

Funktionelle Relevanz der zelltypspezifischen Kollagen Typ I Produktion in der Niere



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Simone Buchtler (geborene Kutzi)

aus
Mallersdorf-Pfaffenberg

im Jahr
2017

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:
07.04.2017

Die Arbeit wurde angeleitet von:
Prof. Dr. Matthias Mack

Unterschrift:

Simone Buchtler

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Anatomie und Physiologie der Niere..... | 1 |
| 1.2 Erkrankungen der Niere..... | 3 |
| 1.3 Nierenfibrose..... | 4 |
| 1.3.1 Molekulare Mechanismen der renalen Fibrose..... | 5 |
| 1.3.1.1 Residente Fibroblasten..... | 6 |
| 1.3.1.2 Perizyten..... | 8 |
| 1.3.1.3 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)..... | 8 |
| 1.3.1.4 Endotheliale-mesenchymale Transition (EndoMT)..... | 9 |
| 1.3.1.5 Fibrozyten..... | 9 |
| 1.3.1.5.1 Definition der Fibrozyten..... | 9 |
| 1.3.1.5.2 Physiologische Funktion der Fibrozyten..... | 10 |
| 1.3.1.5.3 Nachweis der Fibrozyten..... | 10 |
| 1.3.1.5.4 Zusammenhang zwischen Monozyten und Fibrozyten..... | 11 |
| 1.3.1.5.5 Einfluss auf die Fibrozytenmigration..... | 12 |
| 1.3.1.5.6 Bedeutung der Fibrozyten..... | 13 |
| 1.3.2 Bedeutung der renalen Fibrose für die Nierenfunktion..... | 13 |
| 1.3.2.1 Fibrose als inertes Füllmaterial..... | 13 |
| 1.3.2.2 Fibrose als Hindernis für die Regeneration..... | 14 |
| 1.3.2.3 Fibrose als Unterstützung für die Regeneration..... | 14 |
| 1.3.2.4 Fibrose als überbleibender Rest nach der Regeneration..... | 14 |
| 1.4 Extrazelluläre Matrix (EZM)..... | 14 |
| 1.4.1 Fibronectin..... | 16 |
| 1.4.2 Kollagen..... | 16 |
| 1.5 Das Cre/loxP-System..... | 18 |
| 1.6 Tiermodelle der renalen Fibrose..... | 21 |
| 1.6.1 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)..... | 22 |
| 1.6.2 Reversible unilaterale Ureterobstruktion (R-UUO)..... | 24 |
| 1.6.3 Adenin-Nephropathie..... | 25 |
| 1.6.4 Modell der kompensatorischen Hypertrophie mit akutem Nephronverlust..... | 26 |
| 1.7 Zielsetzung..... | 26 |
| 2. Material..... | 28 |
| 2.1 Chemikalien..... | 28 |
| 2.2 Puffer..... | 29 |
| 2.3 Enzyme..... | 30 |
| 2.4 Antikörper..... | 30 |
| 2.5 Primer..... | 31 |
| 2.6 Farbstoffe..... | 31 |
| 2.7 Arzneistoffe..... | 32 |
| 2.8 Kits..... | 32 |
| 2.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien..... | 33 |
| 2.10 Operationsmaterialien..... | 34 |
| 2.11 Geräte..... | 34 |
| 2.12 Software..... | 35 |
| 2.13 Versuchstiere..... | 35 |
| 3. Methoden..... | 36 |
| 3.1 Tierexperimente..... | 36 |
| 3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung..... | 36 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.1.2 | Generierung Knochenmarks-chimärer Mäuse | 36 |
| 3.1.3 | Modell der renalen Fibrose | 37 |
| 3.1.3.1 | Unilaterale Ureterobstruktion | 37 |
| 3.1.3.2 | Reversible UUO | 38 |
| 3.1.3.3 | Adenin-Nephropathie | 38 |
| 3.1.3.4 | Modell der kompensatorischen Hypertrophie | 39 |
| 3.1.4 | Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) | 39 |
| 3.2 | Zellbiologische Methoden | 41 |
| 3.2.1 | Entnahme von peripherem Blut | 41 |
| 3.2.2 | Präparation von murinen Nierenzellen | 41 |
| 3.3 | Durchflusszytometrische Zellsortierung | 41 |
| 3.3.1 | Extra- und intrazelluläre Färbung zur FACS-Analyse | 42 |
| 3.3.2 | Quantifizierung durchflusszytometrischer Analysen | 43 |
| 3.4 | Molekularbiologische Methoden | 44 |
| 3.4.1 | mRNA Isolation aus murinen Nieren | 45 |
| 3.4.1.1 | Reverse Transkription | 45 |
| 3.4.1.2 | Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) | 46 |
| 3.4.1.3 | Auswertung der qPCR | 46 |
| 3.4.2 | Analyse genomischer DNA | 47 |
| 3.4.2.1 | DNA Isolation aus Nieren oder Vollblut | 47 |
| 3.4.2.2 | PCR zur Detektion des verkürzten Col1a1 Alleles | 47 |
| 3.5 | Histologische Analysenmethoden | 48 |
| 3.5.1 | Herstellung histologischer Schnitte | 48 |
| 3.5.2 | Hellfeldmikroskopie | 48 |
| 3.5.2.1 | Masson-Trichrom-Färbung | 48 |
| 3.5.2.2 | CD3-Histologie | 49 |
| 3.5.3 | Immunfluoreszenz-Färbung | 49 |
| 3.5.3.1 | Immunfluoreszenz von Kollagen und α -SMA | 50 |
| 3.5.3.2 | Immunfluoreszenz von Fibronektin | 50 |
| 3.5.4 | Auswertung der Immunhistologien | 50 |
| 3.6 | Statistische Auswertung | 51 |
| 4. | Ergebnisse | 52 |
| 4.1 | Generierung verschiedener konditioneller Kollagen I-defizienter Mäuse | 52 |
| 4.1.1 | Generierung von Mäusen mit ubiquitärem Kollagen Knock-Out | 53 |
| 4.1.1.1 | Generierung von Mäusen mit heterozygot ubiquitärem Kollagen Knock-Out | 53 |
| 4.1.1.2 | Generierung von Mäusen mit induzierbar ubiquitärem Kollagen Knock-Out | 53 |
| 4.1.2 | Generierung von Mäusen mit zelltypspezifischem Kollagen Knock-Out | 54 |
| 4.2 | Nachweis des Knock-Outs von Kollagen Typ I mittels unilateraler Ureterobstruktion | 57 |
| 4.2.1 | UUO bei ubiquitären Kollagen Knock-Out-Mäusen | 57 |
| 4.2.2 | UUO bei induzierbar ubiquitären Kollagen Knock-Out-Mäusen | 61 |
| 4.3 | Zelltypspezifische Deletion von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen .. | 63 |
| 4.4 | Funktionelle Untersuchung mit reversibler unilateraler Ureterobstruktion | 73 |
| 4.4.1 | R-UUO in Ubi-Cre x Col ^{wt/fl} -Mäusen | 73 |
| 4.4.2 | R-UUO in ERT2-Cre x col1a1 ^{fl/fl} -Mäusen | 76 |
| 4.4.3 | R-UUO in CD45 ^{wt/cre} x col1a1 ^{fl/fl} -Mäusen | 77 |
| 4.5 | Adenin-induzierte Nephropathie | 80 |
| 4.5.1 | Adenin-induzierte Nephropathie bei Ubi-Cre x col1a1 ^{wt/fl} -Mäusen | 80 |
| 4.5.1.1 | Adenin-induzierte Nephropathie in Kombination mit UUO | 80 |

| | |
|--|-----|
| 4.5.2 Adenin-induzierte Nephropathie bei CD45 ^{wt/cre} x col1a1 ^{fl/fl} -Mäusen | 83 |
| 5. Diskussion | 85 |
| 5.1 Der Kollagen Knock-Out ist effektiv und spezifisch; Kollagen Typ I ist das überwiegende extrazelluläre Matrixprotein..... | 85 |
| 5.2 Fibrozyten wirken direkt und signifikant auf die Ablagerung von Kollagen I.... | 86 |
| 5.3 Fibrozyten tragen 38% bis 54% zur Gesamtfibrose bei. | 89 |
| 5.4 Endogene Fibroblasten/Perizyten dominieren in der frühen Phase der Fibrogenese; Fibrozyten dominieren in der späteren Phase der Fibrogenese..... | 90 |
| 5.5 Tubuläre Epithelzellen haben keine relevante Rolle für die direkte Produktion von Kollagen Typ I. | 91 |
| 5.6 Die funktionelle Bedeutung der renalen Fibrose ist abhängig vom verwendeten Modell. | 91 |
| 5.6.1 Fibrose ist nützlich im Modell der R-UUO; Fibrose ist schädlich im Modell der Adenin-induzierten Nephropathie..... | 92 |
| 5.6.2 Kollagen-Produktion durch Fibrozyten ist bei R-UUO nicht erforderlich; Kollagen-Produktion ist unabhängig von der zellulären Kollagenquelle im Modell der Adenin-induzierten Nephropathie..... | 94 |
| 6. Zusammenfassung | 96 |
| 7. Literaturverzeichnis | 98 |
| 8. Abkürzungsverzeichnis..... | 105 |
| 9. Danksagung | 107 |

1. Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Niere dient Säugetieren der Aufrechterhaltung exkretorischer, osmoregulatorischer und auch endokriner Mechanismen.

Eine essentielle Funktion der Niere ist die Filtration des Blutes und somit die Ausscheidung von überflüssigen oder toxischen Substanzen, welche nur über den Harn ausgeschieden werden können. Zu diesen harnpflichtigen Substanzen zählen sowohl körpereigene Stoffwechselprodukte, wie z.B. Harnstoff, Harnsäure oder Ammoniak, als auch einige Pharmaka und Toxine. Die Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushaltes ist ebenso Teil der Nierenfunktion wie die Funktion als endokrines Organ mit der Produktion der Hormone Erythropoetin (Epo), Calcitriol und Renin. Darüber hinaus fungiert es als Zielorgan extrarenal gebildeter Hormone [1-3].

Die in Säugern paarig angelegten Nieren liegen in der sogenannten Fettkapsel des Retroperitonealraums. Das Parenchym gliedert sich in den oberflächennahen Rindbereich (Cortex renalis), welche durch die Nierenkapsel begrenzt ist, sowie das äußere und innere Nierenmark (Medulla renalis), welches in das Nierenbecken mündet (Abb. 1.1, A) [2]. Die Grenzen zwischen den Bereichen werden durch die verschiedenen Abschnitte der funktionellen Filtrationseinheiten der Nieren, der Nephrone, definiert. In humanen Nieren befinden sich etwa eine Million, in einer murinen Niere etwa 8000 Nephrone [4]. Diese setzen sich aus einem kortikalen Nierenkörperchen, dem Glomerulum, und einem daran angeschlossenen Tubulussystem zusammen (Abb. 1.1, B). Das Glomerulum besteht aus einem Kapillarschlingenkonvolut, umgeben von der Bowmann'schen Kapsel. In diesem findet eine ständige Filtration des Blutes statt. Im humanen System liegt die Filtrationsleistung der Niere, gemessen als glomeruläre Filtrationsrate (GFR), bei etwa 125ml/min/1,73m² Körperoberfläche [5].

Der dabei gebildete Primärharn enthält noch alle kleinmolekularen Bestandteile des Blutplasmas. Während der Passage des proximalen Tubulus, der Henle'schen Schleife, des distalen Tubulus und des Sammelrohres wird das Ultrafiltrat durch aktive und passive Resorption aufkonzentriert. Gleichzeitig steigt durch aktive Sekretionsprozesse die Menge von auszuscheidenden, unbrauchbaren oder

toxischen Stoffwechselendprodukten im Endharn. Ein Gegenstromaustauschsystem entlang eines osmotischen Gradienten mit zunehmender Hypertonie vom Nierenmark papillenwärts ermöglicht die konzentrierte Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen bei minimalem Wasser- und Salzverlust [2, 6].

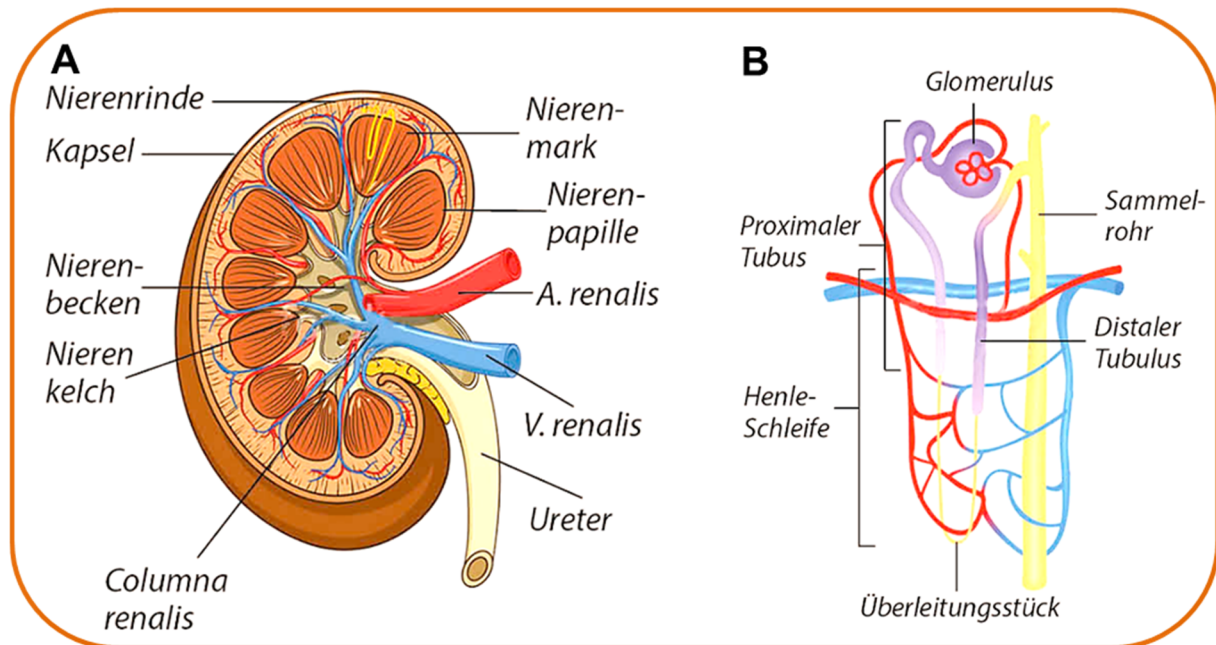


Abb. 1.1 Schematischer Aufbau der Niere. (A) Längsschnitt durch eine Niere. (B) Funktioneller Aufbau eines Nephrons [7].

Im peritubulären und extravaskulären Raum der Nieren befindet sich das renale Interstitium. Im Bereich des Kortex macht dieses ca. 0,6-3,4% des Nierenvolumens aus [8]. Es besteht zum einen aus zellulären Bestandteilen, welche überwiegend Fibroblasten, aber auch dendritische Zellen, Makrophagen und Lymphozyten darstellen [9]. Zum anderen besteht es aus extrazellulären Strukturen welche aus fibrillärem Kollagen Typ I, III und VI, eingebettet in einer gelartigen Matrix aus Glykoproteinen und Proteoglykanen, gebildet werden. Das Interstitium dient neben einer skelettähnlichen Stützfunktion des parenchymatösen und vaskulären Bereichs der Niere dem Stoffaustausch zwischen Tubuli und Blutfluss. Die Effizienz dieses Austausches ist stark von der Struktur des renalen Interstitiums beeinflusst, da die Diffusionsstrecke von den Tubuli zu den Gefäßen maßgeblich von der Weite des renalen Interstitiums definiert wird [8].

1.2 Erkrankungen der Niere

Die zahlreichen Aufgaben der Niere bedingen gleichzeitig eine starke Auswirkung auf den Organismus bei Schädigung und Funktionsverlust dieses Organs. Nierenerkrankungen können in akutes Nierenversagen (acute kidney injury, AKI) und chronische Niereninsuffizienz (chronic kidney disease, CKD) eingeteilt werden.

AKI ist durch eine rapide Reduktion der Nierenfunktion definiert [10, 11]. Induziert werden kann ein AKI durch eine Vielzahl von Noxen, z.B. Infektionen, immunologische Nierenerkrankungen, hypoxische Zustände durch mangelnde Durchblutung, obstruktive Nephropathie oder Verabreichung nephrotoxischer Substanzen wie Röntgenkontrastmittel [12, 13]. Im Gegensatz zu anderen Organen wie dem Herz oder Gehirn ist die Niere theoretisch in der Lage, sich von Schäden wieder vollständig zu erholen [10].

Persistierende oder wiederholte Schädigungsreize hingegen können zu einer chronischen Nierenerkrankung führen. Diese ist definiert durch eine Schädigungsdauer von mindestens drei Monaten und einer einhergehender GFR $< 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$ Körperoberfläche.

Zu den häufigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer CKD zählen neben einem höheren Lebensalter und Übergewicht, auch systemische Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ II und arterielle Hypertonie. Mögliche Schädigungen können aber auch durch erbliche Veranlagung oder Autoimmunerkrankungen bedingt sein.

Die chronische Niereninsuffizienz endet meist in einem terminalen Nierenversagen, eine sogenannte End-Stage Renal Disease (ESRD). Eine ESRD macht eine Nierenersatztherapie in Form von Nierentransplantation oder einer Dialyse-Pflicht notwendig, was für Patienten eine reduzierte Lebensqualität bedeutet [14]. Zudem erhöht eine ESRD die Risikofaktoren für Folgeerkrankungen, insbesondere kardiovaskulärer Erkrankungen, welche mit erhöhter Mortalität einhergehen [15].

In den letzten Jahren zeichnete sich eine kontinuierliche Zunahme der Anzahl von Dauerdialysepatienten in Deutschland ab. Laut den zuletzt vom deutschen Nephrologieregister veröffentlichten Daten wurden im Jahr 2006 über 66000 Patienten mit Dauerdialyse behandelt, über 17000 Patienten unterzogen sich einer Nierenersatztherapie. Dies bedeutet 5%, bzw. 4,6% mehr Patienten als im Jahr 2005 [16].

1.3 Nierenfibrose

Der progrediente Verlauf chronischer Nierenerkrankungen unterschiedlichster Genese ist gekennzeichnet durch einen *Circulus vitiosus*, welcher in einer renalen Fibrose endet. Unter Fibrose versteht man eine pathologische Wundheilung bzw. ein gestörtes Remodeling, welches durch abnormale und exzessive Akkumulation der extrazellulären Matrixproteine, z.B. Kollagen und Fibronectin, gekennzeichnet ist [17, 18]. Es kommt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes von Matrixdeposition und Matrixresorption zu Gunsten der Deposition.

Die Pathogenese der Nierenfibrose lässt sich in drei Phasen einteilen: Inflammation, Proliferation und postinflammatorische Phase [19-22]. Die ersten beiden Phasen sind vergleichbar mit der physiologischen Wundheilung, in der dritten Phase hingegen beginnt die Fibrogenese.

Die Entzündungsphase startet unmittelbar nach einer Verletzung des Nierengewebes zum Verschluss der Wunde mit Koagulation durch Thrombozyten-Aggregation [18]. Durch die Ausschüttung von Mediatoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor), TGF- β (transforming growth factor-beta) sowie anderer Zytokine und Chemokine werden Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten angelockt, welche das entzündliche Gewebe infiltrieren. Diese synthetisieren ihrerseits ebenfalls Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche die residenten Fibroblasten aktivieren. Diese Aktivierung geht mit einer gesteigerten Syntheseaktivität extrazellulärer Matrixproteine einher. Dies führt in die zweite Phase, die Proliferationsphase. Hierbei wird das Gewebe durch Neoangiogenese von Fibroblasten und anderen Zellen neu aufgebaut. In der letzten Phase der physiologischen Wundheilung werden die Produktion proinflammatorischer Stoffe und die Proliferation verschiedenster Entzündungszellen wieder normalisiert, so dass sich der Entzündungsprozess auflösen kann, die sogenannte Resolution. Bei der Fibrose hingegen normalisieren sich diese Prozesse nicht mehr. Es entsteht stattdessen eine postinflammatorische Phase, bei der trotz fehlender Stimuli die Matrixsynthese fortschreitet. Dadurch wird das Gleichgewicht von Matrixauf- und abbau gestört. Dies führt zu einer fortschreitenden Zerstörung der Mikroarchitektur des Organs und geht letztlich mit Organversagen einher. Dabei nimmt die Anzahl intakter Nephrone und folglich die GFR kontinuierlich ab, wobei insbesondere die

morphologischen Veränderungen des Tubulointerstitiums den Funktionsverlust der Niere gut reflektieren [19-21].

Renale Fibrose läuft unter Einbeziehung nahezu aller renaler Zelltypen ab und kann alle Kompartimente der Niere betreffen. Man unterscheidet zwischen Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose und vaskulärer Sklerose [23, 24].

Der Entstehungsmechanismus der renalen Fibrose ist bis heute unzureichend erforscht [25].

1.3.1 Molekulare Mechanismen der renalen Fibrose

Seit Mitte der 1970er Jahre wurden der Ursprung und die Rolle der extrazellulären Matrix (EZM)-produzierenden Zellen intensiv untersucht [26] und bis heute nicht eindeutig geklärt. Allgemein anerkannt ist die Endstrecke der Entwicklung der renalen Fibrose. Es entwickeln sich sogenannte Myofibroblasten, welche ihren Namen aufgrund ihrer Expression von α -glatten Muskelaktin (alpha smooth muscle actin, α -SMA) und ihrer ähnlichen Charakteristiken zu denen der Fibroblasten erhalten haben [27, 28]. Unter physiologischen Bedingungen ist die α -SMA-Expression auf vaskuläre glatte Muskelzellen in gesunden Nieren beschränkt. Hingegen sind in einer fibrotischen Niere α -SMA-positive Myofibroblasten detektierbar. α -SMA verleiht den Zellen kontraktile Eigenschaften und damit die Fähigkeit zum Gewebe-Remodeling bei Wundheilung [29]. Myofibroblasten gelten als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrixproteine. Sie produzieren Kollagene, Fibronektine, Elastine, Fibrilline, proinflammatorische Proteine, Tenascine und Proteoglykane [30].

Lin et al. zeigte mittels unilateraler Ureterobstruktion von Reporter-mäusen, mit einer eGFP (enhanced green fluorescent protein)-Expression unter der Kontrolle des Kollagen Typ I α 1 Promotors, eine enge Überlappung zwischen α -SMA- und GFP-positiven Zellen. Jedoch zeigte sich keine vollkommene Korrelation, da 1% der GFP-positiven Zellen α -SMA-negativ und umgekehrt 25% der α -SMA-positiven Zellen GFP-negativ waren [31]. Dies verdeutlicht die Heterogenität der Myofibroblasten. Um diese heterogenen Merkmale und Verhaltensweisen erklären zu können, ist es nötig, die Vorläuferzellen und den Ursprung der Myofibroblasten zu bestimmen. Postuliert werden hauptsächlich fünf Mechanismen, die zur verstärkten Akkumulation der extrazellulären Matrix beitragen: Aktivierung interstitieller Fibroblasten,

Differenzierung von Perizyten, Transition von Tubulusepithelzellen, Transition von Endothelzellen und die Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten (Abb.1.2) [32].

Unklar ist bis heute, welchen Beitrag die einzelnen Mechanismen tatsächlich zur Entwicklung der Fibrose leisten.

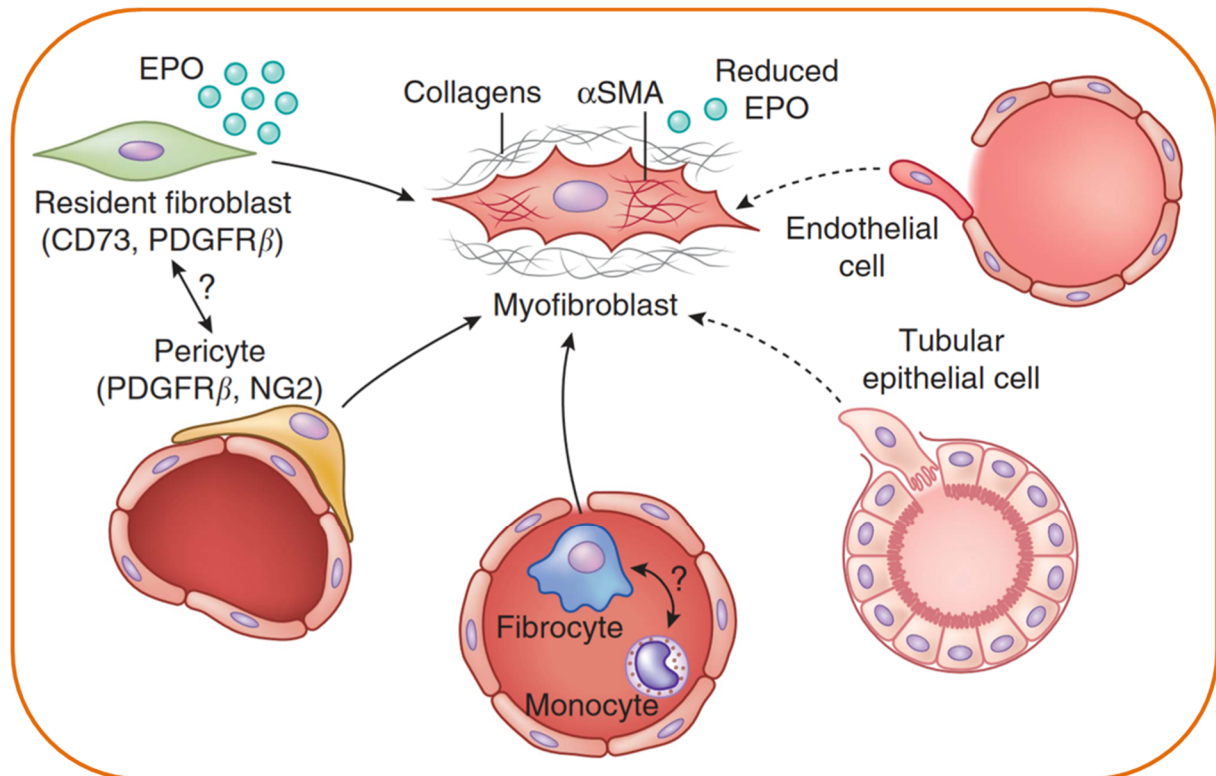


Abb. 1.2 Ursprung der Matrix-produzierenden Myofibroblasten. Alpha-glattes Muskelaktin (α -SMA)-positive Matrix-produzierende Myofibroblasten können aus fünf verschiedenen Zelltypen und den damit zugrunde liegenden Mechanismen entstehen: Aktivierung residenter Fibroblasten, Differenzierung aus vaskulären Perizyten, Rekrutierung zirkulierender Knochenmarks-abstammender Fibrozyten, kapillare EndoMT (endotheliale-mesenchymale Transition) und tubuläre EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) [33].

1.3.1.1 Residente Fibroblasten

Fibroblasten sind mesenchymalen Ursprungs und eingebettet in die EZM und im Stroma von Bindegewebe und Organen. Die Identifizierung und Abgrenzung der Fibroblasten von anderen Zelltypen ist schwierig, da bis heute ein spezifischer Marker für diese Zellen fehlt und diese zudem eine starke topographische Differenzierung aufzeigen. Charakteristisch für Fibroblasten ist eine längliche oder spindelförmige Morphologie, ihre anatomische Lokalisation im Interstitium sowie die Expression von (nicht spezifischen) Markern wie PDGFR- β (Platelet-derived growth

factor receptor β), CD73 (Ekto-5'-Nukleotidase) und FSP1 (fibroblast-specific protein 1) [34, 35].

Mittels Zellabstammungs-Analysen zur Identifizierung der Herkunft der Fibroblasten konnte Asada et al. 2011 zeigen, dass Zellen aus der Neuralleiste in die embryonale Niere migrieren und in residente Fibroblasten, einschließlich EPO-produzierender Zellen, differenzieren [36].

Fibroblasten haben vielfältige Funktionen. In der Niere befinden sich Fibroblasten ubiquitär im Interstitium und produzieren sowie organisieren dort die interstitielle EZM. Sie dienen dadurch der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur. Durch ihre Kommunikation mit anderen Zelltypen wie Epithelzellen, Endothelzellen und zirkulierenden Zellen tragen sie zudem eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase. Diese ist essentiell für die Wundheilung und beeinflusst bei überschießender Reaktion die Generierung einer Fibrose. Fibroblasten werden von verschiedenen Stimuli, z.B. PDGF, TGF- β , FGF2 (fibroblast growth factor 2), CTGF (connective tissue growth factor) oder t-PA (tissue-type plasminogen activator) aktiviert. Dadurch proliferieren die Zellen und entwickeln einen α -SMA-positiven Myofibroblasten-Phänotyp [32]. Zudem sind bestimmte Subpopulationen von Nierenfibroblasten spezialisierte endokrine Zellen, die als Reaktion auf Hypoxie Erythropoetin produzieren [37].

Aufgrund ihrer vielfältigen Aufgaben fördert die Dysfunktion residenter Fibroblasten die Entwicklung einer Nierenfibrose und Nierenanämie. Es konnte bereits in drei Fibrose-Modellen, einer einseitigen Harnleiter-Obstruktion (UUO), einer Folsäure-Nephropathie und einer schweren Ischämie-Reperfusion (IR)-Verletzung gezeigt werden, dass residente Fibroblasten eine Hauptquelle für EZM-produzierende Myofibroblasten sind. Zudem verwandeln sich EPO-produzierende Fibroblasten auf Kosten der EPO-Produktion in Myofibroblasten und trans-differenzierte Myofibroblasten reduzieren ihre EPO-Produktion drastisch, so dass Patienten eine renale Anämie entwickeln [34].

Ein neuer therapeutischer Ansatz in der Nierenfibrose könnte die Adressierung dieser Zellen sein, um die Bildung EZM-produzierender Myofibroblasten zu unterdrücken und die EPO-Produktion wiederherzustellen. Souma et. al. konnte 2013 im reversiblen UUO-Modell zeigen, dass sich aktivierte Myofibroblasten wieder in EPO-produzierende Zellen zurück entwickeln können [38].

1.3.1.2 Perizyten

Perizyten sind definiert als eingebettete Zellen innerhalb der vaskulären Basalmembran. Als Marker werden PDGFR- β und NG2 (neural/glial antigen 2) verwendet, welche jedoch nicht spezifisch sind. Perizyten sind kontraktile Zellen mesenchymalen Ursprungs mit mehreren Zellfortsätzen, welche sich von außen an die Endothelzellwände lagern. Perizyten tragen dadurch eine entscheidende Rolle zur Stabilität und Integrität der Mikrogefäße, regulieren den Gefäßtonus und den Kapillardurchmesser zur Kontrolle der Mikrozirkulation [39, 40].

Humphreys et al. zeigte durch Zellabstammungs-Analysen bei UUO und IR-Verletzungen, dass α -SMA-positive Zellen im Interstitium aus Perizyten entstehen können [41]. Lin et al. postuliert zudem einen großen Einfluss der Perizyten. Hierbei führen vor allem Verletzungen der Blutgefäße und der dabei freigesetzten vaskulären Faktoren zur Ablösung der Perizyten von der Endothelwand, Migration und Differenzierung in Myofibroblasten [31]. In Abwesenheit von Perizyten werden peritubuläre Kapillaren zudem destabilisiert, was zu Kapillarregression, Verdünnung und anschließender Hypoxie im Interstitium führt [42]. Mehrere Studien konnten zeigen, dass bei chronischer Hypoxie des Interstitiums die CKD in eine Niereninsuffizienz übergeht. Hypoxie kann Fibroblasten aktivieren und verändert den EZM-Metabolismus, was letztendlich zur Fibrogenese führt [43]. Daher sind Strategien zur Prävention der Perizyten-Ablösung potenzielle neue therapeutische Ansätze für CKD.

1.3.1.3 Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT)

EMT ist ein molekularer Mechanismus, bei dem sich endständig differenzierte Epithelzellen in Mesenchymzellen transdifferenzieren. Dabei verlieren die Epithelzellen ihre Polarität und Adhäsion durch Herunterregulation der Genexpression der Adhäsionsproteine, von z.B. E-Cadherin, wodurch sie ein Migrationsvermögen erlangen. Ihre Genexpression ändert sich soweit, dass sie charakteristische Myofibroblastenmarker wie FSP1, Vimentin und α -SMA exprimieren [44]. EMT dient physiologisch der Embryonalentwicklung [45], aber auch der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen [46].

Kalluri et al. postulierte 2009 EMT als eine Quelle für Myofibroblasten aufgrund einer Kollokalisierung von epithelialer und mesenchymaler Marker [44]. *In vitro* Studien zeigten auch, dass Epithelzellen in Kultur, die mit profibrotischen Faktoren wie beispielsweise TGF- β inkubiert wurden, mesenchymale Merkmale entwickeln und epitheliale Eigenschaften verlieren [47]. Die *in vivo* Ergebnisse der Rolle von EMT auf die Fibrogenese sind kontrovers. In Studien von Iwano et al. wurde 2002 der Anteil der aus EMT rekrutierten Fibroblasten auf nahezu ein Drittel geschätzt [48]. LeBleu et al. zeigte 2013 hingegen, dass der Beitrag von EMT zu Myofibroblasten weniger als 5% beträgt, was darauf hinweist, dass der Anteil von EMT zu Fibrose weniger signifikant als bisher angenommen ist [49].

1.3.1.4 Endotheliale-mesenchymale Transition (EndoMT)

Die EndoMT beschreibt, ähnlich der EMT, eine Transdifferenzierung von tubulären Endothelzellen zu Myofibroblasten. Studien mit Zellabstammungs-Analysen geben Hinweise, dass die EndoMT ein wichtiger Mechanismus bei der Pathogenese der Nierenfibrose ist [50]. Allerdings werden diese Ergebnisse kontrovers diskutiert. Mehrere Versuchsreihen sind noch nötig, um die Bedeutung der EndoMT auf die Fibrogenese abschließend klären zu können.

1.3.1.5 Fibrozyten

1.3.1.5.1 Definition der Fibrozyten

Fibrozyten sind definiert als zirkulierende Kollagen-produzierende Zellen hämatopoetischen Ursprungs, die spezifisch in entzündetes Gewebe einwandern. Sie wurden erstmals 1994 von Bucala et al. in dem entzündlichen Exsudat von subkutan implantierten Wundkammern gefunden und charakterisiert [51]. Fibrozyten sind eine kleine Zellpopulation der Leukozyten, welche mengenmäßig nur einen Anteil von 0,5% der Gesamtleukozytenzahl betragen. Charakteristisch für diese Zellen sind zum einen die Expression der Fibroblasten-ähnlichen Komponenten wie Vimentin, Kollagen I und III sowie Fibronectin, zum anderen aber auch des Leukozytenmarkers CD45 (cluster of differentiation 45) und des hämatopoetischen Stammzellmarkers CD34. Zudem wurden auf humanen Fibrozyten die Marker

CD11b, CD13, CD18, CD71 und auf murinen Fibrozyten CD11b sowie CD18 beschrieben.

1.3.1.5.2 Physiologische Funktion der Fibrozyten

Fibrozyten tragen zur physiologischen Wundheilung bei. Zum einen sekretieren Fibrozyten proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-6, IL-8 und IL-10, zum anderen entwickeln sie einen proangiogenen Phänotyp durch die Sekretion von VEGF, FGF2, IL-8, PDGF und hämatopoetischer Wachstumsfaktoren [52-54]. Durch Freisetzung dieser Faktoren fördern Fibrozyten die Migration, Proliferation und die Bildung von kapillar-ähnlichen Strukturen durch Endothelzellen. Diese Prozesse sind für die Neoangiogenese in der Wundheilung von großer Bedeutung. Zudem exprimieren Fibrozyten Oberflächenmarker zur Antigenpräsentation. Dazu gehören Moleküle des MHC-Klasse-II-Komplexes und die kostimulierenden Moleküle CD80 und CD86 [55]. Bucala et al. suggerierte neben der Funktion in der physiologischen Wundheilung zusätzlich einen Beitrag in einer Reihe pathologischer Prozesse [51]. Mittlerweile wurden Fibrozyten in den jeweiligen Organen verschiedener Fibrose-Tiermodelle (z.B. Lungen-, Leber-, Herz-, Haut- und Niereninsuffizienz) sowie bei menschlichen Krankheiten detektiert [56, 57].

1.3.1.5.3 Nachweis der Fibrozyten

Um die Existenz der Fibrozyten nachzuweisen gibt es mehrere Ansätze. Der Knochenmarks-Ursprung von Fibrozyten wird üblicherweise durch Knochenmarks-Transplantation unter Verwendung von Knochenmark verschiedener Reporter-Mäuse (z.B. ubiquitäre Expression von GFP oder alkalischer Phosphatase) und anschließendem Nachweis von α -SMA oder Kollagen auf Reporter-positiven Zellen belegt [58-60]. Die Knochenmarks-Transplantation stellt jedoch nicht vollständig sicher, dass nur hämatopoetische Zellen den Reporter exprimieren, da auch andere Stammzellen, wie beispielsweise mesenchymale Stammzellen, transplantiert und Reporter-positiv werden können. Idealerweise wird die Knochenmarks-Transplantation mit dem Nachweis von hämatopoetischen Markern wie CD45 oder CD11b auf Reporter-positiven Zellen kombiniert.

Alternativ konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Fibrozyten-Detektion im Durchflusszytometer auch ohne Knochenmarkstransfer durch eine Doppelfärbung spezifischer hämatopoetischer Marker wie CD45, CD11b und CD34

zusammen mit intrazellulärem Nachweis von Kollagen oder α -SMA möglich ist. Durch die Generierung einer Einzelzellsuspension ermöglicht die Durchflusszytometrie auch eine Quantifizierung der Fibrozyten innerhalb des Gewebes [61].

Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits die Existenz der Fibrozyten bei verschiedenen Nierenerkrankungen nachweisen. LeBleu et al. zeigte 2013 mit einer Knochenmarks-chimären α -SMA-Reportermaus, dass 35% der α -SMA-positiven Zellen aus dem Knochenmark und 50% aus residenten Fibroblasten ableitbar sind. Epitheliale und endotheliale Zellen zeigen hingegen nur einen geringen Beitrag [49]. Bei diesen Versuchsreihen wurden die Zellen aus dem Knochenmark jedoch nicht bezüglich ihres Ursprungs zwischen hämatopoetischen Zellen und mesenchymalen Stammzellen unterschieden.

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Studien markierten die Zellen mit hämatopoetischen Markern, hauptsächlich CD45, CD11b und CD34 zusammen mit intrazellulärem Kollagen Typ I. Etwa 20% der Kollagen-positiven Zellen exprimieren den hämatopoetischen Marker CD45, was darauf hinweist, dass diese Zellen hämatopoetischen Ursprungs sind [61]. Unter Verwendung ähnlicher Ansätze wurden auch Knochenmarks-abstammende Kollagen-produzierende Zellen, bzw. Fibrozyten in verschiedenen Nierenfibrose-Modellen wie Alport-Syndrom [49], Adriamycin-induzierter Fibrose [59], IR-Verletzungen [58] und chronischer Angiotensin-Infusion [62] nachgewiesen.

Auch im humanen System wurde bei verschiedenen Arten von Glomerulonephritis und chronischer Nierenerkrankung Fibrozyten unter Verwendung von Pro-Kollagen Typ I und CD45 identifiziert, welche sich hauptsächlich im Interstitium befinden. Die Anzahl der Fibrozyten korreliert mit der Schwere der tubulointerstitiellen Schädigung und Fibrose [63]. Des Weiteren ist bei Patienten mit chronischer Allograft-Nephropathie und einer ausgeprägten interstitiellen Fibrose ein signifikanter Anteil der Myofibroblasten vom Empfänger ableitbar [64].

1.3.1.5.4 Zusammenhang zwischen Monozyten und Fibrozyten

Eine große Diskussion in diesem Bereich beinhaltet die Beziehung zwischen Fibrozyten und Monozyten, basierend auf der Tatsache, dass beide Zelltypen eine Vielzahl identischer Oberflächenmarker exprimieren. *In vitro* Experimente konnten zeigen, dass sich Fibrozyten aus Monozyten entwickeln können. *In vivo* konnte dies aber nicht bestätigt werden. Versuche in unserer Arbeitsgruppe mit Nierenfibrose

induziert durch UUO zeigten schon 3 Tage nach Ureter-Obstruktion eine Zunahme der Anzahl von Monozyten und Fibrozyten. Die Depletion der Monozyten sollte darlegen, ob sowohl die Zahl der Monozyten als auch die Zahl der Fibrozyten im UUO-Modell abnimmt. Hierfür wurde sich die Tatsache zu Nutze gemacht, dass Monozyten CCR2 (chemokine receptor type 2) benötigen, um aus dem Knochenmark zu migrieren. Die Depletion der Monozyten vor Durchführung der UUO unter Verwendung eines Antikörpers gegen CCR2 führte zu einer nahezu vollständigen Abwesenheit der Monozyten in der Niere und der Peripherie, hingegen war kein Unterschied in der Anzahl der Nierenfibrozyten feststellbar. Zusätzlich wurde keine Verbesserung der Fibrose beobachtet. Diese Daten deuten zum einen darauf hin, dass reife Monozyten nicht für die Entwicklung von Fibrozyten *in vivo* oder für die Generierung der Nierenfibrose erforderlich sind. Zum anderen zeigt das schnelle Auftreten von Fibrozyten in der UUO-Niere nach nur 3 Tagen, dass Fibrozyten CCR2-unabhängig in die Niere migrieren, anstatt sich von infiltrierenden Monozyten zu differenzieren. Dabei wird angenommen, dass sich Fibrozyten aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln [65].

1.3.1.5.5 Einfluss auf die Fibrozytenmigration

Derzeit ist noch ungeklärt, welche Faktoren die Fibrozytengenerierung und die Migration aus dem Knochenmark regulieren.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten mittels Blockade der Rezeptoren und Liganden zeigen, dass die Fibrozytenmigration aus dem peripheren Blut in fibrotische Organe von verschiedenen Chemokinrezeptoren, beispielsweise CCR7 und CXCL16, abhängt [66, 67]. Jedoch ist keiner dieser Chemokin-Rezeptoren und Chemokin-Liganden spezifisch für Fibrozyten.

Zusätzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass T-Helferzellen einen Einfluss auf die Fibrozytenmigration haben. Die Abwesenheit von CD4-positiven T-Zellen mündete in eine reduzierte Anzahl von Fibrozyten und weniger Fibrose in UUO-Nieren [61].

Des Weiteren konnte *in vitro* gezeigt werden, dass IL-2, TNF- α , IFN- γ und IL-12 die Fibrozytenentwicklung reduzieren [61, 68]. *In vivo* konnte IL-2 zusammen mit TNF- α diesen Effekt auslösen. Auch die Gabe von humanem Serum-Amyloid P reduzierte die Fibrose im UUO- und IR-Modell [69].

Faktoren, welche die Fibrozytenentwicklung unterstützen, sind TGF- β , Endothelin-1, IL-13, Semaphorin 7A, Angiotensin II Typ 1 Rezeptor und Adiponektin [62, 70-73].

1.3.1.5.6 Bedeutung der Fibrozyten

Insgesamt scheinen Entwicklung, Migration, Überleben und Kollagenproduktion von Fibrozyten strikt geregelt zu sein. Die Rolle dieser Faktoren *in vivo* muss besser definiert werden, um zu verstehen, ob sie direkt auf Fibrozyten oder auf andere Zellen wirken, die dann im Folgenden wiederum Fibrozyten beeinflussen.

Zusammenfassend deuten die bisherigen Daten der verschiedenen Arbeitsgruppen darauf hin, dass Fibrozyten entweder direkt durch die Produktion von EZM oder indirekt durch die Unterstützung der Expansion und Matrixproduktion von residenten Nierenzellen zur Nierenfibrose beitragen. Eine Einschränkung der derzeitigen Studien ergibt sich aus der Unklarheit, wie viel Matrix durch verschiedene Kollagen- oder α -SMA-positive Zelltypen produziert oder sezerniert wird. Absolute oder relative Zahlen dieser Zellen korrelieren nicht notwendigerweise mit der Menge an Matrix oder Kollagen, die von diesen Zellen sekretiert wird. Diese Einschränkung gilt nicht nur für Fibrozyten, sondern auch für andere Zellen wie Myofibroblasten. Generell wäre ein möglicher therapeutischer Ansatz eine Reduktion der Fibrozyten, wobei die genauen Fibrozyten-Funktionen und Zellkommunikationen geklärt werden müssten.

1.3.2 Bedeutung der renalen Fibrose für die Nierenfunktion

Bis heute ist unklar, ob ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Fibrose und chronischem Nierenversagen besteht und ob Fibrose zur Entwicklung chronischer Niereninsuffizienz beiträgt. Dabei sind vier mögliche Theorien zur Bedeutung der Fibrose in Diskussion [6].

1.3.2.1 Fibrose als inertes Füllmaterial

Nach akuter Verletzung kann es möglich sein, dass die Nierenstrukturen nicht wieder vollkommen herstellbar sind. Somit entsteht eine Art Lücke, die durch fibrotisches Gewebe gefüllt und somit ersetzt wird. In diesem Fall würde die Verhinderung der Fibroseentstehung den Verlauf der zugrunde liegenden Erkrankung nicht verbessern.

1.3.2.2 Fibrose als Hindernis für die Regeneration

Ein anderer Ansatz könnte sein, dass bei frühem Auftreten von Fibrose nach akuter oder chronischer Verletzung die vollständige Regeneration der Nierenstrukturen beeinträchtigt wäre. Zudem könnte Fibrose zusätzlich weitere Schäden an der Nierenstruktur bewirken [32, 74]. In diesem Fall wäre die Verhinderung der Fibroseentstehung ein wichtiger Teil der Behandlung.

1.3.2.3 Fibrose als Unterstützung für die Regeneration

Obwohl meist davon ausgegangen wird, dass Fibrose die Nierenstruktur und ihre Funktion beeinträchtigt, könnte es auch möglich sein, dass Fibrose unterstützend auf den Heilungsprozess wirkt. Die Fibrose könnte ein Zwischenzustand im Prozess der Geweberegeneration und sogar für den Wiederaufbau oder den Erhalt von Nierenstrukturen erforderlich sein. Es konnte gezeigt werden, dass Myofibroblasten um verletzte Tubuli entstehen und wieder verschwinden, sobald die tubuläre Regeneration abgeschlossen ist. Dies deutet darauf hin, dass Myofibroblasten, welche die beschädigten Tubuli umgeben, die strukturelle Integrität und Regeneration verletzter Tubuli unterstützen können [75-77]. In diesem Fall wäre die Verhinderung der Fibroseentstehung negativ für den Betroffenen und würde zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion führen.

1.3.2.4 Fibrose als überbleibender Rest nach der Regeneration

Eine letzte Theorie ist, dass fibrotisches Gewebe nach Ausheilen der Primärerkrankung nicht vollständig abgebaut wird. Dadurch würde sich im Laufe der Zeit Bindegewebe ansammeln und die Niere beschädigen. In diesem Fall sollte sich die Behandlung auf die Erhöhung des Gewebeabbaus nach Beendigung der Heilung konzentrieren.

1.4 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Definiert ist die extrazelluläre Matrix als Gesamtheit der Makromoleküle, die interzellulär lokalisiert sind [78]. Sie besteht aus einer Grundsubstanz von Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen, in welche fibrilläre Proteine bzw.

Glykoproteine eingebettet sind (Abb. 1.3). Die Zusammensetzung ist nicht nur organspezifisch und regional innerhalb eines Organs unterschiedlich, sondern unterscheidet sich auch in Abhängigkeit ihrer Funktion. Durch ein komplexes Gleichgewicht und Zusammenspiel dieser Elemente trägt die EZM sowohl statische als auch funktionelle Aufgaben. Es gibt dem jeweiligen Gewebe Stabilität und dient der Verankerung zellulärer Elemente. Die extrazelluläre Matrix ist trotz ihrer Gerüstfunktion nicht statisch, sondern unterliegt ständigen Umbauprozessen. Der Abbau wird durch Proteasen, in erster Linie den Matrix-Metalloproteasen, bewerkstelligt [79]. Der Aufbau erfolgt durch Sezernierung der Komponenten durch umliegende Zellen, welche teilweise über membrangebundene Rezeptoren mit diesen in Verbindung stehen [80]. Als dynamisches Netzwerk hat es Einfluss auf Zelladhäsion, Zellmigration, zelluläre Differenzierungen, Gewebeentwicklung und Remodeling im Zusammenhang mit der Wundheilung und Fibroseentstehung [81, 82]. Während der frühen Phase der renalen Fibrose kann die EZM leicht durch Proteolyse, vermittelt durch Matrix-Metalloproteasen, abgebaut werden. Dies macht die Fibrose zunächst zu einem gewissen Grad reversibel. In diesem Stadium sind die Vorgänge noch vergleichbar mit der physiologischen Wundheilung. Jedoch verändern sich bei andauerndem Entzündungsreiz die Matrixstrukturen. Die Matrixproteine werden zunehmend biochemisch modifiziert, wobei sie durch verschiedene enzymatische Reaktionen quervernetzt werden. Diese, durch Enzyme wie Transglutaminase oder Lysyl-Oxidase katalysierten Vorgänge, stabilisieren die Matrix und machen sie resistent gegen proteolytische Degradation [83].

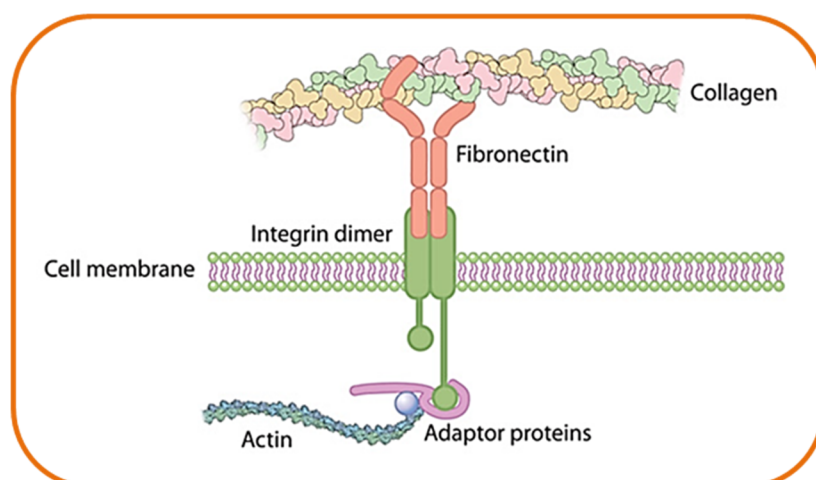


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der extrazellulären Matrix (EZM) [84].

1.4.1 Fibronektin

Fibronektin ist ein ubiquitäres Matrix-Glykoprotein-Dimer mit einer Größe von etwa 500kDa [85]. Das Dimer formt sich durch antiparallele Disulfid Bindungen am C-Terminus der Monomere, welche aus drei Typen sich wiederholender Sequenzen bestehen. Es existieren 12 Isoformen des Fibronektins in Mäusen und 20 in Menschen, die jedoch alle von einem einzigen Gen kodiert werden [86]. Interaktionen von Fibronektin mit anderen Zellen oder Molekülen verlaufen über die Bindung an Integrine, membranständige Rezeptoren. Diese Bindung löst verschiedene mechanische oder chemische Signale aus und resultiert in vielfältigen Funktionen von Fibronektin. Sie reichen von der Mitwirkung an der Embryogenese über die Beteiligung an der Bildung der EZM bis hin zu Beeinflussung des Verhaltens einzelner Zellen hinsichtlich Zelladhäsion, Migration, Proliferation und Differenzierung. Viele Matrixproteine, wie z.B. Kollagen, benötigen Fibronektin für ihren Einbau in die extrazelluläre Matrix. Fibronektin dient hierbei der Verankerung von Kollagen an den Zellen durch die Bindung an Intergrin-Dimere (Abb. 1.3) [85-87].

1.4.2 Kollagen

Kollagen ist ein wichtiger Bestandteil der EZM und ist mit einem Anteil von etwa 30% das am häufigsten vorkommende Protein im Menschen. Bis heute wurden 23 unterschiedliche Kollagentypen, welche auf über 40 Genorten kodiert sind, identifiziert und charakterisiert. Die Kollagene besitzen alle eine hohe Zugfestigkeit und dienen in den meisten Binde- und Stützgeweben (Knorpel, Sehnen und Knochen) der Stabilität. Unterschieden werden die verschiedenen Kollagene durch ihre Lokalisation und Strukturmerkmale der Moleküle, welche mit charakteristischen Anteilen eine Tripelhelixstruktur ausbilden [88].

Den Hauptanteil der Kollagene in den Nieren bilden das Kollagen Typ I und untergeordnet Kollagen Typ III und Typ V, welche alle zu den Fibrillen-bildenden Kollagenen gehören. Fibrilläre Kollagene weisen eine durchgehende Tripelhelixstruktur auf. Die Kollagenfasern bestehen aus mehreren Kollagenfibrillen, welche sich aus Mikrofibrillen zusammensetzen. Kollagen Typ I bildet lange stabile Mikrofibrillen aus Monomeren, dem Tropokollagen, welche aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind (Abb. 1.4, A) [89]. Diese Monomere haben ein Gewicht von etwa 283kDa, eine Länge von ca. 300nm und einen Durchmesser von etwa 1,5nm [90].

Nach der Assemblierung zeigen die Kollagenfibrillen eine typische, sich alle 64-68nm wiederholende Bänderung (D-periodic pattern). Dabei lagern sich die Monomere mit einem Abstand von etwa 67nm versetzt übereinander an, so dass sich in Längsrichtung das nächste Monomer nicht direkt anschließt, sondern eine Lücke von 27nm freigelassen wird (Abb. 1.4, B) [91].

Kollagen I besteht aus zwei α_1 -Ketten und einer α_2 -Kette, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden. Die drei Polypeptidketten bestehen aus einer repetitiven helikalen Domäne aus einem wiederkehrenden Aminosäuretriplet aus Glycin, Prolin sowie meist Hydroxyprolin [92]. Gleichfalls kommt Lysin häufig in den Peptidketten vor. Die Pyrrolidinringe von Prolin- und Hydroxyprolin tragen zur Stabilität der Tripelhelix bei, da sie aufgrund ihrer Größe nur eine geringe Drehung der Helix in sich zulassen. Zudem ermöglicht der elektronegative Sauerstoff des Prolins sowie die Hydroxy-Gruppe des Hydroxyprolins die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, welche die drei Polypeptidketten untereinander verknüpfen. Lysin- und Hydroxylysinreste tragen zur Bildung von kovalenten Bindungen innerhalb und zwischen den Tropokollagenen bei und sind somit für die Zugfestigkeit des Kollagens entscheidend. Neben den helikalen Domänen weisen Tropokollagene auch nicht-helikale Abschnitte auf. Diese befinden sich sowohl am Amino- als auch am Carboxyl-Ende der Peptidketten und werden als Telo peptide bezeichnet [93].

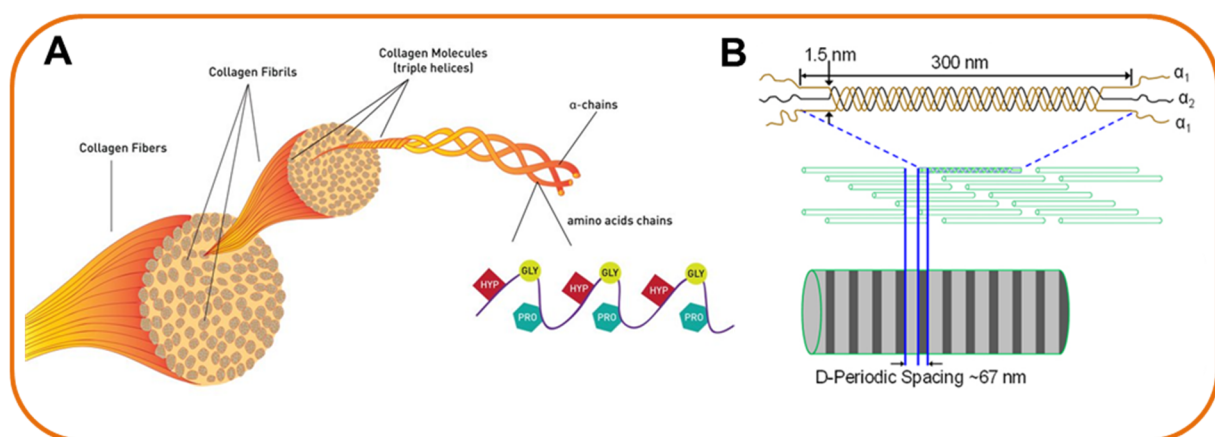


Abb. 1.4 Schematische Darstellung von Kollagen Typ I. (A) Aminosäuresequenz aus Hydroxyprolin (Hyp), Glycin (Gly) und Prolin (Pro), Tripel- α -Ketten formen Kollagenfibrillen. (B) Kollagen Typ I besteht aus zwei α_1 - und eine α_2 -Kette, Versetzter Aufbau ergibt D-periodic pattern mit Abstand von 67nm (modifiziert nach [94]).

1.5 Das Cre/loxP-System

Zur Erforschung der Bedeutung verschiedener Gene besteht die Möglichkeit, das Mausgenom durch zufällige Integration von Transgenen oder gezielt über homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen zu verändern (Abb. 1.6, A) [95]. Ein konventioneller Knock-Out eines Gens hat jedoch oft negative Konsequenzen. Da viele Gene ubiquitär exprimiert werden, führt deren Verlust meist zu schweren Schäden bis hin zu einer embryonalen Letalität. Außerdem kann die zeit- und zelltypspezifische Funktion eines Gens an konventionellen Mutanten nicht analysiert werden. Ziel ist daher die Generierung von Mäusen mit einem zell- oder gewebespezifischen Knock-Out und einer kontrollierten Induktion des Knock-Outs bei einem bestimmten Entwicklungsstadium der Maus.

Deshalb wurden die bisher verfügbaren Methoden zur Modifikation der Gene mit einem Rekombinationssystem kombiniert, das darauf basiert, dass eine Rekombinase einen Austausch zwischen zwei kurzen DNA (deoxyribonucleic acid) Erkennungssequenzen herbeiführt. Das sogenannte Cre/loxP Rekombinationssystem wurde 1987 von Sauer et al. entwickelt [96]. Entdeckt wurde dieses bakterielle System bereits 1981 in den Coliphagen P1 [97]. Dafür nötig sind nur zwei Komponenten. Die eine ist die loxP-Stelle im Genom (locus of crossing over P1), die den Ort der Rekombination festsetzt. Diese 34bp lange loxP-Sequenz besteht neben der zentralen 8bp-Kern-Sequenz aus zwei flankierenden palindromischen 13bp-Sequenzen [98]. Um eine Rekombination zu ermöglichen muss die loxP-Sequenz zweimal im Genom vorkommen. Als zweite Komponente dient die Rekombinase Cre (cyclization recombination). Diese Rekombinase ist ein 38kDA großes Protein aus der Familie der Integrasen und agiert, ohne den Bedarf eines Kofaktors, beschränkt auf loxP-Stellen im Genom [99]. Dabei katalysiert die homotetramere Rekombinase die Exzision des DNA-Abschnittes zwischen den loxP-Stellen. Dafür bindet je ein Cre-Monomer an eine der vier 13-Basenpaar-Sequenzen. Die Cre-Rekombinase kann die Einzelstränge der DNA an der Kern-Sequenz der loxP-Stelle öffnen und mittels Esterbildung wieder verbinden [100]. Mit dem Cre/loxP-System ist es möglich, die DNA in vielerlei Hinsicht zu verändern. Je nach Orientierung der loxP-Stellen zueinander kann die Cre-vermittelte Rekombination eine Inversion, Exzision, Integration oder Translokation der DNA erzeugen.

Um das Cre/loxP-System im murinen System anwenden zu können, sind zunächst zwei verschiedene genetisch veränderte Mauslinien nötig. Bei einer Mauslinie wird das Ziel-Gen durch homologe Rekombination mit loxP-Sequenzen flankiert, wodurch eine sogenannte „gefloxtete Maus“ entsteht. Eine zweite transgene Mauslinie exprimiert die Cre-Rekombinase zelltypspezifisch oder ubiquitär. Durch Kreuzung dieser beiden Tiere entstehen Nachkommen, bei denen das gefloxtete Gen durch die Cre-Rekombinase zelltypspezifisch oder ubiquitär eliminiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Cre/loxP-System ausschließlich die *in vivo* Exzision des Kollagen Typ I Gens in der Maus ausgelöst. Hierfür wurden neben den klassischen ubiquitären Kollagen Knock-Out-Tieren konditionelle Knock-Out Tiere generiert, bei denen der Knock-Out entweder zelltypspezifisch oder zu einem bestimmten Zeitpunkt induziert werden kann. Um dies zu erreichen wurde in Vorarbeiten eine konditionelle Kollagen Typ I Knock-Out Maus hergestellt, bei der die letzten Exone, inklusive der Poly-A-Region der alpha-1 Kette des Kollagen Typ I, mit flox-Signalen versehen sind. Hierfür wurde zunächst das *col1a1*-Gen aus einer C57BL6/J-Genbibliothek isoliert. Anschließend wurden loxP-Sequenzen in die flankierenden Introns von Exon 47 und 51 des Kollagen Gens eingeführt (Abb. 1.5, A). Diese 3'-Exone kodieren für das C-terminale Propeptid und den Poly-A-Schwanz, die für die Tripelhelixbildung bzw. die RNA-Stabilisierung essentiell sind. Die loxP-Stellen wurden nicht am 5'-Ende eingeführt, da die In-Silico-Analyse potentielle regulatorische Sequenzen in dieser Region offenbarte. Das *col1a1*-Genkonstrukt wurde in C57BL6/J-embryonalen Stammzellen (ES) mittels homologer Rekombination eingeführt. Hierfür wurden ES-Zellen mit Hilfe einer Neomycin-Resistenzkassette (neo) positiv durch Behandlung mit Neomycin selektiert und in Mäuse injiziert. Die Neomycinkassette ist mit einer FRT-Sequenz flankiert, welche durch die Flip-Rekombinase erkannt wird. Somit konnte durch Paarung chimärer Mäuse mit Mäusen, die die Flip-Rekombinase exprimieren, die Neomycinkassette zusammen mit der FRT-Sequenz wieder entfernt werden (Abb. 1.5, B). Die Nachkommen wurden untereinander verpaart, um eine Reihe von homozygoten Mäusen zu erzeugen, in denen die Exone 47-51 durch loxP-Stellen flankiert werden (*col1a1^{fl/fl}*). Diese Tiere wurden dann mit verschiedenen sogenannten Cre-Deleter Mäusen verpaart. Der gefloxtete Teil der Kollagen Typ I-DNA wird folglich herausgeschnitten, so dass die Expression des Kollagen Typ I drastisch reduziert wird (Abb. 1.5, C).

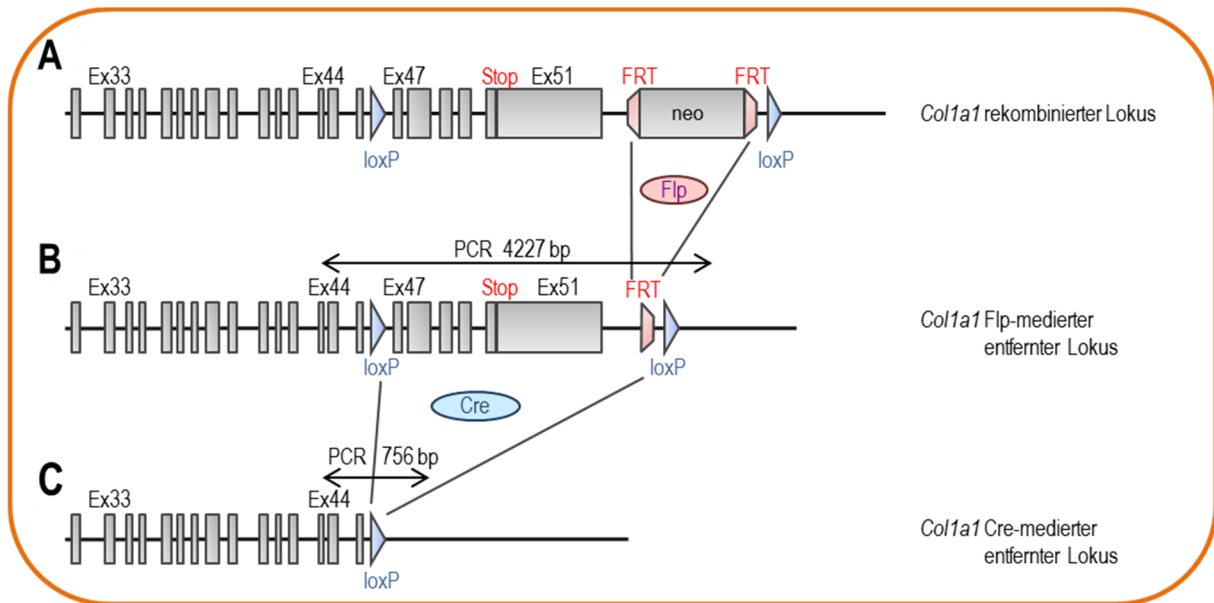


Abb. 1.5 Schematische Darstellung der Generierung einer konditionalen *col1a1*-defizienten Maus. (A) LoxP Stellen wurden durch homologe Rekombination zwischen die Exone (Ex) 46 und 47 und nach dem letzten Exon 51 eingeführt. (B) Die Neomycinkassette wurde durch die Flp-medierte Rekombination entfernt. Die Länge des PCR Produktes beträgt 4227 Basenpaare. (C) Cre-medierte Rekombination führt zu einer Deletion von Exon 47 bis 51. Die Länge des PCR Produktes beträgt nun 756 Basenpaare.

Die verschiedenen Cre-Deleter Mäusen exprimieren die Cre-Rekombinase auf drei verschiedene Arten.

Die erste Mauslinie, genannt Ubi-Cre-Maus, weist eine ubiquitäre Cre-Expression auf. Die Verpaarung mit der geflochten Kollagen Typ I-Maus resultiert in Nachkommen mit einem ubiquitären Kollagen I Knock-Out (Abb. 1.6, B).

Um die Bedeutung der hämatopoetischen Fibrozyten an der Kollagenproduktion analysieren zu können, werden Cre-Mäuse mit einer zelltypspezifischen Cre-Expression in diesen Zellen verwendet, sogenannte CD45-Cre- oder Vav (vav guanine nucleotide exchange factor)-Cre-Mäuse. CD45 und Vav sind beides spezifische hämatopoetische Marker. Durch die Verpaarung mit geflochten Kollagen Typ I-Mäusen resultieren Nachkommen mit einer Defizienz von Kollagen Typ I ausschließlich in hämatopoetischen Zellen (Abb. 1.6, C).

Die dritte Mauslinie enthält eine Liganden-aktivierbare Cre-Rekombinase. Hierbei wird eine Fusion von Cre mit einer mutierten Ligandenbindungsstelle des Östrogenrezeptors (ER^{T2}) durchgeführt. CreERT2-Rekombinasen können spezifisch durch Tamoxifen bzw. dessen aktiven Metaboliten 4-Hydroxytamoxifen aktiviert werden. Durch Verpaarung mit der geflochten Kollagen Typ I-Maus entstehen Nachkommen, bei denen man durch Gabe von Tamoxifen einen ubiquitären

Kollagen Knock-Out in jedem beliebigen Entwicklungsstadium der Maus induzieren kann (Abb. 1.6, D).

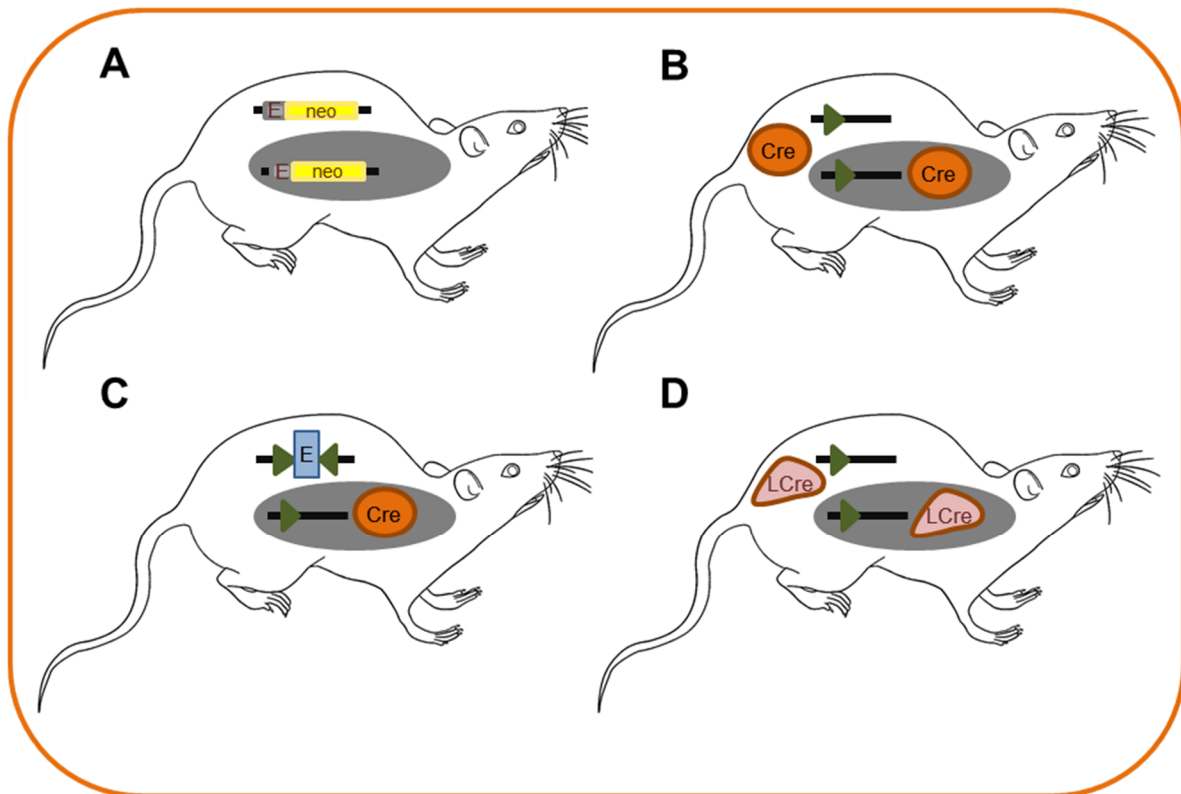


Abb. 1.6 Konventionelle und konditionelle Genmodifikation. (A) Konventionelle Inaktivierung eines Gens durch Einföhrung eines Neomycinresistenzgens (neo) in ein Exon (E). (B) Ubiquitäre Inaktivierung eines Gens durch Exzision eines loxP-flankierten (grünes Dreieck) Exons (Cre im orangenen Kreis). (C) Gewebespezifische/zelltypspezifische Inaktivierung eines Gens durch Exzision eines loxP-flankierten Exons (E) nur in Cre exprimierenden Zellen (graues Oval). (D) Örtliche und zeitliche Regulation der Inaktivierung eines Gens durch Verwendung einer Liganden-aktivierbaren Cre-Rekombinase (LCre, rosa). Die modifizierte Cre-Rekombinase ist zunächst inaktiv und wird erst in Anwesenheit eines synthetischen Liganden aktiviert.

1.6 Tiermodelle der renalen Fibrose

Aktuell ist die Forschung im Bereich der renalen Fibrose stark davon abhängig geeignete Fibrosemodelle in Nagetieren zu generieren. Einige Modelle sind limitiert durch ihren Einsatz von Toxinen, beispielsweise die Adriamycin-Nephropathie. Zum einen sind diese Toxine nicht physiologisch und zum anderen unterscheidet sich die Wirkung auf die Fibrogenese zwischen verschiedenen Mausstämmen [101]. Bei anderen bisher verfügbaren Knock-Out Modellen, wie z.B. $Col4\alpha3^{-/-}$, sterben die Tiere bereits in der frühen postnatalen Phase oder nach nur wenigen Monaten [102].

Darüber hinaus ermöglichen viele Modelle keinen präzisen Vergleich zwischen tierischen Fibrose-Modellen und menschlicher Nierenfibrose.

In der vorliegenden Arbeit wurden sich vier verschiedene Modelle zu Nutze gemacht, um die Rolle der Kollagen Typ I-produzierenden Zellen und des Kollagen Typ I selbst bei der Generierung der Nierenfibrose zu analysieren: die unilaterale Ureterobstruktion, die reversible unilaterale Ureterobstruktion, das Adenin-Modell und ein akuter Verlust an Nephrone.

1.6.1 Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Die UUO, welche die verschiedenen Schlüsselmerkmale der Fibrogenese zusammen mit tubulären Schädigungen reflektiert, ist derzeit das am häufigsten verwendete Fibrose-Modell [103].

Generelles Prinzip der UUO ist eine Hinderung des Urinflusses durch Ligatur des Ureters (Abb. 1.7, A) und dadurch resultierend eine tubuläre Schädigung und ein rascher Einstrom von Leukozyten. Das Modell kann bei verschiedenen gentechnisch veränderten Tieren gleichermaßen verwendet werden.

Dabei liegt ein Vorteil der UUO darin, dass sie innerhalb von 5 bis 14 Tage eine starke und reproduzierbare interstitielle Fibrose verursacht, ohne dass dabei eine Verabreichung von Toxinen nötig ist. Charakteristisch nach Ligatur des Ureters ist zunächst eine Veränderung der renalen Hämodynamik und des Ureterdruckes. Unmittelbar nach Ligatur des Ureters erhöht sich durch eine Vasodilatation initial sowohl der Ureterdruck als auch der renale Blutfluss. Ab etwa 5-stündiger Ligatur resultiert durch eine Vasokonstriktion der gegenteilige Effekt eines dauerhaften Absinkens des Ureterdrucks und Blutflusses [104]. Dies resultiert in einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Gleichzeitig führt der dauerhafte Harnstau zu einer Hydronephrose und letztendlich zur Fibrotisierung der Niere. Eddy et al. zeigte, dass das Modell der UUO alle wichtigen Merkmale der Fibrogenese wie beispielsweise Influx inflammatorischer Zellen, erhöhte Synthese profibrotischer Faktoren und gesteigerte Synthese von EZM-Proteinen zur Folge hat [105].

Ein weiterer Vorteil der UUO ist, dass die Operation zur Ligatur des Ureters relativ einfach und schnell durchführbar ist. Dadurch ist es möglich, diesen Eingriff bei einer großen Anzahl an Tieren an einem Tag durchzuführen. Außerdem bedeutet die kurze

Operationsdauer eine kurze Narkosedauer für die Tiere und somit eine relativ geringe Belastung.

Ein zusätzlicher Vorteil der UUO ist das Vorhandensein einer zweiten unbehandelten Niere (Abb. 1.7, B). Diese dient zum einen als interne Kontrolle und zum anderen dem Überleben mit unauffälligem Phänotyp der Tiere über Monate nach UUO hinweg. Die kontralaterale Niere kompensiert den Funktionsverlust der gestauten Niere durch eine Steigerung ihrer funktionellen Kapazität [106]. Dies wird durch den Vorgang der kompensatorischen renalen Hypertrophie ermöglicht. Dabei erhöht sich nicht die Anzahl der Zellen, sondern es vergrößern sich die einzelnen Zellen infolge eines erhöhten RNA- sowie Proteingehalts. Dadurch wird eine Hyperfiltration der kontralateralen Niere ermöglicht, was eine gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate bedeutet [107, 108].

