. M., Suter-Dick, L., Fountoulakis, M. M., Dekant, W. und Mally, A. (2010). Assessment of candidate biomarkers of drug induced liver injury in preclinical toxicity studies. *in Vorbereitung*.

Agarwal, A. und Nick, H. S. (2000). Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J Am Soc Nephrol* **11**, 965-73.

Ahmed, A. K., Haylor, J. L., El Nahas, A. M. und Johnson, T. S. (2007). Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental progressive kidney scarring. *Kidney Int* **71**, 755-63.

Akobeng, A. K. (2007). Understanding diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic curves. *Acta Paediatr* **96**, 644-7.

Aktories, K., Föstermann, U., Hofmann, F. B. und K., S. (2009). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer, München.

Amin, R. P., Vickers, A. E., Sistare, F., Thompson, K. L., Roman, R. J., Lawton, M., Kramer, J., Hamadeh, H. K., Collins, J., Grissom, S., Bennett, L., Tucker, C. J., Wild, S., Kind, C., Oreffo, V., Davis, J. W., 2nd, Curtiss, S., Naciff, J. M., Cunningham, M., Tennant, R., Stevens, J., Car, B., Bertram, T. A. und Afshari, C. A. (2004). Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* **112**, 465-79.

Appel, G. B. (1990). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Am J Med* **88**, 16S-20S; discussion 38S-42S.

Arlt, V. M., Pfohl-Leszkowicz, A., Cosyns, J. und Schmeiser, H. H. (2001). Analyses of DNA adducts formed by ochratoxin A and aristolochic acid in patients with Chinese herbs nephropathy. *Mutat Res* **494**, 143-50.

Arlt, V. M., Stiborova, M. und Schmeiser, H. H. (2002). Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis* **17**, 265-77.

Arlt, V. M., Stiborova, M., vom Brocke, J., Simoes, M. L., Lord, G. M., Nortier, J. L., Hollstein, M., Phillips, D. H. und Schmeiser, H. H. (2007). Aristolochic acid mutagenesis: molecular clues to the aetiology of Balkan endemic nephropathy-associated urothelial cancer. *Carcinogenesis* **28**, 2253-61.

Aulitzky, W. K., Schlegel, P. N., Wu, D. F., Cheng, C. Y., Chen, C. L., Li, P. S., Goldstein, M., Reidenberg, M. und Bardin, C. W. (1992). Measurement of urinary clusterin as an index of nephrotoxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* **199**, 93-6.

Bailly, V., Zhang, Z., Meier, W., Cate, R., Sanicola, M. und Bonventre, J. V. (2002). Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* **277**, 39739-48.

Bedard, E. L., Jiang, J., Parry, N., Wang, H., Liu, W., Garcia, B., Kim, P., Chakrabarti, S., Buelow, R. und Zhong, R. (2005). Peritransplant treatment with cobalt protoporphyrin attenuates chronic renal allograft rejection. *Transpl Int* **18**, 341-9.

Bennett, M., Dent, C. L., Ma, Q., Dastrala, S., Grenier, F., Workman, R., Syed, H., Ali, S., Barasch, J. und Devarajan, P. (2008). Urine NGAL predicts severity of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective study. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**, 665-73.

Biomarkers Definitions Working, G. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* **69**, 89-95.

Blaschuk, O., Burdzy, K. und Fritz, I. B. (1983). Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* **258**, 7714-20.

Bolbrinker, J., Markovic, S., Wehland, M., Melenhorst, W. B., van Goor, H. und Kreutz, R. (2006). Expression and response to angiotensin-converting enzyme inhibition of matrix metalloproteinases 2 and 9 in renal glomerular damage in young transgenic rats with renin-dependent hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 8-16.

Boobis, A., Gundert-Remy, U., Kremers, P., Macheras, P. und Pelkonen, O. (2002). In silico prediction of ADME and pharmacokinetics. Report of an expert meeting organised by COST B15. *Eur J Pharm Sci* **17**, 183-93.

Branten, A. J., Mulder, T. P., Peters, W. H., Assmann, K. J. und Wetzels, J. F. (2000). Urinary excretion of glutathione S transferases alpha and pi in patients with proteinuria: reflection of the site of tubular injury. *Nephron* **85**, 120-6.

Brew, K., Dinakarandian, D. und Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 267-83.

Brown, L. F., Berse, B., Van de Water, L., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C. A., Manseau, E. J., Dvorak, H. F. und Senger, D. R. (1992). Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* **3**, 1169-80.

Bruning, T., Thier, R., Mann, H., Melzer, H., Brode, P., Dallner, G. und Bolt, H. M. (2001). Pathological excretion patterns of urinary proteins in miners highly exposed to dinitrotoluene. *J Occup Environ Med* **43**, 610-5.

Bu, D. X., Hemdahl, A. L., Gabrielsen, A., Fuxe, J., Zhu, C., Eriksson, P. und Yan, Z. Q. (2006). Induction of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in vascular injury via activation of nuclear factor-kappaB. *Am J Pathol* **169**, 2245-53.

Cai, G., Zhang, X., Hong, Q., Shao, F., Shang, X., Fu, B., Feng, Z., Lin, H., Wang, J., Shi, S., Yin, Z. und Chen, X. (2008). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 exacerbated renal interstitial fibrosis through enhancing inflammation. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 1861-75.

Chen, T., Guo, L., Zhang, L., Shi, L., Fang, H., Sun, Y., Fuscoe, J. C. und Mei, N. (2006). Gene Expression Profiles Distinguish the Carcinogenic Effects of Aristolochic Acid in Target (Kidney) and Non-target (Liver) Tissues in Rats. *BMC Bioinformatics* **7 Suppl 2**, S20.

Christensen, B., Petersen, T. E. und Sorensen, E. S. (2008). Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. *Biochem J* **411**, 53-61.

Christensson, A., Ekberg, J., Grubb, A., Ekberg, H., Lindstrom, V. und Lilja, H. (2003). Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation. *Nephron Physiol* **94**, p19-27.

