

Aus dem Nephrologischen Zentrum
Medizinische Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Untersuchung der Regeneration renaler Tubulusepithelzellen
in vitro zur Identifikation möglicher Therapeutika
für die Akute Nierenschädigung**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München



Vorgelegt von
Jan Henrik Hagemann
aus Heidelberg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Alexander Dietrich

Prof. Dr. Franz-Xaver Beck

Prof. Dr. Andreas Nerlich

Priv. Doz. Dr. Bärbel Lange-Sperandio

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dana Thomasova, MD, PhD

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Januar 2016

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum zwischen Februar 2011 und November 2012 im Nephrologischen Zentrum der Medizinischen Poliklinik IV, Innenstadt an der Ludwig-Maximilians Universität München durchgeführt. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders betreut.

Förderung des Projekts:

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenkolleg 1202 der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Endres gefördert.

Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:

Publikationen:

1. Kulkarni OP*, Hartter I*, Muly S*, **Hagemann JH**, Darisipudi MN, Kumar S, Thomasova D, Ryu M, Anders HJ. Toll-like receptor 4 signalling in intrarenal dendritic cells drives epithelial regeneration upon acute kidney injury via secretion of interleukin-22. *J Am Soc Nephrol* 2014, 25(5): 978-989
2. **Hagemann JH**, Haegele H, Mueller S, Anders HJ. Danger Control Programs Cause Tissue Injury and Remodeling. *Int J Mol Sci* 2013, 14(6), 11319-11346
3. **Hagemann JH**, Thomasova D, Muly SR, Anders HJ. NRF2 Signaling Promotes Tubular Epithelial Cell Survival and Regeneration via Murine Double Minute (MDM)-2. *Nephrol Dial Transpl* 2013, 28(8):2028-37

Vorträge:

1. **Hagemann JH**, Thomasova D, Anders HJ. „In Vitro Modell zur Untersuchung der tubulären Regeneration“. *Junge Niere* 2011, 27.-28. Mai 2011, Göttingen
2. **Hagemann JH**, Anders HJ. „Development of an in vitro model for tubular regeneration“. *Ergebniskolloquium im Rahmen des Graduiertenkollegs 1202 der DFG*, 30. Mai 2011, München
3. **Hagemann JH**, Anders HJ. „Mechanisms of epithelial damage and healing“. *Annual Retreat 2011 des Graduiertenkollegs 1202 der DFG*, 30. Juni - 1. Juli 2011, Schloss Fürstenried bei München

4. **Hagemann JH**, Kulkarni O, Mulay SR, Ryu M, Thomasova D, Anders HJ. „Interleukin-22 aus renalen dendritischen Zellen stimuliert die Regeneration tubulärer Epithelzellen nach akutem Nierenversagen“. *Doktorarbeitstage „DoktaMed“ der Ludwig-Maximilians-Universität München, 5. Mai 2012, Klinikum Großhadern.*
5. Kulkarni O, **Hagemann JH**, Mulay SR, Ryu M, Anders HJ. „Interleukin-22 of Renal Dendritic Cells Promotes Regeneration of Tubular Epithelial Cells after Acute Kidney Injury“. *Jahreskongress der Europäischen Gesellschaft für Nephrologie (ERA-EDTA), Mai 2012, Paris, Frankreich.*

Poster:

1. **Hagemann JH**, Thomasova D, Anders HJ. „NF-E2-related factor 2 (NRF-2) signaling promotes survival and healing of tubular epithelial cells“. *ASN Kidney Week 2011 (Jahreskongress der American Society of Nephrology), 10.-13. November 2011, Philadelphia, PA, USA*
2. **Hagemann JH**, Kulkarni O, Mulay SR, Ryu M, Anders HJ. „Interleukin-22 aus renalen dendritischen Zellen stimuliert die Regeneration tubulärer Epithelzellen nach akutem Nierenversagen“. *Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), 14.-17. April 2012, Wiesbaden.*
3. **Hagemann JH**, Kulkarni O, Mulay SR, Ryu M, Anders HJ. „Interleukin-22 aus renalen dendritischen Zellen stimuliert die Regeneration tubulärer Epithelzellen nach akutem Nierenversagen“. *Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN), 6.-9. Oktober 2012, Hamburg.*

Auszeichnungen:

- Teilnehmer des *ASN Program for Medical Students*, Reisestipendium
- Abstract Preis der DoktaMed der LMU 2012
- Auswahl des Abstracts für mündlichen Vortrag für den ERA-EDTA Kongress

- *meinen Großeltern* -

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	<i>Klinische Merkmale der Akuten Nierenschädigung</i>	10
1.1.1	Definition und Epidemiologie	10
1.1.2	Einteilung und Ätiologie	12
1.1.3	Klinische Präsentation und Diagnostik	15
1.1.4	Therapie der akuten Nierenschädigung	18
1.1.5	Klinischer Verlauf und Prognose der akuten Tubulusschädigung	18
1.2	<i>Pathophysiologie der ischämisch-akuten Nierenschädigung</i>	21
1.2.1	Veränderungen der Hämodynamik	21
1.2.2	Veränderungen der Tubuluszellen	22
1.2.3	Aktivierung der Immunantwort	24
1.2.4	Veränderungen der Tubulus-Dynamik	26
1.3	<i>Funktionsweise der epithelialen Wundheilung</i>	27
1.3.1	Epitheliale Heilung in drei Phasen	28
1.3.2	Tubulus-Reepithelialisierung	30
1.3.3	Die Rolle des Immunsystems bei der tubulären Heilung	35
1.4	<i>Methodische Ansätze zur Erforschung der tubulären Heilung</i>	41
1.5	<i>Verfolgter Ansatz und Hypothese</i>	42
2	Material und Methoden	44
2.1	<i>Material</i>	44
2.1.1	Geräte	44
2.1.2	Software	46
2.1.3	Chemikalien	46
2.1.4	Zellkultur	46
2.1.5	Tierzucht und Tierhaltung	48
2.1.6	Histologie	48
2.1.7	Molekularbiologische Methoden	49
2.1.8	Immunologische Methoden	49
2.2	<i>Methoden</i>	53
2.2.1	Zellkultur	53
2.2.2	Scratch Assay	54

2.2.3	MTS-Proliferationsassay.....	55
2.2.4	Quantifizierung des oxidativen Stresses mittels TBARS-Assay.....	55
2.2.5	Tierexperimente.....	55
2.2.6	Histologie	56
2.2.7	Molekularbiologische Methoden.....	56
2.2.8	Immunologische Methoden.....	57
2.2.9	Statistische Analyse	58
3	Ergebnisse.....	59
3.1	<i>Ergebnisse der primären Tubuluszellkultur.....</i>	<i>59</i>
3.2	<i>Die Isolation der Zellen imitiert akute Schädigung.....</i>	<i>61</i>
3.3	<i>Etablierung eines für compound screening-geeigneten Assays</i>	<i>64</i>
3.4	<i>Identifikation pro-regenerativer Moleküle im Screeningversuch.....</i>	<i>66</i>
3.4.1	<i>Der Nrf2-Agonist Sulforaphan verbessert Überleben und Regeneration</i>	<i>66</i>
3.4.2	<i>Der pro-regenerative Effekt von Sulforaphan ist MDM2-vermittelt.....</i>	<i>70</i>
3.5	<i>Screeningversuch zur Identifikation proregeneratorischer Interleukine</i>	<i>74</i>
3.5.1	<i>Interleukin-22 verbessert tubuläres Überleben und Regeneration.....</i>	<i>74</i>
3.5.2	<i>Interleukin-22 vermittelt seine Effekte über mehrere Kinasen.....</i>	<i>77</i>
4	Diskussion.....	80
4.1	<i>Verwendung immunologischer Signalstoffe in der ANS-Therapie.....</i>	<i>81</i>
4.2	<i>NF-E2-related factor 2 (Nrf2) als Regulator der Regeneration.....</i>	<i>84</i>
4.3	<i>Tubuläre Progenitorzellen – wie agieren sie nach akuter Schädigung?.....</i>	<i>88</i>
4.4	<i>Stärken und Grenzen des methodischen Ansatzes</i>	<i>91</i>
5	Zusammenfassung.....	93
6	Abkürzungsverzeichnis.....	94
7	Abbildungsverzeichnis	96
8	Tabellenverzeichnis	97
9	Literaturverzeichnis.....	98
10	Erklärung.....	113
11	Danksagung.....	113
12	Zusätzliche Abbildungen	115
13	Lebenslauf	116

1 Einleitung

1.1 Klinische Merkmale der Akuten Nierenschädigung

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das akute Nierenversagen definiert den abrupten Verlust eines Teils oder der gesamten Nierenfunktion [1]. Im Englischen wird das akute Nierenversagen (ANV) als *acute kidney injury* (*injury* = Verletzung) bezeichnet, was sowohl eine partielle Schädigung mit teilweisem Funktionsverlust, als auch eine umfangreiche Schädigung mit komplettem Organversagen bedeuten kann. Seit kurzem ist der Terminus Akute Nierenschädigung (ANS) auch in Deutschland gebräuchlich. Bei einem Funktionsverlust kommt es zur Retention harnpflichtiger Substanzen wie zum Beispiel dem Harnstoff, sowie anderer Abfallprodukte des Stoffwechsels. Zudem wird die Regulierung des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens, des Säure-Base-Haushalts sowie der Elektrolyte gestört.

Der Funktionsverlust der Nieren lässt sich am einfachsten durch die Messung der Kreatinin-Serumkonzentration (SCr) erkennen, anhand derer man die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) abschätzen kann. Hierzu wird in der Regel die Cockcroft-Gault-Formel verwendet. Zur genaueren Bestimmung der GFR benötigt man als zusätzlichen Parameter zur Serumkonzentration noch die sogenannte *Clearance*, also jenes Plasmavolumen, welches in einer bestimmten Zeit von einem Stoff befreit wird. Die Inulin-Clearance ist der Goldstandard in der Diagnostik, wird aber wegen des hohen Aufwands nicht für die Routine-Diagnostik verwendet. Flächendeckend kommt die Kreatinin-Clearance zum Einsatz.

Die Definition der akuten Nierenschädigung allein durch den absoluten Anstieg des SCr ist problematisch, da sich besonders in der Anfangsphase der ANS die glomeruläre Filtrationsrate schneller verändert als der SCr-Wert. Zudem kommt es bei der Nierenersatztherapie mit Hämodialyse zu einer Elimination des Kreatinins, ohne dass die Nierenfunktion sich verändert. Auch hier ist das SCr als Verlaufsparemeter ungeeignet. Aus diesem Grund wurden zunächst die RIFLE-Kriterien und in einem zweiten Schritt die AKIN-Kriterien zur Definition der ANS festgelegt [2-5]. Hierbei ist mindestens eines von drei Kriterien zu erfüllen, damit per definitionem eine akute Nierenschädigung vorliegt. Insbesondere die Oligurie stellt ein wichtiges Kriterium dar und gilt als zuverlässiger

Frühparameter. Gemäß der AKIN-Kriterien liegt eine ANS also dann vor, wenn der SCr-Wert entweder um $>0.3\text{mg/dl}$ oder um $>50\%$ des Basiswerts ansteigt, oder eine Oligurie von weniger als 0.5ml/kg KG innerhalb von 6 Stunden besteht. Die Kriterien sind in Abbildung 1 dargestellt.

Die Inzidenz der ANS stieg gemäß zuletzt veröffentlichter Studien im Vergleich zu früheren Daten an. In einer retrospektiven Untersuchung aus den USA stieg die Zahl der Neuerkrankungen zwischen 1988 und 2002 von 61 auf 288 pro 100.000 Einwohner [6]. Ebenfalls die Zahl derjenigen akut Erkrankten, die eine Dialysebehandlung benötigten, stieg im gleichen Zeitraum von 4 auf 27 pro 100.000 Einwohner. Eine weitere Studie, die sich mit der geschlechterspezifischen Inzidenz der ANS befasst hat, kam in einem Beobachtungszeitraum von 6 Monaten zu einer berechneten jährlichen Inzidenz von 181,1 pro 100.000 für die männliche Bevölkerung, und 33,6 pro 100.000 für die weibliche Bevölkerung [7]. Die ANS stellt somit einen wichtigen Faktor für Morbidität und Mortalität der Allgemeinbevölkerung dar [8-12].

Das Ausmaß der finanziellen Belastungen für das Gesundheitssystem zur Behandlung der ANS hängt stark vom Ausmaß der Nierenschädigung ab. Eine Studie aus dem Jahr 2005 hat versucht, die Mehrkosten der ANS in hospitalisierten Patienten zu verdeutlichen und kam zum Ergebnis, dass die der ANS zuzuschreibenden Mehrkosten pro Patient und Jahr zwischen 2.500 und 24.000 USD liegen, respektive für einen Anstieg des SCr von $0,3\text{-}0,4\text{mg/dl}$ und von $>2\text{mg/dl}$ während des Krankenhausaufenthalts. Der große Unterschied zwischen den Probanden ist dem Einsatz von extrakorporalen Nierenersatzverfahren und intensivmedizinischer Behandlung zuzuschreiben [8]. Die Zahlen sind bereits bezüglich Geschlecht und Komorbiditäten bereinigt. Die der Nierenschädigung zuzuschreibenden Kosten aller Patienten des Studienkollektivs betragen 5% der Gesamtkosten aller eingeschlossenen Patienten, also auch derer ohne Nierenschädigung. In einer Hochrechnung für das gesamte Land USA käme es mit diesen 5% allein für die Krankenhaus-assoziierte ANS zu Gesamtkosten von mehr als 10 Milliarden USD [8]. Im Vergleich dazu liegen die

AKIN-Kriterien	Anstieg SCr um 0.3mg/dl ODER $>50\%$ in 48h	Anstieg SCr um $>100\%$	Anstieg SCr um $>200\%$	-	-
Stadieneinteilung nach AKIN / KDIGO	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3	-	-
Stadieneinteilung nach RIFLE	RISK	INJURY	FAILURE	LOSS (Ersatztherapie >4 Wochen)	END STAGE (Ersatztherapie >3 Monate)

Abbildung 1: AKIN- und RIFLE-Kriterien zur Definition der akuten Nierenschädigung.

Mehrkosten pro Patient und Jahr bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), einer Erkrankung mit nur gering höherer Prävalenz als die ANS (3% bei COPD vs. 1% bei ANS für die Allgemeinbevölkerung; ANS im Krankenhaus 7%), lediglich zwischen 6.100 und 6.600 USD [13].

1.1.2 Einteilung und Ätiologie

Die Klassifikation der akuten Nierenschädigung baut stark auf der Nierenphysiologie auf. Dabei sind folgende Schritte ausschlaggebend: sauerstoffreiches Blut wird zunächst über Endäste der Aa. renales, zu allerletzt über die afferente Arteriole, zum Glomerulus befördert. In Kombination mit einem gefensterten Endothel und der Basalmembran sorgen die Fußfortsätze spezialisierter Zellen, die Podozyten, für den Aufbau einer Filtrationsbarriere, durch die Flüssigkeiten samt Elektrolyten und vieler Moleküle frei filtriert werden. Die zurückgebliebenen Erythrozyten setzen ihren Weg über die efferente Arteriole in Richtung Nierenmark fort, um das Gewebe mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen. Das Filtrat hingegen setzt den Weg aus der Bowman-Kapsel über die verschiedenen Tubulusabschnitte fort. Die Tubulusepithelzellen sorgen derweil für eine Rückabsorption von Wasser, Glukose, Aminosäuren und Elektrolyten, sowie für eine Sekretion im Blut verbliebener harnpflichtiger Substanzen. Über die Papille verlässt der konzentrierte Harn schließlich die Niere und gelangt ins Nierenbecken, von wo er über die ableitenden Harnwege in die Harnblase geleitet wird [14-16].

Die Beeinflussung der oben genannten Prozesse kann eine Nierenschädigung oder eine Beeinträchtigung ihrer Funktion verursachen. Die Einteilung der akuten Nierenschädigung richtet sich danach, ob die Ursache der Krankheit intra- oder extrarenal liegt: man unterscheidet prärenales, intrarenales und postrenales akutes Nierenversagen, bzw. akute Nierenschädigung [17].

Ursachen für prärenale akute Nierenschädigung

Für die Verringerung der renalen Durchblutung kann es 2 wesentliche Gründe geben: großer intravasaler Flüssigkeitsverlust oder verminderter Blutdruck [18, 19]. Der daraus resultierende Zustand kann auch als Schock bezeichnet werden. Blutungen oder gastrointestinale, kutane beziehungsweise interstitielle Verluste führen zum hypovolämen Schock [20, 21]. Im Fall von generalisierten Ödemen während einer Sepsis spricht man auch vom septischen Schock. Verminderter Blutdruck bei konserviertem intravasalen Volumen tritt

bei akuter Herzinsuffizienz – hier spricht man vom kardiorenenalen Syndrom oder akut vom kardiogenen Schock - oder venösen Pooling nach Splanchnikus-Aktivierung auf [22]. Ebenfalls kann eine Nierenarterienstenose eine poststenotische Minderperfusion bewirken.

Neben hypovolämien, septischem oder kardiogenem Schock kann die hormonelle / medikamentöse Beeinflussung der glomerulären Hämodynamik zur kapillären Minderperfusion in der Niere führen [23]. *Vas afferens* und *efferens* werden über die Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) im Tonus beeinflusst um die GFR konstant zu halten. Angiotensin II wirkt in niedrigen Dosen vorwiegend konstringierend am *Vas efferens*, was den Filtrationsdruck erhöht. Gleichzeitig sorgt die Prostaglandin-Produktion für eine Dilatation des *Vas afferens*. *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID)* hemmen die Prostaglandin-Produktion und beeinflussen die GFR negativ [24]. Ebenso tun dies Hemmer des RAAS (vorwiegend *angiotensin-converting enzyme inhibitors*, ACE-Hemmer; und Angiotensin-II-Rezeptorblocker) über eine Dilatation der efferenten Arteriole. Besonders folgenschwer ist der Einsatz solcher Pharmaka, wenn die Aktivität des jeweils beeinflussten Systems besonders hoch ist. Der Einsatz solcher Mittel bei einer Nierenarterienstenose kann folgenschwer sein, da die ipsilaterale Niere nur so eine ausreichende GFR sicherstellen kann [25]. Einen die glomeruläre Hämodynamik verändernden Sonderfall stellt das hepatorenale Syndrom dar, von dem Patienten mit schwerem Leberversagen betroffen sein können. Über eine Vasodilatation im Splanchnikus-Gebiet und eine Erhöhung des intraabdominellen Drucks in Folge von Aszites kommt es zur Minderperfusion der Nieren mit nachfolgendem Funktionsverlust [26].

Ursachen für intrarenale akute Nierenschädigung

Beim intrarenalen akuten Nierenversagen kommt es entweder zu einer Schädigung des Glomerulus oder des Tubulointerstitiums. Am häufigsten sind hierbei die Tubuli betroffen, mit einem Anteil von 45% aller Fälle von akutem Nierenversagen [27]. Glomeruläre oder interstitielle Schädigungen machen insgesamt lediglich 6% der Fälle aus. Als Ursachen für eine akute glomeruläre Schädigung kommen glomeruläre Entzündungen bei Ablagerung von Immunglobulinen (IgA-Nephritis, Lupusnephritis, rasch progressive Glomerulonephritis oder auch *crescentic glomerulonephritis*) oder Immunkomplexen (Post-Streptokokken-Glomerulonephritis, membranproliferative Glomerulonephritis) in Frage [28-30]. Seltener gibt es auch infektiöse Ursachen, zum Beispiel nach einer Infektion mit Hanta-Viren (*hemorrhagic fever with renal syndrome*) [31]. Das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) befällt ebenfalls die Glomeruli, indem es eine Mikroangiopathie verursacht.

Krankheiten, welche das interstitielle Kompartiment der Niere befallen, führen meistens nicht zum rapiden Abfall der Nierenfunktion und somit zum akuten Nierenversagen, sondern verursachen einen allmählichen Abfall der Nierenfunktion. Die häufigsten Ursachen für eine chronisch interstitielle Schädigung umfassen die polyzystische Nierenerkrankung, Nephrokalzinose, Sarkoidose, das Sjögren-Syndrom, sowie die Reflux-Nephropathie bei Kindern [32-38]. Ausnahme ist die deutlich schneller voranschreitende, akute interstitielle Nephritis, welche entweder durch allergische Reaktionen auf bestimmte Medikamente (z.B. Penicillin, Protonenpumpeninhibitoren, NSAID, Rifampicin, Sulfonamide und verwandte Arzneistoffe, Fluorchinolone, Allopurinol oder Phenytoin), oder durch rezidivierende Infekte des Nierenbeckens hervorgerufen werden kann [39-42].

Wegen der anteiligen Häufigkeit von 45% konzentriert sich diese Arbeit vor allem auf die tubuläre Schädigung [27]. Bei der akuten Tubulusschädigung spricht man auch von der akuten Tubulusnekrose (ATN). Neben dem Abfall der GFR mit Retention harnpflichtiger Substanzen besteht bei der prärenalen ANS die Gefahr einer ATN [18, 19]. Die ATN kann aber auch durch intrarenale Mechanismen ausgelöst werden, welche im nächsten Absatz erläutert sind. Im Falle einer ausgeprägten Sepsis mit septischem Schock können auch kombiniert prä- und intrarenale Faktoren zusammenspielen und zur ATN führen [43]. Systemisch niedriger Blutdruck und erhöhte Kapillarpermeabilität auf der einen Seite, sowie eine exzessive Ausschüttung inflammatorischer Zytokine mit nachfolgender Leukozytenaktivierung auf der anderen Seite addieren sich in ihrer Tubulus-schädigenden Wirkung [17, 44-46]. Zu den genauen Pathomechanismen der ischämischen ATN wird im Kapitel 1.2 eingegangen.

Neben ischämischen Ursachen kann die ATN durch direkt tubulotoxische Stoffe verursacht werden. Hierbei ist zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen zu unterscheiden. Ein möglicher körpereigener Stoff als Verursacher einer ATN ist das Häm-Molekül, welches während generalisierter Rhabdomyolyse freigesetzt wird und dann die „Crush-Niere“ verursacht [47-50]. Komplexe aus Myoglobin führen zunächst zu einer Beschädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und sorgen dann für eine Verstopfung des Tubulussystems. Die direkt tubulotoxische Eigenschaft des Häms ist auf dessen oxidative Eigenschaft zurückzuführen. Generalisierte Rhabdomyolyse tritt aus unklarer Ursache häufig nach schweren Erdbeben und anderen Naturkatastrophen auf [51-54].

Zu den tubulotoxischen körperfremden Substanzen gehören zum Beispiel Aminoglykosid-Antibiotika, Cisplatin, Mannitol, Hydroxyethylstärke und synthetische

Cannabinoide aus Designer-Drogen [55-60]. Jodhaltiges Röntgenkontrastmittel wird mit einer direkten Tubulusschädigung in Verbindung gebracht [61-64]. Die genauen Mechanismen hierbei sind bislang ungeklärt, und es wird eine multifaktorielle Schädigung mit Beeinflussung der renalen Hämodynamik vermutet [65-71].

Von den direkt tubulotoxischen Substanzen ist die Kristall-induzierte indirekte Tubulusschädigung zu unterscheiden [72, 73]. Ausgeprägte Urämie begünstigt die Entstehung von Kristallen im sauren Tubulummilieu. Die Wasserrückresorption erhöht die Konzentration zusätzlich. Die Kristalle führen zu Obstruktion des Lumens mit sekundärer Tubulusschädigung, aber auch zur Stimulation der lokalen Immunantwort [74, 75]. Durch das aktivierte Immunsystem gehen weitere Tubuluszellen zugrunde. Beispiele für exogene Kristallbildner sind Vitamin C als Nahrungsergänzungsmittel in hoher Dosierung, Ethylenglykol als Ethanol-Ersatz (beide führen zur Entstehung von Oxalat-Kristallen [76]), Aciclovir und andere Virustatika, Fluorchinolon- und Sulfonamid-Antibiotika und Methotrexat [77-81].

Ursachen für postrenale akute Nierenschädigung

Postrenale, akute Nierenschädigung ist durch Obstruktion der ableitenden Harnwege gekennzeichnet. Bei ansonsten gesunden Patienten reicht die einseitige Obstruktion nicht zur Entstehung einer ANS aus, sofern man sich auf den Kreatinin-Anstieg bezieht (siehe 1.1.1). Bei einseitiger Obstruktion gingen 50% der Nephrone insgesamt zugrunde, was jedoch durch Hyperfiltration der anderen Niere kompensiert werden kann. Benigne Prostatahyperplasie und maligne Neoplasien können bei ihrer Entstehung und im Verlauf die Urethra einengen oder ganz verschließen, wonach sich ein subakutes bis akutes Krankheitsbild ergeben kann. Insgesamt ist eine bilaterale (oder unilaterale bei nur einer funktionierenden Niere) Obstruktion für 10% der ANS-Fälle verantwortlich [27].

1.1.3 Klinische Präsentation und Diagnostik

Das intrarenale akute Nierenversagen in Form einer akuten Tubulusnekrose, sowie das prärenale akute Nierenversagen nehmen mit anteiligen Häufigkeiten von 45 und 21 Prozent den insgesamt größten Anteil aller ANS ein [27]. Die tubuläre Schädigung wird entweder durch Ischämie, oder durch exogene und endogene Noxen verursacht. Die ANS entwickelt sich häufig im Zusammenhang einer anderen Begleit- oder Grunderkrankung. Typische Symptome sind die Bildung peripherer oder pulmonaler Ödeme, Bluthochdruck und der

Abfall der Harnausscheidung. Andere mögliche Symptome sind der unzureichenden Eliminierung harnpflichtiger Substanzen geschuldet, wie zum Beispiel Veränderungen des Bewusstseinszustandes, Abgeschlagenheit, zerebrale Krampfanfälle, oder Flüssigkeitsansammlungen in serösen Höhlen bei Polyserositis im Rahmen einer ausgeprägten Urämie. Die Begleitsymptome der Grunderkrankung können Hinweise zur Pathogenese liefern [82].

Um dem Problem des verspäteten Anstiegs des SCr besser begegnen zu können, wird nach anderen, diagnostisch wertvollen Biomarkern gesucht [83-86]. Mehrere Kandidaten wurden in Studien identifiziert, jedoch wurde bislang nur ein Schnelltest in Deutschland für den klinischen Gebrauch zugelassen (Alere Triage©) [87]. Die Tabelle 1 gibt einen Auszug über die neuen Kandidaten und deren Eigenschaften wieder. Drei der Biomarker (uNGAL, uKIM-1, uNAG) wurden als Kombination bereits in einem *Panel* zur Früherkennung getestet, was die Sensitivität zur Erkennung einer postoperativen ANS signifikant steigern konnte [88].

Um die genaue renale Pathologie bestimmen zu können, ist die Urin-Analyse hilfreich. Basisinformationen über die Bestandteile des Urins liefert der sogenannte „Urin-Stix“, ein Teststreifen, der durch simples Eintauchen den pH-Wert sowie das Vorhandensein von Proteinen, Glukose, Leuko- und Erythrozyten, Nitrit und weiteren Parametern verrät. Die mikroskopische Analyse des Urins dient zur Suche nach Zellen, Zellzylindern und Kristallen und ist eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Schwere der Schädigung [85]. Bräunliche Zylinder weisen auf eine tubuläre Schädigung im Rahmen einer ATN hin, rote Zellzylinder hingegen sprechen mehr für eine Glomerulonephritis, jedoch müssen andere

Tabelle 1: Neue Biomarker zur Früherkennung der ATN

<i>Gruppe</i>	<i>Name</i>	<i>Besonderheiten</i>
<i>Urinary tubular enzymes</i>	alpha-GST	Unterscheidungsmöglichkeit
	LDH	zwischen prä- und intrarenaler
	NAG	Pathologie [89, 90].
	IGFBP7	Verwendung im in den USA
	TIMP-2	zugelassenen NephroCheck©
<i>Urinary low-molecular weight proteins</i>	alpha-1-Mikroglobulin	Falsch positive Werte bei Tubulus-
	Cystatin C	Dysfunktion [89-91].
weitere Biomarker	NGAL	Nach renaler Ischämie vermehrt
	uKIM-1	freigesetzt [92]

Abkürzungen: alpha-GST = Alpha-Glutathion-S-Transferase, LDH = Laktatdehydrogenase, NAG = N-acetyl-beta-glucosaminidase, AP = alkalische Phosphatase, NGAL = *Urinary Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, uKIM-1 = *Urinary kidney injury molecule-1*

mögliche Ursachen für eine Hämaturie ausgeschlossen werden. Die Erythrozytenmorphologie gibt hierzu Aufschluss, da Erythrozyten beim pathologischen Passieren der Filtrationsbarriere ihre runde, bikonkave Form verlieren.

Das absolute Urinvolumen hat nur eine ungenaue Aussagekraft und eignet sich vielmehr als Verlaufsparemeter [93]. Postoperativ wird häufig so die Nierenfunktion überwacht, um frühzeitig und noch vor dem Anstieg des Serumkreatinins einen interstitiellen oder hämorrhagischen Flüssigkeitsverlust zu erkennen. Eine Anurie kann hinweisgebend auf eine postrenale oder prärenale Obstruktion sein. Bei Verdacht auf eine prärenale ANS mit Volumenmangel kann sowohl aus diagnostischen als auch therapeutischen Gründen ein Versuch mit intravenöser Rehydratation gestartet werden. Die Ultraschalluntersuchung der Nieren, der nierenversorgenden Gefäße und der ableitenden Harnwege wird standardmäßig bei jedem Patienten mit ANS empfohlen [93]. Eine invasivere diagnostische Untersuchung stellt die Nierenbiopsie dar [94]. Die *core needle biopsy* hat sich als Goldstandard gegenüber der Feinnadelpunktion durchgesetzt. Sollte die Pathogenese mit den herkömmlichen diagnostischen Mitteln nicht zu ermitteln sein, oder muss die Art der glomerulären Schädigung genauer untersucht werden, besteht die Indikation zur Nierenbiopsie (Abb. 2) [95]. Akut nephrotische bzw. nephritische Syndrome oder unerklärbare, rapide voranschreitende Nierenerkrankungen sind solche Fälle. Einen Spezialfall stellt die Nierenbiopsie bei Nierentransplantierten dar, welche beim Verdacht auf eine akute oder chronische Transplantat-Abstoßungsreaktion indiziert ist und auch routinemäßig durchgeführt wird.

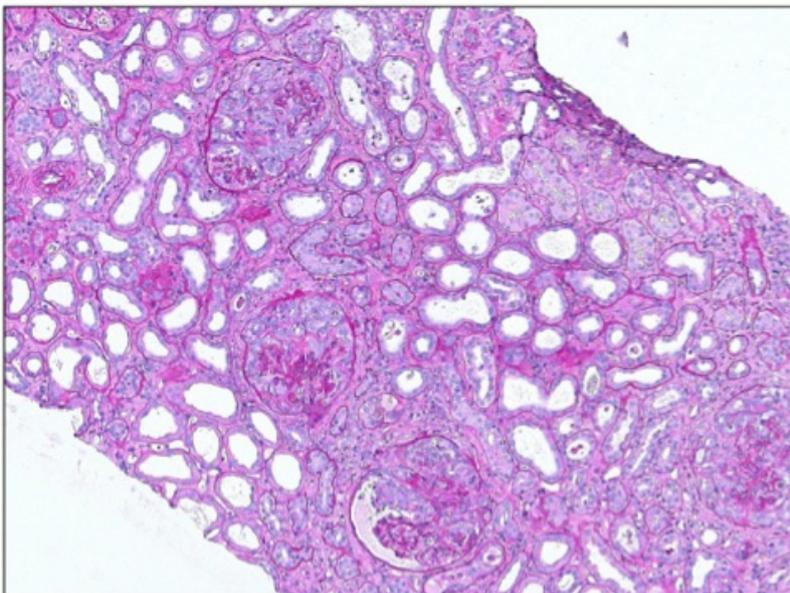


Abbildung 2: Biopsie einer von *Glomerulonephritis* befallenen Niere. PAS-Färbung, 100x-Vergr. Nach [96].

1.1.4 Therapie der akuten Nierenschädigung

Die Therapie der ANS muss von zwei verschiedenen Seiten betrachtet werden. Einerseits gilt es, Elektrolytstörungen und Störungen des Flüssigkeitshaushalts zu behandeln. Andererseits muss die Schädigung des Gewebes begrenzt werden und nephrotoxische Agenzien eliminiert werden. Systemerkrankungen mit Nierenbeteiligung, zum Beispiel die Granulomatöse Polyangiitis, müssen gemäß der aktuellen Studienlage behandelt werden. Leider gibt es bisher keine Möglichkeiten der direkten Behandlung renaler Gewebsschäden oder Gewebsverlusten. Dies liegt an der zu späten Diagnosestellung, da die akute Schädigung beim Kreatininanstieg zeitlich bereits zurück liegt. Bedrohliche Komplikationen einer ANS können ein starker Flüssigkeitsüberschuss, eine Hyperkaliämie mit Werten über 5,5mmol/l, Anzeichen einer schweren Urämie mit Verminderung des Bewusstseinszustands und Perikarditis, oder eine schwere metabolische Azidose mit pH-Werten unter 7,1 sein. Für diese vier ernstesten Komplikationen besteht die sofortige Indikation zur Hämodialyse [97]. Sollte keine Hämodialyse-Einheit sofort zu Verfügung stehen, oder sind die Komplikationen weniger stark ausgeprägt, müssen die Störungen konservativ mit kristalloiden Lösungen oder Bikarbonat behandelt werden. Flüssigkeitsüberschüsse können kurzzeitig mit Schleifendiuretika behandelt werden [98].

1.1.5 Klinischer Verlauf und Prognose der akuten Tubulusschädigung

Der Verlauf nach einer ATN hängt stark von der Dauer der Ischämie ab, bzw. von der Eliminierung und Einwirkdauer des tubulotoxischen Agens. Die Funktionseinschränkungen können zwischen 2 und 21 Tagen dauern, sofern keine Nierenersatztherapie notwendig war [20]. Bei temporär dialysepflichtigen Patienten, insbesondere solche mit Oligurie als Begleitsymptom, kann die Therapie auch mehrere Monate andauern. In diesem Kapitel werden nur der klinische Verlauf der ANS nach ATN und die Prognose beschrieben. Die genauen Mechanismen der epithelialen Regeneration und Heilung werden später im Kapitel 1.3 beschrieben.

Einen kurzen Verlauf kann man nach der temporären, suprarenalen Abklemmung der Aorta im Rahmen (endo-)vaskulärer Eingriffe beobachten, bei denen die beidseitig renale Ischämie nur zwischen 20 und 80 Minuten dauert; bei endovaskulären Eingriffen sogar nur wenige Minuten [20, 99]. Postoperativ kommt es zum Abfall der GFR und zum Anstieg der *FENa*, welche nach 1 bis 3 Tagen wiederhergestellt sind. Bei einer kurzzeitigen Ischämie wie

dieser ist davon auszugehen, dass große oder alle Teile der Nephrone überleben und, wenn überhaupt, nur kurzfristig morphologische Veränderungen aufweisen, wie kurzzeitige Hypertrophie oder teilweisen Polaritätsverlust. Schwerere und längere Verläufe sind bei ATN-Patienten mit septischem Schock, wiederholter Ischämie oder andauernder Exposition nephrotoxischer Medikamente zu erwarten [100]. Die Tubuluszellen drohen hierbei irreversibel geschädigt zu werden und werden durch Apoptose oder Nekrose eliminiert.

Es ist davon auszugehen, dass trotz klinischer Erholung der Nierenfunktion (SCr normal, normaler Elektrolythaushalt) ein erhöhtes Risiko für Folgekomplikationen entsteht. Dies beruht auf dem irreversiblen Verlust von Nephronen. Mehrere Studien konnten eine Zunahme des Risikos für chronisches Nierenversagen und *end stage renal disease (ESRD)* unter Patienten nachweisen, die sich von einer ANS erholten [101-103]. So hatten über 67-jährige ehemals ANS-Patienten ein 6,7-fach erhöhtes Langzeitrisiko für *ESRD* im Vergleich zur Kontrollgruppe, die vorher nie an ANS erkrankt war. Die Notwendigkeit einer Hämodialyse im Rahmen einer ANS steigerte das Risiko, später an chronischem Nierenversagen Grad 4 oder 5 zu erkranken um das 28-fache, und das Risiko für Tod um das zweifache während einer 8-jährigen Follow-Up-Periode. Die Notwendigkeit einer langfristigen, regelmäßigen Dialysebehandlung war unter den kurzzeitig dialysierten Patienten ebenfalls erhöht. Ein präexistentes chronisches Nierenversagen vor akuter Schädigung verschlechterte die Prognose gegenüber einer vormals gesunden Kontrollgruppe deutlich [104].

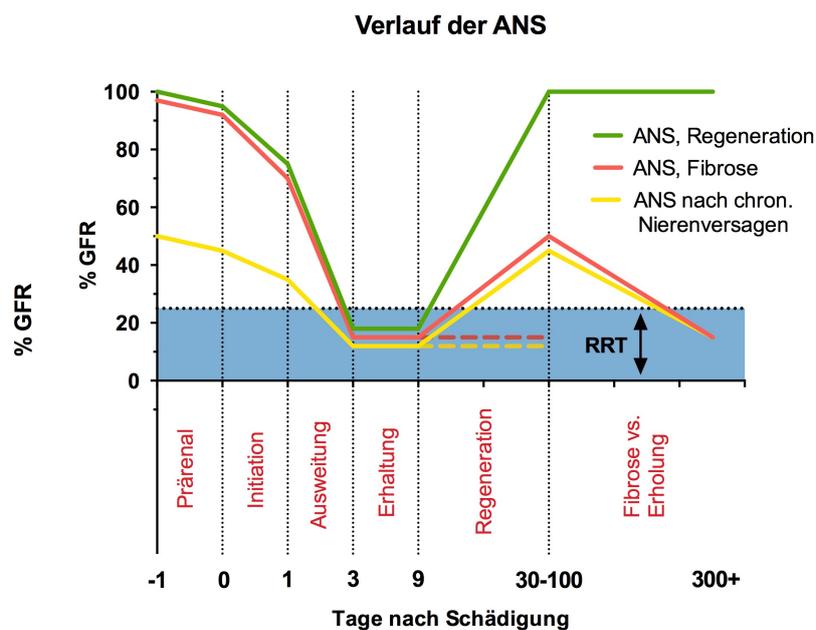


Abbildung 3: Klinischer Verlauf der ANS. Die Phasen wurden u.a. durch [105] geprägt. Relativ neu ist die Aufnahme des Langzeitverlaufs durch Okusa et al. (Abbildung nach [106]). RTT = renal replacement therapy

Die bisher beschriebenen Zahlen gelten für Patienten, die langfristig oder kurzzeitig nach Hause entlassen werden können. Die ANS während des Krankenhausaufenthalts hat eine hohe Mortalität. Sie liegt bei dialysepflichtigen Patienten auf der Intensivstation zwischen 40 und >60 Prozent, bei weniger ernsten Fälle ohne Intensiv- und Nierenersatzbehandlung zwischen 15 und 30 Prozent (im Vergleich zu 1-10 Prozent in einer Kontrollgruppe ohne ATN) [27, 107-109]. Die der ATN zugrundeliegende Erkrankung erhöht selbst schon die Krankenhaus-assoziierte Mortalität [11]. Auch die Langzeitmortalität, insbesondere anschließend an eine stationäre Behandlung, ist bei den Betroffenen gesteigert. In den 90 Tagen nach Entlassung war die Mortalität fast 3-mal so hoch im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch später besteht ein höheres Risiko bei ehemaligen ANS-Patienten: Eine retrospektive Untersuchung mit über 47.000 Patienten ergab eine Mortalität von 8,9 Todesfällen pro 100 Personen-Jahre bei ehemaligen ANS-Patienten, verglichen mit 4,3 bei einer Kontrollgruppe ohne ANS-Krankengeschichte [110].