Die primäre Einschränkung dieses Modells ist das seltene Auftreten von Ureterobstruktionen als Auslöser der Nierenfibrose beim Menschen. Daher müssen die Ergebnisse der UUO mit anderen Fibrosemodellen verglichen werden. Die zweite Einschränkung liegt darin, dass keine Messungen der Rest-Nierenfunktion der geschädigten Niere möglich sind. Dieses Hindernis kann mit der reversiblen UUO umgangen werden.

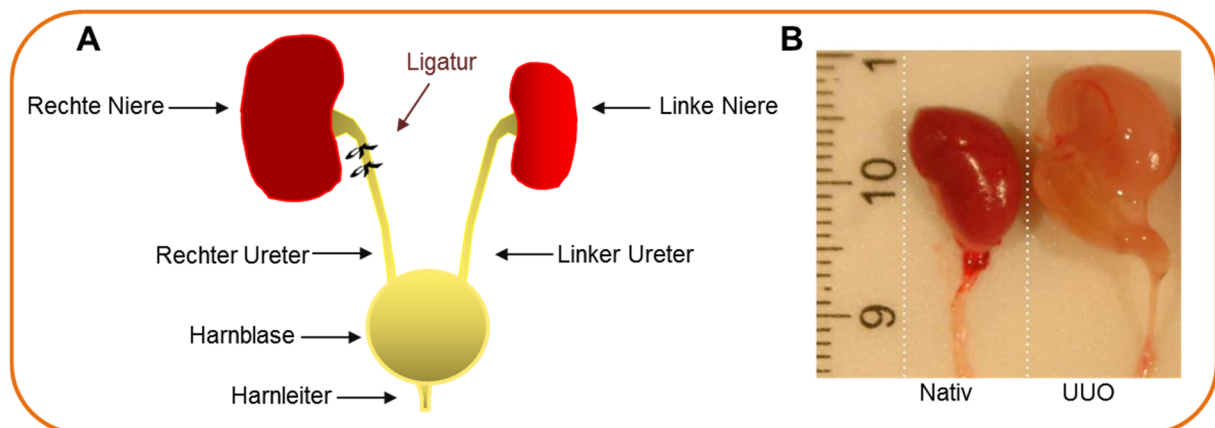


Abb. 1.7 Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO). (A) Schematische Darstellung der UUO. Ligatur des rechten Ureters an zwei Stellen mittels eines nicht resorbierbaren Fadens. Kontralaterale Niere dient als interne Kontrolle. (B) Fotografie von nativen und 7 Tage UUO-Nieren mit Nierenbecken und Harnleiter. Im Vergleich zur nativen Niere erscheint die UUO-Niere hydronephrotisch und blass [109].

1.6.2 Reversible unilaterale Ureterobstruktion (R-UUO)

Das chirurgisch anspruchsvolle Modell der reversiblen UUO bietet erhebliche Forschungspotenziale, da es Untersuchungen von entzündlichen Prozessen und Gewebeeränderungen in einer verletzten und vernarbten Niere nach Entfernung des Schädigungsreizes ermöglicht. So bietet das R-UUO Modell die Möglichkeit, die Auflösung von Nierenfibrose sowie wichtige Aspekte der Gewebereparatur zu erforschen. Zudem dient diese experimentelle Methode der Prognose häufig vorkommender renaler Erkrankungen im humanen System. Dabei weisen Patienten zeitweise eine Obstruktion des Nierentraktes auf, wodurch sich meist eine Beeinträchtigung dieser Niere entwickelt, was zu einem Nierenversagen führen kann [109].

Das Prinzip der reversiblen UUO liegt zunächst in einer vollständigen Obstruktion des Ureters für eine Zeit von sechs Tagen (Abb. 1.8, A). Somit werden fibrotische Prozesse analog zur klassischen UUO induziert. In der Versuchsreihe von Puri et al. überlebten die Tiere deutlich besser, wenn während der Obstruktionsphase die Ureterklemme alle zwei Tage repositioniert wurde. Dadurch werden starke Verletzungen des Ureters vermieden und dieser ist nach Aufhebung der Obstruktion wieder für den Harn durchlässig [110]. Nach sechs Tagen Obstruktion wird diese durch Herausnehmen der Ureterklemme aufgehoben. Eine fünf-tägige Regenerationszeit dient der Auflösung der Hydronephrose, der Dekompression der Niere und der Wiederherstellung des Harnflusses zur Blase (Abb. 1.8, B). Nach dieser Erholungsphase der ehemals gestauten Niere wird die kontralaterale Niere entfernt, um die funktionellen Konsequenzen der obstruktionsbedingten Verletzung zu analysieren. Bei einer Regenerationszeit von weniger als fünf bis sieben Tagen sterben die Tiere an Nierenversagen [110]. Die Entfernung der kontralateralen Niere kann durch Uninephrektomie oder einfacher durch UUO erfolgen.

Die Funktion der ehemals gestauten Niere wird durch Messungen der glomerulären Filtrationsrate bestimmt. Mit dieser Methode kann die Regenerationsfähigkeit verschiedener Genotypen analysiert werden.

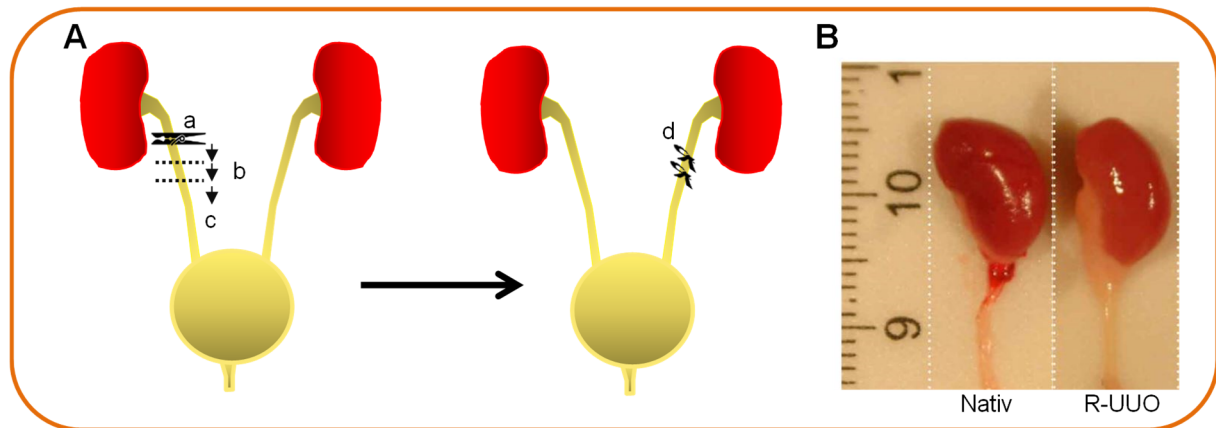


Abb. 1.8 Modell der reversiblen unilateralen Ureterobstruktion (R-UUO) (A) Schematische Darstellung der R-UUO. Setzen der Gefäßklemme an Tag 0 (a), Versetzen der Gefäßklemme an Tag 2 und 4 (b), Gefäßklemme entfernen an Tag 6 (c) und Ligatur der kontralateralen Niere an Tag 11 (d). (B) Fotografie von nativen und R-UUO-Nieren mit Nierenbecken und Harnleiter. Nach Auflösung der Obstruktion dekomprimiert sich die R-UUO-Niere, jedoch bleiben das Nierenbecken und der Harnleiter leicht "sackig" [109].

1.6.3 Adenin-Nephropathie

Adenin-induzierte Nephropathie ist ein Modell der chronischen Nierenfunktionsstörung. Ausgelöst wird diese Störung durch das Füttern von Adenin-reichem Futter über drei Wochen (Abb. 1.9). Adenin ist eine in allen Säugern vorkommende Purin-Base. Unter physiologischen Bedingungen katalysiert das Enzym Phosphoribosyltransferase die Synthese von Adenosinmonophosphat (AMP) aus Adenin und Phosphoribosylpyrophosphat über den sogenannten Purin-Salvage Pathway. Eine übermäßige Verabreichung des Adenins führt zur Substratsättigung. Überschüssiges Adenin wird stattdessen durch die Xanthindehydrogenase zu 2,8-Dihydroxyadenin oxidiert, welches über die Nieren ausgeschieden wird und dort aufgrund seiner geringen Löslichkeit präzipitiert [111-113]. Histologisch sind Ablagerungen von 2,8-Dihydroxyadenin-Kristallkörpern in Tubuli und Interstitium des Nierenkortex erkennbar. Dies führt zum Influx inflammatorischer Zellen, Tubulusobstruktionen und interstitieller Fibrose, sowie deutlicher Abnahme der Nierenfunktion mit erhöhter Retention harnpflichtiger Substanzen [114].

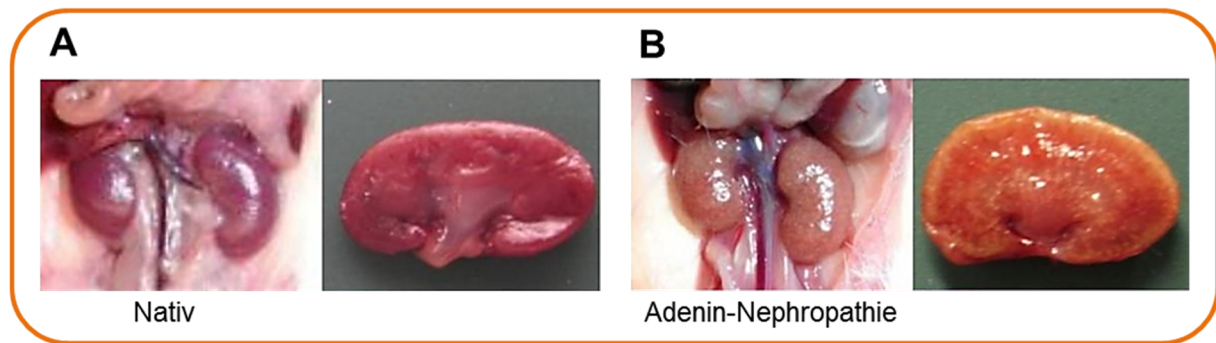


Abb. 1.9 Modell der Adenin-Nephropathie. (A) Fotografie einer nativen Niere im Ganzen und im Querschnitt. (B) Fotografie einer fibrotischen Niere nach drei-wöchiger Adenin-Gabe im Ganzen und im Querschnitt [115].

1.6.4 Modell der kompensatorischen Hypertrophie mit akutem Nephronverlust

Ein weiteres Modell ist eine Kombination aus Adenin-Nephropathie und UUO. Nach einer Schädigung der Nieren durch Adenin wird bei den Tieren eine UUO durchgeführt, um somit einen akuten Verlust von 50% aller Nephrone zu erzeugen. Dies führt wie unter 1.6.1 beschrieben zu einer kompensatorischen Hypertrophie der verbleibenden Niere. Diese Steigerung der funktionalen Kapazität wird durch Messungen der glomerulären Filtrationsrate analysiert.

1.7 Zielsetzung

Interstitielle Fibrose ist ein gemeinsames Merkmal verschiedener Nierenerkrankungen und eng verknüpft mit chronischem Nierenversagen. In den letzten Jahren wurde v.a. durch Abstammungsanalysen gezeigt, dass in der Niere Kollagenproduzierende Zellen aus verschiedenen zellulären Quellen, einschließlich endogenen mesenchymalen Fibroblasten/Perizyten, infiltrierenden hämatopoetischen Zellen (Fibrozyten), tubulären Epithelzellen und endothelialen Zellen abgeleitet werden können. Jedoch gibt es dazu noch viele Kontroversen. Es ist unklar, welchen Beitrag jeder dieser Zelltypen direkt zur Produktion von Kollagen Typ I hat. Insbesondere hämatopoetische Fibrozyten werden oft nur als schwache Kollagenproduzenten oder nur als indirekte Effektoren zur Fibrogenese (z.B. durch Freisetzung profibrotischer Faktoren) angesehen.

Darüber hinaus ist die kritische Frage nach der funktionellen Relevanz der Nierenfibrose nicht eindeutig geklärt. Klinisch bekannt ist, dass eine stärkere

interstitielle Fibrose mit einer schlechteren Nierenfunktion korreliert. Jedoch sehen viele Nephrologen keinen ursächlichen Zusammenhang zwischen Fibrose und Nierenfunktion. Fibrose wird oft als funktionell irrelevanter Ersatz von beschädigtem Nierengewebe betrachtet. Auch unklar ist, ob sich die funktionellen Konsequenzen der Fibrose bei verschiedenen Arten von Nierenerkrankungen unterscheiden.

Die funktionelle Relevanz der Kollagenablagerung kann auch davon abhängen, ob Kollagen von endogenen oder infiltrierenden Zellen produziert wird. Dies kann sowohl an einem zeitlichen Unterschied der Kollagenproduktion durch ein zeitlich verzögertes Einwandern, als auch an einer Ablagerung an anatomisch unterschiedlichen Stellen liegen.

Um diese Fragen zu beantworten, wurden in Vorarbeiten zu dieser Arbeit konditionelle *col1a1*-defiziente Mäuse erzeugt und mit verschiedenen Cre-deleter-Stämmen gekreuzt. Kollagen Typ I ist das vorherrschende extrazelluläre Matrixprotein in der interstitiellen Nierenfibrose. Die Deletion von *col1a1* verhindert die Bildung der Kollagen Typ I-Tripelhelix und resultiert somit in einer starken Reduktion des Kollagengehalts. Für die Versuche zur Verfügung stehen sowohl ubiquitär heterozygote-, ubiquitär induziert- als auch zelltyp-defiziente Kollagen Knock-Out-Mäuse.

Die Mäuse mit einer zelltypspezifischen Defizienz des Kollagens in hämatopoetischen Zellen legen einen Fokus auf die Fibrozyten. Durch das Modell der UUO und Adenin-Nephropathie soll die Bedeutung der Fibrozyten für die Fibrogenese und im Modell der R-UUO die Rolle für die Regeneration analysiert werden.

Zudem soll die Funktion und Bedeutung der Fibrose an sich genauer aufgeklärt werden. Das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit einer Fibrose allein gibt keinen Aufschluss darüber, ob Fibrose vorteilhaft oder schädlich für die Wiederherstellung der Nierenfunktion ist. Um diese Frage zu klären, ist eine Kombination der Nierenfibrosemodelle mit Messungen der Nierenfunktion, der glomerulären Filtrationsrate, nötig. Mittels dieser Messungen sollen die allgemeinen Auswirkungen der Fibrose und der zelltypspezifischen Kollagenproduktion auf die Nierenfunktion, abhängig von der Nierenschädigung, analysiert werden. Ziel ist es letztendlich, Effektorzellen und pathologische Zustände zu identifizieren und zu charakterisieren, bei denen man in den Verlauf der Nierenfibrose eingreifen kann.

2. Material

2.1 Chemikalien

| Bezeichnung | Verwendung | Bezugsquelle |
|-----------------------------------|-----------------------------|---|
| Aceton | Immunfluoreszenz | Merck, Darmstadt |
| Agarose | PCR | Roth, Karlsruhe |
| BD Cytotfix/Cytoperm™ | Intrazelluläre FACS-Färbung | BD Biosciences, Heidelberg |
| BD FACS Lysing Solution | Extrazelluläre FACS-Färbung | BD Biosciences, Heidelberg |
| DEPC-behandeltes Wasser | RT-PCR | Ambion/life technologies, USA |
| 6x DNA Loading Dye | PCR | Thermo scientific, Rockford, USA |
| dNTP Mix, 100 mM | RT-PCR | Natutec, Frankfurt am Main |
| Essigsäure | Histologie | Roth, Karlsruhe |
| Faramount Aqueous Mounting Medium | Histologie | Dako, Jena |
| Fluoromount G mit DAPI | Immunfluoreszenz | eBioscience, San Diego, USA |
| Formaldehydlösung, 4% | Histologie | Uniklinikum Regensburg |
| Methanol | Immunfluoreszenz | Merck, Darmstadt |
| Nuklease-freies Wasser | RT-PCR | Qiagen, Hilden |
| Pepsin Reagenz | Histologie | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| peqGold TriFast | PCR | Peqlab/VWR International GmbH, Erlangen |
| RNasin | RT-PCR | Promega Corporation, |
| Roti-Histokitt-Eindeckmedium | Histologie | Roth, Karlsruhe |
| Roti-Histol | Histologie | Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure, 0,1mol/l | Immunfluoreszenz | Roth, Karlsruhe |

| | | |
|---|-----------------------------|--|
| Saponin | Intrazelluläre FACS-Färbung | Sigma Aldrich, Taufkirchen |
| SuperBlock Blocking Buffer | Immunfluoreszenz | Thermo scientific, Rockford, USA |
| Tissue Tek [®] , OCT [™] Compound | Kryopräparatherstellung | Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Nierlande |
| Wasserstoffperoxid, 3% | Histologie | Merck, Darmstadt |

2.2 Puffer

| Bezeichnung | Zusammensetzung / Bezugsquelle |
|--|--|
| 5x First Strand Buffer | Invitrogen/life technologies, USA |
| 5x Phusion HF Buffer | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| 10x Amplification Buffer mit MgCl ₂ | Genaxxon bioscience, Ulm |
| FACSClean | BD Biosciences, Heidelberg |
| FACSflow | BD Biosciences, Heidelberg |
| FACSRinse | BD Biosciences, Heidelberg |
| Hanks Balanced Salt Solution(HBSS) | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Pepsin-Puffer (1% Pepsin-Reagenz) | 10ml Pepsin Reagent 100ml HCl (0,1mol/l) Auf 1000ml aufgefüllt mit Aqua dest. |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS (10x)) pH 7,4 | 11,5g Na ₂ HPO ₄ 80g NaCl 2g KH ₂ PO ₄ 2g KCl Auf 1000ml aufgefüllt mit Aqua dest. |
| Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE (25x)) | 121 g Trisbase 28,55 ml Eisessig 50ml EDTA (0,5M, pH8) Auf 1000ml aufgefüllt mit Aqua dest. |

2.3 Enzyme

| Bezeichnung | Aktivität | Bezugsquelle |
|-------------------------------------|--------------|-----------------------------------|
| Collagenase Typ I | 0,25-1,0U/mg | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Phusion Hot Start II DNA Polymerase | 2U/μl | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Reverse Transkriptase M-MLV | 200U/μl | Invitrogen/life technologies, USA |
| RNAse A | 700U/ml | Qiagen, Hilden |
| Taq DNA-Polymerase | 5U/μl | Genaxxon bioscience, Ulm |

2.4 Antikörper

| Antikörper | Spezifität | Konjugat | Klon | Konzentration | Bezugsquelle |
|--|------------|-----------------|------------|---------------|----------------------------------|
| CD45 | Maus | FITC | 30-F11 | 0,5mg/ml | Biolegend, San Diego, USA |
| CD11b | Maus | PE | M1/70 | 0,2mg/ml | Biolegend, San Diego, USA |
| Kollagen I | Maus | Biotin | 7G5D2 | 1mg/ml | Chondrex, Redmond, USA |
| Isotypkontrolle zu Kollagen I | Ratte | Biotin | R35-95 | 1mg/ml | BD, Heidelberg, Germany |
| Streptavidin | Biotin | APC | - | 0,2mg/ml | BDBiosciences, Heidelberg |
| Kollagen I | Maus | - | polyklonal | 1mg/ml | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| α-SMA | Maus | - | E184 | 10mg/ml | Biocare Medical, Concord, USA |
| Fibronectin | Maus | - | polyklonal | 1mg/ml | Sigma Aldrich, Steinheim |
| F (ab') ₂ fragment of goat antirabbit IgG | Kaninchen | Alexa Flour 594 | polyklonal | 2mg/ml | life technologies, USA |

2.5 Primer

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|-----------------------------------|
| Desoxyribonukleotide (A, T, C und G) | Promega, Fitchburg, USA |
| Oligonukleotide/Oligo(dT) ₂₀ | Invitrogen/life technologies, USA |
| Primer 80011 cre-MAC1 (PCR für Kollagen) 5' CCT GTC TTG TCC CCT CCT CTC TTT TAG G 3' | Eurofins Genomics, Ebersberg |
| Primer 80012 cre-MAC1 (PCR für Kollagen) 5' CTC AGT CCC TGT TTC TGC TGC TTG AAT 3' | Eurofins Genomics, Ebersberg |
| Primer β -Aktin Fgf23 for #26 (qPCR) 5' TAT GGA TCT CCA CGG CAA C 3' | Eurofins Genomics, Ebersberg |
| Primer β -Aktin Fgf23 rev #26 (qPCR) 5' GTC CAC TGG CGG AAC TTG 3' | Eurofins Genomics, Ebersberg |
| Primer Kollagen mCol1 for (qPCR) 5' TGT TCA GCT TTG TGG ACC TC 3' | Eurofins Genomics, Ebersberg |
| Primer Kollagen mCol1 rev (qPCR) 5' TCA AGC ATA CGG GTT TC 3' | Eurofins Genomics, Ebersberg |
| Primer Fibronektin (qPCR) 5' TCC AGC CCC ACC CTA CAA GT 3' | Eurofins Genomics, Ebersberg |
| Primer rev-Fibronektin (TaqMan-PCR) 5' CCA GAC CAA ACC ATA AGA CA 3' | Eurofins Genomics, Ebersberg |
| GeneRuler 100bp DNA Ladder | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| GeneRuler 1kbp DNA Ladder | Thermo Scientific, Waltham, USA |

2.6 Farbstoffe

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|--------------------------|
| Anilinblaulösung | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Beize (Bouin's Solution) | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsinlösung | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Eosin-G-Lösung 0,5% | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Mayers Hämalaulösung | Merck, Darmstadt |

| | |
|---|-----------------------------------|
| Phosphormolybdänsäurelösung | Sigma Aldrich, Steinheim |
| Phosphorwolframsäurelösung | Sigma Aldrich, Steinheim |
| SYBR Green (in QuantiTect SYBR Green PCR Kit) | Qiagen, Hilden |
| SYBR Safe | Invitrogen/life technologies, USA |
| Weigerts Eisen-Hämatoxylin Lösung A und B | Sigma Aldrich, Steinheim |

2.7 Arzneistoffe

| Wirkstoff | Verwendung | Konzentration | Hersteller |
|-------------------------|---------------------|---------------|-------------------------------|
| Atipamezolhydrochlorid | Antagonist | 5mg/ml | Vetoquinol, Ravensburg |
| Fentanylcitrat | Narkose | 0,1mg/ml | Janssen, Beerse, Belgien |
| Flumazenil | Antagonist | 0,5mg/ml | Hexal, Holzkirchen |
| Medetomidinhydrochlorid | Narkose | 1mg/ml | Vetoquinol, Ravensburg |
| Midazolam | Narkose | 1mg/ml | Rotexmedica, Trittau |
| Naloxonhydrochlorid | Antagonist | 0,4mg/ml | Ratiopharm, Ulm |
| Tamoxifencitrat | Cre-Induktion | 400mg/kg | Harlan Laboratories, Rossdorf |
| Dexpanthenol | Augenschutz bei OPs | 5% | BAYER, Leverkusen |

2.8 Kits

| Bezeichnung | Verwendung | Bezugsquelle |
|----------------------------------|---------------|----------------|
| Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit | DNA-Isolation | Qiagen, Hilden |
| Qiagen RNeasy mini Kit (250) | RNA-Isolation | Qiagen, Hilden |

2.9 Sonstige Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Verwendung | Bezugsquelle |
|--|--------------------------|---|
| 384-well Mikrotiterplatte, transparent | qPCR | Applied Biosystems, Darmstadt |
| AccuCheck Counting Beads | FACS-Analyse | Invitrogen/life technologies, USA |
| Cell-Strainers, 70nm | Vereinzelung der Zellen | Falcon / Corning Inc., Tewksbury, USA |
| Cell-Strainers, 40nm | Vereinzelung der Zellen | Falcon / Corning Inc., Tewksbury, USA |
| Deckgläser 24x24mm | Histologie | Roth, Karlsruhe |
| Einmalskalpell (No. 10, No.11) | Präparation von Gewebe | Pfm, Köln |
| Einmalspritzen (1 ml) | Injektionen | BD Biosciences, Heidelberg |
| Insulinspritzen 1ml, 27G | GFR-Messung | BD Medical, Heidelberg |
| Kanülen 27G | GFR-Messung | BD Medical, Heidelberg |
| Kapillaren, Minicaps, 0,5µl | GFR-Messung | Hirschmann, Eberstadt |
| Kapillaren, Minicaps, 5µl | GFR-Messung | Hirschmann, Eberstadt |
| Liquid Blocker – Super PAP Pen (Fettstift) | Immunfluoreszenz | Science Services, München |
| Objektträger SuperFrost Plus | Histologie | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Reagenzröhre mit Schraubverschluss, Polypropylene, konisch, 50 ml, 15 ml | Zellbiologische Methoden | Sarstedt, Nümbrecht |
| Reagenzröhre, Polystyrene, Rundboden, 5 ml | FACS-Analyse | BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich |

2.10 Operationsmaterialien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|--|--------------------------------|
| Dumont #7 Pinzette 11,5cm | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Extra feine Graefe Pinzette, gebogen, 10cm | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Extra feine Schere, gerade, 8,5cm | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Graefe Pinzette, gerade, 10cm | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Lexer-baby Schere, gebogen, 10cm | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Semken-Pinzette, gebogen, 13cm | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Semken-Pinzette, gerade, 13cm | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Retraktor, stumpf, 2,5cm | Fine Science Tools, Heidelberg |
| Novosyn resorbierbares chirurgisches Nahtmaterial, geflochten, 4/0 | Braun, Melsungen |
| Optilene nicht resorbierbares monofiles Nahtmaterial 5/0 | Braun, Melsungen |

2.11 Geräte

| Bezeichnung | Verwendung | Hersteller |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Nanodrop 2000c und 3300 | DNA, RNA-Messungen, GFR-Messungen | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| PCR thermal cycler Mastercycler pro | PCR | Eppendorf AG, Hamburg |
| Geldokusystem Quantum 100 | PCR | Vilber Lourmat SAS, Frankreich |
| ChemiDoc XRS+ Imaging System | PCR | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| ViiA 7 Real-Time PCR system | qPCR | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| FACS Canto II | FACS-Analyse | BD Biosciences, Heidelberg |
| Mikroskop AxioStar plus | Histologie | Zeiss, Oberkochen |
| Mikroskop AxioObserver.Z1 | Immunfluoreszenz | Zeiss, Oberkochen |

2.12 Software

| Bezeichnung | Verwendung | Herausgeber |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| BD FACSDiva Software 8.0.1 | FACS-Analyse | BD Biosciences, Heidelberg |
| Carl Zeiss AxioVision Rel.4.8.1 | Histologie | Zeiss, Oberkochen |
| GraphPad Prism 5 | Statistische Auswertung | GraphPad Software Inc., La Jolla, USA |
| Image Lab 5.2 | PCR | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA |
| Meta Imaging Series 4.6 (MetaMorph) | Histologie | Molecular devices, USA |
| NanoDrop2000 und 3300 | DNA, RNA-Messungen, GFR-Messungen | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| QuantumCapt | PCR | Vilber Lourmat SAS, Frankreich |
| ViiA 7 | qPCR | Life technologies, USA |

2.13 Versuchstiere

| Stamm | Abkürzung | Herkunft |
|--|-------------------------|---|
| CH57BL/6J (CD45.1) | WT / CD45.1 | Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA |
| B6.Cg-Tg(Vav1-cre)A2Kio/J | Vav-Cre | Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA |
| B6.129-Gt(ROSA)26Sortm1(cre/ERT2)Tyi/J | ERT2-Cre | Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA |
| CD45 ^{wt/cre} (Hintergrund C57BL/6J) | CD45 ^{wt/cre} | A. Medvinsky Universität Edinburgh, GB |
| Ubi-Cre (Hintergrund C57BL/6J) | Ubi-Cre | Genoway (Lyon, France) |
| col1a1 ^{fl/fl} (Hintergrund C57BL/6J) | col1a1 ^{fl/fl} | Genoway (Lyon, France) |

3. Methoden

3.1 Tierexperimente

3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Alle Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen im Tierstall des Universitätsklinikums Regensburg untergebracht und gezüchtet. Der Hell-Dunkel-Rhythmus folgte einem 12-Stunden-Wechsel, die Temperatur betrug konstant $21^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ und die Luftfeuchtigkeit lag konstant bei 60%. Nahrung und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Für die Versuche wurden nur weibliche Mäuse im Alter von 10-12 Wochen verwendet. Alle Experimente wurden von der „Regierung der Oberpfalz“ genehmigt und in Übereinstimmung mit den institutionellen Richtlinien durchgeführt.

Für die Induktion der Cre-Expression in ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen wurden diese Tiere im Alter von 12 Wochen mit Tamoxifen-angereichertem Futter mit einer Konzentration von 400mg/kg für fünf Wochen gefüttert. Diese Tiere standen nach einer Auswaschphase von zwei Wochen für Versuche zur Verfügung.

3.1.2 Generierung Knochenmarks-chimärer Mäuse

Um eine spezifische Deletion des Kollagen Typ I in den hämatopoetischen Zellen zu erreichen, wurden sogenannte Knochenmarks-chimäre Mäuse generiert (Abb. 3.1). Zunächst wurden hierfür die Spendertiere wie unter 3.1.1 beschrieben mit Tamoxifen behandelt. Als Donoren wurden ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Tiere und col1a1^{fl/fl}-Kontrollen verwendet, welche alle den Oberflächenmarker CD45.2 tragen. Als Empfängertiere wurden CD45.1 C57BL/6J Wildtypmäuse am Tag des Knochenmarkstransfers letal mit 9,5 Gray bestrahlt und durch intravenösen Transfer von 4×10^6 Knochenmarkszellen, gewonnen aus den Oberschenkelknochen der Spendertiere, rekonstituiert. Nach einer Rekonstitutionsperiode von 8 Wochen wurde bei diesen chimären Tieren eine UO durchgeführt. Die Entwicklung der Spenderzellen wurde an Tag 14 nach UO mittels Durchflusszytometrie-Analyse (siehe 3.3) überprüft. Hierfür wurden Zellen mit Antikörpern gegen CD45.1 und CD45.2 gefärbt und der Chimärismus analysiert.

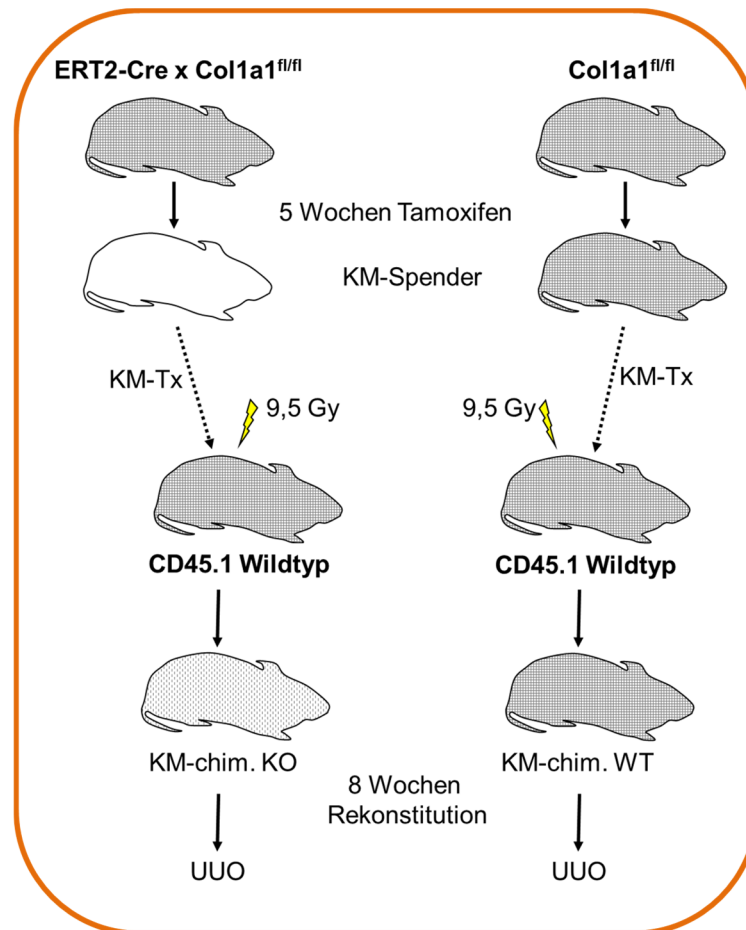


Abb. 3.1 Generierung Knochenmarks-chimärer Mäuse mittels Knochenmarks-Transplantation: Spendermäuse ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl} oder col1a1^{fl/fl}-Mäuse behandelt mit Tamoxifen; Empfänger CD45.1 C57BL/6J-Mäuse bestrahlt mit 9,5 Gray; nach 8 Wochen Rekonstitution Durchführung der UUO.

3.1.3 Modell der renalen Fibrose

3.1.3.1 Unilaterale Ureterobstruktion

An Tag 0 wurde bei den Versuchstieren eine unilaterale Ureterobstruktion durchgeführt. Zunächst wurde hierfür eine antagonisierbare Narkose bestehend aus Fentanyl (0,05mg/kg), Midazolam (5mg/kg) und Medetomidin (0,5mg/kg) eingeleitet, welche mittels fehlendem Zwischenzehreflex überprüft wurde. Um Unterkühlungen der Mäuse zu vermeiden, lagen diese in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (28°C). Zudem wurden ihre Augen mit einer Dexpanthenol-haltigen Salbe benetzt um Austrocknungen dieser zu vermeiden. Durch einen 5mm langen medianen Abdominalschnitt wurde die Bauchdecke und das Peritoneum geöffnet. Durch Einsetzen von vier Wundhaken konnte der Ureter unter einem Operationsmikroskop (10-fache Vergrößerung) sichtbar gemacht und frei präpariert werden. Der rechte

Ureter wurde an zwei Stellen im Abstand von 2-3mm mit einem nicht resorbierbaren Faden ligiert. Anschließend wurde das Peritoneum mit einem nicht resorbierbaren 4-0-Faden und die Bauchdecke mit einem resorbierbaren 5-0-Faden sowie unter Anwendung von Einzelknopfnähten verschlossen. Durch eine subkutane Injektion des Antagonisten, bestehend aus Naloxon (1,2mg/kg), Flumazenil (0,5mg/kg) und Atipamezol (2,5mg/kg), wurde die Narkose aufgehoben. Die Aufwachphase erfolgte beobachtet unter Rotlichtwärme. An Tag 7 oder 14 nach UUO erfolgte die Organentnahme zur weiteren Analyse.

3.1.3.2 Reversible UUO

Um Aufschluss über die Nierenfunktion nach Induktion einer renalen Fibrose zu erhalten, wurde an Mäusen das Modell der R-UUO angewandt. Zunächst wurde hierfür an Tag 0 analog zur Vorgehensweise der UUO gearbeitet. Um die Reversibilität sicher zu stellen, wurde jedoch im Gegensatz zur UUO der Ureter mittels einer versetzbaren Gefäßklemme und nicht mittels Fadens ligiert. Um zu verhindern, dass das Uretergewebe an der ligierten Stelle zu stark beschädigt worden wäre und somit eine Durchgängigkeit des Ureters nach Entfernen der Klemme und somit eine Regeneration der Niere beeinträchtigt gewesen wäre, wurde die Gefäßklemme an Tag 2 und 4 repositioniert. An Tag 6, somit nach einer Obstruktion von insgesamt sechs Tagen, wurde die Gefäßklemme und somit die Ligatur entfernt. Um ausschließlich die Nierenfunktion der ehemals ligierten Niere messen zu können, wurde an Tag 11, demnach nach 5 Tagen der Regeneration, die kontralaterale Niere durch eine klassische UUO ligiert [110]. GFR-Messungen (beschrieben unter 3.1.4) wurden basal, am Tag nach Ligatur der kontralateralen Niere und mehrmals im weiteren Versuchsverlauf durchgeführt. Der basale Messwert wurde rechnerisch auf eine Niere bezogen.

3.1.3.3 Adenin-Nephropathie

Die Adenin-Nephropathie wurde durch ausschließliches Füttern einer Adenin-haltigen Spezialdiät mit einem Zusatz von 0,2% Adenin über einen Zeitraum von drei Wochen induziert. Um die Mäuse während des Versuchsverlaufs überwachen und um eine gleichmäßige Aufnahme des Futters gewährleisten zu können, wurden die Mäuse

einmal wöchentlich gewogen. Nach Absetzen der Adenindiät bekamen die Versuchstiere für sechs Wochen Standardfutter, bevor der Versuch beendet wurde und die Organentnahme für Histologien und qPCR-Analysen erfolgte. Um den Effekt des Adenins auf die Nierenfunktion verschiedener Mausstränge analysieren zu können, wurde basal und in Woche eins, drei und sechs nach Adeningabe die GFR gemessen.

3.1.3.4 Modell der kompensatorischen Hypertrophie

Als Modell der kompensatorischen Hypertrophie fand das Modell der Adenin-induzierten Nephropathie in Kombination mit einer UUO Verwendung, wodurch ein akuter Nephronverlust induziert wurde. Verschiedene Mausstränge wurden zunächst wie unter 3.1.3.3 beschrieben mit Adenin gefüttert, um eine Fibrose zu induzieren. Sechs Wochen nach Beendigung der Adenindiät wurde eine UUO durchgeführt. Mittels mehrmaliger Messungen der GFR post UUO wurde der Effekt der kompensatorischen Hypertrophie analysiert.

3.1.4 Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Das Prinzip der Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate beruht auf der „Single-Shot-Clearance“-Methode, wobei eine fluoreszierende Substanz in den retrobulbären Venenplexus injiziert und anschließend dessen Elimination verfolgt wird [116].