Colle, A., Tavera, C., Laurent, P., Leung-Tack, J. und Girolami, J. P. (1990). Direct radioimmunoassay of rat cystatin C: increased urinary excretion of this cysteine proteases inhibitor during chromate nephropathy. *J Immunoassay* **11**, 199-214.

Conti, M., Moutereau, S., Zater, M., Lallali, K., Durrbach, A., Manivet, P., Eschwege, P. und Loric, S. (2006). Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin Chem Lab Med* **44**, 288-91.

Correa-Rotter, R., Ibarra-Rubio, M. E., Schwochau, G., Cruz, C., Silkensen, J. R., Pedraza-Chaverri, J., Chmielewski, D. und Rosenberg, M. E. (1998). Induction of clusterin in tubules of nephrotic rats. *J Am Soc Nephrol* **9**, 33-7.

Cowland, J. B., Muta, T. und Borregaard, N. (2006). IL-1beta-specific up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin is controlled by IkappaB-zeta. *J Immunol* **176**, 5559-66.

Debelle, F. D., Nortier, J. L., De Prez, E. G., Garbar, C. H., Vienne, A. R., Salmon, I. J., Deschodt-Lanckman, M. M. und Vanherweghem, J. L. (2002). Aristolochic acids induce chronic renal failure with interstitial fibrosis in salt-depleted rats. *J Am Soc Nephrol* **13**, 431-6.

Debelle, F. D., Vanherweghem, J. L. und Nortier, J. L. (2008). Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem. *Kidney Int* **74**, 158-69.

Depierreux, M., Van Damme, B., Vanden Houde, K. und Vanherweghem, J. L. (1994). Pathologic aspects of a newly described nephropathy related to the prolonged use of Chinese herbs. *Am J Kidney Dis* **24**, 172-80.

Depreter, M., Vandesompele, J., Espeel, M., Speleman, F. und Roels, F. (2002). Modulation of the peroxisomal gene expression pattern by dehydroepiandrosterone and vitamin D: therapeutic implications. *J Endocrinol* **175**, 779-92.

DiMasi, J. A., Hansen, R. W. und Grabowski, H. G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* **22**, 151-85.

Ding, H., He, Y., Li, K., Yang, J., Li, X., Lu, R. und Gao, W. (2007). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol* **123**, 227-34.

Eddy, A. A. (1996). Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Kidney Int* **50**, 1139-49.

Eti, S., Cheng, C. Y., Marshall, A. und Reidenberg, M. M. (1993). Urinary clusterin in chronic nephrotoxicity in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **202**, 487-90.

Fernando, R. C., Schmeiser, H. H., Scherf, H. R. und Wiessler, M. (1993). Formation and persistence of specific purine DNA adducts by ³²P-postlabelling in target and non-target organs of rats treated with aristolochic acid I. *IARC Sci Publ*, 167-71.

Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., Akira, S. und Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**, 917-21.

Flower, D. R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* **318** (Pt 1), 1-14.

Flower, D. R., North, A. C. und Sansom, C. E. (2000). The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 9-24.

Franke, W. W., Schmid, E., Winter, S., Osborn, M. und Weber, K. (1979). Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res* **123**, 25-46.

French, L. E., Wohlwend, A., Sappino, A. P., Tschopp, J. und Schifferli, J. A. (1994). Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J Clin Invest* **93**, 877-84.

Gatanaga, H., Tachikawa, N., Kikuchi, Y., Teruya, K., Genka, I., Honda, M., Tanuma, J., Yazaki, H., Ueda, A., Kimura, S. und Oka, S. (2006). Urinary beta2-microglobulin as a possible sensitive marker for renal injury caused by tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS Res Hum Retroviruses* **22**, 744-8.

Girton, R. A., Sundin, D. P. und Rosenberg, M. E. (2002). Clusterin protects renal tubular epithelial cells from gentamicin-mediated cytotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F703-9.

Giuliano, R. A., Paulus, G. J., Verpooten, G. A., Pattyn, V. M., Pollet, D. E., Nouwen, E. J., Laurent, G., Carlier, M. B., Maldague, P., Tulkens, P. M. und et al. (1984). Recovery of cortical phospholipidosis and necrosis after acute gentamicin loading in rats. *Kidney Int* **26**, 838-47.

Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N. und Strong, R. K. (2002). The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**, 1033-43.

Gold, L. S. und Slone, T. H. (2003). Aristolochic acid, an herbal carcinogen, sold on the Web after FDA alert. *N Engl J Med* **349**, 1576-7.

- Greco, D. S., Turnwald, G. H., Adams, R., Gossett, K. A., Kearney, M. und Casey, H. (1985). Urinary gamma-glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Am J Vet Res* **46**, 2332-5.
- Grollman, A. P., Shibutani, S., Moriya, M., Miller, F., Wu, L., Moll, U., Suzuki, N., Fernandes, A., Rosenquist, T., Medverec, Z., Jakovina, K., Brdar, B., Slade, N., Turesky, R. J., Goodenough, A. K., Rieger, R., Vukelic, M. und Jelakovic, B. (2007). Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12129-34.
- Grone, H. J., Weber, K., Grone, E., Helmchen, U. und Osborn, M. (1987). Coexpression of keratin and vimentin in damaged and regenerating tubular epithelia of the kidney. *Am J Pathol* **129**, 1-8.
- Guthmiller, P., Van Pilsum, J. F., Boen, J. R. und McGuire, D. M. (1994). Cloning and sequencing of rat kidney L-arginine:glycine amidinotransferase. Studies on the mechanism of regulation by growth hormone and creatine. *J Biol Chem* **269**, 17556-60.
- Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. und Bonventre, J. V. (2002). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* **62**, 237-44.
- Han, W. K., Wagener, G., Zhu, Y., Wang, S. und Lee, H. T. (2009). Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 873-82.
- Han, W. K., Waikar, S. S., Johnson, A., Betensky, R. A., Dent, C. L., Devarajan, P. und Bonventre, J. V. (2008). Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* **73**, 863-9.
- Hara, I., Miyake, H., Gleave, M. E. und Kamidono, S. (2001). Introduction of clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their resistance to cytotoxic chemotherapy through inhibition of apoptosis both in vitro and in vivo. *Jpn J Cancer Res* **92**, 1220-4.
- Hart, S. E. und Kinter, L. B. (2005). Assessing renal effects of toxicants in vivo. In *Toxicology of the kidney* (J. B. Tarloff und L. H. Lash, Hrsg.). CRC Press, Boca Raton
- Hasegawa, S., Kato, K., Takashi, M., Zhu, Y., Obata, K., Kinukawa, T. und Miyake, K. (1993). Increased levels of calbindin-D in serum and urine from patients treated by extracorporeal shock wave lithotripsy. *J Urol* **149**, 1414-8.
- Hewitt, S. M., Dear, J. und Star, R. A. (2004). Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1677-89.
- Hidaka, S., Kranzlin, B., Gretz, N. und Witzgall, R. (2002). Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. *Cell Tissue Res* **310**, 289-96.