Diejenigen Faktoren, welche die Mortalität innerhalb von 60 Tagen nach ANS am meisten beeinflussen, sind in absteigender Reihenfolge das Alter (OR 1,13 pro Lebensdekade), ein SCr-Wert von über 2,0mg/dl (OR 1,99) und das Vorliegen eines begleitenden *Adult respiratory distress syndrome* (OR 1,79), gefolgt von Thrombozytopenie, Leberversagen, Sepsis und Ausmaß des Harnstoff-Anstiegs [111].

1.2 Pathophysiologie der ischämisch-akuten Nierenschädigung

Die ischämische ANS lässt sich in drei verschiedene Phasen aufteilen: die Schädigungsphase, die Erhaltungsphase mit oligurischen und polyurischen Abschnitt, und schließlich die Restitutionsphase (vgl. auch Abbildung 3) [18, 82, 112, 113]. Die Schädigungsphase wurde in Abschnitt 1.1.2 bereits skizzenhaft beschrieben und soll hier vertieft werden. Anschließend werden die zellulären und physiologischen Mechanismen der zweiten Phase besprochen, bevor im nächsten Kapitel die Restitutionsphase genauer beschrieben wird.

1.2.1 Veränderungen der Hämodynamik

Die Schädigungsphase beginnt über eine Abnahme des Filtrationsdrucks und der Filtrationsfunktion, welche unter anderem durch das RAAS reguliert werden [114]. Der im vorigen Kapitel beschriebene Mechanismus der Auto-Regulation am *Vas afferens* und *efferens* versagt, sobald der Perfusionsdruck unter die Grenze von 80mmHg MAP fällt [17]. Weiter ausgeschüttetes Renin und Angiotensin II wirkt dann nicht mehr ausschließlich an der efferenten Arteriole, sondern auch am Zufluss, was die Situation weiter verschärft [112]. Da die efferente Arteriole der tiefen Nephronen im weiteren Verlauf als *Vasa recta* die Markregion versorgt, entwickelt sich hieraus die Ischämie der Tubulusregion.

Die Schädigung der Tubuli kann aber nicht allein über die Veränderungen im glomerulären Blutfluss erklärt werden [113]. Die Schädigung ist als Zusammenspiel zwischen vaskulären und tubulären Veränderungen zu verstehen. Im *steady state* ist die Versorgung der äußeren Markregion – dort, wo sich eigentlich besonders energieabhängige, proximale Tubuluszellen befinden – verhältnismäßig niedrig: ein Großteil der Flüssigkeit wurde gerade erst filtriert, aber erst rund 60% rückresorbiert. Daraus resultiert ein niedriger Blutfluss und die Region ist besonders anfällig für Ischämie [82, 112, 113]. Hoher Sauerstoffbedarf und lang andauernde Minderperfusion führen zu einer Verlängerung der relativen Ischämie dieser Region, was schnell zum Untergang von Tubuluszellen führt.

Ein Grund für die heterogene Durchblutungssituation nach Ischämie liegt im Funktionsverlust der Endothelzellen. Die Endothelschädigung ist für einen wesentlichen Teil der Initiierung der Schädigung verantwortlich. Erstens besteht plötzlich ein Mangel

vasoaktiver Substanzen wie NO oder Bradykinin, die eine vorübergehende Ischämie kompensieren könnten. Zweitens werden Leukozyten durch die Überexpression adhäsiver Rezeptoren wie zum Beispiel ICAM angelockt, welche durch die nicht mehr ganz intakte Endothel-Barriere ins Interstitium migrieren [113, 115, 116].

1.2.2 Veränderungen der Tubuluszellen

Die Tubuluszellen verändern während der Ischämie sowohl ihre Morphologie, als auch wichtige metabolische Prozesse [113]. Zu den morphologischen Veränderungen zählt der Verlust des apikalen Bürstensaums und der Polarität, einem klassisch epithelialen Merkmals. Zellfragmente werden abgestoßen und verstopfen nach und nach das Tubuluslumen [117]. Großflächige Nekroseareale sind erst bei langer Ischämie zu erwarten, aber Flickenteppich-artige, kleinere Areale treten insbesondere im empfindlichen äußeren Nierenmark schnell auf. Die Abbildung 4 zeigt ein typisches Bild für das Verletzungsmuster. Die meisten zugrunde gehenden Zellen tun dies durch Apoptose und nicht durch Nekrose, wie einige Studien in der Vergangenheit gezeigt haben [118, 119]. Auf die zugrundeliegenden Mechanismen der Apoptose wird hier nicht ausführlich eingegangen, wichtiges Unterscheidungsmerkmal für den weiteren Verlauf der Schädigung ist aber die unterschiedliche Auswirkung auf das Immunsystem: bei der Nekrose kommt es zu einer stärkeren Aktivierung der Entzündungsreaktion als bei der Apoptose, und entgegen früherer Meinung geschieht dies nicht ungeordnet [120]. Die Rolle des Immunsystems wird in den nachfolgenden Kapiteln noch ausführlich besprochen.

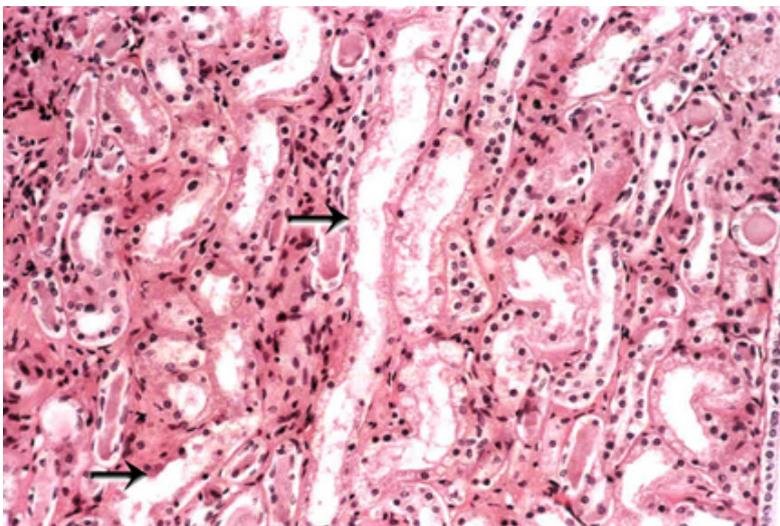


Abbildung 4: Histologisches Bild der akuten Tubulusnekrose. Der Pfeil markiert einen beschädigten Tubulus, der durch den Verlust der Zellen erweitert erscheint. Das Lumen ist gefüllt mit Zelldebris. Man beachte auch die Infiltration des Gewebes mit Granulozyten. Abbildung aus [121].

Während der Ischämie werden die intrazellulären ATP-Speicher schnell aufgebraucht. Hierdurch steigt die intrazelluläre Calcium-Konzentration stark an, was wiederum Cystein-Proteasen aktiviert [114, 122]. Diese Proteasen sind für die Dislokation von zwei wichtigen Proteinen verantwortlich: die Na-K-ATPase wird von ihrem Anker-Protein Ankyrin an der basolateralen Zellmembran abgetrennt, wo sie sonst für die Externalisierung von Natrium und somit indirekt für die Rückresorption von Wasser aus dem Tubulus verantwortlich ist. Zusammen mit der Na-K-ATPase wird außerdem das Adhäsionsprotein Integrin zerschnitten, und der Zusammenhalt der Tubuluszellen an der basolateralen Zelloberfläche geht verloren [114, 123]. Im Zuge des Polaritätsverlusts tubuluswärts-gerichtete Na-K-ATPasen pumpen zusätzlich Natrium ins Tubulussystem und erhöhen die F_{Na} , was zu einer Wassersekretion statt Resorption führt, auch *back leak* genannt.

Der Verbrauch der ATP-Speicher und der Abbau von AMP führen außerdem zur massiven Entstehung oxidativer Sauerstoffradikale (ROS). Die Radikale spielen in der Pathogenese eine wichtige Rolle und sind für das Ausmaß der Schädigung mitverantwortlich. Schlüssel in der Radikalentstehung sind die AMP-Abbauprodukte Hypoxanthin und Xanthin, welche in der Zelle akkumulieren und die Bildung von Wasserstoffperoxid und -superoxid fördern. In Verbindung mit freiem Eisen oder Stickstoffoxid entstehen hochreaktive Hydroxyl-Radikale bzw. Peroxynitrite, was direkt Proteine nitrosyliert und damit unbrauchbar macht [122]. Nicht nur Proteine werden durch die Sauerstoffradikale angegriffen, sondern auch Lipide in der Zellmembran, sowie die DNA [124]. Über DNA-Schädigung steigt auch indirekt die Apoptoserate im betroffenen Gewebe an. Himmelfarb et al. beschreiben in ihrer Arbeit zum akuten Nierenversagen einen dramatischen Anstieg der reaktiven Sauerstoffradikale nach Ischämie [125]. Viele Metabolite der Sauerstoffradikale sind nach ihrer Entstehung ebenfalls reaktiv und tragen so zum Ausmaß der Schädigung bei [124].

Zelluläre Mechanismen zur Bekämpfung reaktiver Sauerstoffradikale

Die Bekämpfung oxidativen Stresses spielt eine zentrale Rolle in der Zellbiologie und verschiedene Mechanismen haben sich in nahezu allen Spezies entwickelt [126, 127]. Viele Mechanismen agieren abhängig voneinander, sodass es zu keiner ungewollten konstitutiven Aktivierung der Radikalabwehr kommt. Grundaufbau der ROS-Abwehr sind verschiedene Transkriptionsfaktoren, welche bei Kontakt mit ROS oder nach ihrer Aktivierung die Expression sogenannter Phase-II-Enzyme fördern, welche anschließend die eigentliche Abwehr übernehmen. Zu den bekannten Transkriptionsfaktoren gehören PPAR γ , SIRT1, ATF4, Sp1 und Sp3, p53, und Nrf2 [128-133]. Im Gegensatz zu den meisten anderen ist der

Transkriptionsfaktor Nrf2 in mehrere Aspekte der zellulären Abwehr integriert, nämlich der DNA-Ausbesserung, dem Häm-Metabolismus, der Reduktion von Quinonen und der Glutathion-Synthese, und spielt daher eine zentralere Rolle [134-138].

Nrf2 und strukturverwandte Angehörige derselben Proteinfamilie *CNC* sind evolutionär gut konservierte Proteine, wobei die Funktionen von Nrf2 im Laufe der Evolution noch ergänzt wurden [132]. Dafür spricht der in verschiedenen Spezies unterschiedliche Aktivierungs-Mechanismus. Während in *C. elegans* eine Phosphorylierungskaskade schließlich Nrf2 aktiviert, hat sich beim Menschen eine permanente Inhibition von Nrf2 durch das Adapterprotein Keap1 entwickelt. Keap1 bindet Nrf2 und verhindert dadurch einerseits dessen Translokation in den Nukleus, andererseits fungiert es als Adapterprotein für Ubiquitin-Ligasen und fördert dessen Degradierung [139]. Siebenundzwanzig Cystein-Reste an Keap1 können direkt durch ROS modifiziert werden, was eine Konformationsänderung von Keap1 und die Lösung von Nrf2 zur Folge hat. Die Vielzahl an Cystein-Resten bietet im Gegensatz zu einem einzelnen Rest je nach Ausmaß der ROS-Exposition die Möglichkeit zum graduellen Feintuning [140].

Sobald sich Nrf2 von Keap1 gelöst hat, kommt es zur Translokation in den Zellkern. Dort bindet Nrf2 an das *antioxidant responsive element* (ARE), einem spezifischen DNA-Abschnitt, und fördert die Expression von Phase-II-Enzymen wie NQO1, HO-1 und der Glutathion-S-Transferase (GST) [136]. Die Enzyme eliminieren ROS in der Zelle und verhindern so die Beschädigung und Degradierung von Proteinen und Membranbestandteilen.

1.2.3 Aktivierung der Immunantwort

Die Schädigung des Endothels sowie der Tubuluszellen führt zu einer starken Aktivierung des innate sowie des adaptiven Immunsystems [113]. Die Endothelzellen reagieren auf Ischämie und Schädigung mit einer erhöhten Präsentation leukotaktischer Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, darunter ICAM und VCAM sowie verschiedene Selektine. Diese Rezeptoren dienen zur Rekrutierung von Leukozyten, vor allem neutrophiler Granulozyten. Dabei spielen auch die Thrombozyten als Adapter zwischen Endothel und Leukozyt eine Rolle und fördern die Entstehung von Aggregaten an der Endotheloberfläche. Die Leukozyten migrieren durch die aufgelockerte Endothelbarriere ins Interstitium und folgen dabei chemotaktischen Reizen.

Die von den Endothelzellen initiierte Immunantwort kann durch Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren in Tubuluszellen dramatisch verstärkt werden. Die genaue Rolle des Immunsystems bei (Wund-)Heilungsprozessen wird später noch im Detail erläutert (vgl. Kapitel 1.3.3). Eine überschießende Verstärkung der Entzündungsreaktion zu Beginn der ATN führt zu unnötigen Gewebsschäden und verhindert eine effiziente Wundheilung [96]. Für diffuse Schädigungen des Nierengewebes, beispielsweise durch tubulotoxische Pharmaka, ist die auf fokale Schädigungen selektionierte Entzündungsreaktion auch häufig kontraproduktiv [141]. Zu den pro-inflammatorischen Zytokinen zählen $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 und $\text{TGF}\beta$, zu den chemotaktischen produzierten Zytokinen gehören MCP-1, IL-8 und RANTES [113]. Leukozyten reagieren auf die Exposition dieser Zytokine mit einer weiteren Produktion von Mediatoren und folgen den chemotaktischen Reizen zum Ort der Schädigung. Zellfragmente, DNA-Bestandteile und Proteine aus nekrotischen Tubuluszellen können als sogenannte DAMPS (*danger associated molecular patterns*) lokale und periphere Leukozyten aktivieren, indem sie über *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) erkannt werden. Hierbei spielen vor allem TLR2 und 4 eine Rolle [45, 46]. Die Dendritischen Zellen, welche sich im Interstitium zwischen den Tubuluszellen befinden, sind aufgrund ihrer Lage die ersten, die auf DAMPS mit der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine reagieren. Da sie auch naive T-Zellen aktivieren können, gelten sie als wichtige Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem [142].

Die migrierten neutrophilen Granulozyten sezernieren vor Ort weitere Zytokine, wodurch ein pro-inflammatorisches Milieu entsteht [113]. Mithilfe der Leukozyten-Peroxidase werden vorgeschädigte Zellen beseitigt, aber auch intakte Tubuluszellen werden dadurch in Mitleidenschaft gezogen. MCP-1 fördert die Rekrutierung von Makrophagen, welche eine essentielle Rolle bei der Regulierung der Entzündungsreaktion spielen [143]. Zusammen mit den Makrophagen gelangen auch T-Lymphozyten in die Niere, und der Anteil an Neutrophilen sinkt. *Knock out*-Experimente mit CD4/CD8-defizienten Mäusen, denen diese wichtigen T-Zell-spezifischen Rezeptoren fehlen, zeigten ein geringeres Ausmaß der Schädigung nach Ischämie im Vergleich zur Kontrolle. Die T-Zellen verstärken also die Immunantwort [144]. Die Heilungsphase war durch diesen *knock out* aber ebenfalls betroffen: bestimmte Subtypen von T-Zellen, sogenannte regulatorische T-Zellen (Tregs; CD25/Foxp3^+), fehlten während der Regeneration und konnten diese nicht fördern [145]. Wie im Kapitel 1.3.3 noch besprochen wird, ist die Immunantwort nicht nur mit einer initialen Gewebeschädigung verbunden.

1.2.4 Veränderungen der Tubulus-Dynamik

Ein klinisches Zeichen der ANS ist der Rückgang der Urinmenge, was auf eine verringerte GFR schließen lässt. Ein Grund dafür ist die mechanische Verstopfung des Tubuluslumens mit Zellen, Zellfragmenten und Proteinen [117, 146]. Dafür sprechen die dilatierten proximalen Tubulusabschnitte und die das Lumen verlegenden *casts* im distalen Tubulus auf histologischen Schnitten. Für die Entstehung dieser *casts* gibt es mehrere begünstigende Faktoren: der tubuläre Fluss ist aufgrund der glomerulären Autoregulation erniedrigt, was im Zusammenspiel mit der hohen Konzentration von *Tamm-Horsfall*-Protein die Viskosität des Urins erhöht. Die erhöhte Natrium-Konzentration begünstigt diesen Mechanismus zusätzlich. Abgestoßene Bürstensaum-Fragmente und Zellen verlegen schließlich das Tubulussystem.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Verlegung der Tubuli nicht allein für den Rückgang der Urinmenge verantwortlich ist [147]. Ein weiterer Mechanismus liegt im tubuloglomerulären Feedback an der Macula Densa: die erhöhte Natriumkonzentration im Tubulussekret wird von der Macula Densa registriert. Über parakrine Effekte am Adenosin-Rezeptor wird die afferente Arteriole weiter verengt und die ohnehin schon niedrige GFR reduziert.

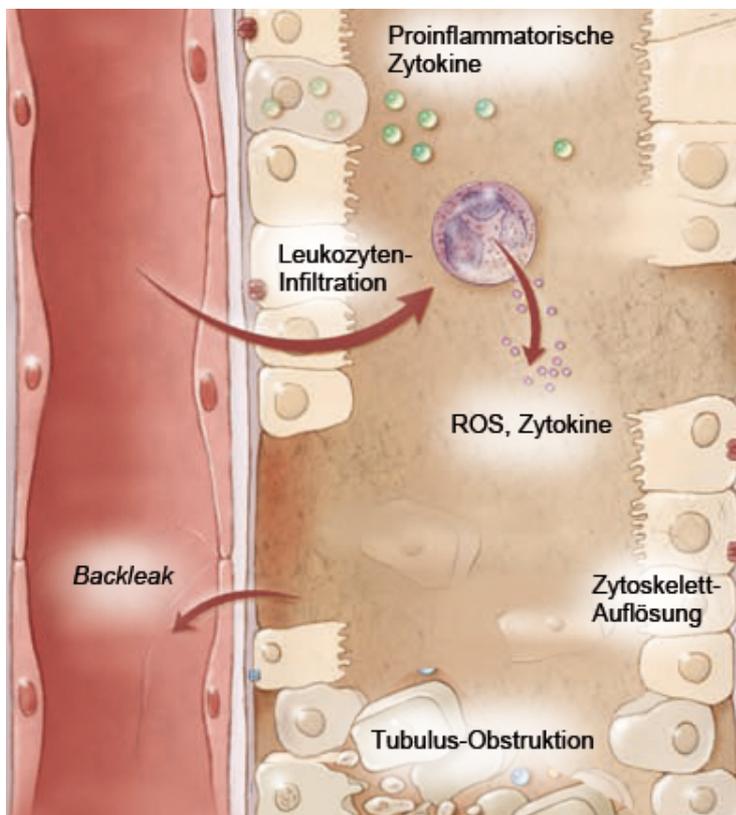


Abbildung 5: Pathomechanismen der akuten Tubulusnekrose. Die Tubulusschädigung ist eine direkte Folge metabolischer Prozesse, welche durch die Ischämie aktiviert wurden. Die Schädigung wird durch Veränderungen der Häm- und Tubulusdynamik verschlimmert. Abbildung nach [17].

1.3 Funktionsweise der epithelialen Wundheilung

Kommt es zur Schädigung eines intakten Epithels, müssen zur Heilung mehrere Zelltypen koordiniert zusammenarbeiten. Ziel der epithelialen Wundheilung sind einerseits die Wiederherstellung einer intakten Barriere, andererseits die Wiederherstellung der epithelialen Funktion. Diese Funktionen können je nach Art des Epithels ganz unterschiedlich sein und reichen von Barriere im eigentlichen Sinne mit Beherbergung von Hautanhangsgebilden und Sensorik für die Haut, bis zur Keimabwehr und Resorption von Nährstoffen im Darm. In die epitheliale Wundheilung involvierte Zelltypen und Systeme sind die Gerinnungskaskade des Blutes, Leukozyten und das Immunsystem, Fibroblasten und überlebende Epithelzellen. Essentielle, aktivierte Programme sind Migration, De- und Redifferenzierung und Proliferation.

Trotz der Komplexität, die in der Regulierung dieser Programme liegt, kommt es im Laufe der Wundheilung nur selten zur malignen Entartung [148, 149]. Eher ist die unzureichende epitheliale Regeneration ein Problem, was das Risiko einer Fibrose erhöht. Nicht immer ist die Regenerationsfähigkeit der Epithelzellen ausreichend, um den gesamten Defekt zu schließen. Fibrose geht unwiederbringlich mit Funktionsverlust einher [150].

Für den schnellen Verschluss einer Wunde ist die Proliferation überlebender Epithelzellen essentiell [151]. Bevor ausdifferenzierte Epithelzellen den Zellzyklus beginnen und eventuell auch migrieren können, müssen sie in geringem Maße dedifferenzieren. Epitheliale Dedifferenzierung ist unter sehr strenger Kontrolle als natürliche Reaktion nach ischämischer Schädigung zu verstehen und ohne Kontrolle als Karzinomentstehung [152]. Unter normalen Umständen proliferieren Tubulusepithelzellen nur wenig, was immunhistochemisch an der geringen Positivität für Ki-67 und PCNA (*proliferative cell nuclear antigen*) zu erkennen ist. Mit der Ischämie und der umliegenden Schädigung anderer Zellen werden Gene, die unter normalen Umständen nur in der Embryonalperiode überexprimiert sind, wieder vermehrt exprimiert. Dazu gehören auch Gene, die für Wachstumsfaktoren wie IGF-1, FGF, und HGF codieren, oder für die Proliferation wichtige Transkriptionsfaktoren wie Pax-2 oder Egr-1 [153-160]. Auch Regulatoren der Apoptose, darunter Bcl-2 als Protein mit antiapoptotischen Effekten, werden vermehrt exprimiert. Die Apoptose ist daher ein zentrales Programm für sowohl Organentwicklung, als auch für Heilungsprozesse [161-163]. Die dedifferenzierten Zellen differenzieren nach Beendigung der

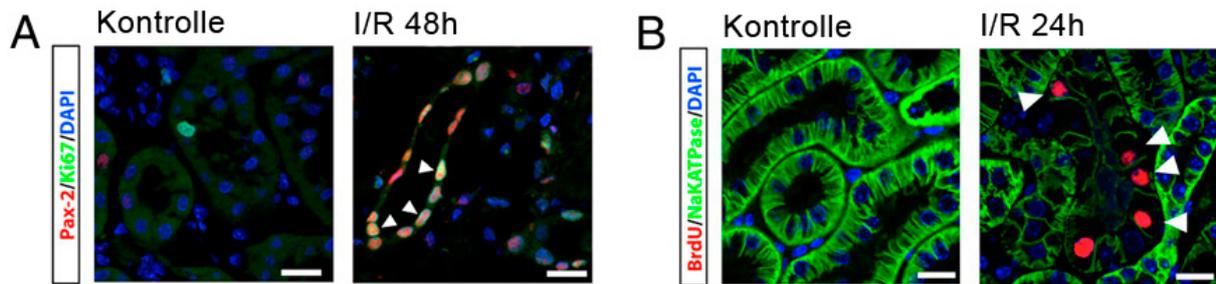


Abbildung 6: Expression embryonaler Marker und Dedifferenzierung. A: Pax-2 / Ki67-Doppelfärbung. Die Schädigung induziert die Pax-2-Expression in TEC der äußeren Medulla. Die Zellen sind 48h nach Ischämie doppelt positiv, demnach sind Proliferation und Pax-2-Expression verknüpft. B: Gab man den Mäusen vor Ischämie eine einzelne Dosis BrdU, stellten sich die proliferierenden Zellen (rot) 24h nach Schädigung ohne basolaterale Na/K-ATPase dar (grün), als Zeichen ihrer Dedifferenzierung. Abbildung nach [164].

Heilungsreaktion wieder aus, was man als Redifferenzierung beschreibt. Der zwischenzeitliche Zustand der Zellen ist durch die enge Kontrolle der Programme nicht als komplette Entdifferenzierung zu verstehen, und ist damit auch nicht vergleichbar mit den Möglichkeiten einer multipotenten Stammzelle [165].

1.3.1 Epitheliale Heilung in drei Phasen

Die Reaktion auf epitheliale Schädigung ist in drei Phasen aufgeteilt: eine inflammatorischen Phase, eine Phase mit Neubildung von Gewebe, und zuletzt eine Umbauphase (vgl. Abb. 7) [150]. Die inflammatorische Phase beginnt sofort nach der Schädigung mit dem provisorischen Verschluss des Defekts. Um Blutverluste und Verunreinigungen zu verhindern, wird der Defekt mit einem Stopfen aus Fibrin und Thrombozyten verschlossen. Die Fibrin-Matrix ermöglicht gleichzeitig, dass sich einwandernde Zellen anhand dieses Gerüsts bewegen können. Die Aktivierung der Immunantwort wurde im vergangenen Kapitel 1.2.3 bereits besprochen. Ergänzend zu den besprochenen Mechanismen spielt das Komplement-System eine große Rolle für die Rekrutierung von Immunzellen [115, 150]. Das Komplement-System wird bei Gewebsdefekten aktiviert und fördert die Expression endothelialer Adhäsions-moleküle, wirkt aber über einige seiner Bestandteile auch direkt chemotaktisch. Die eingewanderten Zellen übernehmen einerseits den Schutz vor Pathogenen, als auch den Abtransport von Zell- und Gewebsfragmenten.

Die zweite Phase beginnt meist am zweiten Tag nach Schädigung und dauert bis zum achten bis zehnten Tag an [150]. In dieser Phase beginnt der eigentliche Regenerationsprozess, indem das fehlende Gewebe ersetzt wird. In dieser Phase wird auch die wichtige Weiche zwischen Regeneration und narbiger Fibrose gestellt: nur, wenn genügend Epithelzellen über-

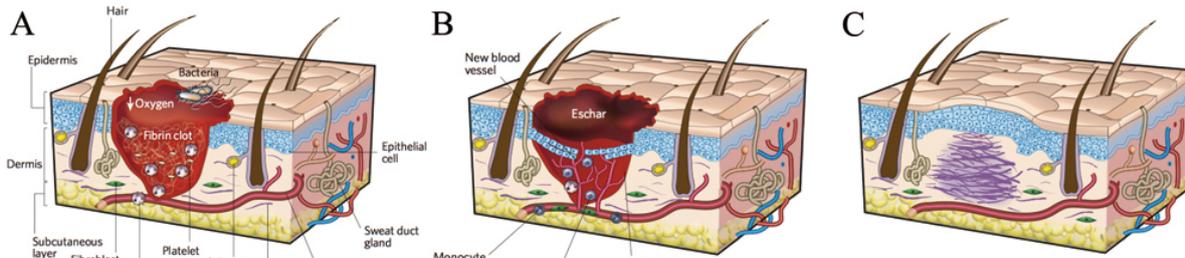


Abbildung 7: Phasen der epithelialen Wundheilung. A: Provisorischer Wundverschluss durch initiale, inflammatorische Reaktion. B: Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten. C: Wundumbau und endgültiger Verschluss, sowie Beendigung der inflammatorischen Antwort. Abbildung aus [150]

lebt haben, oder wenn sich multipotente Stammzellen am Ort der Schädigung befinden, kann Regeneration erfolgen. Überlebende Epithelzellen migrieren an den Ort der Schädigung und beginnen mit der Proliferation [164]. Um die gleichmäßige Sauerstoffversorgung und Migration von Zellen zu gewährleisten, werden bei größeren Wunddefekten neue Blutgefäße nach Ausschüttung von VEGF gebildet [150]. Zusammen mit den Blutgefäßen wird die Wunde von basal mit lockerem Granulationsgewebe aufgefüllt, welches aus neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten und Makrophagen besteht. Den Raum, den proliferierende Epithelzellen nicht ausfüllen können, infiltrieren die Fibroblasten und beginnen mit der Produktion von extrazellulärer Matrix. Einige dieser Fibroblasten werden von Makrophagen zur Umwandlung in Myofibroblasten stimuliert. Myofibroblasten haben eine kontraktile Funktion und bewirken eine bessere Adaptation der Wundränder. Die Wunde ist schließlich mit überlebenden und neu gebildeten Epithelzellen verschlossen, mit narbigen Anteilen aus Fibroblasten und extrazellulärer Kollagenmatrix [150].

In der dritten Phase der Wundheilung finden Umbauprozesse statt, welche bis zu einem Jahr nach Schädigung andauern können [150]. Die für die Wundheilung wichtigen Programme werden in ihrer Aktivität reduziert. Neu gebildete Epithelzellen differenzieren komplett aus und beenden ihre Proliferation. Endothelzellen, Makrophagen und große Teile der Fibroblasten verschwinden durch Apoptose oder wandern aus. Metalloproteasen helfen beim Umbau der überwiegend aus Kollagen Typ III bestehenden extrazellulären Matrix in eine aus Kollagen Typ I bestehende Struktur, welche stabiler ist. Das neu entstandene Gewebe erreicht auch nach den Umbauprozessen nicht das gleiche Ausmaß seiner ursprünglichen Funktionalität [166].

1.3.2 Tubulus-Reepithelialisierung

Die epitheliale Heilung von Tubulusschäden funktioniert nach ähnlichen Prinzipien wie die Heilung einer Hautverletzung [150]. Eine unzureichende Heilungsreaktion geht, wie bereits erwähnt, mit fibrotischen Umbauprozessen einher und führt zu Funktionseinbußen. Daher wäre es aus therapeutischer Sicht interessant herauszufinden, wie man die epitheliale, tubuläre Heilungsreaktion positiv beeinflussen könnte. Vorher muss das Zusammenspiel der verschiedenen, in die Heilungsreaktion involvierten Zelltypen und molekularen Mechanismen besser verstanden werden.

Der initiale Schaden nach Ischämie wird vor allem durch DNA-Schäden und oxidativen Stress verursacht. Nekrose und Apoptose und somit Gewebeverlust sind die Folge. Hinzu kommt der destruktive Einfluss der sterilen Entzündungsreaktion, welcher das Ausmaß des Schadens vergrößert. Durch mehrere molekulare Mechanismen sind diese beiden Seiten der Schädigung miteinander verbunden, einer der Regulatoren ist das Molekül *murine double minute-2* (MDM2). In den vergangenen Jahren wurden mehr und mehr p53-unabhängige Rollen von MDM2 entdeckt, nachdem zunächst vorwiegend die antagonistische Rolle von MDM2 auf den pro-apoptotischen Faktor p53 bekannt war [167]. MDM2 führt als Ubiquitin-E3-Ligase zum Abbau des Tumorsuppressors. Die experimentelle Blockade von MDM2 nach ischämischer ATN führte zu verminderter, epithelialer Regeneration, jedoch wurde das Ausmaß der initialen Schädigung reduziert [168]. Die Ursache ist die Funktion von MDM2 als Kofaktor für die Bindung von NF-kappa-b an dessen DNA-Bindungsstelle. Somit kommt es nach MDM2-Blockade zu einer verminderten Expression proinflammatorischer Zytokine und zur Hemmung der sterilen Entzündungsreaktion. Darüber hinaus wird postuliert, dass p53 die DNA-geschädigten Tubuluszellen in Zellzyklusarrest versetzt und manche dieser Zellen – unter Abwesenheit neutrophiler Granulozyten – durch DNA-Reparatur gerettet werden können [169, 170].

Zur Zeit wird darüber diskutiert, ob und in welchem Ausmaß Epithelzellen selber an fibrotischen Umbauprozessen beteiligt sind. Darüber hinaus wird die Rolle tubulärer Vorläuferzellen beim Verschließen des Defekts erforscht. Daher möchte ich diese beiden Themen im Detail vorstellen.

Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)

Die Existenz und das mögliche Ausmaß der Beteiligung der Tubulusepithelzellen an fibrotischen Prozessen werden diskutiert [171-177]. Die für die Produktion von

extrazellulärer Matrix verantwortlichen Zellen während der Wundheilung oder Fibrose sind überwiegend Myofibroblasten [178-181]. Verschiedene Hypothesen wurden über deren Herkunft aufgestellt, denn im gesunden Zustand findet man diese spezialisierten, mesenchymalen Zellen nicht. Einige vermuten, dass die Zellen aus Perizyten entstehen, einer speziellen Zellgruppe, die sich rund um die Blutgefäße befindet [182, 183]. Andere gehen von einer Rekrutierung aus dem Knochenmark aus [184, 185]. Auch die permanent residenten Fibroblasten könnten durch Differenzierung zu Myofibroblasten werden [179]. Und einige sehen in den Tubulusepithelzellen die Quelle der Myofibroblasten und sprechen hierbei von EMT [186].

EMT würde bedeuten, dass ausdifferenzierte Epithelzellen nach Schädigung ihre Polarität verlieren, sich von der Basalmembran ablösen, und mit der Expression mesenchymaler Marker anstelle epithelialer Marker beginnen würden. Da die extrazelluläre Matrix in der Niere vor allem im Interstitium angebaut wird, müssten die Zellen zudem die Basalmembran durchbrechen, um an der Produktion fibrotischer Fasern beteiligt zu sein. Dafür sprechen einige Studien, im Rahmen derer mittels *cell fate tracing* – einer molekularbiologischen Markiertechnik für Zellen unter Verwendung eines LacZ/ γ GT *promoters* – Tubulusepithelzellen markiert wurden, die sich nach experimenteller Induktion von Fibrose auf beiden Seiten der Basalmembran befanden und zudem den mesenchymalen Marker FSP1 exprimierten [187]. Für die Einleitung dieser Entwicklung ist der Wachstumsfaktor TGF- β verantwortlich, dessen Signal intrazellulär über β -catenin weitergeleitet wird [176, 188, 189]. EMT wurde auch im Kontext mit der Schädigung anderer Organe untersucht, und ist somit ein nicht auf die Niere beschränktes Konzept. Studien von Kim et al. konnten EMT im Rahmen primärer Lungenfibrose zeigen [189-191].

Gegen eine Beteiligung der Tubuluszellen an der Fibroseentstehung sprechen andere, ebenfalls mithilfe von *cell fate tracing*-Studien durchgeführte Experimente. Humphreys et al. konnten in ihren Experimenten zeigen, dass keine der markierten Epithelzellen die Basalmembran nach experimenteller UUO überschritten [182]. Auch strukturelle Studien, die nach mikroskopisch sichtbaren, die tubuläre Basalmembran (TBM) durchwandernden Zellen suchten, konnten keine solche Zellen zeigen [192-194]. Die Experimente zeigten aber, dass die Tubuluszellen durch Schädigung oder Stimulation mit TGF- β mit der Expression mesenchymaler Marker beginnen [182]. Zu den wichtigsten, mit EMT in Verbindung gebrachten Markern zählen N-cadherin, α 3 β 1-integrin, Vimentin, α SMA, β -catenin, Kollagen

I und III, und Snail als Transkriptionsfaktor. Die Expression epithelialer Marker wird dabei reduziert, verschwindet aber nicht vollständig [195].

Es gibt eine Diskrepanz zwischen den Beobachtungen *in vitro* und *in vivo*, was auf die Ultrastruktur des Gewebes mit verschiedenen Kompartimenten zurückzuführen ist. *In vitro* konnte mehrmals gezeigt werden, dass sich Tubulusepithelzellen unter Stimulation zu mesenchymalen Zellen verändern können [196-198]. Auch *in vivo* zeigten Tubuluszellen nach Schädigung eine vermehrte Expression mesenchymaler Marker. Dass EMT maßgeblich an fibrotischen Umbauprozessen in der Niere beteiligt ist, wurde jedoch überwiegend ausgeschlossen, da nicht abschließend geklärt werden konnte, ob oder wie die Zellen die TBM überqueren [186].

Die bereits angesprochene De- und anschließende Redifferenzierung ist eng mit der beobachteten Expression mesenchymaler Marker verknüpft. Studien mit verschiedenen Zeitpunkten zur Kontrolle, ob es sich hierbei um eine transiente Expression handelt, fehlen bislang. Zeisberg et al. beschreiben verschiedene Arten von EMT, in drei unterschiedlichen Szenarien [175, 195]. Szenario 1 beschreibt EMT primitiver Epithelzellen zu mesenchymalen Zellen, die während der Embryonalentwicklung die Neuralleiste formen und proliferieren. Später differenzieren manche der Zellen zu Epithelzellen des Meso- und Endoderms, was auch *mesenchymal-to-epithelial transition* (MET) genannt wird. So wie auch Transkriptionsfaktoren der Embryonalzeit (s.o., Pax-2, [154]) während der epithelialen Wundheilung aktiviert werden, könnte eine transiente Expression mesenchymaler Marker als Zeichen der Dedifferenzierung während der Wundheilung die Proliferation ermöglichen.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Kalluri et al. untersuchte die mutmaßliche Herkunft von Myofibroblasten bei der Fibroseentstehung, um mehr über die Relevanz der einzelnen Konzepte aufzudecken [179]. Sie stellten fest, dass der Pool aus Myofibroblasten aus verschiedenen Quellen stammt. Mit 50% Anteil kamen die meisten davon aus proliferierenden, residenten Fibroblasten. 35% der Zellen stammten aus vom Knochenmark eingewanderten MSC (*mesenchymal stem cells*), die unter TGF- β -Stimulation zu Myofibroblasten ausdifferenzierten. Durch *knock out* des TGF- β -Rezeptors Tgfr2 konnte die Gesamtzahl von Myofibroblasten um 56% gesenkt werden, was die Schlüsselrolle des Wachstumsfaktors unterstreicht. Perizyten waren nicht an der Entstehung von Myofibroblasten beteiligt. *Endothelial-* und *epithelial-to-mesenchymal transition* waren für 10% der α SMA-positiven Zellen verantwortlich, wobei die Studie die Überquerung der TBM nicht beschrieben hat.

Die Rolle der Progenitorzellen

Die Stammzellforschung auf dem Gebiet tubulärer Erkrankungen ist im Vergleich zu anderen Organen noch sehr jung. Erst kürzlich wurden Progenitorzellen an der Bowmanschen Kapsel und verstreut im Tubulussystem identifiziert [199]. Im Vergleich zur klassisch epithelialen Wundheilung erlauben pluripotente Stammzellen den voll funktionsfähigen Ersatz des Epithels, so die Hoffnung. Eine Narbe mit fibrotischen Gewebe würde so verhindert werden, und man könnte von echter Regeneration und nicht Heilung sprechen [150, 200].

Den Beginn dieser Idee markieren zwei Experimente aus den Jahren 2003 und 2005, als Lange und Lin et al. mesenchymale (MSC) bzw. hämatopoietische (HSC) Stammzellen zur Behandlung der Ischämie-Reperfusion-Schädigung (I/R) der Niere testeten. Die Zellen wurden isoliert, zur späteren Identifikation markiert und Mäusen nach I/R verabreicht. Per Histologie wurden später ausdifferenzierte, markierte Zellen im proximalen Tubulussystem gefunden und eine bessere Nierenfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt [201, 202]. Einige Jahre später gelang die Identifikation Nieren-spezifischer Progenitorzellen mithilfe der beiden Stammzellmarker CD24 und CD133 am Menschen [203]. Eine embryonal große Population von CD24/CD133+ Zellen nimmt laut Lazzeri et al. im Laufe der Entwicklung stark ab, bis sich nur noch einige wenige Zellen am Harnpol der Bowmanschen Kapsel befinden. In den Experimenten zeigten diese Zellen praktisch unbegrenzte Teilungsfähigkeit bei konserviertem genetischen Profil. Die Zellen ließen sich unter Epithel-bevorzugenden Bedingungen zur Expression Tubulus-typischer Marker stimulieren.

Lindgren et al. beschäftigten sich daraufhin mit der Frage, ob man die Progenitorzellen noch besser charakterisieren könne. Sie fanden heraus, dass sich CD133/CD24+ Zellen nicht nur an der Bowmanschen Kapsel befinden, sondern auch im proximalen Tubulus verstreut zu finden sind. Diese im Tubulussystem verstreuten Zellen besitzen laut Lindgren und Angelotti et al. andere Marker, als die Verwandten an der Bowmanschen Kapsel [204, 205]. Die Studien beschreiben eine überdurchschnittlich hohe Expression der ALDH und eine fehlende Expression von CD106. CD106+ Zellen an der Bowmanschen Kapsel könnten sich zudem sowohl in Tubuluszellen, als auch Podozyten differenzieren, CD106- Zellen jedoch nur in Tubuluszellen. CD106- Zellen besaßen eine höhere Stressresistenz als reguläre TEC in den Experimenten und konnten ähnlich wie MSC nach experimenteller ANS die Nierenfunktion im Vergleich zur Kontrolle verbessern, indem sie sich nach Injektion im Tubulus ansiedelten und die Regeneration förderten [204].

Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt die Studie von Smeets et al., die die Existenz einer im Tubulussystem verstreuten, CD24/CD133+ Zellpopulation bestätigt. Diese Zellen zeigten unter dem Elektronenmikroskop einen leicht modifizierten Phänotyp mit weniger Zytoplasma, weniger Mitochondrien, fehlenden basolateralen Einkerbungen und fehlendem Bürstensaum, was für ein geringeres Ausmaß an Differenzierung spricht [206]. Für die Studien von Angelotti und Smeets et al. ist die Regeneration aus lokalen, tubulären Progenitorzellen das nach Schädigung vorherrschende Prinzip.

Diesen Ergebnissen gegenüber stehen mehrere Studien von Humphreys und Bonventre et al., welche die Rolle der Progenitorzellen für die epitheliale Heilung als irrelevant bezeichnen [164]. Aus ihren Experimenten gehen vier große Beobachtungen hervor, die jeweils unterschiedliche Aspekte und Voraussetzungen für die Progenitor-These widerlegen sollen: Erstens beobachten Humphreys et al. in ihren *cell fate trace* Experimenten keine Proliferation von Progenitorzellen an der Bowmanschen Kapsel. Zweitens wurde keine Migration dieser Zellen festgestellt, was eine Voraussetzung für eine fokussierte Regeneration ist. Die tubuläre Wunde wird drittens hauptsächlich durch dedifferenzierte, überlebende Tubuluszellen verschlossen, wobei die Schädigung einer einzelnen Zelle selbst der größte Trigger für eine anschließende Proliferation war und die Chancen für Zellteilungen erhöht hat [164]. Viertens beobachtete Kusaba *et al.* in weiterführenden Versuchen die Proliferation differenzierter Zellen, nicht nur während der Entwicklung zur Verlängerung des Tubulussystems, sondern auch nach I/R-Schädigung [152].

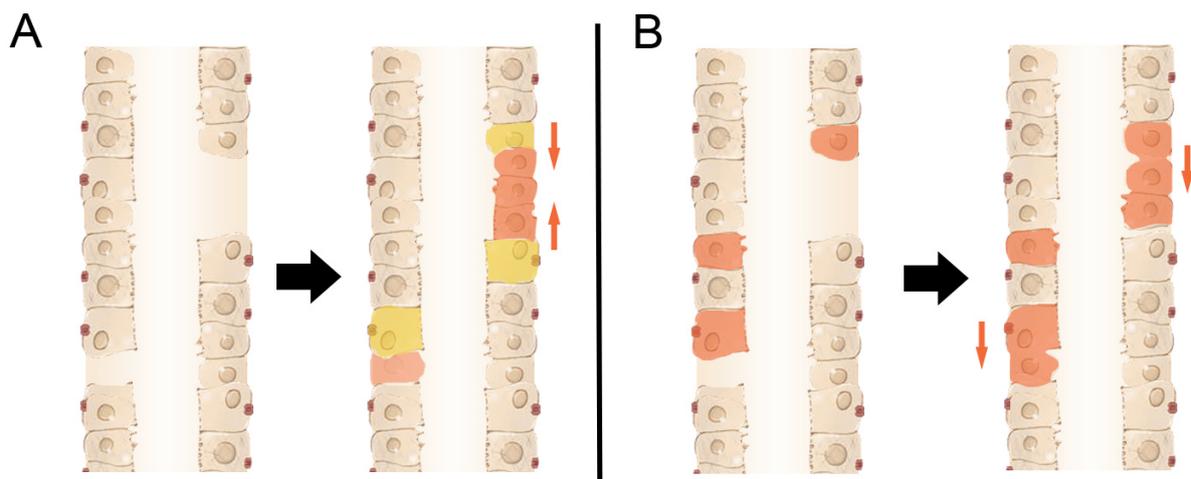


Abbildung 8: Zwei mögliche Konzepte der tubulären Regeneration. A: Nach Schädigung proliferieren und migrieren überlebende Tubuluszellen (gelb), um den Defekt zu schließen (orange). Dabei unterlaufen sie De- und Redifferenzierung. **B:** Progenitorzellen sind im gesunden Tubulussystem zwischen den TEC verstreut (orange). Nach Schädigung proliferieren diese und schließen den Defekt, um abschließend zu reifen Tubuluszellen zu differenzieren (nicht gezeigt). Abbildung nach [200].

Die Kontroverse zur Rolle der Progenitorzellen während der tubulären Heilung ist nicht abschließend geklärt. Die oben dargestellten Studien legen nahe, dass verschiedene Konzepte in verschiedenen Organismen zum Einsatz kommen. Während die Befürworter der Progenitor-Theorie mit humanen Nieren geforscht haben, verwendeten die Gegner der Theorie experimentelle Mausmodelle. Smeets et al. konnte keine Progenitorzellen mit den humanen Markern CD24/CD133 identifizieren, und neben den Studien von Humphreys et al. spricht vieles dafür, dass Dedifferenzierung in Nagetieren das vorherrschende Konzept nach ATN darstellt [152, 206]. Bei Nagern konnten die mesenchymalen Marker CD44 und Vimentin erst nach Induktion von ATN nachgewiesen werden, was für eine gezielte Dedifferenzierung spricht. Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass nagetier- oder mausspezifische Progenitorzellen in der Zukunft identifiziert werden, sollten sich spezielle Marker hierfür finden lassen [200].

1.3.3 Die Rolle des Immunsystems bei der tubulären Heilung

Dem Immunsystem kommen bei der Wundheilung zwei wichtige Funktionen zu: erstens die Erkennung des Schadens, zweitens die Überwachung der Reparatur [150]. Um diese unterschiedlichen Aufgaben ausführen zu können, ist es aus verschiedenen Bestandteilen zusammengesetzt und kann daher möglichst spezifisch auf jeweils unterschiedliche Bedrohungen reagieren. Grob lässt sich das Immunsystem in zwei große Gruppen aufteilen: einerseits in die Gruppe der angeborenen, innatens Bestandteile, andererseits in die Gruppe der erlernten oder auch adaptiven Bestandteile. Zu jeder dieser Gruppen gehören unterschiedliche Zelltypen, Proteine und Rezeptoren, und Botenstoffe wie sogenannte Zytokine. Die Proteine und Rezeptoren lassen sich nicht ausschließlich auf Immunzellen finden, sondern sind auch in mesenchymale oder epitheliale Zellreihen integriert [44, 207-209].

DAMP-Erkennung durch Rezeptoren der innatens Immunität

Beim Zerfall von Tubuluszellen werden DAMPs freigesetzt und von lokalen Immunzellen erkannt. Dies funktioniert über die sogenannten *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) an der Zelloberfläche und über das *Inflammasome* im Zellinnern [210, 211]. Aus der Familie der TLR werden die DAMPs von den Rezeptoren 2 und 4 erkannt, deren Signalkaskade zur Aktivierung der Zelle führt. Zellen aus dem mononukleären Phagozytensystem dienen als Vermittler zwischen den Epithelzellen und den weit entfernten Neutrophilen Granulozyten

und Makrophagen, die nur durch die Produktion proinflammatorischer Zytokine zum Ort der Schädigung geleitet werden können. Die lokalen Zellen beginnen also mit der Produktion von Zytokinen wie TNF- α oder Interleukin-1 β , um andere Immunzellen zu aktivieren.

Obwohl es sich in den allermeisten Fällen bei ANS um eine sterile Entzündungsreaktion handelt, infiltrieren zunächst neutrophile Granulozyten das Nierengewebe. Diese Zellen sind eigentlich auf die Keimabwehr spezialisiert und tragen durch extensiven Gebrauch ihrer Leukozyten-Peroxidase in großem Maße zur Gewebeschädigung bei. Das Gewebe wird dabei von vorgeschädigten Zellen und Debris befreit und die Wundränder „gesäubert“. Der Körper spielt unabhängig von der Ursache der Schädigung stets das gleiche Programm ab, um potentielle Gefahren abzuwenden. Evolutionär gesehen handelte es sich meistens um fokale Schäden durch Verletzungen der Haut oder Gliedmaßen, bei denen eine lokalisierte Reaktion mit Keimabwehr einen Überlebensvorteil brachte. ANS nach diffuser, generalisierter Schädigung durch Toxine oder generalisierte Ischämie zieht eine generelle Organschädigung nach sich, bei der die initiale Immunantwort einen großen Anteil am späteren Gewebsdefekt hat (Abb. 9).

Bei der experimentellen Ausschaltung der TLR-2- bzw. TLR-4-Signalkaskade konnten mehrere Experimente eine Abschwächung der initialen Schädigung zeigen [44-46]. Der TLR-Signalweg bewirkt aber nicht nur die Entstehung pro-inflammatorischer Signale, sondern führt auch zur Aktivierung der Proliferation von Epithelzellen. Rakoff-Nahoum testeten diese These in einem Modell der akuten intestinalen Schädigung an Kontroll- und MyD88-KO-Mäusen [212]. MyD88 ist ein zentrales Adaptermolekül in der Signalkaskade der TLR-A2 und -4. Hierbei kam es zu einer insuffizienten Proliferation der Darmepithelien nach Schädigung,

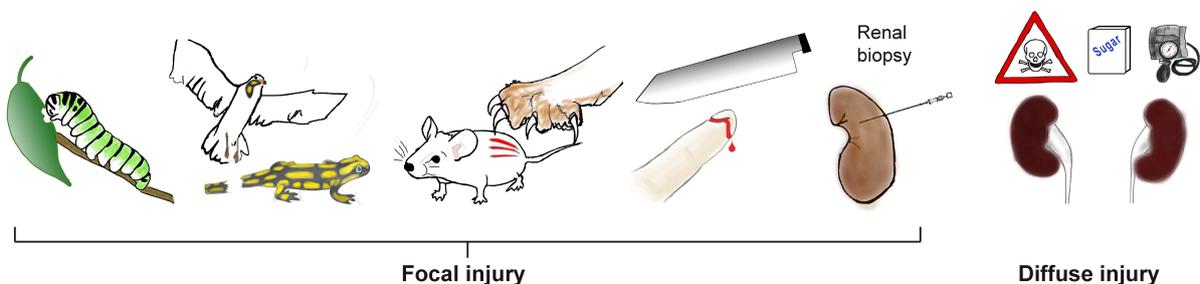


Abbildung 9: Begrenzte vs. diffuse Schädigung. Evolutionär neue Schädigungsmuster (Pharmaka, Blutglukose im Rahmen von Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie) rufen die gleiche Immunantwort wie nach einer fokalen Schädigung hervor. Der Kollateralschaden wird so aufs ganze Organ ausgeweitet.

sodass die omnipräsenten Keime im Darm die Epithelbarriere überwinden konnten, und die Versuchstiere eine Sepsis entwickelten [212, 213].

Sallustio et al. beschrieben in ihren Versuchen eine weitere Rolle der TLR-Rezeptoren bei der tubulären Heilung. TLR-2-Rezeptoren auf tubulären Progenitorzellen vermittelten die Produktion und Sekretion der Proteine Inhibin-A und FGF2, welche sich als essentiell für die tubuläre Regeneration herausstellten [214]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Erkennung des Schadens von zwei großen Rezeptor-Klassen des innate Immunsystems erfolgt. Sowohl pro-inflammatorische, als auch pro-proliferative Signale werden danach von Immunzellen und Epithelzellen gesendet.

Regulierung der Wundheilung durch Makrophagen

In der späteren Phase der Reparatur, nach 3 bis 7 Tagen, werden vermehrt Makrophagen ins Gewebe rekrutiert [143, 215-218]. Makrophagen stammen wie Dendritische Zellen aus dem mononukleären Phagozytensystem und können verschiedenste Phänotypen ausbilden [219, 220]. Grob lassen sich die Phänotypen in zwei Haupttypen aufteilen, nämlich in den proinflammatorischen M1-Typ und den proliferativen M2-Typ. In den drei Phasen der Wundheilung regulieren die Makrophagen den Abtransport beschädigter Zellteile, die Proliferation von Epithelzellen und Fibroblasten sowie von Blutgefäßen und die Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Eine Dysregulation dieser Prozesse führt zu unzureichender Wundheilung oder übermäßiger Fibroseentstehung, weshalb der Einfluss der Makrophagen für die epitheliale Heilung essentiell ist [143].

Die Makrophagen werden aus dem Blut über die Erkennung von CCL2 am CCR2-Rezeptor, bzw. CX3CL1 am CX3CR1-Rezeptor rekrutiert [143]. Durch den Einfluss von TNF- α und IFN γ nehmen die Makrophagen einen pro-inflammatorischen M1-Phänotyp an. Sie produzieren in der Frühphase die Zytokine TNF- α , IL-1 und IL-6 und tragen weiter zu einem inflammatorischen Mikromilieu bei, beginnen aber bereits, die Zahl der Neutrophilen durch Apoptose-Induktion und Phagozytose zu reduzieren [143]. Dies stellt den Beginn des Übergangs von der inflammatorischen zur proliferativen Phase dar. M1-Makrophagen sind durch Zytokinproduktion in der Lage, die Proliferation von Myofibroblasten und somit auch die Ablagerung von Kollagenfasern zu fördern, wenn auch in schwächerem Maße als M2a-Makrophagen [143, 215, 221-224].

Während der proliferativen Phase der Wundheilung nehmen die Makrophagen den alternativen, pro-proliferativen Phänotyp an [143]. Die Mechanismen des *phenotype switch* sind nicht abschließend geklärt und es ist unklar, ob die Makrophagen nur auf Exposition mit Zytokinen reagieren, oder ob schon vorbestimmt ist, welche Funktion sie im Verlauf der Wundheilung einnehmen. Das mononukleäre Phagozytensystem besteht aus vielen Untergruppen von Zellen mit unterschiedlichen Markern, sodass nicht ausgeschlossen ist, dass die „M0“-Makrophagen-Population schon von vornherein heterogen ist und verschieden auf den gleichen Reiz reagiert [223]. *In vitro* lässt sich der M2-Phänotyp weiter in einen M2a- und einen Mreg-Typ unterscheiden. Abbildung 10 gibt einen Überblick über die wichtigsten Eigenschaften der drei vorherrschenden Phänotypen. Während der M2a-Phänotyp, induziert durch den Einfluss von IL-4 und IL-13, eher mit überschießender Wundheilung und Chronifizierung der Makrophagen-Reaktion in Verbindung gebracht wird, dient der Mreg-Typ der Beendigung der Entzündungsreaktion und auch der Hemmung profibrotischer Signale. Mreg-Makrophagen produzieren hohe Konzentrationen an IL-10, was die Entzündungsreaktion hemmt. In mehreren Versuchen konnte durch IL-10 eine reduzierte Neutrophilen-Infiltration und geringere Ausmaße von Zelltod erreicht werden [225-227]. Es wird vermutet, dass der *phenotype switch* zum Mreg durch Exposition mit Pentraxin-2 getriggert ist [228].

Es mehren sich Hinweise, dass der WNT-Signalweg und β -catenin in den *phenotype switch* involviert sind. Dendritische Zellen in der Darmmukosa benötigen β -catenin zur Expression der anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β [229]. Durch Hemmung der Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β), einem hemmenden Enzym sowohl von β -catenin als auch dem Wnt-Signalweg, konnte die Entzündungsreaktion gehemmt werden und die Produktion von IL-10 gesteigert werden [230, 231]. Die experimentelle Ausschaltung β -catenins führte zur Verstärkung der Entzündungsreaktion [229]. Von Makrophagen produziertes Wnt7b aus dem Wnt-Signalweg war zudem in Modellen zur Nierenschädigung für die Regeneration essentiell [232, 233]. Wegen seiner pro-proliferativen Eigenschaften wird der Wnt/ β -catenin-Signalweg auch mit der Tumorentstehung in verschiedenen Organen in Verbindung gebracht, was den engen Bezug zwischen regenerativer und maligner Proliferation aufzeigt [234-236].

Nach Abklingen der Entzündungsreaktion erfolgt der Eintritt in die Umbauphase, in der das provisorische Narbengewebe reduziert und die epitheliale Proliferation abgeschlossen wird. Die Makrophagen verändern auch während dieser Phase ihren Phänotyp, indem die

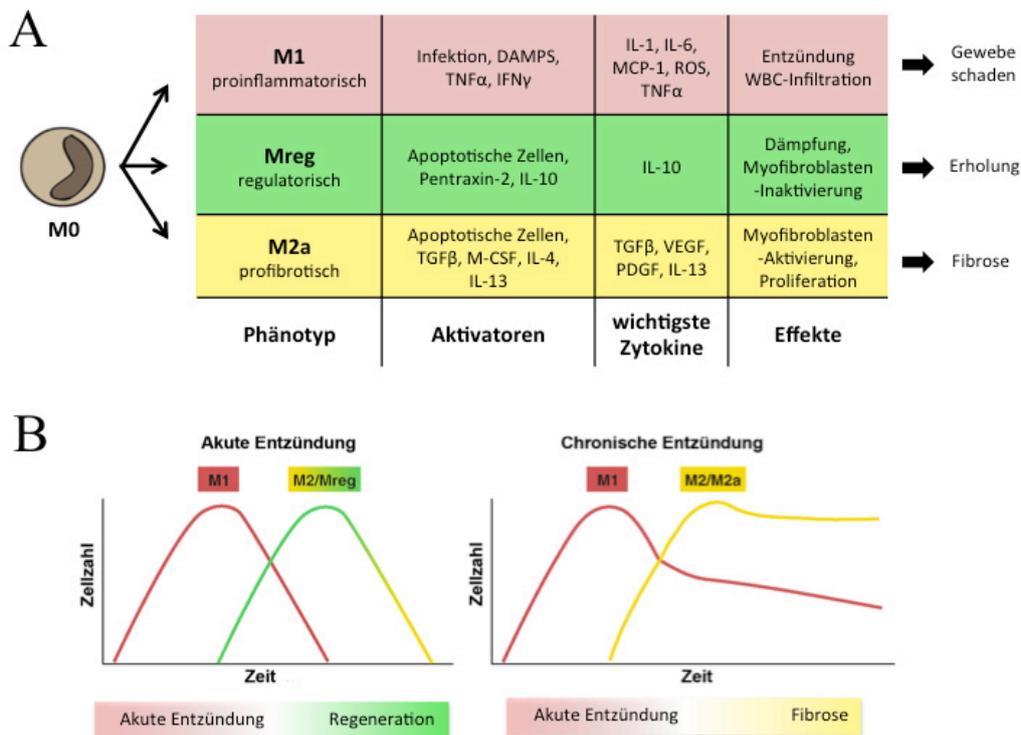


Abbildung 10: Makrophagen-Plastizität in den verschiedenen Phasen der Entzündungsreaktion. A: Übersicht über die Phänotypen und ihre Aktivatoren. **B:** Aktivität der einzelnen Phänotypen im Verlauf. Der proinflammatorische M1-Typ wird nach akuter Schädigung u.a. durch Mreg-Aktivität gedämpft. Es folgt eine primär epitheliale Heilungsreaktion. Bei Ausbleiben der Mreg-Aktivität (rechts) kommt es zur chronischen Aktivierung des M2-Typs, der einen exzessiven Umbau mit Fibrose zur Folge hat. Abbildung nach [223].

Marker CD206 und CD163 vermehrt exprimiert werden und die Produktion der Zytokine VEGF, IFG-1 und Arginase-1 reduziert wird. Die TGF β -Produktion bleibt hingegen stabil [143]. Ob Makrophagen in der Umbauphase ausschließlich zur Fibroseentstehung beitragen, oder ob die Fibrose-Last sogar reduziert wird, wird diskutiert [216, 237]. Frühe Deaktivierung der M1-Makrophagen führte zu reduzierter Fibrose, ein verlängerter pro-inflammatorischer Einfluss der M1-Makrophagen zu verstärkter Kollagen-Ablagerung [238-240]. Eine Chronifizierung der M2a-Reaktion verstärkte langfristig ebenfalls die Fibroseentstehung durch permanenten Einfluss von TGF β [241]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass kein einzelner Makrophagen-Phänotyp ausschließlich pro-regenerativ agiert, sondern ein perfektes zeitliches Zusammenspiel verschiedener Phänotypen für eine effiziente und schadenfreie Wundheilung erforderlich ist. Die Epithelzellen, Myofibroblasten und Progenitorzellen agieren gemäß dem Mikromilieu, welches durch die Makrophagen und den produzierten Zytokinen geschaffen wird [143, 237, 242-244].

T_H2-Immunität

Als Vertreter des adaptiven Immunsystems sind die T-Lymphozyten an der Regulierung der epithelialen Wundheilung beteiligt [245]. Die T-Helferzellen können wie die Makrophagen in zwei verschiedene Klassen aufgeteilt werden: die T_H1-Zellen, mit proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 und IFN γ , und die T_H2-Zellen, welche mit allergischen Reaktionen und bei der Abwehr von Parasiten vorherrschen. Die T_H1-Reaktion ist notwendig zur Bekämpfung viraler und bakterieller Invasionen, bei denen es um eine hohe zahlenmäßige Überlegenheit geht, der Gewebsschaden aber minimal ist. Die proinflammatorischen Zytokine verursachen eine generalisierte Reaktion des gesamten Immunsystems, um die große Masse an Erregern eliminieren zu können. Bei parasitären Erkrankungen, zum Beispiel einer Wurminfektion, kommt es zu einer großen Gewebsschädigung, die nur durch einen (oder wenige) Organismen entsteht. Eine generalisierte Entzündungsreaktion wäre in diesem Fall nicht adäquat und brächte einen großen Kollateralschaden mit sich, bei nur limitierter Wirkung gegen den Parasiten. Hier hat sich evolutionär die T_H2-Reaktion durchgesetzt, die eine Förderung der Wundheilung nach sich zieht. IL-4, IL-5 und IL-13 bewirken nicht nur die Induktion des M2a-Phänotyps bei Makrophagen, sondern rekrutieren auch noch andere Zelltypen wie eosinophile Granulozyten. Diese speichern Metalloproteasen (MMP) und Wachstumsfaktoren, welche die epitheliale und mesenchymale Wundheilung fördern [246]. Durch die Wundheilung und beschleunigte Fibrose werden zwei Ziele der Parasiten-Bekämpfung erreicht: die durch den Eintritt des Parasiten hervorgerufene Schädigung wird schnellstmöglich repariert, zweitens wird der Parasit in einer fibrotischen Höhle isoliert und abgekapselt [245].

1.4 Methodische Ansätze zur Erforschung der tubulären Heilung

Einige der etablierten Modelle zur Erforschung der akuten Tubulusschädigung sowie der anschließenden Regeneration wurden bereits in den vorigen Kapiteln beschrieben. *In vivo* ist das Modell der Ischämie-Reperfusion (I/R) ein geeignetes Mittel, um einen akuten, ischämischen Tubulusschaden herbeizuführen [247]. Möchte man den Einfluss bestimmter Pharmaka, Antikörper oder Ähnlichem auf die Schädigung oder Heilungsreaktion untersuchen, müssen den Tieren zu den jeweiligen relevanten Zeitpunkten Injektionen verabreicht werden. Verschiedene Endpunkte können durch einen solchen I/R-Versuch ausgelesen werden, dazu gehören die Histologie gegebenenfalls mit immunhistochemischen Färbungen, Serumkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine, FACS-Analysen des Nierengewebes und Urinanalysen. Die bereits erwähnten *cell fate trace* Studien sind zur Betrachtung einzelner Zelltypen geeignet und stellen einen Sonderfall der histologischen Untersuchung dar. Alternativ zur I/R kann auch ein tubulotoxisches Agens wie zum Beispiel Cisplatin zur Schädigung verwendet werden.

Zur Untersuchung der epithelialen Heilung *in vitro* stehen ebenfalls etablierte Modelle zur Verfügung (vgl. Kapitel 2.2). Einige Modelle konzentrieren sich dabei vor allem auf das Messen der Proliferation, wohingegen nur eines eine Schädigung einer intakten Epithelstruktur zu Beginn des Versuchs beinhaltet: der *scratch assay*. Hierbei wird ein Monolayer aus Epithelzellen durch eine Schabe-Verletzung unterbrochen und das Zusammenwachsen des Wundspaltes unter dem Mikroskop über mehrere Tage beobachtet. Hierbei untersucht man sowohl Migration als auch Proliferation, was den Assay als Näherung zu den *in vivo*-Bedingungen attraktiv macht. Als reiner Proliferationsassay steht MTS-Assay zur Verfügung, bei dem die Verstoffwechslung eines farbigen Metabolits als Surrogatparameter für das Zellwachstum gemessen werden kann. Mithilfe von LDH-Assays lassen sich Zelluntergang und Zellüberleben quantifizieren. Für die *in vitro*-Versuche können immortalisierte, tubuläre Zelllinien, primäre Tubuluszellen oder primäre Progenitorzellen verwendet werden.

1.5 Verfolgter Ansatz und Hypothese

In unserer Studie möchten wir uns mit der Regeneration von Tubulusepithelzellen beschäftigen. Derzeitige Therapiekonzepte der ANS konzentrieren sich auf die Verhinderung einer bedrohlichen Komplikation durch Funktionsverlust der Niere. Wenn möglich wird im Vorfeld versucht, eine ANS bei vermuteter Nierenschädigung durch Aufrechterhaltung eines ausreichenden Perfusionsdrucks zu verhindern. Kommt es jedoch zur ATN im Rahmen einer ANS, kann die Regeneration geschädigter Tubuli beim Menschen bislang nicht beschleunigt oder positiv beeinflusst werden. Die genauen Mechanismen der tubulären Heilung, sowie des Zusammenspiels zwischen den verschiedenen Zelltypen sind noch nicht vollständig verstanden, was die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten erschwert. Viele experimentelle Ansätze zielen auf die Reduktion der Schädigung ab, nicht aber auf die gezielte Förderung der Regeneration. Es ist anzunehmen, dass eine solche Förderung der Regeneration in einem engen, begrenzten Zeitfenster zu erfolgen hätte. Versuche wie die von Thomasova et al. und die bisherigen Erkenntnisse über die phasische Aktivität der Makrophagen sind nur zwei der vielen Hinweise dafür. Hierfür benötigt man zuverlässige Aussagen über den Verlauf des ANS beim jeweiligen Patienten, zum Beispiel durch Marker. Per Serumkreatinin ließe sich eine genaue Aussage über die Phase der Wundheilung nicht stellen, der optimale Therapiezeitpunkt wäre im Alltag selten gegeben.

Die momentan zur Verfügung stehenden Methoden zur Untersuchung der ATN und der anschließenden epithelialen Heilung kommen im Falle der *in vitro* Studien nur marginal an die tatsächlichen Verhältnisse heran, oder sind im Falle der Tierexperimente mit großem finanziellen und zeitlichem Aufwand verbunden. Groß angelegte Experimente mit vielen verschiedenen Fragestellungen sind daher nur begrenzt möglich. Eine Vielzahl an Therapeutika *in vivo* zu testen bedeutet große Versuchsgruppengrößen mit vielen Tieren und große Mengen an zu injizierenden Therapeutika, die oft sehr teuer sind. Viele der *in vitro* Studien werden mit immortalisierten Zelllinien durchgeführt, deren Eigenschaften nicht mehr dem ursprünglichen, tubulär-epithelialen Phäno- und Genotyp entsprechen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die ANS ist daher als begrenzt anzusehen.

Die Bildung spezifischer Mikromilieus durch Makrophagen, T-Zellen und Progenitorzellen ist für die Steuerung der epithelialen und mesenchymalen Proliferation mitverantwortlich [143]. Diese Milieus werden durch parakrine und endokrine Effekte sekretierter Zytokine geschaffen. Bei der Vielzahl an bereits identifizierten, immunologischen

Zytokinen sowie der enormen Anzahl verfügbarer Pharmaka und *small molecules* ist es notwendig groß angelegte Experimente durchzuführen, bei denen eine große Bandbreite an möglichen Kandidaten getestet werden kann. Strukturierte Massen-Assays für *in vitro*- oder *in vivo*-Experimente existieren derzeit nicht.

Gibt es Zytokine oder Moleküle, welche die tubuläre Regeneration spezifisch fördern? Lässt sich die tubuläre Regeneration nach ischämischem Schaden durch Behandlung mit einem dieser Moleküle beschleunigen? Wir möchten untersuchen, ob sich ein solches Molekül unter vielen zu testenden Kandidaten finden lässt. Ein Screening-Versuch mit *small molecules* und einer großen Zahl an Stoffen ist für die zeitlich ungezielte Behandlung einer ATN nach der Schädigung gut geeignet. Hierzu soll ein zuverlässiger Screening-Assay entwickelt werden, mit dem Reihentestungen an primären, murinen Tubuluszellen möglich sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer

FACS Calibur® BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

ELISA-Reader

GENios Plus Tecan, Crailsheim, Deutschland

Kühlaggregate

4°C / -20°C Schränke Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland

-80°C Schrank Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

Mikroskope

Leica DMIL Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland

ProGres® Mikroskop-Kamera Jenoptik Laser Optrik Systeme, Jena, Deutschland

Pipetten

Multikanalpipette Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Elektronische (Multi-) Pipetten Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Multipette® Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Easypet® Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Pipette Pipetman® Gilson, Middleton, WI, USA

Pipettenspitzen Typ Gilson® Peske, Aindling-Arnhofen, Deutschland

Pipettenspitzen epT.I.P.S. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Serologische Pipetten 5/10/25/50ml Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Photometer

NanoDrop 1000® Peqlab GmbH, Erlangen, Deutschland

Real Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

LightCycler 480 I+II Roche, Mannheim, Deutschland

Waagen

BP 110S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
EC-211	Acculab Sartorius Group, Bohemia, USA
Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Mettler P 1200 N	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Western Blot	
Snap ID Filtersystem	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Acrylamide	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Beta-actin	Cell Signaling Technologies, Frankfurt a.M., Deutschland
Ammoniumpersulfat	BioRad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
ECL WB Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Immobilon-PVDF-Membran	Millipore, Eschborn, Deutschland
Protein-Marker II	PeqLab, Erlangen, Deutschland
SDS	BioRad, München, Deutschland
TEMED	BioRad, München, Deutschland
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Whatman papers ®	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Zellkultur & Inkubator	
Heracell 150	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Steril Card Hood CII, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, Maine, USA
Typ B5060 EC-CO 2	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
UV-Licht	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, Deutschland
Zählkammer Neubauer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen	
Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5418	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Universal 16	Hettich, Bäch, Schweiz
Sonstige	
Eppendorfgefäße 1,5/2ml	TPP Zellkulturbedarf, Trasadingen, Schweiz

Falcon Tubes 15/50ml	TPP Zellkulturbedarf, Trasadingen, Schweiz
Homogenisator UltraTurrax T25	IKA GmbH, Staufen, Deutschland
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Welheim, Deutschland
Sicherheitswerkbank Microflow ®	Nunc GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Themomixer 5320, 5436, comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
VortexGenie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
VortexGenie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifugiergefäße 15/50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

2.1.2 Software

Creative Suite 5 Extended	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
GraphPad Prism 5 ®	Graph Pad Software, La Jolla, CA; USA
Microsoft Office 2011 for Mac	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
ProGres Software	Jenoptik Laser Optik Systeme, Jena, Deutschland
Image J	National Institutes of Health (NIH), Bethesda, PA, USA

2.1.3 Chemikalien

DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Percoll ®	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck AG, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Zellkultur

Puffer

DPBS	(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HBSS	(Hank's Buffered Saline Solution), Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Medium und Zusätze

DMEM	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
------	--

Fetales Kalbsserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Trypsin / EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trypan Blau	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Collagen IV	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
REGM+Reagent Pack	Lonza, Basel, Schweiz

Kulturgefäße

25/57/150cm ² Flaschen	TPP Zellkulturbedarf, Trasadingen, Schweiz
96/48/24/12/6-Well Platten	TPP Zellkulturbedarf, Trasadingen, Schweiz
Petrischalen 10cm ⊙	TPP Zellkulturbedarf, Trasadingen, Schweiz
LabTek ® Chamber Slides	Nunc Ind., Rochester, NY, USA
Cryo-Vial	Alpha Laboratories, Eastleigh, England

Zellisolation aus Organen

Butterfly-System	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
2/20/50ml Spritzen	BD, Heidelberg, Deutschland
Skalpelli	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
70µm Cell Stainer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
20µm Cell Stainer	Millipore, Billerica, MA, USA
Collagenase A <i>aus C. hist.</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Fentanyl Jansen ® für Narkose	Jansen Pharma, Deutschland
Midazolam für Narkose	Ratiopharm, Deutschland
Naloxon für Narkose-Antag.	Inresa Pharma, Deutschland
Flumazenil für Narkose-Antag.	Hikma Pharma, Deutschland
Revertor® für Narkose Antag.	cp-Pharma, Deutschland

Zytokine und Stimulantien

Alle folgenden: Immunotools, Friesoyte, Deutschland

rm Interleukin 1 alpha / 1 beta / 2 / 3 / 4 / 5 / 6 / 7 / 9 / 10 / 11 / 13 / 15 / 16 / 17A / 17C / 17F / 19 / 20 / 21 / 25 / 31 / 33, Interferon gamma, IGF-1, FGF-alpha, FGF-9, VEGF, PDGF-AA / -BB, M-CSF, M-GSF, NGF beta, SCF, LIF, Noggin, Sonic hedgehog, TPO, TNF alpha

ITSS (Insulin-Transferrin-Selinit-Suppl.), Roche, Mannheim

rm HGF	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Hormon-Mix für Zellkultur	Selbst zusammengestellt
Nutlin 3a	Alexis Biotech Ltd., London, England
Sulforaphan	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Assay-Kits für die Zellkultur	
CellTiter 96 ® One Solution Kit	Promega, Madison, WI, USA
TBARS-Assay	Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA

2.1.5 Tierzucht und Tierhaltung

Mäuse

C57BL6 Wildtyp	Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA
----------------	---

Organentnahme

Einbettkassetten	Simport, Beloeil, Kanada
Formaldehydlösung	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Sonstiges Zubehör

Isofluran Forene ®	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Operationsbesteck	Miltex, Deutschland
Wärmeplatte	Panlab, Cornellà, Spanien
Nahmaterial Typ Mersilene 2-0	Ethicon by Johnson & Johnson, USA

2.1.6 Histologie

Aceton	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, USA
Ammoniumpersulfat	BioRad, München, D
Methylgrün	Sigma, Deisenhofen, D
Mounting Med. VectaMount	Vector, Burlingame, USA
PAS	Bio-Optica, Mailand, I
Biotinilierter Sekundär-AK	Vector, Burlingame, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, D

Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Rabbit Anti-Maus ALDH1A1	Abcam plc, Cambridge, England
Rabbit Anti-Maus Cytokeratin 19	Acris GmbH, Herford, Deutschland
Rabbit Anti-Maus Vimentin	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Sheep Anti-Maus Cytokeratin 7	Abcam plc, Cambridge, England
Rabbit Anti-Maus E-cadherin	Abcam plc, Cambridge, England

2.1.7 Molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation aus Zellen und Gewebe

PureLink [®] RNA Mini-Kit	Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
RNA later [®]	Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

cDNA-Synthese

Linear Acrylamid	Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
0.1M DTT	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
5x First Strand Buffer	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Hexanucleotides	Roche, Mannheim, Deutschland
25mM dNTPs	GE Healthcare, München, Deutschland
RNAsin [®]	Promega, Madison, WI, USA
Superscript II [®]	Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR)

25mM MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
1,25mM dNTPs	Metabion, Martinsried, Deutschland
SYBR Green Dye Detection	Applied Biosystems by Life Techn., Carlsbad, CA, USA
DNA Taq Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
DNA-Primer	Metabion, Martinsried, Deutschland

2.1.8 Immunologische Methoden

Zubehör für das Durchflusszytometer

Aldeflour Kit [®]	Aldagen, Durham, NC, USA
FACS Flow	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

Zubehör für Western Blot

Acrylamide	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Actin	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M., Deutschland
Ammoniumpersulfat	BioRad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
ECL WB Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Immobilon-PVDF Membran	Millipore, Eschborn, Deutschland
Protein-Marker II	Peqlab, Erlangen, Deutschland
SDS	BioRad, München, Deutschland
TEMED	BioRad, München, Deutschland
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Whatman papers®	Milipore, Schwalbach, Deutschland
<i>loading buffer:</i>	30mM Tris-HCl, 5% Glycerol, 1% SDS, 0,0025% Bromphenolblau 30µl/ml β-Mercaptoethanol
<i>Sammelgel:</i>	1,3ml 30% Acrylamidmix; 6,1 ddH ₂ O; 2,5ml; 2,5ml stacking buffer, 50µl APS, 10µl TEMED
<i>stacking buffer:</i>	6,05mg 0,5mM Tris-HCL; 50ml ddH ₂ O; HCl bis pH 6,8, dann ddH ₂ O bis 100ml; 400mg SDS,
<i>Trenngel:</i>	4ml 30% Acrylamidmix; 3,5 ddH ₂ O; 2,5ml; 2,5ml separating buffer, 3µl APS, 6,66µl TEMED
<i>separating buffer:</i>	18,2mg 1,5mM Tris-HCL; 50ml ddH ₂ O; HCl bis pH 8,8; dann ddH ₂ O bis 100ml; 400mg SDS,
TBS	24,22g 200mM Tris; 80g 1,37M NaCl; 1l H ₂ O, HCl bis pH 7,6:
<i>transfer buffer:</i>	17,46g Tris; 8,79g Glycin; 11,25ml SDS 10%; 600ml Methanol; 3lml H ₂ O

Tabelle 2: DNA-Primer-Sequenzen (alle murin)