Hierfür wurde das fluoreszierende Fluorescein isothiocyanate (FITC)-Sinistrin verwendet. Sinistrin ist ein in den Zwiebeln von *Urginea maritima* vorkommendes Polysaccharid und dient dort als Energiespeicher. Als GFR-Marker eignet sich diese biologische inaktive Substanz, da diese in den Glomeruli frei filtriert, im Tubulus weder resorbiert noch sezerniert und vollständig renal durch glomeruläre Filtration ausgeschieden wird. Während einer leichten Narkose mit Isofluran wurde den Mäusen eine 1%-FITC-Sinistrin-Lösung mit der Menge von 3,74µl pro Gramm Körpergewicht retrobulbär injiziert. Zu den Zeitpunkten 3, 7, 10, 15, 35 und 75 Minuten nach der Injektion wurde aus der Schwanzvene 5µl Blut mittels Punktion entnommen, in Na⁺-heparinisierte Kapillaren überführt und anschließend bei 1200 g für 7 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde 1:10 mit 0,5M HEPES Puffer (pH7,4) verdünnt und die Fluoreszenz bei einer Anregung von 480nm und

einer Emission von 520nm vermessen. Um die Konzentration des Sinistrin bestimmen zu können, wurde die Fluoreszenz einer Standardreihe aus 1% FITC-Sinistrin mit den Verdünnungen von 1:100, 1:500, 1:1000 und 1:2000 vermessen. Die Berechnung der GFR erfolgte durch Verwendung des Zwei-Kompartiment-Modells. Die Konzentrations-Zeitkurve (Abb. 3.2) zeigt hierbei zwei exponentielle Abfälle des injizierten FITC-Sinistrin auf: ein erster schneller Abfall (A), welcher gekennzeichnet ist durch eine Umverteilung des Fluoreszenzstoffes vom intravaskulären in den extrazellulären Raum, und ein zweiter langsamerer Abfall (B), der dessen renale Ausscheidung beschreibt. Die GFR berechnet sich folge dessen aus folgender Gleichung:

$$GFR = I/(A/\alpha + B/\beta)$$

Dabei stellt I die Menge des injizierten FITC-Sinistrins dar. A und B ergeben sich jeweils aus den Schnittpunkten der y-Achse mit den Graphen der Exponentialfunktion und α bzw. β sind die jeweiligen Senkungskonstanten des exponentiellen Abfalls (Abb. 3.2). Anschließend wurde die GFR noch auf das Körpergewicht (KGW) der Maus in Gramm bezogen. Somit wurde die GFR pro 100g KGW berechnet.

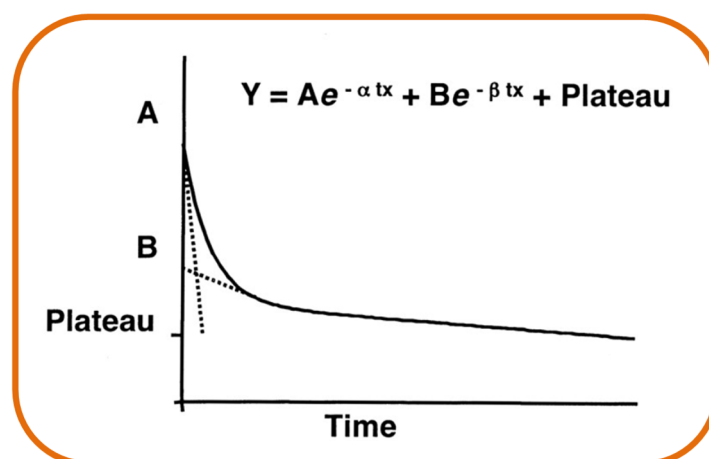


Abb. 3.2 Konzentrations-Zeitkurve der „Single-Shot Clearance“-Methode [117].

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Entnahme von peripherem Blut

Mäusen, welche unter einer antagonisierbaren Narkose (beschrieben unter 3.1.3.1) schliefen, wurde mittels einer Heparin-beschichteten Kapillare retrobulbär Blut entnommen. Das entnommene Blut wurde mit 0,1M EDTA vermengt und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert.

3.2.2 Präparation von murinen Nierenzellen

Am Ende jedes Versuchansatzes wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und anschließend ihr Fell mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach Öffnen des Bauchraumes konnten die Nieren frei präpariert und entnommen werden. Die Nierenkapseln wurden vorsichtig entfernt und die Nieren anschließend gewogen. Mit einem Skalpell wurden die Nieren für die unterschiedlichen Analysemethoden unterteilt. Dabei wurde jeweils 1/4 der Nieren für kryokonservierte Schnitte und 1/4 für Paraffinschnitte wie unter 3.5 beschrieben verarbeitet. Je nach Fragestellung wurde zusätzlich 1/16 Nieren für DNA-Isolation und somit 1/16 oder 1/8 Niere für RNA-Isolation separiert. 3/8 Nieren wurden für die Durchflusszytometrie benötigt.

3.3 Durchflusszytometrische Zellsortierung

Zur Charakterisierung von Zellen in Einzelzellsuspensionen hinsichtlich Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung wurde die Technik der FACS (fluorescence activated cell sorting)-Analyse verwendet. Diese Methode basiert zum einen auf der Messung der Streulichteigenschaft von Zellen, zum anderen auf der Bindung Fluorochrom-gekoppelter Antikörper an das für sie spezifische Oberflächenantigen. Die Antikörperfärbung kann direkt oder indirekt erfolgen. Direkt bedeutet Kopplung mit einem Fluorochrom-gebundenen Antikörper an das Antigen in oder auf der Zelle. Bei der indirekten Markierung werden die gebundenen Antikörper der Zelle mit einem fluoreszenzkonjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Indirekte Markierungen dienen oft der Signalverstärkung. Im Durchflusszytometer werden die markierten Zellen zusammen mit einer speziellen Trägerflüssigkeit mittels hydrodynamischer Fokussierung einzeln durch einen

Laserstrahl angeregt und erzeugen so charakteristische Streu- und Fluoreszenzsignale. Über Linsen, Spiegel und ein Filtersystem wird die Strahlung auf Fotodetektoren geleitet, verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das Vorwärtstreulicht (forward scatter, FSC), welches bei 180° gemessen wird, liefert Informationen über die Größe der Zellen, während das Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC), welches bei 90° gemessen wird, Informationen über deren Granularität liefert. Die Fluoreszenz des gebundenen Fluorochroms wird ebenfalls durch das Seitwärtstreulicht detektiert. Dabei ist die Lichtmenge direkt proportional zur Zahl der Antikörper markierten Epitope, so dass die Lichtemission (mittlere Fluoreszenzintensität, MFI) umso höher ist, je zahlreicher die entsprechenden Antigene exprimiert werden.

3.3.1 Extra- und intrazelluläre Färbung zur FACS-Analyse

Zur Probenvorbereitung wurden die in 3.2.2 beschriebenen 3/8 Nierenstücke zunächst gewogen, um am Ende das Verhältnis von eingesetzter zu kompletter Niere berechnen zu können. Nach starker Zerkleinerung mittels Skalpell wurden die Gewebeteile in 5ml Kollagenase I mit einer Konzentration von 1mg/ml in Hanks Balanced Salt Solution (HBBS) aufgenommen. Die Inkubation von 30 Minuten bei 37°C in einem Rotator diente dem Anverdau des Gewebes und somit einer erleichterten Isolation der Zellen aus dem Zellverband. Um eine Einzelzellsuspension zu generieren, wurden die anverdauten Nierenstücke vorsichtig mit Hilfe eines 2ml-Spritzenstempels durch ein Nylonsieb mit einer Maschenweite von $70\mu\text{m}$ gedrückt, welches mit 5ml eisgekühltem HBSS gespült wurde. Durch die weitere Verdünnung mit HBSS und dem Arbeiten auf Eis wurde die Kollagenase inaktiviert, um einen weiteren Verdau zu verhindern. Die Zellsuspension wurde nach einem Zentrifugationsschritt (1600 rpm, 7min, 4°C) und Absaugen des Überstandes über ein weiteres Nylonsieb mit $40\mu\text{m}$ Maschenweite gefiltert. Es folgte ein Spülschritt mit insgesamt 5ml PBS und einer anschließenden Überführung der Suspension in FACS-Röhrchen. Nach einer weiteren Zentrifugation (1600 rpm, 7min, 4°C) stand das Sediment für FACS-Färbungen zur Verfügung. Zunächst wurde eine extrazelluläre Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern mit einer Inkubation von 20 Minuten bei 4°C durchgeführt. Hierbei wurden stets die Antikörper anti-CD45 (FITC) und anti-CD11b (PE) verwendet. Bei Knochenmarks-chimären Mäusen

wurden zur Detektion des Chimärismus zusätzlich anti-CD45.1 (PB) und anti-CD45.2 (AmCyan)-Antikörper zugegeben. Durch einen Waschschrift mit 4ml PBS wurde die Färbung abgestoppt. Die Zellen wurden erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen resuspendiert. Da im nächsten Schritt eine intrazelluläre Färbung zur Detektion des Kollagens Typ I vollzogen wurde, mussten die Zellen permeabilisiert und somit für den Antikörper durchlässig gemacht werden. Hierfür wurde die Zellsuspension 20 Minuten mit 150µl Cytotfix/Cytoperm von BD behandelt. Dies diente neben einer zusätzlichen Fixierung der bereits gefärbten Oberflächenmoleküle auch der Lyse der störenden Erythrozyten. Abgestoppt wurde zur Aufrechterhaltung der Poren mit einer 0,1%igen Saponinlösung. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt erfolgte die 50-minütige intrazelluläre Färbung mit dem biotinylierten Kollagen Typ I Antikörper oder dessen Isotyp. Nach einem weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritt mit Saponin wurde das APC-konjugierte Streptavidin zur Detektion des Kollagen I-Antikörpers für 35 Minuten zugegeben. Nach einem letzten Waschschrift mit Saponin erfolgte die Analyse der Zellsuspension im Durchflusszytometer.

3.3.2 Quantifizierung durchflusszytometrischer Analysen

Für die Vergleichbarkeit der prozentualen Verteilung von verschiedenen Zellpopulationen wurde innerhalb eines Versuches immer die gleiche Anzahl an Gesamtevents aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FACSDiva von BD. Die erfassten Daten wurden in Form einer korrelierten Zweiparameterdarstellung als Punktediagramm (dot plot) abgebildet. Jeder Punkt steht dabei für eine Zelle mit ihren beiden Eigenschaften. Durch Eingrenzung der Zellpopulationen (Gate) wurde die Quantifizierung ermöglicht. Um das Gesamtverhältnis der jeweiligen Population bezogen auf die Gesamt-Niere zu berechnen, wurde die Gatingstrategie wie unter Abbildung 3.3 dargestellt genutzt. Zunächst wurden hierbei die Zell-Dupletten eliminiert (Abb. 3.3, A, I) und anschließend die Lymphozyten identifiziert (Abb. 3.3, A, II). Als Kollagenpartikel wurden eine intrazellulär Kollagen-positive und CD45-negative Population (Abb. 3.3, B, III); als Fibrozyten eine intrazellulär Kollagen-positive und CD45-positive Population (Abb. 3.3, B, IV) identifiziert. Kollagenpartikel und Fibrozyten waren nur in der UUO-Niere, nicht in der kontralateralen Niere feststellbar.

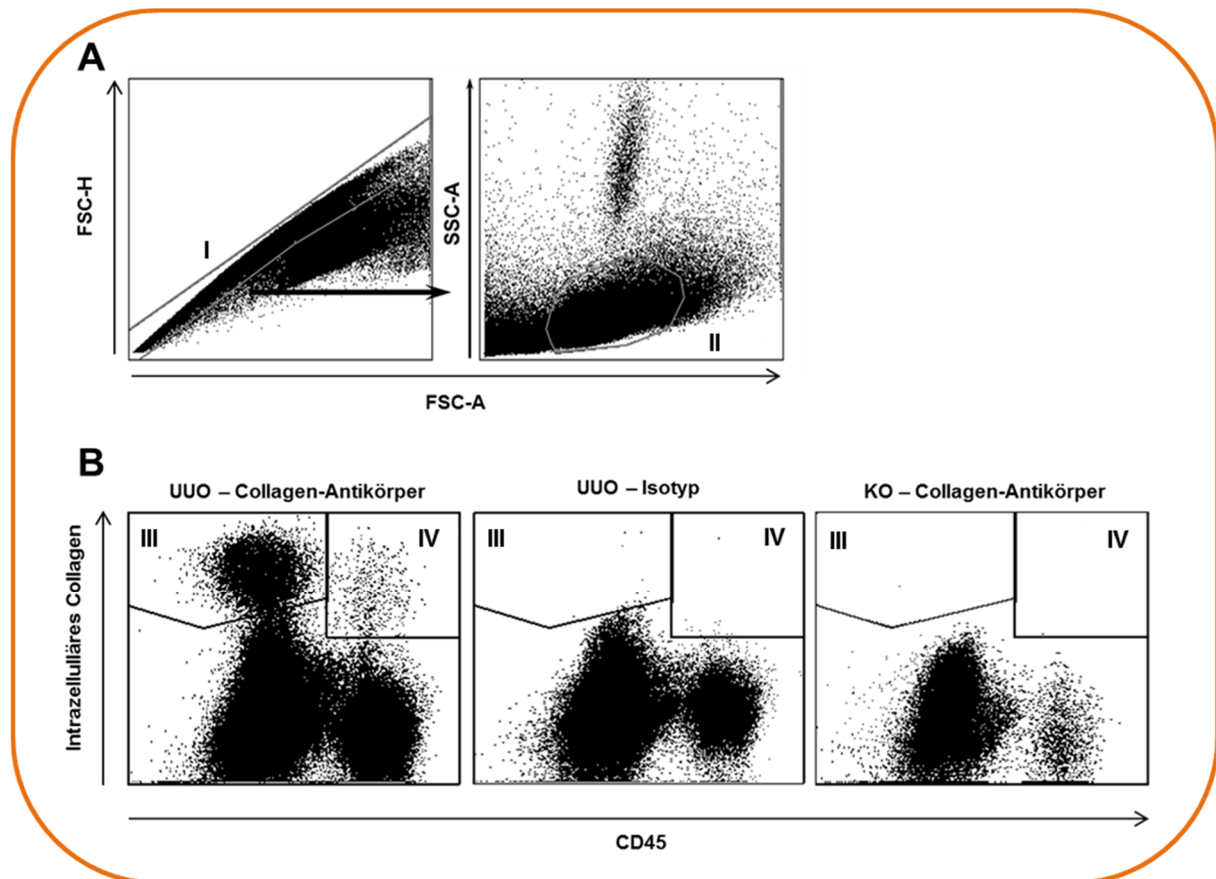


Abb. 3.3 Gatingstrategie. (A) Gate I: Eliminierung der Zell-Dupletten, Gate II: Identifikation der Lymphozyten. (B) Repräsentative FACS Dot Plots von Kollagenpartikel (Gate III) und Fibrozyten (Gate IV) bei einer 7 Tage UUO-Niere mit Kollagenantikörper; bei einer 7 Tage UUO-Niere mit Isotyp-Kontrolle, bei einer 7 Tage kontralateralen (KO) Niere.

3.4 Molekularbiologische Methoden

Für die Intensität der Fibrose entscheidend ist die Expression von extrazellulären Matrixproteinen. Um diese analysieren zu können, findet die messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) als Vorstufe zur Proteinbiosynthese Verwendung. Die mRNA muss zunächst aus den Nieren isoliert, dann in complementary DNA (cDNA) transkribiert und anschließend mittels einer quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) analysiert werden. Analysiert wurden in der vorliegenden Arbeit die mRNA für Kollagen Typ I, Fibronectin und α -SMA. Als Referenz wurde das, nicht von fibrotischen Vorgängen beeinflusste, β -Aktin verwendet.

3.4.1 mRNA Isolation aus murinen Nieren

Bei Arbeiten mit RNA wurde stets auf RNase-freie Materialien und Geräte und dem Gebrauch von Laborhandschuhen geachtet, um einen enzymatischen Abbau der RNA zu vermeiden. RNA wurde aus 1/16 oder 1/8 Nieren, welche bei der Organentnahme entnommen und bis zur Isolation bei -80°C gelagert wurden, isoliert. Hierfür fand das Kit von Macherey-Nagel Verwendung. Bei diesem wurden die Proben zunächst in 350µl Lysepuffer homogenisiert und lysiert. Anschließend wurde durch einen Filtrationsschritt genomische DNA abfiltriert. Dazu wurde das Homogenisat auf speziell beschichtete Säulen gegeben und anschließend zentrifugiert (11000g, 30sec, 20°C). Das Filtrat wurde zusammen mit 100µl Bindungssolution (BS) auf eine weitere Säule, welche diesmal ausschließlich mRNA binden konnte, gegeben. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Filtrates wurde die mRNA mit zwei verschiedenen Waschpuffern aufgereinigt. Nach einem Zentrifugationsschritt zur Trocknung wurde die mRNA nach Zugabe von 30µl Diethyldicarbonat (DEPC)-Wasser durch Zentrifugation von der Säule gelöst. Der exakte Gehalt der im Filtrat befindlichen mRNA wurde mittels Spektralfotometer quantifiziert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.4.1.1 Reverse Transkription

Um die Proteinexpression auf mRNA-Ebene bestimmen zu können, musste die mRNA in cDNA transkribiert werden. Hierfür fand die Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (RT MMLV) Verwendung. Für die reverse Transkription wurden zunächst 4µg RNA, welche in Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 9µl verdünnt wurde, mit 1µl Primern (Random Primer) versetzt und 3 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Dabei lösten sich RNA-Sekundärstrukturen und ermöglichten eine Anlagerung der Primer während der anschließenden Abkühlung auf Eis. Zu dem Reaktionsgemisch wurden zusätzlich Erststrang-Puffer, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)-Mix, Ribonuklease-Inhibitor (RNasin) sowie die RT MMLV gegeben. Die Mischung wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, wodurch die cDNA Synthese stattfinden konnte. Schließlich wurde die Aktivität der RT MMLV durch 2-minütiges Erhitzen auf 94°C gestoppt. Die erhaltene cDNA wurde mit RNase-freiem Wasser auf 1ml Endvolumen aufgefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.4.1.2 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Die Polymerasekettenreaktion beschreibt die enzymatische Amplifikation eines definierten DNA-Abschnittes *in vitro*. Bei der quantitativen PCR-Methode wird die entstandene DNA-Menge nach jedem PCR-Zyklus fotometrisch vermessen und somit der Verlauf der Reaktion in Echtzeit (real-time) verfolgbar gemacht. Die quantitative Bestimmung des amplifizierten DNA-Produkts erfolgt indirekt über die Messung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green. SYBR Green interkaliert in doppelsträngige DNA und emittiert in diesem Zustand, nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 497nm, Licht der Wellenlänge von 520nm. Ungebundenes SYBR Green bzw. an Einzelstrang-DNA gebundenes SYBR Green ist bis zu 1000-fach schwächer fluoreszierend.

Der Ansatz für die Real-time-PCR enthielt 5µl cDNA, 10µl SYBR Green, jeweils 1µl sense und 1µl antisense Primer sowie 3µl Nuklease-freies Wasser und wurde jeweils als Dreifachansatz auf die 384-Well-Platte aufgetragen. Die PCR wurde mittels eines spezifischen Amplifikationsprotokolls am TaqMan mit dem Programm Viiia 7 durchgeführt. Dabei wurde die DNA-Polymerase zuerst für 10 Minuten bei 95°C aktiviert. Anschließend erfolgten 40 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 98°C Denaturierungsphase der Doppelstrang-DNA auf Einzelstrang-DNA und je 1 Minute bei 58°C Annealingphase zur Primer-Anlagerung und schließlich 15 Sekunden Elongationsphase zur DNA-Synthese. Nach Ablauf dieser 40 Zyklen wurde das Schmelzverhalten der synthetisierten DNA mittels schrittweiser Erhöhung der Temperatur auf 95°C analysiert. Somit konnte die spezifische Denaturierungstemperatur für das jeweilige Amplifikat durch die Freisetzung von SYBER Green detektiert werden. Dies diente dem Erkennen möglicher Kontaminationen und unspezifischer Amplifikate. Zur Ermittlung der Effektivität der PCR wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:100 und 1:1000 angefertigt. Zudem wurden als Negativ-Kontrollen zum einen nur Nuklease-freies Wasser und zum anderen eine Probe ohne Zusatz von RT MMLV verwendet.

3.4.1.3 Auswertung der qPCR

Zur Berechnung der relativen mRNA-Expression wurde der C_T -Wert (cycle treshold Wert) bzw. dessen Mittelwert herangezogen. Der C_T -Wert entspricht der Zykluszahl

(cycle) ab der die Amplifikation in einer exponentiellen Phase läuft und somit das Fluoreszenzniveau (threshold) der Hintergrund-Fluoreszenz überschritten wird. Durch die Subtraktion der C_T -Mittelwerte von Kollagen, Fibronectin oder α -SMA mit dem des Referenzgens β -Aktin ergab sich der ΔCT -Wert. Mit dem Einsetzen in die Formel $2^{-\Delta CT}$ wurde ein quantitativer Vergleich der mRNA Menge möglich.

3.4.2 Analyse genomischer DNA

Um zu analysieren, ob auch in den Zielorganen ein Knock-Out des Kollagens Typ I erfolgt ist, wurde eine PCR für Kollagen basierend auf genomischer DNA aus den am Versuchsende entnommenen Nieren bzw. Vollblut durchgeführt.

3.4.2.1 DNA Isolation aus Nieren oder Vollblut

Bei Organentnahme wurde bei Bedarf zusätzlich 1/16 der Niere und Vollblut entnommen und bis zur Isolierung der DNA bei -80°C gelagert. Zur Isolierung der DNA wurde das DNeasy Blood&Tissue Kit von Quiagen verwendet und nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

3.4.2.2 PCR zur Detektion des verkürzten Col1a1 Alleles

Die isolierte DNA wurde zunächst mittels Spektralfotometers quantifiziert. 20ng DNA wurden mit 10 μl Phusion Puffer, 1 μl dNTP Mix, 0,5 μl Phusion Hot Start II DNAPolymerase, 0,75 μl je Primer und 32 μl Nuklease-freiem Wasser gemischt. Anschließend wurde eine PCR nach dem folgendem Amplifikationsschema durchgeführt: 1. Zyklus für 30 Sekunden auf 98°C ; 2. Zyklus mit 35 Wiederholungen für 10 Sekunden auf 98°C , anschließend 30 Sekunden auf 65°C und schließlich 150 Sekunden auf 72°C ; 3. Zyklus für 10 Minuten auf 72°C . Das PCR Produkt wurde mit Loading dye (6x) auf ein 1%iges, mit SYBR Safe angereichertem, Agarosegel aufgetragen. Die Spannung betrug 50V für 10 Minuten und im Anschluss 60V für 60 Minuten. Im UV-Licht konnten die Banden sichtbar gemacht werden, wobei der 1kb-Ladder zur Orientierung diente. Beim Vorliegen eines Kollagen Knock-Outs war eine kurze Bande von 746bp sichtbar, wohingegen die Wildtypbande bei 4227bp lag.

3.5 Histologische Analysemethoden

3.5.1 Herstellung histologischer Schnitte

Für histopathologische und immunhistochemische Analysemethoden wurde bei der Organentnahme zum einen ein Viertel jeder Niere in Formaldehydlösung eingelegt. Nach der Entwässerung dieser Proben erfolgte eine Einbettung in Paraffin. Mit einem Mikrotom wurden 3µm dünne Nierenschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Paraffinschnitte wurden vor der weiteren Behandlung 2 Tage auf 37 °C getrocknet. Zum anderen wurde ein weiteres Viertel jeder Niere in TissueTek Einbettmedium bei -80°C tiefgefroren. Mit einem Kryotom wurden bei -20°C ebenfalls 3µm dünne Nierenschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Kryoschnitte wurden mit eisgekühltem Aceton für 10 Minuten fixiert ehe sie weiter behandelt wurden.

3.5.2 Hellfeldmikroskopie

3.5.2.1 Masson-Trichrom-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung diente der Visualisierung angereicherter extrazellulärer Matrixproteine, wobei Kollagen deren Hauptkomponente darstellt. Zunächst wurden Paraffinschnitte 10 Minuten in Rotihistol inkubiert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Über Nacht kamen sie in eine Beize (Bouins' solution), um eine kontrastreichere Färbung und die Lyse von störenden Erythrozyten zu gewährleisten. Am nächsten Tag wurden die Präparate gründlich mit Wasser gespült, 5 Minuten in Weigerts Eisen-Hämatoxylin-Lösung inkubiert und für 10 weitere Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Dieser Schritt diente der selektiven, dunkelblau bis schwarzen Kernfärbung. Im nächsten Färbegang wurde das Zytoplasma durch 5-minütige Inkubation in Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin rot gefärbt. Nach einem Spülschritt wurde das Bindegewebe mittels 5-minütiger Inkubation mit Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdänsäurelösung zunächst entfärbt, um es anschließend mit Anilinblau 15 Minuten deutlich blau anzufärben. Um ein transparenteres Erscheinen und Abstufen der Farben zu erreichen, wurden die Schnitte 50 Sekunden mit 1% Essigsäure behandelt. Nach Spülen in endionisiertem Wasser wurden die Schnitte durch eine aufsteigende

Alkoholreihe entwässert. Abschließend wurden die Präparate noch 5 Minuten in Rotihistol inkubiert, um sie dann mit dem Roti-Histokitt einzudecken.

3.5.2.2 CD3-Histologie

Um die Menge an infiltrierenden Zellen bestimmen zu können, wurde die CD3-Färbung angewandt. Hierfür wurden Paraffinschnitte zunächst analog zur Masson-Trichrom-Färbung behandelt. Nach der absteigenden Alkoholreihe wurden die endogene Peroxidase mittels 20-minütiger Inkubation in 3% H₂O₂/Methanol blockiert. Durch anschließendes Kochen in Citratpuffer wurden die Antigene demaskiert. Nach Abkühlung der Schnitte wurden diese eine Stunde mit Superblock inkubiert. Über Nacht erfolgte die Behandlung mit dem, aus der Ratte stammenden, Primärantikörper anti-CD3 (Verdünnung 1:100). Nach einem Waschschrift mit PBS wurde das Gewebe eine Stunde mit dem sekundären biotinyliertem Antikörper aus der Ziege anti-rat IgG1 F(ab)₂ (Verdünnung 1:100) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS erfolgte die 30-minütige Behandlung mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (=HRP Reagenz) und der anschließenden Visualisierung mit der Inkubation dessen Substrates, dem 3,3'-Diaminobenzidine (DAB). Durch dessen Oxidation wurden die CD3-positiven Zellen dunkelbraun gefärbt. Als letzter Schritt wurden die Schnitte in VE Wasser gespült und die Zellkerne mit Hämalaun nach Mayer 50 Sekunden blau gegengefärbt. Anschließend erfolgte das Bläuen für 20 Minuten unter Leitungswasser und am Ende das Eindecken der Gewebeschnitte in Aquatex.

3.5.3 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode, um zelluläre Proteine durch fluoreszierende Antikörper im Fluoreszenzmikroskop nachweisbar und lokalisierbar zu machen. Bei der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung, wie im weiteren Verlauf vorliegend, bindet erst ein primärer, nicht konjugierter Antikörper an das Antigen im Gewebeschnitt. Anschließend bindet ein zweiter, fluoreszierender Antikörper an den Fc-Teil des primären Antikörpers. Wenn eine Anregung des Fluorophors mit entsprechender Wellenlänge erfolgt, wird der Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar.

3.5.3.1 Immunfluoreszenz von Kollagen und α -SMA

Zur immunhistologischen Färbung von Kollagen Typ I und α -SMA wurden kryokonservierte Gewebeschnitte verwendet. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur wurden die Schnitte mit einer hydrophoben Emulsion umrandet und mehrmals mit PBS gewaschen. Es folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen im Gewebe mittels Superblock für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschriff mit PBS wurden die Schnitte entweder mit einem anti-Kollagen-I-Primärantikörper (Verdünnung 1:1000) oder einem anti- α -SMA-Primärantikörper (Verdünnung 1:500) bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Beide Primärantikörper wurden im Kaninchen generiert. Nach drei Waschschriffen mit PBS erfolgte die Inkubation des Gewebes mit dem Sekundärantikörper, einem AlexaFluor 594 konjugierten anti-Kaninchen IgG Antikörper, in einer Verdünnung von 1:500 für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer. Erneut wurde dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Schnitte mit Fluoromount G eingedeckt wurden. Fluoromount G enthält den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, welcher die Zellkerne durch Bindung an die DNA blau anfärbt.

3.5.3.2 Immunfluoreszenz von Fibronektin

Zur immunhistologischen Färbung von Fibronektin wurden Paraffinschnitte verwendet. Diese wurden zunächst analog zur Masson-Trichom-Färbung mit Rotihistol inkubiert und in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Zur besseren Bindung des Antikörpers an das Antigen wurden die Schnitte 30 Minuten mit 1% Pepsin-Puffer, welcher einen pH von 2,0 und eine Temperatur von 37°C aufweist, behandelt. Anschließend wurde analog zu 3.5.3.1 weiter vorgegangen. Als Primärantikörper wurde ein, aus dem Kaninchen stammender, anti-Fibronektin-Antikörper in der Verdünnung 1:500 benutzt.

3.5.4 Auswertung der Immunhistologien

Von jeder Niere der Masson-Trichrom-, Kollagen-, α -SMA- und Fibronektinhistologie wurden 15 nicht überlappende Gesichtsfelder in 200-facher Vergrößerung im Fluoreszenz- oder Hellfeldmikroskop aufgenommen und anschließend die jeweils positiv prozentuale Fläche mit der MetaMorph-Software verblindet ermittelt sowie

statistisch ausgewertet. Bei der CD3-Histologie wurde die Anzahl der CD3-positiven Zellen in 25 Gesichtsfeldern bei einer 400-fachen Vergrößerung ausgezählt und statistisch ausgewertet.

3.6 Statistische Auswertung

Die komplette statistische Auswertung und alle Graphen wurden mit GraphPad Prism 5.0 erstellt. Dabei wurden die Mittelwerte der Versuchsgruppen als arithmetisches Mittel \pm Standard Error of the Mean (s.e.m) dargestellt. Eine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten T-Test bei Normalverteilung, und mit einem zweiseitigen Mann-Whitney-U Test bei nicht Normalverteilung, bestimmt. Für Mehrfachvergleiche wurde ein Einfaktorieller-ANOVA mit Dunnett's oder Bonferroni's post-hoc-Tests angewendet. Für die Überlebensanalyse wurde ein Log-rank (Mantel-Cox)-Test verwendet. Als Signifikanzniveau wurde ein Wert von 0,05 angenommen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4. Ergebnisse

4.1 Generierung verschiedener konditioneller Kollagen I-defizienter Mäuse

Bis heute gibt es keine Daten welche zeigen, wie hoch der Anteil der prinzipiell zur Kollagenproduktion fähigen Zelltypen an dessen Produktion *in vivo* ist. Da die Defizienz von Kollagen Typ I embryonal letal ist [118], kann nur mittels induzierbaren, teilweisen oder zelltypspezifischen Knock-Out-Mäusen untersucht werden, welchen Beitrag hämatopoetische, mesenchymale oder epitheliale Zellen zur Kollagenproduktion leisten. Dazu wurden in Vorarbeiten konditionelle *col1a1* Knock-Out-Mäuse hergestellt, bei denen die letzten Exone inklusive des Poly-A Schwanzes mit flox-Signalen versehen sind und durch Kreuzung mit Cre-exprimierenden Mäusen entfernt werden können. Die entstehende mRNA ist aufgrund der fehlenden Polyadenylierung instabil, so dass eine deutliche Verringerung der Kollagenproduktion zu erwarten ist.

Col1a1^{fl/fl}-Mäuse wurden mit den verschiedenen Cre-Deleter-Stämmen, wie im weiteren Verlauf beschrieben, gekreuzt (Abb. 4.1).

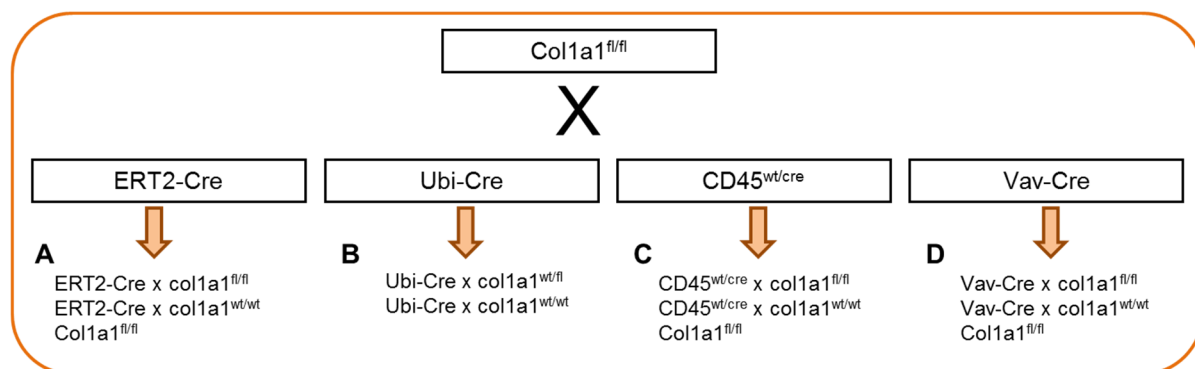


Abb. 4.1 Verpaarungs-Schema. *Col1a1^{fl/fl}*-Mäuse wurden mit (A) ERT2-Cre, (B) Ubi-Cre, (C) CD45^{wt/cre} oder (D) Vav-Cre gekreuzt. Die daraus entstandenen Nachkommen sind durch jeweils einen orangenen Pfeil gekennzeichnet.

4.1.1 Generierung von Mäusen mit ubiquitärem Kollagen Knock-Out

Mäuse mit einem heterozygot ubiquitärem oder induzierbar ubiquitärem Kollagen Knock-Out dienten zum einen der Kalibrierung der Analysenmethoden und zum anderen der Klärung der Frage, welchen Einfluss eine 50%ige oder induziert vollständige Reduktion des Kollagengehaltes auf die Nierenfunktion im Modell der renalen Fibrose besitzt. Mäuse mit vollständigem Kollagen Knock-Out dienten zudem als Knochenmarks-Spender für die Generierung Knochenmarks-chimärer Mäuse, welche einen spezifischen Kollagen Knock-Out in den hämatopoetischen Zellen aufweisen.

4.1.1.1 Generierung von Mäusen mit heterozygot ubiquitärem Kollagen Knock-Out

Zunächst wurden die $col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse mit konstitutiven ubiquitären Cre-exprimierenden transgenen Mäusen auf C57BL/6J Hintergrund (Ubi-Cre) verpaart (Abb. 4.1, B) [119]. Die weitere Kreuzung von heterozygoten Ubi-Cre x $col1a1^{wt/fl}$ -Mäusen untereinander führte zu 43% Wildtypen (Ubi-Cre x $col1a1^{wt/wt}$) und 57% heterozygoten Mäusen (Ubi-Cre x $col1a1^{wt/fl}$). Aufgrund der bereits beschriebenen embryonalen Letalität wurden keine homozygoten Knock-Out-Mäuse (Ubi-Cre x $col1a1^{fl/fl}$) geboren [118]. Heterozygote Ubi-Cre x $col1a1^{wt/fl}$ -Mäuse zeigten unter basalen Bedingungen keinen auffallenden Phänotyp, jedoch war ihre Geburtenrate etwas niedriger als die erwarteten 66 Prozent. Der heterozygote Kollagen Knock-Out resultiert in einer Reduktion des Kollagengehalts in diesen Mäusen um ungefähr 50% im Vergleich zu den Kontrolltieren.

4.1.1.2 Generierung von Mäusen mit induzierbar ubiquitärem Kollagen Knock-Out

Nur ein induzierbarer ubiquitärer Kollagen Knock-Out ermöglicht einen kompletten Knock-Out durch Induktion zu einem beliebigen postnatalen Entwicklungsstadium der Maus. Hierfür wurden $col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse mit Tamoxifen-induzierbaren ubiquitären Cre-exprimierenden transgenen Mäusen auf C57BL/6J-Hintergrund (ERT2-Cre) verpaart (Abb. 4.1, A). Zur Induktion der Cre-Rekombinase ist eine Verabreichung von

Tamoxifen nötig. Durch das im Mausorganismus befindliche Tamoxifen kann eine Translokation des Cre in den Zellkern stattfinden und somit die Rekombination der flox-Sequenz erfolgen. Nicht-induzierte ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäuse zeigten keinen auffallenden Phänotyp und waren normal lebensfähig. Durch eine Induktion mit Tamoxifen im frühen Alter von 5 Wochen war das Wachstum der homozygoten Knock-Out-Mäuse stark verringert und ihre Knochen zeigten eine deutliche Fragilität. Diese Mäuse konnten für Versuche nicht verwendet werden. Daher wurde die orale Tamoxifen-Induktion mit einem Alter von 12 Wochen begonnen. Hierfür wurden die Tiere mit einem Tamoxifen angereicherten Medizinalfutter gefüttert. Die Konzentration betrug 400mg Tamoxifencitrat auf 1 kg Futter. Die Mäuse erhielten dieses Futter für 5 Wochen *ad libitum*. Anschließend wurde 2 Wochen auf die übliche Standarddiät umgestellt, bevor diese Mäuse in Versuche verwendet wurden. Als Kontrollen dienten unbehandelte ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäuse, Tamoxifen-behandelte ERT2-Cre x col1a1^{wt/wt}-Mäuse und Tamoxifen-behandelte col1a1^{fl/fl}-Mäuse.

4.1.2 Generierung von Mäusen mit zelltypspezifischem Kollagen Knock-Out

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Menge an Fibrozyten in die Niere nach Inflammationsstimulus mittels UUO einwandern. Es ist jedoch derzeit unklar, ob hämatopoetische Zellen direkt oder nur indirekt zur Nierenfibrose beitragen (z.B. durch Aktivierung endogener Fibroblasten). Zudem ist nicht feststellbar, welcher Prozentsatz des abgelagerten Kollagens von Fibrozyten produziert wird.