- Hodgson, J. (2001). ADMET--turning chemicals into drugs. *Nat Biotechnol* **19**, 722-6.
- Hoffmann, P. R., deCathelineau, A. M., Ogden, C. A., Leverrier, Y., Bratton, D. L., Daleke, D. L., Ridley, A. J., Fadok, V. A. und Henson, P. M. (2001). Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol* **155**, 649-59.
- Hofstra, J. M., Deegens, J. K., Willems, H. L. und Wetzels, J. F. (2008). Beta-2-microglobulin is superior to N-acetyl-beta-glucosaminidase in predicting prognosis in idiopathic membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 2546-51.
- Horstrup, J. H., Gehrman, M., Schneider, B., Ploger, A., Froese, P., Schirop, T., Kampf, D., Frei, U., Neumann, R. und Eckardt, K. U. (2002). Elevation of serum and urine levels of TIMP-1 and tenascin in patients with renal disease. *Nephrol Dial Transplant* **17**, 1005-13.
- Houghton, D. C., Hartnett, M., Campbell-Boswell, M., Porter, G. und Bennett, W. (1976). A light and electron microscopic analysis of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Am J Pathol* **82**, 589-612.
- Hraba-Rnevey, S., Turler, H., Kress, M., Salomon, C., . und Weil, R. (1989). SV40-induced expression of mouse gene 24p3 involves a post-transcriptional mechanism. *Oncogene* **4**, 601-608.
- uthor, Ed.^ Eds.).
- Huang, Q., Dunn, R. T., 2nd, Jayadev, S., DiSorbo, O., Pack, F. D., Farr, S. B., Stoll, R. E. und Blanchard, K. T. (2001). Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci* **63**, 196-207.
- Hudkins, K. L., Giachelli, C. M., Cui, Y., Couser, W. G., Johnson, R. J. und Alpers, C. E. (1999). Osteopontin expression in fetal and mature human kidney. *J Am Soc Nephrol* **10**, 444-57.
- Humes, H. D. (1988). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Kidney Int* **33**, 900-11.
- Ichimura, T., Asseldonk, E. J., Humphreys, B. D., Gunaratnam, L., Duffield, J. S. und Bonventre, J. V. (2008). Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* **118**, 1657-68.
- Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L. und Sanicola, M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* **273**, 4135-42.
- Ichimura, T., Hung, C. C., Yang, S. A., Stevens, J. L. und Bonventre, J. V. (2004). Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F552-63.
- Ichimura, T. und Mou, S. (2008). Kidney injury molecule-1 in acute kidney injury and renal repair: a review. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* **6**, 533-8.

Iguchi, S., Nishi, S., Ikegame, M., Hoshi, K., Yoshizawa, T., Kawashima, H., Arakawa, M., Ozawa, H. und Gejyo, F. (2004). Expression of osteopontin in cisplatin-induced tubular injury. *Nephron Exp Nephrol* **97**, e96-105.

Johnson, T. S., Haylor, J. L., Thomas, G. L., Fisher, M. und El Nahas, A. M. (2002). Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring. *Exp Nephrol* **10**, 182-95.

Jones, S. E. und Jomary, C. (2002). Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 427-31.

Kaplan, G., Totsuka, A., Thompson, P., Akatsuka, T., Moritsugu, Y. und Feinstone, S. M. (1996). Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J* **15**, 4282-96.

Khan, K. N. M. und Alden, C. L. (2002). Kidney. In Handbook of Toxicologic Pathology, 2nd Edition (W.M. Haschek, C.G. Rousscanx und M.A. Wallig, Hrsg.). Academic Press.

Khan, S. R., Johnson, J. M., Peck, A. B., Cornelius, J. G. und Glenton, P. A. (2002). Expression of osteopontin in rat kidneys: induction during ethylene glycol induced calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* **168**, 1173-81.

Kiyatake, I., Nakamura, T. und Koide, H. (2004). Urinary guanidinoacetic acid excretion as an indicator of gentamicin nephrotoxicity in rats. *Ren Fail* **26**, 339-44.

Kjeldsen, L., Cowland, J. B. und Borregaard, N. (2000). Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 272-83.

Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengelov, H. und Borregaard, N. (1993). Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* **268**, 10425-32.

Kleinman, J. G., Beshensky, A., Worcester, E. M. und Brown, D. (1995). Expression of osteopontin, a urinary inhibitor of stone mineral crystal growth, in rat kidney. *Kidney Int* **47**, 1585-96.

Kola, I. und Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* **3**, 711-5.

Kramer, J. A., Pettit, S. D., Amin, R. P., Bertram, T. A., Car, B., Cunningham, M., Curtiss, S. W., Davis, J. W., Kind, C., Lawton, M., Naciff, J. M., Oreffo, V., Roman, R. J., Sistare, F. D., Stevens, J., Thompson, K., Vickers, A. E., Wild, S. und Afshari, C. A. (2004). Overview on the application of transcription profiling using selected nephrotoxicants for toxicology assessment. *Environ Health Perspect* **112**, 460-4.

Kramer, J. A., Sagartz, J. E. und Morris, D. L. (2007). The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 636-49.