Gen	Reverse Primer 5'-3'	Forward Primer 5'-3'
18S	AGGGCCTCACTAAACCATCC	GCAATTATTCCCCATGAACG
Aldh1	ACCTCCTCAGTTGCAGGGTT	CACTGGCCGACTTGAAGATT
BMPR2	GGCGCACCAGCCGATTTCCA	GCAGACGGCCGCATGGAGTA
c-Kit	AATGAGCAGCGGCGTGAACAGA	GAGTTCCATAGACTCCAGCGTC
c-Met	GGAGAATGCACTGTATTGCGTCG	GTTCTGCTTGGCAACGAGAGCT
CCL2	ATTGGGATCATCTTGCTGGT	CCTGCTGTTACAGTTGCC
CCR1	AGGCCCAGAAACAAAGTCTG	TGCTGAGGAACTGGTCAGG
CCR2	CAACTCCTTCATCAGGCACA	AGGCATCCATTTTGCTTCTG
CCR5	ATCCGTTCCCCCTACAAGAG	GCAGGGTGCTGACATACCAT
CD110	GGCTGTGATCCTGGACGCGG	CCCAACCGCATGGACCAGTGA
CD120a	CACACGGTGTCTGAGTCTCCT	GTGTGGCTGTAAGGAGAACCAG
CD120b	ATGCTTGCCTCACAGTCCGCAC	TGACAGGAAGGCTCAGATGTGC
CD40	GGATGACAGACGGTATCAGTGG	ACCAGCAAGGATTGCGAGGCAT
CSF1R	CTGTTGGTGAGGAATGTGGCTG	TGTGCTCGGCCACTAACGCC
CSF2RB1s	GGCTCTGTGCTTGGGCGACA	GGAAGAGCCTGCAACTCACTGGC
CSF2RB2s	CTCTGTGGATTCAGATGAGGCAG	GCAGGCTTCTTGCTGAGCAACA
CSF3R	CTCTCCAGCGAAGGTGTAGACA	CCTGGATGATAGAACCTAACGGG
CXCL2	TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC	CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG
CXCR2	GTCATCGCGGCGCTCACAGG	CGGGCCATGCGGGTTCATCTT
CXCR3	AGCAGGAAACCAGCCACTAGCT	TACGATCAGCGCCTCAATGCCA
CXCR4	GGGCAGGACGAGACCCACCA	GCCTGGACCGGTACCTCGCT
CXCR7	GTTGGAAGCAGATGTGACCGTC	GACCGCTATCTCTCCATCACCT
E-Cadh.	CCACTTTGAATCGGGAGTCT	GAGGTCTACACCTTCCCGGT
ErbB-1	GGCTGGCCCAGAGGATTTGGAAG	CTGCCACCTATGCCACGCCA
FGFR1	TGGGTCGGTGCGGAGATCGT	CGGACAACACCAAACCAAACCCTGT
FGFR2	GGGGGCAACCACGTACGCTTC	CTGGGGGCGCTTCATCTGCC
FGFR3	CTCCATCTCAGATAACCAGGTCC	ACAGGTGGTCATGGCAGAAGCT
FGFR4	CCCCGGCTCATGTGCTCTGC	CTCGGGGGCTCCCCATACCC
FXD2	TTTGCGGACGGTTTCATA	ATGGCTGGGGAAATATCA
HER2 ^{neu}	TGGACAGGCCCGGGAACGAT	CCTGGTGCCGTTGGGGGTTTC
HER3	GAAAATGGGCGCATCGAGCACA	AGGCTCATTGCTTCTCCTGCCA
HER4	CTGCGTAACCAACTGGATAGTGG	CAAAGCCAACGTGGAGTTCATGG
HO-1	CCTTCAAGGCCTCAGACAAA	GAGCCTGAATCGAGCAGAAC
IFNGR1	TTGGTGCAGGAATCAGTCCAGG	CTTGAACCCTGTGCTATGCTGG
IFNGR2	TGTGATGTCCGTACAGTTCGGC	CCTTCCAGCAATGACCCAAGAC
IGF1R	AAACACGAGCCCCACAGCG	TCCGCATTTCTGCCCCTCGC
IL-31RA	CTGTCCTCAGACCGATGTTCTC	ACACCGAGTTGGAGAGCCGTAT
IL-6	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC	TGATGCACTTGACAGAAAACA
IL10RA	AGGCGTCTGTGCCCGCTTTC	TGCTGGGCTGACACCTCCGT
IL10RB	ATGAGCCACAGCACGACAAAGC	CTGTGAACGGACAGGCAATGAC
IL11RA1	CTCGTACCGCGTGTGGCAGC	CTGCCGCAGAAGATGAGCAGCA
IL11RA2	GCTTGGCAAGAGACTTCAGGAC	GACAGCCCTGATGAAGGCACTT

IL13RA1	GTGTAGAAGGTGGAGTTTTGCTC	TGTTCTTGCCGACGCTGTCTAC
IL13RA2	GCTGGAGGTAATCAGCACACTG	TGGTCTGCTCTTGGAACCTGG
IL15R	CTGTCTCTGTGGTCATTGCGGT	GACACCAAAGGTGACCTCACAG
IL17RA	CGATGAGTGTGATGAGGCCATA	CCCAGTAATCTCAAATACCACAGTTC
IL17RB	TGTGTTGGACCATCCACTCT	AGTGTGCTGATCTTGGCTG
IL17RC	ACTGGAAATCTTGTGGCTCATT	GAGTCCCTGC CAGCCACTT
IL17RD	GAGAGCCGCAGCGTATGTGGA	CCATCACTGTGCCTCTGGTTGT
IL17RE	ACACTTTTTGCGCCTCACAG	AATTCCTTCTGCCCTGCAT
IL1R1	GGCTCAGGATAACAGGTCTGTC	CTGTTGGTGAGGAATGTGGCTG
IL1RAP	CCAGAAAGACCGTGGCTCCAAA	GGAGGATCTCAGGCGCAACTAT
IL1RL1	TCGGGCAGAGTGTGGTGAACAA	GGATTGAGGTTGCTCTGTTCTGG
IL20RA	CGTCTCGGCCCATTCGGAGC	TCGGGACGCGCAGTTCCTTG
IL20RB	ACGGGCTACGGCCTCTCTCG	ACCTCGGACCCCCGCTTTGT
IL21R	GCAGAAGGTCTCTTGGTCCTGA	CACTGACTACCTCTGGACCATC
IL22RA1	CGTGTTCTTGGATGAAGCGTAGG	TTTCCTCGTCGGCTTGCTCTGT
IL22RA2	GAGGACGGAGAAGCACCCGC	TGGACGCCACTCTGCCTGGA
IL2RA	GCATAGACTGTGTTGGCTTCTGC	GCGTTGCTTAGGAAACTCCTGG
IL2RB	AGCACTTCCAGCGGAGAGATCT	CTCAAGTGCCACATCCCAGATC
IL2RG	CCACAGATTGGGTTATAGCGGC	GGAGCAACAGAGATCGAAGCTG
IL3R	AGCACCGTAGCCACTGAAGTCA	GAGGTTTACCCTCGGAAGCTCA
IL4RA	AGCAGCCATTCGTCCGACACAT	ACCAGATGGAAGTGTGGGCTGA
IL5R	CCACTGTGACATTCTTGGAGG	AGGGTTTGAGCAGCTTGCTGTG
IL6R	TGCCCGTGACCTCTGGGGAC	CGTGGTCCAGGTCCGTGGGA
IL7R	AGGCGAGCGGTTTGCCTGT	GTGGCCTACCGCCAGCAAG
IL9R	AAGAACGCCTCGGGAGATGGAA	GCAATGGTCAGCCAGCATCCTT
InsR	TGGGACCCCCGGCGATCAGAG	AGTCGAGCCCTAGCTCCCGC
LIFR	AGCAGCTCCGGCCTCCTTGA	CGTTATCGTCGCCTGGCGCT
MDM2	TCCTTCAGATCACTCCCACC	CCCGAGTTTCTCTGTGAAGG
N-Cadh.	CGTCCACCTTGAAATCTGCT	TTACAGCGCAGTCTTACCGA
Notch-1	TCTTACACGGTGTGCTGAGG	GAATGGAGGTAGGTGCGAAG
NQO-1	GTCTTCTCTGAATGGGCCAG	TTTAGGGTCGTCTTGGCAAC
NRF-2	TCTATGTCTTGCCTCCAAAGG	CTCAGCATGATGGACTTGGA
p53	TCCGACTGTGACTCCTCCAT	CTAGCATTCAAGCCCTCATC
p75	CAGGGCGTGCACTCGCGTAA	CAGACGATGCCGTGTGCCGA
Patched-1	TGATGCCATCTGCGTCTACCAG	CCTCGTTACAAACTCCTGGTG
Pax-2	GGCAGTCACTCCTGTCCCT	TCCCAGTGTCTCATCCATCA
PDGFRA	CCGGCGTCGCTCAAAGCTCA	CGTGCTAGCGCGGAACCTCA
PDGFRB	GTGGAGTCGTAAGGCAACTGCA	GTGGTCCTTACCGTCATCTCTC
TNF-alpha	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
TrkA	GCTGAAAGTCCTGCCGAGCATT	GGTCTTTCTCGCTGAGTGCTAC
VEGFR1	GCCAAATGCAGAGGCTTGAACG	TGGATGAGCAGTGTGAACGGCT
VEGFR2	TTCTCACCTGCGGATAGTCA	CGAGACCATTGAAGTGAAGTGGC
VEGFR3	GGCTCGCCGTGCACTTCCTT	AGCTCCTCGGCTCACGCAGA
Vimentin	GCTCCTGGATCTTTCATCG	AAAGCACCTGCAGTCATTC

Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für die Versuche der Zellkultur wurden primäre, frisch isolierte, murine Tubulusepithelzellen verwendet. Für einige Versuche wurden zusätzlich wiederaufgetaute primäre murine Mesangialzellen, Zelllinien (NIH3T3-Fibroblasten, MEF-Zellen (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) oder HEK-Zellen (*Human Embryonic Kidney*) verwendet.

Die Tubulusepithelien wurden aus C57BL6-Wildtyp-Mäusen verschiedenen Alters und Geschlechts isoliert. Die Tiere wurden mit einer Kurznarkose i.p. (Zusammensetzung: Fentanyl 0,05mg/kg KG, Midazolam 5mg/kg KG) betäubt. Nach Fixierung auf einer Styroporplatte wurden nacheinander Haut, Peritoneum und Thorax eröffnet und die Vena cava inferior durchtrennt. Mithilfe des Butterfly-Systems mitsamt angeschlossener Spritze wurde der linke Ventrikel an der Herzspitze punktiert und ausreichend DPBS injiziert, bis die parenchymatösen Organe annähernd frei von Blut waren. Die Nieren wurden entnommen und von ihrer dünnen Kapsel befreit. Nach sorgfältiger Zerkleinerung mit dem Skalpell wurden sie in ein Probengefäß mit Kollagenase (1mg/ml) für 30 Minuten inkubiert und verdaut. Anschließend wurde der Inhalt des Gefäßes durch ein Sieb der Porengröße 70µm in ein großes Falcon-Gefäß gepresst. Das Falcon-Gefäß wurde 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert, dekantiert und das Pellet mit 2ml DPBS resuspendiert. Ein Falcon-Gefäß der Größe 15ml wurde vorab mit 10ml 31% Percoll gefüllt. Die Gewebesuspension wurde vorsichtig auf die Percoll-Säule gegeben (schwimmt oben auf) und alles zusammen für 10 Minuten bei 3000rpm zentrifugiert. Das Percoll dient hierbei zur Erzeugung eines Dichte-Gradienten [248]. Percoll ist hierbei geeigneter als vergleichbare Substanzen, da es eine geringere Osmolalität, Viskosität und Toxizität besitzt. Das Pellet am Boden des Gefäßes wurde in ein frisches Gefäß transferiert und zweimal mit DPBS gewaschen (1200rpm, 5 Minuten). Nach der letzten Zentrifugierung wurde das Pellet anstelle von DPBS mit Kulturmedium resuspendiert.

Die Zellen wurden in einem sterilen Inkubator bei 37°C und 5%CO₂-Konzentration kultiviert. Für Fibroblasten und HEK-Zellen eignete sich DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin, die primären murinen Tubuluszellen benötigten weitere Zusätze: Der Hormon-Mix wurde auf Basis von 50ml HBSS hergestellt, in welche 50mg ITSS, 1,56ng PGE-1, 17ng T3, 900ng Hydrocortison zugegeben wurde. Zu 427ml DMEM-Medium wurden 50ml FCS, 5ml P/S, 12,5ml HEPES, 5ml Hormon-Mix und EGF (finale Konzentration

25ng/ml) gegeben. Die Zellen wurden in 6-48-Well-Platten oder in Kulturflaschen der Größen 25-150cm² kultiviert. Der Mediumwechsel fand nach Bedarf, jedoch nicht seltener als alle 3 Tage statt. Für eine bessere Anheftung der Tubuluszellen wurden einige Platten am Vortag mit in DPBS verdünntem Collagen Typ IV beschichtet (ca. 10µg/cm²). Sollte ein Transfer der Zellen erfolgen, war dies nur bei unbeschichteten Platten möglich.

Zum Splitten der Zellen wurde ein gängiges Protokoll unter Verwendung von Trypsin/EDTA und mehreren Waschschritten angewendet. Vor Reaktivierung der Zellen wurden die Zellen gezählt (Neubauer-Zellkammer). Das Einfrieren von Zellen begann analog zum Splitten von Zellen, lediglich wurde das Pellet nach Zentrifugierung mit einer 10-prozentigen DMSO-Lösung in FCS resuspendiert, in ein Cryo-Vial gegeben und rasch bei -80°C eingefroren.

Für einige der Versuche wurden die Zellen vor oder während des Experiments mit Zytokinen, Chemokinen oder anderen Substanzen stimuliert. Die in der Materialliste aufgeführten Chemokine waren in *Aqua ad iniectabilia* oder DMSO gelöst. Da sich DMSO nur schlecht in wässrigen Medien löst, wurde es mit Medium vorgemischt. Die verwendeten Konzentrationen richteten sich nach den vom Hersteller angegebenen EC₅₀ (halbmaximale Enzymgeschwindigkeit), nach Angaben in Literatur sowie eigenen Erfahrungen. Zytokine wurden in Konzentrationen zwischen 0.01-100ng/ml getestet, Nutlin und Sulforaphan in Konzentrationen zwischen 0.1-20µM.

2.2.2 Scratch Assay

Der *scratch assay* ist eine Methode zur Erfassung der Wundheilung *in vitro*, und beinhaltet Proliferation und Migration [249]. Es wird die Wundheilung eines *monolayers* über einen Zeitraum von 24 Stunden am Mikroskop beobachtet. Vorher wurden die Well-Platten mit Markierungen versehen (Abb. 15-16). Zur Durchführung wurden primäre TEC der Passage 1 in 6- oder 12-Well Platten kultiviert. Die Kultur erfolgte hierbei unter 2- statt 10-prozentigem FCS-Einfluss, um die Zellen weniger stark proliferieren zu lassen. Eventuelle Stimulantien wurden mit einer Inkubationszeit von 4 Stunden vor dem *scratch* hinzugegeben. Der *scratch* wurde mithilfe einer 1ml-Pipettenspitze durchgeführt. Direkt nach Durchführung des *scratches* wurden die Fotos für den Zeitpunkt „0 Stunden“ gemacht. Sie dienten als jeweilige Referenz. Danach wurden die Platten im Inkubator für 24 Stunden gelagert und nur für die Fotoaufnahmen „8/12/16/18/22/24 Stunden“ herausgenommen. Die Auswertung des Assays erfolgte per Analyse der Wundgrößen am Computer. Hierzu wurde im Programm

Photoshop CS5 Extended ® unter dem Menüpunkt „Messung“ für jedes einzelne Foto die Wundgröße bestimmt und in Relation zur Anfangsgröße der Wunde gestellt (Abb. 17).

2.2.3 MTS-Proliferationsassay

Der Proliferationsassay ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Anzahl proliferierender Zellen. Mit dem Kit von Promega® kann er direkt in der Kulturplatte vorgenommen werden. Die Methode basiert auf der Reduktion eines Moleküls (MTS) durch intrazelluläres NADH/NADPH in einen farbigen Metaboliten (Formazan). Die Intensität der Farbe im Kulturgefäß repräsentiert die Anzahl an proliferierenden Zellen und kann mithilfe eines ELISA-Readers gemessen werden [250]. Die Zellen wurden für 24 Stunden vor Testbeginn in FCS-freien Medium gehalten. 15000 Zellen pro Well wurden mit 20µl Testreagenz, und fakultativ einem Zytokin inkubiert. Nach 4 Stunden Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 490nm Wellenlänge im ELISA-Reader gemessen.

2.2.4 Quantifizierung des oxidativen Stresses mittels TBARS-Assay

Der TBARS-Assay erlaubt die Quantifizierung des Stoffes Malondialdehyd (MDA) aus Organ-, Zell-, Plasma- oder Urinproben, welcher unter oxidativen Bedingungen verstärkt gebildet wird. MDA ist ein Nebenprodukt bei der Entstehung von hochreaktiven Fettsäure-Hydroperoxiden, welche durch reaktive Sauerstoffradikale getriggert ist. Der Assay macht sich eine Reaktion zwischen MDA mit Thiobarbitalsäure (TBA) zunutze, welche im sauren Milieu unter hohen Temperaturen (90-100°C) stattfindet. Die Konzentration des MDA-TBA-Endprodukts lässt sich unter Messung der Absorption bei 530-540nm kolorimetrisch bestimmen.

2.2.5 Tierexperimente

Für sämtliche Tierexperiment wurden Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL6 verwendet. Für die Isolation primärer Zellen wurden die Tiere im Alter zwischen 2 und 10 Wochen geopfert. Die Tierhaltung befand sich in einem von der Regierung von Oberbayern geprüften und abgenommenen Raum im Labortrakt. Die Mäuse waren einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden ausgesetzt und hatten unbeschränkt Zugang zu frischem Wasser

und Futter. In jedem der Käfige vom Typ Makrolone IIR wurden maximal 5 Tiere untergebracht. Den Tieren wurden nach Narkotisierung und zervikaler Dislokation beide Nieren entnommen, Blut sowie Urin abgenommen. Das Nierenparenchym wurde je nach Anforderung in RNAlater® zur RNA-Isolation, in Formaldehyd zur Histologie oder in flüssigem Stickstoff zur Proteinisolation gegeben.

2.2.6 Histologie

Zur immunhistochemischen Untersuchung von Zellen in Kultur wurden gekammerte Objektträger als Kulturschale verwendet (*chamber slides*). Hierbei wuchsen die Zellen direkt auf dem späteren Objektträger. Die Zellen wurden in reinem Aceton bei 4°C für 10 Minuten fixiert. Danach konnten die Objektträger bei 4°C bis zur Färbung aufbewahrt werden. Für die Untersuchung der frischen Tubuluszellisolate aus Mäusen benutzten wir den sogenannten *cytospin*. Hierbei wurden die Zellsuspensionen in einer speziellen Zentrifuge mithilfe einer speziellen Vorrichtung auf die Objektträger gepresst. Danach erfolgte die Fixierung in Aceton wie oben beschrieben.

Die in Formaldehyd eingelegte Histologie-Kassette wurde in einen Paraffin-Block eingebettet. Mithilfe eines Mikrotoms wurden 2µm dünne Schnitte angefertigt. Für die histologische Beurteilung der Nieren verwendeten wir danach die sog. periodic acid Schiff (PAS) Färbung. Die Durchführung der Färbung erfolgte nach Herstellerangaben. Für immunhistochemische Färbungen wurden die Schnitte nach der Entparaffinierung noch weiter vorbereitet. Nacheinander wurden im Wechsel mit Waschschritten mit PBS oder Abkochen noch H₂O₂ (20 Minuten), Demaskierungslösung sowie Avidin und Biotin (jeweils 15 Minuten) auf die Objektträger gegeben. Danach folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper.

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

Die Isolation von RNA erfolgte entweder aus in RNAlater® gelagerten Organsegmenten, oder aus Zellen der Zellkultur (Pure Link RNAmuni® Kits von ambion). Die Verwendung des RNA-Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurden die Proben gemäß ihrer RNA-Konzentration verdünnt, sodass sich in allen Proben die gleiche Menge an RNA befand (üblicherweise 1 oder 2µg). Mit einer

Mischung aus Pufferlösung (5X F_s Buffer 8µl), DTT (2µl), Desoxynukleotiden (dNTP 25mM 0,8µl), linearem Acrylamid (0,5µl), Hexanukleotiden (0,43µl), Wasser (ddH₂O 6,4µl), RNAase-Inhibitor (RNAsin 1µl) sowie dem Enzym Reverse Transkriptase (Superscript II 0,87µl) wurden die Proben bei 42°C für 90min umgeschrieben. Eine Inkubation für 5min bei 85°C stand am Schluss der Umschreibung. Für Negativ-Kontrollen wurde ein Mix ohne das Reverse Transkriptase-Enzym hergestellt.

Zur Quantifizierung der Expression eines bestimmten Proteins wurde eine RT-PCR durchgeführt. Wir verwendeten den Roche Light Cycler sowie ein Protokoll mit SYBRGreen als Fluoreszenzmedium. Bei einem CT-Wert (*cycle threshold*) von über 35 wurde davon ausgegangen, dass das jeweilige Gen nicht exprimiert wurde. Die verwendeten Primer mit dazugehörigen Sequenzen sind im Material-Teil aufgelistet (siehe Abschnitt 2.1.8). Als Kontroll-Gen (*housekeeping gene*) wurde 18S-Ribosomale RNA verwendet. Negative Kontrollen wurden mittels Messung von ddH₂O durchgeführt. Alle Versuche wurden nach den MIQE-Richtlinien durchgeführt [251].

2.2.8 Immunologische Methoden

Durchflusszytometrie

Die Analyse der Proben wurde auf dem FACSCalibur®-Gerät sowie der CellQuest-Software (beides Benson & Dicktinson Pharmingen, USA) durchgeführt. Wir verwendeten die Durchflusszytometrie zur erweiterten Charakterisierung des frischen TECs. Neben normalen Antikörpern verwendeten wir das ALDEFLOUR-Kit zur Suche nach Stammzellen. Das Versuchs-Kit dient der Bestimmung derjenigen Zellfraktion, welche das zytosomale Enzym Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) in großen Mengen exprimieren [252]. Stamm- oder Vorläuferzellen vieler Organe exprimieren diesen Enzym in größeren Mengen als ausdifferenzierte Zellen [253, 254]. Das Kit basiert auf einem Substrat der ALDH, welches durch enzymalen Umbau grün fluoreszierendes Licht im Bereich 520-540nm erzeugt (Ausgangs-Substrat: BODIPY-Aminoacetaldehyddiethylacetal (BAAA-DA) → BODIPY-Aminoacetat (BAA)). Die Zellen werden mit dem Ausgangssubstrat für 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Negativkontrolle werden 5µl DEAB (Diethylaminobenzylaldehyd) hinzugefügt, welches den Reaktionsschritt der ALDH hemmt. Nach Inkubation wird die Fluoreszenz der Zellsuspensionen im Durchflusszytometer gemessen. ALDH-hochpositive

Zellen erscheinen bei der Messung als eigene Zellpopulation, wenn man im Diagramm Seitwärtsstreuung (*side scatter*) gegen Fluoreszenz aufträgt.

Western Blot

Der Western Blot ist eine immunologische Methode zum semiquantitativen Nachweis von Proteinen. Die Inhaltsstoffe der Pufferlösungen sind im Materialteil aufgelistet. Das Polyacrylamid-Gel wurde in der Plexiglas-Kammer mit dem Puffer gemischt. Das gesamte Gel (Sammel- und Trenngel) wurde über Nacht bei 4°C ausgehärtet. Die Proteinproben wurden unter Zugabe eines Lade-Puffers (*Laemmli buffer* [255]) in einer Konzentration von 2µg/µl bei 95°C degradiert. 20µl des Proteingemischs wurden in die Aussparungen des Sammelgels gebracht. Unter Anlagen von zunächst 60V für eine Stunde, sowie 140V für weitere zwei Stunden durchliefen die Proteine das Gel. Danach wurde die Gel-Kammer geöffnet und das Gel vorsichtig auf eine in Transfer-Puffer getränkte Immobilon-P-Membran gelegt. Durch Zusammendrücken und mittels Spannung (15V, 1 Stunde) wurden die Proteine auf die Membran übertragen. Die Membran wurde anschließend in einprozentiger Blockadelösung geblockt. Hiernach wurden die in TBS gelösten Primärantikörper auf die Membran gegeben. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS wurde die Membran mit Sekundärantikörper inkubiert. Hiernach wurde erneut mit TBS gewaschen. Unter Zugabe der Detektionsreagenzien A und B wurde die durch die enzymatische Chemilumineszenzreaktion (ECL) hervorgerufene Strahlung gemessen.

2.2.9 Statistische Analyse

Sämtliche Ergebnisse zeigen das mittlere Ergebnis aus einer Reihe von unabhängigen Experimenten. Die Fehlerindikatoren geben Auskunft über das Maß der statistischen Streuung. Statistische Analysen (t-test, ANOVA) wurden mithilfe der Prism©-Software durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein Ergebnis ab einem p-Wert von $p < 0.05$ angesehen (weitere Abstufung: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$).

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der primären Tubuluszellkultur

Nach der Isolation konnten wir die Tubulusfragmente morphologisch klar als solche identifizieren. Die frühen aus den Fragmenten entstandenen Kolonien wiesen adhärente, Kuboid-förmige Epithelzellen auf. Nach mehreren Tagen entwickelte sich hieraus ein Kopfsteinpflaster-artiger Epithel-*Monolayer* [256] (Abbildung 13). Um die Zellen weiter zu charakterisieren, untersuchten wir sie mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf die Expression typisch epithelialer und mesenchymaler Marker. In Abbildung 11A erkennt man die deutliche Positivität der Zellen für epitheliale Marker wie E-Cadherin und Cytokeratin 7. Mittels qRT-PCR untersuchten wir die Expression des Proteins FXYD2, einem Ionenkanalprotein des distalen Tubulus (Abb. 11B). Abschließend lässt sich sagen, dass die Methode die Isolation eines Zellgemischs aller Tubulusabschnitte und dem Sammelrohr erlaubt. Wir wollten eine Verunreinigung der Kultur mit Fibroblasten oder anderen mesenchymalen Zellen ausschließen. Unter Berücksichtigung der Theorie, dass die Zellen verschiedene Expressionsprofile zu verschiedenen Zeitpunkten aufweisen könnten, wurden Proben verschiedener Zeitpunkte verwendet. Abbildung 12 zeigt die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin an Tag 2. An Tag 5 färbt ein geringerer Anteil der Zellen für Vimentin positiv als an Tag 2. Die frühe Koexpression von Vimentin und E-Cadherin (nicht gezeigt) lässt sich durch zwei Mechanismen erklären. Erstens durch die Präsenz von Progenitorzellen, welche durch die Arbeit von Paola Romagnani charakterisiert und beschrieben worden sind [205]. Diese Zellen und deren direkten Abkömmlinge weisen einen *intermediate phenotype* auf. Zweitens kommt es bei differenzierten Tubuluszellen zu einer Dedifferenzierung nach akuter Schädigung, um die Wundheilung durch überlebende Zellen zu beschleunigen. Dieser Dedifferenzierung folgt eine unmittelbare Redifferenzierung nach erfolgreicher Wundheilung, wie durch die Arbeiten von Humphreys und Bonventre gezeigt [164, 257].

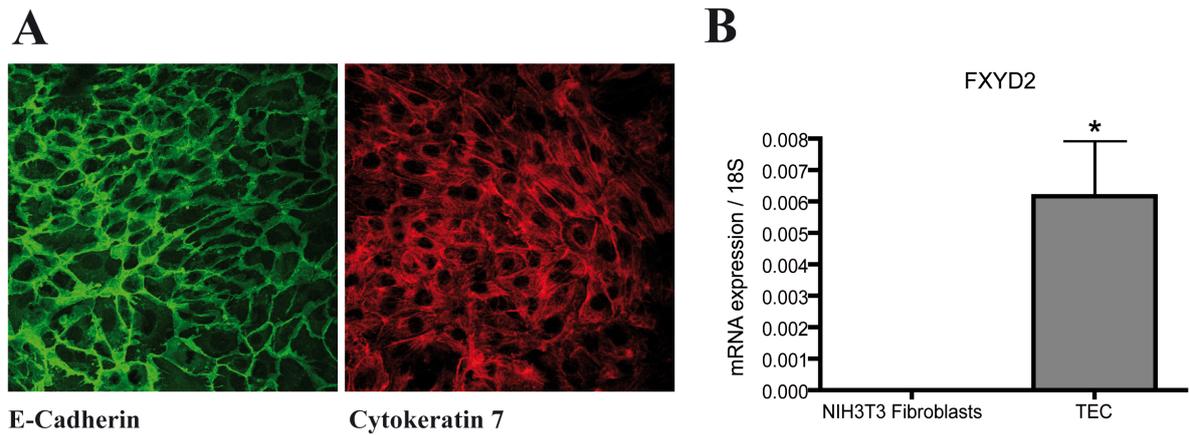


Abbildung 11: Immunfluoreszenz-Mikroskopie und qRT-PCR der Tubuluszellen. **A:** Immunfluoreszenz-Mikroskopie von konfluenten Tubulusepithelzellen an Tag 5 nach der Isolation. Sowohl das Zelladhärenzprotein E-Cadherin, als auch das Zytoskelettprotein Cytokeratin 7 werden in großer Menge von den Zellen exprimiert. **B:** qRT-PCR für das Ionenkanalprotein FXD2, welches vom distalen Tubulus exprimiert wird. Fibroblasten (links) exprimieren das Protein überhaupt nicht, wohingegen die isolierten Tubuluszellen das Protein in größerer Menge exprimieren.

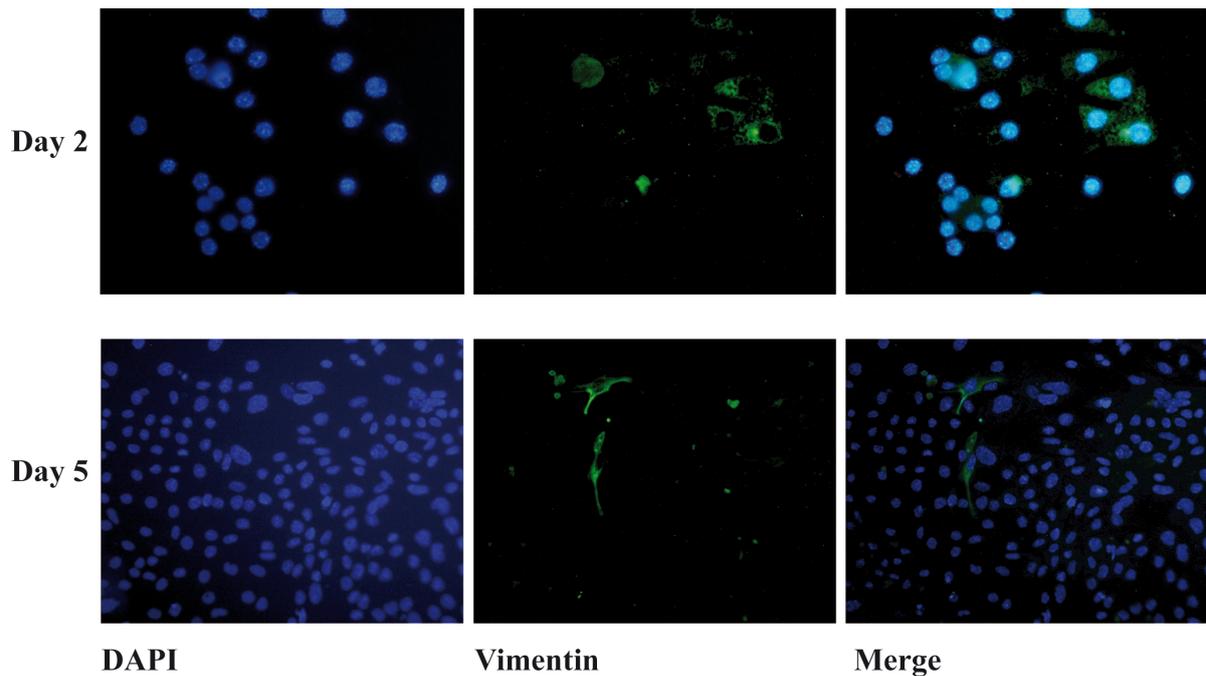


Abbildung 12: Reinheit der Tubulzellkultur. Färbung für Vimentin und DAPI, die DAPI-Färbung lässt die Zellkerne aller Zellen blau erscheinen. Im fusionierten Bild rechts zeigt sich eine annähernd Vimentin-freie, reine Zellkultur von TEC. **Day 2:** Es zeigt sich eine schwache Expression des mesenchymalen Markers Vimentin in allen frischen Kolonien. Vergr. 800x. **Day 5:** Das schwache Vimentin-Signal aller Zellen ist nicht mehr nachweisbar, die Zellen exprimieren nur noch epitheliale Marker (vgl. Abb. 11). Einzelne Fibroblasten haben sich zwischen den Tubuluszellen etabliert. Vergr. 400x.

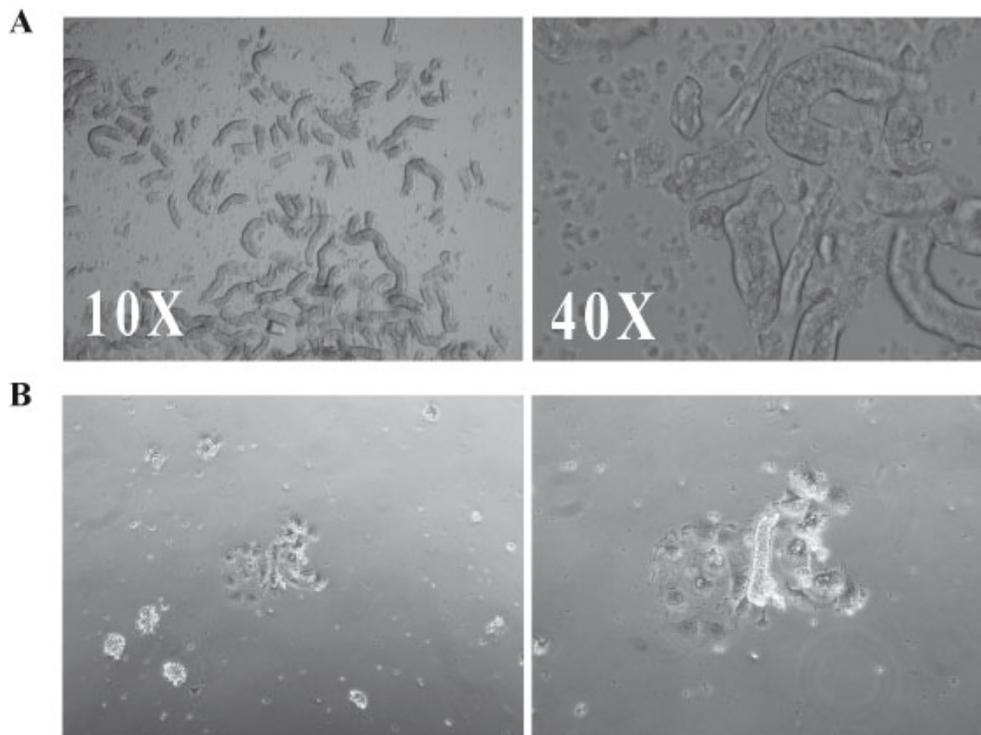


Abbildung 13: Frisch isolierte Tubulussegmente und Kolonien. **A:** Phasenkontrast-Mikroskopie frischer isolierter Tubulusfragmente in 10- und 40-facher Vergrößerung. **B:** Phasenkontrast-Mikroskopie einer neu herangewachsenen Kolonie von Tubulusepithelzellen am Tag 2 in 2 Vergrößerungen. Im Zentrum ein Tubulusfragment, aus dem die Kolonie hervorgegangen ist.

3.2 Die Isolation der Zellen imitiert akute Schädigung

Das Herausnehmen, die Zerkleinerung und das Sieben der verdauten Organe führen über mehrere Stunden hinweg zu einer Zunahme des oxidativen, ischämischen und mechanischen Stresses, dem die Tubuluszellen ausgesetzt sind. Nur manche der Fragmente schaffen es in Kultur, sich an der Platte anzuhafte und neue Kolonien von Tubuluszellen zu gründen (vgl. Abbildung 13). Fragmente und Zellen, welche sich auch nach 48 Stunden noch nicht an die Platte angehaftet hatten, wurden mehrmals in einer neuen Platte erneut ausplattiert, jedoch ohne Erfolg. Es ist anzunehmen, dass alle dieser Zellen die Isolationsprozedur nicht überstanden hatten. Grund dafür ist die signifikante Zunahme des oxidativen Stresses während der Isolation, wie in Abbildung 14A gezeigt. Die verhältnismäßig kleine absolute Veränderung der MDA-Konzentration in unserem TBARS-Experiment spiegelt nicht das Maß der biologischen Folgen für die Zellen durch diese Veränderung wieder. Die Zunahme der reaktiven Sauerstoffradikale führt dazu, dass die Abwehrmechanismen der Zellen vollständig ausgelastet sind. Die zusätzliche Belastung durch die Kollagenase-Verdauung sowie der mechanischen Reizung beim Sieben führen zum Tod

der Zellen. MDA selbst, in unserem Assay nur als Surrogatparameter für das Ausmaß des oxidativen Stresses verwendet, ist ein toxischer Metabolit für die Zellen. Er fördert die Entstehung sogenannter *advanced lipoxidation end-products* (ALE), welche die Zellen an zusätzlich schädigen [124] Daher reicht eine kleine Veränderung der MDA-Konzentration aus, um fatale Konsequenzen für die Zellen hervorzurufen.

Diejenigen Zellen, welche die Prozedur überleben, bilden anschließend durch rasche Zellteilung und Migration einen Epithel-*monolayer* aus. Dieser Vorgang lässt sich in einem Modell als Heilungsphase ansehen. Wir wollten herausfinden, ob neben den ausdifferenzierten Tubuluszellen auch die Progenitorzellen eine Rolle spielen [205]. Diese Zellen lassen sich durch eine starke Expression des Enzyms Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH) charakterisieren. Wir führten ein Experiment zur Quantifizierung der ALDH_{High}-Zellpopulation durch. Die isolierten Tubuluszellen wurden hierzu mit dem ALDEFLUOR-Assay im Durchflusszytometer analysiert. Wir konnten eine kleine Population dieser ALDH_{High}-Zellen, rund 2%, unter den isolierten Tubuluszellen finden (Abbildung 14B). In unserem neuen Modell für akute Tubulus-Schädigung und Heilung sind also neben den überlebenden ausdifferenzierten Epithelzellen auch Vorläuferzellen an der Heilungsreaktion beteiligt. Hohe ALDH-Aktivität macht die Vorläuferzellen zudem widerstandsfähiger gegen *advanced lipoxidation products*, da sie den Abbau von MDA beschleunigt.

Wir wollten herausfinden, ob sich aus dem Modell ein standardisierter Assay etablieren ließe. Wir verglichen Tubuluszellen von jeweils 2 und 8 Wochen alten Wildtyp C57BL6-Mäusen. Wir vermuteten, dass junge Mäuse widerstandsfähigere Zellen besäßen und somit eine höhere Überlebensrate nach akuter Schädigung aufwiesen. Tubuluszellen der 2 Wochen alten Mäuse zeigten eine signifikant höhere Überlebensrate nach akuter Schädigung durch die Isolation (Abbildung 14C). Wir vermuteten, dass eine größere Progenitorzell-Population für das bessere Überleben verantwortlich sein könnte. Im ALDEFLUOR®-Assay mit 2 und 8 Wochen alten Mäusen zeigten die jüngeren Mäuse jedoch keine signifikant größere Population von Progenitorzellen (nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur ein geringer Prozentsatz von stressresistenten Tubuluszellen den erhöhten oxidativen, mechanischen und ischämischen Stress überlebt. Die Tubulusepithelzellen wachsen anschließend aus sowohl überlebenden ausdifferenzierten Tubuluszellen, wie auch Tubulus-Progenitorzellen wieder heran. Zellen, welche aufgrund ihres Alters oder ihres Expressionsprofils eine erhöhte Stressresistenz aufweisen, haben eine erhöhte Überlebenschance nach akuter Schädigung.