Um nun die Rolle der Fibrozyten in der Nierenfibrose genauer analysieren zu können, wurden Mäuse generiert, welche genau in diesen hämatopoetischen Zellen einen Kollagen Typ I Knock-Out aufwiesen. Dafür wurden col1a1^{fl/fl}-Mäuse mit CD45^{wt/cre}-C57BL/6J-Knock-in-Mäusen gekreuzt (Abb. 4.1, C) [120]. CD45 ist ein spezifischer Marker für hämatopoetische Zellen und wird nicht auf anderen Zellen wie mesenchymale Fibroblasten oder tubuläre Epithelzellen exprimiert [120]. Die Tatsache, dass CD45^{wt/cre} x col1a1^{fl/fl}-Mäuse unter Basalbedingungen keinen auffallenden Phänotyp und zudem eine normale Lebensfähigkeit zeigten verdeutlichte, dass die homozygote Deletion von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen keinen Einfluss auf das Wachstum oder Überleben hatte. Als Kontrolliere

diente stets eine Cre-Kontrollmaus ($CD45^{wt/cre} \times col1a1^{wt/wt}$) und eine Flox-Kontrollmaus ($CD45^{wt/wt} \times col1a1^{fl/fl}$).

Um die Untersuchungen in einer zweiten Mäuselinie zu wiederholen, wurden Vav-Cre-transgene Mäuse auf einem C57BL/6-Hintergrund mit den $col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen verpaart (Abb. 4.1, D). Vav wird als ein spezifischer Marker für hämatopoetische Zellen angesehen und Vav-Cre-Mäuse werden häufig verwendet, um gefloxt Gene spezifisch im hämatopoetischen System abzuschalten [121]. Auch Vav-Cre $\times col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse zeigten keinen auffallenden Phänotyp und waren normal lebensfähig. Als Kontrollen dienten hier $col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse.

In einem dritten Ansatz zur Analyse der Rolle der Fibrozyten wurden Knochenmarkschimäre Mäuse generiert. Dabei wurden zunächst CD45.1 Wildtypmäuse als Empfänger letal bestrahlt und anschließend das Knochenmark von Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre $\times col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen, ohne Tamoxifen-behandelte ERT2-Cre $\times col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse, oder Tamoxifen-behandelten $col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen transplantiert. Die Rekonstitution des transplantierten Knochenmarks und die Deletion von *col1a1* in hämatopoetischen Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie durch Unterscheidung zwischen Donor- und Empfänger-hämatopoetischen Zellen gezeigt (Abb. 4.2, A) [122]. Dabei wurden Milzzellen mit Markern gegen CD45.1 und CD45.2 gefärbt. Durch Auftragen der beiden Marker gegeneinander zeigte sich, dass bei unbehandelten, nicht transplantierten Mäusen alle Zellen CD45.1-positiv waren. Hingegen konnte bei Tieren, die Knochenmark von induzierten ERT2-Cre $\times col1a1^{fl/fl}$ transplantiert bekommen hatten, festgestellt werden, dass die überwiegende Mehrheit der hämatopoetischen Zellen vom Spender kam und somit CD45.2-positiv war. Der Chimärismus lag bei allen Versuchsreihen bei über 90% (Abb. 4.2, A). Des Weiteren konnte durch genomische PCR von peripheren Blutzellen, welche an Tag 14 nach UUO entnommen wurden, gezeigt werden, dass der Knock-Out von Kollagen Typ I in den hämatopoetischen Zellen erfolgreich war (Abb. 4.2, B). Bei Mäusen, welche Knochenmark von induzierten ERT2-Cre $\times col1a1^{fl/fl}$ -Tieren bekommen hatten, zeigte sich die kleine Bande mit 756bp, wohingegen bei Mäusen, die Knochenmark von $col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen oder nicht induzierten ERT2-Cre $\times col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen bekommen hatten, die lange Bande bei 4227bp detektierbar war.

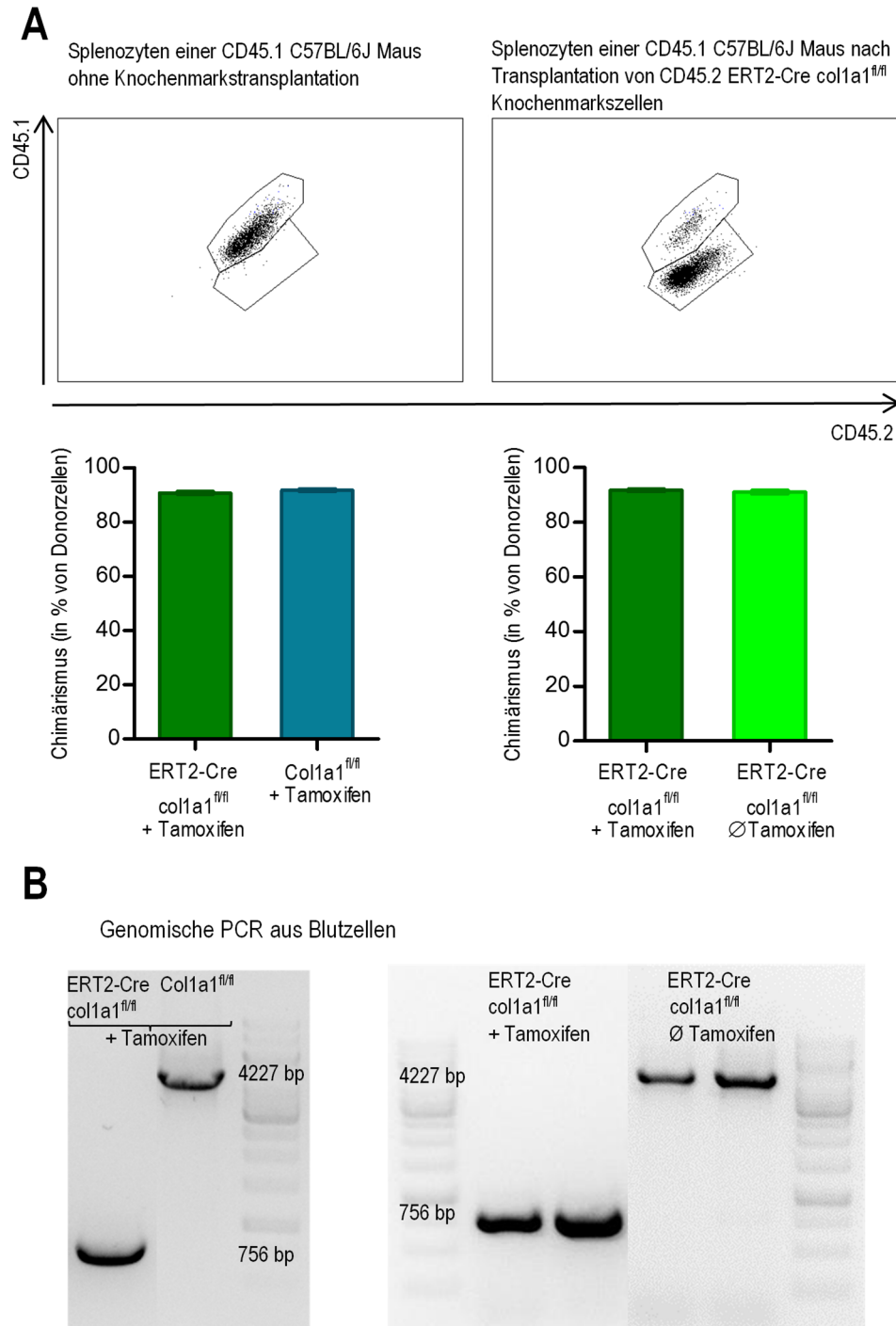


Abb. 4.2 Überprüfung des Chimärismus und Knock-Out nach Knochenmarks-Transplantation. (A) Durchflusszytometrische Quantifizierung des Chimärismus. CD45.1-Empfänger-Tiere wurden letal bestrahlt und mit Knochenmark aus CD45.2-Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x *col1a1^{fl/fl}*-, Tamoxifen-behandelten *col1a1^{fl/fl}*- oder nicht-Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x *col1a1^{fl/fl}*-Mäusen rekonstituiert. Auswertung der CD45.1- und CD45.2-positiven Populationen im FACS ergab einen Chimärismus von über 90%. (B) Deletion von *col1a1* bei den Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x *col1a1^{fl/fl}*-Mäusen, gezeigt durch die genomische PCR von peripheren Blutzellen. Deletion von *col1a1* resultiert in einer kurzen Bande bei 756bp, keine Deletion resultiert in einer langen Bande bei 4227bp.

4.2 Nachweis des Knock-Outs von Kollagen Typ I mittels unilateraler Ureterobstruktion

Um zu zeigen, dass die Deletion der Exone 47-51 von *col1a1* die Kollagen Typ I Expression abschaltet und zur Kalibrierung des Analysensystems für die Quantifizierung der Nierenfibrose, wurde das Modell der UUO bei zwei verschiedenen Genotypen verwendet.

4.2.1 UUO bei ubiquitären Kollagen Knock-Out-Mäusen

Zur Induktion der renalen Fibrose wurde das Modell der UUO für eine Dauer von 7 und 14 Tagen durchgeführt. Heterozygote Ubi-Cre x *col1a1^{wt/fl}*-Mäuse entwickelten signifikant weniger renale Fibrose als Ubi-Cre x *col1^{wt/wt}*-Kontrollmäuse in Tag 7 und Tag 14 UUO-Nieren. Die Analyse der UUO-Nieren im FACS ergab eine Reduktion der Fibrozyten um 42%, bei den Kollagenpartikeln, welche die Gesamtfibrose darstellen, zeigte sich ein Rückgang von 44% (Abb. 4.3, A). Auf mRNA-Ebene konnte eine Reduktion von 25% von Kollagen Typ I festgestellt werden (Abb. 4.3, B), auf Proteinebene zeigte sich in der Immunfluoreszenz eine Reduktion von 60% (Abb. 4.3, C). Eine Gesamtfibrose, welche durch Masson-Trichrom-Histologie analysiert wurde, wurde um 56% verringert (Abb. 4.3, C). Weder auf mRNA noch auf Proteinebene konnte ein Unterschied in der Menge von α -SMA und Fibronectin festgestellt werden (Abb. 4.3, B und D). In der CD3-Histologie konnte eine deutliche Reduktion der infiltrierenden T-Zellen von 28% gemessen werden (Abb. 4.3, E).

An Tag 14 war der Effekt bei den heterozygoten Ubi-Cre x *col1a1^{wt/fl}*-Mäusen sehr ähnlich. Fibrozyten waren um 38%, Kollagenpartikel um 50% reduziert (Abb. 4.4, A). Die Ablagerung von durch Immunfluoreszenz quantifiziertem Kollagen I wurde um etwa 62% verringert und die Gesamtfibrose, die durch Masson-Trichrom-Färbung quantifiziert wurde, wurde um etwa 55% verringert (Abb. 4.4, C). Es gab auch eine Reduktion von etwa 50% in der mRNA für *col1a1* in der ligierten Niere (Abb. 4.4, B). Im Gegensatz dazu waren die Expression von α -SMA und die Ablagerung von Fibronectin sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene unverändert, was darauf hinweist, dass die Entwicklung von Myofibroblasten und die Ablagerung anderer extrazellulärer Matrixproteine durch die Deletion von Kollagen Typ I nicht beeinflusst wurden (Abb. 4.4, B und D). Die Zellinfiltration war bei den 14 Tage UUO-Nieren um 73% reduziert (Abb. 4.4, E).

Der Vergleich von Tag 7 zu Tag 14 UUO-Nieren zeigt im Allgemeinen eine vergleichbare Reduktion der Fibrose zwischen den beiden Genotypen, so dass eine Reduktion eines Kollagengehaltes von ungefähr 50% zeitunabhängig im Modell der UUO einen gleichen Effekt hat. Deutlich zeigt sich jedoch, dass sich die absolute Menge an abgelagertem Kollagen erhöht. Diese ist an Tag 14 um 43% höher als an Tag 7. Auch auf mRNA Ebene ist an Tag 14 die Reduktion doppelt so hoch wie an Tag 7. Zudem erhöht sich die Menge an infiltrierenden Zellen an Tag 14 um 47%. Zusammen zeigen diese Daten, dass die Deletion von Kollagen Typ I erfolgreich war. Außerdem deutet dies darauf hin, dass endogene Fibroblasten für die sofortige Ablagerung von Kollagen Typ I verantwortlich sein können.

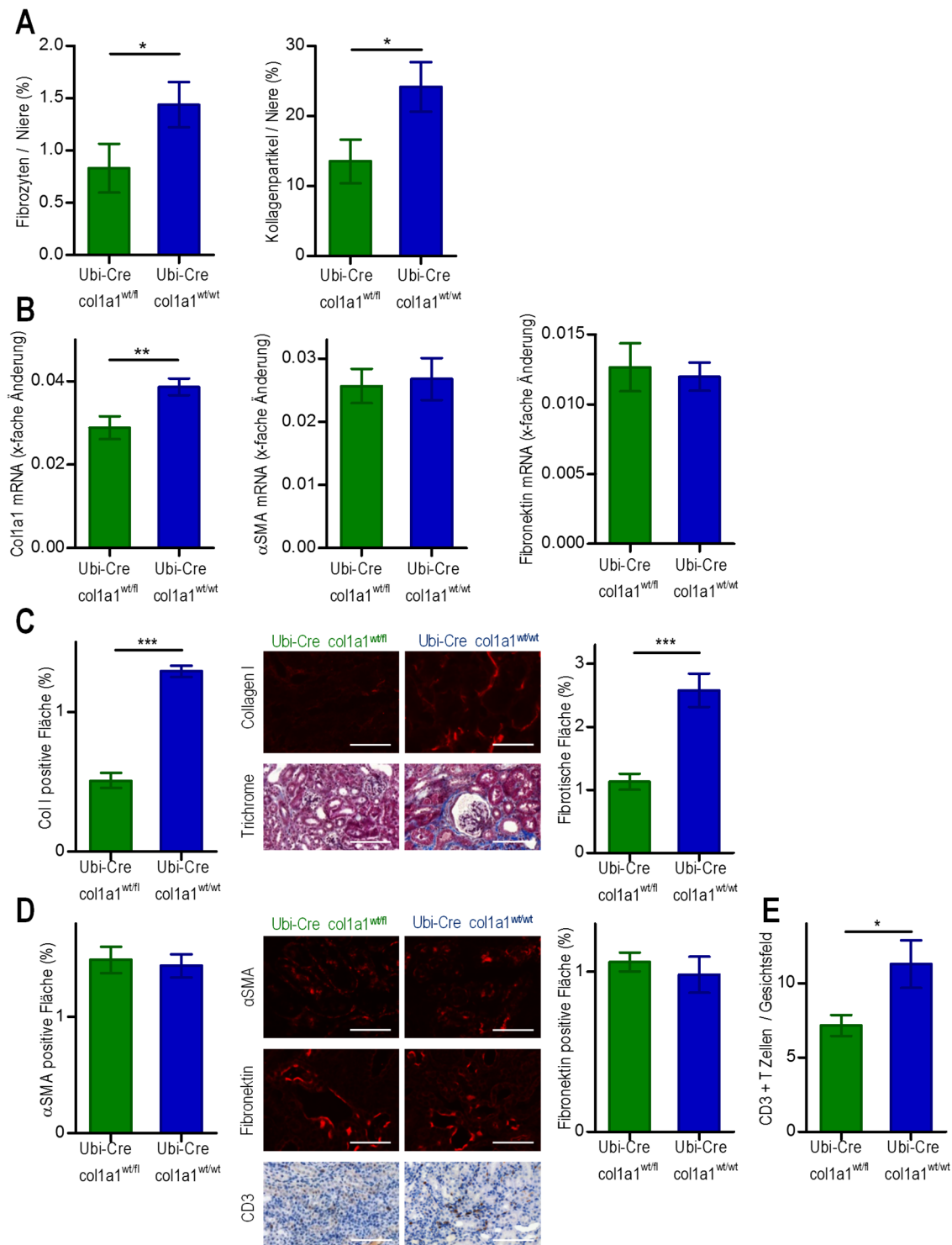


Abb. 4.3. Analyse von 7 Tage UUO-Nieren bei heterozygoten ubiquitären *col1a1*-defizienten Mäusen. (A) FACS-Analyse der Fibrozyten und Kollagenpartikel. (B) *col1a1*-mRNA, α SMA-mRNA, Fibronektin-mRNA-Expression durch Real-Time-PCR. (C) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (D) α -SMA und Fibronektin durch Immunfluoreszenz und (E) CD3-Histologie. Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/fl} heterozygote Mäuse (n=11) und Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/wt}-Kontrollen (n=12). Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in C bis E dargestellt. Maßstäbe: 100 μ m. Die Daten werden als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen T-Test. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001.

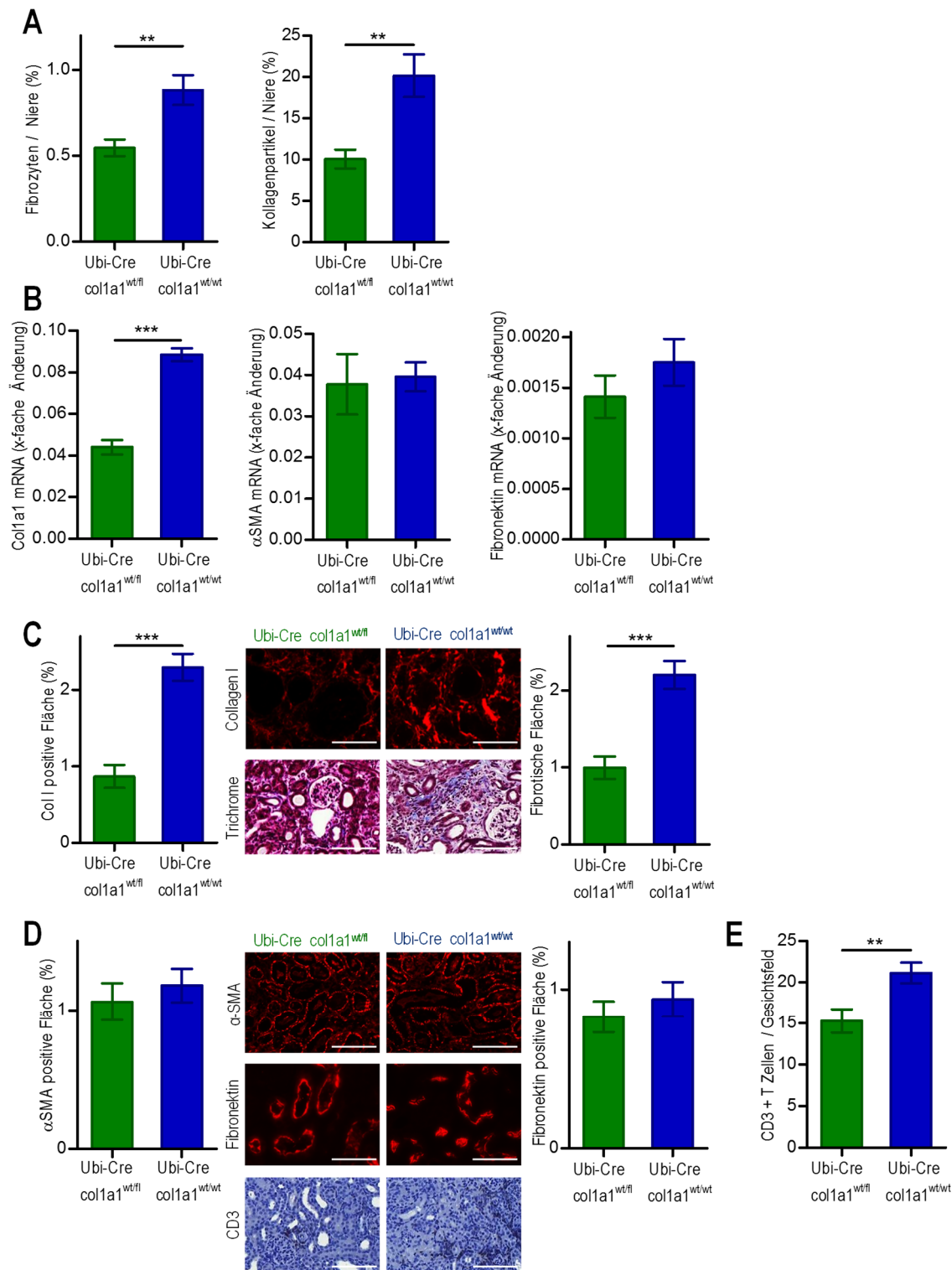


Abb. 4.4 Analyse von 14 Tage UUO-Nieren bei heterozygoten ubiquitären col1a1-defizienten Mäusen. (A) FACS-Analyse der Fibrozyten und Kollagenpartikel. (B) col1a1-mRNA, αSMA-mRNA, Fibronectin-mRNA-Expression durch Real-Time-PCR. (C) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (D) α-SMA und Fibronectin durch Immunfluoreszenz und (E) CD3-Histologie. Ubi-Cre x col1a1^{wt/fl} heterozygote Mäuse (n=6) und Ubi-Cre x col1a1^{wt/wt}-Kontrollen (n=9). Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in C bis E dargestellt. Maßstäbe: 100µm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen T-Test. **p<0,01; ***p<0,001.

4.2.2 UUO bei induzierbar ubiquitären Kollagen Knock-Out-Mäusen

Das Modell der 14 Tage UUO wurde auch in Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x *col1a1^{fl/fl}*-Mäusen durchgeführt. Als Kontrollen fanden Tamoxifen-induzierte *col1a1^{fl/fl}*- und ERT2-Cre x *col1a1^{wt/wt}*-Mäuse Verwendung. Eine erfolgreiche Deletion von *col1a1* bei Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x *col1a1^{fl/fl}*-Mäusen im Zielorgan wurde durch PCR von genomischer DNA aus UUO-Nieren gezeigt (Abb. 4.5, A). Mit Tamoxifen induzierte ERT2-Cre x *col1a1^{fl/fl}*-Mäuse zeigten die kurze Bande bei 756bp, wohingegen mit Tamoxifen induzierte Kontrolltiere, ERT2-Cre x *Col^{wt/wt}*- und *col1a1^{fl/fl}*-Mäuse, die lange Bande bei 4227bp aufwiesen. Die FACS Analyse ergab eine Reduktion der Fibrozyten um 50%, der Kollagenpartikel um 54% (Abb. 4.5, B). Die Ablagerung von Kollagen Typ I wurde um etwa 70%, die Gesamtfibrose um etwa 46% (Abb. 4.5, C) und die *col1a1*-mRNA-Menge um etwa 78% (Abb. 4.5, F) in Tag 14 UUO-Nieren der induzierten Knock-Out-Mäuse reduziert. Die infiltrierenden Zellen reduzierten sich um 41% (Abb. 4.5, E). Die Expression von α -SMA und Fibronectin wurde in Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x *col1a1^{fl/fl}*-Mäusen nicht verändert (Abb. 4.5, D). Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass der Knock-Out von Kollagen Typ I erfolgreich war und gleichzeitig eine verminderte Expression des Kollagens Typ I zu einer verminderten Entwicklung der renalen Fibrose im Modell der UUO führt.

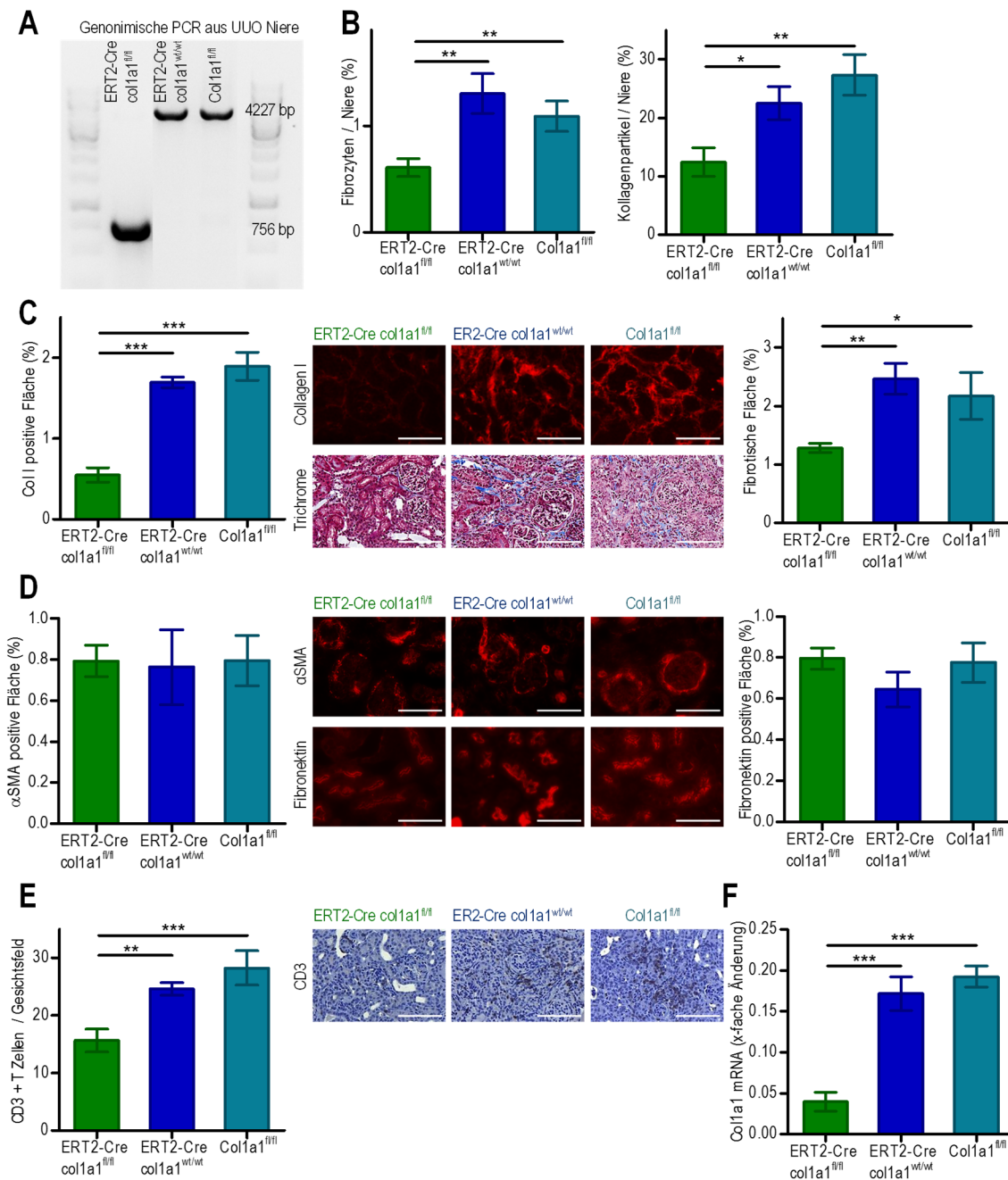


Abbildung 4.5 Analyse von 14 Tage UOU-Nieren bei induziert ubiquitären col1a1-defizienten ERT2-Cre-transgenen Mäusen. (A) Die Deletion von Kollagen Typ I in Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen wurde durch PCR von genomischer DNA aus UOU-Nieren gezeigt. (B) FACS-Analyse der Fibrozyten und Kollagenpartikel. (C) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (D) α -SMA und Fibronectin durch Immunfluoreszenz und (E) CD3-Histologie. (F) col1a1-mRNA-Expression durch Real-Time-PCR. ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl} (n=9), ERT2-Cre x col1a1^{wt/wt} (n=4) und col1a1^{fl/fl} (n=4); alle mit Tamoxifen behandelt. Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in C bis E dargestellt. Maßstäbe: 100 μ m. Die Daten werden als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.3 Zelltypspezifische Deletion von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen

Bei den $CD45^{wt/cre} \times col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen wurden zusammen mit ihren Kontrollen, der Cre-Kontrollmaus $CD45^{wt/cre} \times Col^{wt/wt}$ und der Flox-Kontrollmaus $CD45^{wt/wt} \times col1a1^{fl/fl}$, eine UUO mit einer Dauer von 7 und 14 Tagen durchgeführt und die Nierenfibrose anschließend quantifiziert. Damit wollte man den zelltypspezifischen Einfluss der Fibrozyten auf die Entwicklung der renalen Fibrose im Allgemeinen und im zeitlichen Verlauf von 7 oder 14 Tage Stauung untersuchen. Die FACS-Analyse von UUO-Nieren wurde durchgeführt, um die Anzahl infiltrierender Fibrozyten und die allgemeinen Fibrose-bestimmenden Kollagenpartikel durch intrazelluläre Färbung für Kollagen Typ I und extrazelluläre Färbung von CD45 zu quantifizieren. Der Beispielplot (Abb. 4.7, A) zeigt die Kollagen-positiven, CD45-positiven Fibrozyten sowie die Kollagen-positiven, CD45-negativen Kollagenpartikel.

Die Analyse der UUO-Nieren an Tag 7 nach UUO zeigte im FACS eine signifikante Verringerung von 39% an Fibrozyten und 42% an Kollagenpartikeln bei den Leukozyten-spezifischen Kollagen Typ I-defizienten Mäusen im Vergleich zu deren beiden Kontrollgruppen (Abb. 4.6, A). Weiter zeigten diese Mäuse etwa 49% weniger Ablagerung von Kollagen Typ I und etwa 30% weniger Gesamtfibrose (Abb. 4.6, B). Die Expression von Fibronektin und α -SMA waren in allen Gruppen vergleichbar (Abb. 4.6, C). Die Defizienz von Fibrozyten hatte zudem einen Effekt auf die Zellinfiltration. Mit der CD3-Histologie war eine signifikante Reduktion von 32% an CD3-positiven T-Zellen feststellbar (Abb. 4.6, D).

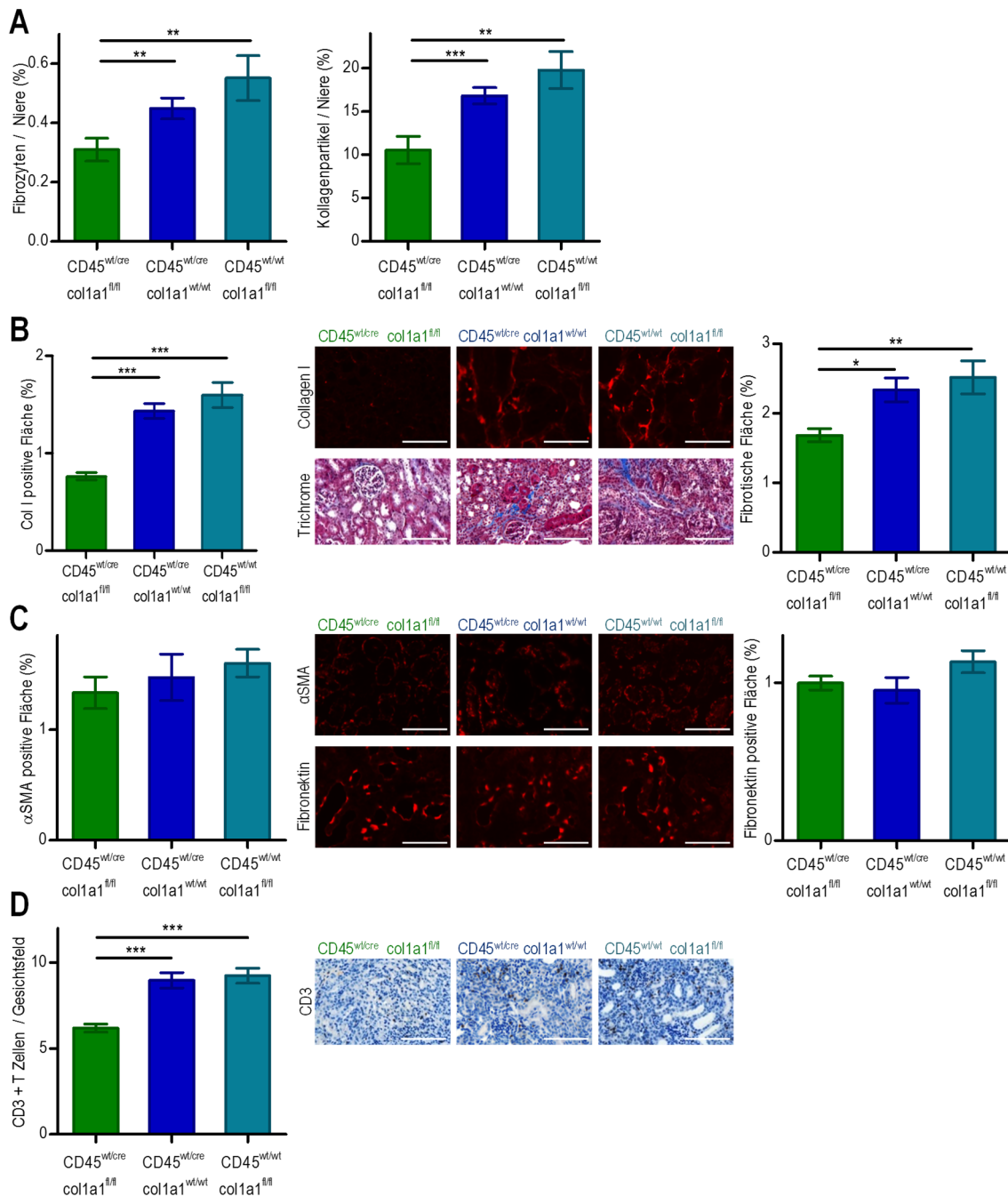


Abb. 4.6 Analyse von 7 Tage UUO-Nieren bei Mäusen mit zelltypspezifischer Defizienz von *col1a1* in Fibrozyten. Zelltypspezifische Deletion von Kollagen Typ I bei CD45^{wt/cre} Knock-in Mäusen. (A) FACS-Analyse der Fibrozyten und Kollagenpartikel. (B) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (C) α-SMA und Fibronectin durch Immunfluoreszenz und (D) CD3-Histologie. CD45^{wt/cre} x col1a1^{fl/fl} (n=13), CD45^{wt/cre} x col1a1^{wt/wt} (n=11) und CD45^{wt/wt} x col1a1^{fl/fl} (n=12). Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in B bis D dargestellt. Maßstäbe: 100µm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Weiter wurde eine 14 Tage UUO durchgeführt und die Nierenfibrose im Vergleich zu den zwei Kontrollen $CD45^{wt/cre} \times col1a1^{wt/wt}$ und $CD45^{wt/wt} \times col1a1^{fl/fl}$ gesetzt. Im Vergleich zu diesen waren in den $CD45^{wt/cre} \times col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen 55% weniger Fibrozyten durch Durchflusszytometrie nachweisbar, was die zelltypspezifische Deletion von Kollagen Typ I in Fibrozyten zeigte. Auch die Kollagenpartikel waren um 51% geringer, was wiederum eine verminderte Gesamtfibrose widerspiegelte (Abb. 4.7, A). Die Defizienz von Kollagen-I in hämatopoetischen Zellen führte weiter zu 61% weniger Ablagerung von Kollagen Typ I und 49% weniger Gesamtfibrose in den UUO-Nieren (Abb. 4.7, B). Zudem war 28% weniger Zellinfiltrat zählbar (Abb. 4.7, D). Hingegen war auch hier kein Unterschied in der Expression von Fibronektin und α -SMA feststellbar (Abb. 4.7, C).

Der Vergleich der Ergebnisse der Analysen von Tag 7 und Tag 14 zeigt deutlich, dass die Reduktion der Nierenfibrose in den Tag 7 UUO-Nieren von $CD45^{wt/cre} \times col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen nicht so ausgeprägt wie in den Tag 14 UUO-Nieren war. Die Kollagenablagerungen zeigten einen Anstieg der Reduktion von 49% auf 61% und der Gesamtablagerung von 30% auf 49% (Abb. 4.6, B und 4.7, B).