Kuchroo, V. K., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H. und Freeman, G. J. (2003). The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 454-62.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

Lakins, J., Bennett, S. A., Chen, J. H., Arnold, J. M., Morrissey, C., Wong, P., O'Sullivan, J. und Tenniswood, M. (1998). Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate. *J Biol Chem* **273**, 27887-95.

Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. und Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**, 187-98.

Laurent, G., Kishore, B. K. und Tulkens, P. M. (1990). Aminoglycoside-induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. *Biochem Pharmacol* **40**, 2383-92.

Lebeau, C., Debelle, F. D., Arlt, V. M., Pozdzik, A., De Prez, E. G., Phillips, D. H., Deschodt-Lanckman, M. M., Vanherweghem, J. L. und Nortier, J. L. (2005). Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies. *Nephrol Dial Transplant* **20**, 2321-32.

Lenz, E. M., Bright, J., Knight, R., Westwood, F. R., Davies, D., Major, H. und Wilson, I. D. (2005). Metabonomics with ¹H-NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry applied to the investigation of metabolic changes caused by gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. *Biomarkers* **10**, 173-87.

Liangos, O., Perianayagam, M. C., Vaidya, V. S., Han, W. K., Wald, R., Tighiouart, H., MacKinnon, R. W., Li, L., Balakrishnan, V. S., Pereira, B. J., Bonventre, J. V. und Jaber, B. L. (2007). Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **18**, 904-12.

Liangos, O., Tighiouart, H., Perianayagam, M. C., Kolyada, A., Han, W. K., Wald, R., Bonventre, J. V. und Jaber, B. L. (2009). Comparative analysis of urinary biomarkers for early detection of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass. *Biomarkers*.

Lim, B. J., Kim, P. K., Hong, S. W. und Jeong, H. J. (2004). Osteopontin expression and microvascular injury in cyclosporine nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol* **19**, 288-94.

Liu, B. C., Zhang, L., Lv, L. L., Wang, Y. L., Liu, D. G. und Zhang, X. L. (2006). Application of antibody array technology in the analysis of urinary cytokine profiles in patients with chronic kidney disease. *Am J Nephrol* **26**, 483-90.

Lord, G. M., Hollstein, M., Arlt, V. M., Roufosse, C., Pusey, C. D., Cook, T. und Schmeiser, H. H. (2004). DNA adducts and p53 mutations in a patient with aristolochic acid-associated nephropathy. *Am J Kidney Dis* **43**, e11-7.

Lorenzen, J., Shah, R., Biser, A., Staicu, S. A., Niranjana, T., Garcia, A. M., Gruenwald, A., Thomas, D. B., Shatat, I. F., Supe, K., Woroniecki, R. P. und Susztak, K. (2008). The role of osteopontin in the development of albuminuria. *J Am Soc Nephrol* **19**, 884-90.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Luhe, A., Hildebrand, H., Bach, U., Dingermann, T. und Ahr, H. J. (2003). A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicol Sci* **73**, 315-28.
- Malyszko, J., Bachorzewska-Gajewska, H., Sitniewska, E., Malyszko, J. S., Poniatowski, B. und Dobrzycki, S. (2008). Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in non-diabetic patients with stage 2-4 chronic kidney disease. *Ren Fail* **30**, 625-8.
- Marquardt, H. und Schäfer, S. (2004). Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Martinez-Salgado, C., Lopez-Hernandez, F. J. und Lopez-Novoa, J. M. (2007). Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. *Toxicol Appl Pharmacol* **223**, 86-98.
- Mazzali, M., Kipari, T., Ophascharoensuk, V., Wesson, J. A., Johnson, R. und Hughes, J. (2002). Osteopontin--a molecule for all seasons. *QJM* **95**, 3-13.
- Mengs, U. (1983). On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid. *Arch Toxicol* **52**, 209-20.
- Mengs, U. (1988). Tumour induction in mice following exposure to aristolochic acid. *Arch Toxicol* **61**, 504-5.
- Mengs, U., Lang, W. und Poch, J. A. (1982). The carcinogenic action of aristolochic acid in rats. *Arch. Toxicol.* **51**, 107-119.
- Mengs, U. und Stotzem, C. D. (1992). Toxicity of aristolochic acid - a subacute study in male rats. *Med. Sci. Res.* **20 (6)**, 223-224.
- Meyers, J. H., Chakravarti, S., Schlesinger, D., Illes, Z., Waldner, H., Umetsu, S. E., Kenny, J., Zheng, X. X., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H., Strom, T. B. und Kuchroo, V. K. (2005). TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nat Immunol* **6**, 455-64.
- Min, W., Shiraga, H., Chalko, C., Goldfarb, S., Krishna, G. G. und Hoyer, J. R. (1998). Quantitative studies of human urinary excretion of uropontin. *Kidney Int* **53**, 189-93.
- Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M. M., Ma, Q., Kelly, C., Ruff, S. M., Zahedi, K., Shao, M., Bean, J., Mori, K., Barasch, J. und Devarajan, P. (2005). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* **365**, 1231-8.
- Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsnefes, M., Zahedi, K., Yang, J., Barasch, J. und Devarajan, P. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* **14**, 2534-43.

Mishra, J., Mori, K., Ma, Q., Kelly, C., Barasch, J. und Devarajan, P. (2004). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* **24**, 307-15.

Miyata, T., Jadoul, M., Kurokawa, K. und Van Ypersele de Strihou, C. (1998). Beta-2 microglobulin in renal disease. *J Am Soc Nephrol* **9**, 1723-35.

Mori, K., Lee, H. T., Rapoport, D., Drexler, I. R., Foster, K., Yang, J., Schmidt-Ott, K. M., Chen, X., Li, J. Y., Weiss, S., Mishra, J., Cheema, F. H., Markowitz, G., Suganami, T., Sawai, K., Mukoyama, M., Kunis, C., D'Agati, V., Devarajan, P. und Barasch, J. (2005). Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* **115**, 610-21.

Mori, K. und Nakao, K. (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* **71**, 967-70.