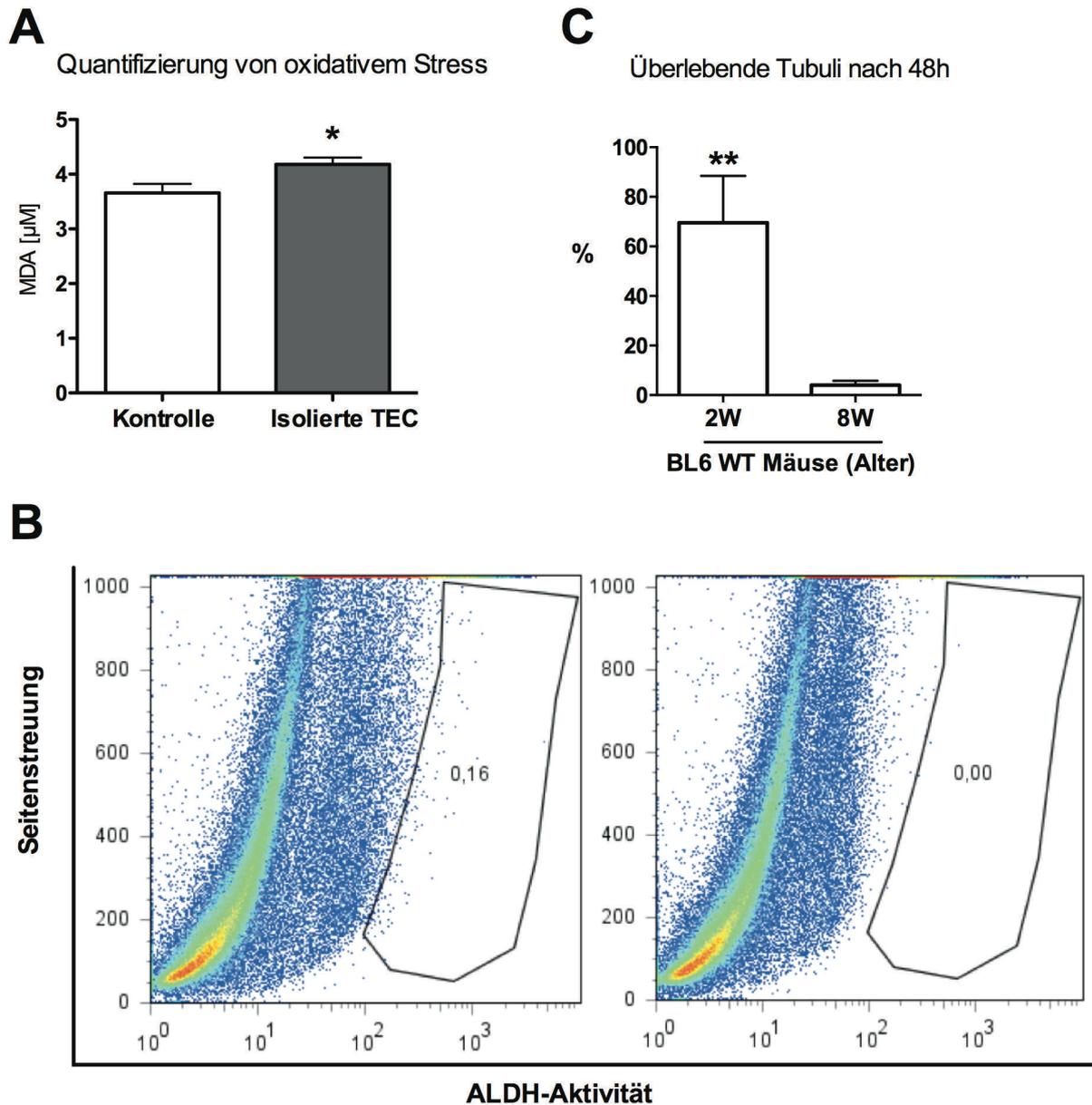


Abbildung 14: Entwicklung eines neuen Regenerationsassays für Tubulusepithelzellen. **A:** Quantifizierung des oxidativen Stresses anhand des Surrogatparameters MDA-Konzentration. 5 Tage lang unter Normalbedingungen kultivierte, primäre Tubuluszellen (Kontrolle) wurden verglichen mit frisch isolierten Tubuluszellen (8 Wochen alte Wildtyp-Mäuse). Die Isolierung erhöht die MDA-Konzentration signifikant, was einer Zunahme der ROS während der Isolation bedeutet ($n=4$, $p<0.05$). **B:** Suche nach ALDH-hochpositiven Zellen ($\text{ALDH}_{\text{High}}$) unter den isolierten Tubuli im Durchflusszytometer. Das Diagramm zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus einer Reihe von Experimenten (3 Mäuse). Das linke Diagramm zeigt das Ergebnis nach ungehemmter Fluoreszenzreaktion, die Zellen im markierten Areal repräsentieren die $\text{ALDH}_{\text{High}}$ -Population. $1,88\% \pm 0,55$ der isolierten Tubuluszellen gehören dieser Population an. Das rechte Diagramm zeigt eine Negativ-Kontrolle unter Verwendung des ALDH-Inhibitors DEAB. **C:** Überleben der Tubuluszellen nach akuter Schädigung zum Zeitpunkt 48 Stunden (vgl. Methodenteil zur Erklärung der Auswertung). Verglichen wurden 2 Wochen alte Mäuse mit 8 Wochen alten Mäusen. Tubuluszellen aus 2 Wochen alten Mäusen zeigen ein signifikant besseres Überleben im Vergleich mit Zellen aus älteren Tieren ($n=4$, $p<0.01$).

3.3 Etablierung eines für *compound screening*-geeigneten Assays

Nachdem wir die herkömmliche Methode zur Isolation der primären Tubuluszellen als eine geeignete Simulation für akute Tubulusschädigung identifizieren konnten, planten wir die Etablierung eines Assays, mit dem sich große Reihentestungen durchführen ließen. Der Regenerationsassay setzt sich wie folgt zusammen: 1. Schritt Zellüberleben, 2. Schritt Regeneratives Wachstum, sowie 3. Schritt *scratch assay*. An 4. Stelle des Modells stehen die *in vivo* Versuche. Im Gegensatz zu anderen Methoden integriert der Regenerations-Assay die Isolation primärer Zellen selbst in das Experiment. Hauptaufgabe war die Entwicklung eines standardisierten Auswertungsverfahrens, um Überleben und die anschließende Regeneration messen zu können. Auch bei diesem Assay stand zu Beginn die Vorbereitung der Kulturplatten (Abb. 16).

Die primären Tubuluszellen wurden nach der beschriebenen Methode isoliert und eine gleiche Anzahl von Tubulusfragmenten in jedes der Wells gegeben. In Gruppen à 4 Wells wurden den Kulturmedien eine zu testende Substanz zugefügt, was in Kombination mit den 4 Testfeldern pro Well eine Gruppengröße von $n=16$ erlaubte. Beide Nieren wurden nach Ent-

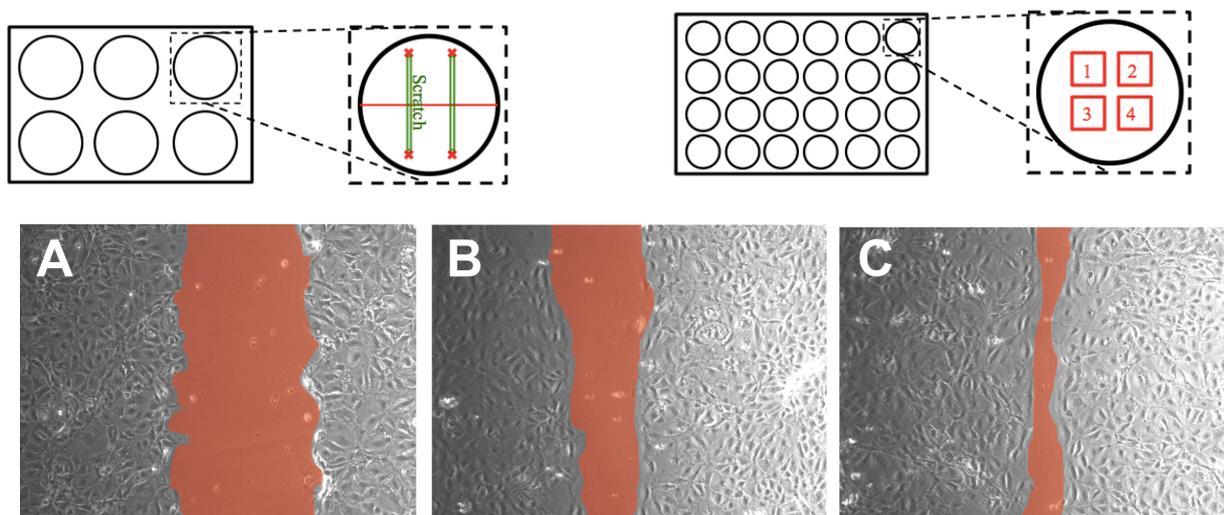


Abbildung 15 (oben links): Markierung der Platte und Skizzierung des *Scratch Assay* Abgebildet ist eine 6-Well-Platte mit Vergrößerung eines der Wells. Die Markierungen sind in rot gehalten, der später zu erfolgende *scratch* erfolgt senkrecht. Hieraus ergibt sich später eine Anzahl von 4 auszuwertenden Scratches pro Well: jeweils der Abschnitt über sowie unter dem waagerechten roten Strich.

Abbildung 16 (oben rechts): Markierung der Platte für den *In Vitro* Regenerations-Assay Abgebildet ist eine 24-Well-Platte. Auf die Unterseite jedes Wells wurden mithilfe einer Schablone 4 Quadrate gezeichnet. Der Innendurchmesser eines Quadrats entspricht genau der Größe eines am Mikroskop aufgenommenen Fotos

Abbildung 17 (unten): Beispiel eines *Scratch Assays*. Phasen-Kontrast-Mikroskopie während der Auswertungsphase des *Scratch Assay*. Die rot markierte Fläche entspricht der Restgröße des Wundspalts. A: 12h. B: 16h. C: 24h.

fernung der Kapsel und vor der Zerkleinerung mit einer Präzisionswaage gewogen, um später auch bei unterschiedlich großen Mäusen eine standardisierte Verteilung der Tubulus-Fragmente auf die Wells-Platten zu gewährleisten. Die Verteilung folgte hierbei einer auf Erfahrungswerten beruhenden Verdünnungstabelle. Eine konventionelle Zählmethode, wie zum Beispiel die Benutzung einer Neubauer-Zählkammer, eignete sich für das Zählen der Tubulus-Fragmente aufgrund deren Größe nicht.

Teil 1: Zellüberleben: Einige der TEC-Segmente hefteten sich bis 48 Stunden nach Ausplattieren an die Platte an und formten Kolonien. Der Großteil der Tubuli konnte aufgrund zu großen Schadens keine neuen Kolonien bilden. Das Zellüberleben ergibt sich in unserem Assay aus dem Verhältnis zwischen der Anzahl der neu gebildeten Kolonien / Anzahl der ausgesäten Tubulusfragmente zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Ischämie (Beginn der Perfusion der Maus mit DPBS). Die Anzahl der Kolonien wurde anhand von digitalen Fotos bestimmt, welche zum Zeitpunkt 48 Stunden unter dem Phasenkontrast-Mikroskop aufgenommen wurden. Für jedes Well wurde der Durchschnitt aus 3 Fotos gebildet. (Abb. 18).

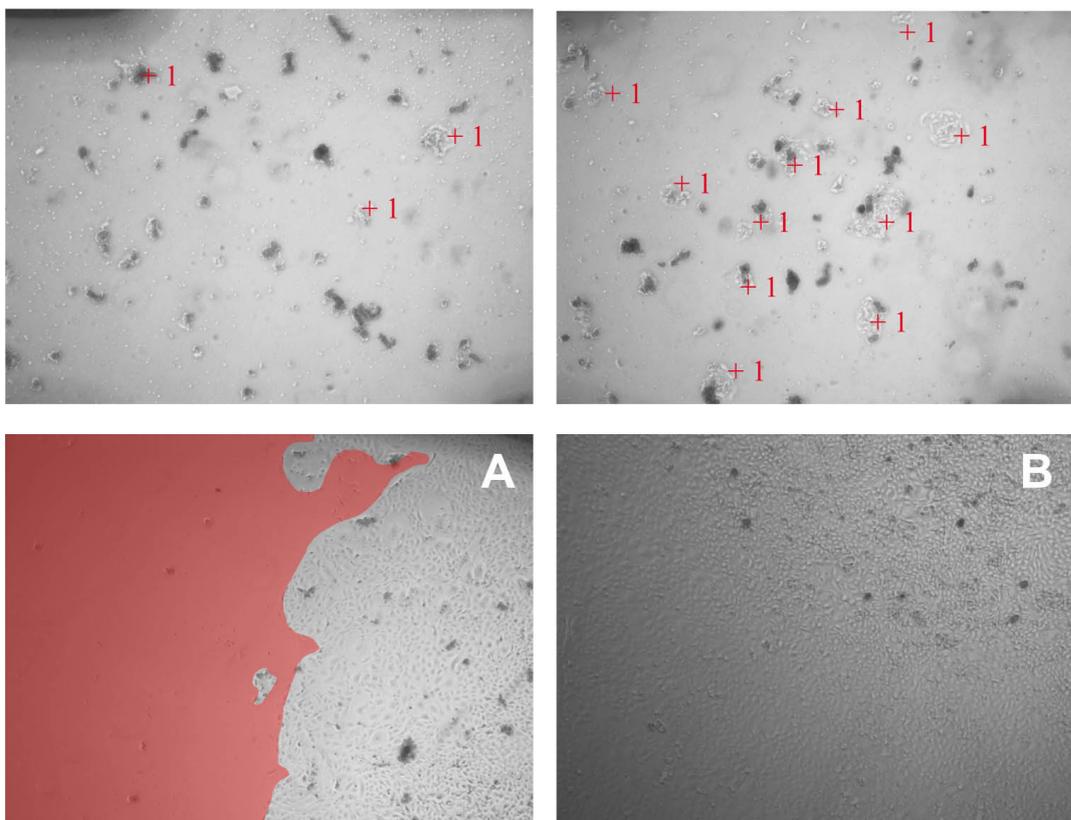


Abbildung 18 (oben): Auswertung des Überlebens am Mikroskop. Phasenkontrast-Mikroskopie 48 Stunden nach akuter Schädigung und Kultur. Auf der linken Seite sind 3 neue Kolonien sichtbar (z.B. Gruppe 1). Auf der rechten Seite hingegen sind deutlich mehr Kolonien sichtbar zum gleichen Zeitpunkt (z.B. Gruppe 18), was für ein verbessertes Überleben spricht.

Abbildung 19 (unten): Auswertung der Regeneration am Mikroskop. Phasenkontrast-Mikroskopie an Tag 5 nach Schädigung. Die rot schraffierte Fläche stellt die nicht bewucherte Fläche dar. Gruppe A hat im Vergleich zur Gruppe B ein geringeres regeneratives Wachstum gezeigt.

Teil 2: Regeneratives Wachstum: Über einen Zeitraum von 6 Tagen wurden im Abstand von 24 Stunden Digitalfotos von den 4 markierten Quadraten aufgenommen. Die Fotos wurden am Computer mithilfe Photoshop® ausgewertet, indem die von Zellen bedeckte Fläche des Fotos ausgemessen wurde (entspricht exakt der Größe des Innendurchmessers der Quadrate). Der erhaltene Absolutwert in Pixeln wurde in Prozent der Bildfläche umgewandelt (Abb. 19).

Teil 3: Scratch Assay: Durchführung gemäß der in Einleitung beschriebenen Methode.

3.4 Identifikation pro-regenerativer Moleküle im Screeningversuch

3.4.1 Der Nrf2-Agonist Sulforaphan verbessert Überleben und Regeneration

Die bisherigen Experimente sprechen dafür, dass die ROS-Resistenz für das Zellüberleben essentiell ist (vgl. Abb. 14A; [126, 127, 132]). Wir konnten unsere Methode – den Regenerationsassay in drei Stufen – zu einem zuverlässigen Assay etablieren, mit dem sich Reihentestungen vieler Moleküle vornehmen lassen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben fehlen Möglichkeiten zur Behandlung der akuten Tubulusnekrose (ATN) nach akutem Nierenversagen (ANV). Neben einer Reihe rekombinanter Wachstumsfaktoren und Zytokinen wollten wir den Einfluss von Sulforaphan (SRF), einem Nrf2-Agonisten, auf die Regeneration hin untersuchen (vgl. Einleitung). Ein weiterer Nrf2-Agonist, Bardoxolon, hatte in einer Studie zur Behandlung des chronischen Nierenversagens Erfolge gezeigt [258], gleichzeitig schienen die Auswirkungen einer Nrf2-Aktivierung nicht komplett erforscht [259]. Sulforaphan stabilisiert die intrazelluläre Aktivität von Nrf2, indem es seinen Abbau verhindert [260, 261]. Wir vermuteten, dass die mit SRF behandelten Zellen durch die verbesserten ROS-Abwehrmechanismen einen Überlebens- und Regenerationsvorteil nach akuter Schädigung aufweisen. Sulforaphan verbesserte die Zahl adhärenter Tubuli zum Zeitpunkt 48 Stunden bis zu 3,5-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 20). Keines der getesteten Zytokine und Chemokine konnte eine ähnliche Verbesserung hervorrufen. In der zweiten Phase unseres Screening-Versuchs beobachteten wir die regenerative Ausbreitung der Zellen. Konsistent zu den Ergebnissen im ersten Teil konnte Sulforaphan auch die Regeneration signifikant verbessern, jedoch erst in höherer Dosierung (Abbildung 21 und 22). Die Behandlung der isolierten Tubuluszellen mit SRF führte zusammenfassend zu einer signifikanten Verbesserung des Überlebens und der Regeneration nach akuter Schädigung.

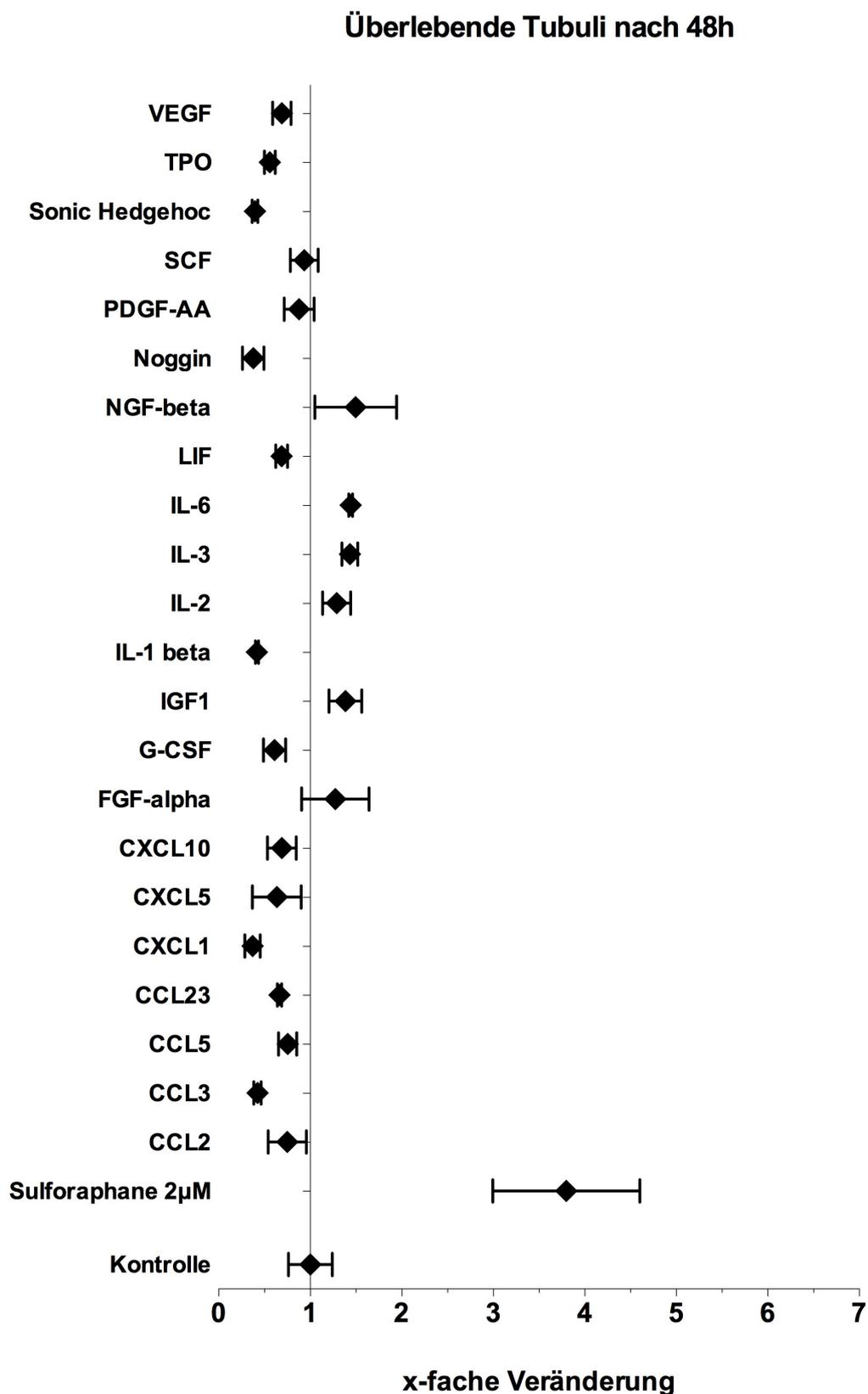


Abbildung 20: Sulforaphan im Regenerationsassay-Screeningexperiment. Von Wildtyp-Mäusen isolierte primäre Tubuluszellen wurden entweder mit H₂O bzw. DMSO (Kontrolle), oder mit rekombinanten Zytokinen bzw. Sulforaphan inkubiert. X-fache Veränderung des Überlebens der Tubulusepithelzellen 48 Stunden nach Schädigung. Sulforaphan steigert das Überleben rund 3,5-fach im Vergleich zur Kontrollgruppe. Kein anderer getesteter Kandidat war zu einer ähnlichen Steigerung in der Lage (n=12,) SRF 2µM: p=0.07, Mittelwert mit SEM.

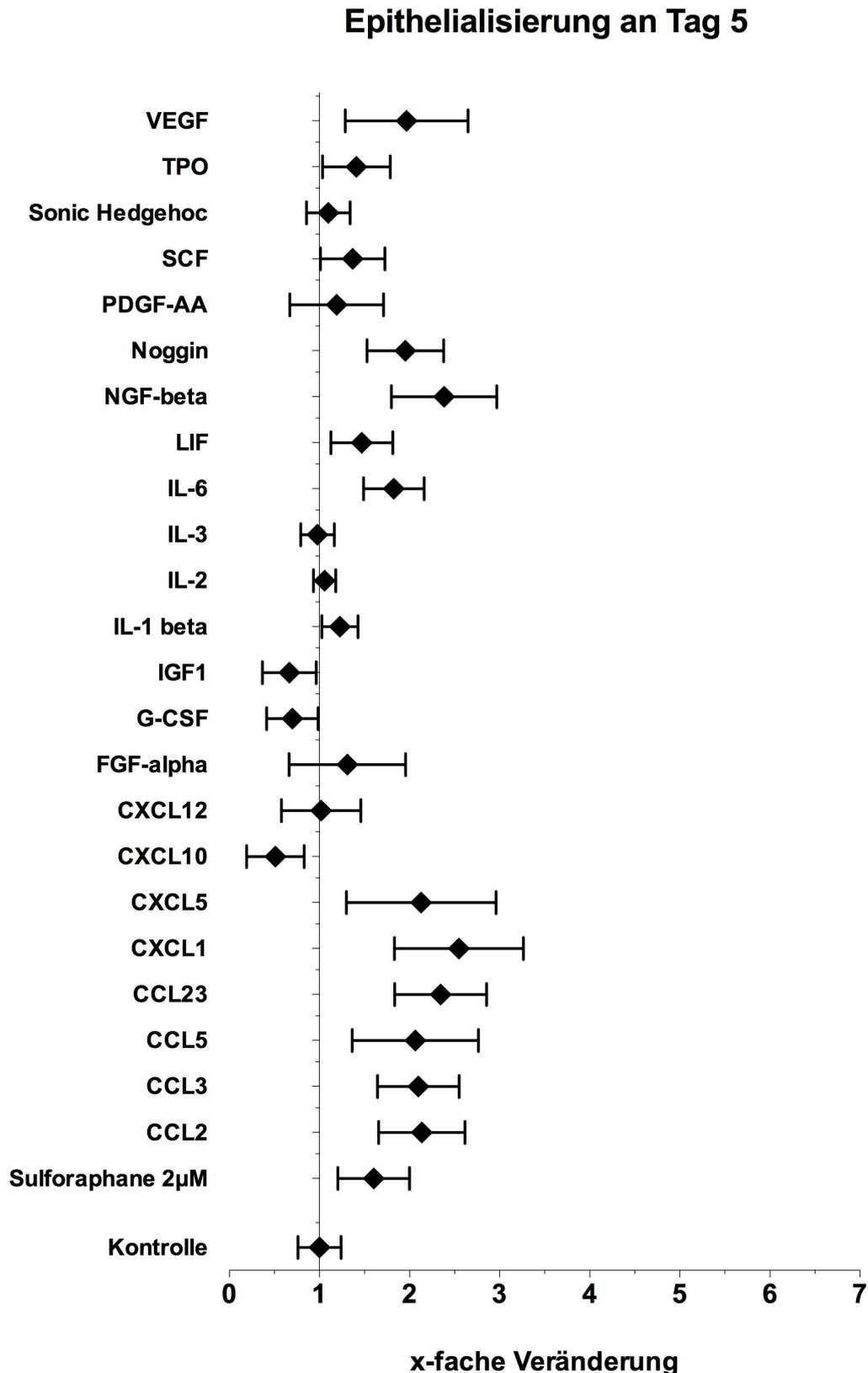


Abbildung 21: Sulforaphan im Regenerationsassay-Screeningexperiment. Von Wildtyp-Mäusen isolierte primäre Tubuluszellen wurden entweder mit H₂O bzw. DMSO (Kontrolle), oder mit rekombinanten Zytokinen bzw. Sulforaphan inkubiert. Regenerative Ausbreitung als Parameter für die Heilung nach akuter Schädigung zum Zeitpunkt Tag 5. Sulforaphan steigert die Regeneration der Tubulusepithelien in geringer Dosierung ohne Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=16, p>0.05), Mittelwert mit SEM.

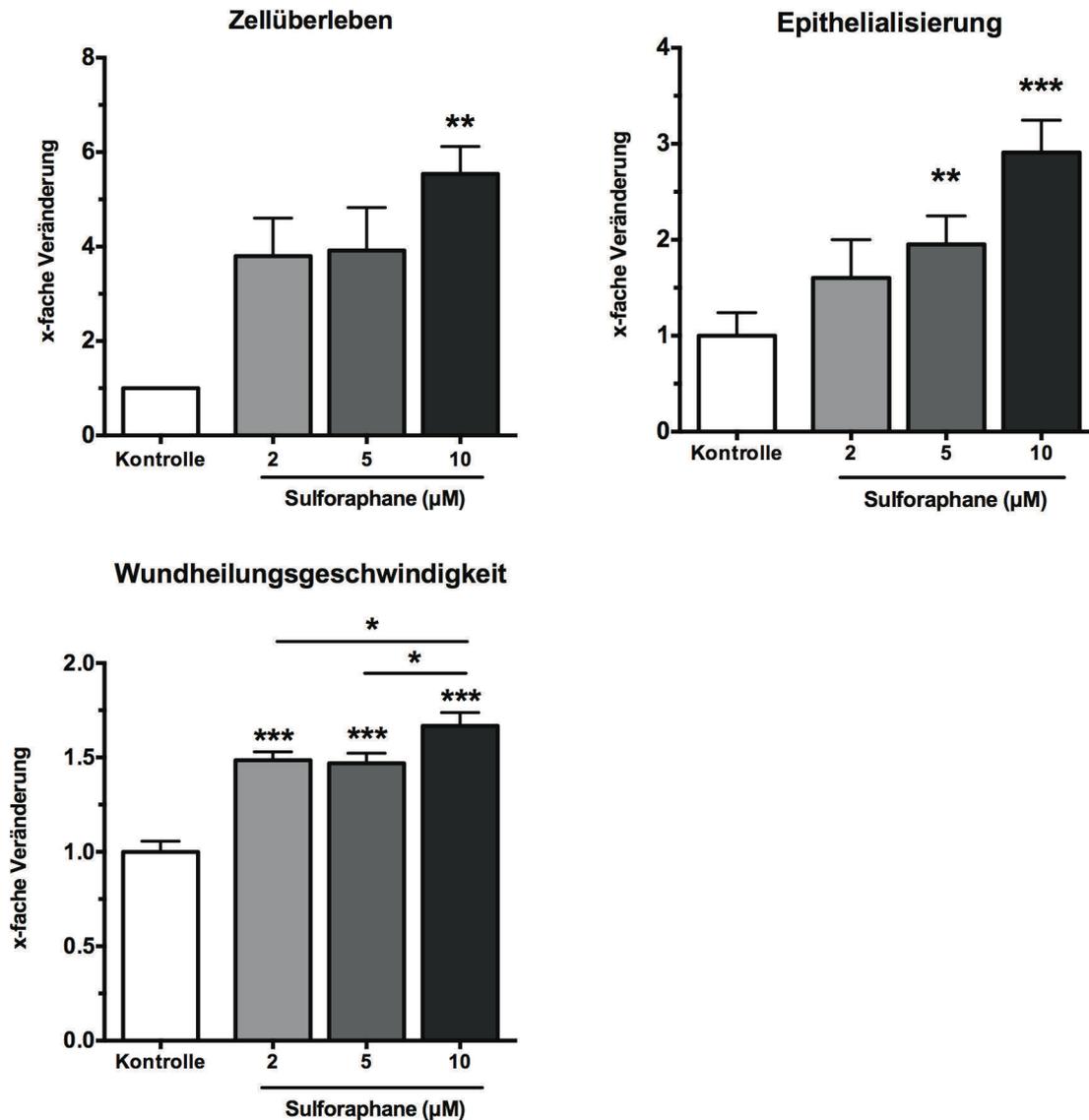


Abbildung 22: Dosisabhängige Wirkung von Sulforaphan im Regenerationsassay.

Oben: Beeinflussung des Zellüberlebens und der regenerativen Ausbreitung. SRF kann Überleben und Regeneration der TEC bei einer Konzentration von 10µM bzw. 5µM signifikant verbessern (**=p<0.01, ***=p>0.001), Mittelwert mit SEM.

Unten: Sulforaphan im Scratch Assay. Primäre Tubuluszellen von 8 Wochen alten C57BL6-Wildtyp-Mäusen wurden in 12-Well Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Die Stimulation mit verschiedenen Dosen von Sulforaphan+DMSO / DMSO (Kontrolle) wurde 2 Stunden vor *scratching* begonnen, die Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt seit 24 Stunden in FCS-freiem Medium. Anschließend erfolgte die mechanische Herbeiführung einer Wunde. Sulforaphan beschleunigt die Wundheilung signifikant (bis zu 1,6-fach) in dosisabhängiger Weise. n=12, p<0.001 bzw. p<0.05.

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus den ersten beiden Teilen führten wir als dritten Teil den *scratch assay* durch. Er untersucht die Migration und Proliferation von Epithelzellen nach Verletzung der konfluenten Zellen, für die epitheliale Wundheilung essentielle Programme [150]. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse des *Scratch Assays* mit Sulforaphan. Sulforaphan beschleunigte die Schließung der Wunde in dosisabhängiger Weise im Vergleich

zur Kontrollgruppe. In Zusammenschau der Ergebnisse aus den ersten drei Teilen des Regenerationsassays konnte durch Behandlung der Tubuluszellen mit Sulforaphan eine Verbesserung des Überlebens nach akuter Schädigung, der Regeneration sowie der Schließung einer mechanisch herbeigeführten Wunde erzielt werden.

3.4.2 Der pro-regenerative Effekt von Sulforaphan ist MDM2-vermittelt

Die Funktionen des Transkriptionsfaktors Nrf2 wurden in der Einleitung bereits erläutert. Sulforaphan interagiert mit Nrf2, indem es die Bindung zu seinem natürlichen Inhibitor Keap1 verhindert. Wir vermuteten, dass unter Verwendung von Sulforaphan in unseren Experimenten die Expression der Phase-2-Enzyme ebenfalls erhöht ist. Wir isolierten die RNA nach erfolgreicher Durchführung des *scratch assay*-Experiments. Die Expression von sowohl Nrf2 selbst, als auch der getesteten Phase-2-Enzyme war nach Stimulation mit Sulforaphan hochreguliert, wie in Abbildung 23A zu erkennen ist. Eine höhere Dosis Sulforaphan ging ebenfalls mit einer stärkeren Transskription der Enzyme einher. Daher lässt sich sagen, dass der Nrf2-Agonist Sulforaphan die Expression antioxidativer Faktoren in Tubulusepithelzellen verstärkt, was sich positiv auf deren Widerstandsfähigkeit auswirkt.

Ein Zusammenhang zwischen Nrf2 und dem Zellzyklusregulator murine-double-minute-2 (MDM2) wurde bereits von You et al. beschrieben [262]. Unter anderem fördert MDM2 als E3-Ubiquitin-Ligase Zellüberleben und Zellwachstum, indem es den Tumorsuppressor p53 inaktiviert, der normalerweise für die Einleitung der Apoptose sorgt [167, 263]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass MDM2 die Tubulus-Regeneration nach postischämischer, akuter Tubulusnekrose fördert [168]. Wir vermuteten einen Zusammenhang zwischen der pro-regenerativen Wirkung von Sulforaphan in unseren Experimenten und MDM2. Zunächst überprüften wir, ob die Expression von MDM2 durch die Stimulation mit Sulforaphan gesteigert sein würde. Auch hier verwendeten wir für die RNA-Isolation die im *scratch assay* verwendeten Tubuluszellen. MDM2-mRNA war nach Stimulation mit Sulforaphan im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abbildung 23B).

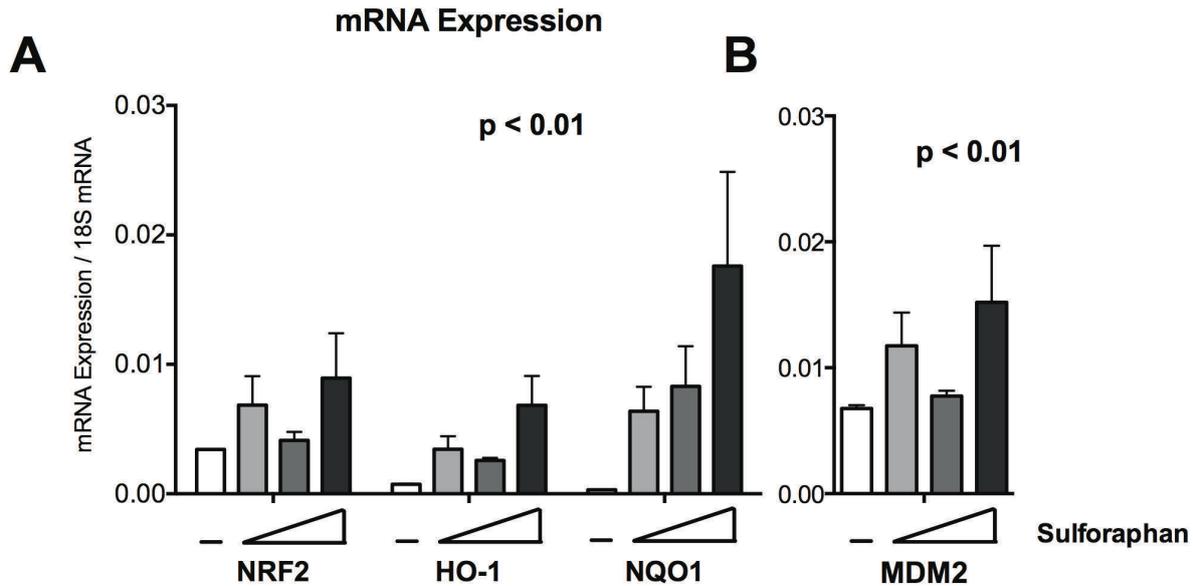


Abbildung 23: mRNA-Expression von Phase-2-Enzymen sowie MDM2 nach Sulforaphan-Stimulation. Primäre Tubuluszellen wurden entweder mit DMSO (Kontrolle) oder Sulforaphan+DMSO stimuliert. Die mRNA-Expression ist gezeigt als Verhältnis zur 18S-Expression (*housekeeping gene*). $n=12$, $p<0.01$. **A:** mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Nrf2 sowie einiger Phase-2-Enzyme zur Bekämpfung reaktiver Sauerstoffradikale. Die mRNA von Nrf2, Hämoxigenase-1 und NAD(P)H-Dehydrogenase-1 ist signifikant hochreguliert nach Sulforaphan-Stimulation. **B:** MDM2-mRNA-Expression nach Sulforaphan-Stimulation. Auch MDM2 wird signifikant hochreguliert, was ein Hinweis auf Beteiligung an der Regeneration sein könnte.

Wir vermuteten, dass der progenerative Effekt von SRF über MDM2 vermittelt wird. Für die Bestätigung dieser Hypothese mussten wir überprüfen, ob sich der MDM2-Effekt durch Verwendung eines Inhibitors verhindern ließe. Wir verwendeten den MDM2-Inhibitor Nutlin-3a. Nutlin-3a gehört zur Familie der Nutline, einer Reihe von niedermolekularen Substanzen (cis-Imidazoline), welche die Interaktion zwischen MDM2 und p53 verhindern. p53 wird so nicht mehr durch Ubiquitinierung zum Abbau markiert und übt seine proapoptotische Wirkung aus. Die Ergebnisse der Verwendung von Nutlin-3a sind in Abbildung 24 dargestellt. Die Costimulation von Sulforaphan zusammen mit Nutlin-3a führte zu einer Egalisierung des positiven Sulforaphan-Effekts auf Überleben und Regeneration der Tubuluszellen nach der Isolation (Abbildung 24A und B). Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren Überleben und regenerative Ausbreitung sogar leicht gesenkt. Daraus schließen wir, dass die Aktivität von MDM2 für ein adäquates Zellüberleben und eine adäquate Proliferation nach akuter Schädigung maßgeblich entscheidend ist. Durch Sulforaphan-Stimulation unserer primären Tubuluszellen konnten wir eine Steigerung der MDM2-Expression erreichen, was zu einer verbesserten Regeneration führt.

Abschließend untersuchten wir das Zusammenspiel zwischen Nrf2 und MDM2 sowie etwaige Auswirkungen einer MDM2-Blockade im *scratch assay*. Stimulation mit Nutlin-3a

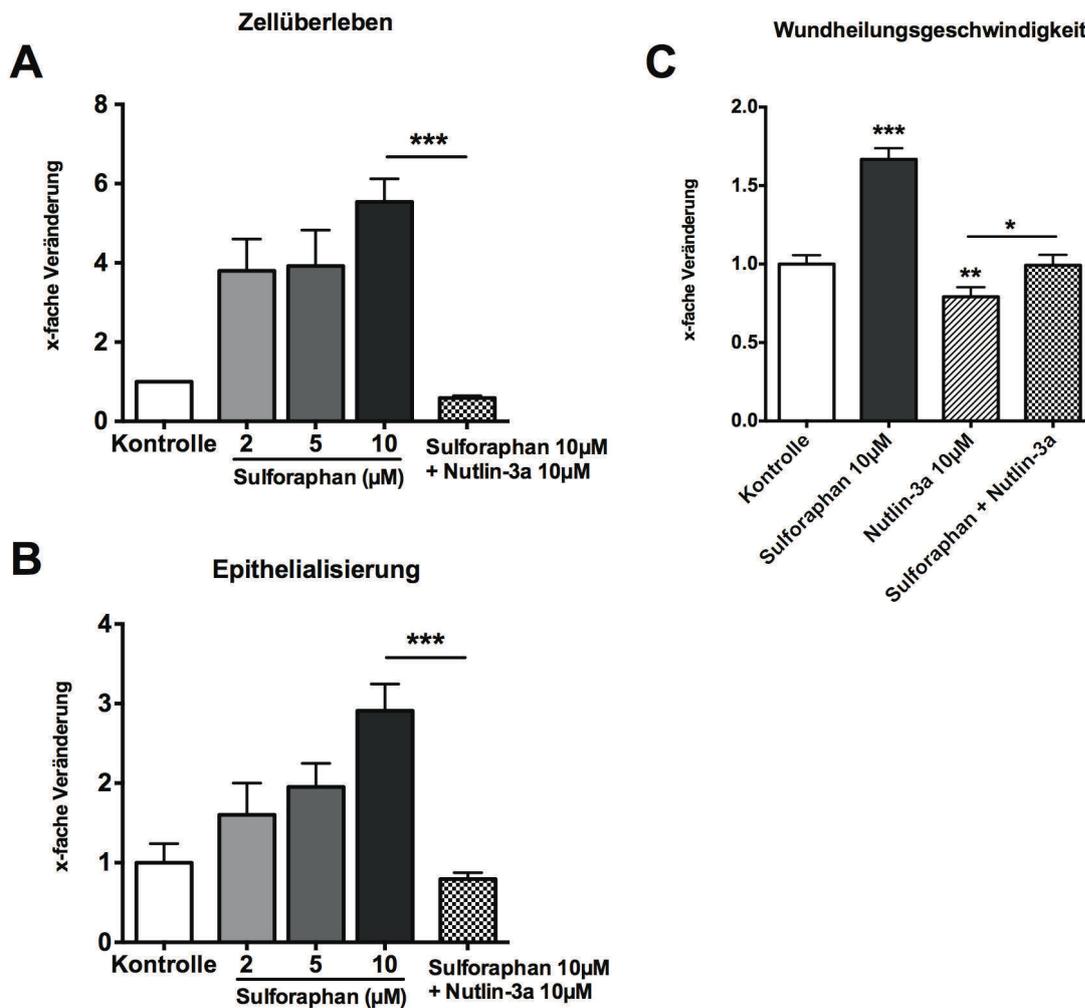


Abbildung 24: Regenerationsassay mit funktioneller Blockade von MDM2. A/B: Regenerationsassay mit primären murinen Tubulusepithelzellen. Co-Stimulation mit Sulforaphan und Nutlin-3a führt zu einer Egalisierung des positiven Sulforaphan-Effekts auf Überleben und Regeneration C: Primäre murine Tubulusepithelzellen wurden in 12-Well-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Einer 24-stündigen Fastperiode in FCS-freien Medium folgte die Stimulation mit DMSO (Kontrolle), Sulforaphan, Nutlin-3a oder Sulforaphan+Nutlin3a. Alleinige Stimulation der Zellen mit Nutlin-3a führt zu einer dramatischen Verschlechterung der Wundheilungskapazität, noch schlechter als die der Kontrollgruppe. Die darauffolgende Co-Stimulation mit Sulforaphan und Nutlin-3a kann den negativen Nutlin-Effekt ausgleichen. Es kommt zu einer signifikanten Beschleunigung der Wundheilung unter Sulforaphan alleine sowie bei Co-Stimulation mit Nutlin-3a (verglichen mit Nutlin-3a alleine). n=12, p<0.05/0.01/0.001 */**/**

alleine führte zu einer drastischen Verlangsamung der Wundheilung gegenüber der Kontrollgruppe. Wir wollten wissen, ob eine Costimulation mit Sulforaphan diesen negativen Effekt ausgleichen könnte. Die Costimulation der Tubuluszellen mit Nutlin-3a und SRF führte zu einem der Kontrolle vergleichbaren Wundheilungsgeschwindigkeit, vermutlich aufgrund einer erhöhten Ausgangsexpression von MDM2 und einer gesicherten MDM2-Restaktivität nach MDM2-Blockade (Abbildung 24C).