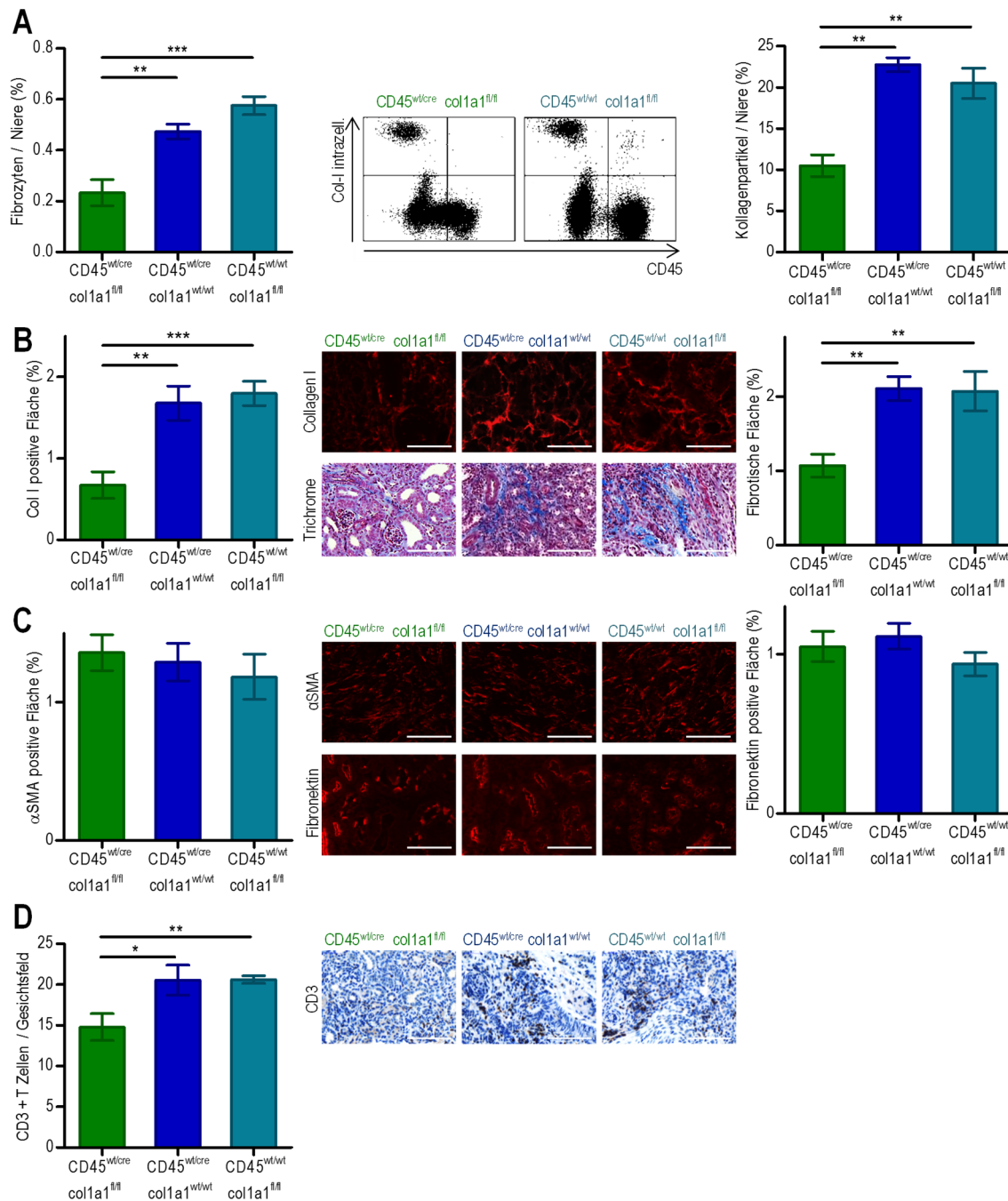


Abb. 4.7 Analyse von 14 Tage UUO-Nieren bei Mäusen mit zelltypspezifischer Defizienz von *col1a1* in Fibrozyten. Zelltypspezifische Deletion von Kollagen Typ I bei CD45^{wt/cre} Knock-in Mäusen. (A) FACS-Analyse der Fibrozyten und Kollagenpartikel mit repräsentativen Dot Plots. (B) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (D) α-SMA und Fibronektin durch Immunfluoreszenz und CD3-Histologie. CD45^{wt/cre} x col1a1^{fl/fl} (n=6), CD45^{wt/cre} x col1a1^{wt/wt} (n=6) und CD45^{wt/wt} x col1a1^{fl/fl} (n=6). Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in B bis D dargestellt. Maßstäbe: 100µm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Um den bereits gezeigten Einfluss hämatopoetischer Zellen im Modell der UUO weiter zu bestätigen, wurde das Modell der 14 Tage UUO in Vav-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen, zusammen mit der col1a1^{fl/fl}-Maus als Kontrolle, durchgeführt. In diesen Mäusen ist in gleichem Maße wie bei den CD45^{wt/cre} x col1a1^{fl/fl}-Mäusen das Kollagen in den hämatopoetischen Fibrozyten ausgeschaltet.

Die Analyse der UUO-Nieren mittels FACS ermittelte eine Reduktion von 26% der Fibrozyten und 26% der Kollagenpartikel in den Vav-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen im Vergleich zu den col1a1^{fl/fl}-Tieren (Abb. 4.8, A). Die col1a1-mRNA-Expression wurde um etwa 39% reduziert, was eine Regulation des Kollagens auf mRNA-Ebene bedeutet (Abb. 4.8, B). Weiter zeigte sich in den UUO-Nieren der Knock-Out-Tiere etwa 45% weniger Ablagerung von Kollagen Typ I und etwa 52% weniger Gesamtfibrose im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 4.8, C). Die Expression von Fibronectin und alpha-SMA war erneut unverändert (Abb. 4.8, D). Der Einfluss auf das Zellinfiltrat lag bei einer Reduktion von 34% bei den Vav-Cre x col1a1^{fl/fl}-Tieren (Abb. 4.8, E).

Mit dieser Versuchsreihe konnte der Einfluss der Fibrozyten erneut dargelegt werden.

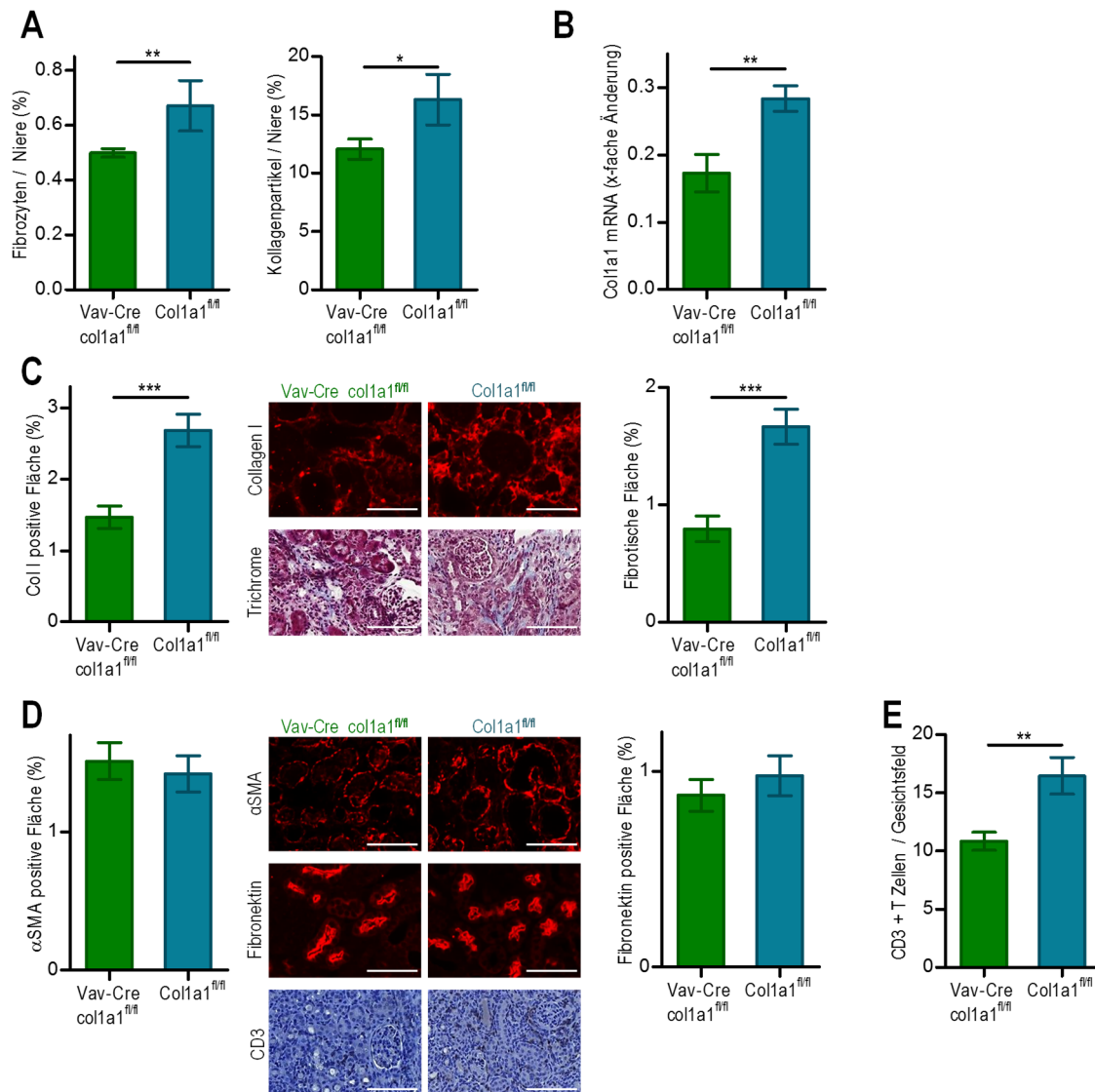


Abb. 4.8 Analyse von 14 Tage UUO-Nieren bei Mäusen mit zelltypspezifischer Defizienz von *col1a1* in Fibrozyten. Zelltypspezifische Deletion von Kollagen Typ I bei Vav-Cre transgenen Mäusen. (A) FACS-Analyse der Fibrozyten und Kollagenpartikel. (B) *col1a1*-mRNA-Expression durch Real-Time-PCR. (C) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (D) α -SMA und Fibronektin durch Immunfluoreszenz und (E) CD3-Histologie. Vav-Cre x *col1a1^{fl/fl}* (n=11) und *col1a1^{fl/fl}* (n=11). Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in C bis E dargestellt. Maßstäbe: 100 μ m. Die Daten werden als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen T-Test. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

In einem weiteren Ansatz zu Analyse der Rolle der Fibrozyten fanden Knochenmarks-chimäre Mäuse Verwendung. Dabei wurde in eine Versuchsreihe Knochenmark von Tamoxifen induzierten ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}- und Tamoxifen behandelten col1a1^{fl/fl}-Mäusen zur Transplantation verwendet und anschließend diese Knochenmarks-chimären Tiere im Modell der 14 Tage UO verwendet. Der Beispielplot in Abb. 4.9 A zeigt deutlich, dass bei den ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen mittels Durchflusszytometrie kaum Fibrozyten detektierbar waren. Durch das Fehlen von Kollagen I im Knochenmark konnten keine Kollagen-positiven Zellen in die UO-Niere einwandern. Der Anteil der Fibrozyten bei Tieren mit Knochenmark von Tamoxifen induzierten ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen war um 63% reduziert, der Anteil der Kollagenpartikel um 53% (Abb. 4.9, A). Knochenmarks-chimäre Kollagen Typ I-defiziente Mäuse zeigten eine 60%ige Reduktion der Kollagen Typ I-Expression und eine 53%ige Reduktion der Gesamtfibrose in der UO-Niere am Tag 14 (Abb. 4.9, B). Die Expression von α -SMA und Fibronectin war nicht unterschiedlich (Abb. 4.9, C). Das Zellinfiltrat war um 38% reduziert (Abb. 4.9, D) und auf mRNA zeigte sich der Effekt mit einer 31%igen Abnahme der col1a1-mRNA-Menge (Abb. 4.9, E).

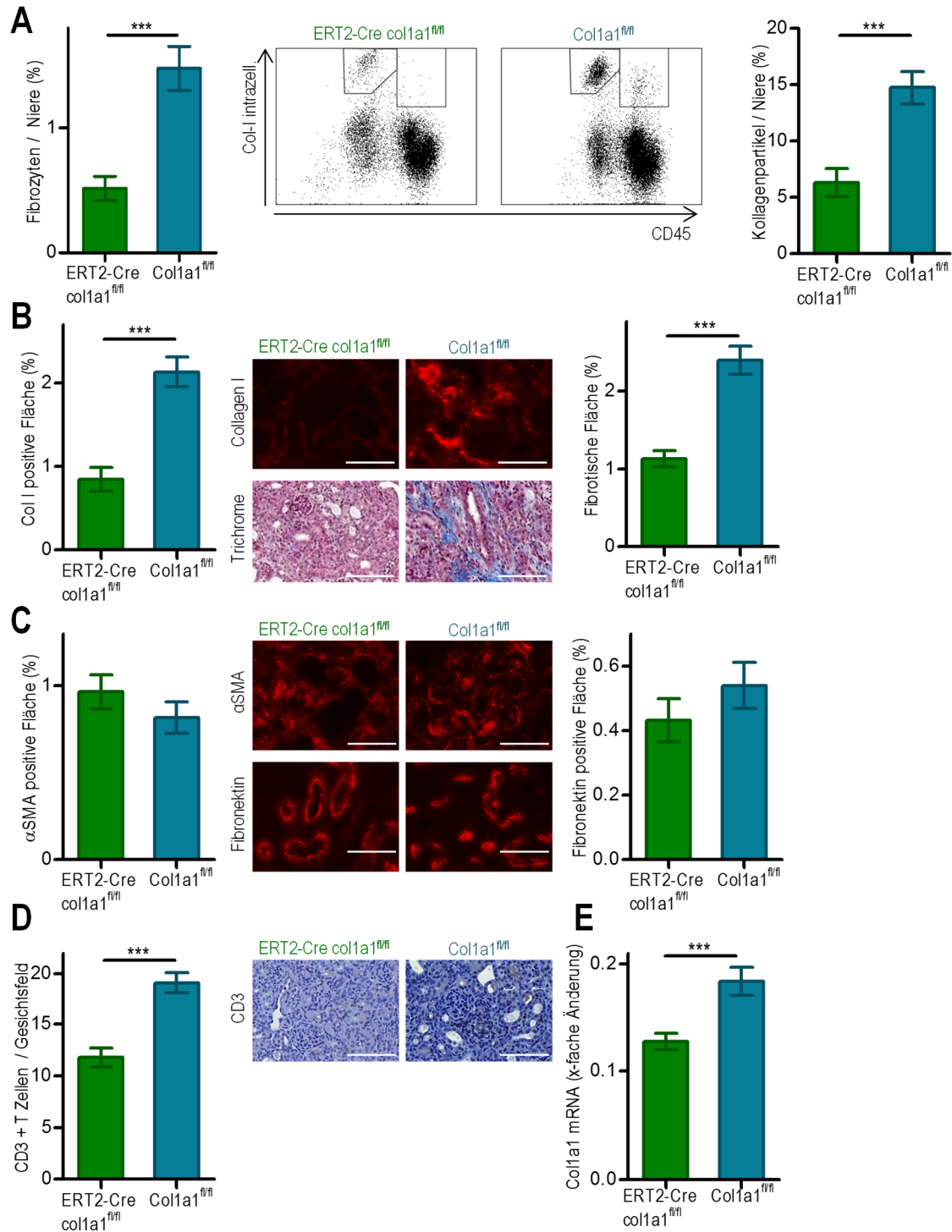


Abb. 4.9 Analyse von 14 Tage UUO-Nieren bei Knochenmarks-chimären Mäusen. Letal bestrahlte C56BL/6-Mäuse wurden mit Knochenmark aus Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl} (n=12) oder col1a1^{fl/fl} (n=12, Kontrollen) Mäusen rekonstituiert. (A) FACS-Analyse der Fibrozyten und Kollagenpartikel mit repräsentativen Dot Plots. (B) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (C) α-SMA und Fibronektin durch Immunfluoreszenz und (D) CD3-Histologie. (E) col1a1-mRNA-Expression durch Real-Time-PCR. Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in B bis D dargestellt. Maßstäbe: 100µm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen T-Test. ***p<0,001.

Sehr ähnliche Ergebnisse wurden in einer zweiten Versuchsreihe erzielt, wobei Stammzellen aus Tamoxifen-induzierten und nicht Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen (Kontrollen) zur Rekonstitution verwendet wurden. Bei den Knochenmarks-chimären Tieren wurde ebenfalls das Modell der 14 Tage UUO angewandt.

Die Quantifizierung der Fibrozyten in den UUO-Nieren durch Durchflusszytometrie ergab eine deutlich verringerte Fibrozytenzahl um 53% in den Knochenmarks-chimären Kollagen Typ I-defizienten Mäusen. Weiter waren die Kollagenpartikel um 36% vermindert (Abb. 4.10, A). Die durch Immunfluoreszenz analysierte Ablagerung von Kollagen I war um 44%, die Gesamtfibrose um 37% verringert (Abb. 4.10, C). Die CD3-positiven Zellen waren um 33% reduziert (Abb. 4.10, E). Auf mRNA war der Effekt mit einer 21%igen Abnahme der col1a1 mRNA Menge messbar (Abb. 4.10, B). Bei α -SMA- und Fibronectin-positiver Fläche war hingegen kein Unterschied feststellbar (Abb. 4.10, D).

Zusammengenommen liefern diese Daten mit zelltypspezifischer Defizienz von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen einen starken Beweis dafür, dass hämatopoetische Fibrozyten direkt und in hohem Maße zur Entwicklung der Nierenfibrose im UUO-Modell beitragen. Diese Daten deuten zudem darauf hin, dass Fibrozyten erst zu einem späteren Zeitpunkt den größten Einfluss auf die renalen Fibrose haben, da diese erst in das entzündliche Gewebe migrieren müssen.

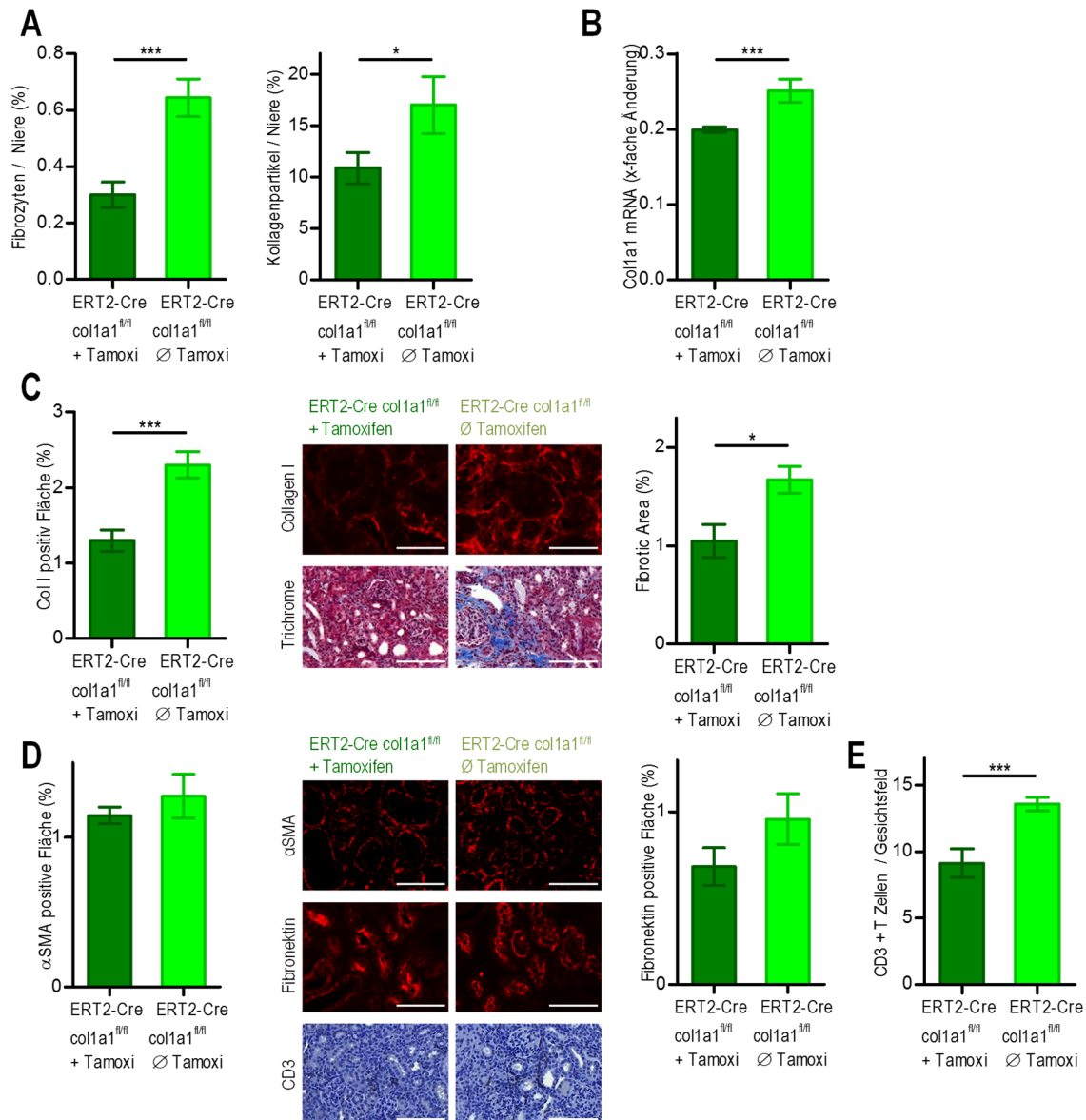


Abb. 4.10 Analyse von 14 Tage UUO-Nieren bei Knochenmarks-chimären Mäusen. Letal bestrahlte C56BL/6-Mäuse wurden mit Knochenmark aus Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl} (n=7) oder nicht mit Tamoxifen-induzierten ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl} (n=8, Kontrollen) Mäusen rekonstituiert. (A) FACS-Analyse der Fibrozyten und Kollagenpartikel. (B) col1a1-mRNA-Expression durch Real-Time-PCR. (C) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (D) α-SMA und Fibronektin durch Immunfluoreszenz und (E) CD3-Histologie. Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in C bis E dargestellt. Maßstäbe: 100µm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen T-Test. *p<0,05; ***p<0,001.

4.4 Funktionelle Untersuchung mit reversibler unilateraler Ureterobstruktion

Um zu untersuchen, wie Veränderungen in der Nierenfibrose und Veränderungen in der zelltypspezifischen Produktion von Kollagen Typ I die Nierenfunktion beeinträchtigen, wurde das Modell der reversiblen UUO verwendet. Ureterobstruktion wurde durch Setzen eines Clips an Tag 0, welcher an Tag 2 und 4 leicht versetzt wurde und an Tag 6 entfernt wurde, erreicht. Das Versetzen des Clips diente der Vermeidung permanenter Strikturen. Als Kontrolle wurden Schein-Operationen an den identischen Tagen durchgeführt. Wie bereits in Abschnitt 4.2 gezeigt, reicht eine Obstruktion von 5 bis 7 Tagen bereits zur Entwicklung einer Fibrose in der ligierten Niere. Am Tag 11 wurde die kontralaterale Niere in allen Mäusen, R-UUO- und Schein-OP-Tieren, entfernt. Die Nierenfunktion (glomeruläre Filtrationsrate) wurde durch die Clearance von intravenös injiziertem FITC-Sinistrin basal und ab Tag 11 kontinuierlich vermessen.

4.4.1 R-UUO in Ubi-Cre x Col^{wt/fl}-Mäusen

Das Modell der R-UUO wurde mit heterozygoten Ubi-Cre x col1a1^{wt/fl}-Mäusen und mit Ubi-Cre x col1a1^{wt/wt}-Kontrollen durchgeführt. Basal war die Nierenfunktion (GFR) bei beiden Mäusestämmen identisch, was bedeutet, dass der unterschiedliche Gehalt an Kollagen keinen Einfluss auf die native Nierenfunktion hat. Am Tag 12 nach UUO, das heißt an Tag 6 nach Entfernen des Clips und Tag 1 nach Ligatur der kontralateralen Niere, zeigten heterozygote Kollagen Typ I-defiziente Mäuse eine signifikant reduzierte GFR im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen (Abb. 4.11, A; durchgeführt von A. Grill). Gleichzeitig erhöhten sich die Plasmakaliumspiegel in den heterozygoten Knock-Out-Mäusen auf mehr als 11mmol/l und alle Mäuse starben innerhalb der nächsten Tage (Abb. 4.11, B). Im Gegensatz dazu erholte sich die GFR bei Kontrolltieren von Tag 12 nach UUO von 154µl/min auf 378µl/min an Tag 34. Die Plasmakaliumspiegel von diesen Tieren blieben im normalen Bereich, waren aber signifikant erhöht im Vergleich zu Schein-operierten Tieren des identischen Genotyps. Dies verdeutlichte, dass sich die Nieren noch nicht wieder komplett erholt hatten und die Kaliumausscheidung eingeschränkt war. Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich hoch signifikant eine Erhöhung des mRNA Levels von col1a1 bei Ubi-Cre

x col1a1^{wt/wt}-Tieren nach R-UUO im Vergleich zu den Schein-operierten Mäusen des gleichen Genotyps (Abb. 4.11, C).

Insgesamt stand einem Überleben von 0% bei Ubi-Cre x Col^{wt/fl} ein Überleben von 80% bei den Kontrolltieren gegenüber (Abb. 4.11, A, durchgeführt von A. Grill).

Diese Daten zeigen deutlich, dass die reduzierte Fähigkeit zur Produktion von Kollagen Typ I während UUO zu einem schädlichen Ergebnis in Bezug auf Nierenfunktion und Überleben führt, da die Regenerationsfähigkeit bei diesen Tieren beeinträchtigt ist.

Bei Schein-Operationen konnte ein entgegengesetztes Ergebnis beobachtet werden. Zwar überlebten alle Mäuse gleichermaßen, jedoch zeigten die heterozygoten Knock-Out-Mäuse durchweg bessere GFR-Daten als deren Wildtyp-Kontrollen, an Tag 12 und Tag 34 sogar signifikant (Abb. 4.11, A, durchgeführt von A. Grill). Auf mRNA-Ebene konnte hierbei bestätigt werden, dass die Menge an col1a1-mRNA bei den Ubi-Cre x col1a1^{wt/fl}-Mäusen signifikant reduziert war (Abb. 4.11, B).

Dies deutet darauf hin, dass bei Stress, welcher hier durch die Ligatur der kontralateralen Niere erzeugt wurde, sich die Niere bei einer Maus mit deutlich reduzierter Produktion an Kollagen Typ I schneller anpassen kann. Dies wurde weiter im Modell der Adenin-Nephropathie (Abschnitt 4.5) untersucht.

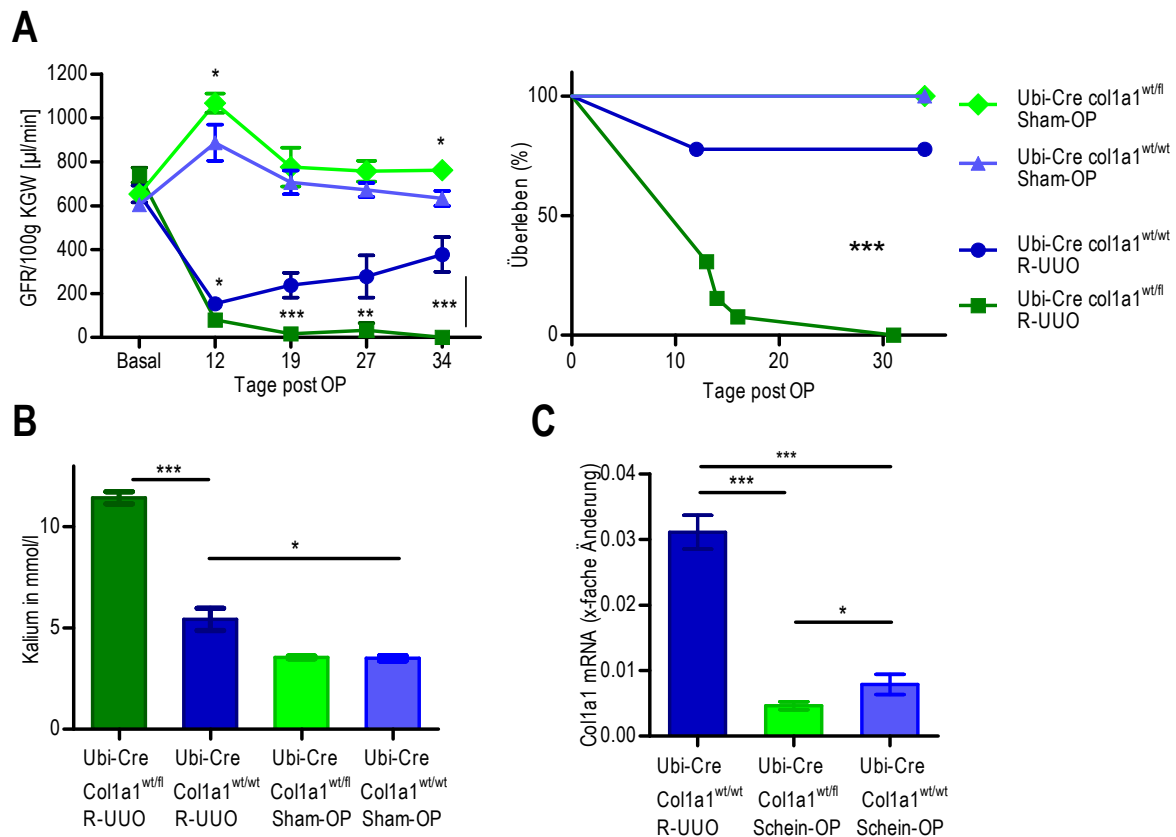


Abb. 4.11 Analyse von reversiblen UUO-Nieren bei heterozygoten ubiquitären *col1a1*-defizienten Mäusen. Modell der reversiblen UUO (R-UUO) bei Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/fl} heterozygoten Mäusen (n=13) und Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/wt}-Kontrollen (n=9). Schein-Operationen wurden bei Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/fl}-Mäusen (n=5) und Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/wt}-Kontrollen (n=4) durchgeführt. R-UUO wurde an Tag 0 durchgeführt, die Obstruktion wurde an Tag 6 entfernt und die kontralaterale Niere an Tag 11 entfernt (durchgeführt von A. Grill). (A) Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR, bezogen auf eine Niere) pro 100g Körpergewicht (KGW) und Überleben der Tiere. (B) Kaliumlevel und (C) *col1a1*-mRNA-Expression am Tag des Beendens der jeweiligen Maus. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen T-Test und Log-Rank (Mantel-Cox) Test für das Überleben. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Um den Verlauf des Kollagenabbaus zu analysieren, wurde ein Vergleich des Gehaltes der Gesamtfibrose mittels Masson-Trichrom-Färbung der Nieren von Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/wt}-Kontrolltieren nach 7 Tagen klassischer UUO und nach R-UUO an Tag 34, also 28 Tage nach Aufhebung der Ligatur, durchgeführt. Hierbei zeigte sich zwar eine Reduktion des Gehaltes der Gesamtfibrose um 26% (Abb. 4.12). Im Vergleich zu Schein-operierten Tieren des gleichen Genotyps lag die Gesamtfibrose bei den R-UUO-Tieren jedoch 7x höher. Der Abbau der EZM braucht wesentlich länger als deren Aufbau und kann längerfristige Auswirkungen auf die Nierenfunktion der Mäuse haben.

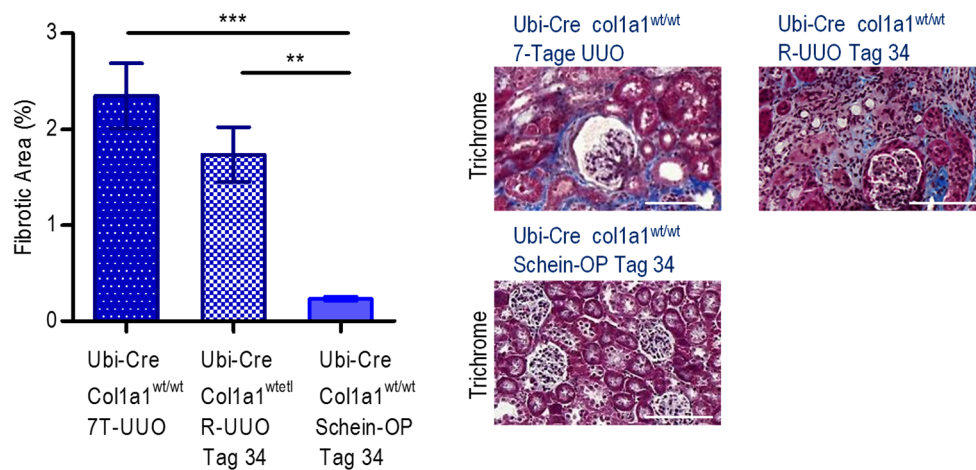


Abb. 4.12 Analyse der Gesamtfibrose im Vergleich von 7 Tage UUO-Nieren, R-UUO-Nieren an Tag 34 und Schein-OP-Nieren an Tag 34. Ubi-Cre x col1a1^{wt/wt}-Mäuse mit 7 Tage UUO (n=7), Ubi-Cre x col1a1^{wt/wt}-Mäuse nach R-UUO an Tag 34 (n=7) und Ubi-Cre x col1a1^{wt/wt}-Mäuse nach Schein-OP an Tag 34 (n=4). Quantifizierung der Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung. Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind dargestellt. Maßstäbe: 100µm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. **p<0,01; ***p<0,001.

4.4.2 R-UUO in ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen

14 Tage nach 5-wöchiger Induktion der Cre-Rekombinase mittels Tamoxifenfutters, wurde in ERT2-Cre x col1a1^{fl/fl}-Mäusen sowie in ERT2-Cre x col1a1^{wt/wt}- und col1a1^{fl/fl}-Kontrollmäusen die reversible UUO durchgeführt. Basal zeigte sich zwischen den Genotypen kein Unterschied in der Nierenfunktion. Nach R-UUO und Entfernung der kontralateralen Niere zeigte sich an Tag 12 bei den Kollagen Knock-Out-Mäusen bereits eine deutlich niedrigere Nierenfunktion. Diese Tiere starben alle zwischen Tag 12 und 14, wobei das Überleben der beiden Kontrollstämme bei 80%, bzw. 100% lag. Die Nierenfunktion dieser Tiere erholte sich auch bis Tag 20 deutlich (Abb. 4.13, durchgeführt von A. Grill).

Diese Versuche zeigten deutlich, dass die Nieren der Mäuse mit einem induzierten vollständigen Fehlen der Expression von Kollagen Typ I nicht regenerationsfähig sind. Das Ergebnis von 4.4.1 wurde untermauert. Kollagen Typ I ist essentiell für die Regeneration.

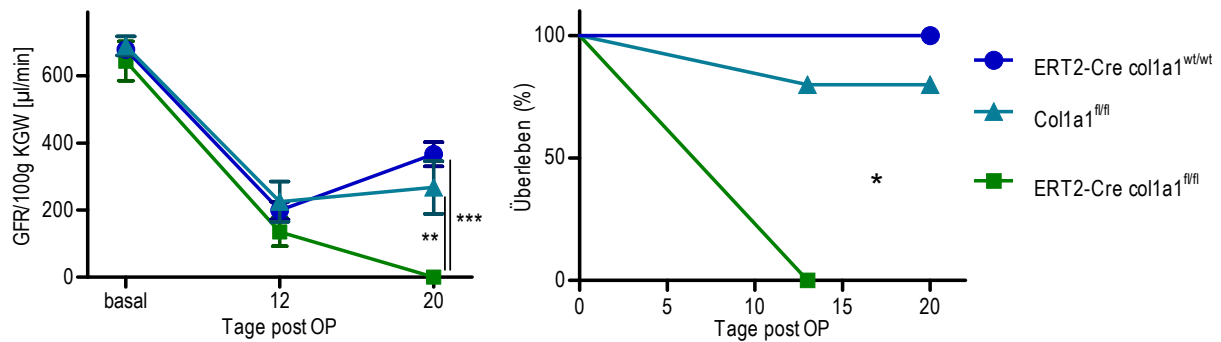


Abb. 4.13 Analyse von reversiblen UUO-Nieren bei induziert ubiquitären *col1a1*-defizienten Mäusen. Modell der reversiblen UUO (R-UUO) bei mit Tamoxifen behandelten ERT2-Cre x *col1a1*^{fl/fl} (n=5), ERT2-Cre x *col1a1*^{wt/wt} (n=5) und *col1a1*^{fl/fl} (n=5). R-UUO wurde an Tag 0 durchgeführt, die Obstruktion wurde an Tag 6 entfernt und die kontralaterale Niere an Tag 11 entfernt (durchgeführt von A. Grill). Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR, bezogen auf eine Niere) pro 100g Körpergewicht (KGW) und Überleben der Tiere. Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA und Log-Rank (Mantel-Cox) Test für das Überleben. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.4.3 R-UUO in CD45^{wt/cre} x *col1a1*^{fl/fl}-Mäusen

Um den Einfluss von Fibrozyten im Modell der R-UUO zu analysieren, wurde diese Methode bei CD45^{wt/cre} x *col1a1*^{fl/fl}-Mäusen und deren Kontrollen CD45^{wt/cre} x *col1a1*^{wt/wt}- und *col1a1*^{fl/fl}-Mäusen angewandt. Die spezifische Deletion von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen führte hierbei zu keiner verminderten GFR oder verringertem Überleben der Mäuse (Abb. 4.14, A, durchgeführt von A. Grill). Um zu überprüfen, ob auch in diesem Modell die Kollagenexpression verringert ist, wurde an Tag 35 nach R-UUO die Nierenfibrose in allen drei Mäusestämmen quantifiziert (Abb. 4.14, B). Die Ablagerung von Kollagen Typ I in der R-UUO-Niere wurde signifikant um 47% verringert, während die Gesamtfibrose signifikant um 37% in CD45^{wt/cre} x *col1a1*^{fl/fl}-Mäusen reduziert wurde. Da die R-UUO eine Obstruktion von 6 Tagen beinhaltet, lagen diese Prozentsätze der R-UUO im vergleichbaren Bereich wie nach 7 Tage UUO dieser Tiere (49% und 30%). Somit war die Reduktion der Nierenfibrose in den R-UUO-Nieren von CD45^{wt/cre} x *col1a1*^{fl/fl}-Mäusen nicht so ausgeprägt wie in Tag 14 UUO-Nieren, bei denen die Prozentsätze der Kollagen- und Gesamtfibrose-Reduktion bei 61%, bzw. 49% lagen. Bei α -SMA und Fibronectin zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (Abb. 4.14, C). Die Zellinfiltration war um 43% reduziert (Abb. 4.14, D).

Der fehlende Einfluss der Fibrozyten im Modell der R-UUO könnte aus der Tatsache resultieren, dass die Ligatur bereits nach 6 Tagen aufgehoben wurde und dass sich die R-UUO-Nieren für einen Zeitraum von 29 Tagen erholen konnten, bevor sie zur Analyse entnommen wurden. Infiltrierende Fibrozyten können primär zu späteren Zeitpunkten zur Nierenfibrose beitragen, da sie erst in die Niere migrieren müssen, während endogene Fibroblasten für die sofortige Ablagerung von Kollagen Typ I verantwortlich sein können, was bereits unter 4.3 gezeigt wurde.

Diese Daten deuten erneut darauf hin, dass infiltrierende Fibrozyten stärker zu späteren Zeitpunkten nach UUO zur renalen Fibrose beitragen, während endogene Fibroblasten wichtiger für die frühe Produktion von Kollagen sind.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des R-UUO-Modells, dass die Expression von Kollagen Typ I für die Erhaltung und Regeneration der Nierenfunktion essentiell ist. Zudem ist eine frühe Entwicklung der Nierenfibrose durch endogene Fibroblasten wesentlich, um die strukturelle Integrität und Nierenfunktion in einem Modell mit akuter druckinduzierter tubulärer Schädigung aufrechtzuerhalten. Die Infiltration von Fibrozyten hingegen unterliegt hierbei einer untergeordneten Bedeutung.