Moser, H. D. u. H. (1934). Die Osterluzei als Wundheilmittel. , *Münchenener medizinische Wochenschrift* **81**, S. 473f.

Mulrane, L., Rexhepaj, E., Smart, V., Callanan, J. J., Orhan, D., Eldem, T., Mally, A., Schroeder, S., Meyer, K., Wendt, M., O'Shea, D. und Gallagher, W. M. (2008). Creation of a digital slide and tissue microarray resource from a multi-institutional predictive toxicology study in the rat: an initial report from the PredTox group. *Exp Toxicol Pathol* **60**, 235-45.

Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P. und Schäfer-Korting, M. (2008). Mutschler Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Nickolas, T. L., O'Rourke, M. J., Yang, J., Sise, M. E., Canetta, P. A., Barasch, N., Buchen, C., Khan, F., Mori, K., Giglio, J., Devarajan, P. und Barasch, J. (2008). Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Ann Intern Med* **148**, 810-9.

Nijboer, W. N., Schuur, T. A., Damman, J., van Goor, H., Vaidya, V. S., van der Heide, J. J., Leuvenink, H. G., Bonventre, J. V. und Ploeg, R. J. (2009). Kidney Injury Molecule-1 is an Early Noninvasive Indicator for Donor Brain Death-Induced Injury Prior to Kidney Transplantation. *Am J Transplant*.

Norpoth, K. und Deppe, H. D. (1965). [Effect of 3,4-methylene-dioxy-8-methoxy-10-nitrophenanthrene-carbonic acid-1 (aristolochic acid) and of omnadin on mycobacteria in vivo]. *Z Hyg Infektionskr* **151**, 55-63.

Nortier, J. L., Deschodt-Lanckman, M. M., Simon, S., Thielemans, N. O., de Prez, E. G., Depierreux, M. F., Tielemans, C. L., Richard, C., Lauwerys, R. R., Bernard, A. M. und Vanherweghem, J. L. (1997). Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney Int* **51**, 288-93.

Ogutmen, B., Tuglular, S., Cakalagaoglu, F., Ozener, C. und Akoglu, E. (2006). Transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, and bone morphogenic protein-7 expression in tacrolimus-induced nephrotoxicity in rats. *Transplant Proc* **38**, 487-9.

Oldberg, A., Franzen, A. und Heinegard, D. (1986). Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8819-23.

Ozaki, N., Matheis, K. A., Gamber, M., Feidl, T., Nolte, T., Kalkuhl, A. und Deschl, U. (2009). Identification of genes involved in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats - A toxicogenomic investigation. *Exp Toxicol Pathol*.

Peng, W., Chen, J., Jiang, Y., Shou, Z., Chen, Y. und Wang, H. (2007). Non-invasive detection of acute renal allograft rejection by measurement of vascular endothelial growth factor in urine. *J Int Med Res* **35**, 442-9.

Persy, V. P., Verstrepen, W. A., Ysebaert, D. K., De Greef, K. E. und De Broe, M. E. (1999). Differences in osteopontin up-regulation between proximal and distal tubules after renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* **56**, 601-11.

Pfaller, W. und Gstraunthaler, G. (1998). Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect* **106 Suppl 2**, 559-69.

Pfau, W., Schmeiser, H. H. und Wiessler, M. (1990). 32P-postlabelling analysis of the DNA adducts formed by aristolochic acid I and II. *Carcinogenesis* **11**, 1627-33.

Potier, M., Wolf, A. und Cambar, J. (1998). Comparative study of cyclosporin A, cyclosporin G, and the novel cyclosporin derivative IMM 125 in isolated glomeruli and cultured rat mesangial cells: a morphometric analysis. *Nephrol Dial Transplant* **13**, 1406-11.

Pozdzik, A. A., Salmon, I. J., Husson, C. P., Decaestecker, C., Rogier, E., Bourgeade, M. F., Deschodt-Lanckman, M. M., Vanherweghem, J. L. und Nortier, J. L. (2008). Patterns of interstitial inflammation during the evolution of renal injury in experimental aristolochic acid nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 2480-91.

Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Vaidya, V. S. und Bonventre, J. V. (2009). Preclinical evaluation of novel urinary biomarkers of cadmium nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **238**, 301-5.

Prozialeck, W. C., Vaidya, V. S., Liu, J., Waalkes, M. P., Edwards, J. R., Lamar, P. C., Bernard, A. M., Dumont, X. und Bonventre, J. V. (2007). Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney Int* **72**, 985-93.

Rached, E., Hoffmann, D., Blumbach, K., Weber, K., Dekant, W. und Mally, A. (2008). Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin a in vivo and in vitro. *Toxicol Sci* **103**, 371-81.

Risch, L. und Huber, A. R. (2002). Assessing the diagnostic accuracy of cystatin C as a marker of impaired glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* **39**, 661-2.

Rittling, S. R. und Chambers, A. F. (2004). Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* **90**, 1877-81.

Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A., Schmitt, F. L., Paulsson, M. und Lindmark-Mansson, H. (2007). The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **16**, 1087-97.

Rosenberg, M. E., Girton, R., Finkel, D., Chmielewski, D., Barrie, A., 3rd, Witte, D. P., Zhu, G., Bissler, J. J., Harmony, J. A. und Aronow, B. J. (2002). Apolipoprotein J/clusterin prevents a progressive glomerulopathy of aging. *Mol Cell Biol* **22**, 1893-902.

Rosenberg, M. E. und Silksen, J. (1995). Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 633-45.

Roudkenar, M. H., Kuwahara, Y., Baba, T., Roushandeh, A. M., Ebishima, S., Abe, S., Ohkubo, Y. und Fukumoto, M. (2007). Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. *J Radiat Res (Tokyo)* **48**, 39-44.

Sanders, J. S., Huitema, M. G., Hanemaaijer, R., van Goor, H., Kallenberg, C. G. und Stegeman, C. A. (2007). Urinary matrix metalloproteinases reflect renal damage in anti-neutrophil cytoplasm autoantibody-associated vasculitis. *Am J Physiol Renal Physiol* **293**, F1927-34.