Zusammenfassend stellten wir fest, dass Sulforaphan die Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors Nrf2 steigert (Abb. 23). Die primären Tubulusepithelzellen weisen eine

erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress auf. Im neu etablierten Regenerationsassay ist die Zunahme des oxidativen Stresses einer der Hauptgründe für die akute Schädigung der Zellen (Abb. 14A). Mit Sulforaphan stimulierte Zellen weisen daher eine signifikant höhere Überlebensrate in Teil 1 des Assays auf (Abb. 20). Die Nrf2-Aktivierung nach Sulforaphan-Stimulation führt darüber hinaus zu einer verstärkten Expression des Zellzyklusregulators MDM2. Die verstärkte MDM2-Aktivität sorgt in Teil 2 und 3 des Regenerationsassays zu einer signifikant verbesserten Proliferations- und Wundheilungskapazität der Epithelzellen (Abb. 21 und 22).

3.5 Screeningversuch zur Identifikation proregeneratorischer Interleukine

3.5.1 Interleukin-22 verbessert tubuläres Überleben und Regeneration

Bei der Untersuchung des Zellzyklus-Regulators MDM2 fällt auf, dass diesem Protein eine weitaus komplexere Rolle zukommt als der Interaktion mit p53. Vergangene Arbeiten konnten MDM2 eine Schlüsselfunktion in der Regulierung zwischen Proliferation und Entzündung zuschreiben [168]. Die proinflammatorische Wirkung von MDM2 wird über Bindung an den Transkriptionsfaktor NF-kappa-b gesteuert, welcher die Sekretion proinflammatorischer Zytokine vermittelt. Entzündung und regeneratives Wachstum sind nach akuter epithelialer Schädigung unweigerlich miteinander verbunden [264]. Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Milieus verschiebt sich im Laufe der Heilungsreaktion zunächst auf die Seite der Entzündung und erst später in Richtung Proliferation und Regeneration [143, 237, 242, 244].

Den Zellen des Immunsystems kommt bei der Heilungsreaktion eine zentrale Rolle zu (vgl. Kapitel 1.3.3). Wir wollten herausfinden, ob es von Immunzellen sezernierte Zytokine gibt, die in unserem Modell die tubuläre Regeneration fördern. Zu den immunologischen Zytokinen gehören die Interleukine. Einige der Interleukine wurden bereits auf deren Eigenschaften bei der Heilungsreaktion untersucht, unter anderem Interleukin-22. Interleukin-22 ist ein exklusiv von Leukozyten sezerniertes Zytokin und spielt eine wichtige Rolle in der Signalvermittlung zwischen Immunsystem und peripherem Gewebe [265]. Interleukin-22 wird während der Entzündungsreaktion sezerniert und fördert die Regeneration in mehreren Experimenten [265, 266]. Über verschiedene Signalwege wirkt es proliferativ und anti-apoptotisch, kann aber auch durch Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren die Entzündungsreaktion aufrechterhalten [267]. Wie MDM2 besitzt es also pro-regenerative und proinflammatorische Eigenschaften und wirkt so regulierend auf Entzündung und Heilungsreaktion.

Wir vermuteten, dass Interleukin-22 auch in unserem Regenerationsassay die tubuläre Regeneration *in vitro* fördert. Viele Interleukine sind strukturverwandt und wir testeten eine möglichst große Anzahl der Vertreter in einem zweiten Screeningversuch. Abbildungen 26 und 27 zeigen das Ergebnis der Teile 1 und 2 des Regenerationsassays. Die Stimulation der Tubuluszellen mit Interleukin-22 bewirkte eine signifikante Verbesserung des Überlebens nach akuter Schädigung im Vergleich zur Kontrollgruppe (mehr als 3-fach, Abb. 26A).

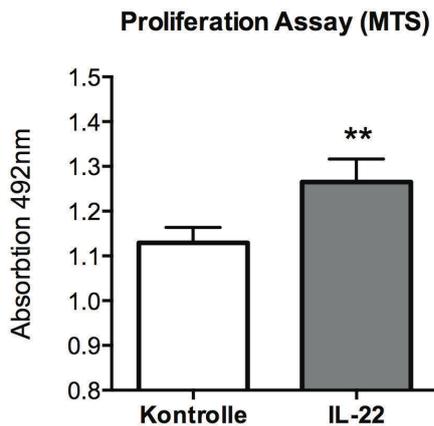


Abbildung 25: Proliferationsassay unter Stimulation mit Interleukin-22 Primäre murine Tubulusepithelzellen von Wildtyp-Mäusen wurden im FCS-freien Medium kultiviert. Es erfolgte entweder eine Stimulation mit H₂O (Kontrolle) oder mit rekombinanten Interleukin-22. Das Diagramm zeigt die mittlere Absorption bei 492nm Wellenlänge \pm SEM. n=8, p<0.01.

Mehrere andere Vertreter der Interleukin-Familie, darunter Interleukin-10 als strukturverwandtes Protein von Interleukin-22, bewirkten eine geringfügigere Verbesserung des Überlebens. Auch im zweiten Teil des Assays konnte durch Stimulation mit Interleukin-22 eine signifikante Verbesserung des regenerativen Wachstums erreicht werden (rund 2-fach, Abb. 26B). Die Steigerung der Proliferation war dosisabhängig (Abb. 27A). Die pro-proliferative Wirkung von Interleukin-6 bewirkte eine 1,8-fache Verstärkung der Proliferation, eine bereits bekannte Wirkung von Interleukin-6 [268-270].

Um auszuschließen, dass das Überleben im ersten Teil des Experiments den Ausgang des zweiten Experiments vorbestimmt („besseres Überleben führt zu besserer Wundheilung“), führten wir einen zusätzlichen, unabhängigen Proliferationsassay durch. Wir verglichen die Proliferationsrate von mit Interleukin-22 stimulierten primären Tubuluszellen mit der einer unbehandelten Kontrollgruppe. Interleukin-22 stimulierte die Proliferationsrate signifikant, wie in Abbildung 25 zu erkennen ist. Unabhängig von der Ausgangszahl überlebender Tubuluszellen im Regenerationsassay fördert Interleukin-22 das regenerative Wachstum signifikant. Die n-fache Verbesserung des regenerativen Wachstums aus Schritt 2 des Assays lässt sich ebenfalls isoliert oder korrigiert betrachten, indem man den Quotient zwischen Regeneration und Überleben bildet (*fold change* Regeneration / *fold change* Überleben; nicht gezeigt). Dies dient der einfachen und schnellen Kontrolle der Aussagekraft einzelner Ergebnisse im Vergleich.

Wir wollten Interleukin-22 nun auch im dritten Schritt des Regenerationsassay testen um herauszufinden, ob Interleukin-22 auch die Schließung einer künstlich herbeigeführten Wunde beschleunigt. Stimulation der primären Tubuluszellen mit Interleukin-22 im Scratch Assay bewirkte eine bis zu 2,5-fache Beschleunigung des Wundverschlusses (Abbildung 27).

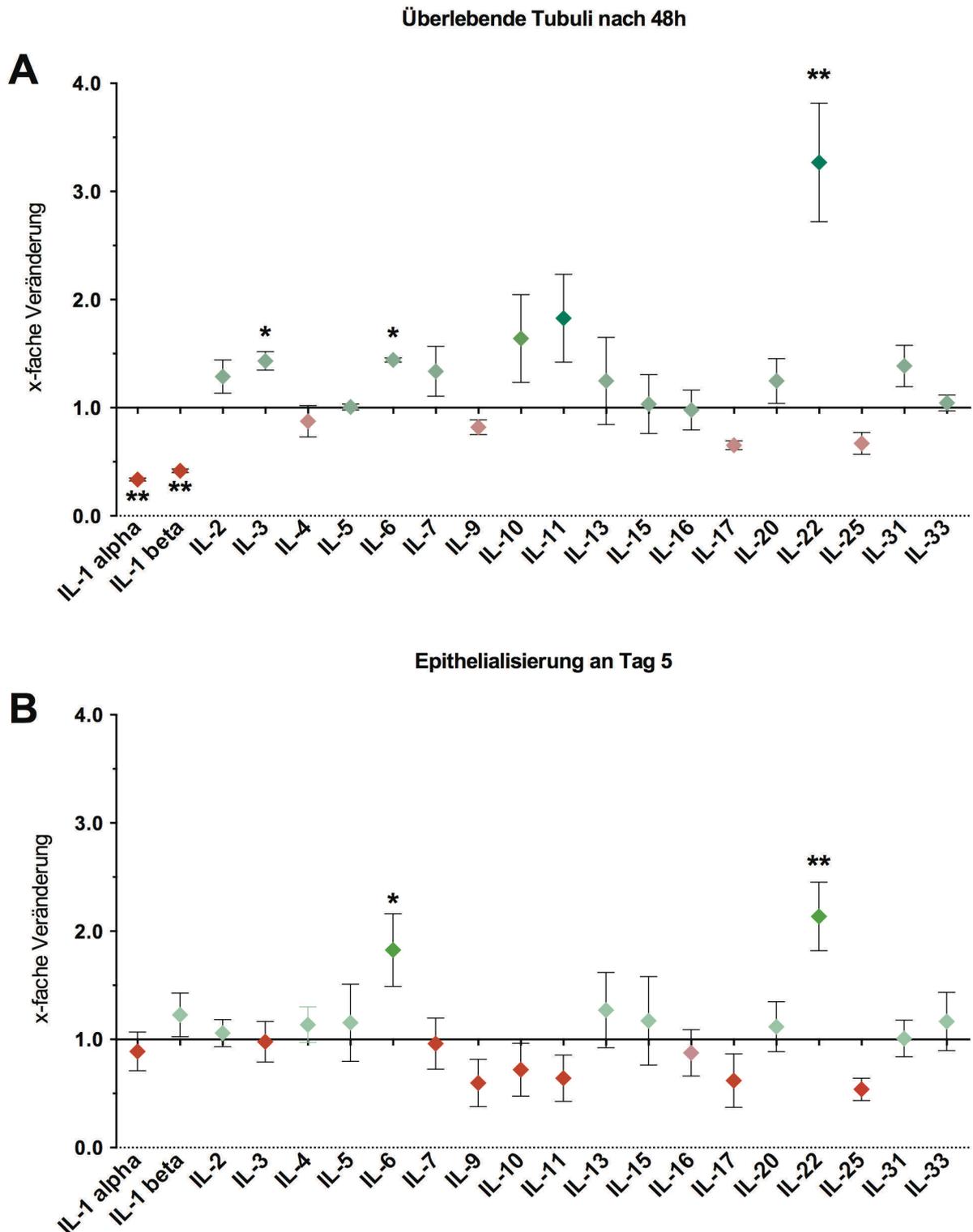


Abbildung 26: Screening mit Interleukinen im Regenerationsassay. Analog zum ersten Screeningversuch wurden primäre Tubulusepithelzellen von Wildtyp-Mäusen verwendet. Die Zellen wurden nach der Isolation entweder mit H₂O (Kontrolle) oder rekombinanten Interleukinen + H₂O stimuliert. Die Auswertung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. n=16, p<0.05/0.01/0.001 */**/***. **A:** Überleben der Tubuluszellen 48 Stunden nach akuter Schädigung. Die Stimulation mit Interleukin-22 führte zu einer signifikanten, mehr als 3-fachen Verbesserung des Zellüberlebens im Vergleich zur Kontrollgruppe. **B:** Regenerative Ausbreitung der Zellen 5 Tage nach Schädigung. Auch hier konnte die Stimulation mit Interleukin-22 eine signifikante Verbesserung des regenerativen Zellwachstums bewirken.

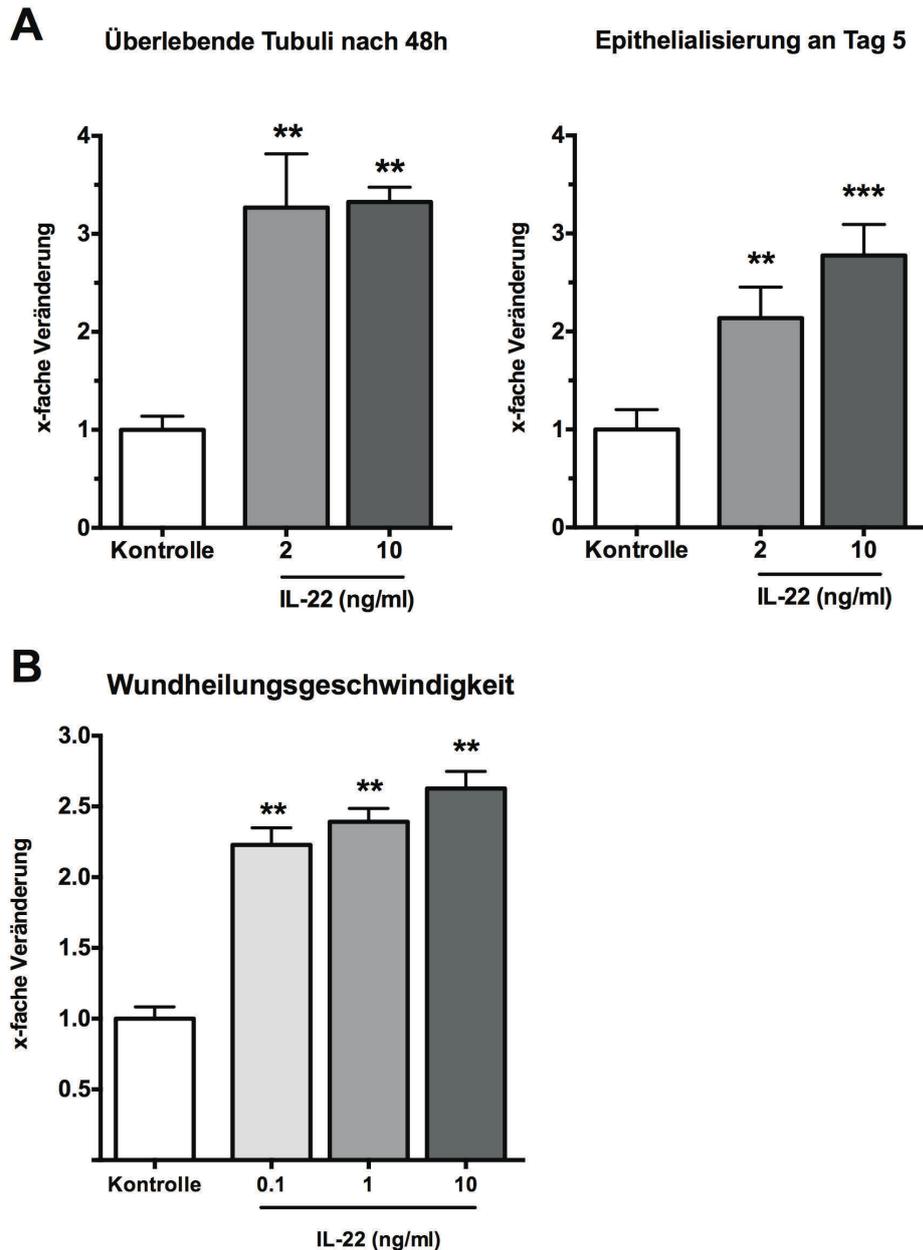


Abbildung 27: Dosisabhängige Wirkung von Interleukin-22 im Regenerationsassay.

A: Die Steigerung der Dosis von 2 auf 10ng/ml führte zu einer beschleunigten, regenerativen Ausbreitung der Zellen (oben rechts).

B: Scratch Assay mit Interleukin-22-Stimulation. Der Assay wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Es erfolgte eine Stimulation mit entweder H₂O (Kontrolle) oder rekombinanten Interleukin-22 + H₂O in unterschiedlicher Dosierung. Die Stimulation mit Interleukin-22 bewirkte eine bis zu 3,5-fach beschleunigte Wundheilung. n=12, p<0.01.

3.5.2 Interleukin-22 vermittelt seine Effekte über mehrere Kinasen

Als von Leukozyten sezerniertes Zytokin vermittelt Interleukin-22 seine Effekte über Transmembranrezeptoren an Zellen peripherer Organe. Der Rezeptor besteht aus einem Dimer aus IL-22R und IL-10RB [271]. Um die Plausibilität der oben gezeigten Ergebnisse zu überprüfen, untersuchten wir die primären murinen Tubulusepithelzellen auf die Expression

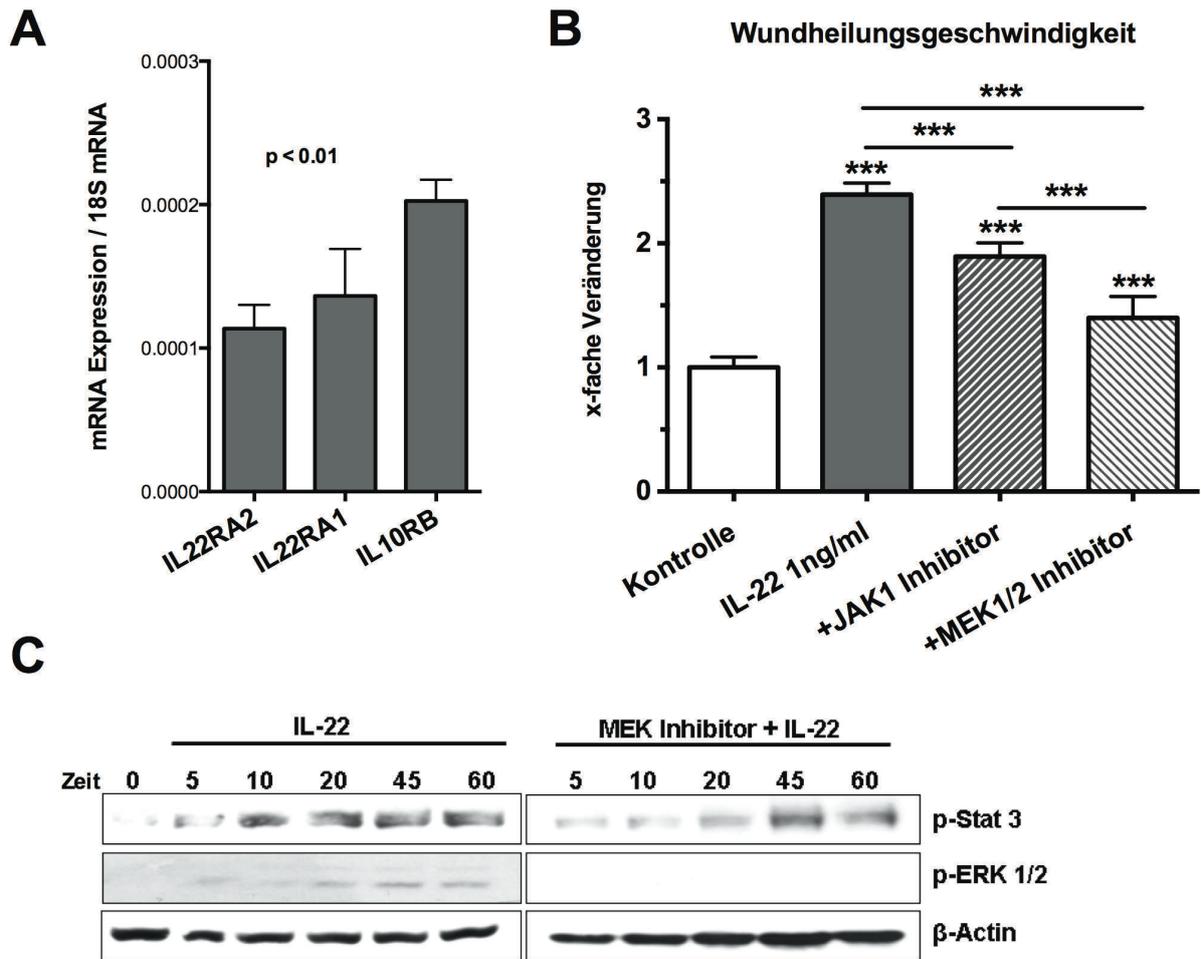


Abbildung 28

A: mRNA-Expression der Interleukin-22-Rezeptoren. Wir isolierten Gesamt-RNA aus primären murinen Tubulusepithelzellen mehrerer Mäuse. Das Diagramm zeigt die mRNA-Expression der jeweiligen Gene im Verhältnis zur 18S-mRNA-Expression. n=8, p<0.01.

B: Scratch Assay mit Interleukin-22-Signalweg-Inhibitoren. Primäre TEC wurden mit H₂O / mit Interleukin-22 / mit IL-22+JAK1-Inhibitor / mit IL-22+MEK1/2-Inhibitor stimuliert. Das Diagramm zeigt die n-fache Veränderung der Geschwindigkeit des Wundverschlusses im Vergleich zur Kontrollgruppe. n=28, p<0.001.

C: Western Blot zur Analyse des Interleukin-22-Signalwegs. Primäre Tubuluszellen wurden entweder mit rekombinanten Interleukin-22 (links), oder mit Interleukin-22/MEK1/2-Inhibitor (rechts) stimuliert. Die Isolation der Proteine erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 20, 45, 60 Minuten. Beta-Aktin als Kontrolle.

der beiden Rezeptoren, sowie auf die Expression der Rezeptoren für sämtliche der oben getesteten Zytokine und Wachstumsfaktoren. Abbildung 28A zeigt einen Auszug der Ergebnisse der qRT-PCR (Gesamtübersicht siehe Anhang). Die Bindung an das Rezeptor-Dimer führt zur Aktivierung mehrerer Kinasen zur Signaltransduktion. Während die Kinasen MEK1/2 sowie ERK1/2 vor allem zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führen und zur Expression proliferativer Gene, gibt es außerdem den JAK-STAT3-Signalweg, welcher die Expression antiapoptotischer und zellprotektiver Gene fördert. Neben diesen Signalwegen werden weitere Kinasen und Transkriptionsfaktoren mit der Interleukin-

22-Signalkaskade in Verbindung gebracht, ebenfalls im Zusammenhang mit einer gesteigerten Proliferationsrate [272]. In mehreren Studien wurde die Rolle des STAT3-Signalwegs nach IL-22-Stimulation für die Regeneration von Leber- und Darmepithelien bereits untersucht [273-276].

Wir wollten herausfinden, über welchen der möglichen Signalwege Interleukin-22 in unserem Modell Zellüberleben und Regeneration fördert. Hierzu stimulierten wir die Tubuluszellen entweder mit rekombinantem Interleukin-22, oder mit Interleukin-22 in Kombination eines MEK1/2-Inhibitors. Anschließend führten wir einen Western Blot zur Quantifizierung der in den Signalwegen beteiligten Proteine durch. Die Interleukin-22-Stimulation führt zu einer Aktivierung von sowohl STAT3, als auch von ERK1/2 nach wenigen Minuten (Abb. 28C). Die Costimulation mit einem MEK1/2-Inhibitor verlangsamt die Aktivierung von STAT3 deutlich, verhindert jedoch nicht die Restaktivierung von STAT3 durch JAK1 (Abb. 28C). Die Aktivierung der ERK1/2 bleibt nach Inaktivierung der MEK völlig aus. Um die tatsächliche Rolle von STAT3 und der ERK1/2 für die Proliferation der Tubuluszellen zu untersuchen, führten wir einen *scratch assay* unter Einsatz des MEK-Inhibitors und eines JAK1-Inhibitors durch. Wir vermuteten, dass sich die Wundheilung nach Einsatz der Inhibitoren verlangsamt. Die Inkubation mit dem JAK1-Inhibitor führt zu einer leichten Verlangsamung der Wundheilungsgeschwindigkeit im Vergleich zur Interleukin-22-Gruppe (Abb. 28B). Unter Einsatz des MEK1/2-Inhibitors kommt es zu einer drastischeren Verlangsamung des Wundverschlusses, beinahe auf das Niveau der Kontrollgruppe. Der proliferative Effekt von IL-22 in unserem Assay ist demnach über die JAK/STAT3p-Signalkaskade und die ERK1/2-Kinasen vermittelt.

4 Diskussion

Die adäquate Förderung epithelialer Wundheilung ist für den Funktionserhalt eines Organs essenziell. Bislang lässt sich durch Therapeutika nicht positiv in diesen von verschiedenen Zelltypen regulierten Prozess eingreifen. Bei insuffizienter Wundheilung entsteht ein Parenchymverlust, der durch fibrotisches Gewebe aufgefüllt wird. Dieser Teil der Niere greift funktionell nicht mehr in die Aufgaben der Niere ein, sodass es zum irreversiblen Funktionsverlust kommt. Fibrose ist ein zentrales Problem der heutigen Medizin und verursacht große Kosten für das Gesundheitssystem [277]. Herzinsuffizienz und Rhythmusstörungen als Folge zunehmender Vernarbung bei koronarer Herzkrankheit ist für rund 100000 Todesfälle pro Jahr in den USA verantwortlich [150]. In der Leber und Lunge entsteht Fibrose häufig nach Applikation toxischer Medikamente, im Fall von Bleomycin für die Lungenfibrose konnte Nrf2 bereits einen Therapieerfolg in der Maus erzielen [278]. In der Niere entsteht tubuläre Fibrose unter anderem durch chronische oder wiederholt auftretende Minderperfusion mit partieller Wundheilung, wodurch sich das Konzept der *chronic-on-acute kidney failure* erklären lässt. Dieses Konzept konnte unter anderem bei Kindern beobachtet werden, welche frühkindliches oder fetales ANV entwickelt hatten [279]. Aus unseren Studien ergeben sich mehrere Ansatzpunkte für eine mögliche gezielte Förderung der tubulären Regeneration: einerseits die Förderung der Widerstandsfähigkeit der Tubuluszellen, andererseits die Förderung der Proliferation. Sulforaphan, als Nrf2-Agonist klassischerweise für seine Förderung der ROS-Abwehr und somit der Widerstandsfähigkeit von Zellen bekannt, zeigte in unseren Studien auch eine pro-proliferative Wirkung. Interleukin-22 konnte versuchsweise in der Leber bereits erfolgreich eingesetzt werden, ist aber im nephrologischen Zusammenhang weitestgehend unerforscht. Es stellen sich noch viele Fragen hinsichtlich der Wirkungsweise der Therapeutika und möglicher unerwünschter Nebenwirkungen. In welcher Phase der ANS oder ATN sollten die Stoffe eingesetzt werden? Welche Signalwege werden außer den hier erforschten noch aktiviert? Einige dieser Aspekte sollen nachfolgend angesprochen werden.

4.1 Verwendung immunologischer Signalstoffe in der ANS-Therapie

Die ANS ist eine häufige Komplikation anderer Begleiterkrankungen, Operationen oder generalisierten Entzündungsreaktionen, zum Beispiel eines *SIRS* [18, 20-23]. Bei ANS nach Ischämie stellt die ausreichende Flüssigkeitssubstitution zur Erhaltung eines hochnormalen Blutdrucks im Nierenparenchym eine Behandlungsmöglichkeit dar. Das Ziel dieser Therapie ist die Verhinderung weiteren Schadens, die Regeneration der Epithelzellen wird nicht direkt beeinflusst. Bei ANS nach *SIRS* kommt es durch ausgedehnte systemische Extravasate ebenfalls zur Hypoperfusion parenchymatöser Organe, zudem vermitteln die signifikant erhöhten Level von Entzündungsmediatoren eine systemische Immunreaktion. In kürzerer Vergangenheit wurde zunächst auf Studienbasis versucht, die Entzündungsmediatoren zu blockieren [280, 281]. Ob sich hieraus auch eine Verringerung der Nierenschädigung erreichen ließe, ist nicht direkt belegt. In der Theorie könnten solche Blockaden die initial schädliche, überschießende Makrophagen- und Neutrophilen-vermittelte Immunreaktion verhindern. Im Phasenmodell der Makrophagen [223] betrifft dies die erste Phase. Die zweite Phase, in der das Immunsystem in die Proliferation von Epithelzellen und fibrotischem Weichgewebe eingreift, bleibt durch solche Versuche unberührt. Die aktive Förderung der tubulären Regeneration stellt dementsprechend einen neuen Ansatz in der Therapie der ANS dar. Unsere Versuche belegen Vorteile *in vitro* durch eine Therapie, sowohl auf Ebene der freien Sauerstoff-Radikale (ROS) als auch mit immunologischen Mediatoren wie IL-22.

Die Immunotherapie ist in den vergangenen Jahren ein aufstrebendes Forschungsgebiet. Durch die Produktion rekombinanter Mediatoren und spezifischer Antikörper durch Bakterien bieten sich neue Möglichkeiten. Auch auf dem Gebiet der Nephrologie gibt es zahlreiche Studien, die sich der Immunotherapie bedienen [282]. Die Studien beschäftigen sich vor allem mit der Reduktion von Nierenschäden im Rahmen chronisch entzündlicher, rheumatischer Erkrankungen wie dem SLE, Vaskulitiden oder Immun-Komplex-Glomerulonephritiden, die sich klinisch sowohl mit akutem als auch chronischem Nierenversagen äußern können. Zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen, welche sich entgegen der Vaskulitiden nicht im Glomerulus, sondern im Interstitium des Nierenmarks abspielen, wurden ebenfalls Studien durchgeführt [282]. Abstoßungsreaktionen rufen pathophysiologisch eine Tubulitis aus, was sich histologisch durch Immunzellen entlang der tubulären Basalmembran zeigt. Für die Abstoßungsreaktionen von Transplantatnieren

muss zwischen hyperakuten, akuten und chronischen Reaktionen unterschieden werden. Hyperakute Reaktionen werden durch präformierte Antikörper, also vor der Transplantation existente Antikörper hervorgerufen. Hier und bei den akuten Reaktionen kommt es zum Bild einer ANS; bei den chronischen Reaktionen hingegen kommt es zu einer langsamen Verschlechterung der Nierenfunktion. Die aktuell im Hinblick auf ANS durchgeführten Immuntherapiestudien untersuchen lediglich das Ausmaß des Tubulusschadens, nicht aber die Regenerationsphase. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass das Immunsystem auch an der Wundheilung, also der Regeneration aus überlebenden und Vorläuferzellen, maßgeblich beteiligt ist [143, 150, 237, 242-244]. Hier sind weitere Studien dringend notwendig, um die Möglichkeiten einer Immunotherapie auszuschöpfen.

Das Ziel dieser Arbeit war unter anderem, in einem neu etablierten *in vitro*-Modell zur akuten Nierenschädigung und Regeneration potentielle Kandidaten für eine Förderung der Regeneration nach ANS zu identifizieren. Im Gegensatz zu bisherigen *in vitro*-Modellen ist die Isolationsmethode in unserem Assay integriert: sie imitiert die akute Schädigungsphase einer ATN *in vitro*. Dies bietet mehrere Vorteile: die primären Zellen werden in Passage 0 verwendet und sind somit so nah an *in vivo*-Bedingungen wie nur möglich. Es entsteht keine Verfälschung durch lange Kulturzeiten oder Passagen. Die Isolationsmethode versetzt die Zellen nachweislich unter ROS-Stress, einem der Hauptfaktoren für ischämisch-akute Schädigung.

Da die Wirkungen der einzelnen Bestandteile des Immunsystems für die epitheliale Wundheilung nicht ausreichend erforscht sind, testeten wir in unserem Screeningversuch zahlreiche immunologische Mediatoren. Es stellte sich heraus, dass Interleukin-22 nicht nur das Überleben nach Ischämie verbesserte, sondern auch die Regeneration signifikant förderte. Auch im Scratch-Assay und im Proliferations-Assay zeigte sich eine signifikante Verbesserung von Proliferation und Migration. Gemäß des neu entwickelten Versuchsmodells (vgl. Abb. 30) bestand der nächste logische Schritt in der Durchführung von *in vivo* Versuchen mit IL-22. Diese Studien wurden im Anschluss an diese Arbeit durch Kulkarni et al. durchgeführt. Zunächst konnte durch Kulkarni et al. gezeigt werden, dass die Expression von IL-22 nach ischämischer ANS in der Niere gesteigert ist, was nahe legt, dass IL-22 eine Rolle bei der Bewältigung einer ischämischen ANS spielt. Durch postischämische Blockade von IL-22 durch Antikörper wurde der Anteil gesunder Tubuli an Tag 5 signifikant reduziert, was sowohl anhand histologischer Schnitte bestätigt wurde, als auch anhand erhöhter Spiegel von Tubulus-Verletzungsmarkern (Kim-1, π GTP, α GTP und FABP) [283]. Nach IL-22-

Blockade war die Expression weiterer Marker signifikant verändert: die pro-inflammatorischen Marker CCL2 und TNF- α waren erhöht, ebenso wie der profibrotische Marker TGF- β , welcher laut aktueller Meinung auch an der mesenchymalen Transformation aus Tubulusepithelzellen beteiligt ist [176, 189, 195]. Die Ergebnisse von Kulkarni et al. bestätigen soweit unsere Beobachtungen eines Überlebens- und Heilungsvorteils aus dem *in vitro* Versuch.

Als bekanntes immunologisches Zytokin und IL-10-Verwandter war anzunehmen, dass IL-22 von einer Subgruppe von Immunzellen nach ischämischer ANS ausgeschüttet wird. Aber welche Zellen sind dafür verantwortlich? Die Rolle der Makrophagen bei der epithelialen Regeneration wurde bereits teilweise aufgedeckt, aber ist die IL-22-Produktion ebenfalls Aufgabe der Makrophagen? Kulkarni et al. ist es gelungen, die verantwortlichen Zellen zu identifizieren. Es sind interstitielle dendritische Zellen (DC), welche nach akuter Schädigung das Zytokin produzieren. Diese Zellen, welche wiederum in eigene Unterklassen eingeteilt sind, werden unter anderem durch das Oberflächenmolekül CD11c charakterisiert [284]. Die Studien von Kulkarni et al. konnten nun die Rolle dieser DC im Kontext der ischämischen ANS aufdecken. Dass sich ein Mangel an DC nach ANS negativ auf das Outcome auswirkt wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe im Vorfeld dieser Studien gezeigt [243]. Der Grund für diesen Nachteil wurde jedoch nicht im Detail identifiziert. Kulkarni et al. konnten beweisen, dass es der Mangel an IL-22 ist, der sich nach DC-Depletion negativ auf die Tubuli auswirkt, indem sie nach Ausschaltung der DC endogenes durch rekombinantes IL-22 ersetzen. So konnte der durch den DC-Mangel hervorgerufene Nachteil ausgeglichen werden [243, 283, 285]. Die Aktivierung der sich im Interstitium befindlichen DC findet in diesem Kontext über TLR4 statt, indem Fragmente von nekrotischen Tubuluszellen erkannt werden. Die Rolle von TLR4 im Zusammenhang mit ischämischer ANS wurde bereits früher untersucht [45, 46]. Nun steht fest, dass die Expression von IL-22 direkt aktiviert wird, welches überlebenden Tubuluszellen zugute kommt. Da auch in einem weiteren Modell die pro-regenerativen Eigenschaften von IL-22 für epitheliale Zellen gezeigt werden konnten, spricht vieles dafür, dass IL-22 ein potentieller Kandidat zur Immuntherapie eines epithelialen Schadens nach Ischämie ist [275, 286].

Wie Makrophagen gehören auch die DC zur Gruppe des monozytären Phagozytensystems. Die bisherigen Studienergebnisse legen nahe, dass verschiedene Phänotypen von Zellen dieses Systems in allen Phasen der epithelialen Wundheilung eine wegweisende Rolle einnehmen. Die Makrophagen können durch alternierende Phänotypen

das Ausmaß der Fibroseentstehung entscheidend beeinflussen. Dies tun sie unter anderem durch direkte Wirkung auf Epithelzellen, Myofibroblasten und Immunzellen. Die Wirkung wird durch parakrine Effekte mit der Schaffung von Mikromilieus erreicht [143, 243]. Die Dendritischen Zellen, bisher vorwiegend bekannt durch ihre Funktion als Antigen-präsentierende Zellen und Vermittler zwischen innatem und adaptivem Immunsystem [142, 284], beteiligen sich direkt an der Schaffung eines Mikromilieus, indem sie IL-22 ins benachbarte Tubulussystem ausschütten. Dies stellt eine weitgehend neue Rolle der DC in der Nierenpathologie dar [242, 287].

4.2 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) als Regulator der Regeneration

Wir konnten zeigen, dass der Nrf2-Agonist Sulforaphan (SRF) zu einer signifikanten Steigerung des Überlebens nach akuter Ischämie, sowie zu einer verbesserten Regeneration der murinen Tubuluszellen führt (vgl. Abb. 20-22). Sulforaphan ist bisher eher bekannt als Phytotherapeutikum, welches aus Kohlarten wie Broccoli gewonnen werden kann. Bislang konnte in mehreren Studien zur Behandlung von Gefäßerkrankungen ein positiver Effekt von SRF gezeigt werden [288, 289]. Darüber hinaus wird eine Beeinflussung der Epigenetik, insbesondere der DNA-Methylierung durch SRF angenommen, was natürliche Altersprozesse aufhalten könnte [290]. Yoon et al. testeten SRF bereits im I/R ANS-Modell und konnten einen Vorteil durch SRF-Therapie nachweisen [260]. Dieser wurde mit den höheren Spiegeln von ROS-bekämpfenden Enzymen (Phase-II-Enzyme) begründet. Durch die Bindung von SRF an den natürlichen Nrf2-Antagonisten KEAP1 verhindert es indirekt den Abbau von Nrf2. Per Translokation zum Nukleus kann Nrf2 seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben und die Expression von Phase-II-Enzymen fördern. Durch die höheren Spiegel von Nrf2 können ROS besser bekämpft und die Zelle vor Schädigungen auf DNA- und Protein-Ebene geschützt werden.

Die Rationale zur Verwendung von SRF in unseren Experimenten ergab sich aus der Vermutung, die TEC-Isolationsmethode müsse ein beträchtliches Ausmaß an oxidativem Stress freisetzen, da sie eine ischämische ANS *in vitro* imitiert. Durch Nachweis von MDA im TBARS-Assay (vgl. Abb. 14) wiesen wir die erhöhten Level von ROS nach. Dass Sauerstoffradikale während ischämischer ANS entstehen und auch an dessen Fortschreiten

beteiligt sind, wurde bereits *in vivo* nachgewiesen [291]. Dies unterstützt unsere These, dass der neu entwickelte *in vitro* Assay die *in vivo* Bedingungen pathophysiologisch simuliert.