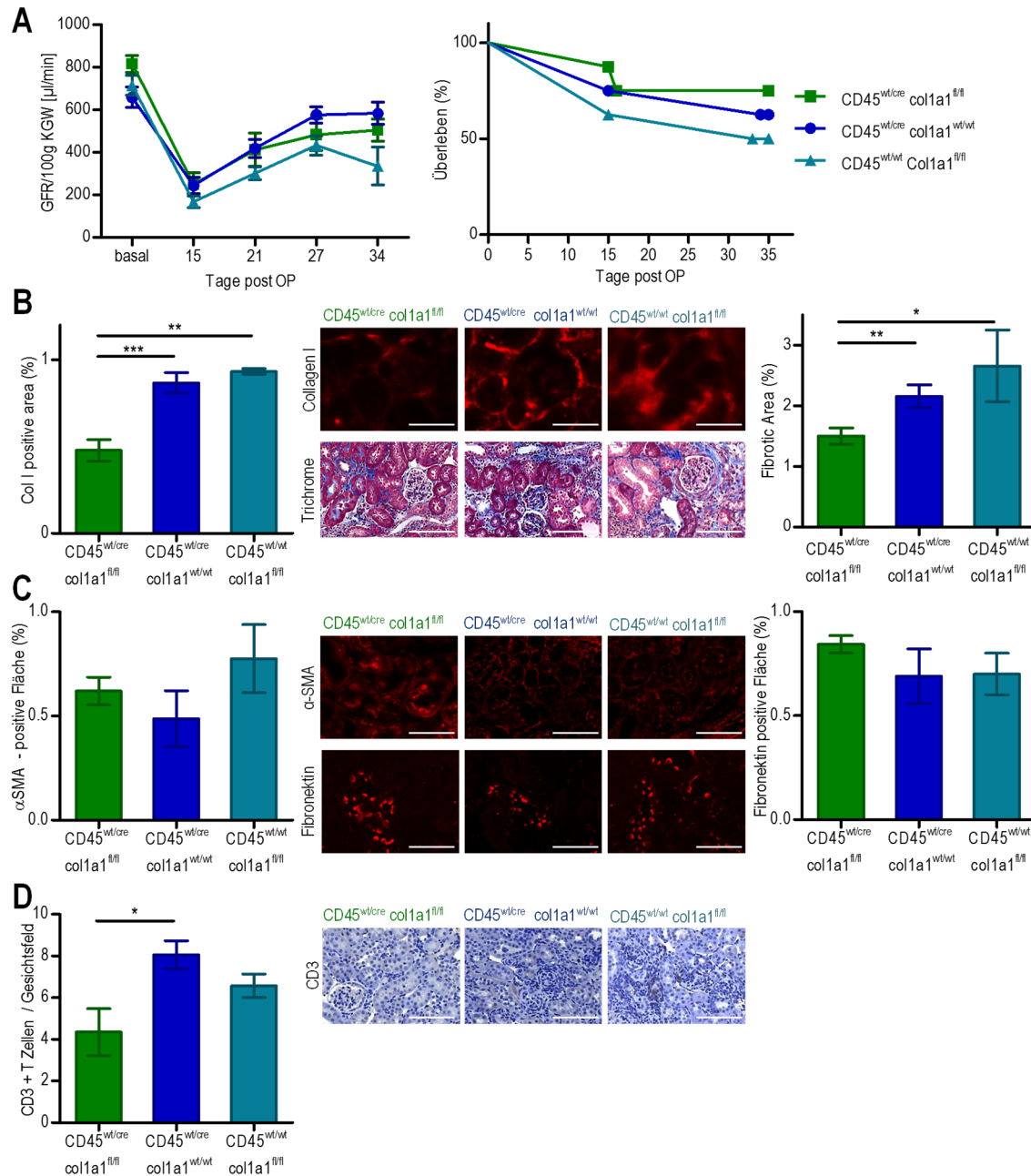


Abb. 4.14 Analyse von reversiblen UUO-Nieren bei Mäusen mit zelltypspezifischer Defizienz von *col1a1* in Fibrozyten. Modell der reversiblen UUO (R-UUO) bei CD45^{wt/cre} x col1a1^{fl/fl} (n=8), CD45^{wt/cre} x col1a1^{wt/wt} (n=8) und CD45^{wt/wt} x col1a1^{fl/fl} (n=8). R-UUO wurde an Tag 0 durchgeführt, die Obstruktion wurde an Tag 6 entfernt und die kontralaterale Niere an Tag 11 entfernt (durchgeführt von A. Grill). (A) Messung der glomerulären Filtrationsrate (GFR, bezogen auf eine Niere) pro 100g Körpergewicht (KGW) und Überleben der Tiere. Quantifizierung von (B) Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (C) α-SMA und Fibronectin und (D) CD3-positive Zellen. Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in B bis D dargestellt. Maßstäbe: 100μm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA und Log-Rank (Mantel-Cox) Test für das Überleben. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.5 Adenin-induzierte Nephropathie

Adenin-induzierte Nephropathie führt zu einer interstitiellen Fibrose und einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion auf einer pathophysiologisch sehr unterschiedlichen Weise im Vergleich zur UUO. Daher wurde ein möglicher Effekt von ubiquitär heterozygoten oder zelltypspezifischen Defizienz von Kollagen I in diesem Krankheitsverlauf untersucht. Die Mäuse wurden 3 Wochen mit einer Adenin-reichen Diät gefüttert und nach einer 6-wöchigen Erholungsphase bei normaler Ernährung analysiert. Während des Versuches zeigten die verschiedenen Mausstämmen einen gleichen Verlauf bezüglich des Körpergewichts. Während Adeningabe nahmen die Tiere stark ab, wohingegen eine rasche Gewichtszunahme ab dem Tag der Gabe des normalen Futters stattfand. Dies zeigt, dass es keine Unterschiede in der Aufnahme des Adenin-Futters gab, welche für Unterschiede in der Fibrose verantwortlich sein könnten (Abb. 4.15, E und Abb. 4.16, E).

4.5.1 Adenin-induzierte Nephropathie bei Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/fl}-Mäusen

Erwartungsgemäß entwickelten heterozygote *col1a1*-defiziente Mäuse (Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/fl}) deutlich weniger renale Fibrose als Kontrollen (Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/wt}). Die Ablagerung von Kollagen Typ I wurde um etwa 66% und die Gesamtfibrose um etwa 45% reduziert (Abb. 4.15, A). Der mRNA-Level von Kollagen Typ I verringerte sich um 45% (Abb. 4.15, B). Die Zellinfiltration war um 53% reduziert (Abb. 4.15, C). Die Expressionen von alpha-SMA und Fibronectin waren jeweils unverändert (Abb. 4.15, C).

4.5.1.1 Adenin-induzierte Nephropathie in Kombination mit UUO

Um zu untersuchen, wie die Gesamtreduktion der Fibrose die Nierenfunktion im Adeninmodell beeinflusst, wurden Messungen der Nierenfunktionen in heterozygoten Kollagen Typ I-defizienten Mäusen (Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/fl}) und deren Kontrollen (Ubi-Cre x *col1a1*^{wt/wt}) durchgeführt. GFR wurde basal vor Beginn der Gabe des Adeninfutters und 1, 3 und 6 Wochen nach Absetzen dieses Futters gemessen. Die zwischen den Genotypen basal vergleichbare Nierenfunktion wurde auf eine Niere bezogen und anschließend auf 100% normalisiert.

Bei heterozygoten Kollagen Typ I-defizienten Mäusen war die Nierenfunktion in Woche 1, 3 und 6 um jeweils 61%, 60% und 38% besser als bei den Wildtyp-Kontrollen.

Um nun zu analysieren, inwiefern bereits geschädigte Nieren einen akuten Verlust an Nephrone kompensieren können, wurde bei diesen Tieren in Woche 6 nach Absetzen des Adeninfutters das Modell der UUO durchgeführt und somit ein akuter Verlust der Nephrone von 50% induziert. Eine Woche nach UUO erreichten heterozygote Kollagen-defiziente Mäuse eine GFR der verbleibenden Niere von 69% des Basalwertes, während die Kontrolltiere den akuten Verlust an Nephrone weitgehend nicht kompensieren konnten und deren GFR bei 40% des Basalwertes blieb. Zwei Wochen nach UUO erhöhten heterozygote Mäuse ihre GFR auf 84% des Basalwertes, während die Kontrollen nur mit Kompensation auf etwa 56% des Basalwertes kamen. Ab Woche 5 nach UUO nahm die Hyperfiltration bei beiden Gruppen ab, wobei ein signifikanter Unterschied von 68% bei den UbiCre x col1a1^{wt/fl} zu 45% bei den Kontrollen blieb (Abb. 4.15, E).

Diese Daten zeigen, dass Fibrose zum einen eine deutliche negative Auswirkung auf die Nierenfunktion bei Adenin-induzierter Nephropathie hat. Zum anderen stört Fibrose auch deutlich die Fähigkeit der Niere, einen weiteren Verlust an Nephrone zu kompensieren. Selbst eine partielle Reduktion der Fibrose kann vorteilhaft sein, um die Nierenfunktion bei chronischen Nierenerkrankungen zu bewahren.

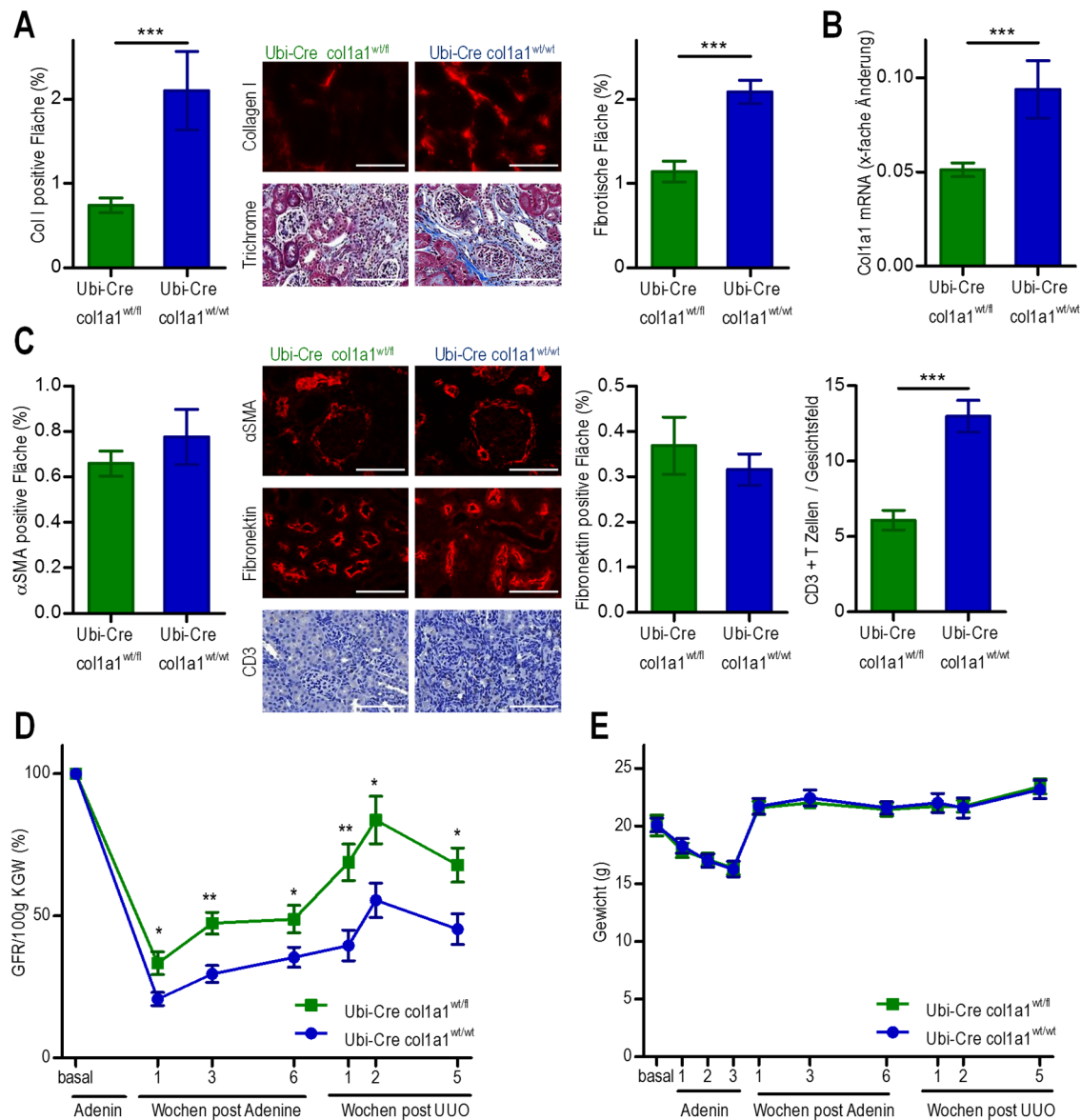


Abb. 4.15 Nierenfunktion, kompensatorische Hypertrophie und Fibrose bei Adenin-induzierter Nephropathie. Ubi-Cre x col1a1^{wt/fl} heterozygote Mäusen (n=11) und Ubi-Cre x col1a1^{wt/wt}-Kontrollen (n=4) wurden für 3 Wochen mit einer Adenin-reichen Diät gefüttert. 6 Wochen nach Beendigung der Adenin-Fütterung (A) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (C) α-SMA und Fibronectin durch Immunfluoreszenz und CD3-Histologie. (B) col1a1-mRNA Expression durch Real-Time-PCR. (D) Glomeruläre Filtrationsrate (GFR, bezogen auf eine Niere) pro 100g Körpergewicht (KGW) bestimmt vor und nach der Adenin-Fütterung und post-UUO. In Ubi-Cre x col1a1^{wt/fl} heterozygoten Mäusen (n=7) und Ubi-Cre x col1a1^{wt/wt}-Kontrollen (n=7) wurde 6 Wochen nach Adenin-Fütterung eine UUO durchgeführt, um einen 50% Nephronverlust zu erreichen und eine kompensatorische Hypertrophie in der verbleibenden Niere zu induzieren. (E) Körpergewicht im Versuchsverlauf. Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in A und C dargestellt. Maßstäbe: 100µm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit ungepaartem zweiseitigen T-Test. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

4.5.2 Adenin-induzierte Nephropathie bei $CD45^{wt/cre}$ x $col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen

Zelltypspezifische Deletion von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen wurde durchgeführt, um den Beitrag von Fibrozyten zur Entwicklung der Nierenfibrose im Modell der Adenin-Nephropathie zu untersuchen. Der Gehalt an Fibrose wurde 6 Wochen nach Absetzen des Adeninfutters analysiert. $CD45^{wt/cre}$ x $col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse zeigten etwa 52% weniger Kollagen Typ I Ablagerung und etwa 29% weniger Gesamtfibrose im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 4.16, A), während α -SMA und Fibronectin nicht unterschiedlich waren (Abb. 4.16, B). Die CD3-positiven Zellen waren um 36% reduziert (Abb. 4.16, C). Diese Daten zeigen, dass hämatopoetische Fibrozyten auch deutlich zur Nierenfibrose bei Adenin-induzierter Nephropathie beitragen.

Um die funktionellen Konsequenzen einer spezifischen Deletion von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen bei der Adenin-induzierten Nephropathie untersuchen zu können, wurden bei $CD45^{wt/cre}$ x $col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen und den entsprechenden Kontrollen ($CD45^{wt/cre}$ x $col1a1^{wt/wt}$ und $CD45^{wt/wt}$ x $col1a1^{fl/fl}$) GFR-Messungen durchgeführt. Messungen erfolgten basal und in Woche 3, 6 und 13 nach Beendigung der Adenin-Zufuhr. Die Leukozyten-spezifischen Knock-Out-Mäuse zeigten eine 38%ige und 34%ige höhere GFR als die Kontrollen in Woche 6 und 13 (Abb. 4.16, D). Eine geringere Verbesserung der Nierenfunktion bei Leukozyten-spezifischen Knock-Out-Mäusen im Vergleich zu heterozygoten Knock-Out-Mäusen korrelierte mit der geringeren Reduktion der Gesamtfibrose (29% gegenüber 45%).

Diese Daten zeigen, dass die Fibrose unabhängig davon, ob Kollagen Typ I durch endogene Fibroblasten oder infiltrierende hämatopoetische Zellen produziert wird, die Nierenfunktion bei Adenin-induzierter Nephropathie deutlich beeinträchtigt.

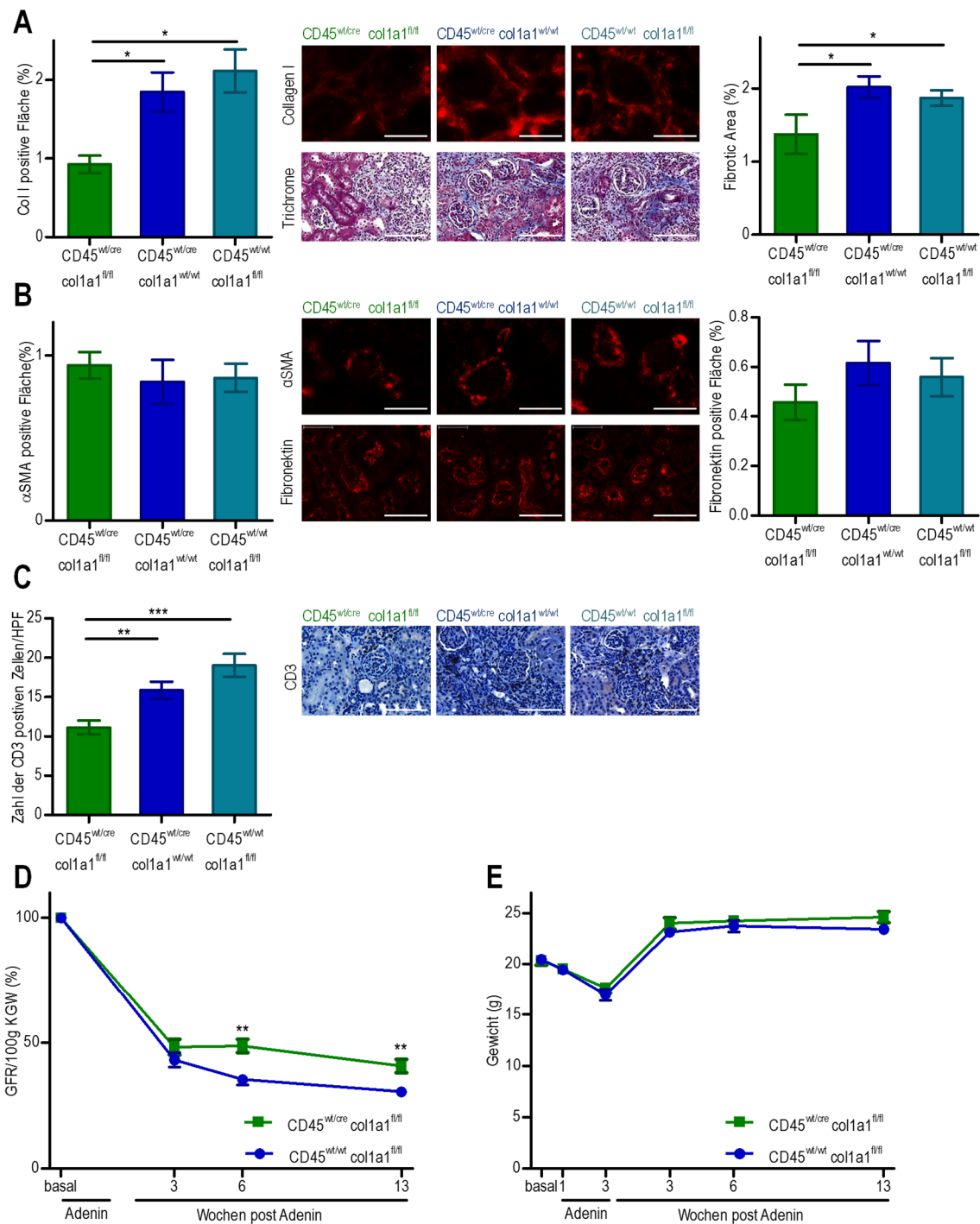


Abb. 4.16 Nierenfunktion, kompensatorische Hypertrophie und Fibrose bei Adenin-induzierter Nephropathie. CD45^{wt/cre} x col1a1^{fl/fl} (n=7), CD45^{wt/cre} x col1a1^{wt/wt} (n=7) und CD45^{wt/wt} x col1a1^{fl/fl} (n=7) wurden für 3 Wochen mit einer adeninreichen Diät gefüttert. 6 Wochen nach Beendigung der Adenin-Fütterung (A) Quantifizierung von Kollagen Typ I (Col I) durch Immunfluoreszenz, Gesamtfibrose (fibrotische Fläche) durch Masson-Trichrom-Färbung, (B) α-SMA und Fibronectin durch Immunfluoreszenz und (C) CD3-Histologie. (D) Glomeruläre Filtrationsrate (GFR, bezogen auf eine Niere) pro 100g Körpergewicht (KGW) bestimmt vor und nach der Adenin-Fütterung bei CD45^{wt/cre} x col1a1^{fl/fl} (n=8) und CD45^{wt/wt} x col1a1^{fl/fl} (n=7). (E) Körpergewicht im Versuchsverlauf. Repräsentative Bildausschnitte von Nierengewebe aus einer repräsentativen Maus/Gruppe sind in A bis C dargestellt. Maßstäbe: 100µm. Die Daten werden als Mittelwert ± s.e.m. dargestellt. Statistische Auswertung mit einseitigem ANOVA. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5. Diskussion

Chronische Nierenerkrankungen (CKD) haben sich zu einem weltweitem Problem entwickelt und betreffen schätzungsweise 10-16% der Bevölkerung [16]. CKD resultieren in einer gesteigerten Morbidität und frühzeitigen Mortalität und reduzieren die Lebensqualität betroffener Patienten durch die meist daraus folgende Nierenersatztherapie oder Dialysepflicht drastisch. Trotz dieser massiven Folgen und der dadurch entstehenden Kosten sind bis heute keine Therapien verfügbar, die die Progression der chronischen Nierenerkrankung und die daraus resultierenden zusätzlichen Sekundärfolgen wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen wirksam aufhalten können.

Die gemeinsame Endstrecke der CKD ist die renale Fibrose, welche durch eine massive Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen gekennzeichnet ist. Trotz intensiver Forschungen sind bis jetzt viele Fragen bezüglich der molekularen Mechanismen, der Progression und der Bedeutung der Fibrose für den Krankheitsverlauf und die Erholung unbeantwortet, wodurch die Entwicklung antifibrotischer Therapien erschwert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden diesbezüglich mehrere Fragen geklärt.

5.1 Der Kollagen Knock-Out ist effektiv und spezifisch; Kollagen Typ I ist das überwiegende extrazelluläre Matrixprotein.

Zunächst musste die grundlegende Frage der Effektivität und Spezifität des Kollagen Typ I Knock-Outs in unseren Fibrose-Modellen beantwortet werden. Da Zuchtergebnisse gezeigt hatten, dass ein vollständiger Knock-Out von Kollagen I embryonal letal und nur die Zucht einer heterozygoten ubiquitären Kollagen Knock-Out-Maus möglich war, konnte bewiesen werden, dass der Kollagen I Knock-Out erfolgreich war.

Um eine Quantifizierung des abgelagerten Kollagen Typ I zur gesamten abgelagerten extrazellulären Matrix zu ermöglichen, wurde das Modell der UUO und die Adenin-induzierte Nephropathie mit ubiquitären heterozygoten Kollagen Typ I-defizienten (Ubi-Cre x col1a1^{wt/fl}) Mäusen durchgeführt. Bei diesen Tieren ist durch den heterozygoten Knock-Out das Kollagen Typ I genetisch um etwa 50% reduziert. Es zeigte sich bei den beiden renalen Fibrosemodellen eine Reduktion der durch

Masson-Trichrom-Färbung analysierten Gesamtfibrose um 45-51%. Diese Reduktion der abgelagerten extrazellulären Matrixproteine um etwa die Hälfte verdeutlicht, dass die Mehrheit des fibrotischen Materials im Interstitium aus Kollagen Typ I besteht. Des Weiteren zeigte sich bei diesen Tieren eine durch Immunfluoreszenz gemessene Reduktion der Kollagen Typ I-Ablagerung um 62-65%. Die Reduktion des Kollagengehalts um mehr als 50% kann daran liegen, dass die Produktion um 50% reduziert, der Protease-vermittelte Abbau von Kollagen Typ I jedoch gleichgeblieben ist [41]. Auch die Anzahl der Kollagenpartikel als zusätzlicher Marker für das Ausmaß der Fibrose war bei den ubiquitären heterozygoten Kollagen Knock-Out-Mäusen in beiden Fibrosemodellen stets signifikant reduziert. Interessanterweise korrelierte die Anzahl der infiltrierenden CD3-positiven T-Zellen mit dem Ausmaß der Fibrose. Dies könnte daran liegen, dass fibrotische Areale gleichsam als Netz die Adhäsion von T-Zellen begünstigen. Die Deletion von Kollagen Typ I war spezifisch und hatte in keinem der Experimente der kompletten Versuchsreihe einen Einfluss auf die Anzahl der alpha-SMA-positiven Myofibroblasten oder die Expression von Fibronectin. Diese wurde stets mit Immunfluoreszenz-Analysen gezeigt.

Um zusätzlich die Kinetik des Abbaus der extrazellulären Matrix zu analysieren, wurde der Gehalt der Gesamtfibrose mittels Masson-Trichrom-Färbung bei Ubi-Cre x col1a1^{wt/wt}-Kontrolltieren nach 7 Tage UUO, nach R-UUO an Tag 28 nach Aufhebung der Ligatur und nach Schein-Operationen verglichen. Hierbei zeigte sich zum einen, dass Schein-Operationen allein zu keiner Ablagerung von EZM führen. Die Nieren enthielten kein messbares fibrotisches Gewebe. Die Dauer der Obstruktion bei 7 Tage UUO und R-UUO war vergleichbar bei 7, bzw. 6 Tagen. Interessanterweise war die Gesamtfibrose durch eine Regenerationszeit von 28 Tagen nur um 26% reduziert. Somit ist der Aufbau der EZM, welche durch die 6-tägige Obstruktion entstanden ist, wesentlich schneller als deren Protease-vermittelter Abbau. Folglich beeinflusst das fibrotische Gewebe nach einer relativ kurzfristigen Obstruktion längerfristig die Nierenfunktion dieser Tiere.

5.2 Fibrozyten wirken direkt und signifikant auf die Ablagerung von Kollagen I.

Obwohl die tubulointerstitielle Fibrose weithin als zentral für den Verlust der Nierenfunktion nach Nierenschäden angesehen wird, ist der Ursprung der Zellen, die

EZM im Interstitium produzieren, immer noch unklar. Frühere Studien konnten zeigen, dass einige der interstitiellen Zellen in der Niere von außerhalb der Niere und möglicherweise dem Knochenmark ableitbar sind, die sogenannten Fibrozyten. Die Rolle der hämatopoetischen Fibrozyten wird bis heute kontrovers diskutiert. Viele Arbeitsgruppen gehen davon aus, dass Fibrozyten nur indirekt zur Kollagenproduktion durch z.B. Freisetzung profibrotischer Faktoren beitragen und selbst kein Kollagen produzieren, sondern nur durch Endozytose Kollagen aufnehmen können. In früheren Publikationen wird der Anteil der Fibrozyten innerhalb der Kollagen-exprimierenden Zellen von nahezu 0% bis 50%, abhängig vom Fibrosemodell und Identifikationsverfahren der Fibrozyten, postuliert.

Roufousse et al. verwendete Knochenmarks-chimäre Mäuse, bei denen die Produktion von Kollagen I durch Knochenmarks-abstammende Zellen, aber nicht durch intrinsische Nierenzellen, zu einer gleichzeitigen Synthese von Reporter-Molekül Luciferase in der UUO-Niere führt. Mit Hilfe von Enzym-Assays für die Luciferase-Detektion konnte keine Teilnahme der Knochenmarks-abstammenden Zellen an der Kollagen Typ I-Produktion gezeigt werden [123]. Jedoch muss dieses Ergebnis kritisch bewertet werden, da möglicherweise durch die verwendete Methode der Y-Chromosomen-in-situ-Hybridisierung der Einfluss der Fibrozyten auf die Fibrogenese unterschätzt wird, da es durch Kernteilung zu einem Verlust des Y-Chromosoms und dadurch einer falsch negativen Detektion kommen kann.

Hingegen konnten bei Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen beim Menschen interstitielle Zellen vom Spender abgeleitet werden [64]. Grimm et al. zeigte, dass der Anteil der vom Spender abstammenden α -SMA-positiven Zellen bei renaler Abstoßung etwa 30% betrug, verglichen mit 10% in Fällen ohne Abstoßung. Bei Nagetiermodellen mit Knochenmarks-Transplantation haben mehrere Arbeitsgruppen Knochenmarks-ableitbare interstitielle Zellen beobachtet [56, 57]. Die genaue Natur dieser Zellen wurde jedoch in vielen dieser Studien nicht untersucht, so dass die beobachteten Zellen Fibroblasten, Gefäßzellen oder Entzündungszellen darstellen können. Iwano et al. versuchte die Art der Knochenmarks-abstammenden Zellen weiter zu definieren, indem Knochenmarks-chimäre Mäuse verwendet wurden, welche Knochenmark von transgenen Tieren erhielten, die ein grünes Fluoreszenzprotein unter der Kontrolle des Fibroblasten-spezifischen Proteins 1 (FSP1)-Promotors exprimierten. Zehn Tage nach UUO zeigten 15% der interstitiellen Zellen grünes Fluoreszenzprotein. Weil FSP1 als ein spezifischer Marker der

fibroblastischen Differenzierung angesehen wurde, war die Schlussfolgerung der Autoren, dass Knochenmarks-abstammende Zellen Fibroblasten geworden waren [48]. Jedoch wird mittlerweile die Verwendung von FSP1 als spezifischer Marker von Fibroblasten in Frage gestellt [124]. Broekema et al. wiesen auf eine starke Modellabhängigkeit des nachgewiesenen Anteils der Fibrozyten an der Kollagenablagerung hin. Im Modell der IR-Verletzungen fanden sie einen Anteil von 30% der Knochenmarks-ableitbaren Zellen an der Kollagenproduktion [58].

Um in dieser Arbeit die Bedeutung der Fibrozyten an der Kollagenproduktion und vor allem deren Anteil an der Gesamtkollagenproduktion ohne die Limitationen der bisherigen Versuchsreihen analysieren zu können, wurden zum einen drei verschiedene Mauslinien für die Versuche und zum anderen zwei verschiedene Fibrose-Modelle verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass infiltrierende hämatopoetische Zellen signifikant zur direkten Produktion und Ablagerung von Kollagen Typ I beitragen. Dies wurde durch die Verwendung von drei verschiedenen Mauslinien im Modell der 14 Tage UUO gezeigt. Die $CD45^{wt/cre} \times col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse und die $Vav-Cre \times col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse wiesen durch das Cre/loxP System einen spezifischen Knock-Out von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen auf. Bei beiden Mausstämmen konnte durch Durchflusszytometrie eine reduzierte Fibrozytenzahl (55% und 26%) und damit zusammenhängend eine Reduktion der Kollagenpartikel (51% und 26%), also der Gesamtfibrose, gezeigt werden. Dies führte bei den Tieren zu einer geringeren Ablagerung von Kollagen I (61% und 45%) und auch der gesamten extrazellulären Matrix (49% und 32%). Auch die Zellinfiltration war deutlich reduziert (28% und 34%). Bei den $Vav-Cre \times col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen konnte diese Reduktion von Kollagen Typ I zusätzlich auf mRNA-Ebene (39%) gezeigt werden.

Die Fähigkeit der Fibrozyten, Kollagen Typ I zu produzieren wurde auch nachgewiesen, indem eine 14 Tage UUO in Knochenmarks-chimären Mäusen durchgeführt wurde. Der Knochenmarks-Chimärismus wurde durch Transplantation des Knochenmarks von induziert vollständigen Kollagen Knock-Out-Mäusen, $ERT2-Cre \times col1a1^{fl/fl}$, in letal bestrahlte Wildtyp-Mäuse erzeugt. Der Chimärismus war stark ausgeprägt und lag bei allen Versuchsreihen bei über 90%. Dies bedeutete für die Tiere, dass sich spezifisch in ihren hämatopoetischen Zellen kein Kollagen Typ I ausbilden konnte, wohingegen die mesenchymalen Zellen nicht beeinflusst waren.

Mit diesen Tieren konnten die vorangegangenen Ergebnisse mittels FACS, Histologie und qPCR bekräftigt werden. Im Durchflusszytometer waren kaum Fibrozyten detektierbar, der Anteil der Reduktion lag bei 63%. Auch die Gesamtfibrose, widergespiegelt durch die Kollagenpartikel, war um 53% reduziert. Die Kollagenablagerung zeigte eine Reduktion von 60%, die gesamte EZM von 53%. Zusätzlich konnte auf mRNA-Ebene eine Reduktion von 31% und eine Reduktion der Zellinfiltration von 38% gezeigt werden.

Um wirklich zu beweisen, dass die aus dem Knochenmark stammenden Zellen in unseren Analysen hämatopoetische kollagenproduzierende Fibrozyten und keine anderen Stammzellen, wie beispielsweise mesenchymale Stammzellen waren, wurde eine Doppelfärbung des intrazellulären Kollagens Typ I mit einem spezifischen hämatopoetischen Marker (CD45) durchgeführt. Fibrozyten wurden als doppelt positive Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Zudem konnten in Splenozyten der Knochenmarks-chimären Mäuse gezeigt werden, dass Zellen ableitbar vom Knochenmarkspender aus dem Knochenmark in die Milz infiltrieren. Dies wurde durch unterschiedliche Typen des CD45 Antigens erreicht. Die Spender waren CD45.2-positiv, wohingegen die Empfänger CD45.1-positiv waren. Die einwandernden Zellen in die Milz wiesen nach Transplantation die charakteristischen Merkmale des Spenders, also CD45.2, auf.

Um nun zu zeigen, dass Fibrozyten nicht nur im Modell der UUO einen Beitrag zur Kollagenablagerung leisten, wurde ein weiteres Fibrose-Modell etabliert. Die $CD45^{wt/cre} \times col1a1^{fl/fl}$ -Mäuse wurden in einem druckunabhängigen System der Adenin-induzierten Nephropathie verwendet. Auch in diesem Modell zeigten Fibrozyten einen signifikanten Beitrag zur Kollagenablagerung. Die Leukozyten-spezifischen KO-Mäuse wiesen 52% weniger Kollagenablagerungen und 29% weniger Gesamt-EZM auf. Diese Daten unterstreichen, dass Fibrozyten einen signifikanten Beitrag zur Ablagerung von Kollagen I tragen.

5.3 Fibrozyten tragen 38% bis 54% zur Gesamtfibrose bei.

Um eine Quantifizierung des Beitrags der Fibrozyten zur Gesamt-Kollagen-Produktion zu ermöglichen, wurde das System mit ubiquitären heterozygoten Kollagen Typ I-defizienten Mäusen kalibriert. Bei diesen Tieren ist durch den heterozygoten Knock-Out das Kollagen Typ I genetisch um etwa 50% reduziert. Bei

der histologischen Auswertung zeigte sich eine Reduktion der Kollagen Typ I-Ablagerung um 62% nach 14 Tage UUO und 65% nach Adenin-induzierter Nephropathie.

Die Ergebnisse der Kollagen Reduktion der ubiquitären heterozygoten Kollagen Knock-Out-Mäuse wurden mit denen der homozygoten Kollagen Typ I Knock-Out-Mäuse in hämatopoetischen Zellen verglichen. Der homozygote Knock-Out von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen reduzierte die Kollagen Typ I-Deposition um 50-67% nach 14 Tage UUO und 50% nach Adenin-induzierter Nephropathie.

Somit tragen hämatopoetische Fibrozyten mit etwa 38-54% zur Gesamtablagerung von Kollagen Typ I in der Niere, in Abhängigkeit des verwendeten Modells der Nierenfibrose und der Art des Kollagen Typ I-Knock-Outs in hämatopoetischen Zellen, bei.

5.4 Endogene Fibroblasten/Perizyten dominieren in der frühen Phase der Fibrogenese; Fibrozyten dominieren in der späteren Phase der Fibrogenese.

Um die Bedeutung der Fibrozyten im zeitlichen Verlauf einer Fibrogenese genauer analysieren zu können, wurden kinetische Experimente im UUO-Modell durchgeführt. Hierfür wurde mit den hämatopoetischen Kollagen Knock-Out-Mäusen $CD45^{wt/cre} \times col1a1^{fl/fl}$ eine UUO mit einer Dauer von 7 und 14 Tagen ausgeführt. Der Vergleich der Ergebnisse der Analysen von Tag 7 und Tag 14 zeigt deutlich, dass die Reduktion der Nierenfibrose in den Tag 7 UUO-Nieren von $CD45^{wt/cre} \times col1a1^{fl/fl}$ -Mäusen nicht so ausgeprägt wie in den Tag 14 UUO-Nieren war. Die Kollagenablagerung zeigte einen Anstieg der Reduktion von 49% auf 61%, die Gesamtablagerung einen Anstieg von 30% auf 49%. Als Vergleich dienten die Resultate der 7 und 14 Tage UUO der heterozygoten Kollagen Knock-Out-Mäuse, $Ubi-Cre \times col1a1^{wt/fl}$. Bei diesen Tieren zeigte sich nach 7 und 14 Tagen UUO ein vergleichbarer Effekt der Reduktion der Fibrose.