Sands, J. M. und Verlander, J. W. (2005). Anatomy and physiologic of the kidneys. In *Toxicology of the kidney* (J. B. Tarloff und L. H. Lash, Hrsg). CRC Press, Boca Raton.

Schmeiser, H. H., Pool, B. L. und Wiessler, M. (1986). Identification and mutagenicity of metabolites of aristolochic acid formed by rat liver. *Carcinogenesis* **7**, 59-63.

Schnaper, H. W. (1995). Balance between matrix synthesis and degradation: a determinant of glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol* **9**, 104-11.

Shanley, P. F. und Burke, T. J. (1990). Differential susceptibility to gentamicin toxicity within the proximal convoluted tubule. *Ren Fail* **12**, 83-7.

Shannan, B., Seifert, M., Leskov, K., Willis, J., Boothman, D., Tilgen, W. und Reichrath, J. (2006). Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* **13**, 12-9.

Shihab, F. S., Bennett, W. M., Yi, H. und Andoh, T. F. (2001). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Transplantation* **72**, 164-8.

Shui, H. A., Ka, S. M., Yang, S. M., Lin, Y. F., Lo, Y. F. und Chen, A. (2007). Osteopontin as an injury marker expressing in epithelial hyperplasia lesions helpful in prognosis of focal segmental glomerulosclerosis. *Transl Res* **150**, 216-22.

Sieber, M. (2009). Evaluation of ¹H NMR- and GC/MS-based metabonomics for the assessment of liver and kidney toxicity (Dissertation). *Institut für Toxikologie, Universität Würzburg*.

Sikorski, E. M., Hock, T., Hill-Kapturczak, N. und Agarwal, A. (2004). The story so far: Molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F425-41.

Silverblatt, F. J. und Kuehn, C. (1979). Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int* **15**, 335-45.

Smyth, R., Lane, C. S., Ashiq, R., Turton, J. A., Clarke, C. J., Dare, T. O., York, M. J., Griffiths, W. und Munday, M. R. (2008). Proteomic investigation of urinary markers of carbon-tetrachloride-induced hepatic fibrosis in the Hanover Wistar rat. *Cell Biol Toxicol*.

Solichova, P., Karpisek, M., Ochmanova, R., Hanulova, Z., Humenanska, V., Stejskal, D. und Bartek, J. (2007). Urinary clusterin concentrations--a possible marker of nephropathy? Pilot study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **151**, 233-6.

Soni, S. S., Cruz, D., Bobek, I., Chionh, C. Y., Nalesso, F., Lentini, P., de Cal, M., Corradi, V., Virzi, G. und Ronco, C. (2009). NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int Urol Nephrol*.

Stejskal, D. und Fiala, R. R. (2006). Evaluation of serum and urine clusterin as a potential tumor marker for urinary bladder cancer. *Neoplasma* **53**, 343-6.

Stetler-Stevenson, W. G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* **1**, re6.

Stiborova, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M. und Schmeiser, H. H. (2005). Human hepatic and renal microsomes, cytochromes P450 1A1/2, NADPH:cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer. *Int J Cancer* **113**, 189-97.

Suter, L., Babiss, L. E. und Wheeldon, E. B. (2004). Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chem Biol* **11**, 161-71.

Takashi, M., Hasegawa, S., Ohmuta, M., Ohshima, S. und Kato, K. (1998). Significant elevation of urinary 28-kD calbindin-D and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase levels in patients undergoing extracorporeal shock wave lithotripsy. *Int Urol Nephrol* **30**, 407-15.

Takashi, M., Zhu, Y., Miyake, K. und Kato, K. (1996). Urinary 28-kD calbindin-D as a new marker for damage to distal renal tubules caused by cisplatin-based chemotherapy. *Urol Int* **56**, 174-9.

Takeda, M., Jung, K. Y., Sekine, T., Endou, H. und Koide, H. (1995). Guanidinoacetic acid (GAA) synthesis in rat tubular suspension as a system for evaluating gentamicin (GM) nephrotoxicity. *Toxicol Lett* **81**, 85-9.

Tamimi, N. A. und Ellis, P. (2009). Drug development: from concept to marketing! *Nephron Clin Pract* **113**, c125-31.

Tang, W. W., Feng, L., Xia, Y. und Wilson, C. B. (1994). Extracellular matrix accumulation in immune-mediated tubulointerstitial injury. *Kidney Int* **45**, 1077-84.

Thomas, G. (1986). Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: identification of specific proteins. *J Cell Biol* **103**, 2137-44.

Thompson, K. L., Afshari, C. A., Amin, R. P., Bertram, T. A., Car, B., Cunningham, M., Kind, C., Kramer, J. A., Lawton, M., Mirsky, M., Naciff, J. M., Oreffo, V., Pine, P. S. und Sistare, F. D. (2004). Identification of platform-independent gene expression markers of cisplatin nephrotoxicity. *Environ Health Perspect* **112**, 488-94.

Thukral, S. K., Nordone, P. J., Hu, R., Sullivan, L., Galambos, E., Fitzpatrick, V. D., Healy, L., Bass, M. B., Cosenza, M. E. und Afshari, C. A. (2005). Prediction of nephrotoxicant action and identification of candidate toxicity-related biomarkers. *Toxicol Pathol* **33**, 343-55.

Tobinick, E. L. (2009). The value of drug repositioning in the current pharmaceutical market. *Drug News Perspect* **22**, 119-25.

Trougakos, I. P., Lourda, M., Agiostratidou, G., Kletsas, D. und Gonos, E. S. (2005). Differential effects of clusterin/apolipoprotein J on cellular growth and survival. *Free Radic Biol Med* **38**, 436-49.

Uchida, K. und Gotoh, A. (2002). Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta* **323**, 121-8.

Usuda, K., Kono, K., Dote, T., Nishiura, K., Miyata, K., Nishiura, H., Shimahara, M. und Sugimoto, K. (1998). Urinary biomarkers monitoring for experimental fluoride nephrotoxicity. *Arch Toxicol* **72**, 104-9.