Auch für das chronische Nierenversagen wird angenommen, dass oxidativer Stress für das Fortschreiten der Erkrankung mitverantwortlich ist [292-294]. Der überwiegende Teil von ROS wird in den Mitochondrien beim Durchlaufen der Atmungskette produziert [295]. Bei normaler mitochondrialer Funktion werden die ROS weiterverarbeitet und teilweise unschädlich gemacht. Yuan et al. konnten zeigen, dass EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*) mit mitochondrialer Dysfunktion einhergeht [296]. EMT wiederum führt zu Fibrose und chronischem Nierenversagen. Weitere Studien konnten belegen, dass Nrf2 als Schlüsselfigur in der Abwehr von ROS den Verlauf von chronischen Nierenversagen beeinflussen kann [297-300]. Yoh et al. untersuchten die Rolle von Nrf2 speziell im Hinblick auf Diabetes-induziertes chronisches Nierenversagen [301]. Im Jahre 2011 veröffentlichte Pergola et al. eine klinische Studie, in welcher der Nrf2-Agonist Bardoxolon zur Behandlung von Diabetes-induziertem chronischen Nierenversagen getestet wurde [258, 302]. Dies geschah auf dem Boden bereits vielversprechender Resultate in Phase II-Studien mit Bardoxolon [258, 303]. Über 2000 Patienten mit Diabetes mellitus Typ II und chronischen Nierenversagen erhielten in dieser doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie entweder Bardoxolon-Methyl oder ein Placebo. Die Studie wurde jedoch ein Jahr später aufgrund einer Häufung tödlicher Komplikationen in der Bardoxolon-Gruppe von der Monitoring-Kommission beendet [259]. Die GFR, der Blutdruck und die *albumine-to-creatinine-ratio* im Urin verbesserten sich durch die Therapie mit Bardoxolon jedoch erheblich. Vor dem erneuten Einsatz mit Bardoxolon sind zunächst Studien am Tiermodell notwendig, um die Verträglichkeit der Therapie weiter zu verbessern.

Die von uns durchgeführten Studien gehen in mehreren Punkten weiter als die bislang von Yoon et al. veröffentlichten Ergebnisse. Yoon et al. verwendeten in ihren Experimenten immortalisierte Zelllinien (HK2), deren Aussagekraft gegenüber primären Tubuluszellen abgeschwächt ist. Darüber hinaus evaluierten Yoon et al. das Ergebnis der SRF-Behandlung an nur einem Zeitpunkt. Unser Regenerationsassay verwendet primäre murine Tubuluszellen und der Behandlungserfolg wird an 2 Zeitpunkten ausgelesen (Überleben Tag 2, Regeneration Tag 5). So ist es möglich, die Rolle von Nrf2 und seinem Agonisten genauer zu untersuchen. Die Ergänzung des Assays um den *Scratch Assay* ermöglicht es, weitere Aussagen zur Proliferation und Migration der Zellen zu treffen.

Wir stellten uns die Frage, ob Nrf2 auch über andere Signalwege als der Induktion von Phase-II-Enzymen wirkt. You et al. postulierten bereits eine Aktivierung von *Murine double minute 2* (MDM2) durch Nrf2 [262]. Zusammen mit den Phase-II-Enzymen überprüften wir die Expression von MDM2 nach SRF-Stimulation (im Anschluss an den *Scratch assay*). Die Expression von MDM2 war signifikant erhöht. Per Inhibition der MDM2-Funktion konnten wir zeigen, dass SRF seine proliferativen Effekte über MDM2 vermittelt (vgl. Abb. 23). Erst kürzlich wurde die Rolle von MDM2 beim I/R-Modell der ANS im Detail untersucht [168]. Hierbei zeigte sich eine duale Rolle des Moleküls: in der Frühphase der ischämischen ANS agiert MDM2 proinflammatorisch und unterstützt die initiale, destruktive Immunreaktion. In der späteren Heilungsphase ist MDM2 wiederum essentiell für eine ausreichende Proliferation der Zellen. Dass Entzündung und epitheliale Proliferation eng miteinander verzahnt sind, ist bereits von Rakoff-Nahoum et al. eindrucksvoll dargestellt worden. Die permanente, bakterielle Stimulation von *Toll-like-Rezeptoren* auf intestinalen Epithelzellen führt zu vermehrter Proliferation der Zellen, die zur Verhinderung einer Sepsis nach epithelialer Schädigung beiträgt [212]. Ebenso besitzen die Makrophagen die Möglichkeit, durch Beeinflussung des Milieus das Ausmaß der Schädigung, sowie der epithelialen und mesenchymalen Proliferation zu regulieren. Durch Induktion von MDM2 ist auch Sulforaphan in der Lage, in dieses komplexe System von epithelialer Wundheilung mit einzugreifen.

Nrf2 wurde bereits in anderem Zusammenhang als der epithelialen Regeneration untersucht. Mehrere Arbeiten belegen einen protektiven Effekt von Nrf2 hinsichtlich der Entstehung bösartiger Tumoren [261, 304, 305]. Viele Karzinogene wirken als starkes oxidatives Agens, und mittels einer Behandlung mit Nrf2-Agonisten konnte die Tumorgenese vermindert werden. Nrf2-Induktion trägt aber nicht nur zur Prävention, sondern auch zur Therapieresistenz von Tumorzellen bei. Tumorzellen müssen sich gegen ROS schützen, denn Immunsystem und Chemotherapeutika wirken teilweise über die Induktion von ROS. Durch Überexpression von Nrf2 erreichen Tumorzellen einen gewissen Schutz vor Therapeutika und Ischämie, welche bei starkem Tumorwachstum ebenfalls in großen Tumorarealen auftreten kann [261, 306]. In einem Modell zur Untersuchung der Arteriosklerose konnten weitere Rollen von Nrf2 aufgedeckt werden [132]. Erste Versuche konnten zeigen, dass Nrf2-Aktivierung, welche unter anderem durch laminaren Blutfluss angeregt wird, neben einer Bekämpfung von ROS auch die Chemotaxis von Makrophagen durch Verringerung von MCP-1 und VCAM-1 beeinflussen [132, 307-311]. Es wurde also angenommen, dass Nrf2-Aktivierung hinsichtlich der Entstehung von Arteriosklerose protektiv wirkt, und zwar über

eine Unterdrückung der Immunreaktion. In weiteren Versuchen fand man jedoch heraus, dass eines der Schlüsselproteine für die Cholesterinaufnahme in Makrophagen, CD36, direkt durch Nrf2-Aktivität transkribiert wird [132]. Durch Cholesterinaufnahme entstehen zunächst sogenannte *Foam cells* und infolgedessen auch arteriosklerotische Plaques. Hierdurch kommt es neben einer Immunreaktion auch zur Abnahme des laminaren Blutflusses und verminderten Aktivierung von Nrf2, sodass eine Art *circulus vitiosus* entsteht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Nrf2 die Entstehung arteriosklerotischer Plaques fördert, sofern erhöhte Mengen von Cholesterin vorhanden sind.

Wir fanden heraus, dass die proliferative Wirkung von Nrf2 über eine Aktivierung des Zellzyklus-Regulators MDM2 erfolgt. Durch Therapie mit SRF nach akuter Schädigung ließe sich so die Proliferation überlebender Tubuluszellen steigern. Dass Nrf2 aber physiologisch im Rahmen der epithelialen Heilung aktiviert wird, wurde in dieser Studie nicht untersucht [132]. Braun et al. fanden heraus, dass Nrf2 die epitheliale Wundheilung beschleunigt [312, 313]. In einem Modell an Keratinozyten der Haut wurde beobachtet, dass Nrf2^{-/-}-Mäuse eine verlangsamte Wundheilung gegenüber der Kontrollgruppe zeigen mangels ausreichender Matrixproduktion und Proliferation. Braun et al. fanden heraus, dass die physiologische Nrf2-Aktivierung durch den *Keratinocyte growth factor* (KGF) erfolgt, welcher vermutlich in der Lage ist, die Aktivität von KEAP1 zu verringern [313]. In Geweben, die physiologischerweise eine hohe epitheliale Proliferationsrate aufweisen (z.B. Gastrointestinaltrakt), ist KGF verhältnismäßig überexprimiert. Was aber passiert, wenn die Aktivierung von Nrf2 nicht transient im Rahmen einer Wundheilung auftritt, sondern permanent? KEAP^{-/-} - Mäuse kamen bereits mit geringfügiger Hyperkeratose der Haut auf die Welt und verstarben frühzeitig an gastrointestinalen Komplikationen, meist ösophagealer Blockade [132]. Es ist also davon auszugehen, dass eine permanente Aktivierung von Nrf2 zu Hyperproliferation von Epithelien führt, möglicherweise über MDM2 vermittelt. Hier sind dringend weitere Studien notwendig, um die einzelnen Funktionen von Nrf2 auch im zeitlichen Verlauf besser zu verstehen. Nicht zuletzt die Häufung von Todesfällen bei Dauerbehandlung mit Bardoxolon könnte durch ein erhöhtes Risiko für kardiale Komplikationen verursacht sein.

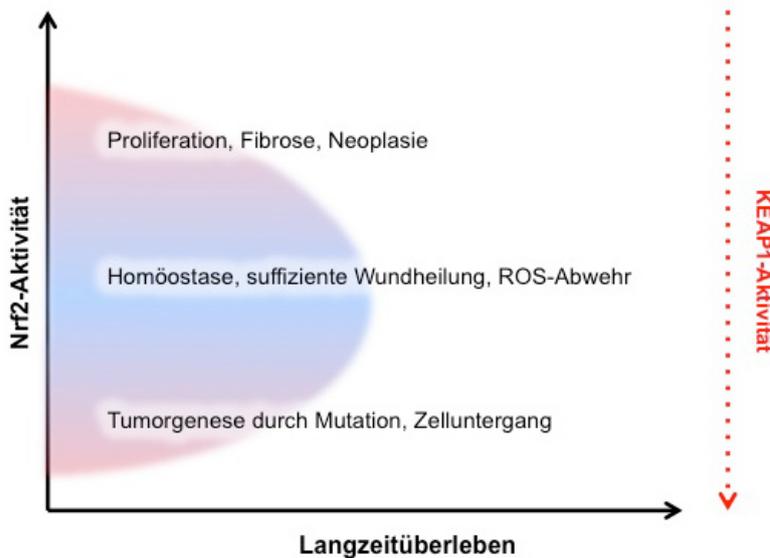


Abbildung 29: Nrf2-Aktivität und davon abhängige Veränderungen auf Zellebene. Bei geringer Nrf2-Aktivität droht die Schädigung durch ROS und somit auch Alterungsprozesse und Entartung. Bei zu hoher Nrf2-Aktivität steigt die Proliferationsrate. Bei Langzeittherapie zur Nrf2-Aktivierung drohen Gefahren, u.a. Fibrose und überschießende Proliferation. Abbildung nach [132]

Nrf2 nimmt eine über die bislang angenommenen Funktionen hinausreichende Vermittlerfunktion zwischen Entzündung, zellulärem Schutz und Proliferation ein und ist somit in der Lage, die epitheliale Wundheilung zu orchestrieren [132]. Bevor Sulforaphan am Menschen zur Therapie der ATN und der ANS zum Einsatz kommen kann, müssen *in vivo* Studien an der Maus vorgenommen werden. Hierbei gilt es auch zu testen, ob Sulforaphan durch die gleichzeitige Induktion von MDM2 und ROS-bekämpfenden Phase-II-Enzymen nur zu bestimmten Zeitpunkten nach Schädigung eingesetzt werden sollte, um das Potential einer neuartigen Therapie nach ANS optimal zu nutzen (vgl. auch Abb. 29). Angesichts des mitogenen Potentials von Nrf2 ist es essentiell, dass die Nrf2-Aktivierung nach akuter Schädigung kurz und präzise erfolgt. Ob ein natürlich vorkommender Nrf2-Agonist wie Sulforaphan eventuell besser verträglich ist als Bardoxolon, wird derzeit diskutiert, sodass auch dieser Faktor bei zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollte [259].

4.3 Tubuläre Progenitorzellen – wie agieren sie nach akuter Schädigung?

Noch bevor wir die Reihentestung von Zytokinen und Interleukinen an unseren primären Tubuluszellen durchführten, testeten wir im Assay die Regenerationsfähigkeit junger Mäuse gegenüber älterer (Abb. 14). Die 2-Wochen alten Mäuse wiesen eine signifikant

höhere Rate an überlebenden Zellen auf. Ob dieses Phänomen durch einen höheren Anteil von Vorläuferzellen bedingt ist, oder ob die jüngeren Zellen verbesserte Mechanismen zur Bekämpfung von ROS besitzen, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden. Es mangelt an zuverlässigen Markern für murine Progenitorzellen [200]. Der bei humanen Progenitorzellen vermehrt exprimierte Marker ALDH1 konnte in unseren Versuchen unter den Jungtieren nicht signifikant vermehrt nachgewiesen werden (vgl. Abb. 14).

Die Beantwortung der Frage, ob und inwieweit Tubulus-Progenitorzellen an der Regeneration der Tubuli beteiligt sind, war nicht Gegenstand dieser Studie. Romagnani et al. postulieren, dass vor allem residente Progenitorzellen an der Regeneration beteiligt sind [200]. Humphreys et al. widersprechen dieser These und erachten vor allem die überlebenden Zellen im Tubulus als prognostisch entscheidend [164]. Da eine gezielte Stammzelltherapie realistisch gesehen noch in weiter Ferne liegt, zielte unsere Studie auf die direkte Beeinflussung der Tubuluszellen ab: einerseits fanden wir eine Möglichkeit, die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber ROS mittels SRF-Therapie zu steigern, andererseits konnten wir das regenerative Wachstum durch rekombinantes IL-22 beschleunigen. Noch ohne Wissen um die residenten Progenitorzellen versuchten mehrere Arbeitsgruppen in den 90er Jahren, die Regeneration der Tubuli nach ischämischer ANS zu verbessern [314-316]. In Ratten wurde nach oder vor experimenteller ANS eine Therapie mit IGF-I oder EGF durchgeführt und die Tiere auf Anstieg des Harnstoff-Spiegels sowie auf histopathologische Veränderungen untersucht. Die Studien belegen einen Vorteil der IGF-I- und EGF-Therapie gegenüber der Kontrollgruppe. Konsistent hierzu stellte eine prospektive Studie zur Evaluation der IGF-I-Spiegel auf Intensivstationen einen Zusammenhang zwischen niedrigen IGF-I-Spiegeln und hoher Mortalität fest [317]. In unseren Experimenten konnte kein signifikanter ($p=0,1223$) Vorteil einer IGF-I-Therapie auf das Überleben der primären Tubuluszellen gezeigt werden, das Überleben konnte nur rund 1,3-fach gesteigert werden (vgl. Abb. 20). Der positive Effekt konnte also bestätigt werden, jedoch nur als Tendenz. Hier sind weitere Experimente mit größeren Gruppen notwendig (hier: $n=16$), um eine signifikante Veränderung nachzuweisen.

Gemäß unserer Screeningexperimente scheint es Stoffe zu geben, die ein größeres protektives und progeneratorisches Potential besitzen, als IGF-I. Trotzdem ist IGF-I ein interessanter Kandidat im Hinblick auf die aktuell geführte Stammzelldebatte. Ein Studie aus dem Jahr 2007 von Imberti et al. [318] fand heraus, dass IGF-I von mesenchymalen Stammzellen produziert wird, die bis dato auch schon in *in vivo* Versuchen zur Behandlung

der ANS eingesetzt wurden. Imberti et al. decken mit ihrer Studie den Mechanismus auf, der die teils positiven Beobachtungen erklären könnte: Mesenchymale Stammzellen (MSC), welche nach ANS Mäusen appliziert werden, könnten durch parakrine Ausschüttung von IGF-I die überlebenden Tubuluszellen stimulieren. Ob es noch weitere Quellen von IGF-I bei ANS gibt, ob das IGF-I auch in relevanten Mengen in die Blutbahn ausgeschwemmt wird und die Beobachtungen von Guimaraes et al. [317] erklärt, wurde bislang nicht untersucht. Es kann aber sein, dass den Stammzellen neben ihren von Haus aus regenerativem Potential eine zusätzliche, den dendritischen Zellen ähnliche Rolle bei der Regeneration des Tubulusepithels zukommt.

4.4 Stärken und Grenzen des methodischen Ansatzes

Die Mechanismen, welche die epitheliale Wundheilung der Tubuluszellen nach akuter Schädigung beeinflussen, werden aktuell kontrovers diskutiert. Bislang ist kein Medikament zur gezielten Förderung epithelialer Regeneration nach akutem Nierenversagen zugelassen. Wir nahmen an, es müsse lokal oder systemisch freigesetzte Moleküle und Signalstoffe geben, welche Überleben und Regeneration tubulärer Epithelzellen verbessern können. Lässt sich ein zuverlässiges Testsystem etablieren, um solche Signalstoffe zu identifizieren? Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob sich potentielle Kandidaten in einem Reihensystem testen lassen, ob es für die tubuläre Regeneration förderliche Moleküle gibt und auf welcher molekularen Ebene diese Signalstoffe wirken.

Bei der Isolation primärer Zellen beobachteten wir, dass die Isolationsmethode die ischämische Schädigung bei ANS imitiert. Zunächst prüften wir, ob sich das Maß der Regeneration messen und standardisieren ließe. Hierzu führten wir Versuche mit erwachsenen C57BL6 Mäusen durch. Danach verglichen wir die Regeneration verschieden alter Mäuse (2 Wochen alt versus 8 Wochen alt) und bemerkten einen dramatischen Vorteil der Zellen junger Mäuse gegenüber den älteren (vgl. Abb. 14).

In den nachfolgenden Experimenten mit insgesamt über 50 Zytokinen, Interleukinen und niedermolekularen Substanzen konnten wir zeigen, dass der Assay für *high throughput* Screeningexperimente geeignet ist. Die Auswertung lässt sich mittels Fremdsoftware auch teilweise automatisieren (nicht gezeigt). Die im ersten Schritt des Assays gezeigten Ergebnisse konnten konsistent in den nachfolgenden Schritten bestätigt werden. Damit steht uns der Assay als zuverlässiges und kostensparendes Tool zur Verfügung, bevor man aufwendige *in vivo* Experimente durchführt (Abbildung 30).

Unsere Ergebnisse stützen sich allein auf die Beobachtungen der Zellkultur. Die hier gesammelten Erfahrungen lassen sich nicht unbedingt eins zu eins in *in vivo* Modelle übertragen, sie dienen unter anderem dazu, die Kosteneffizienz von zukünftigen *in vivo* Versuchen zu steigern. Wir verwendeten zwar primäre murine Zellen und nicht immortalisierte Zelllinien, sodass wir von einem *in vivo*-nahen Phäno- und Genotyp ausgehen können. Zellen in Kultur reagieren auf verschiedene Reize möglicherweise anders, als es im Organ belassene Zellen tun würden. Ein wesentliches Manko der Zellkultur ist die fehlende Cokultur mit anderen Zelltypen. Diverse Studien haben aber belegt, dass gerade Zellen wie

z.B. dendritische Zellen, Makrophagen oder Myofibroblasten Einfluss auf die Reparatur nach akuter Schädigung nehmen. Diese Bedingungen sind *in vitro* - wenn überhaupt - nur schwer nachzuahmen. Zytokine, die auf interstitielle Zellen wirken und so Einflussnahme auf die Regeneration der Tubuli auswirken können durch unseren Ansatz ebenfalls nicht erkannt werden. Auch ist nicht gesichert, dass i.v.-applizierte Zytokine oder andere Moleküle auch wirklich zu den Tubuluszellen gelangen, und nicht durch die Leber beispielsweise eliminiert werden. Diese Kontrolle der Konzentrationen im Medium ist *in vitro* einfacher zu bewerkstelligen. So ist nicht gesichert, dass die Versuche *in vivo* mit identischen Ergebnissen reproduziert werden. Im Falle von IL-22 ist dies erfreulicherweise geglückt, Kulkarni et al. konnten ähnlich vielversprechende Beobachtungen *in vivo* wie *in vitro* machen. Ungeklärt ist in Zukunft auch, wie sich die mögliche Therapie mit solchen Botenstoffen auf den Gesamtorganismus auswirkt. Die Häufung von Zwischenfällen in Phase-III Bardoxolon-Studien lassen vermuten, dass das Nebenwirkungspotential vielfältiger ist, als zunächst in Phase-I und Phase-II Studien erwartet wurde. Wir vermuten auch, dass ROS physiologisch eine weitaus wichtigere Funktion für die Homöostase ausübt, als bisher angenommen. Die in unseren Studien geprüften Kandidaten sind dementsprechend auf alle ihre Wirkungen auf verschiedene Signalwege zu untersuchen, bevor sie in klinischen Studien eingesetzt werden. Geht man bei der ANS-Therapie jedoch von einem kürzeren Therapieintervall als bei CKD-Therapie aus, so besteht die Chance, dass die Toxizität der Behandlung weniger ins Gewicht fällt.

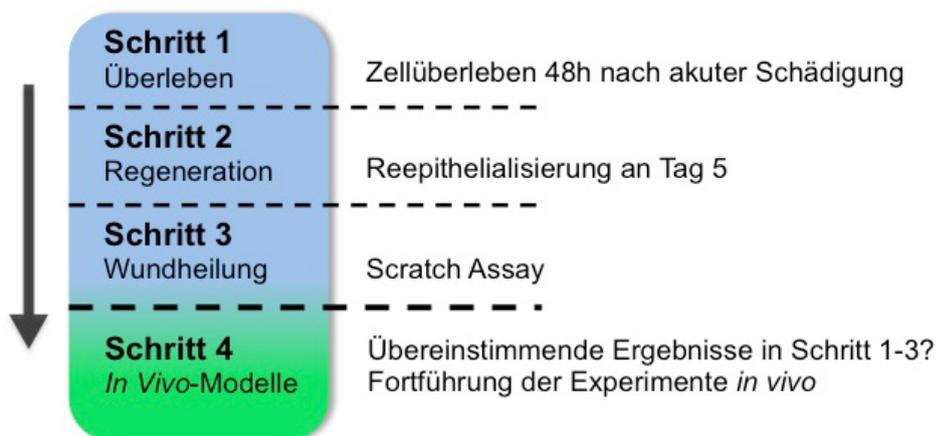


Abbildung 30: Aufbau des Regenerations-Assays in einzelnen Schritten. Die Isolation der TEC initiiert die akute Tubulusnekrose durch Ischämie und oxidativen Stress. Überleben wird nach 48h, Regeneration nach 5 Tagen per standardisierter Methode ausgewertet. Die primären Zellen werden nach Ausbildung eines *Monolayers* im *Scratch Assay* weiterverwendet. Bei konsistenten Ergebnissen kann zu *in vivo* Versuchen oder weiterführender molekularer Untersuchung übergegangen werden. Der Assay ist durch seinen einfachen Aufbau auch für große Screening-Experimente geeignet.

5 Zusammenfassung

Die Regeneration nach akutem Tubulusschaden geschieht teilweise aus überlebenden Tubuluszellen, teilweise aus tubulären Progenitorzellen. Unzureichende Proliferation und Migration der Tubuluszellen nach ANS resultiert langfristig in Fibrose und renalem Funktionsverlust. Die Mechanismen der Reparatur werden zunehmend besser verstanden, jedoch existieren keine Therapeutika, um die Regeneration nach ANS zu verbessern. Angesichts der Häufigkeit des Krankheitsbildes besteht hier Handlungsbedarf. Tierstudien mit Mäusen sind ethisch bedenklich und teuer und bestehende *in vitro* Modelle verwenden meist immortalisierte Zelllinien. Wir konnten einen neuen Assay entwickeln, der primäre, murine Tubuluszellen mehrere Versuche durchlaufen lässt und so die akute Tubulusschädigung *in vitro* simuliert. Der Assay verwendet neuartige Auswertungsmethoden und erlaubt die Reihentestung vieler verschiedener *compounds* zur Behandlung der akuten Tubulusnekrose.

Die Zellen von C57BL6-Mäusen werden nach der Isolation in speziellem Nährmedium kultiviert und teilweise mit Therapiekandidaten inkubiert. Dabei wird per Mikroskopie die Zahl neuer Kolonien (Überleben) sowie die Reepithelialisierung (Regeneration) untersucht. Nach Erreichen eines *Monolayers* wird ein Scratch Assay durchgeführt (Wundheilung).

Wir konnten zeigen, dass oxidativer Stress eine der wesentlichen Ursachen für die Zellschädigung nach Isolation darstellt. Junge Mäuse (2 Wochen) scheinen widerstandsfähigere Zellen zu besitzen als ältere Mäuse, was deren im Vergleich vielfach besseres Abschneiden in unserem Regenerationsassay erklärt. In mehreren Screeningversuchen konnten im Wesentlichen zwei Therapiekandidaten für die ATN identifiziert werden: Sulforaphan (SRF) und Interleukin-22 (IL-22). Beide steigern signifikant das regenerative Wachstum nach akuter Schädigung. SRF als Nrf2-Agonist ist darüber hinaus in der Lage, die Widerstandsfähigkeit der überlebenden Zellen zu steigern, indem Enzyme zur Abwehr von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) induziert werden.

Unser Assay ermöglicht erstmals die Durchführung von großen Screening-Experimenten *in vitro* zur Behandlung der tubulären Regeneration, indem die Isolation der primären Tubuluszellen die ATN simuliert. SRF induziert den Transkriptionsfaktor Nrf2, welcher neben der ROS-Abwehr auch Entzündung und Proliferation der Zellen beeinflusst. IL-22 ist ein Kandidat zur Behandlung der tubulären Regeneration, welches in die Interaktion zwischen DCs und Epithelzellen eingreift.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ANS	Akute Nierenschädigung
ANV	Akutes Nierenversagen
ARE	<i>Antioxidant response element</i>
ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATN	Akute Tubulusnekrose
CCL	<i>Chemokine ligand</i>
CXCL	<i>Chemokine CXC ligand</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CNC	<i>Cap'n'Collar</i> (Transkriptionsfaktorfamilie)
DAMP	<i>Danger- associated molecular patterns</i>
DAPI (Färbung)	4',6-Diamidin-2-phenylindol (färbt DNA blau)
DC	Dendritische Zellen
DEAB	Diethylaminobenzylaldehyd
ECL	Enzymatische Chemilumineszenzreaktion
EMT	<i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i>
FCS (syn. FBS)	<i>Fetal calf serum</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HEK-Zellen	<i>Human embryonic kidney cells</i> (Zelllinie)
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HO-1	Hämoxigenase 1
i.p.	Intraperitoneal
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukin
kD	Kilodalton (Maßeinheit für Proteingröße)
Keap1	<i>Kelch ECH associating protein 1</i>
KG	Körpergewicht

m- / μ - / nl	Milli- / Mikro- / Nanoliter (analog: -Meter, ...)
MAP	<i>Mean arterial pressure</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i>
MEF-Zellen	<i>Mice embryonic fibroblasts</i> (Zelllinie)
MTS	Tetrazolin-Metabolit für den <i>proliferation assay</i>
NADH / NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid / -Phosphat
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NQO1	NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase 1
OR	<i>Odds ratio</i>
P/S	Penicillin-Streptomycin-Zellkulturzusatz
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RRT	<i>Renal replacement therapy</i>
s.c.	subcutan
SIRT1	Sirtuin / silent mating type information regulation 2 homolog
SIRS	<i>Severe inflammatory distress syndrome</i>
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TEC	Tubulusepithelzelle
TGF β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
TNF α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
UUO	<i>Unilateral urethral obstruction</i>
VCAM	<i>Vascular adhesion molecule</i>

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: AKIN- und RIFLE-Kriterien zur Definition der akuten Nierenschädigung.	11
Abbildung 2: Biopsie einer von Glomerulonephritis befallenen Niere.....	17
Abbildung 3: Klinischer Verlauf der ANS.	19
Abbildung 4: Histologisches Bild der akuten Tubulusnekrose..	22
Abbildung 5: Pathomechanismen der akuten Tubulusnekrose.	26
Abbildung 6: Expression embryonaler Marker und Dedifferenzierung.....	28
Abbildung 7: Phasen der epithelialen Wundheilung.....	29
Abbildung 8: Zwei mögliche Konzepte der tubulären Regeneration.	34
Abbildung 9: Begrenzte vs. diffuse Schädigung.....	36
Abbildung 10: Makrophagen-Plastizität in den verschiedenen Phasen der Entzündungsreaktion.	39
Abbildung 11: Immunfluoreszenz-Mikroskopie und qRT-PCR der Tubuluszellen.....	60
Abbildung 12: Reinheit der Tubuluszellkultur.....	60
Abbildung 13: Frisch isolierte Tubulussegmente und Kolonien.	61
Abbildung 14: Entwicklung eines neuen Regenerationsassays für Tubulusepithelzellen.	63
Abbildung 15 (oben links): Markierung der Platte und Skizzierung des Scratch Assay	64
Abbildung 16 (oben rechts): Markierung der Platte für den In Vitro Regenerations-Assay.....	64
Abbildung 17 (unten): Beispiel eines Scratch Assays.....	64
Abbildung 18 (oben): Auswertung des Überlebens am Mikroskop.	65
Abbildung 19 (unten): Auswertung der Regeneration am Mikroskop.....	65
Abbildung 20: Sulforaphan im Regenerationsassay-Screeningexperiment.....	67
Abbildung 21: Sulforaphan im Regenerationsassay-Screeningexperiment.....	68
Abbildung 22: Dosisabhängige Wirkung von Sulforaphan im Regenerationsassay.....	69
Abbildung 23: mRNA-Expression von Phase-2-Enzymen sowie MDM2 nach Sulforaphan-Stimulation. ..	71
Abbildung 24: Regenerationsassay mit funktioneller Blockade von MDM2.....	72
Abbildung 25: Proliferationsassay unter Stimulation mit Interleukin-22	75
Abbildung 26: Screening mit Interleukinen im Regenerationsassay.....	76
Abbildung 27: Dosisabhängige Wirkung von Interleukin-22 im Regenerationsassay.	77
Abbildung 28: mRNA des IL-22Rezeptors / Scratch Assay mit IL-22 Antagonisten	78
Abbildung 29: Nrf2-Aktivität und davon abhängige Veränderungen auf Zellebene.....	88
Abbildung 30: Aufbau des Regenerations-Assay in einzelnen Schritten..	92
Abbildung 31: qRT-PCR-Ergebnisse (Zytokinrezeptorexpression).....	115

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Neue Biomarker zur Früherkennung der ATN.....	16
Tabelle 2: DNA-Primer-Sequenzen (alle murin)	51

9 Literaturverzeichnis

1. Mehta, R.L. and G.M. Chertow, *Acute renal failure definitions and classification: time for change?* J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8): p. 2178-87.
2. Bellomo, R., et al., *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group.* Crit Care, 2004. **8**(4): p. R204-12.
3. Levin, A., et al., *Improving outcomes from acute kidney injury: report of an initiative.* Am J Kidney Dis, 2007. **50**(1): p. 1-4.
4. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.* Crit Care, 2007. **11**(2): p. R31.
5. Molitoris, B.A., et al., *Improving outcomes from acute kidney injury.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(7): p. 1992-4.
6. Waikar, S.S., et al., *Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 1143-50.
7. Ali, T., et al., *Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(4): p. 1292-8.
8. Chertow, G.M., et al., *Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients.* J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3365-70.
9. Hou, S.H., et al., *Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study.* Am J Med, 1983. **74**(2): p. 243-8.
10. Hsu, C.Y., et al., *Community-based incidence of acute renal failure.* Kidney Int, 2007. **72**(2): p. 208-12.
11. Xue, J.L., et al., *Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001.* J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(4): p. 1135-42.
12. Shusterman, N., et al., *Risk factors and outcome of hospital-acquired acute renal failure. Clinical epidemiologic study.* Am J Med, 1987. **83**(1): p. 65-71.
13. Foster, T.S., et al., *Assessment of the economic burden of COPD in the U.S.: a review and synthesis of the literature.* COPD, 2006. **3**(4): p. 211-8.
14. Bhalla, V. and K.R. Hallows, *Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications.* J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(10): p. 1845-54.
15. Kopan, R., H.T. Cheng, and K. Surendran, *Molecular insights into segmentation along the proximal-distal axis of the nephron.* J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(7): p. 2014-20.
16. Mathieson, P.W., *Update on the podocyte.* Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. **18**(3): p. 206-11.
17. Abuelo, J.G., *Normotensive ischemic acute renal failure.* N Engl J Med, 2007. **357**(8): p. 797-805.
18. Bonventre, J.V. and L. Yang, *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury.* J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4210-21.
19. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation.* Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1391-401.
20. Myers, B.D. and S.M. Moran, *Hemodynamically mediated acute renal failure.* N Engl J Med, 1986. **314**(2): p. 97-105.
21. Myers, B.D., et al., *Pathophysiology of hemodynamically mediated acute renal failure in man.* Kidney Int, 1980. **18**(4): p. 495-504.
22. Shchekochikhin, D., R.W. Schrier, and J. Lindenfeld, *Cardiorenal syndrome: pathophysiology and treatment.* Curr Cardiol Rep, 2013. **15**(7): p. 380.

23. van der Graaf, A.M., et al., *From preeclampsia to renal disease: a role of angiogenic factors and the renin-angiotensin aldosterone system?* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27 Suppl 3**: p. iii51-7.
24. Lapi, F., et al., *Concurrent use of diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors, and angiotensin receptor blockers with non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: nested case-control study.* BMJ, 2013. **346**: p. e8525.
25. Woittiez, K.J., M. van Buren, and J. Kesecioglu, *Renal artery stenosis: a classic presentation, a rare cause.* BMJ Case Rep, 2012. doi: **10.1136/bcr-2012-006499**.
26. Angeli, P. and F. Morando, *Optimal management of hepatorenal syndrome in patients with cirrhosis.* Hepat Med, 2010. **2**: p. 87-98.
27. Liano, F. and J. Pascual, *Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study.* Madrid Acute Renal Failure Study Group. Kidney Int, 1996. **50**(3): p. 811-8.
28. Certikova-Chabova, V. and V. Tesar, *Recent insights into the pathogenesis of nephrotic syndrome.* Minerva Med, 2013. **104**(3): p. 333-47.
29. Lech, M. and H.J. Anders, *The pathogenesis of lupus nephritis.* J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(9): p. 1357-66.
30. Wyatt, R.J. and B.A. Julian, *IgA nephropathy.* N Engl J Med, 2013. **368**(25): p. 2402-14.
31. Tai, P.W., L.C. Chen, and C.H. Huang, *Hanta hemorrhagic fever with renal syndrome: a case report and review.* J Microbiol Immunol Infect, 2005. **38**(3): p. 221-3.
32. Bogdanovic, R., et al., *Renal involvement in primary Sjogren syndrome of childhood: case report and literature review.* Mod Rheumatol, 2013. **23**(1): p. 182-9.
33. Fonseca, F.F., F.Y. Tanno, and H.T. Nguyen, *Current options in the management of primary vesicoureteral reflux in children.* Pediatr Clin North Am, 2012. **59**(4): p. 819-34.
34. Helal, I., *Autosomal dominant polycystic kidney disease: new insights into treatment.* Saudi J Kidney Dis Transpl, 2013. **24**(2): p. 230-4.
35. Jha, V., et al., *Chronic kidney disease: global dimension and perspectives.* Lancet, 2013. **382**(9888): p. 260-72.
36. Kronbichler, A. and G. Mayer, *Renal involvement in autoimmune connective tissue diseases.* BMC Med, 2013. **11**: p. 95.
37. Rejnmark, L., P. Vestergaard, and L. Mosekilde, *Nephrolithiasis and renal calcifications in primary hyperparathyroidism.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(8): p. 2377-85.
38. Tkachenko, O., et al., *Renin-angiotensin-aldosterone system in autosomal dominant polycystic kidney disease.* Curr Hypertens Rev, 2013. **9**(1): p. 12-20.
39. Chang, Y.S., *Hypersensitivity reactions to proton pump inhibitors.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2012. **12**(4): p. 348-53.
40. Coca, S.G. and M.A. Perazella, *Early steroid treatment for drug-induced acute interstitial nephritis.* Nat Clin Pract Nephrol, 2008. **4**(6): p. 298-9.
41. Perazella, M.A. and G.S. Markowitz, *Drug-induced acute interstitial nephritis.* Nat Rev Nephrol, 2010. **6**(8): p. 461-70.
42. Ulinski, T., et al., *Acute tubulointerstitial nephritis.* Pediatr Nephrol, 2012. **27**(7): p. 1051-7.
43. Schrier, R.W. and W. Wang, *Acute Renal Failure and Sepsis.* N Engl J Med, 2004. **351**(2): p. 159-169.
44. Anders, H.-J., B. Banas, and D. Schlöndorff, *Signaling danger: Toll-like receptors and their potential roles in kidney disease.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(4): p. 854-867.

45. Leemans, J.C., et al., *Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2894-2903.
46. Wu, H., et al., *TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2847-2859.
47. Better, O.S. and J.H. Stein, *Early management of shock and prophylaxis of acute renal failure in traumatic rhabdomyolysis*. N Engl J Med, 1990. **322**(12): p. 825-9.
48. Odeh, M., *The role of reperfusion-induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome*. N Engl J Med, 1991. **324**(20): p. 1417-22.
49. Zager, R.A., *Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury*. Lab Invest, 1989. **60**(5): p. 619-29.
50. Zager, R.A., *Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure*. Kidney Int, 1996. **49**(2): p. 314-26.
51. Bartal, C., et al., *Crush syndrome: saving more lives in disasters: lessons learned from the early-response phase in Haiti*. Arch Intern Med, 2011. **171**(7): p. 694-6.
52. Oda, J., et al., *Analysis of 372 patients with Crush syndrome caused by the Hanshin-Awaji earthquake*. J Trauma, 1997. **42**(3): p. 470-5; discussion 475-6.
53. Sever, M.S., et al., *The Marmara earthquake: epidemiological analysis of the victims with nephrological problems*. Kidney Int, 2001. **60**(3): p. 1114-23.
54. Sheng, Z.Y., *Medical support in the Tangshan earthquake: a review of the management of mass casualties and certain major injuries*. J Trauma, 1987. **27**(10): p. 1130-5.
55. Bhanushali, G.K., et al., *AKI associated with synthetic cannabinoids: a case series*. Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(4): p. 523-6.
56. Myburgh, J.A., et al., *Hydroxyethyl starch or saline in intensive care*. N Engl J Med, 2013. **368**(8): p. 775.
57. Perner, A., et al., *Hydroxyethyl starch 130/0.42 versus Ringer's acetate in severe sepsis*. N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 124-34.
58. Rocco, M., et al., *Risk factors for acute kidney injury in critically ill patients receiving high intravenous doses of colistin methanesulfonate and/or other nephrotoxic antibiotics: a retrospective cohort study*. Crit Care, 2013. **17**(4): p. R174.
59. Wiedermann, C.J., et al., *Hyperoncotic colloids and acute kidney injury: a meta-analysis of randomized trials*. Crit Care, 2010. **14**(5): p. R191.
60. Zarychanski, R., et al., *Association of hydroxyethyl starch administration with mortality and acute kidney injury in critically ill patients requiring volume resuscitation: a systematic review and meta-analysis*. JAMA, 2013. **309**(7): p. 678-88.
61. Barrett, B.J., *Contrast nephrotoxicity*. J Am Soc Nephrol, 1994. **5**(2): p. 125-37.
62. Parfrey, P.S., et al., *Contrast material-induced renal failure in patients with diabetes mellitus, renal insufficiency, or both. A prospective controlled study*. N Engl J Med, 1989. **320**(3): p. 143-9.
63. Rudnick, M.R., et al., *Nephrotoxicity of ionic and nonionic contrast media in 1196 patients: a randomized trial. The Iohexol Cooperative Study*. Kidney Int, 1995. **47**(1): p. 254-61.
64. Schwab, S.J., et al., *Contrast nephrotoxicity: a randomized controlled trial of a nonionic and an ionic radiographic contrast agent*. N Engl J Med, 1989. **320**(3): p. 149-53.
65. Agmon, Y., et al., *Nitric oxide and prostanoids protect the renal outer medulla from radiocontrast toxicity in the rat*. J Clin Invest, 1994. **94**(3): p. 1069-75.
66. Cantley, L.G., et al., *Role of endothelin and prostaglandins in radiocontrast-induced renal artery constriction*. Kidney Int, 1993. **44**(6): p. 1217-23.
67. Detrenis, S., et al., *Lights and shadows on the pathogenesis of contrast-induced nephropathy: state of the art*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(8): p. 1542-50.