Diese Versuche deuten an, dass endogene Zellen (Fibroblasten/Perizyten) bei der frühen Produktion von Kollagen Typ I vorherrschen, während Fibrozyten im späteren Verlauf der Fibrogenese aufholen. Dieser Effekt ist erklärbar, da Fibrozyten eine gewisse Zeit brauchen um in die Niere zu migrieren und dann erst mit der Kollagenproduktion beginnen können. Endogene Zellen sind von Anfang an am Ort

des Geschehens und können unmittelbar nach einem inflammatorischen Stimulus mit der Kollagenproduktion beginnen.

5.5 Tubuläre Epithelzellen haben keine relevante Rolle für die direkte Produktion von Kollagen Typ I.

Neben endogenen Fibroblasten/Perizyten und infiltrierenden Fibrozyten wird auch eine Bedeutung von EMT und EndoMT zur Entwicklung der renalen Fibrose diskutiert. Parallel zur Analyse der Funktion der Fibrozyten wurden in unserer Arbeitsgruppe Untersuchungen zum Beitrag der EMT zur Kollagenablagerung durchgeführt. Hierfür wurden Mäuse mit einem induzierten zelltypspezifischen Kollagen Knock-Out in Tubulusepithelzellen im Modell einer 14 Tage UUO verwendet.

Dabei konnte festgestellt werden, dass tubuläre Epithelzellen keine relevante Rolle für die direkte Produktion von Kollagen Typ I tragen. Sowohl bei Durchflusszytometrie- als auch in Histologien- und qPCR-Analysen konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu deren Kontrollgruppen gemessen werden. Das Fehlen des direkten Einflusses schließt jedoch nicht aus, dass eine partielle EMT von beschädigten tubulären Epithelzellen indirekt zur Nierenfibrose beiträgt. Diese indirekte Funktion wurde in den letzten Jahren von einigen Arbeitsgruppen als essentiell für die Entwicklung der Fibrose postuliert [125-127]. Partielle EMT und chronische Entzündungen bilden zusammen ein profibrotisches Milieu, welches die Kollagenproduktion durch endogene Fibroblasten/Perizyten und infiltrierende Fibrozyten in der Niere ermöglicht.

5.6 Die funktionelle Bedeutung der renalen Fibrose ist abhängig vom verwendeten Modell.

Bisher wurde die Frage zur funktionellen Bedeutung der renalen Fibrose nicht eindeutig beantwortet. Unklar war ob die Nierenfibrose vorteilhaft ist, weil sie die anatomische Struktur der Niere bewahrt; ob Nierenfibrose funktionell irrelevant ist, weil sie nur beschädigtes Nierengewebe ersetzt, oder ob die Nierenfibrose schädlich ist, da sie die Regeneration oder die Kompensation der Nierenfunktion beeinträchtigt. Eine Vielzahl an Arbeitsgruppen unterstützt die letzte Theorie und versucht darauf

basierend Therapien zu entwickeln. Sharma et al. zeigte bei diabetischer Nephropathie, dass eine antifibrotische Behandlung ein vernünftiger Ansatz zur Erhaltung der Nierenfunktion bei ausgewählten Nierenerkrankungen sein kann. Es wurde festgestellt, dass eine oral bioverfügbare Verbindung, Pirfenidon, die TGF- β -Produktion und die anschließende Matrixablagerung in experimentellen Tiermodellen der Lungen- und Nierenerkrankung hemmt [128]. Demgegenüber stehen die Forschungen von Kaissling et al. die besagen, dass Myofibroblasten nach einem inflammatorischen Stimulus die beschädigten Tubuli umgeben und so die strukturelle Integrität dieser erhalten und deren Regeneration fördern können [75].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage bezüglich der funktionellen Bedeutung der Fibrose durch serielle Messungen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) in zwei pathophysiologisch sehr unterschiedlichen Modellen der Nierenfibrose beantwortet, dem Modell der reversiblen UUO und dem Modell der Adenin-induzierten Nephropathie. GFR wurde hierbei durch Clearance eines intravenös injizierten Markermoleküls (FITC-Sinistrin) gemessen, welches der Goldstandard für die Messung der Nierenfunktion ist.

5.6.1 Fibrose ist nützlich im Modell der R-UUO; Fibrose ist schädlich im Modell der Adenin-induzierten Nephropathie.

Im Modell des reversiblen UUO mit anschließender irreversibler Obstruktion der kontralateralen Niere ist die frühe Kollagenproduktion essentiell, um die Nierenfunktion zu erhalten und das Überleben der Mäuse zu ermöglichen. Dies konnte in zwei verschiedenen Mauslinien gezeigt werden. 100% der in der R-UUO verwendeten heterozygoten ubiquitären Kollagen Knock-Out-Mäuse und 100% der induziert ubiquitären Kollagen Knock-Out-Mäuse starben kurz nachdem die kontralaterale Niere ligiert wurde, wohingegen bei den Kontrollen nur maximal 20% verstarben. Bei den Schein-operierten Tieren starben hingegen weder ubiquitär heterozygote Knock-Out-Tiere noch deren Kontrollen. Dadurch können die Operation an sich und die möglicherweise daraus entstehenden Wundheilungsstörungen als Todesursache ausgeschlossen werden.

Durch die vollständige, bzw. 50%ige Reduktion des Kollagens und folglich einer starken Reduktion der Fibrose kann sich die ursprünglich gestaute Niere nicht regenerieren und die Tiere sterben nach Ligatur der kontralateralen Niere an

Nierenversagen, was durch die massive Erhöhung der Kaliumspiegel bestätigt werden konnte. Eine Fibrose scheint notwendig zu sein, um dem erhöhten intrarenalen Druck zu widerstehen, der aus einer Obstruktion des Urinflusses resultiert. In Folge dessen, ist die Fibrose essentiell für die Regeneration der geschädigten Niere im Modell der reversiblen unilateralen Ureterobstruktion.

Im Gegensatz dazu war die Nierenfibrose im chronischen Modell der Adenin-induzierten Nephropathie nicht nur für die Erhaltung der Nierenfunktion, sondern auch für die Kompensation der Nierenfunktion nach akutem Nephronverlust eindeutig schädlich. Um diese negative Prognose hinsichtlich der Regeneration feststellen zu können, wurden heterozygote ubiquitäre Kollagen Knock-Out-Mäuse in zwei kombinierten renalen Modellen verwendet. Zunächst wurde bei diesen Tieren eine Nephropathie durch Adenin induziert. Im Vergleich der basalen GFR zur GFR nach einer, drei und sechs Wochen nach Absetzen des Adeninfutters und somit des inflammatorischen Stimulus zeigte sich deutlich, dass sich die heterozygoten ubiquitären Kollagen Knock-Out-Mäuse signifikant besser erholten. Bei heterozygoten Kollagen Typ I-defizienten Mäusen war die Nierenfunktion um 61%, 60% und 38% besser als bei den Wildtyp-Kontrollen. Diese Daten zeigen, dass Fibrose eine deutlich negative Auswirkung auf die Nierenfunktion bei Adenin-induzierter Nephropathie hat.

Um nun zu analysieren wie die Regenerationsfähigkeit nach weiterem Verlust an Nephrone durch den Gehalt von Kollagen Typ I beeinflusst wird, wurde nach Adeninbehandlung eine Ligatur einer Niere durchgeführt. Somit wurde die Zahl der Nephrone um 50% reduziert. Weiterer Verlust von Nephrone in zuvor geschädigten und fibrotischen Nieren ist ein typisches Szenario, das bei Patienten zu einem Endstadium der renalen Erkrankung führt [129, 130]. Auch hier waren die Mäuse mit 50% weniger Kollagen deutlich im Vorteil. Ihre GFR Daten waren eine, zwei und fünf Wochen post UUO signifikant höher als die der Kontrollen (69%, 84%, 68% im Vergleich zu 40%, 56%, 45%). Die heterozygoten ubiquitären Kollagen Knock-Out-Mäuse hatten durch die geringere Menge an Kollagen Typ I eine bessere Fähigkeit zur kompensatorischen Hypertrophie.

Zusammengefasst stellt die Fibrose im Modell der Adenin-induzierten Nephropathie mit einem zusätzlichen Nephronverlust eine negative Prognose hinsichtlich der

Regeneration dar. In diesem Modell wirkt selbst eine partielle Reduktion der Fibrose vorteilhaft, um die Nierenfunktion bei chronischer Nierenerkrankung zu bewahren.

Die Ergebnisse konnten verdeutlichen, dass die funktionelle Bedeutung der Fibrose stark abhängig von der Ursache der renalen Fibrose ist. Sobald festgesellt ist, wann und bei welchen Krankheiten die Reduktion der Fibrose die Nierenregeneration und -funktion verbessert, können klinische Versuche (z.B. für chronische Allograft-Nephropathie oder diabetische Nephropathie) adäquat gestaltet werden.

5.6.2 Kollagen-Produktion durch Fibrozyten ist bei R-UUO nicht erforderlich; Kollagen-Produktion ist unabhängig von der zellulären Kollagenquelle im Modell der Adenin-induzierten Nephropathie.

Es konnte gezeigt werden, dass die funktionelle Bedeutung der Fibrose an sich unterschiedlich ist, je nachdem welches Modell zur Analyse Verwendung findet.

Um nun die funktionelle Bedeutung noch grundlegender analysieren zu können und somit konkrete Anhaltspunkte für eine mögliche antifibrotische Therapie zu erkennen, wurden die funktionellen Konsequenzen der zelltypspezifischen Produktion von Kollagen untersucht. Die funktionelle Bedeutung der bereits gezeigten, massiven Kollagenproduktion der Fibrozyten wurde ebenfalls mittels zweier unterschiedlicher Modelle analysiert, der reversiblen UUO und der Adenin-induzierten Nephropathie.

Im 6 Tage R-UUO-Modell war die Kollagen-Produktion durch hämatopoetische Fibrozyten nicht erforderlich, um die Nierenfunktion zu erhalten. Die spezifische Deletion von Kollagen Typ I in hämatopoetischen Zellen resultierte in keiner verminderten GFR oder verringerten Überlebensrate. Dieser Unterschied im Kontrast zur einer ubiquitären heterozygoten oder vollständigen Kollagendefizienz kann durch die Tatsache erklärt werden, dass Fibrozyten in die Niere migrieren müssen und somit mehr Zeit als endogene Fibroblasten benötigen, um mit der Kollagenproduktion beginnen zu können. Diese Daten zeigen erneut, dass der Beitrag von Fibrozyten zu Fibrose in 7 Tage UUO-Nieren viel geringer ist als in 14 Tage UUO-Nieren. Darüber hinaus können Fibrozyten Kollagen an etwas unterschiedlichen anatomischen Stellen innerhalb des Interstitiums ablagern als endogene Fibroblasten oder Perizyten, die für den Schutz von Tubuli gegen druckinduzierte Schäden relevant

sein können. Somit trägt das Kollagen Typ I, produziert von Fibrozyten, keine funktionelle Rolle im Modell der R-UUO.

Bei dem chronischen und druckunabhängigeren Modell der Adenin-induzierten Nephropathie war die Ablagerung von Kollagen unabhängig von der zellulären Kollagenquelle. Die Nierenfunktion wurde ebenfalls verbessert, wenn Kollagen Typ I spezifisch in hämatopoetischen Fibrozyten ausgeknockt wurde. Die Fibrose kann sich bei diesem Modell über einen Zeitraum von 3 Wochen entwickeln, somit haben Fibrozyten genügend Zeit um zu infiltrieren und Kollagen zu produzieren. 6 und 13 Wochen nach Absetzen des Adenin-Futters zeigten die hämatopoetischen Kollagen Knock-Out-Tiere um 38% und 34% signifikant höhere GFR Daten als deren Kontrollen. Im zukünftigen Verlauf dieser Arbeit sollte zusätzlich geprüft werden, wie sich die Nierenfunktion dieser Tiere nach einer zusätzlichen UUO verändert, um somit den funktionellen Effekt, des von Fibrozyten abgelagerten Kollagens, auch bei 50% Nephronverlust analysieren zu können.

Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit ein besseres Verständnis der zellulären Herkunft und der biologischen Bedeutung der Nierenfibrose erreicht werden. Dies dient der Identifikation geeigneter Krankheiten und Bedingungen für die Entwicklung antifibrotischer Therapien.

6. Zusammenfassung

Renale Schädigungen führen meist zu einer unvollständigen Heilung mit der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose, welche eng mit einem chronischen Nierenversagen assoziiert ist. Langfristiges Ziel ist es, Therapieansätze zu entwickeln, mit denen der zunehmende Verlust der Nierenfunktion verhindert und somit für die Patienten die oftmals resultierende Nierenersatztherapie oder Dialysepflicht umgangen werden kann. Dafür nötig sind die Aufklärung der genauen molekularen Mechanismen der Fibrose-Entstehung und Verständnis der funktionellen Relevanz des fibrotischen Gewebes. Charakteristisch für eine Fibrose ist die Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine wie dem Kollagen Typ I.

Neben Fibroblasten haben auch hämatopoetische Zellen, sogenannte Fibrozyten, und tubuläre Epithelzellen die Fähigkeit, Kollagen zu produzieren. Es ist jedoch völlig unbekannt, ob diese Zellen direkt zur Produktion von Kollagen Typ I beitragen oder Fibrose nur indirekt, z.B. durch Aktivierung endogener Fibroblasten, beeinflussen.

Fragestellungen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollen, sind der mengenmäßige Beitrag von Fibrozyten zur Produktion von Kollagen Typ I und zusätzlich die Relevanz von Fibrose für den Erhalt und die Regeneration der Nierenfunktion. Hierfür wurden konditionelle Kollagen Typ I-defiziente Mäuse generiert und in verschiedenen renalen Fibrose-Modellen verwendet. Als Fibrose-Modelle dienten pathophysiologisch sehr unterschiedliche Modelle, das Modell der unilateralen Ureterobstruktion, die reversible unilaterale Ureterobstruktion, das Modell der Adenin-induzierten Nephropathie sowie die Kombination aus Adenin-Nephropathie und unilateraler Ureterostruktion.

Bei drei verschiedenen Mauslinien mit einer hämatopoetischen Defizienz von Kollagen Typ I konnte im Modell der UUO und der Adenin-Nephropathie gezeigt werden, dass Fibrozyten direkt mit 38-54% zur gesamten Kollagen Typ I Produktion in der Niere beitragen. Zudem konnte mittels Kinetik-Versuchen gezeigt werden, dass Fibroblasten unmittelbar nach renaler Schädigung Kollagen Typ I exprimieren, wohingegen Fibrozyten erst in das geschädigte Gewebe infiltrieren müssen, um dann zeitverzögert mit der Kollagenproduktion beginnen zu können.

Die epitheliale mesenchymale Transition hingegen hat keinen direkten Einfluss auf die Generierung der Fibrose, was mittels tubulusspezifischer Kollagen Knock-Out-Mäuse gezeigt werden konnte.

Die biologische Bedeutung der Fibrose hängt stark von der Art des Schadens ab. Bei der unilateralen Ureterobstruktion, welches ein akutes druckabhängiges Modell darstellt, ist die Kollagenproduktion durch endogene Fibroblasten notwendig, um die Nierenfunktion zu erhalten. In starkem Kontrast dazu ist eine Fibrose für die Nierenfunktion und für die Kompensation nach akutem Nephronverlust im chronischen Modell der Adenin-induzierten Nephropathie schädlich.

Diese Daten liefern Erklärungen zur Entstehung der Fibrose. Fibrozyten tragen eine signifikante und direkte Rolle zur Fibrogenese. Zudem werden die Grenzen der antifibrotischen Therapien bei Nierenerkrankungen dargelegt. Je nach Art der Nierenerkrankung, die zu einer renalen Fibrose führt, muss geprüft werden, inwieweit eine antifibrotische Therapie sinnvoll ist.

7. Literaturverzeichnis

1. M. Classen, V.D., K. Kochsiek, *Innere Medizin*. Vol. 11. 2003, Urban & Fischer.
2. Silbernagl, R.K.H.-C.P.S., *Physiologie 5* Thieme Verlag KG. 2005.
3. Robert Schmidt, F.L., Manfred Heckmann, *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Vol. 29. 2005: Springer.
4. Georgas, K., et al., *Use of dual section mRNA in situ hybridisation/immunohistochemistry to clarify gene expression patterns during the early stages of nephron development in the embryo and in the mature nephron of the adult mouse kidney*. *Histochem Cell Biol*, 2008. **130**(5): p. 927-42.
5. Weiner, S.G.D., *Primer on Kidney Diseases*. Vol. 6. 2013, National Kidney Foundation
6. W Siegenthaler, H.B., *Klinische Pathophysiologie*. Vol. 9. 2006: Georg Thieme Verlag K.
7. www.deutschesapothekenportal.de.
8. Lemley, K.V. and W. Kriz, *Anatomy of the renal interstitium*. *Kidney Int*, 1991. **39**(3): p. 370-81.
9. Zeisberg, M. and R. Kalluri, *Physiology of the Renal Interstitium*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015. **10**(10): p. 1831-40.
10. Bonventre, J.V. and L. Yang, *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. *J Clin Invest*, 2011. **121**(11): p. 4210-21.
11. Lattanzio, M.R. and N.P. Kopyt, *Acute kidney injury: new concepts in definition, diagnosis, pathophysiology, and treatment*. *J Am Osteopath Assoc*, 2009. **109**(1): p. 13-9.
12. Thurman, J.M., *Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion*. *Clin Immunol*, 2007. **123**(1): p. 7-13.
13. Kellum, J.A. and N. Lameire, *Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1)*. *Crit Care*, 2013. **17**(1): p. 204.
14. Lopez-Novoa, J.M., et al., *Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: clinical implications*. *J Transl Med*, 2011. **9**: p. 13.
15. Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
16. QuaSi-Niere, *Jahresberichte der QuaSi-Niere gGmbH iL*, B. Niere, Editor. 2006/2007.
17. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 199-210.
18. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. *Nat Med*, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
19. Nagaoka, T., et al., *Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression*. *Am J Pathol*, 2000. **157**(1): p. 237-47.
20. Strutz, F. and M. Zeisberg, *Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(11): p. 2992-8.
21. Schreml, S., et al., *Oxygen in acute and chronic wound healing*. *Br J Dermatol*, 2010. **163**(2): p. 257-68.
22. Eddy, A.A., *Molecular basis of renal fibrosis*. *Pediatr Nephrol*, 2000. **15**(3-4): p. 290-301.

23. Boor, P., [*New approaches in progressive kidney diseases*]. *Pathologe*, 2012. **33 Suppl 2**: p. 296-301.
24. Bohle, A., F. Strutz, and G.A. Muller, *On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium*. *Exp Nephrol*, 1994. **2(4)**: p. 205-10.
25. Conway, B. and J. Hughes, *Cellular orchestrators of renal fibrosis*. *Qjm*, 2012. **105(7)**: p. 611-5.
26. Nagle, R.B. and R.E. Bulger, *Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. II. Late morphologic changes*. *Lab Invest*, 1978. **38(3)**: p. 270-8.
27. Eyden, B., *The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research*. *Ultrastruct Pathol*, 2001. **25(1)**: p. 39-50.
28. Eyden, B., et al., *The myofibroblast and its tumours*. *J Clin Pathol*, 2009. **62(3)**: p. 236-49.
29. Tomasek, J.J., et al., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3(5)**: p. 349-63.
30. Klingberg, F., B. Hinz, and E.S. White, *The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis*. *J Pathol*, 2013. **229(2)**: p. 298-309.
31. Lin, S.L., et al., *Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney*. *Am J Pathol*, 2008. **173(6)**: p. 1617-27.
32. Liu, Y., *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2011. **7(12)**: p. 684-96.
33. Mack, M. and M. Yanagita, *Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis*. *Kidney Int*, 2015. **87(2)**: p. 297-307.
34. Boor, P. and J. Floege, *The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27(8)**: p. 3027-36.
35. Chang, H.Y., et al., *Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99(20)**: p. 12877-82.
36. Asada, N., et al., *Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice*. *J Clin Invest*, 2011. **121(10)**: p. 3981-90.
37. Sato, Y. and M. Yanagita, *Renal anemia: from incurable to curable*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **305(9)**: p. F1239-48.
38. Souma, T., et al., *Plasticity of renal erythropoietin-producing cells governs fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2013. **24(10)**: p. 1599-616.
39. Campanholle, G., et al., *Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013. **304(7)**: p. C591-603.
40. Pallone, T.L. and E.P. Sillardorff, *Pericyte regulation of renal medullary blood flow*. *Exp Nephrol*, 2001. **9(3)**: p. 165-70.
41. Humphreys, B.D., et al., *Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis*. *Am J Pathol*, 2010. **176(1)**: p. 85-97.
42. Kida, Y. and J.S. Duffield, *Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2011. **38(7)**: p. 467-73.
43. Norman, J.T., I.M. Clark, and P.L. Garcia, *Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts*. *Kidney Int*, 2000. **58(6)**: p. 2351-66.
44. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2009. **119(6)**: p. 1420-8.

45. Greenburg, G. and E.D. Hay, *Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells*. J Cell Biol, 1982. **95**(1): p. 333-9.
46. Nakaya, Y. and G. Sheng, *EMT in developmental morphogenesis*. Cancer Lett, 2013. **341**(1): p. 9-15.
47. Zeisberg, M., et al., *BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 964-8.
48. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
49. LeBleu, V.S., et al., *Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Nat Med, 2013. **19**(8): p. 1047-53.
50. Zeisberg, E.M., et al., *Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(12): p. 2282-7.
51. Bucala, R., et al., *Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair*. Mol Med, 1994. **1**(1): p. 71-81.
52. Chesney, J., et al., *Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 419-25.
53. Herzog, E.L. and R. Bucala, *Fibrocytes in health and disease*. Exp Hematol, 2010. **38**(7): p. 548-56.
54. Hartlapp, I., et al., *Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo*. Faseb j, 2001. **15**(12): p. 2215-24.
55. Chesney, J., et al., *The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(12): p. 6307-12.
56. Hashimoto, N., et al., *Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2004. **113**(2): p. 243-52.
57. Kisseleva, T., et al., *Bone marrow-derived fibrocytes participate in pathogenesis of liver fibrosis*. J Hepatol, 2006. **45**(3): p. 429-38.
58. Broekema, M., et al., *Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(1): p. 165-75.
59. Li, J., et al., *The contribution of bone marrow-derived cells to the development of renal interstitial fibrosis*. Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 697-706.
60. Jang, H.S., et al., *Bone marrow-derived cells play a major role in kidney fibrosis via proliferation and differentiation in the infiltrated site*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(6): p. 817-25.
61. Niedermeier, M., et al., *CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17892-7.
62. Sakai, N., et al., *The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes*. J Hypertens, 2008. **26**(4): p. 780-90.
63. Sakai, N., et al., *Fibrocytes are involved in the pathogenesis of human chronic kidney disease*. Hum Pathol, 2010. **41**(5): p. 672-8.
64. Grimm, P.C., et al., *Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection*. N Engl J Med, 2001. **345**(2): p. 93-7.
65. Reich, B., et al., *Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model*. Kidney Int, 2013. **84**(1): p. 78-89.

66. Sakai, N., et al., *Secondary lymphoid tissue chemokine (SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(38): p. 14098-103.
67. Xia, Y., M.L. Entman, and Y. Wang, *Critical role of CXCL16 in hypertensive kidney injury and fibrosis*. Hypertension, 2013. **62**(6): p. 1129-37.
68. Shao, D.D., et al., *Pivotal Advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1323-33.
69. Castano, A.P., et al., *Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc gamma R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo*. Sci Transl Med, 2009. **1**(5): p. 5ra13.
70. Abe, R., et al., *Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7556-62.
71. Hong, K.M., et al., *Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Biol Chem, 2007. **282**(31): p. 22910-20.
72. Gan, Y., et al., *Role of semaphorin 7a signaling in transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis and scleroderma-related interstitial lung disease*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(8): p. 2484-94.
73. Yang, J., et al., *Adiponectin promotes monocyte-to-fibroblast transition in renal fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(10): p. 1644-59.
74. Bechtel, W., et al., *Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney*. Nat Med, 2010. **16**(5): p. 544-50.
75. Kaissling, B., M. Lehir, and W. Kriz, *Renal epithelial injury and fibrosis*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(7): p. 931-9.
76. Sun, D.F., et al., *Possible involvement of myofibroblasts in cellular recovery of uranyl acetate-induced acute renal failure in rats*. Am J Pathol, 2000. **157**(4): p. 1321-35.
77. Fujigaki, Y., et al., *Transient myofibroblast differentiation of interstitial fibroblastic cells relevant to tubular dilatation in uranyl acetate-induced acute renal failure in rats*. Virchows Arch, 2005. **446**(2): p. 164-76.
78. Kalluri, R., *Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 422-33.
79. Stamenkovic, I., *Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 448-64.
80. Yurchenco, P.D. and B.L. Patton, *Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(12): p. 1277-94.
81. Slater, M., *Dynamic interactions of the extracellular matrix*. Histo Histopathol, 1996. **11**(1): p. 175-80.
82. Schultz, G.S. and A. Wysocki, *Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing*. Wound Repair Regen, 2009. **17**(2): p. 153-62.
83. Eddy, A.A., *Can renal fibrosis be reversed?* Pediatr Nephrol, 2005. **20**(10): p. 1369-75.
84. www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/14707425/U4CP5-1_FibronectinIntegri_ksm.jpg.
85. Pankov, R. and K.M. Yamada, *Fibronectin at a glance*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 20): p. 3861-3.
86. Kornblihtt, A.R., K. Vibe-Pedersen, and F.E. Baralle, *Isolation and characterization of cDNA clones for human and bovine fibronectins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(11): p. 3218-22.

87. Singh, P., C. Carraher, and J.E. Schwarzbauer, *Assembly of fibronectin extracellular matrix*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010. **26**: p. 397-419.
88. Prockop, D.J. and K.I. Kivirikko, *Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy*. *Annu Rev Biochem*, 1995. **64**: p. 403-34.
89. Khan, A.M., et al., *Connective tissue structures in clubfoot: a morphologic study*. *J Pediatr Orthop*, 2001. **21**(6): p. 708-12.
90. Sun, Y.L., et al., *Direct quantification of the flexibility of type I collagen monomer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **295**(2): p. 382-6.
91. Mienaltowski, M.J. and D.E. Birk, *Structure, physiology, and biochemistry of collagens*. *Adv Exp Med Biol*, 2014. **802**: p. 5-29.
92. Fietzek, P.P. and K. Kuhn, *The primary structure of collagen*. *Int Rev Connect Tissue Res*, 1976. **7**: p. 1-60.
93. Frank, S., et al., *Collagen triple helix formation can be nucleated at either end*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(10): p. 7747-50.
94. www.iupui.edu.
95. Jaenisch, R., *Transgenic animals*. *Science*, 1988. **240**(4858): p. 1468-74.
96. Sauer, B., *Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *Mol Cell Biol*, 1987. **7**(6): p. 2087-96.
97. Sternberg, N. and D. Hamilton, *Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites*. *J Mol Biol*, 1981. **150**(4): p. 467-86.
98. Hoess, R.H., M. Ziese, and N. Sternberg, *P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. **79**(11): p. 3398-402.
99. Argos, P., et al., *The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity*. *Embo j*, 1986. **5**(2): p. 433-40.
100. Guo, F., D.N. Gopaul, and G.D. van Duyne, *Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse*. *Nature*, 1997. **389**(6646): p. 40-6.
101. Wang, Y., et al., *Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events*. *Kidney Int*, 2000. **58**(4): p. 1797-804.
102. Miner, J.H. and J.R. Sanes, *Molecular and functional defects in kidneys of mice lacking collagen alpha 3(IV): implications for Alport syndrome*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(5): p. 1403-13.
103. Chevalier, R.L., M.S. Forbes, and B.A. Thornhill, *Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy*. *Kidney Int*, 2009. **75**(11): p. 1145-52.
104. Vaughan, E.D., Jr., et al., *Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York*. *J Urol*, 2004. **172**(6 Pt 2): p. 2563-9.
105. Eddy, A.A., et al., *Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models*. *Pediatr Nephrol*, 2012. **27**(8): p. 1233-47.
106. Sinuani, I., et al., *Mesangial cells initiate compensatory tubular cell hypertrophy*. *Am J Nephrol*, 2010. **31**(4): p. 326-31.
107. Hostetter, T.H., *Progression of renal disease and renal hypertrophy*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 263-78.
108. Hauser, P., et al., *Transcriptional response in the unaffected kidney after contralateral hydronephrosis or nephrectomy*. *Kidney Int*, 2005. **68**(6): p. 2497-507.
109. Hesketh, E.E., et al., *A murine model of irreversible and reversible unilateral ureteric obstruction*. *J Vis Exp*, 2014(94).

110. Puri, T.S., et al., *Chronic kidney disease induced in mice by reversible unilateral ureteral obstruction is dependent on genetic background*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(4): p. F1024-32.
111. Bollee, G., et al., *Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(4): p. 679-88.
112. Engle, S.J., et al., *Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5307-12.
113. Evan, A.P., et al., *Sequential analysis of kidney stone formation in the Aprt knockout mouse*. Kidney Int, 2001. **60**(3): p. 910-23.
114. Okabe, C., et al., *NF-kappaB activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(2): p. F155-63.
115. Oyama, Y., et al., *High-mobility group box-1 protein promotes granulomatous nephritis in adenine-induced nephropathy*. Lab Invest, 2010. **90**(6): p. 853-66.
116. Qi, Z., et al., *Serial determination of glomerular filtration rate in conscious mice using FITC-inulin clearance*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(3): p. F590-6.
117. Qi, Z. and M.D. Breyer, *Measurement of glomerular filtration rate in conscious mice*. Methods Mol Biol, 2009. **466**: p. 61-72.
118. Schnieke, A., K. Harbers, and R. Jaenisch, *Embryonic lethal mutation in mice induced by retrovirus insertion into the alpha 1(I) collagen gene*. Nature, 1983. **304**(5924): p. 315-20.
119. Schwenk, F., U. Baron, and K. Rajewsky, *A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(24): p. 5080-1.
120. Yang, J., et al., *Transgenic tools for analysis of the haematopoietic system: knock-in CD45 reporter and deleter mice*. J Immunol Methods, 2008. **337**(2): p. 81-7.
121. de Boer, J., et al., *Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre*. Eur J Immunol, 2003. **33**(2): p. 314-25.
122. Seldin, M.F., et al., *Allelic variants of Ly-5 in inbred and natural populations of mice*. Immunogenetics, 1987. **26**(1-2): p. 74-8.
123. Roufosse, C., et al., *Bone marrow-derived cells do not contribute significantly to collagen I synthesis in a murine model of renal fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(3): p. 775-82.
124. Le Hir, M., et al., *Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys*. Histochem Cell Biol, 2005. **123**(4-5): p. 335-46.
125. Grande, M.T., et al., *Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease*. Nat Med, 2015. **21**(9): p. 989-97.
126. Lovisa, S., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis*. Nat Med, 2015. **21**(9): p. 998-1009.
127. Yang, L., et al., *Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury*. Nat Med, 2010. **16**(5): p. 535-43, 1p following 143.
128. Sharma, K., et al., *Pirfenidone for diabetic nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(6): p. 1144-51.
129. Venner, J.M., et al., *Relationships among injury, fibrosis, and time in human kidney transplants*. JCI Insight, 2016. **1**(1): p. e85323.

130. Ferenbach, D.A. and J.V. Bonventre, *Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(5): p. 264-76.

8. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Abb | Abbildung |
| AKI | Akute Kidney Injury |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| APC | Allophycocyanin |
| α -SMA | alpha smooth muscle actin |
| Bp | Basenpaare |
| BS | Binding solution |
| CCR2 | chemokine receptor type 2 |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CKD | Chronic Kidney Disease |
| Cre | cyclization recombination |
| CTGF | connective tissue growth factor |
| C _T - Wert | cycle treshold Wert |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidine |
| DEPC | Diethyldicarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| eGFP | enhanced green fluorescent protein |
| Epo | Erythropoetin |
| ES | Embryonale Stammzellen |
| ESRD | End-Stage Renal Disease |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| FACS | fluorescence activated cell sorting |
| FGF2 | fibroblast growth factor 2 |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| FSC | forward scatter |
| FSC | forward scatter |
| FSP1 | fibroblast-specific protein 1 |
| g | Gramm |
| GFR | Glomeruläre Filtrationsrate |
| Gy | Gray |
| HRP | Meerrettichperoxidase |

| | |
|----------|---|
| Il | Interleukin |
| Kb | Kilobasen |
| KGW | Körpergewicht |
| loxP | locus of crossing over P1 |
| µl | Microliter |
| M | Molar |
| MFI | mittlere Fluoreszenzintensität |
| min | Minute |
| M-MLV RT | Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase |
| mRNA | messenger- Ribonukleinsäure |
| NG2 | neural/glial antigen 2 |
| nm | Nanometer |
| PB | Pacific Blue |
| PE | Phycoerythrin |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PDGFR-β | Platelet-derived growth factor receptor beta |
| qPCR | quantitative Polymerasekettenreaktion |
| rpm | Rounds per Minute |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SEM | Standard Error of the Mean |
| SSC | side scatter |
| TGF-β | transforming growth factor-beta |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| t-PA | tissue-type plasminogen activator |
| UUO | Unilaterale Ureterobstruktion |
| Vav | vav guanine nucleotide exchange factor |
| VE | voll entzalzt |
| VEGF | vascular endothelial growth factor |

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und mich während der Promotionszeit in persönlicher und professioneller Hinsicht gefördert und gefordert haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Mattias Mack. Durch ihn bekam ich die Möglichkeit, an einem solch spannenden und aktuellen Thema forschen zu dürfen. Danken möchte ich Ihm für sein großes Interesse an meiner Arbeit und seine intensive Betreuung, bei der er mir gleichzeitig viele Freiheiten ließ. Er schaffte es durch seine Begeisterung für die Forschung sowie seine stetige Bereitschaft, Ergebnisse mit mir zu besprechen und durch sein beeindruckendes Wissen, mein Interesse an der Thematik sowie meinen Ehrgeiz und Eifer am experimentellen Arbeiten immer weiter auszubauen. Insgesamt konnte ich fachlich wie auch persönlich sehr von dieser Zusammenarbeit profitieren.

Bei Prof. Hayo Castrop und Prof. Frank Schweda bedanke ich mich für die Übernahme des Fachmentorats seitens der Regensburger Internationalen Graduiertenschule für Lebenswissenschaften (RIGeL).

Weiter möchte ich mich herzlich bei Prof. Hayo Castrop, Dr. Alexandra Grill und Katharina Fremter für die Durchführung der reversiblen unilateralen Ureterobstruktion und die Hilfe bei unzähligen GFR-Messungen bedanken. Ohne diese Methoden wären die Ergebnisse dieser Arbeit nicht annähernd so aussagekräftig geworden. Alexandra möchte ich unendlich danken für die in Perfektion durchgeführten reversiblen UUOs, ihre unglaubliche Geduld für die x-te GFR-Messung, die super Zusammenarbeit und auch die freundschaftlichen Aktivitäten und Kontakte außerhalb des Labors.

Ein enorm großes Dankeschön geht an alle ehemaligen und derzeitigen Teammitglieder der AG Mack: Manuel, Kerstin, Fabian, Gabi, Sophia, Kathrin, Nicole, Yvonne, Dagmar, Petra und Stefanie. Jeder von ihnen stand mir ohne zu Zögern immer mit guten Ratschlägen und sehr oft mit viel, viel Tat zur Seite. Ohne sie wäre meine Arbeit noch lange nicht fertig. Ein besonderer Dank gilt Manuel. Er hat mir die

Methode der UUO geduldig beigebracht, stand mir bei allen Fragen bezüglich der FACS-Auswertung immer zur Seite und hat mir von Anfang an hilfreiche Soft-Skill-Tipps gegeben. Gabi und Kerstin möchten ich für das Beibringen und der Hilfe bei allerlei Histos danken. Yvonne, Dagmar und Nicole möchte ich auch sehr dafür danken, dass sie mir bei Versuchsenden, Zellkulturen und Mäusetransporten geholfen haben und stets für meine Fragen offen waren. Weiter gilt ein nicht in Worte zu fassender Dank an Kathrin und Sophia. Kathrin war immer eine super Anlaufstelle für all meine Labor- und Alltagsprobleme. Sie ist ein Profi in Histo und PCR und ohne sie wären die zahlreichen Versuchsenden deutlich langsamer und langweiliger gewesen! Sophia war in allen Lebens- und Laborlagen eine unersetzbare Unterstützung. Ihr Engagement bezüglich Zucht im D3, Genotypisierungen, Organisation der GFR-Messungen, Histologien und so vieles mehr hat mich im Labor extrem unterstützt und mir unglaublich viel geholfen. Darüber hinweg möchte ich ihr für die lustigen Freizeitaktivitäten in und um die Donau danken. Sie hat mich oftmals den Laboralltag vergessen lassen!

Ein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Nephrologie für die gute Zusammenarbeit, für den einen oder anderen Tipp, das Aushelfen mit Reagenzien und die schöne Zeit im H4.

Ein Dankeschön geht auch an die Tierpfleger des Tierstalls D3 und H4 für die gute Zusammenarbeit und stets gute Betreuung der Mäuse.

Ein ganz großer Dank geht an meine Eltern Christine und Ludwig Kutzi, die mein ganzes Leben lang nur das Beste für mich wollen, die mich in allen Lebenslagen unterstützen, auf die ich mich immer verlassen kann und ohne die ich meinen Lebensweg so nicht hätte gehen können.

Zu guter Letzt möchte ich von ganzem Herzen meinem Ehemann Josef zum einen für das Korrekturlesen dieser Arbeit und zum anderen dafür danken, dass er so verständnisvoll und stets für mich da ist, mir in jeglicher Hinsicht immer sofort hilft und somit den Rücken frei hält. Nach langen stressigen Labortagen lassen mich sein offenes Ohr und seine kulinarischen Köstlichkeiten den Laborstress sofort vergessen.