Vaidya, V. S., Ford, G. M., Waikar, S. S., Wang, Y., Clement, M. B., Ramirez, V., Glaab, W. E., Troth, S. P., Sistare, F. D., Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Bobadilla, N. A., Mefferd, S. C. und Bonventre, J. V. (2009). A rapid urine test for early detection of kidney injury. *Kidney Int* **76**, 108-14.

Vaidya, V. S., Ramirez, V., Ichimura, T., Bobadilla, N. A. und Bonventre, J. V. (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F517-29.

Vaidya, V. S., Waikar, S. S., Ferguson, M. A., Collings, F. B., Sunderland, K., Gioules, C., Bradwin, G., Matsouaka, R., Betensky, R. A., Curhan, G. C. und Bonventre, J. V. (2008). Urinary Biomarkers for Sensitive and Specific Detection of Acute Kidney Injury in Humans. *Clin Transl Sci* **1**, 200-208.

van Gool, A. J., Henry, B. und Sprengers, E. D. (2009). From biomarker strategies to biomarker activities and back. *Drug Discov Today*.

van Timmeren, M. M., Vaidya, V. S., van Ree, R. M., Oterdoom, L. H., de Vries, A. P., Gans, R. O., van Goor, H., Stegeman, C. A., Bonventre, J. V. und Bakker, S. J. (2007). High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients. *Transplantation* **84**, 1625-30.

Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastre, R., But, P. und Vanherweghem, J. L. (1994). Identification of aristolochic acid in Chinese herbs. *Lancet* **343**, 174.

Vanherweghem, J. L., Depierreux, M., Tielemans, C., Abramowicz, D., Dratwa, M., Jadoul, M., Richard, C., Vandervelde, D., Verbeelen, D., Vanhaelen-Fastre, R. und et al. (1993). Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* **341**, 387-91.

Vanherweghem, L. J. (1998). Misuse of herbal remedies: the case of an outbreak of terminal renal failure in Belgium (Chinese herbs nephropathy). *J Altern Complement Med* **4**, 9-13.

Verstrepen, W. A., Nouwen, E. J., Yue, X. S. und De Broe, M. E. (1993). Altered growth factor expression during toxic proximal tubular necrosis and regeneration. *Kidney Int* **43**, 1267-79.

Wagener, G., Gubitosa, G., Wang, S., Borregaard, N., Kim, M. und Lee, H. T. (2008). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis* **52**, 425-33.

Wallin, A., Zhang, G., Jones, T. W., Jaken, S. und Stevens, J. L. (1992). Mechanism of the nephrogenic repair response. Studies on proliferation and vimentin expression after 35S-1,2-dichlorovinyl-L-cysteine nephrotoxicity in vivo and in cultured proximal tubule epithelial cells. *Lab Invest* **66**, 474-84.

Wang, E. J., Snyder, R. D., Fielden, M. R., Smith, R. J. und Gu, Y. Z. (2008). Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. *Toxicology* **246**, 91-100.

Wasilewska, A. M. und Zoch-Zwierz, W. M. (2008). Urinary levels of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in nephrotic children. *Pediatr Nephrol* **23**, 1795-802.

Wheeler, D. S., Devarajan, P., Ma, Q., Harmon, K., Monaco, M., Cvijanovich, N. und Wong, H. R. (2008). Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med* **36**, 1297-303.

Whelton, A. (1984). The aminoglycosides. *Clin Orthop Relat Res*, 66-74.

Whittle, C., Gillespie, K., Harrison, R., Mathieson, P. W. und Harper, S. J. (1999). Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin Sci (Lond)* **97**, 303-12.

Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C. und Bonventre, J. V. (1994). Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* **93**, 2175-88.

Wyss, M. und Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev* **80**, 1107-213.

Xie, Y., Nishi, S., Iguchi, S., Imai, N., Sakatsume, M., Saito, A., Ikegame, M., Iino, N., Shimada, H., Ueno, M., Kawashima, H., Arakawa, M. und Gejyo, F. (2001). Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. *Kidney Int* **59**, 959-74.

Yang, A., Trajkovic, D., Illanes, O. und Ramiro-Ibanez, F. (2007). Clinicopathological and tissue indicators of para-aminophenol nephrotoxicity in sprague-dawley rats. *Toxicol Pathol* **35**, 521-32.

Zhang, Z., Humphreys, B. D. und Bonventre, J. V. (2007). Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2704-14.

Zhou, Y., Vaidya, V. S., Brown, R. P., Zhang, J., Rosenzweig, B. A., Thompson, K. L., Miller, T. J., Bonventre, J. V. und Goering, P. L. (2008). Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci* **101**, 159-70.

12 PUBLIKATIONEN & KONFERENZBEITRÄGE

12.1 Publikationen

Rached, E., **Hoffmann, D.**, Blumbach, K., Weber, K., Dekant, W. und Mally, A. (2008). Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin. A in vivo and in vitro. *Toxicol. Sci* **103**, 371-81

Sieber, M.¹, **Hoffmann, D.**¹, Adler, M., Vaidya V., Clement M., Bonventre J., Zidek N., Rached E., Amberg A., Callanan J., Dekant W. und Mally A (2009). Comparative analysis of novel non-invasive renal biomarkers and metabonomic changes in a rat model of gentamicin nephrotoxicity. *Toxicol Sci* **109**, 336-49 ¹**joint first author**

Hoffmann, D., Adler, M., Vaidya, V., Rached, E., Mulrane, L., Gallagher, W.M., Callanan, J.J., Gautier, J.C., Matheis, K., Staedtler, F., Dieterle F., Brandenburg, A., Sposny, A., Hewitt, P., Ellinger-Ziegelbauer, H., Bonventre, J.V., Dekant, W. und Mally, A. (2010) Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. *Toxicol Sci*, doi: 10.1093/toxsci/kfq029

Hoffmann, D., Fuchs, T., Henzler, T., Matheis, K., Herget, T., Dekant, W., Hewitt, P. und Mally, M. (2010) Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *In Vorbereitung*

Adler, M., **Hoffmann, D.**, Ellinger, H., Hewitt, P., Matheis, K., Mulrane, L., Gallagher, W.M, Suter-Dick L, Fountoulakis M.M, Dekant W und Mally A. (2010) Assessment of candidate biomarkers of drug induced liver injury in preclinical toxicity studies. *Toxicology Letters (eingereicht)*

Com, E., Boitier, E., Marchandeaudeau, J.P., Schroeder, S., **Hoffmann, D.**, Mally, A. und Gautier J.C. (2010) Integrated transcriptomic and proteomic evaluation of gentamicin nephrotoxicity in rats. *In Vorbereitung*

Matheis, K., Amberg, A., Boernsen, O., Guerreiro, N., Brandenburg, A., Com, E., Dieterle, F., Gautier, J.C., Gmünder, H., **Hoffmann, D.**, Kalkuhl, A., Mally, A., Riefke, B., Suter-Dick, L., Sposny, A. Staedtler, F. (2010) Cross study comparison of three compounds causing kidney proximal tubule damage by combining omics data and conventional toxicological endpoints – specific effects on the complement system. *In Vorbereitung*

12.2 Konferenzbeiträge

Rached, E., **Hoffmann, D.**, Dekant, W. und Mally, A. (2008) Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin a in vivo and in vitro. 49. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology 375 (Suppl. 1) (Poster)

Hoffmann, D., Sieber, M., Zidek, N., Dekant, W. und Mally, A. (2008) Lipocalin 2, clusterin and Kim 1 as potential early, non-invasive biomarkers of nephrotoxicity. 49. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology 375 (Suppl. 1) (Poster)

Gautier, J.C., Mally, A., **Hoffmann, D.**, Adler, M., Betton, G., Davis, D., Bounous, D., Ennulat, D., Riefke, B., Mylecraine, L., Hoffman, D., Schuster, K., Pettit, S., Harpur, E. (2008) Use of novel biomarkers in pre-clinical renal assessment. Meeting of the Association of European Comparative Clinical Pathology, Barcelona, Spanien (Vortrag)

Hoffmann, D., Adler, M., Rached, E., Mulrane, E., Gallagher, W.M., Callanan, J.J., Gautier, J.C., Matheis, K., Staedtler, F., Dieterle, F., Walijew, A., Hewitt, P., Ellinger, H., Vaidya, V., Clement, M., Bonventre, J.V., Dekant, W. und Mally, A. (2009) Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. Society of Toxicology 48th Annual Meeting, Baltimore, USA. The Toxicologist, Supplement to Toxicological Sciences (Poster)

Hoffmann, D., Henzler, T., Herget, T., Hewitt, P., Callanan, J., Dekant, W. und Mally, A. (2009) Urinary rat kidney biomarker panel using Gentamicin and OTA as a model. 46th Congress of the European Society of Toxicology, Dresden, Deutschland. Toxicology Letters, Vol. 189S (Poster)

Adler, M., **Hoffmann, D.**, Ellinger, H., Hewitt, P., Matheis, K., Mulrane, L., Gallagher, W.M., Suter-Dick, L., Fountoulakis, M.M., Dekant, W. und Mally, A. (2009) Assessment of candidate biomarkers of drug induced liver injury in preclinical toxicity studies. 46th Congress of the European Society of Toxicology, Dresden, Deutschland. Toxicology Letters, Vol. 189S (Poster)

Matheis, K., Sposny, A., Com, E., Gautier, J.C., Mally, A., **Hoffmann, D.**, Kalkuhl, A., Riefke, B., Boernsen, O., Amberg, A., Dieterle, F., Staedtler, F., Gmuender, H. und Brandenburg, A. (2009) Cross study comparison of three compounds causing kidney proximal tubule damage by combining omics data and conventional toxicological endpoints. 46th Congress of the European Society of Toxicology, Dresden, Deutschland. Toxicology Letters, Vol. 189S (Poster)

Fuchs, T., **Hoffmann, D.**, Pohl, S. und Mally, A. (2009) Use of the Luminex® xMAP® technology in combination with the Widescreen™ Rat Kidney Assays for detection of key kidney damage biomarkers in rat urine after gentamicin treatment. European Bioplex Usergroup-Meeting, Berlin, Deutschland

Hoffmann, D., Henzler, T., Herget, T., Hewitt, P., Callanan, J., Dekant, W. und Mally, A. (2009) Performance of a urinary kidney biomarker panel for improved detection of acute and subchronic nephrotoxicity in the rat. Planet xMAP 2009, Amsterdam, Niederlande

13 DANKSAGUNG

Zum Schluss möchte ich mich noch bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Vollendung meiner Promotion unterstützt haben:

Mein erster Dank gilt Frau PD Dr. A. Mally und Herrn Prof. Dr. W. Dekant für die Überlassung des interessanten Themas, ihre hilfreiche Unterstützung, für die stets offene Tür verbunden mit der immerwährenden Diskussionsbereitschaft und Motivation.

Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe als Vertreterin der Fakultät für Chemie und Pharmazie danke ich für die freundliche und bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Dissertation.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen „Mally-Mädels“ (Sabrina, Melli, Micha, Stephi, Susi, Caro, Ursula, Helene und „Fausto“), die, nicht nur im Laboralltag sondern auch nach Dienstschluss, immer für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Auch bei allen anderen nicht- genannten Personen der Toxikologie Würzburg möchte ich mich herzlichst für die schöne Zeit und gute Zusammenarbeit am Institut bedanken.

Ein Teil dieser Arbeit entstand im Rahmen des InnoMed-PredTox-Projektes innerhalb des „6th framework programme“ der Europäischen Union. Allen Partnern danke ich für die gute Zusammenarbeit während der gesamten Dauer des Projektes.

Zum Schluss gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern, Geschwistern und dem Rest meiner lieben Familie, die mich sowohl während des Pharmaziestudiums als auch während der gesamten Promotionszeit unterstützt haben und immer für mich da waren.