68. Heyman, S.N., C. Rosenberger, and S. Rosen, *Regional alterations in renal haemodynamics and oxygenation: a role in contrast medium-induced nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20 Suppl 1**: p. i6-11.
69. Persson, P.B., P. Hansell, and P. Liss, *Pathophysiology of contrast medium-induced nephropathy*. Kidney Int, 2005. **68**(1): p. 14-22.
70. Russo, D., et al., *Early effects of contrast media on renal hemodynamics and tubular function in chronic renal failure*. J Am Soc Nephrol, 1995. **6**(5): p. 1451-8.
71. Weisberg, L.S., P.B. Kurnik, and B.R. Kurnik, *Radiocontrast-induced nephropathy in humans: role of renal vasoconstriction*. Kidney Int, 1992. **41**(5): p. 1408-15.
72. Perazella, M.A., *Crystal-induced acute renal failure*. Am J Med, 1999. **106**(4): p. 459-65.
73. Teichman, J.M., *Clinical practice. Acute renal colic from ureteral calculus*. N Engl J Med, 2004. **350**(7): p. 684-93.
74. Mulay, S.R., A. Evan, and H.J. Anders, *Molecular mechanisms of crystal-related kidney inflammation and injury. Implications for cholesterol embolism, crystalline nephropathies and kidney stone disease*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **Mar;29**(3):507-14.
75. Mulay, S.R., et al., *Calcium oxalate crystals induce renal inflammation by NLRP3-mediated IL-1beta secretion*. J Clin Invest, 2013. **123**(1): p. 236-46.
76. Hoppe, B., *An update on primary hyperoxaluria*. Nat Rev Nephrol, 2012. **8**(8): p. 467-75.
77. Hein, R., et al., *Symptomatic sulfadiazine crystalluria in AIDS patients: a report of two cases*. Clin Nephrol, 1993. **39**(5): p. 254-6.
78. Herlitz, L.C., et al., *Tenofovir nephrotoxicity: acute tubular necrosis with distinctive clinical, pathological, and mitochondrial abnormalities*. Kidney Int, 2010. **78**(11): p. 1171-7.
79. Nakamoto, Y., et al., *Irreversible tubulointerstitial nephropathy associated with prolonged, massive intake of vitamin C*. Nephrol Dial Transplant, 1998. **13**(3): p. 754-6.
80. Sawyer, M.H., et al., *Acyclovir-induced renal failure. Clinical course and histology*. Am J Med, 1988. **84**(6): p. 1067-71.
81. Widemann, B.C. and P.C. Adamson, *Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity*. Oncologist, 2006. **11**(6): p. 694-703.
82. Thadhani, R., M. Pascual, and J.V. Bonventre, *Acute renal failure*. N Engl J Med, 1996. **334**(22): p. 1448-60.
83. Bonventre, J.V., *Diagnosis of acute kidney injury: from classic parameters to new biomarkers*. Contrib Nephrol, 2007. **156**: p. 213-9.
84. Cruz, D.N., et al., *Use of biomarkers to assess prognosis and guide management of patients with acute kidney injury*. Contrib Nephrol, 2013. **182**: p. 45-64.
85. Perazella, M.A. and S.G. Coca, *Traditional urinary biomarkers in the assessment of hospital-acquired AKI*. Clin J Am Soc Nephrol, 2012. **7**(1): p. 167-74.
86. Vanmassenhove, J., et al., *Urinary and serum biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: an in-depth review of the literature*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(2): p. 254-73.
87. Constantin, J.M., et al., *Plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin is an early marker of acute kidney injury in adult critically ill patients: a prospective study*. J Crit Care, 2010. **25**(1): p. 176 e1-6.
88. Han, W.K., et al., *Urinary biomarkers in the early detection of acute kidney injury after cardiac surgery*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(5): p. 873-82.
89. Herget-Rosenthal, S., et al., *Prognostic value of tubular proteinuria and enzymuria in nonoliguric acute tubular necrosis*. Clin Chem, 2004. **50**(3): p. 552-8.

90. Trof, R.J., et al., *Biomarkers of acute renal injury and renal failure*. Shock, 2006. **26**(3): p. 245-53.
91. Uchida, K. and A. Gotoh, *Measurement of cystatin-C and creatinine in urine*. Clin Chim Acta, 2002. **323**(1-2): p. 121-8.
92. Mishra, J., et al., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery*. Lancet, 2005. **365**(9466): p. 1231-8.
93. Post, T.W.R., B.D., *Diagnostic approach to the patient with acute kidney injury (acute renal failure) or chronic kidney disease*. UpToDate, 2012. **Online library**(Topic 7188, Version 12.0).
94. Appel, G.B., *Renal biopsy: How effective, what technique, and how safe*. J Nephrol, 1993. **6**(4).
95. Madaio, M.P., *Renal biopsy*. Kidney Int, 1990. **38**(3): p. 529-43.
96. Hagemann, J.H., et al., *Danger control programs cause tissue injury and remodeling*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(6): p. 11319-46.
97. Okusa, M.D.R., M.H., *Overview of management of acute kidney injury (acute renal failure)*. UpToDate, 2013. **Online library**(Topic 14035, Version 9.0).
98. Grams, M.E., et al., *Fluid balance, diuretic use, and mortality in acute kidney injury*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(5): p. 966-73.
99. Myers, B.D., et al., *Nature of the renal injury following total renal ischemia in man*. J Clin Invest, 1984. **73**(2): p. 329-41.
100. Spurney, R.F., W.J. Fulkerson, and S.J. Schwab, *Acute renal failure in critically ill patients: prognosis for recovery of kidney function after prolonged dialysis support*. Crit Care Med, 1991. **19**(1): p. 8-11.
101. Ishani, A., et al., *Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(1): p. 223-8.
102. Lo, L.J., et al., *Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease*. Kidney Int, 2009. **76**(8): p. 893-9.
103. Wald, R., et al., *Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis*. JAMA, 2009. **302**(11): p. 1179-85.
104. Hsu, C.Y., et al., *The risk of acute renal failure in patients with chronic kidney disease*. Kidney Int, 2008. **74**(1): p. 101-7.
105. Sutton, T.A., C.J. Fisher, and B.A. Molitoris, *Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2002. **62**(5): p. 1539-49.
106. Okusa, M.D., et al., *The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(3): p. 520-2.
107. Schiffl, H., *Renal recovery from acute tubular necrosis requiring renal replacement therapy: a prospective study in critically ill patients*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(5): p. 1248-52.
108. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. JAMA, 2005. **294**(7): p. 813-8.
109. Liangos, O., et al., *Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey*. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. **1**(1): p. 43-51.
110. Coca, S.G., et al., *Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis*. Am J Kidney Dis, 2009. **53**(6): p. 961-73.
111. Chertow, G.M., et al., *Mortality after acute renal failure: models for prognostic stratification and risk adjustment*. Kidney Int, 2006. **70**(6): p. 1120-6.
112. Bonventre, J.V. and J.M. Weinberg, *Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(8): p. 2199-210.
113. Devarajan, P., *Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(6): p. 1503-20.

114. Schrier, R.W., et al., *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. J Clin Invest, 2004. **114**(1): p. 5-14.
115. Bonventre, J.V., *Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair*. Contrib Nephrol, 2010. **165**: p. 9-17.
116. Kelly, K.J., et al., *Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury*. J Clin Invest, 1996. **97**(4): p. 1056-63.
117. Oliver, J., M. Mac Dowell, and A. Tracy, *The pathogenesis of acute renal failure associated with traumatic and toxic injury; renal ischemia, nephrotoxic damage and the ischemic episode*. J Clin Invest, 1951. **30**(12:1): p. 1307-439.
118. Kaushal, G.P., A.G. Basnakian, and S.V. Shah, *Apoptotic pathways in ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 500-6.
119. Saikumar, P. and M.A. Venkatachalam, *Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney*. Semin Nephrol, 2003. **23**(6): p. 511-21.
120. Ofengeim, D. and J. Yuan, *Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(11): p. 727-36.
121. Lerma EV, A.M., Kelly B, <http://emedicine.medscape.com/article/238064-overview>.
122. Devarajan, P., *Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis*. Curr Opin Pediatr, 2005. **17**(2): p. 193-9.
123. Woroniecki, R., et al., *Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(2): p. F358-64.
124. Miyata, T., K. Kurokawa, and C. Van Ypersele De Strihou, *Advanced glycation and lipoxidation end products: role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1744-1752.
125. Himmelfarb, J.M., E.; Freedman, S.; Klenzak, J.; Mc-Menamin, E.; Le, P.; Pupim, L.B.; Ikizler, T.A., *The PICARD Group: Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**: p. 2449-2456.
126. Bae, Y.S., et al., *Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling*. Mol Cells, 2011. **32**(6): p. 491-509.
127. Nathan, C. and A. Ding, *SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI)*. Cell, 2010. **140**(6): p. 951-951 e2.
128. Brunet, A., et al., *Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2011-5.
129. Collino, M., et al., *Modulation of the oxidative stress and inflammatory response by PPAR-gamma agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion*. Eur J Pharmacol, 2006. **530**(1-2): p. 70-80.
130. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
131. Harding, H.P., et al., *An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress*. Mol Cell, 2003. **11**(3): p. 619-33.
132. Maher, J. and M. Yamamoto, *The rise of antioxidant signaling--the evolution and hormetic actions of Nrf2*. Toxicol Appl Pharmacol, 2010. **244**(1): p. 4-15.
133. Ryu, H., et al., *Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons*. J Neurosci, 2003. **23**(9): p. 3597-606.
134. Aoki, Y., et al., *Enhanced spontaneous and benzo(a)pyrene-induced mutations in the lung of Nrf2-deficient gpt delta mice*. Cancer Res, 2007. **67**(12): p. 5643-8.
135. Ishii, T., et al., *Role of Nrf2 in the regulation of CD36 and stress protein expression in murine macrophages: activation by oxidatively modified LDL and 4-hydroxynonenal*. Circ Res, 2004. **94**(5): p. 609-16.

136. Itoh, K., et al., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(2): p. 313-22.
137. Maher, J.M., et al., *Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway*. Hepatology, 2007. **46**(5): p. 1597-610.
138. Sekhar, K.R., et al., *Redox-sensitive interaction between KIAA0132 and Nrf2 mediates indomethacin-induced expression of gamma-glutamylcysteine synthetase*. Free Radic Biol Med, 2002. **32**(7): p. 650-62.
139. Kobayashi, A., et al., *Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(16): p. 7130-9.
140. Hong, F., M.L. Freeman, and D.C. Liebler, *Identification of sensor cysteines in human Keap1 modified by the cancer chemopreventive agent sulforaphane*. Chem Res Toxicol, 2005. **18**(12): p. 1917-26.
141. Anders, H.J., *Four danger response programs determine glomerular and tubulointerstitial kidney pathology: Clotting, inflammation, epithelial and mesenchymal healing*. Organogenesis, 2012. **8**(2): p. 29-40.
142. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 476-83.
143. Novak, M.L. and T.J. Koh, *Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair*. Am J Pathol, 2013. **183**(5): p. 1352-63.
144. Rabb, H., et al., *Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **279**(3): p. F525-31.
145. Gandolfo, M.T., et al., *Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury*. Kidney Int, 2009. **76**(7): p. 717-29.
146. Wangsiripaisan, A., et al., *Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions*. Kidney Int, 2001. **59**(3): p. 932-40.
147. Carlstrom, M., C.S. Wilcox, and W.J. Arendshorst, *Renal autoregulation in health and disease*. Physiol Rev, 2015. **95**(2): p. 405-511.
148. Konigova, R. and V. Rychterova, *Marjolin's ulcer*. Acta Chir Plast, 2000. **42**(3): p. 91-4.
149. Trent, J.T. and R.S. Kirsner, *Wounds and malignancy*. Adv Skin Wound Care, 2003. **16**(1): p. 31-4.
150. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-321.
151. Bonventre, J.V., *Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(suppl 1): p. S55-S61.
152. Kusaba, T., et al., *Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **Jan 28**;111(4): p. 1527-32.
153. Andersson, G. and E. Jennische, *IGF-I immunoreactivity is expressed by regenerating renal tubular cells after ischaemic injury in the rat*. Acta Physiol Scand, 1988. **132**(4): p. 453-7.
154. Davies, J.A. and C.E. Fisher, *Genes and proteins in renal development*. Exp Nephrol, 2002. **10**(2): p. 102-13.
155. Ichimura, T., et al., *Induction of FGF-7 after kidney damage: a possible paracrine mechanism for tubule repair*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 2): p. F967-76.
156. Ichimura, T., et al., *FGF-1 in normal and regenerating kidney: expression in mononuclear, interstitial, and regenerating epithelial cells*. Am J Physiol, 1995. **269**(5 Pt 2): p. F653-62.

157. Nagaike, M., et al., *Renotropic functions of hepatocyte growth factor in renal regeneration after unilateral nephrectomy*. J Biol Chem, 1991. **266**(34): p. 22781-4.
158. Ouellette, A.J., et al., *Expression of two "immediate early" genes, Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice*. J Clin Invest, 1990. **85**(3): p. 766-71.
159. Rogers, S.A., G. Ryan, and M.R. Hammerman, *Insulin-like growth factors I and II are produced in the metanephros and are required for growth and development in vitro*. J Cell Biol, 1991. **113**(6): p. 1447-53.
160. Rackley, R.R., et al., *In situ expression of the early growth response gene-1 during murine nephrogenesis*. J Urol, 1995. **154**(2 Pt 2): p. 700-5.
161. Koseki, C., D. Herzlinger, and Q. al-Awqati, *Apoptosis in metanephric development*. J Cell Biol, 1992. **119**(5): p. 1327-33.
162. Coles, H.S., J.F. Burne, and M.C. Raff, *Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor*. Development, 1993. **118**(3): p. 777-84.
163. Lieberthal, W. and J.S. Levine, *Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury*. Am J Physiol, 1996. **271**(3 Pt 2): p. F477-88.
164. Humphreys, B.D., et al., *Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors*. Proc Natl Acad Sci, 2011. **108**(22): p. 9226-9231.
165. Sugimoto, H., et al., *Bone-marrow-derived stem cells repair basement membrane collagen defects and reverse genetic kidney disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(19): p. 7321-6.
166. Levenson, S.M., et al., *The Healing of Rat Skin Wounds*. Ann Surg, 1965. **161**: p. 293-308.
167. Haupt, Y., et al., *Mdm2 promotes the rapid degradation of p53*. Nature, 1997. **387**(6630): p. 296-9.
168. Mulay, S.R., et al., *MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice*. Kidney Int, 2012. **81**(12): p. 1199-211.
169. Thomasova, D., ; Mulay, S.R.; Bruns, H.; Anders, H.-J., *p53-independent roles of MDM2 in NF-kB signaling: Implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases*. Neoplasia, 2012. **14**(12): p. 1097-1101.
170. Thomasova, D. and H. Anders, *Cell cycle control in the kidney*. Nephrol Dial Transplant, 2014.
171. Grande, M.T. and J.M. Lopez-Novoa, *Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy*. Nat Rev Nephrol, 2009. **5**(6): p. 319-28.
172. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
173. Liu, Y., *Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics*. Kidney Int, 2006. **69**(2): p. 213-7.
174. Liu, Y., *New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(2): p. 212-22.
175. Quaggin, S.E. and A. Kapus, *Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition*. Kidney Int, 2011. **80**(1): p. 41-50.
176. Zeisberg, M. and R. Kalluri, *The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis*. J Mol Med (Berl), 2004. **82**(3): p. 175-81.
177. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-1784.
178. Gabbiani, G., *The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases*. J Pathol, 2003. **200**(4): p. 500-3.
179. LeBleu, V.S., et al., *Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Nat Med, 2013. **19**(8): p. 1047-53.

180. Meran, S. and R. Steadman, *Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis*. Int J Exp Pathol, 2011. **92**(3): p. 158-67.
181. Sugimoto, H., et al., *Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment*. Cancer Biol Ther, 2006. **5**(12): p. 1640-6.
182. Humphreys, B.D., et al., *Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Am J Pathol, 2010. **Jan**;176(1): p. 85-97.
183. 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.
184. 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.
185. 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.
186. Kriz, W., B. Kaissling, and M. Le Hir, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy?* J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 468-74.
187. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
188. Brown, A.C., et al., *Physical and chemical microenvironmental cues orthogonally control the degree and duration of fibrosis-associated epithelial-to-mesenchymal transitions*. J Pathol, 2013. **229**(1): p. 25-35.
189. Yang, J., et al., *Activated alveolar epithelial cells initiate fibrosis through secretion of mesenchymal proteins*. Am J Pathol, 2013. **183**(5): p. 1559-70.
190. Kim, K.K., et al., *Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 213-24.
191. Marmai, C., et al., *Alveolar epithelial cells express mesenchymal proteins in patients with idiopathic pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(1): p. L71-8.
192. Koesters, R., et al., *Tubular overexpression of transforming growth factor-beta1 induces autophagy and fibrosis but not mesenchymal transition of renal epithelial cells*. Am J Pathol, 2010. **177**(2): p. 632-43.
193. Hakrrouch, S., et al., *Effects of increased renal tubular vascular endothelial growth factor (VEGF) on fibrosis, cyst formation, and glomerular disease*. Am J Pathol, 2009. **175**(5): p. 1883-95.
194. 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.
195. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. J Clin Invest, 2009. **119**(6): p. 1429-37.
196. Fan, J.M., et al., *Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro*. Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1455-67.
197. Yang, J. and Y. Liu, *Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1465-75.
198. Masszi, A., et al., *Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003. **284**(5): p. F911-24.
199. Romagnani, P., *Family portrait: renal progenitor of Bowman's Capsule and its tubular brothers*. Am J Pathol, 2011. **Feb**;178((2)): p. 490-3.

200. Romagnani, P., *Of mice and men: the riddle of tubular regeneration*. J Pathol, 2013. **229**(5): p. 641-4.
201. Lange, C., et al., *Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats*. Kidney Int, 2005. **68**(4): p. 1613-7.
202. Lin, F., et al., *Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1188-99.
203. Lazzeri, E., et al., *Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in Acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(12): p. 3128-3138.
204. Angelotti, M.L., et al., *Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury*. Stem Cells, 2012. **Aug;30**(8): p. 1714-25.
205. Lindgren, D., et al., *Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules*. Am J Pathol, 2011. **178**(2): p. 828-37.
206. Smeets, B., et al., *Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration*. J Pathol, 2013. **229**(5): p. 645-59.
207. Lech, M., et al., *Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice*. Int Immunol, 2010. **22**(9): p. 717-28.
208. Nelson, P.J., et al., *The renal mononuclear phagocytic system*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(2): p. 194-203.
209. Patole, P.S., et al., *Expression and regulation of Toll-like receptors in lupus-like immune complex glomerulonephritis of MRL-Fas(lpr) mice*. Nephrol Dial Transplant, 2006. **21**(11): p. 3062-73.
210. Anders, H.J. and M. Lech, *NOD-like and Toll-like receptors or inflammasomes contribute to kidney disease in a canonical and a non-canonical manner*. Kidney Int, 2013. **84**(2): p. 225-8.
211. Allam, R., et al., *Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4*. J Am Soc Nephrol, 2012. **Aug;23**(8):**1375-88**.
212. Rakoff-Nahoum, S., et al., *Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis*. Cell, 2004. **118**(2): p. 229-41.
213. Wullaert, A., M.C. Bonnet, and M. Pasparakis, *NF-kappaB in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation*. Cell Res, 2011. **21**(1): p. 146-58.
214. Sallustio, F., et al., *Human renal stem/progenitor cells repair tubular epithelial cell injury through TLR2-driven inhibin-A and microvesicle-shuttled decorin*. Kidney Int, 2013. **83**(3): p. 392-403.
215. Arnold, L., et al., *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. J Exp Med, 2007. **204**(5): p. 1057-69.
216. Lucas, T., et al., *Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3964-77.
217. Mirza, R., L.A. DiPietro, and T.J. Koh, *Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice*. Am J Pathol, 2009. **175**(6): p. 2454-62.
218. van Amerongen, M.J., et al., *Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice*. Am J Pathol, 2007. **170**(3): p. 818-29.
219. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
220. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.

221. Cantini, M., et al., *Human satellite cell proliferation in vitro is regulated by autocrine secretion of IL-6 stimulated by a soluble factor(s) released by activated monocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **216**(1): p. 49-53.
222. Glenn, K.C. and R. Ross, *Human monocyte-derived growth factor(s) for mesenchymal cells: activation of secretion by endotoxin and concanavalin A*. Cell, 1981. **25**(3): p. 603-15.
223. Lichtnekert, J., et al., *Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves*. Curr Opin Pharmacol, 2013. **13**(4): p. 555-64.
224. Saclier, M., et al., *Differentially activated macrophages orchestrate myogenic precursor cell fate during human skeletal muscle regeneration*. Stem Cells, 2013. **31**(2): p. 384-96.
225. Deng, J., et al., *Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury*. Kidney Int, 2001. **60**(6): p. 2118-28.
226. Duffield, J.S., *Macrophages and immunologic inflammation of the kidney*. Semin Nephrol, 2010. **30**(3): p. 234-54.
227. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
228. 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.
229. Manicassamy, S., et al., *Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine*. Science, 2010. **329**(5993): p. 849-53.
230. Staal, F.J., T.C. Luis, and M.M. Tiemessen, *WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(8): p. 581-93.
231. Martin, M., et al., *Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3*. Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 777-84.
232. Kawakami, T., S. Ren, and J.S. Duffield, *Wnt signalling in kidney diseases: dual roles in renal injury and repair*. J Pathol, 2013. **229**(2): p. 221-31.
233. Lin, S.-L., et al., *Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration*. Proc Natl Acad Sci, 2010. **107**(9): p. 4194-4199.
234. Koch, A., et al., *Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene*. Cancer Res, 1999. **59**(2): p. 269-73.
235. de La Coste, A., et al., *Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8847-51.
236. Peifer, M. and P. Polakis, *Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus*. Science, 2000. **287**(5458): p. 1606-9.
237. Duffield, J.S., et al., *Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 56-65.
238. Mirza, R. and T.J. Koh, *Dysregulation of monocyte/macrophage phenotype in wounds of diabetic mice*. Cytokine, 2011. **56**(2): p. 256-64.
239. Mirza, R.E., et al., *Blocking interleukin-1beta induces a healing-associated wound macrophage phenotype and improves healing in type 2 diabetes*. Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2579-87.
240. Sindrilaru, A., et al., *An unrestrained proinflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(3): p. 985-97.
241. Zhang, L., et al., *Role of integrin-beta3 protein in macrophage polarization and regeneration of injured muscle*. J Biol Chem, 2012. **287**(9): p. 6177-86.

242. Anders, H.-J. and M. Ryu, *Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis*. *Kidney Int*, 2011. **80**(9): p. 915-925.
243. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(2): p. 317-326.
244. Weidenbusch, M. and H.J. Anders, *Tissue microenvironments define and get reinforced by macrophage phenotypes in homeostasis or during inflammation, repair and fibrosis*. *J Innate Immun*, 2012. **4**((5-6)): p. 463-77.
245. Gause, W.C., T.A. Wynn, and J.E. Allen, *Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(8): p. 607-14.
246. Rosenberg, H.F., K.D. Dyer, and P.S. Foster, *Eosinophils: changing perspectives in health and disease*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(1): p. 9-22.
247. Bonventre, J.V., *Complement and renal ischemia-reperfusion injury*. *Am J Kidney Dis*, 2001. **38**(2): p. 430-6.
248. Pertoft H, L.T., Lâås T, Kâgedal L, *Density Gradients Prepared from Colloidal Silica Particles Coated by Polycinylpyrrolidone (Percoll)*. *Analytical Biochemistry*, 1978. **88**: p. 271-282.
249. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. *Nature protocols*, 2007. **2**(2): p. 329-33.
250. Buttke, T.M., J.A. McCubrey, and T.C. Owen, *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines*. *J Imm Meth*, 1993. **157**((1)): p. 233-240.
251. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. *Clin Chem*, 2009. **55**(4): p. 611-22.
252. Gentry, T., et al., *Simultaneous isolation of human BM hematopoietic, endothelial and mesenchymal progenitor cells by flow sorting based on aldehyde dehydrogenase activity: implications for cell therapy*. *Cytotherapy*, 2007. **9**(3): p. 259-74.
253. Storms, R.W., et al., *Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(16): p. 9118-23.
254. Mitchell, J.B., et al., *Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers*. *Stem Cells*, 2006. **24**(2): p. 376-85.
255. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
256. Terryn, S., et al., *A primary culture of mouse proximal tubular cells, established on collagen-coated membranes*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **293**(2): p. F476-85.
257. Humphreys, B.D., et al., *Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(3): p. 284-291.
258. Pergola, P.E., et al., *Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes*. *N Engl J Med*, 2011. **365**(4): p. 327-36.
259. Choi, B.H., K.S. Kang, and M.K. Kwak, *Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease*. *Molecules*, 2014. **19**(8): p. 12727-59.
260. Yoon, H.Y., et al., *Sulforaphane protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through induction of the Nrf2-dependent phase 2 enzyme*. *Biochemical Pharmacology*, 2008. **75**(11): p. 2214-23.
261. Zhang, D.D., *The Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway: The regulation and dual function of Nrf2 in cancer*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010. **13**(11): p. 1623-6.

262. You, A., et al., *Transcription factor Nrf2 maintains the basal expression of MDM2: An implication of the regulation of p53 signaling by Nrf2*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011. **507**(2): p. 356-64.
263. Vazquez, A., et al., *The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(12): p. 979-87.
264. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-435.
265. Mizoguchi, A., *Healing of intestinal inflammation by IL-22*. Inflammatory Bowel Diseases, 2012. **18**(9): p. 1777-84.
266. McGee, H.M., et al., *IL-22 promotes fibroblast-mediated wound repair in the skin*. J Invest Dermatol, 2012. **May**; **133**(5): p. 1321-9.
267. Zenewicz, L.A. and R.A. Flavell, *Recent advances in IL-22 biology*. Int Immunol, 2011. **23**(3): p. 159-163.
268. Anders, H.J., Vielhauer V, Schloendorff D, *Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal diseases*. Kidney Int, 2003. **63**: p. 401-415.
269. Jiang, G.X., et al., *IL-6/STAT3/TFF3 signaling regulates human biliary epithelial cell migration and wound healing in vitro*. Mol Biol Rep, 2010. **37**(8): p. 3813-8.
270. Sugawara, T., et al., *Regulation and role of Interleukin-6 in wounded human epithelial keratinocytes*. Cytokine, 2001. **15**(6): p. 336.
271. Xie, M.H., et al., *Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R*. J Biol Chem, 2000. **275**(40): p. 31335-9.
272. Mitra, A., S.K. Raychaudhuri, and S.P. Raychaudhuri, *IL-22 induced cell proliferation is regulated by PI3K/Akt/mTOR signaling cascade*. Cytokine, 2012. **60**(1): p. 38-42.
273. Feng, D., et al., *Interleukin-22 promotes proliferation of liver stem/progenitor cells in mice and patients with chronic Hepatitis B virus infection*. Gastroenterology, 2012. **143**(1): p. 188-198.e7.
274. Naher, L., et al., *STAT3 signal transduction through interleukin-22 in oral squamous cell carcinoma*. Int J Oncol, 2012. **41**(5): p. 1577-86.
275. Pickert, G., et al., *STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing*. J Exp Med, 2009. **206**(7): p. 1465-72.
276. Radaeva, S., et al., *Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation*. Hepatology, 2004. **39**(5): p. 1332-42.
277. Klein, L., *Pharmacologic therapy for patients with chronic heart failure and reduced systolic function: review of trials and practical considerations*. Am. J. Cardiol., 2003. **91**: p. 18F-40F.
278. Cho, H.Y., et al., *The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis*. FASEB J, 2004. **18**(11): p. 1258-60.
279. Andreoli, S.P., *Acute kidney injury in children*. Pediatr Nephrol, 2009. **24**(2): p. 253-63.
280. Dinarello, C.A., J.A. Gelfand, and S.M. Wolff, *Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome*. JAMA, 1993. **269**(14): p. 1829-35.
281. Kang, S., T. Tanaka, and T. Kishimoto, *Therapeutic uses of anti-interleukin-6 receptor antibody*. Int Immunol, 2014. **Jan**; **27**(1): **21-9**.
282. Kurts, C., et al., *The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(10): p. 738-53.
283. Kulkarni, O.P., et al., *Toll-like receptor 4-induced IL-22 accelerates kidney regeneration*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(5): p. 978-89.

-
284. Ganguly, D., et al., *The role of dendritic cells in autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(8): p. 566-77.
285. Kim, M.G., et al., *Depletion of kidney CD11c+ F4/80+ cells impairs the recovery process in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(9): p. 2908-21.
286. Zheng, Y., et al., *Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 282-9.
287. Lech, M., et al., *Tissues use resident dendritic cells and macrophages to maintain homeostasis and to regain homeostasis upon tissue injury: the immunoregulatory role of changing tissue environments*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 951390.
288. Chapple, S.J., R.C. Siow, and G.E. Mann, *Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging*. Int J Biochem Cell Biol, 2012. **44**(8): p. 1315-20.
289. Evans, P.C., *The influence of sulforaphane on vascular health and its relevance to nutritional approaches to prevent cardiovascular disease*. EPMA J, 2011. **2**(1): p. 9-14.
290. Park, L.K., S. Friso, and S.W. Choi, *Nutritional influences on epigenetics and age-related disease*. Proc Nutr Soc, 2012. **71**(1): p. 75-83.
291. Himmelfarb, J., et al., *Oxidative stress is increased in critically ill patients with acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(9): p. 2449-56.
292. Cachofeiro, V., et al., *Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease*. Kidney Int Suppl, 2008(111): p. S4-9.
293. Garrido, A.M. and K.K. Griendling, *NADPH oxidases and angiotensin II receptor signaling*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **302**(2): p. 148-58.
294. Marrero, M.B., et al., *Angiotensin II-induced signaling pathways in diabetes*. Curr Diabetes Rev, 2005. **1**(2): p. 197-202.
295. Pieczenik, S.R. and J. Neustadt, *Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(1): p. 84-92.
296. Yuan, Y., et al., *Mitochondrial dysfunction accounts for aldosterone-induced epithelial-to-mesenchymal transition of renal proximal tubular epithelial cells*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(1): p. 30-43.
297. Jiang, T., et al., *Nrf2 suppresses lupus nephritis through inhibition of oxidative injury and the NF-kappaB-mediated inflammatory response*. Kidney Int, 2014. **85**(2): p. 333-43.
298. Lee, H., et al., *Curcumin attenuates lupus nephritis upon interaction with regulatory T cells in New Zealand Black/White mice*. Br J Nutr, 2013. **110**(1): p. 69-76.
299. Tsai, P.Y., et al., *Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation*. Free Radic Biol Med, 2011. **51**(3): p. 744-54.
300. Wu, T., et al., *Prevention of murine lupus nephritis by targeting multiple signaling axes and oxidative stress using a synthetic triterpenoid prevents murine lupus nephritis*. Arthritis Rheumatol, 2014. **Nov;66(11):3129-39**.
301. Yoh K, H.A., Ishizaki K, Yamada A et al., *Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases functional impairment in nrf2-deficient mice*. Genes Cells, 2008. **13**: p. 1159-1170.
302. Ruiz, S., et al., *Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease*. Kidney Int, 2013. **83**(6): p. 1029-41.
303. Pergola, P.E., et al., *Effect of bardoxolone methyl on kidney function in patients with T2D and Stage 3b-4 CKD*. Am J Nephrol, 2011. **33**(5): p. 469-76.
-

304. Dinkova-Kostova, A.T., et al., *Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11908-13.
305. Hayes, J.D., et al., *Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the Keap1-Nrf2 pathway*. Antioxid Redox Signal, 2010. **13**(11): p. 1713-48.
306. Kansanen, E., et al., *The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer*. Redox Biol, 2013. **1**(1): p. 45-9.
307. Chen, X.L., et al., *Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(5): p. H1862-70.
308. Chen, X.L., et al., *Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism*. J Biol Chem, 2003. **278**(2): p. 703-11.
309. Hosoya, T., et al., *Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27244-50.
310. van Reyk, D.M. and W. Jessup, *The macrophage in atherosclerosis: modulation of cell function by sterols*. J Leukoc Biol, 1999. **66**(4): p. 557-61.
311. Zakkar, M., et al., *Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1851-7.
312. auf dem Keller, U., et al., *Nrf transcription factors in keratinocytes are essential for skin tumor prevention but not for wound healing*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(10): p. 3773-84.
313. Braun, S., et al., *Nrf2 transcription factor, a novel target of keratinocyte growth factor action which regulates gene expression and inflammation in the healing skin wound*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(15): p. 5492-505.
314. Ding, H., et al., *Recombinant human insulin-like growth factor-I accelerates recovery and reduces catabolism in rats with ischemic acute renal failure*. J Clin Invest, 1993. **91**(5): p. 2281-7.
315. Humes, H.D., et al., *Epidermal growth factor enhances renal tubule cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure*. J Clin Invest, 1989. **84**(6): p. 1757-61.
316. Miller, S.B., et al., *Insulin-like growth factor I accelerates recovery from ischemic acute tubular necrosis in the rat*. Proc Natl Acad Sci, 1992. **89**(24): p. 11876-80.
317. Guimaraes, S.M., et al., *Low insulin-like growth factor-I and hypocholesterolemia as mortality predictors in acute kidney injury in the intensive care unit*. Crit Care Med, 2008. **36**(12): p. 3165-70.
318. Imberti, B., et al., *Insulin-like growth factor-I sustains stem cell mediated renal repair*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(11): p. 2921-8.

Lebenslauf und Anhang

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, sämtliche Experimente gemäß meines besten Wissens und Gewissens durchgeführt sowie diese Arbeit verfasst habe. Das Kapitel 9 „Literaturverzeichnisse“ gibt Auskunft über die von mir genutzte Literatur und Quellen.

Sämtliche Experimente wurden nach Anleitung durch Fachpersonal in Eigenarbeit durchgeführt, mit Ausnahme des Western Blot sowie der Durchflusszytometrie welche beide mit Assistenz durchgeführt wurden. Für die Unterstützung bei diesen Experimenten möchte ich mich u.a. bei Hr. Onkar Kulkarni, PhD bedanken. Für die Anleitung der Tubuluszellisolation bedanke ich mich bei Hr. Shrikant R. Mulay, PhD sowie Hr. Nuru Eltrich. Für die Unterstützung bei der Anleitung der Versuche möchte ich mich bei Hr. Dr. Maciej Lech sowie Fr. Heni Eka Susanti bedanken. Für die Unterstützung bei der Durchführung der Immunfluoreszenz-Färbungen bedanke ich mich bei Hr. Dan Dragonovici und Fr. Janina Mandelbaum.

11 Danksagung

Für die außerordentliche und überdurchschnittliche Betreuung meiner Arbeit möchte ich mich recht herzlich bei meiner Betreuerin Fr. Dana Thomasova, MD, PhD sowie meinem Doktorvater Hr. Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders bedanken. Die Erfahrungen, welche ich in den vergangenen Jahren gesammelt habe, werden mir sicherlich auf meinem weiteren beruflichen und persönlichen Werdegang zugute kommen. Besonders schätze ich die Förderung durch Hr. Prof. Anders auf dem Gebiet des Verfassens wissenschaftlicher Texte und der Präsentation eigener Daten. Durch die Betreuung solcher Fähigkeiten auch abseits des Labors, zum Beispiel auf einer der Vortragsreisen, wurde für mich ein wertvoller Grundstein hinsichtlich meiner späteren Tätigkeit gelegt. Für den regelmäßigen, konstruktiven Austausch bedanke ich mich beim Forschungsdekan der LMU, Prof. Dr. med. Stefan Endres, der für mich nicht zuletzt auch zum Mentor geworden ist. Mein Dank für die finanzielle Unterstützung meiner Forschung geht an die Deutsche Forschungsgemeinschaft. Für die Ermöglichung meines Studiums möchte ich meinen Eltern danken, für die sorgfältige Korrektur, Anregungen und Unterstützung meiner Frau Michaela.

12 Zusätzliche Abbildungen

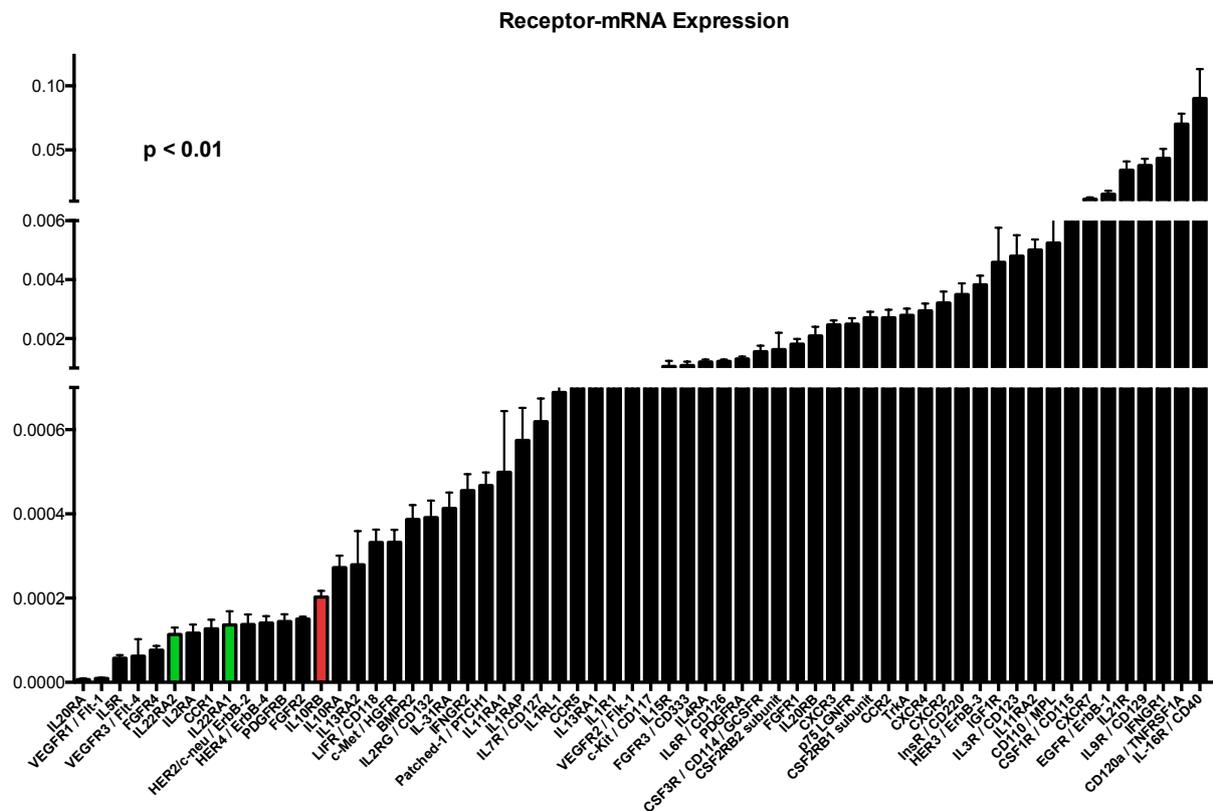


Abbildung 31: Gesamtübersicht der qRT-PCR-Ergebnisse zum Nachweis der Rezeptor-Expression an den primären TEC

Eidesstattliche Versicherung

Hagemann, Jan Henrik

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchung der Regeneration renaler Tubulusepithelzellen in vitro zur Identifikation möglicher Therapeutika für die Akute Nierenschädigung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 22.08.2015

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand