

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im  
Dr. von Haunersches Kinderspital  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein

**Die Bedeutung der STAT3-Blockade  
durch Tyrphostin AG 490  
im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie**



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

vorgelegt von  
Alexandra Schieber, geb. Reiter  
aus Magdeburg  
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstattein: PD. Dr. Bärbel Lange-Sperandio  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Neuhofer  
Prof. Dr. Christian Gratzke  
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel  
Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2018

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Zusammenfassung .....	1
1 Einleitung.....	2
1.1 Angeborene obstruktive Uropathien.....	2
1.1.1 Diagnostik, Therapie und Prognose.....	2
1.1.2 Nierenentwicklung und Pathogenese obstruktiver Uropathien .....	3
1.2 Tiermodell der obstruktiven Uropathie.....	4
1.3 Pathophysiologie der UUO .....	5
1.4 Transkriptionsfaktor STAT3 .....	6
1.5 Therapeutische STAT3-Blockade .....	8
1.5.1 Mechanismen der STAT3-Blockade .....	8
1.5.2 STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 .....	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Versuchstiere .....	10
2.2 Studienprotokoll .....	10
2.2.1 Gruppeneinteilung: Behandlungsgruppe – Kontrollgruppe .....	10
2.2.2 Mikrochirurgische Operationstechnik.....	11
2.2.3 STAT3 Blockade.....	12
2.2.4 Organentnahme.....	13
2.3 Histomorphologische Methoden.....	13
2.3.1 Fixierung und Paraffineinbettung der Nieren .....	13
2.3.2 Herstellung mikroskopischer Nierenschnitte .....	14
2.3.3 Histologische Färbung der Makrophageninfiltration .....	14
2.3.4 Histologische Färbung der T-Lymphozyteninfiltration .....	15
2.3.5 Histologische Färbung der renalen Apoptose .....	15
2.3.6 Histologische Färbung der renalen Proliferation .....	16
2.3.7 Histologische Färbung der tubulären Atrophie .....	17
2.3.8 Histologische Färbungen der interstitiellen Fibrose.....	17
2.4 Statistik .....	19

---

2.5	Chemikalien .....	19
3	Ergebnisse .....	21
3.1	Tyrphostin AG 490 und die neonatale Entwicklung .....	21
3.2	Morphologie der unilateralen Ureterligatur .....	22
3.3	Effekte von Tyrphostin AG 490 in der Mausniere .....	22
3.3.1	Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die Makrophagen-infiltration .....	22
3.3.2	Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die T-Lymphozyten-infiltration .....	24
3.3.3	Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die renale Apoptose .....	26
3.3.4	Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die renale Proliferation .....	31
3.3.5	Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die tubuläre Atrophie.....	34
3.3.6	Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die interstitielle Fibrose .....	37
4	Diskussion.....	42
4.1	Reduktion der Leukozyteninfiltration durch Tyrphostin AG 490 .....	42
4.2	Reduktion der renalen Apoptose durch Tyrphostin AG 490 .....	45
4.3	Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die renale Proliferation .....	49
4.4	Reduktion der tubulären Atrophie durch Tyrphostin AG 490 .....	51
4.5	Reduktion der aktivierten Myofibroblasten durch Tyrphostin AG 490.....	52
4.6	Reduktion der interstitiellen Fibrose durch Tyrphostin AG 490 .....	55
4.7	Verträglichkeit von Tyrphostin AG 490 und Überblick der histologischen Effekte.	57
5	Ausblick .....	59
	Literaturverzeichnis .....	61
	Abkürzungsverzeichnis .....	68
	Danksagung.....	70
	Eidesstattliche Versicherung.....	71

# Zusammenfassung

Angeborene obstruktive Uropathien lösen eine ausgeprägte zytokinvermittelte Entzündungsreaktion in der Niere aus. Pro-inflammatorische Signalwege sind wesentlich an der Aufrechterhaltung dieser Entzündung im Sinne eines Circulus vitiosus beteiligt. Dies führt zu tubulärer Apoptose, tubulärer Atrophie und interstitieller Fibrose. Unter anderem ist daran der „Signal Transducer and Activator of Transkription“ (STAT3) als pro-inflammatorischer und pro-fibrotischer Transkriptionsfaktor beteiligt. Deshalb untersuchte die vorliegende Arbeit die Bedeutung einer STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie.

Der Effekt von Tyrphostin AG 490 wurde an neonatalen Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) studiert, bei denen am 2. Lebenstag eine unilaterale Ureterligatur (UUO) bzw. eine Scheinoperation durchgeführt wurde. Die neugeborenen Mäuse erhielten ab dem 2. Lebenstag täglich eine subkutane Injektion mit dem JAK2/STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG 490, entsprechend erhielt die Kontrollgruppe die Vehikellösung. Am 3., 7., bzw. 14. Lebenstag wurden die Nieren entnommen und immunhistochemisch auf Leukozyteninfiltration, Apoptose, Proliferation, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose untersucht.

Die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 führte zu einer signifikanten Reduktion der Makrophagen- und T-Lymphozyteninfiltration. Tyrphostin AG 490 reduzierte auch signifikant die Apoptose tubulärer, interstitieller und glomerulärer Zellen in der obstruierten Niere. Die STAT3-Blockade bewirkte außerdem einen signifikanten Anstieg der Proliferation tubulärer Zellen nach Ureterligatur. Bezüglich der interstitiellen Fibrose reduzierte Tyrphostin AG 490 die Anzahl aktivierter Myofibroblasten und die Ablagerung extrazellulärer Matrix. Da die interstitielle Fibrose ein wesentlicher Parameter fortgeschrittener Nierenerkrankungen ist und negativ mit der Nierenfunktion korreliert, ist ihre Reduktion durch Tyrphostin AG 490 ein vielversprechendes Ergebnis für die Therapie obstruktiver Uropathien.

Zusammenfassend unterbrach die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 erfolgreich den Circulus vitiosus der tubulointerstitiellen Inflammation und renalen Fibrose im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie. Der STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG 490 könnte aufgrund seiner nephroprotektiven Wirkung ein neuer therapeutischer Baustein in der Behandlung angeborener obstruktiver Uropathien werden.

# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborene obstruktive Uropathien

Angeborene obstruktive Uropathien sind eine häufige Ursache der chronisch terminalen Niereninsuffizienz im Kindesalter [2, 3]. Sie werden definiert als Harnabflussbehinderungen, die ohne adäquate Therapie das Entwicklungspotential der Niere einschränken und zu einer progredienten Verschlechterung der Nierenfunktion führen [4, 5]. Die häufigste obstruktive Uropathie im Kindesalter ist die ureteropelvine Stenose, bei der eine Engstelle des Harnleiters am ureteropelvinen Übergang besteht. Ihre Inzidenz liegt bei ca. 1:1000 [2, 6]. Seltener obstruktive Uropathien sind der primär obstruktive Megaureter, die Ureterozele, die Ureterektopie oder Fehlbildungen von Blase und Urethra [4]. Die schwerwiegendste Form einer kongenitalen obstruktiven Uropathie stellt die nur bei Jungen vorkommende Urethralklappe dar. Ihre Inzidenz beträgt 1:7000 [6]. Die klinische Manifestation obstruktiver Uropathien hängt wesentlich von Schwere, Zeitpunkt und Dauer der Obstruktion ab [7]. Die meisten kongenitalen obstruktiven Uropathien werden heute bereits pränatal mittels Ultraschall entdeckt. Seltener fallen sie durch klinische Symptome wie Harnwegsinfektionen, abdominelle Schmerzen oder Zeichen einer chronischen Niereninsuffizienz auf [6].

### 1.1.1 Diagnostik, Therapie und Prognose

Pränatal werden aktuell bei ca. 1:1000 Schwangerschaften Erweiterungen des Nierenbeckens, des Nierenbeckenkelchsystems oder der Harnleiter entdeckt. Davon sind jedoch nur ca. 20 % klinisch relevant [8]. Die häufigste sonographisch festgestellte Anomalie ist eine Hydronephrose der Niere, die unilateral oder bilateral auftreten kann. Zur weiteren Diagnostik ist bei Vorliegen einer Hydronephrose und Verdacht auf eine obstruktive Harntransportstörung die Durchführung einer Nierenszintigraphie mittels  $^{99m}\text{Tc}$ -Mercaptoacetyltriglycine (MAG-3) erforderlich, die sowohl die Bestimmung der seitengetrenten Partialfunktion der Niere, als auch die Beurteilung des Abflussmusters erlaubt. Die sonographischen und szintigraphischen Ergebnisse ermöglichen dann zusammen mit den klinischen Befunden eine Beurteilung bezüglich der OP-Bedürftigkeit. Aktuell werden ca. 30-40 % der ureteropelvinen Stenosen und ca. 10 % der primär obstruktiven Megaureter operativ korrigiert [9]. Das operative Standardverfahren ist bei der ureteropelvinen Stenose die Anderson-Hynes-Plastik, die als offene Laparotomie mit Resektion der Stenose und Reanastomosierung des Harnleiters durchgeführt wird. Die Erfolgsrate liegt im ersten Lebensjahr bei über 95 %. Aber auch ein laparoskopisches oder endoluminales Vorgehen ist möglich. Aktuelle Langzeitdaten zeigen jedoch, dass die konservativ behandelten Patienten mit ureteropelviner Stenose im Gegensatz zu den operierten Patienten langfristig ein pathologisches Urinproteommuster aufweisen [10]. Diese abnormen Befunde der konservativen Gruppe mit u.a. erhöhter Ausscheidung von Kollagenfragmenten deuten auf kontinuierliche renale Umbauprozesse noch über Jahre hinweg hin. Die aktuellen

diagnostischen Kriterien der OP-Indikation (Ultraschall und MAG-3-Szintigraphie) reichen damit vermutlich nicht aus [10, 11]. Möglicherweise werden aktuell zu wenige Patienten mit ureteropelviner Stenose operativ korrigiert. Die in dieser Doktorarbeit vorgelegten Daten sollen dazu beitragen, die Pathophysiologie obstruktiver Uropathien besser zu verstehen und neue Marker zu identifizieren, die eine bessere Aussage zur OP-Bedürftigkeit ermöglichen.

### 1.1.2 Nierenentwicklung und Pathogenese obstruktiver Uropathien

Die menschliche Niere entwickelt sich aus den Vorstufen Vorniere (Pronephros), Urniere (Mesonephros) und der Nachniere (Metanephros). Durch reziproke Interaktion des Epithels der Ureterknospe (dorsale Ausstülpung des Wolff-Ganges) und des metanephrischen Mesenchyms entstehen ab der 5. Schwangerschaftswoche (SSW) ca. 1 Million Nephrone pro Niere. Die Glomerulogenese aus Komma- und S-förmigen Vorstufen endet in der ca. 36. SSW. Anschließend folgen die glomeruläre Reifung und das renale Größenwachstum durch Längenzunahme des Tubulussystems (Abbildung 1)[2, 8].

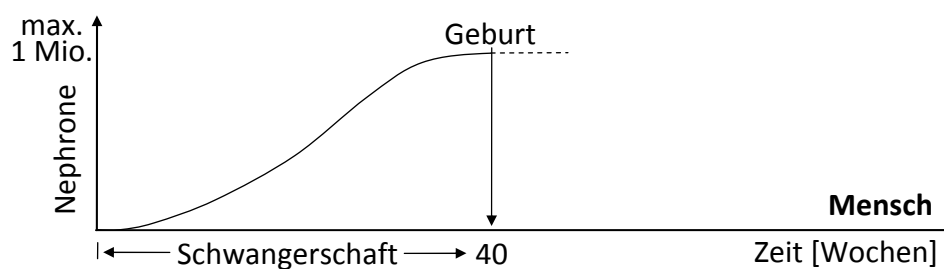


Abbildung 1: Physiologische Nephrogenese

Parallel zur Nephrogenese entstehen aus dem distalen Anteil der Ureterknospe das Sammelrohrsystem, die Nierenbecken und der Harnleiter. Bei der Entwicklung des Harnleiters spielt die Interaktion des Harnleiterepithels (späteres Urothel) mit dem Mesenchym (spätere Stromazellen, glatte Muskulatur und Serosaschicht) eine entscheidende Rolle für die Differenzierung der Harnleiterwandschichten. Auch die regelhafte Entwicklung der Harnleiterperistaltik ist für einen effektiven Harntransport entscheidend. Schrittmacherzellen, die im Nierenbecken und Ureter exprimiert werden und dem kardialen Reizbildungssystem ähneln, lösen peristaltische Wellenbewegungen im Harnleiter aus. Erst nach Abschluss der Harnleiterdifferenzierung in der ca. 10. SSW beginnt die fetale Urinproduktion. Störungen dieser Differenzierung bzw. Peristaltikentwicklung des Harnleiters sind ursächlich für das Auftreten kongenitaler obstruktiver Uropathien. Auf genetischer Ebene sind eine Vielzahl an Genen und Signalwegen wie z.B. der Renin-Angiotensin-, der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-, der Wnt- und der Hedgehog-Signalweg an der Entwicklung des Urogenitaltraktes beteiligt [6, 12]. Zusätzlich spielen auch epigenetische und exogene Faktoren eine Rolle. Kongenitale obstruktive Uropathien treten in der Regel spontan, meistens auf das Urogenitalsystem beschränkt und phänotypisch variabel auf. Aber auch syndromale oder familiäre Krankheitsfälle werden beobachtet [6, 13]. Die ureteropelvine Stenose als häufigste obstruktive Uropathie entsteht meist intrauterin im ca. 2. Trimenon. Sie tritt überwiegend bei Jungen und hauptsächlich links auf [6]. Meist beruht sie auf einer funktionellen

Harntransportstörung des proximalen Ureters. Ursächlich dafür ist entweder eine Hypertrophie oder ein Innervationsdefekt der glatten Muskelzellen [14, 15]. Obstruktionen im engeren Sinne wie endoluminale, urotheliale Polypen oder exoluminal kreuzende akzessorische Nierengefäße sind nur selten Ursache einer ureteropelvinen Stenose [16, 17]. Bisher bekannte, mit der ureteropelvinen Stenose assoziierte Genmutationen betreffen u.a. den Angiotensin-2-Rezeptor und, im Rahmen syndromaler Erkrankungen, den Forkhead-Transkriptionsfaktor (Foxc1) [6, 12].

## 1.2 Tiermodell der obstruktiven Uropathie

Das am häufigsten verwendete tierexperimentelle Modell der obstruktiven Uropathie ist die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) in Mäusen und Ratten. Dazu wird nach lateraler Laparotomie eine doppelte Ligatur am ureteropelvinen Übergang des Harnleiters durchgeführt und das Abdomen anschließend verschlossen. Die Vorteile der unilateralen Ureterligatur sind die genaue Steuerbarkeit von Beginn, Schwere und Dauer der Obstruktion [18, 19]. Chevalier et al. entwickelten bereits in den 80er Jahren ein neonatales Modell der obstruktiven Uropathie, bei der am 2. Lebenstag eine unilaterale Ureterobstruktion in neonatalen Mäusen, bzw. in neugeborenen Ratten durchgeführt wird [20]. Zu diesem Zeitpunkt ist die Nephrogenese bei Nagetieren wie Mäusen und Ratten nur zu ca. 10 % abgeschlossen und wird erst im Alter von 2-3 Wochen beendet. Deshalb interferiert die postnatal durchgeführte Harnleiterobstruktion mit der Nierenentwicklung und ist vergleichbar mit der intrauterin entstandenen obstruktiven Uropathie beim Menschen [21]. Die unilaterale Ureterligatur am 2. Lebenstag hat sich daher als neonatales Tiermodell der kongenitalen obstruktiven Uropathie etabliert [22]. Die hohe neonatale Vulnerabilität zeigt sich tierexperimentell nach UUO als beidseitige Verzögerung der Nephrogenese mit Reduktion der Nephronmasse um ca. 50 % auf der obstruierten Seite (Abbildung 2) [22, 23]. Die renale Schädigung ist dabei proportional zu Beginn, Dauer und Schwere der Obstruktion [24, 25]. Sekundär kommt es zu einer Hypertrophie der kontralateralen Niere. Beträgt der Verlust der Nephronmasse über 50 %, führen Hyperfiltrationsschäden beider Nieren zu einem weiterem Nephronverlust und zu einer langfristigen Abnahme der Nierenfunktion [9, 26].

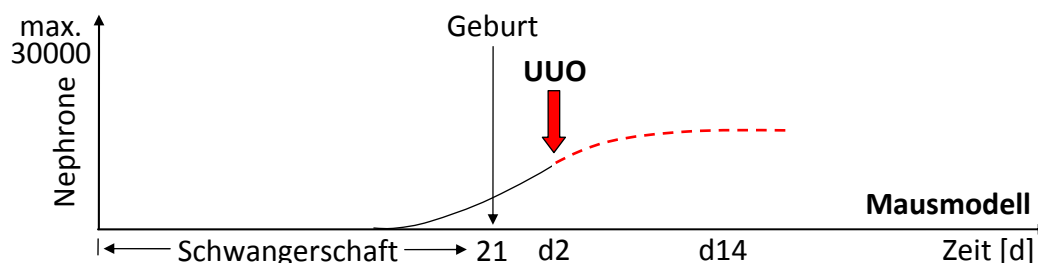


Abbildung 2: Pathologische Nephrogenese nach Obstruktion durch UUO im neonatalen Mausmodell



## 1.3 Pathophysiologie der UUO

Die unilaterale Ureterobstruktion als Modell der obstruktiven Uropathie führt über verschiedene Mechanismen zu einem irreversiblen Verlust funktioneller Nephrone (vgl. Abbildung 3).

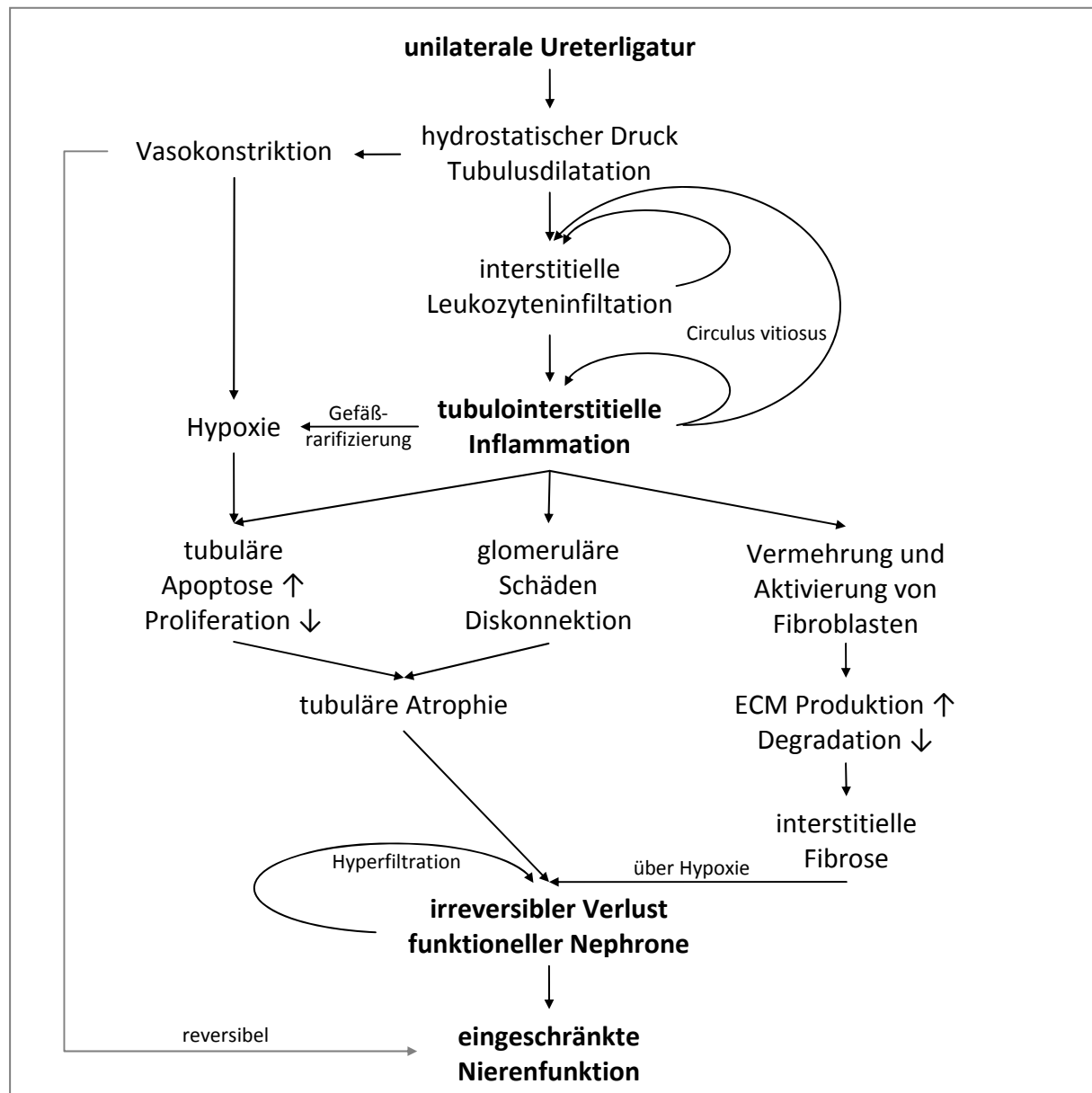


Abbildung 3: Pathophysiologie der unilateralen Ureterligatur (Skizze modifiziert nach [2])

Infolge der Ureterligatur kommt es zu einer hydrostatischen Druckerhöhung besonders in den distalen Nephronabschnitten mit mechanischer Dehnung von Tubulusepithelzellen [2]. Hämodynamisch wird eine Vasokonstriktion ausgelöst, die eine renale Ischämie und eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate bewirkt [22]. Interstitiell infiltrieren Leukozyten, vor allem Makrophagen und aktivierte T-Zellen, chemokinvermittelt in die ureterligierte Niere [27]. Diese Entzündungszellen sezernieren dann gemeinsam mit den geschädigten Tubulusepithelzellen pro-inflammatorische und pro-fibrotische Zytokine

[6]. Auch Angiotensin II als Effektor des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) vermitteln die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und die Bildung weiterer Zytokine wie Interleukine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Durch para- und autokrine Aktivierungs- und Rekrutierungsschleifen entsteht eine chronisch tubulointerstitielle Entzündung [22, 28, 29]. Zusätzlich kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und zur Induktion von Apoptose und Nekrose in der Niere [2, 22, 30]. Nach Ausschöpfung renaler Reparaturmechanismen stellen atrophische Tubuli den Folgezustand nach unilateraler Ureterligatur dar [31]. Aufgrund der chronischen tubulointerstitiellen Inflammation entwickelt sich eine zunehmende interstitielle Fibrose, die mit dem Funktionsverlust der Niere positiv korreliert. Interstitielle Fibroblasten proliferieren und verwandeln sich zu aktivierten Myofibroblasten, die extrazelluläre Matrix synthetisieren. Zusammen mit einer Verminderung fibrolytischer Matrixmetalloproteasen resultiert daraus in der UUO-Niere eine massive Ablagerung von extra-zellulärer Matrix (ECM) [22, 31]. Sowohl interstitielle Fibrose als auch tubuläre Atrophie führen durch den Verlust funktioneller Nephrone zu einer Abnahme der Nierenfunktion [31]. Das Ausmaß der Funktionseinbuße beeinflusst besonders der Circulus vitiosus der tubulointerstitiellen Entzündungsreaktion. Diese wird durch dysregulierte intrazelluläre Signalmoleküle aufrechterhalten. Dabei spielt der Transkriptionsfaktor STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) eine entscheidende Rolle.

## 1.4 Transkriptionsfaktor STAT3

Der Signal Transducer and Activator of Transcription 3, STAT3, wurde 1993 im Rahmen von Entzündungsprozessen entdeckt und als Acute Phase Response Factor (APRF) bezeichnet. Er gehört zur säugetiereigenen STAT-Familie (STAT1-6) und reguliert als intrazelluläres Signalmolekül eine Vielzahl zellulärer Funktionen wie Zelldifferenzierung, Organogenese und Immunantwort. STAT3 wird auf Chromosom 17p21 kodiert, besitzt sieben konservierte Domänen und hat mit insgesamt 770 Aminosäuren eine Größe von 92 kDa [32-34].

Im Tiermodell der unilateralen Ureterligatur wird STAT3 vor allem durch proinflammatorische Mediatoren wie TGF- $\beta$ , Interleukin-6 (IL-6) und Angiotensin II aktiviert [35]. Die Ligandenbindung der membranständigen Zytokinrezeptoren löst eine intrazelluläre Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Tyrosinkinase Januskinase 2 (JAK2) und damit die Aktivierung des JAK2/STAT3-Signalwegs aus [35]. Nach UUO induzieren auch Chemokine wie CC-Chemokine Ligand 5 (CCL5) eine JAK2-abhängige STAT3-Aktivierung über die Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Abbildung 4) [36-39]. Darüber hinaus gibt es weitere STAT3-Aktivierungswege durch Wachstumsfaktoren oder freie Tyrosinkinasen [34, 39]. Aktivierte STAT3-Monomere dimerisieren im Zytoplasma mit einem antiparallelen STAT3-Molekül und werden über einen komplexen Mechanismus in den Zellkern transportiert [33, 40]. Nach Erkennung spezieller DNA-Enhancer und DNA-Bindung beginnt die Transkription der STAT3-Zielgene [37]. Serinkinasen wie PKC (Protein Kinase C) erhöhen dabei die Transkriptionsaktivität [41, 42]. Auch negative Regulationsmechanismen sind bekannt:

Neben unspezifischen Phosphatasen, der ubiquitinvermittelten Proteolyse und der Spaltung durch Caspasen blockieren SOCS (suppressors of cytokine signaling) als Pseudosubstrat der JAKs die STAT3-Aktivierung und nukleäre PIAS (protein inhibitor of activated STAT) die Transkriptionsaktivität. Möglicherweise trägt STAT3 auch unphosphoryliert oder als Tetramer zur Signaltransduktion bei [34, 43].

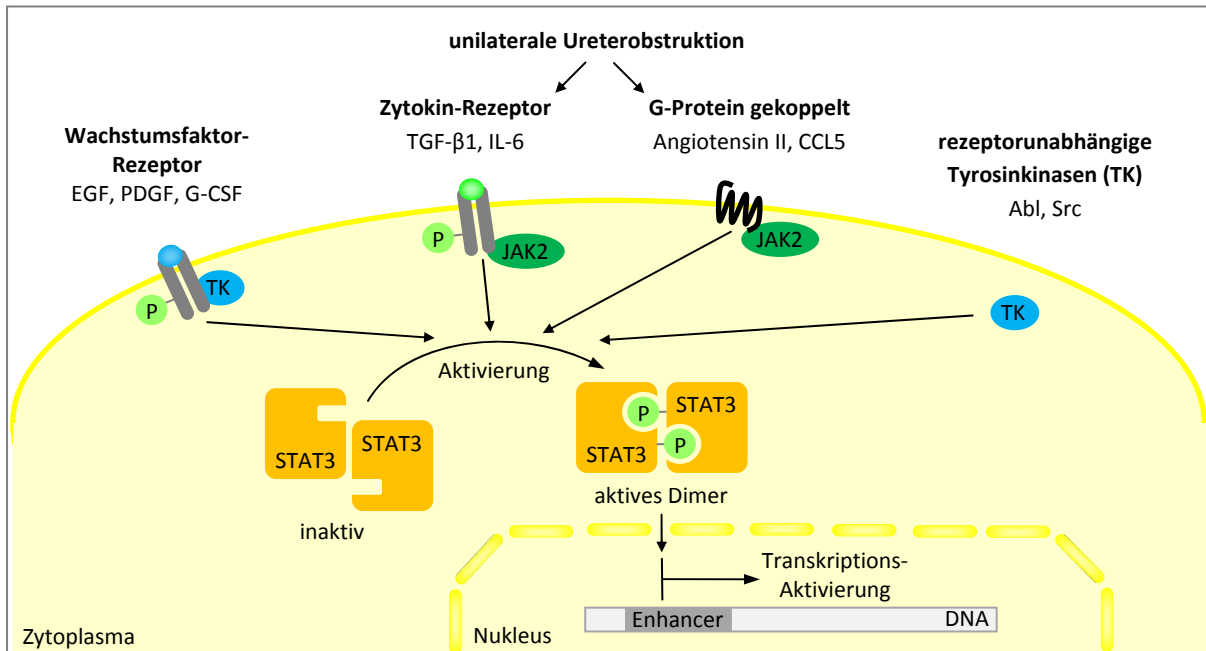


Abbildung 4: Mögliche Aktivierungswege des STAT3-Signalwegs im Tiermodell der UUO (modifiziert nach [36,37,44])

Im Zellkern aktivieren die STAT3-Dimere dann die Transkription von Zielgenen verschiedener Funktionskreise. Zu diesen Funktionskreisen gehören unter anderem das Zellüberleben (Bcl xl, Bcl-2, Mcl-1, Survivin, Hsp70/90, RegIII β/γ), die Proliferation (c-Myc, Cdc 2, Cyclin D1, Cyclin B, c-Jun, c-Fos, p21), die Immunität (TGF-β, IL-6, IL10, IL-11, IL-17, IL-23, CXCL 12, Cox 2), Signalkaskaden (STAT3, SOCS3, Lin28), die Zelladhäsion (ICAM-1, Twist-1) und die Angiogenese (HIF1α, VEGF, FGF) (Abbildung 5) [32, 33, 36, 45].

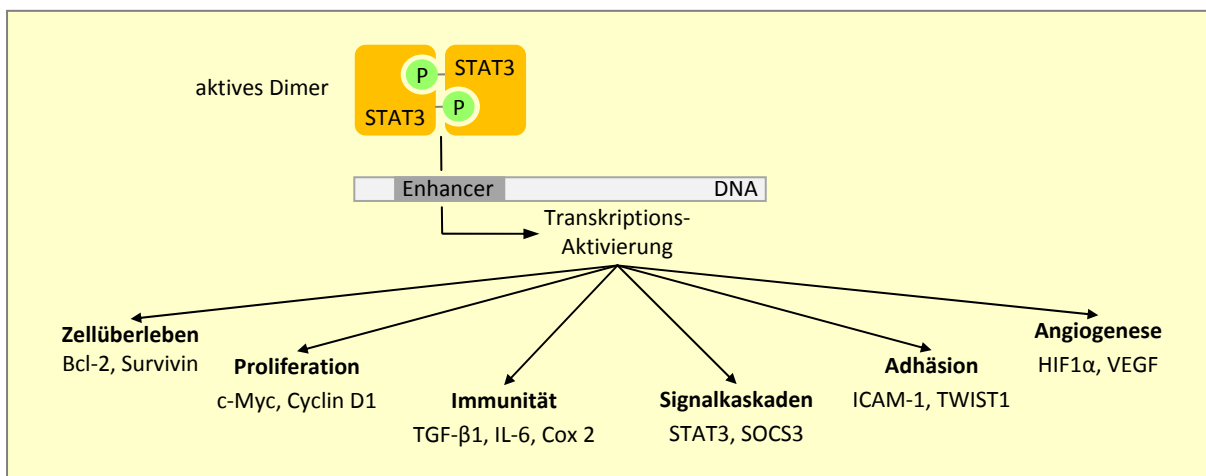


Abbildung 5: STAT3 - Zielgene und Funktionen (Skizze modifiziert nach [33,36,45])

Die physiologische Bedeutung von STAT3 ist überlebenswichtig. Der komplette Knockout von STAT3 ist bereits vor dem embryonalen Tag 7 letal [38, 39]. Auch gewebes-

spezifische Knockouts, z.B. für Makrophagen und Thymusepithelzellen, führen zu schwerwiegenden Defekten [33]. In adulten Geweben reguliert STAT3 z.B. bei der angeborenen Immunantwort die Expansion von Vorläufern dendritischer Zellen, in der erworbenen Immunantwort die Differenzierung von Th2- und Th17-Zellen und im Knochenstoffwechsel die Funktion regulatorischer T-Zellen [46, 47]. Einen Funktionsverlust von STAT3 verursacht das autosomal dominante Hyper-IgE-Syndrom, einen Immundefekt mit gestörter TH17-Zell-differenzierung und T-Gedächtniszellfunktion [34, 48, 49]. Eine persistierende STAT3-Aktivität ist in hämatologischen und soliden Krebsarten beschrieben [36, 39, 50, 51].

In Vorarbeiten an adulten Mäusen mit unilateraler Ureterligatur spielt STAT3 als pro-inflammatorischer und pro-fibrotischer Transkriptionsfaktor eine entscheidende Rolle [35]. Während STAT3 in den Tubuluszellen adulter Mausnieren normalerweise nur gering exprimiert wird, erfolgt nach Ureterligatur eine deutliche Hochregulation und Aktivierung von STAT3 [35, 51, 52]. Anschließend induziert STAT3 in geschädigten Tubuluszellen und eingewanderten Makrophagen u.a. die Bildung von TGF- $\beta$ , einem zentralen Mediator nach UUO [35]. Pro-inflammatorische Regulationsschleifen führen dann zu einem Circulus vitiosus mit ausgeprägter tubulointerstitieller Entzündungsreaktion (Abbildung 3) [22]. STAT3 vermittelt im adulten Mausmodell die renale Makrophageninfiltration und die interstitielle Fibrose [35].

Dagegen ist die Bedeutung von STAT3 im neonatalen Modell der obstruktiven Uropathie bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Effekt einer STAT3-Blockade im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie untersucht werden.

## 1.5 Therapeutische STAT3-Blockade

### 1.5.1 Mechanismen der STAT3-Blockade

Eine STAT3-Blockade kann über verschiedene Mechanismen erreicht werden. Dazu gehören u.a. eine Reduktion der STAT3-Expression und eine Steigerung der STAT3-Deaktivierung. Die Blockade der STAT3-Aktivität ist der meistgenutzte Ansatz und kann durch die Hemmung der Phosphorylierung, der Dimerisierung, der intranukleären Translokation, der DNA-Bindung oder auch der Transkriptionsaktivität erzielt werden. Sie kann außerdem direkt am STAT3-Molekül oder indirekt durch die Hemmung der Phosphorylierungsaktivität der aktivierenden Tyrosinkinase erfolgen. Kamran et al. bieten eine Übersicht pflanzlicher und synthetischer STAT3-Inhibitoren sowie deren Wirkmechanismen [39]. Für die vorliegende Arbeit im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie wurde für die STAT3-Blockade die Hemmung der JAK2-abhängigen STAT3-Aktivierung gewählt. Die verwendete Substanz Tyrphostin AG 490 hemmt dabei die Tyrosinkinaseaktivität von JAK2.

## 1.5.2 STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490

Der Begriff Tyrphostin ist die Kurzform von Tyrosin-Phosphorylierungs-Inhibitor und beschreibt synthetische Kinaseinhibitoren auf der strukturellen Basis des natürlichen Kinaseinhibitors Erbstatin [53]. Tyrphostin AG 490 ist ein nichtpeptidisches Molekül mit der chemischen Struktur (E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamid, der Formel  $C_{17}H_{14}N_2O_3$  und einem Molekulargewicht von 294.30 (Abbildung 6 [54]) [54].

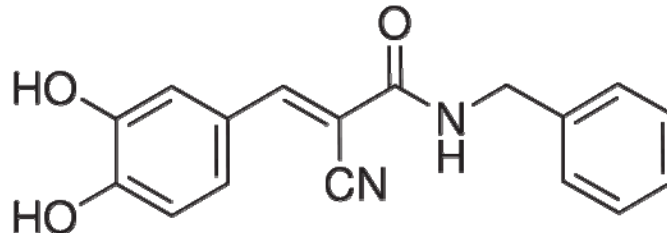


Abbildung 6: Struktur des STAT3-Inhibitors Tyrphostin AG 490 [54]

Tyrphostin AG 490 ist schon in niedriger Dosis ein hocheffizienter Inhibitor der JAK2-abhängigen STAT3-Aktivierung [55, 56]. Dies wurde sowohl in vivo als auch in vitro bereits mehrfach gezeigt [39, 57-64]. Tyrphostin AG 490 ist als Tyrosinkinaseinhibitor nur begrenzt selektiv und hemmt in geringem Maße auch JAK3, JAK5 und Rezeptoren mit integrierter Tyrosinkinaseaktivität wie den EGF-Rezeptor. Andere lymphatische Tyrosinkinasen wie Lck, Lyn, Btk, Syk, Src, JAK1, Zap70 oder Tyk2 sind von der Hemmung nicht betroffen [55]. Die Wirkung von Tyrphostin AG 490 kann durch eine nukleäre Translokation von JAK2, eine unphosphorylierte STAT3-Aktivität und eine JAK2-unabhängige STAT3-Aktivierung umgangen werden [65, 66]. Andererseits zeigt Tyrphostin AG 490 aber auch eine JAK2/STAT3-unabhängige Hemmung des IL-6 Signalwegs [67]. Tyrphostin AG 490 führt außerdem auch zur Hemmung anderer JAK2-abhängiger Transkriptionsfaktoren wie z.B. STAT1, das gegensätzlich zu STAT3 wirken kann [57, 68]. In Bezug auf die Niere wirkt Tyrphostin AG 490 tierexperimentell nach oxidativem Stress nephroprotektiv und schützt nach Ischämie-Reperfusion, Sepsis oder Cyclosporin-Gabe vor einem akuten Nierenversagen [69]. In der vorliegenden Arbeit wird die Bedeutung der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie untersucht.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf dem Pathomechanismus obstruktiver Uropathien und den bisherigen Ergebnissen von Tyrphostin AG 490 in vitro und in adulten Tiermodellen sollen damit folgende Fragen beantwortet werden:

- Welche Rolle spielt STAT3 in Bezug auf die Inflammation und Fibroseentwicklung im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie?
- Kann Tyrphostin AG 490 im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie die Entwicklung von Inflammation und Fibrose erfolgreich reduzieren?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Das tierexperimentelle Projekt wurde auf Grundlage einer Genehmigung des Regierungspräsidiums Oberbayern mit dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2523-90-10 durchgeführt. Eine Ausbildungsgenehmigung im Bereich Versuchstierkunde und tierexperimenteller Methoden liegt vor (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.8-82-11).

Alle Tierexperimente wurden an neugeborenen Wildtypmäusen des Inzuchtstammes Charles River 57/Black 6 (C57/BL6) (Elevage Janvier, Le Genest Saint Isle, Frankreich) durchgeführt. Sowohl männliche als auch weibliche neonatale Tiere wurden in die Auswertung einbezogen. Die Tierhaltung erfolgte in der zentralen Versuchstierhaltung Innenstadt in München. Die Mäuse wurden in IVC-Käfigen der Größe (L x B x H) 365 x 207 x 140 mm mit einer Nutzfläche von 530 cm<sup>2</sup> (blueline Typ II long; Tecniplast, Hohenpeißenberg) gehalten. Die Käfige bestehen aus U-Temp Polyetherimid und wurden bei 134°C autoklaviert. Die bernsteingelbe Farbe des Käfigs reduziert den Lichteinfall. Das Einstreumaterial besteht aus rindenfreiem Fichtenholz (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und wurde einmal in der Woche gewechselt. Jeder Käfig ist mit einem roten Häuschen (EBECO), Nistmaterial (Nestletts der Firma Ssniff) und Nagematerial (Weichholzstücke der Firma Ssniff) ausgestattet. Die Mäuse wurden mit autoklaviertem Leitungswasser und autoklaviertem Alleinfutter V1534-300 ssniff R/M-H (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) mit 19 % Rohprotein, 3,3 % Rohfett, 4,9 % Rohfaser, 6,4 % Rohasche und ausreichenden Mengen an Calcium, Phosphor, Natrium, den Vitaminen A, D<sub>3</sub>, E und C sowie Kupfersulfat versorgt. Die Zu- und Abluft verlief in einem geschlossenen System und wurde durch HEPA-Filter gereinigt. Pro Ablufteinheit wurden zwei Sentineltiere gehalten. Es herrschte ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit. Die Temperatur betrug konstante 20-22°C.

### 2.2 Studienprotokoll

#### 2.2.1 Gruppeneinteilung: Behandlungsgruppe – Kontrollgruppe

Die Bedeutung der STAT3 Blockade wurde im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie untersucht. Dazu wurde bei den Versuchstieren am 2. Lebenstag eine unilaterale Ureterobstruktion oder eine Scheinoperation durchgeführt. Tiere beider Operationsverfahren wurden entweder in die Behandlungs- oder in die Vehikelgruppe eingeteilt. Die Tiere der Behandlungsgruppe erhielten ab dem 2. Lebenstag alle 24 h eine subkutane Injektion mit 10 mg/kg Körpergewicht STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG 490 gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) und verdünnt mit Natriumchloridlösung. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten ab dem 2. Lebenstag alle 24 h eine subkutane Injektion mit der Vehikel-lösung.

Die Organentnahme erfolgte am 3., 7. oder 14. Lebenstag. Dies entspricht dem 1., 5. oder 12. postoperativen Tag. Eine Übersicht über die zeitliche Abfolge von Geburt, Operation, Injektion und Organentnahme bietet Abbildung 7.

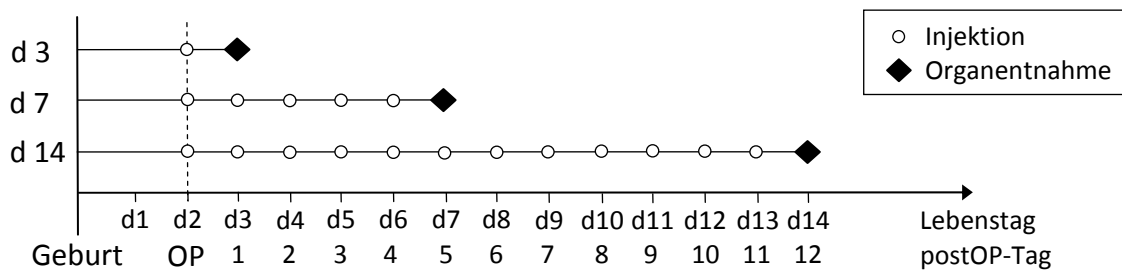


Abbildung 7: Übersichtsschema Geburt, Operation, Injektion und Organentnahme

Nach der Organentnahme wurden die Nieren für die immunhistochemische Analyse in Formalin fixiert und Färbungen für folgende Analysen durchgeführt: Makrophageninfiltration, T-Lymphozyteninfiltration, renale Apoptose, renale Proliferation, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose. Die Anzahl der neonatalen Mäuse, die pro Gruppe und Zeitpunkt für die immunhistochemische Analyse verwendet wurden, können entnommen werden.

	Behandlungsgruppe n = 48		Kontrollgruppe n = 48	
	UUO	Sham	UUO	Sham
Organentnahme d 3	8	8	8	8
Organentnahme d 7	8	8	8	8
Organentnahme d 14	8	8	8	8

Tabelle 1: Gruppeneinteilung Immunhistochemie

## 2.2.2 Mikrochirurgische Operationstechnik

Die neonatalen Mäuse wurden am 2. Lebenstag operiert. Die Operation erfolgte unter Inhalationsnarkose durch einen Verdampfer (Völker GmbH, Kaltenkirchen) mit Isofluran (Florene®; Abott, Wiesbaden) und 0,6 l O<sub>2</sub> pro Minute. Die Operation erfolgte unter sterilen Bedingungen und mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi 2000-C; Zeiss, Göttingen). Bei der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) wurde eine laterale Laparotomie durchgeführt und der linke Ureter dargestellt. Am ureteropelvinen Übergang wurde dann der linke Ureter mit zwei Fäden (Perma-Hand\*Seide, 8,0 mm; Ethicon, St-Stevens-Woluwe, Belgien) doppelt und vollständig ligiert. Anschließend wurden Peritoneum und Bauchdecke verschlossen. Bei der Scheinoperation (sham) wurde die Bauchdecke sowie das Peritoneum eröffnet und der Ureter ausschließlich dargestellt. Anschließend wurde das Abdomen ohne weitere Manipulation verschlossen. Nach der Operation kehrten die neugeborenen Mäuse zu ihrem Muttertier zurück.

### 2.2.3 STAT3 Blockade

Für die STAT3-Blockade wurden neonatale Mäuse ab dem 2. Lebenstag mit dem STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG 490 behandelt. Für die Injektionslösung der Behandlungsgruppe wurden 5 mg Tyrphostin (Sigma Aldrich, Steinheim) in 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid; Sigma Aldrich, Steinheim) gelöst und mit 1,222 ml (Braun Melsungen AG, Melsungen) verdünnt. Die Vehikellösung bestand aus 1 ml DMSO und 1,222 ml 0,9 % NaCl. Die Injektionslösung wurde mit einem Sterilfilter (Porengröße 0,02  $\mu\text{m}$ ; Wagner & Munz, München) filtriert und in sterile Röhrchen (CryoTube, 1,8 ml; Nunc, Roskilde, Dänemark) abgefüllt. Diese wurden für maximal 4 Wochen bei 4 °C gelagert.

Die Dosierung von Tyrphostin AG 490 wurde anhand der Publikation von Yang et al. gewählt [70]. Sie erfolgte gewichtsabhängig und betrug 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Dazu wurde das tägliche Körpergewicht der neonatalen Mäuse mit einer Waage (EMB 2000-3; Kern, Buchholz) bestimmt. Die Konzentration der Injektionslösung betrug 2,25 mg/ml. Es ergaben sich Injektionsvolumina zwischen 4 und 30  $\mu\text{l}$ , die subkutan in die Nackenfalte der Maus appliziert wurden (entsprechend Tabelle 2). Eine Übersicht über die durchschnittlich pro Lebenstag applizierten Injektionsvolumina gibt Abbildung 8.

Körpergewicht [g]	Injektionsvolumen [ $\mu\text{l}$ ]
1,0	4,4
2,0	8,9
3,0	13,3
4,0	17,8
5,0	22,2
6,0	26,7

Tabelle 2: Auszug aus Injektionsvolumen-Tabelle

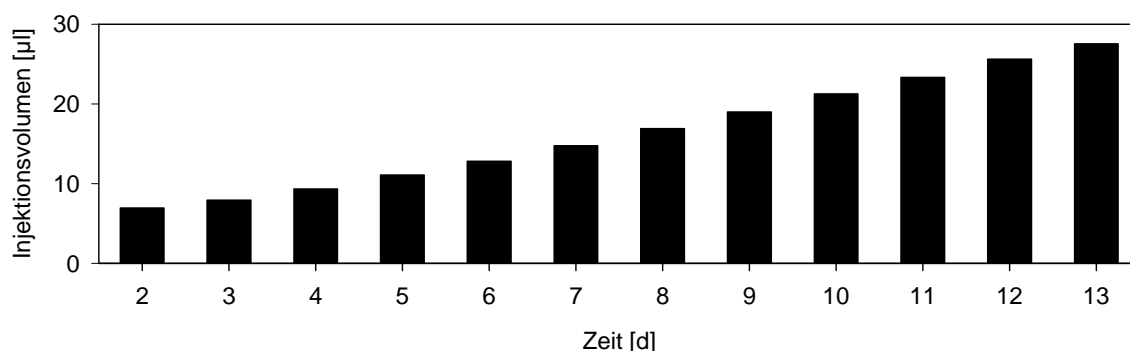


Abbildung 8: durchschnittlich applizierte Injektionsvolumina pro Lebenstag

Da diese geringen Volumina mit handelsüblichen Spritzen nicht präzise appliziert werden können, wurden Hamilton-Spritzen (Typ Microliter 800 RN, 50  $\mu\text{l}$ ; Hamilton, Bonaduz, Schweiz) mit speziellen Nadeln (26 G, piont Style 2, Länge 10 mm) verwendet. Zur Injektion wurde das benötigte Volumen an Tyrphostin- oder Vehikellösung mit einer sterilen Nadel aufgezogen. Nach der Injektion wurden Spritze und Nadeln jeweils gespült und bei



121 °C für 30 Minuten in einem Dampfdrucktopf (Pascal; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) autoklaviert.

## 2.2.4 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte am 3., 7. und 14. Lebenstag nach zervikaler Dislokation. Dabei wurde unter sterilen Bedingungen und mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi 2000-C; Zeiss, Göttingen) eine mediane Laparotomie durchgeführt. Die Nieren wurden aufgesucht und Nebenniere, Ureter und Hilusgefäße abgesetzt. Nach Freipräparierung, Dekapsulierung und bilateraler Nephrektomie wurden die Nieren einzeln gewogen, in gekühlter 0,9 % NaCl-Lösung platziert und für die anschließenden Analysen weiter prozessiert.

## 2.3 Histomorphologische Methoden

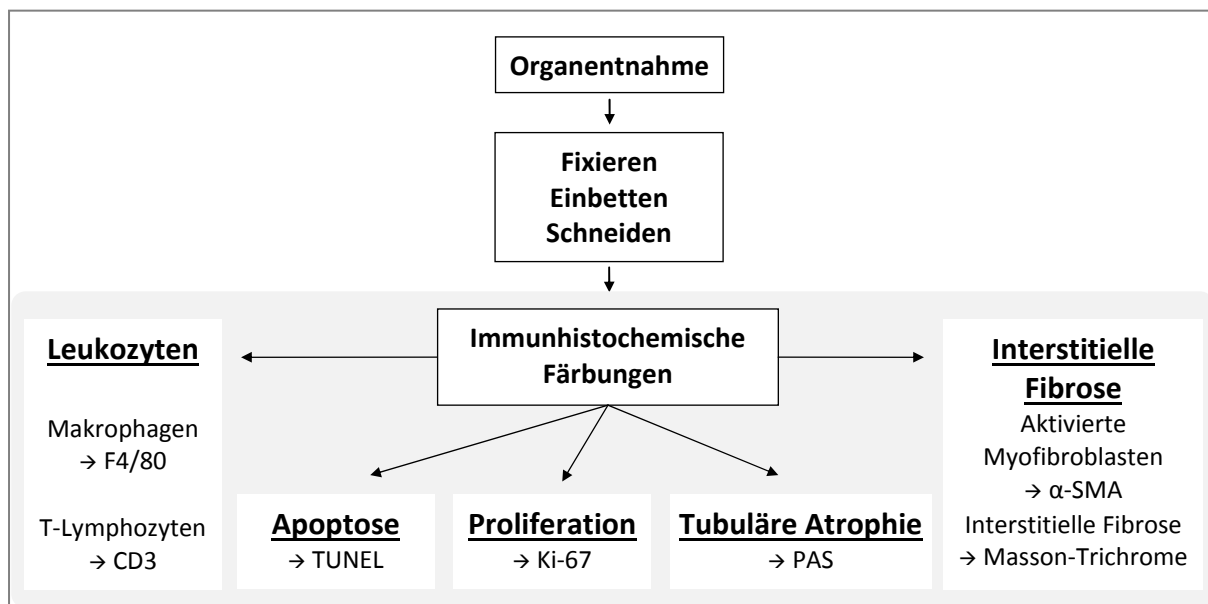


Abbildung 9: Ablaufschema der histomorphologischen Methoden

### 2.3.1 Fixierung und Paraffineinbettung der Nieren

Die Fixierung der Nieren für die Immunhistochemie erfolgte in 4 % Formaldehyd-Lösung für 24 h. Dafür wurden beide Nieren eines Tieres in einer beschrifteten Organkassette (Sanova, Wien, Österreich) platziert. Anschließend wurden die Organe für mindestens 24 h in 70 % Ethanol gelagert. Für die Paraffineinbettung durchliefen die Nieren eine aufsteigende Alkoholreihe: Sie lagerten für mindestens 24 h in 70 % Ethanol, zweimal für je 30 min in 96 % Ethanol und zweimal für je 45 min in 99 % Ethanol. Dann wurden sie für 45 min in Xylol gelegt. Anschließend wurden die Organkassetten in der Einbetтанlage (EG1150H; Leica, Nussloch) für 45 min in ein flüssiges Paraffinbad bei 60 °C gegeben. In eine Metallkassette wurde flüssiges Paraffin vorgelegt und auf dem Cool Spot angehärtet. Auf dem vorgelegten Paraffin wurden beide Nieren eines Tieres nebeneinander mit gegenüberliegendem Hilus positioniert. Anschließend wurde der beschriftete Organkassettendeckel auf die

Einbettschale aufgelegt und die gesamte Metallkassette mit flüssigem Paraffin ausgegossen. Das Aushärten erfolgte auf einer Kühlplatte (EG 50 C; Leica, Nussloch) bei  $-5^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden die Blöcke aus den Einbettschalen gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

### **2.3.2 Herstellung mikroskopischer Nierenschnitte**

Mit Hilfe des Rotationsmikrotoms (RM2255; Leica, Nussloch) wurden pro Organblock 24 serielle Schnitte einer Niere mit der Schichtdicke von  $3\ \mu\text{m}$  angefertigt. Die Schnitte wurden für einige Sekunden in einem Heizbad (HI 1210; Leica, Nussloch) mit Aqua dest. bei  $37^{\circ}\text{C}$  platziert. Jeweils 2 Schnitte wurden auf einem Objektträger positioniert, kurz auf einer Heizplatte (H 1220; Leica, Nussloch) bei  $37^{\circ}\text{C}$  und anschließend im Brutschrank (MiniOven MK II; MWG Biotech, Ebersberg) bei  $37^{\circ}\text{C}$  für mindestens 12 h getrocknet. Die fertigen Schnitte wurden bei Raumtemperatur gelagert.

### **2.3.3 Histologische Färbung der Makrophageninfiltration**

Die Makrophageninfiltration in die neonatalen Mausnieren wurde über die selektive Anfärbung des Oberflächenproteins F4/80 bestimmt. Die F4/80-Färbung begann nach Entparaffinieren der Schnitte durch Lagerung für zweimal je 5 Minuten in Dewax und weitere drei Mal für je 5 Minuten in Aqua dest.. Für die Antigen-Demaskierung lagerten die Schnitte für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  in Trispuffer (1 % TBS in Aqua dest. mit 0,05 % TWEEN, 0,1 % Trypsin und 0,1 %  $\text{CaCl}_2$ ). Anschließend wurden die Präparate drei Mal für je 5 Minuten in Aqua dest. und einmal für weitere 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Neutralisierung erfolgte durch Lagerung in 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol für 10 Minuten. Im Anschluss wurde zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Das Blocken erfolgte durch eine Inkubation mit Schafserum in einer Konzentration von 1:60 in PBS für 20 Minuten. Dann wurde erneut für 5 Minuten in PBS gewaschen. Der Primärantikörper rat-anti-mouse F4/80 wurde in der Konzentration 1:100 in 3 % BSA in PBS gelöst. Die Objektträger wurden über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit dem Antikörper inkubiert. Parallel wurden die Negativkontrollen mit der gleichen Lösung ohne Antikörper inkubiert. Anschließend wurden alle Objektträger wieder zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Der biotinylierte Zweitantikörper goat-anti-rat IgG wurde in der Konzentration 1:200 in 3 % BSA in PBS gelöst und die Schnitte für 30 Minuten inkubiert und dann erneut für zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Um die Farbintensität der F4/80-Färbung zu erhöhen, wurden die Schnitte für 30 Minuten mit Avidin/Biotin inkubiert und anschließend wieder zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Die enzymatische Färbung erfolgte durch eine 6-minütige Behandlung mit DAB. Danach wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Nach Gegenfärbung des Nierenparenchyms durch Lagerung für 5 Minuten in Löfflers Methylenblau durchliefen die Schnitte eine aufsteigend Alkoholreihe mit 70 %, 96 % und 99 % Ethanol und lagerten für zweimal 5 Minuten in Xylol. Die entwässerten Schnitte wurden abschließend mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung der Makrophageninfiltration erfolgte verblindet bei 400-facher Vergrößerung mit einem Raster mit  $10 \times 10$  Kästchen. In 20 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern

pro Niere wurden alle F4/80-positiven Rasterfelder ausgezählt (n = 8 pro Gruppe und Zeitpunkt).

### **2.3.4 Histologische Färbung der T-Lymphozyteninfiltration**

Die T-Lymphozyteninfiltration in die neonatalen Mausnieren wurde über die selektive Anfärbung des T-Lymphozyten-spezifischen Oberflächenproteins CD3 bestimmt. Die CD3-Färbung begann nach Entparaffinieren der Schnitte durch Lagerung für zweimal je 5 Minuten in Dewax und weitere drei Mal für je 5 Minuten in Aqua dest.. Die Antigen-Demaskierung der Oberflächenproteine erfolgte durch Behandlung mit Citratpuffer für 4 Minuten bei 125 °C im Dampfdrucktopf (Pascal; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) (9 ml Lösung A: 10,58 g Citronensäure in 500 ml Monohydrat, 41 ml Lösung B: 14,7 g Trinitiumcitrat in 500 ml Dihydrat und 450 ml Aqua ad injectabilia, pH 6). In diesem Puffer wurden die Schnitte auf Eis abgekühlt und dann für 5 Minuten in 1 % PBS in Aqua dest. gewaschen. Nach der Neutralisierung durch Lagerung in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 10 Minuten wurde zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Das Blocken erfolgte durch Inkubation mit Power Block 1:10 in Aqua dest. für 20 Minuten. Dann wurde erneut für 5 Minuten in PBS gewaschen. Der Primärantikörper rat-anti-human CD3 wurde in der Konzentration von 1:50 in einer Lösung aus 1 % Power Block, 9 % in Aqua dest. und 90 % PBS gelöst und die Objektträger damit für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Negativkontrollen wurden parallel mit der entsprechenden Lösung ohne Antikörper inkubiert. Anschließend wurde zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Der biotinylierte Zweitantikörper goat-anti-rat IgG wurde in der Konzentration von 1:100 in einer Lösung aus 1 % Power Block, 9% in Aqua dest. und 90 % PBS gelöst und die Objektträger damit für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wieder zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Um die Farbintensität der CD3-Färbung zu erhöhen, wurden die Schnitte für 30 Minuten mit Avidin/Biotin behandelt und anschließend wieder zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Die enzymatische Färbung erfolgte durch Inkubation für 5 Minuten mit DAB. Danach wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Nach der Gegenfärbung des Nierenparenchyms durch Lagerung für 5 Minuten in Löfflers Methylenblau durchliefen die Schnitte anschließend eine aufsteigend Alkoholreihe mit 70 %, 96 % und 99 % Ethanol und lagerten für zweimal 5 Minuten in Xylol. Die entwässerten Schnitte wurden abschließend mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung der T-Lymphozyteninfiltration erfolgte verblindet bei 400-facher Vergrößerung. In 20 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern pro Niere wurden alle CD3-positiven Zellen ausgezählt (n = 8 pro Gruppe und Zeitpunkt).

### **2.3.5 Histologische Färbung der renalen Apoptose**

Die renale Apoptose in den neonatalen Mausnieren wurde über die Anfärbung der DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellkernen mittels TUNEL-Färbung (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling) bestimmt. Die TUNEL-Färbung begann nach Entparaffinieren der Schnitte durch Lagerung für zweimal je

5 Minuten in Dewax und weitere drei Mal je 5 Minuten in Aqua dest.. Für die Antigen-Demaskierung wurden die Objektträger 20 Minuten mit Proteinase K in einer Konzentration von 20 µg/ml behandelt. Anschließend wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Neutralisierung erfolgte durch Lagerung in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 10 Minuten. Anschließend wurde erneut zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Die weiteren Schritte der TUNEL-Färbung wurden mittels eines TUNEL-Färbe-Kits (Apoptag<sup>®</sup> Peroxidase in situ Apoptosis Kit, Millipore) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt: Die Schnitte wurden für 5 Minuten mit Equilibration-Buffer inkubiert und dann für 5 Minuten in PBS gewaschen. Die enzymatische Markierung der Apoptose-positiven Zellkerne erfolgte durch Inkubation bei 37 °C für 1 h mit TdT-Enzym (terminale Desoxynucleotidyl-Transferase) im Reaktion-Puffer. Die Negativkontrollen wurden mit PBS inkubiert. Der Reaktionsstopp erfolgte durch Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten mit Stop/Wash-Puffer in Aqua dest., wobei die Schnitte alle 10 Minuten bewegt wurden. Anschließend wurde für zweimal 5 Minuten in PBS gewaschen. Das Blocken erfolgte durch Inkubation für 20 Minuten mit 1 % BSA in PBS. Dann wurden die Schnitte für 5 Minuten in PBS gewaschen. Die Detektion der gebundenen Nukleotide erfolgte durch Inkubation der Objektträger für 30 Minuten mit Antikörper-Digoxigenin-Peroxidase-Conjugate. Dann wurde drei Mal je 5 Minuten in PBS gewaschen. Die enzymatische Färbung erfolgte durch Inkubation für 5 Minuten mit DAB. Danach wurden die Objektträger für zweimal 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Nach der Gegenfärbung des Nierenparenchyms durch Lagerung für 5 Minuten in Löfflers Methylenblau durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70 %, 96 % und 99 % Ethanol und lagerten für zweimal 5 Minuten in Xylol. Die entwässerten Schnitte wurden abschließend mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung der renalen Apoptose erfolgte verblindet bei 400-facher Vergrößerung durch Auszählen aller TUNEL-positiven Zellen in 20 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern pro Niere. Hierbei wurden tubuläre, interstitielle und glomeruläre Zellen unterschieden (n = 8 pro Gruppe und Zeitpunkt).

### **2.3.6 Histologische Färbung der renalen Proliferation**

Die renale Proliferation in den neonatalen Mausnieren wurde über die selektive Anfärbung des Proliferations-spezifischen nukleären Proteins Ki-67 bestimmt. Die Ki-67-Färbung begann nach Entparaffinieren der Schnitte durch Lagerung für zweimal je 5 Minuten in Dewax und weitere drei Mal je 5 Minuten in Aqua dest.. Die Antigen-Demaskierung erfolgte durch Behandlung mit Citratpuffer (9 ml Lösung A: 10,58 g Citronensäure in 500 ml Monohydrat, 41 ml Lösung B: 14,7 g Trinitiumcitrat in 500 ml Dihydrat und 450 ml Aqua ad injectabilia, pH 6) für 4 Minuten bei 125 °C im Dampfdrucktopf (Pascal; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark) In diesem Puffer wurden die Schnitte anschließend auf Eis gekühlt und dann für 5 Minuten in 1 % PBS in Aqua dest. gewaschen. Die Neutralisierung erfolgte durch Lagerung in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 10 Minuten. Anschließend wurde zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Das Blocken erfolgte durch Inkubation mit Power Block 1:10 in Aqua dest. für 20 Minuten. Dann wurde erneut für 5 Minuten in PBS gewaschen. Der Primärantikörper mouse-anti-rat Ki-67 wurde in der Konzentration 1:25 in einer Lösung aus

1 % Power Block, 9 % in Aqua dest. und 90 % PBS gelöst und die Objektträger damit für 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Negativkontrollen wurden parallel mit der entsprechenden Lösung ohne Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Der Zweitantikörper horse-anti-mouse HRP wurde in der Konzentration von 1:100 in PBS gelöst und die Schnitte damit für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde wieder zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Die enzymatische Färbung erfolgte durch Behandlung für 4 Minuten mit DAB. Danach wurden die Schnitte für zweimal 5 Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Nach der Gegenfärbung des Nierenparenchyms durch Inkubation für 5 Minuten in Mayers Hämalaun wurden die Schnitte mit lauwarmem Leitungswasser gründlich gewaschen. Sie durchliefen anschließend eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70 %, 96 % und 99 % Ethanol und lagerten für zweimal je 5 Minuten in Xylol. Die entwässerten Schnitte wurden abschließend mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung der renalen Proliferation erfolgte verblindet bei 400-facher Vergrößerung durch Auszählen aller Ki-67-positiver Zellen in 20 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern pro Niere. Hierbei wurden tubuläre und interstitielle Zellen unterschieden (n = 8 pro Gruppe und Zeitpunkt).

### **2.3.7 Histologische Färbung der tubulären Atrophie**

Die tubuläre Atrophie in den neonatalen Mausnieren nach der Anfärbung von Zuckerderivaten (z.B. Glykogen, Polysaccharide, Glykoproteine und -lipide) in der tubulären Basalmembran mittels PAS-Färbung bestimmt (Periodic-acid-Schiff Reaktion). Die Färbung begann nach Entparaffinieren der Schnitte durch Lagerung für zweimal je 5 Minuten in Dewax und weitere drei Mal für je 5 Minuten in Aqua dest.. Anschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült. Für die spezifische Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 1 % Perjodsäure inkubiert und dann für drei Mal jeweils 3 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 25 Minuten mit Schiffs Reagenz inkubiert, für 5 Minuten mit Leitungswasser gespült und kurz in Aqua dest. gelagert. Die Gegenfärbung des Nierenparenchyms erfolgte durch Lagerung für 40 Minuten in Mayers Hämalaun bei RT. Die Schnitte wurden dann für 10 Minuten mit fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend durchliefen sie eine aufsteigend Alkoholreihe mit 70 %, 96 % und 99 % Ethanol und lagerten dann für zweimal je 5 Minuten in Xylol. Die entwässerten Schnitte wurden abschließend mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung der tubulären Atrophie erfolgte verblindet bei 400-facher Vergrößerung. Als atrophische Tubuli wurden proximale und distale Tubuli gewertet, deren Basalmembranen eine pathologische Verdickung, Aufsplitterung oder Wellenbildung zeigten. Die Auswertung erfolgte in 20 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern pro Niere (n = 8 pro Gruppe und Zeitpunkt).

### **2.3.8 Histologische Färbungen der interstitiellen Fibrose**

Die interstitielle Fibrose in den neonatalen Mausnieren wurde einerseits mittels  $\alpha$ -SMA-Färbung für aktivierte Myofibroblasten und andererseits mittels Masson-Trichrome-Färbung für Kollagenfasern bestimmt. Die  $\alpha$ -SMA-Färbung begann nach Entparaffinieren der

Schnitte durch Lagerung für zweimal je 5 Minuten in Dewax und weitere drei Mal je 5 Minuten in Aqua dest.. Anschließend wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült. Nach der Neutralisierung durch Lagerung in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 20 Minuten wurde zweimal für je 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Die Demaskierung der Oberflächenproteine erfolgte durch Behandlung mit Citratpuffer (9 ml Lösung A: 10,58 g Citronensäure in 500 ml Monohydrat, 41 ml Lösung B: 14,7 g Trinitiumcitrat in 500 ml Dihydrat und 450 ml Aqua ad injectabilia, pH 6) für 30 Sekunden bei 125 °C im Dampfdrucktopf (Pascal; Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark). In diesem Puffer wurden die Objektträger anschließend auf Eis gekühlt und die Schnitte dann fünfmal in Waschpuffer (1 x TBS mit 0,02 % Tween) gewaschen. Die folgenden Schritte der Färbung wurden mit dem Färbekit Histostain Sp Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Inkubation mit Blocking-Solution für 10 Minuten wurden die Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Erstantikörper Anti- $\alpha$ -SMA in der Konzentration von 1:3000, gelöst in Waschpuffer mit 0,15 % Blocking-Solution, inkubiert. Nach zweimaligem Waschen für je 5 Minuten in Waschpuffer wurden die Schnitte für 10 Minuten bei RT mit dem biotinylierten Zweitantikörper inkubiert und erneut für zweimal 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten mit Streptavidin-Konjugat bei RT inkubiert und wieder zweimal 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Nach anschließender Färbung mit dem Chromogen-Substrat für 6 Minuten wurden die Objektträger erneut zweimal 5 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Nach der Gegenfärbung des Nierenparenchyms durch Lagerung für 8 Minuten in Hämatoxylin wurden die Objektträger für 10 Minuten gründlich mit lauwarmem Leitungswasser gewaschen. Das Eindeckeln der Schnitte erfolgte mit der wässrigen Mounting-Solution. Die Auswertung der  $\alpha$ -SMA-Färbung erfolgte verblindet bei 400-facher Vergrößerung. In einem feinen Raster mit 10 x 10 Feldern wurden alle  $\alpha$ -SMA-positiven Felder in je 20 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern pro Niere ausgezählt (n = 8 pro Gruppe und Zeitpunkt).

Die Masson-Trichrome-Färbung begann nach Entparaffinieren der Schnitte durch Lagerung für zweimal je 5 Minuten in Dewax und weitere drei Mal für je 5 Minuten in Aqua dest.. Anschließend wurden die Objektträger mit Leitungswasser gespült. Nach der Färbung für 1 h bei 60 °C mit Bouin's Solution wurde erneut mit Leitungswasser gespült. Für die blaue Hämatoxylin-Färbung wurden die Schnitte für 2 Minuten mit Hämatoxylinlösung Gill Nr.3 behandelt und kurz mit Leitungswasser gespült. Anschließend lagerten die Schnitte für eine Minute in Aqua dest.. Für die rote Fuchsin-Färbung wurden die Schnitte für 5 Sekunden in Scarlet Acid Fuchsin gelagert, dann drei Mal kurz und drei Mal für je 3 Minuten mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Minuten mit einer Lösung aus 25 % Wolframatophosphorsäure und 25 % Molybdatophosphorsäure in Aqua dest. inkubiert. Für die blaue Anfärbung der Kollagenfasern wurden die Schnitte für mindestens 20 Minuten in Aniline blue Solution gelagert und kurz in Aqua dest. gewaschen. Die Schnitte durchliefen anschließend eine aufsteigend Alkoholreihe mit 70 %, 96 % und 99 % Ethanol und lagerten dann für zweimal 5 Minuten in Xylol. Die entwässerten Schnitte wurden abschließend mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung der interstitiellen Fibrose mittels Masson-Trichrome-Färbung erfolgte verblindet bei 400-facher Vergrößerung. In einem Raster mit 10 x 10 Fel-

den wurden alle Kollagen-positiven Felder in je 20 nicht-überlappenden Gesichtsfeldern pro Niere ausgezählt (n = 8 pro Gruppe und Zeitpunkt).

## 2.4 Statistik

Für die statistischen Analysen wurde das Statistikprogramm SigmaStat® verwendet. Die Vergleiche zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) oder dem multifaktoriellen Turkey Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein  $p < 0,05$  festgelegt. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben. Für die graphische Darstellung wurde das Programm SigmaPlot® verwendet.

## 2.5 Chemikalien

Aniline blue Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti-CD3, rat-anti-human IgG monoklonal	Serotec, Kumhausen
Anti-F4/80, rat-anti-mouse IgG monoklonal	ATCC, Manassas, Virginia, USA
Anti-Ki-67 mouse-anti-rat monoklonal	Dako, Carpinteria, USA
Aqua bidestilata	Apotheke Innenstadt Universität München
Aqua destilata	Apotheke Innenstadt Universität München
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Avidin/Biotin, Vectastain	Vektor, Burlingham, USA
Biotin Blocking Reagent	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
biotinylierter goat anti rat IgG Antikörper	Southern Biotech, Birming, Alabama, USA
Bouin's Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim
BSA min. 98 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
CaCl <sub>2</sub> 93,0 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure	Merck, Darmstadt
DAB Peroxidase substrate Kit	Vector, Burlingham, USA
Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dewax	BioGenex, San Ramon, USA
Dihydrat	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %, 1 % Methylethylketon	Apotheke Innenstadt Universität München
Ethanol 99 %, 1 % Petrolether	SAV LP, Flintsbach
Eukitt	Sigma-Aldrich, Steinheim
Forene (Isofluran)	Abbott, Wiesbaden
Formaldehydlösung 4%, gepuffert pH 6,9	Merck, Darmstadt
Goat Normal Serum	Linaris, Dossenheim
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hämatoxylin Gill Nr.3	Sigma-Aldrich, Steinheim
Histostain SP Kit, AEC Broad Spectrum	Invitrogen, Karlsruhe
HRP-konjugierter horse-anti-mouse AK	Cell Signaling, Frankfurt
Löfflers Methylenblau 0,5 %	Merck, Darmstadt
Mayers Hämalaun	Apotheke Innenstadt Universität München
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

---

Molybdato-phosphorsäure 25 % Monohydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt
mouse anti rat Ki-67 Antikörper	Dako, Carpinteria, USA
Paraplast, Schmelzpunkt 56 °C	McCormick, Richmond, USA
PBS pH 7,4	Biochrome AG, Berlin
Perjodsäure	Merck, Darmstadt
Power Block	Bio Genex, Den Haag, Niederlande
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Steinheim
Scarlet Acid Fuchsin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Schafserum	Vector, Burlingham, USA
Schiffs Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
TBS Aqua dest. 1 %	Merck, Darmstadt
Trinatriumcitrat	Merck, Darmstadt
Trypsin, Type II-S aus Schweinepankreas	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tunel-Apoptag Peroxidase in situ Apopt. Kit	Millipore, Schwalbach
TWEEN 20	AppliChem, Darmstadt
Tyrphostin AG 490	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vector DAB HRP-Substrat	Linaris, Dossenheim
Wolframatophosphorsäure 25 %	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol	Merck, Darmstadt

---



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Tyrphostin AG 490 und die neonatale Entwicklung

Zur Beurteilung der neonatalen Entwicklung wurden das Körperwachstum und die motorische Entwicklung der neugeborenen Mäuse regelmäßig erfasst. Das Körpergewicht der Mäuse wurde täglich mittels Wiegen bestimmt. Das mittlere Ausgangsgewicht beider Gruppen am 2. Lebenstag lag bei 1,6 g. Die Tiere der Kontrollgruppe waren am 2. Lebenstag mit 1,6 g im Durchschnitt 7 % schwerer als die Tiere der Behandlungsgruppe mit 1,5 g. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Das mittlere Körpergewicht stieg in beiden Gruppen kontinuierlich an und erreichte am 14. Lebenstag einen mittleren Wert von 6,5 g. Das Körpergewicht der Behandlungsgruppe am 14. Lebenstag lag mit 6,8 g 8 % über dem der Kontrollgruppe mit 6,3 g. Dieser Unterschied war ebenfalls nicht signifikant ( $p > 0,05$ , vgl. Tabelle 3 und Abbildung 10).

Lebenstag	mittleres Körpergewicht [g]		
	Behandlungsgruppe	Kontrollgruppe	gemeinsamer Mittelwert
2	1,5	1,6	1,6
3	1,7	1,8	1,8
4	2,1	2,1	2,1
5	2,4	2,6	2,5
6	2,8	3,0	2,9
7	3,2	3,4	3,3
8	3,9	3,7	3,8
9	4,4	4,1	4,3
10	5,0	4,6	4,8
11	5,5	5,0	5,3
12	6,0	5,5	5,8
13	6,4	6,0	6,2
14	6,8	6,3	6,5

Tabelle 3: Entwicklung des durchschnittlichen Körpergewichts in Behandlungs- und Kontrollgruppe

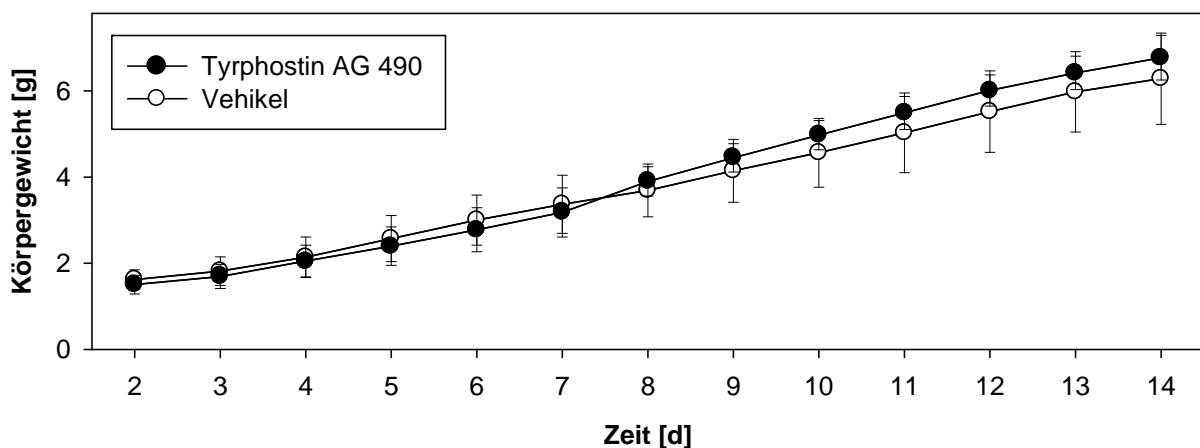


Abbildung 10: Entwicklung des durchschnittlichen Körpergewichts [g] mit Standardabweichung in der Behandlungs- und der Kontrollgruppe

Eine Beurteilung der neonatalen Entwicklung erfolgte zusätzlich in den Kategorien Muskeltonus, Motorik, Saugverhalten und Annahme durch die Mutter. Ein normales Verhalten wurde mit jeweils zwei Punkten, ein reduziertes oder verändertes Verhalten mit einem Punkt und kein entsprechendes Verhalten mit 0 Punkten bewertet. Alle untersuchten Tiere erreichten konstant den Normalwert von acht Punkten. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte damit zu keinem Unterschied in der neonatalen Entwicklung zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe. Eine leichte Hautrötung kurz nach der Injektion von Tyrphostin AG 490, bzw. Vehikel und eine verzögerte Fellentwicklung an der Applikationsstelle waren in der Behandlungs- und Kontrollgruppe gleichermaßen nachweisbar.

## **3.2 Morphologie der unilateralen Ureterligatur**

Nach mikrochirurgischer unilateraler Ureterligatur (UUO) am 2. Lebenstag entwickelte sich in allen ureterligierten Nieren bereits nach 24 h eine sichtbare Hydronephrose. Die Dilatation des Nierenbeckens und des Ureters oberhalb der Ligatur nahmen in den folgenden Lebenstagen progredient zu. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme des Nierenparenchyms und der Mark-Rinden-Relation. Sammelrohre und distale Tubuli zeigten eine zystische Dilatation. Proximale Tubuli und Glomeruli stellten sich weitgehend unverändert dar. Die kontralaterale Niere zeigte im Verlauf eine deutliche Größenzunahme durch ihre kompensatorische Hypertrophie. Bei den scheinoperierten Kontrollen wurde keine Größenzunahme der kontralateralen Niere beobachtet.

## **3.3 Effekte von Tyrphostin AG 490 in der Mausnieren**

Um den Einfluss physiologischer Entwicklungsveränderungen auf die Ergebnisse auszuschließen, wurden alle Daten mit den Messwerten scheinoperierter Nieren des gleichen Entwicklungsstadiums und Behandlungsschemas verglichen. Die Rohdaten sind jeweils in Klammern, bzw. in Tabellen angegeben.

### **3.3.1 Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die Makrophageninfiltration**

Die Makrophageninfiltration in neonatalen Mausnieren wurde mittels Anti-F4/80-Antikörper-Färbung (Abbildung 12) ermittelt. Die Anzahl F4/80-positiver Rasterfelder ist in Tabelle 4 und der Vergleich zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe bezogen auf die scheinoperierte Nieren (Sham) in Abbildung 13 dargestellt.

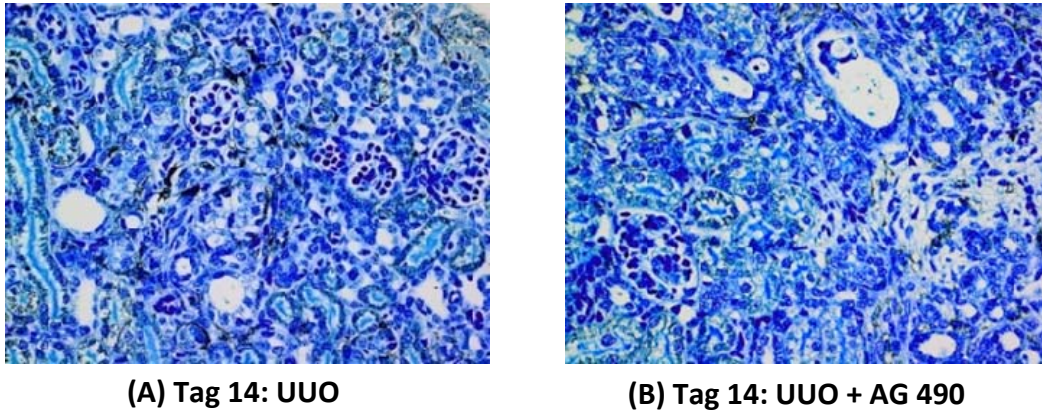


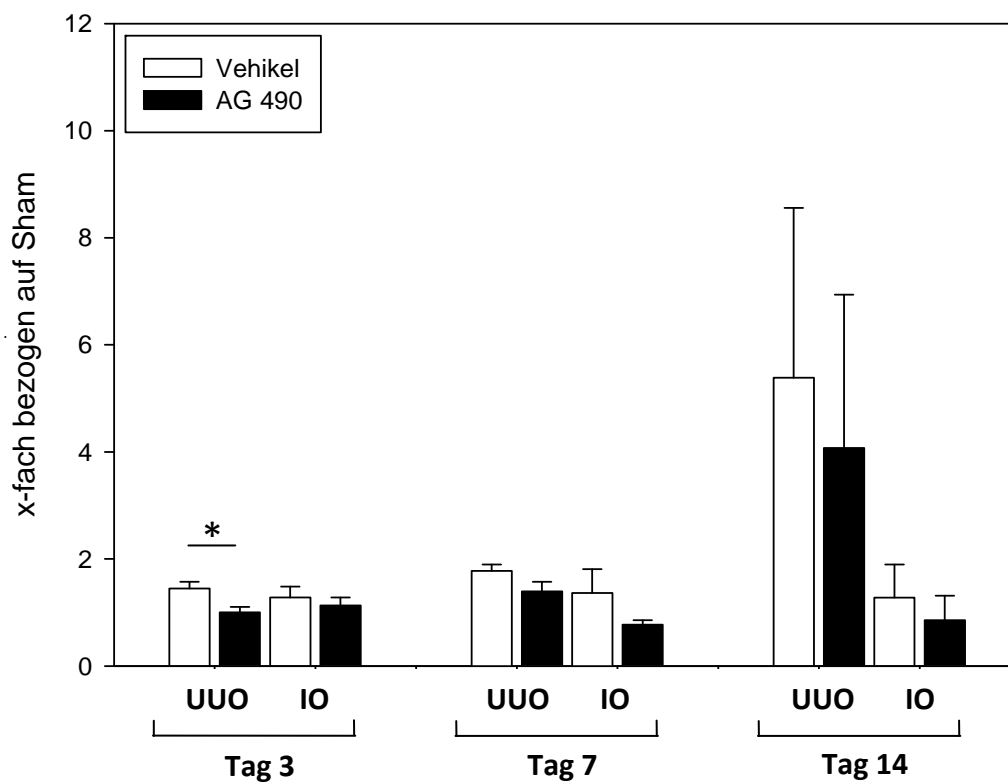
Abbildung 12: F4/80-Färbung neonataler ureterligierter Nieren (UUO) am 14. Lebenstag nach Vehikelbehandlung (A) bzw. Tyrphostin AG 490-Behandlung (B).

Die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) führte in den ureterligierten Nieren zu einer signifikanten und progredienten Zunahme der Makrophageninfiltration, die besonders peritubulär nachweisbar war. Konkret stieg die Makrophageninfiltration signifikant am 3. Lebenstag, also einen Tag nach Ureterligatur, auf das 1,4-Fache (Vehikelgruppe mit  $213,6 \pm 18,7$  versus scheinoperierte Tiere mit  $147,6 \pm 21,2$  F4/80-positiven Rasterfeldern,  $p < 0,05$ ), am 7. Lebenstag auf das 1,8-Fache ( $297,6 \pm 20,2$  versus  $167,6 \pm 25,0$ ) und am 14. Lebenstag auf 5,3-Fache ( $849,8 \pm 177,3$  versus  $157,9 \pm 8,0$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. Auch in den kontralateralen Nieren führte die Ureterligatur zu einer Zunahme der Makrophageninfiltration, die jedoch nicht signifikant war. Die Makrophageninfiltration stieg am 3. Lebenstag auf das 1,3-Fache ( $188,8 \pm 30,1$  versus  $147,6 \pm 21,2$ ), am 7. Lebenstag auf das 1,04-Fache ( $175,0 \pm 26,4$  versus  $167,6 \pm 25,0$ ) und am 14. Lebenstag auf das 1,3-Fache ( $201,1 \pm 34,7$  versus  $157,9 \pm 8,0$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in den ureterligierten Nieren zu einer Reduktion der Makrophageninfiltration, die jedoch nur am 3. Lebenstag um 30,9 % signifikant reduziert war ( $153,9 \pm 15,9$  versus Vehikelgruppe mit  $213,6 \pm 18,7$ ,  $p < 0,05$ ). Am 7. Lebenstag reduzierte Tyrphostin AG 490 die Makrophageninfiltration um 21,4 % ( $291,8 \pm 37,4$  versus  $297,6 \pm 20,2$ ) und am 14. Lebenstag um 24,3 % ( $696,6 \pm 173,2$  versus  $849,8 \pm 177,3$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte auch in den kontralateralen Nieren zu einer Reduktion der Makrophageninfiltration, die jedoch nicht signifikant war. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die Makrophageninfiltration am 3. Lebenstag um 11,7 % ( $174,0 \pm 22,6$  versus  $188,8 \pm 30,1$ ), am 7. Lebenstag um 26,2 % ( $161,1 \pm 17,8$  versus  $175,0 \pm 26,4$ ) und am 14. Lebenstag um 32,3 % ( $146,3 \pm 27,6$  versus  $201,1 \pm 34,7$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	153,9 ± 15,9	213,6 ± 18,7	174,0 ± 22,6	188,8 ± 30,1	153,9 ± 20,5	147,6 ± 21,2
7. Lebenstag	291,8 ± 37,4	297,6 ± 20,2	161,1 ± 17,8	175,0 ± 26,4	209,1 ± 24,9	167,6 ± 25,0
14. Lebenstag	696,6 ± 173,2	849,8 ± 177,3	146,3 ± 27,6	201,1 ± 34,7	171,0 ± 9,0	157,9 ± 8,0

**Tabelle 4: Analyse der Makrophageninfiltration: F4/80-positiven Rasterfelder (Mittelwert ± Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**



**Abbildung 13: Morphometrische Analyse der Infiltration F4/80-positiver Makrophagen in den ureterligierten (UUO) und den kontralateralen (IO) Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n = 8), \* p < 0,05.**

### 3.3.2 Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die T-Lymphozyteninfiltration

Die Infiltration von T-Lymphozyten in neonatale Mausnieren wurde mittels Anti-CD3-Antikörper-Färbung (Abbildung 14) ermittelt. Die Anzahl CD3-positiver Zellen ist in Tabelle 5 und der Vergleich zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe bezogen auf die scheinoperierten Nieren (Sham) in Abbildung 15 dargestellt.

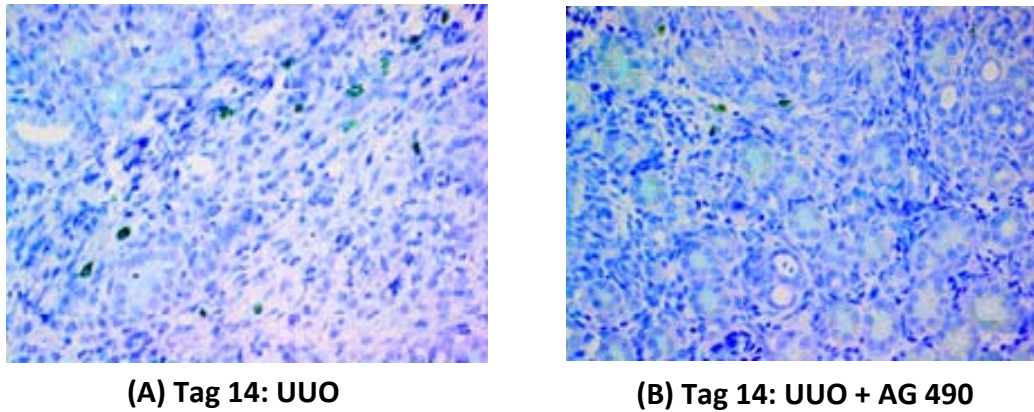


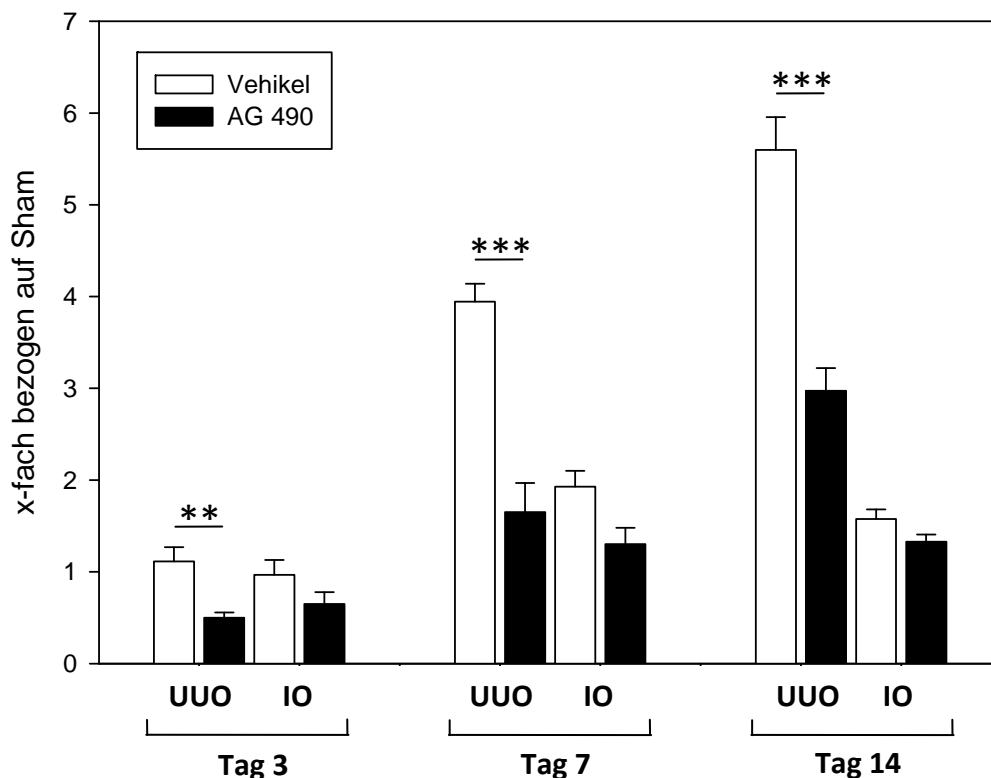
Abbildung 14: CD3-Färbung neonataler ureterligierter Nieren (UUO) am 14. Lebenstag nach Vehikelbehandlung (A) bzw. Tyrphostin AG 490-Behandlung (B)

Die unilaterale Ureterligatur (UUO) führte in den ureterligierten Nieren zu einer progredienten Zunahme der T-Lymphozyteninfiltration. Am 3. Lebenstag zeigte sich ein 1,1-facher Anstieg der T-Lymphozyteneinwanderung (Vehikelgruppe mit  $12,4 \pm 1,8$  versus scheinoperierte Tiere mit  $11,1 \pm 1,0$  CD3-positive T-Lymphozyten) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Die T-Lymphozyteninfiltration nach Ureterligatur stieg dann signifikant am 7. Lebenstag auf das 3,7-Fache ( $58,7 \pm 3,0$  versus  $15,6 \pm 3,0$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag auf das 47,0-Fache ( $128,8 \pm 8,2$  versus  $23,0 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. Interessanterweise führte die Ureterligatur ab dem 7. Lebenstag auch in den kontralateralen Nieren zu einer signifikanten Zunahme der T-Lymphozyteninfiltration. Sie stieg am 7. Lebenstag signifikant auf das 1,9-Fache ( $30,4 \pm 2,7$  versus  $15,6 \pm 3,0$ ,  $p < 0,01$ ) und am 14. Lebenstag signifikant auf das 1,6-Fache ( $36,3 \pm 2,4$  versus  $23,0 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einer signifikanten Reduktion der T-Lymphozyteninfiltration. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die T-Lymphozyteninfiltration am 3. Lebenstag um 55,2 % ( $5,4 \pm 0,6$  versus Vehikelgruppe mit  $12,4 \pm 1,8$ ,  $p < 0,01$ ), am 7. Lebenstag um 50,5 % ( $26,6 \pm 5,1$  versus  $58,7 \pm 3,0$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag, also 12 Tage nach Ureterligatur, um 47,0 % ( $66,9 \pm 5,6$  versus  $128,8 \pm 8,2$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte nach Ureterligatur auch in den kontralateralen Nieren zu einer Reduktion der T-Lymphozyteninfiltration, die jedoch nicht signifikant war. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die T-Lymphozyteninfiltration am 3. Lebenstag um 30,8 % ( $7,0 \pm 1$  versus  $10,4 \pm 2$ ), am 7. Lebenstag um 33,0 % ( $21,0 \pm 3$  versus  $30,4 \pm 3$ ) und am 14. Lebenstag um 15,8 % ( $29,9 \pm 2$  versus  $36,3 \pm 2$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	5,4 ± 0,6	12,4 ± 1,8	7,0 ± 1,4	10,4 ± 2,0	10,8 ± 1,6	11,1 ± 1,0
7. Lebenstag	26,6 ± 5,1	58,7 ± 3,0	21,0 ± 2,9	30,4 ± 2,7	16,1 ± 3,7	15,6 ± 3,0
14. Lebenstag	66,9 ± 5,6	128,8 ± 8,2	29,9 ± 1,8	36,3 ± 2,4	22,5 ± 0,7	23,0 ± 0,4

**Tabelle 5: T-Lymphozyteninfiltration: CD3-positive Zellen (Mittelwert ± Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**



**Abbildung 15: Morphometrische Analyse der Infiltration CD3-positiver T-Lymphozyten in den ureterligierten (UUO) und den kontralateralen (IO) Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n = 8), \*\*p < 0,01 und \*\*\* p < 0,001.**

### 3.3.3 Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die renale Apoptose

Die renale Apoptose in neonatalen Mausnieren wurde mittels TUNEL-Färbung bestimmt (Abbildung 16). Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen ist für tubuläre Zellen in Tabelle 6, für interstitielle Zellen in Tabelle 7 und für glomeruläre Zellen in Tabelle 8 angegeben. Den Vergleich zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe bezogen auf die scheinoperierten Nieren (Sham) zeigt für die ureterligierten Nieren Tabelle 17 und für die kontralateralen Nieren Tabelle 18.

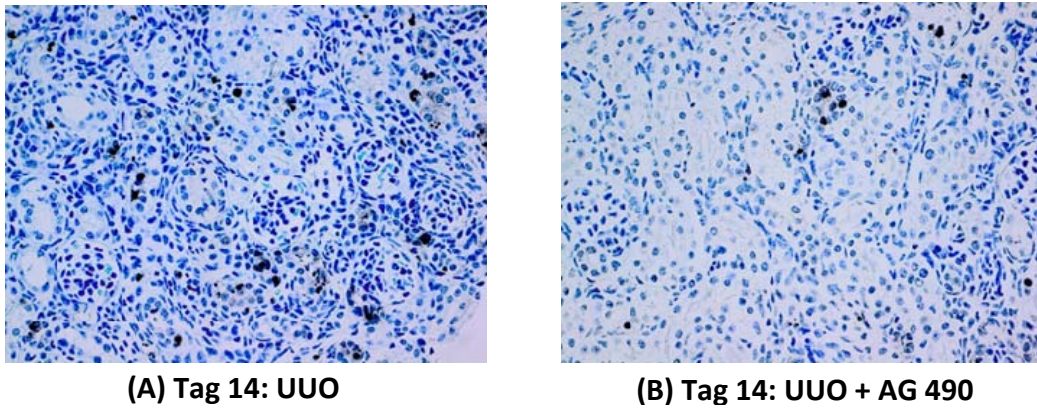


Abbildung 16: TUNEL-Färbung neonataler ureterligierter Nieren (UUO) am 14. Lebenstag nach Vehikelbehandlung (A) bzw. Tyrphostin AG 490-Behandlung (B)

Die unilaterale Ureterligatur (UUO) führte in allen ureterligierten Nieren zu einem signifikanten und progredienten Anstieg der tubulären Apoptose. Die tubuläre Apoptose stieg am 3. Lebenstag signifikant auf das 1,3-Fache an (Vehikelgruppe mit  $31,5 \pm 1,8$  versus scheinoperierte Tiere mit  $24,8 \pm 1,0$  TUNEL-positiven tubulären Zellen,  $p < 0,01$ ), am 7. Lebenstag signifikant auf das 3,6-Fache ( $122,3 \pm 7,0$  versus  $34,4 \pm 2,8$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag signifikant auf das 40,9-Fache ( $132,6 \pm 3,7$  versus  $3,3 \pm 0,4$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. Die Ureterligatur führte in den kontralateralen Nieren zu folgenden Veränderungen, die jedoch nicht signifikant waren: Am 3. Lebenstag zeigte sich ein 1,2-facher Anstieg der tubulären Apoptose ( $29,9 \pm 2,1$  versus  $24,8 \pm 1,0$ ), am 7. Lebenstag eine Reduktion um 13,1 % ( $29,9 \pm 3,8$  versus  $34,4 \pm 2,8$ ) und am 14. Lebenstag ein 1,2-facher Anstieg ( $4,1 \pm 0,6$  versus  $3,3 \pm 0,4$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einer signifikanten Reduktion der tubulären Apoptose. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Apoptose signifikant am 3. Lebenstag um 30,7 % ( $22,6 \pm 1,3$  versus Vehikelgruppe mit  $31,5 \pm 1,8$ ,  $p < 0,001$ ), am 7. Lebenstag um 64,8 % ( $37,3 \pm 2,2$  versus  $122,3 \pm 7,0$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag um 52,3 % ( $63,3 \pm 2,7$  versus  $132,6 \pm 3,7$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte auch in den kontralateralen Nieren zu einer Reduktion der tubulären Apoptose, die jedoch nicht signifikant war. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Apoptose am 3. Lebenstag um 19,0 % ( $25,1 \pm 1,9$  versus  $29,9 \pm 2,1$ ), am 7. Lebenstag um 22,4 % ( $20,1 \pm 1,0$  versus  $29,9 \pm 3,8$ ) und am 14. Lebenstag um 23,5 % ( $2,9 \pm 0,3$  versus  $4,1 \pm 0,6$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.



	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	22,6 ± 1,3	31,5 ± 1,8	25,1 ± 1,9	29,9 ± 2,1	25,6 ± 1,0	24,8 ± 1,0
7. Lebenstag	37,3 ± 2,2	122,3 ± 7,0	20,1 ± 1,0	29,9 ± 3,8	29,8 ± 1,9	34,4 ± 2,8
14. Lebenstag	63,3 ± 2,7	132,6 ± 3,7	2,9 ± 0,3	4,1 ± 0,6	3,3 ± 0,3	3,3 ± 0,4

**Tabelle 6: tubuläre Apoptose: TUNEL positive tubuläre Zellen (Mittelwert ± Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**

Die unilaterale Ureterligatur (UUO) führte in allen ureterligierten Nieren zu einem progredienten Anstieg der interstitiellen Apoptose. Am 3. Lebenstag stieg die interstitielle Apoptose auf das 1,2-Fache (Vehikelgruppe mit  $18,5 \pm 1,2$  versus scheinoperierte Tiere mit  $15,6 \pm 0,8$  TUNEL-positiven interstitiellen Zellen) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Die interstitielle Apoptose nahm im Verlauf signifikant zu und stieg am 7. Lebenstag auf das 2,8-Fache ( $43,8 \pm 3,9$  versus  $15,6 \pm 1,4$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag auf das 26,1-Fache ( $49,1 \pm 0,6$  versus  $1,9 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Die Ureterligatur führte in den kontralateralen Nieren zu folgenden Veränderungen der interstitiellen Apoptose, die jedoch nicht signifikant waren. Sie stieg am 3. Lebenstag auf das 1,2-Fache ( $18,6 \pm 1,3$  versus  $15,6 \pm 0,8$ ) und nahm am 7. Lebenstag bzw. am 14. Lebenstag um 13,5 % ( $13,5 \pm 1,0$  versus  $15,6 \pm 1,4$ ) bzw. 5,3 % ( $1,8 \pm 0,3$  versus  $1,9 \pm 0,3$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle ab.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einer signifikanten Reduktion der interstitiellen Apoptose. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die interstitielle Apoptose signifikant am 3. Lebenstag um 29,7 % ( $13,3 \pm 1,3$  versus Vehikelgruppe mit  $18,5 \pm 1,2$ ,  $p < 0,01$ ), am 7. Lebenstag um 61,9 % ( $17,1 \pm 1,5$  versus  $43,8 \pm 3,9$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag um 41,5 % ( $28,8 \pm 1,5$  versus  $49,1 \pm 0,6$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte auch in den kontralateralen Nieren zu einer Reduktion der interstitiellen Apoptose, die jedoch nur am 3. Lebenstag um 26,1 % im Vergleich zur Vehikelgruppe signifikant war ( $14,1 \pm 1,2$  versus Vehikelgruppe  $18,6 \pm 1,3$ ,  $p < 0,05$ ). Am 7. bzw. 14. Lebenstag reduzierte Tyrphostin AG 490 die interstitielle Apoptose um 17,6 % ( $11,4 \pm 0,8$  versus  $13,5 \pm 1,0$ ) bzw. um 35,5 % ( $1,1 \pm 0,1$  versus  $1,8 \pm 0,3$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	13,3 ± 1,3	18,5 ± 1,2	14,1 ± 1,2	18,6 ± 1,3	16,0 ± 0,9	15,6 ± 0,8
7. Lebenstag	17,1 ± 1,5	43,8 ± 3,9	11,4 ± 0,8	13,5 ± 1,0	16,0 ± 0,9	15,6 ± 1,4
14. Lebenstag	28,8 ± 1,5	49,1 ± 0,6	1,1 ± 0,1	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,3

**Tabelle 7: interstitielle Apoptose: TUNEL positive interstitielle Zellen (Mittelwert ± Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**



Die unilaterale Ureterligatur führte in allen ureterligierten Nieren auch zu einem progredienten Anstieg der glomerulären Apoptose. Am 3. Lebenstag zeigte sich ein 1,07-facher Anstieg der glomerulären Apoptose (Vehikelgruppe mit  $5,9 \pm 0,4$  versus scheinoperierte Tiere mit  $5,5 \pm 1,1$  TUNEL-positiven glomerulären Zellen) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Die glomeruläre Apoptose nahm im Verlauf signifikant zu und stieg am 7. Lebenstag auf das 1,5-Fache ( $23,6 \pm 2,6$  versus  $16,0 \pm 0,6$ ,  $p < 0,01$ ) und am 14. Lebenstag auf das 10,9-Fache ( $10,9 \pm 0,8$  versus  $1,0 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. Die Ureterligatur reduzierte auch in den kontralateralen Nieren die glomeruläre Apoptose, jedoch war dies nicht signifikant. Die glomeruläre Apoptose war am 3. Lebenstag um 1,8 % ( $5,4 \pm 0,7$  versus  $5,5 \pm 1,1$ ), am 7. Lebenstag um 12,5 % ( $14,0 \pm 2,1$  versus  $16,0 \pm 0,6$ ) und am 14. Lebenstag um 70 % ( $0,3 \pm 0,3$  versus  $1,0 \pm 0,3$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle reduziert.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einer signifikanten Reduktion der glomerulären Apoptose. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die glomeruläre Apoptose signifikant am 3. Lebenstag um 39,3 % ab ( $4,0 \pm 0,5$  versus Vehikelgruppe mit  $5,9 \pm 0,4$ ,  $p < 0,05$ ), am 7. Lebenstag um 42,3 % ( $11,4 \pm 1,6$  versus  $23,6 \pm 2,6$ ,  $p < 0,01$ ) und am 14. Lebenstag um 46,0 % ( $5,9 \pm 0,7$  versus  $10,9 \pm 0,8$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in den kontralateralen Nieren zu folgenden Veränderungen der glomerulären Apoptose, die jedoch nicht signifikant waren. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die glomeruläre Apoptose am 3. Lebenstag um 31,6 % ( $4,1 \pm 0,5$  versus Vehikelgruppe mit  $5,4 \pm 0,7$ ) und am 7. Lebenstag um 31,8 % ( $8,0 \pm 1,4$  versus  $14,0 \pm 2,1$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Am 14. Lebenstag steigerte Tyrphostin AG 490 die glomeruläre Apoptose um 66,6 % ( $0,5 \pm 0,4$  versus  $0,3 \pm 0,3$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	$4,0 \pm 0,5$	$5,9 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,7$	$6,1 \pm 0,5$	$5,5 \pm 1,1$
7. Lebenstag	$11,4 \pm 1,6$	$23,6 \pm 2,6$	$8,0 \pm 1,4$	$14,0 \pm 2,1$	$13,4 \pm 1,1$	$16,0 \pm 0,6$
14. Lebenstag	$5,9 \pm 0,7$	$10,9 \pm 0,8$	$0,5 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$	$1,0 \pm 0,3$

**Tabelle 8: glomeruläre Apoptose: TUNEL positive glomeruläre Zellen (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**

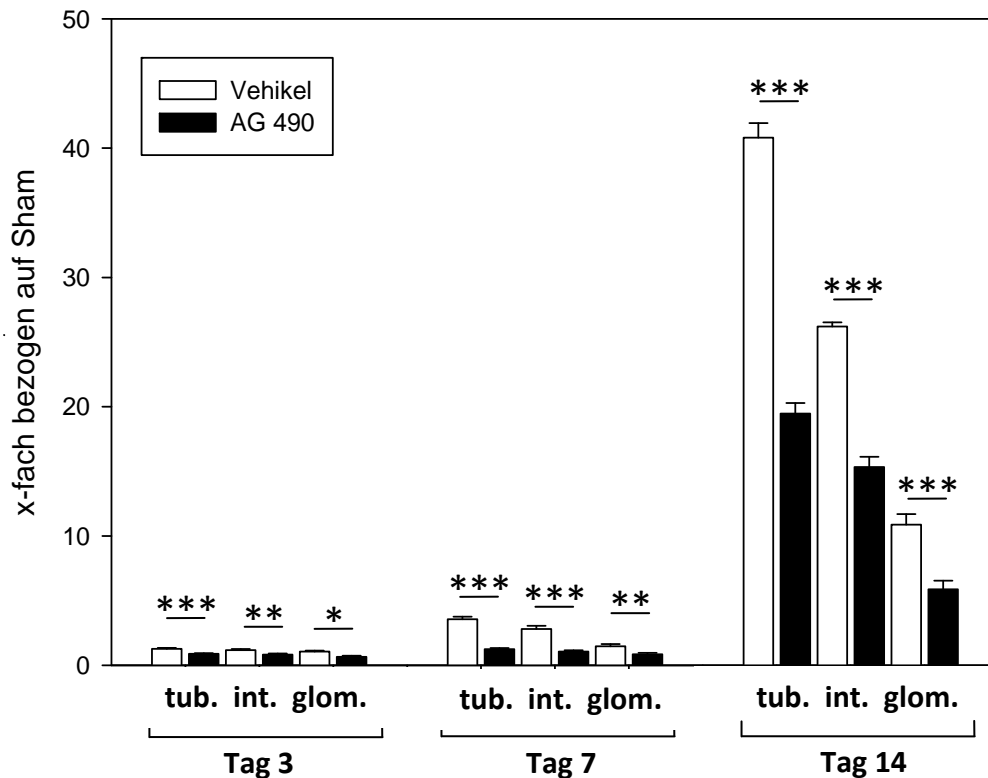


Abbildung 17: Morphometrische Analyse der TUNEL-positiven Zellen (tubulär/interstitiell/glomerulär) in den ureterligierten Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n = 8), \*p < 0,05, \*\*p < 0,01 und \*\*\* p < 0,001.

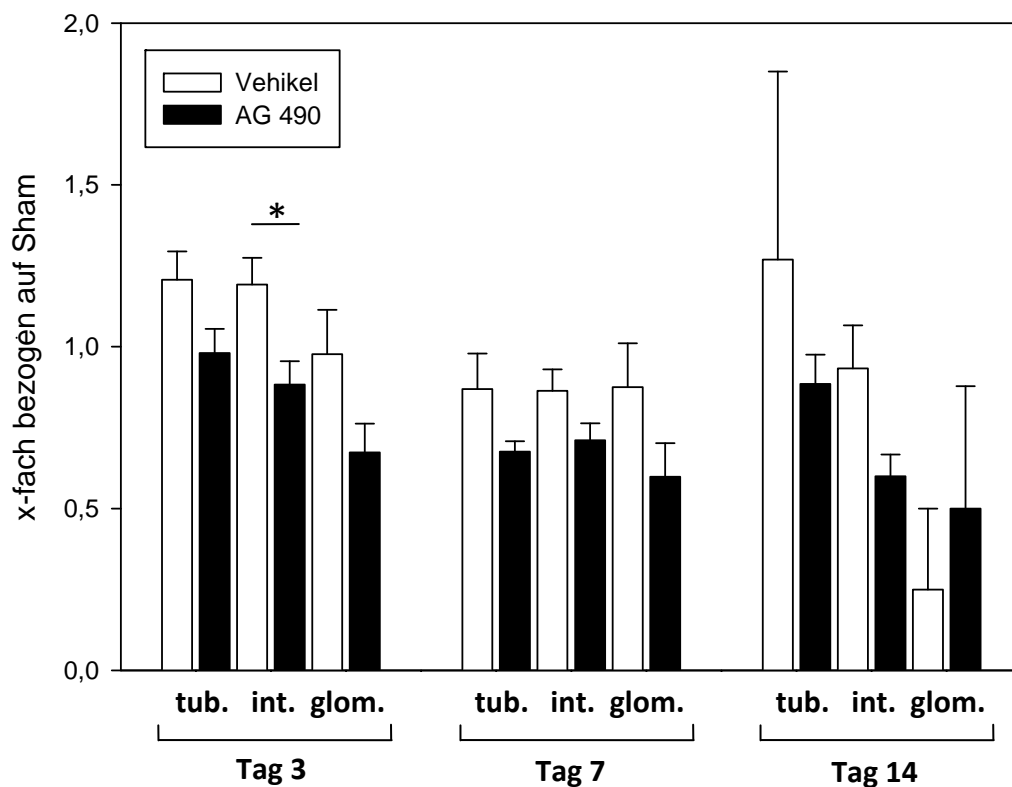


Abbildung 18: Morphometrische Analyse der TUNEL-positiven Zellen (tubulär/interstitiell/glomerulär) in den kontralateralen Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n = 8), \* p < 0,05.

### 3.3.4 Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die renale Proliferation

Die renale Proliferation in neonatalen Mausnieren wurde mittels Ki-67-Färbung gemessen (Abbildung 19). Die Anzahl Ki-67-positiver Zellen ist für tubuläre Zellen in Tabelle 9 und für interstitielle Zellen in Tabelle 10 angegeben. Den Vergleich zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe bezogen auf die scheinoperierten Nieren (Sham) zeigt für die ureterligierte Nieren Abbildung 20 und für die kontralateralen Nieren Abbildung 19 21.

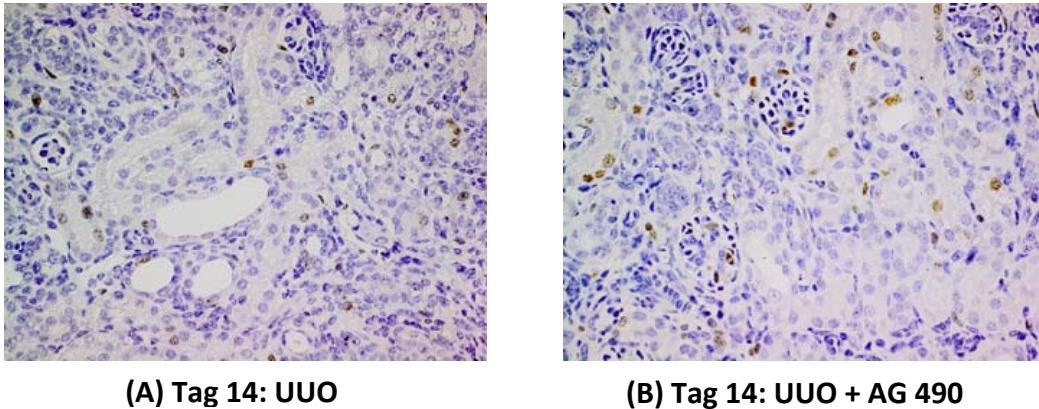


Abbildung 19: Ki-67-Färbung neonataler ureterligierter Nieren am 14. Lebenstag nach Vehikelbehandlung (A) bzw. Tyrphostin AG 490-Behandlung (B)

Die renale Proliferation ist neben dem Zellkompartiment auch vom Lebensalter abhängig. Um diese physiologische Schwankung zu berücksichtigen, wurden alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf die scheinoperierte Kontrolle der entsprechenden Entwicklungsphase und Behandlungsgruppe bezogen.

Die unilaterale Ureterligatur führte in den ureterligierten Nieren zu einer Reduktion der tubulären Proliferation. Die tubuläre Proliferation war am 3. Lebenstag signifikant um 48,0 % reduziert (Vehikelgruppe mit  $530,8 \pm 82,1$  versus scheinoperierte Tiere mit  $1020,9 \pm 12,1$  Ki-67-positiven tubulären Zellen,  $p < 0,001$ ), am 7. Lebenstag um 27,7 % ( $571,8 \pm 65,2$  versus  $883,1 \pm 16,1$ ) und am 14. Lebenstag, erneut signifikant, um 66,1 % ( $216,1 \pm 18,9$  versus  $636,9 \pm 34,9$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. In allen kontralateralen Nieren führte die Ureterobstruktion zu einer signifikanten Reduktion der tubulären Proliferation. Die tubuläre Proliferation nahm am 3. Lebenstag signifikant um 59,7 % ( $410,8 \pm 88,1$  versus  $1020,9 \pm 12,1$ ,  $p < 0,001$ ), am 7. Lebenstag signifikant um 35,4 % ( $519,6 \pm 107,7$  versus  $883,1 \pm 16,1$ ,  $p < 0,05$ ) und am 14. Lebenstag signifikant um 30,0 % ( $448,9 \pm 65,0$  versus  $636,9 \pm 34,9$ ,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle ab.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einem Anstieg der tubulären Proliferation. Tyrphostin AG 490 steigerte die tubuläre Proliferation am 3. Lebenstag auf das 1,3-Fache ( $733,7 \pm 126,5$  versus  $530,8 \pm 82,1$ ) und am 7. Lebenstag auf das 1,04-Fache ( $451,5 \pm 69,2$  versus  $571,8 \pm 65,2$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Am 14. Lebenstag steigerte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Proliferation signifikant auf das 3,4-Fache ( $679,0 \pm 92,1$  versus  $216,1 \pm 19,9$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Tyrphostin AG 490 führte auch in allen kontralateralen Nieren zu einem Anstieg der

tubulären Proliferation. Konkret steigerte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Proliferation am 3. Lebenstag auf das 1,1-Fache ( $486,1 \pm 115,2$  versus Vehikelgruppe mit  $410,8 \pm 88,1$ ) und am 7. Lebenstag auf das 1,01-Fache ( $405,5 \pm 60,2$  versus  $519,6 \pm 107,7$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Am 14. Lebenstag steigerte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Proliferation auch in den kontralateralen Nieren signifikant auf das 3,4-Fache ( $1425,3 \pm 196,1$  versus  $448,9 \pm 65,0$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	$733,7 \pm 126,5$	$530,8 \pm 82,1$	$486,1 \pm 115,2$	$410,8 \pm 88,1$	$1084,9 \pm 19,8$	$1020,9 \pm 12,1$
7. Lebenstag	$451,5 \pm 69,2$	$571,8 \pm 65,2$	$405,5 \pm 60,2$	$519,6 \pm 107,7$	$672,8 \pm 6,3$	$883,1 \pm 16,1$
14. Lebenstag	$679,0 \pm 92,1$	$216,1 \pm 18,9$	$1425,3 \pm 196,1$	$448,9 \pm 65,0$	$592,6 \pm 65$	$636,9 \pm 34,9$

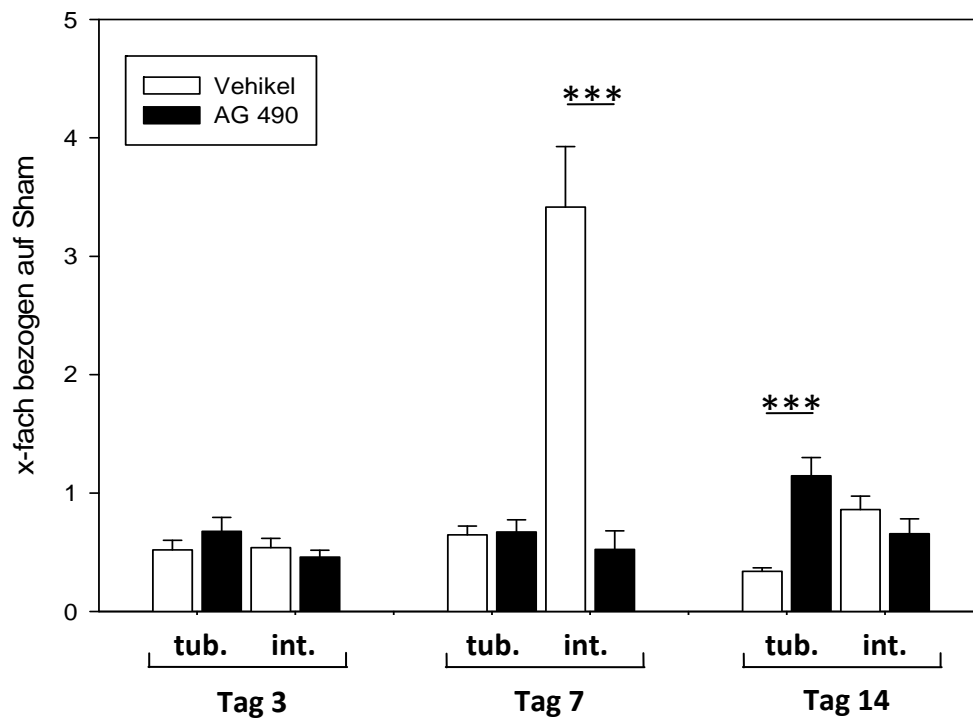
**Tabelle 9: Histopathologische Analyse der tubulären Proliferation (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**

Die unilaterale Ureterligatur führte in den ureterligierten Nieren zu folgenden Veränderungen der interstitiellen Proliferation. Die interstitielle Proliferation nahm am 3. Lebenstag um 46,1 % (Vehikelgruppe mit  $239,7 \pm 34,8$  versus scheinoperierte Tiere mit  $444,5 \pm 10,6$  Ki-67-positiven interstitiellen Zellen,  $p < 0,001$ ) ab, stieg am 7. Lebenstag signifikant auf das 3,4-Fache an ( $158,0 \pm 23,6$  versus  $46,3 \pm 1,5$ ,  $p < 0,001$ ) und nahm am 14. Lebenstag um 13,9 % ( $46,4 \pm 6,1$  versus  $53,9 \pm 2,9$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle ab. Die unilaterale Ureterligatur führte in den kontralateralen Nieren zu folgenden Veränderungen der interstitiellen Proliferation. Die interstitielle Proliferation nahm am 3. Lebenstag um 55,2 % ( $199,3 \pm 35,4$  versus  $444,5 \pm 10,6$ ) ab, stieg am 7. Lebenstag signifikant auf das 3,6-Fache ( $164,8 \pm 31,7$  versus  $46,3 \pm 1,5$ ,  $p < 0,05$ ) und am 14. Lebenstag auf das 1,3-Fache ( $69,0 \pm 13,7$  versus  $53,9 \pm 2,9$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einer Reduktion der interstitiellen Proliferation. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die interstitielle Proliferation am 3. Lebenstag um 14,8 % ( $215,8 \pm 27,0$  versus Vehikelgruppe mit  $239,7 \pm 34,8$ ), am 7. Lebenstag signifikant um 84,6 % ( $52,3 \pm 13,1$  versus  $158,0 \pm 22,6$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag um 23,3 % ( $41,4 \pm 7,9$  versus  $46,4 \pm 6,1$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte auch in allen kontralateralen Nieren zu einer Reduktion der interstitiellen Proliferation. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die interstitielle Proliferation am 3. Lebenstag um 28,9 % ( $150,4 \pm 30,8$  versus  $199,3 \pm 35,4$ ), am 7. Lebenstag signifikant um 89,2 % ( $38,0 \pm 6,5$  versus  $164,8 \pm 31,7$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag um 26,6 % ( $59,5 \pm 9,2$  versus  $69,0 \pm 13,7$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	215,8 ± 27,0	239,7 ± 34,8	150,4 ± 30,8	199,3 ± 35,4	469,9 ± 10,4	444,5 ± 10,6
7. Lebenstag	52,3 ± 13,1	158,0 ± 23,6	38,0 ± 6,5	164,8 ± 31,7	99,3 ± 3,3	46,3 ± 1,5
14. Lebenstag	41,4 ± 7,9	46,4 ± 6,1	59,5 ± 9,2	69,0 ± 13,7	63,0 ± 3,7	53,9 ± 2,9

**Tabelle 10: Histopathologische Analyse der interstitiellen Proliferation (Mittelwert ± Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**



**Abbildung 20: Morphometrische Analyse der Ki-67-positiven Zellen (tubulär/interstitiell) in den ureterligierten Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n = 8), \*\*\* p < 0,001.**

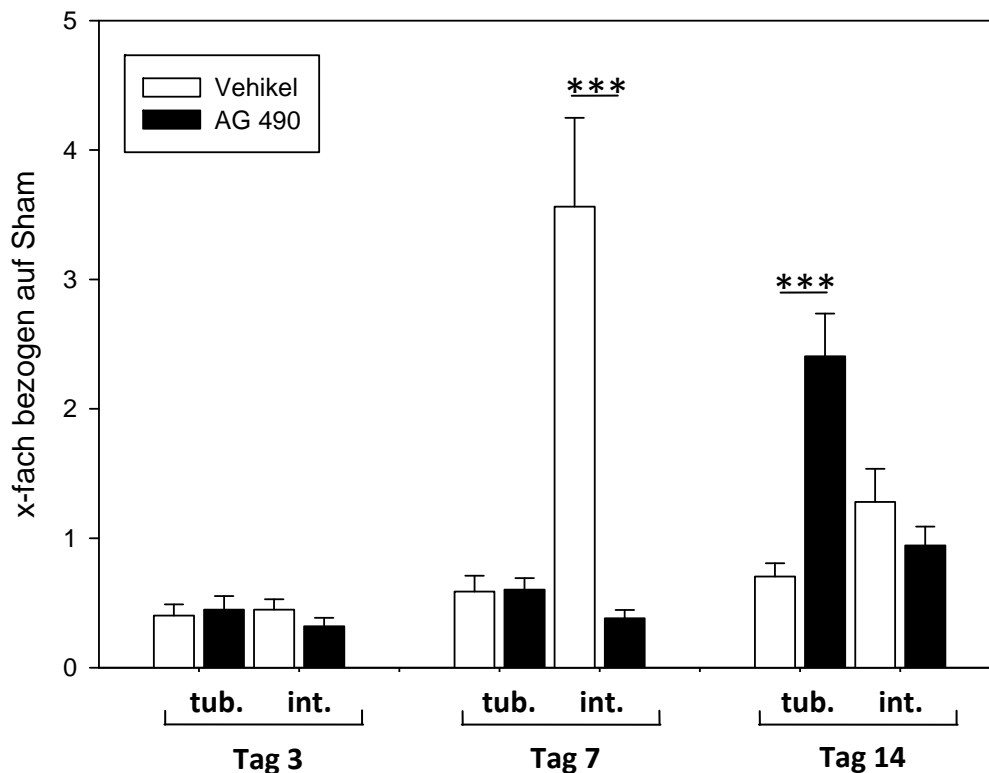
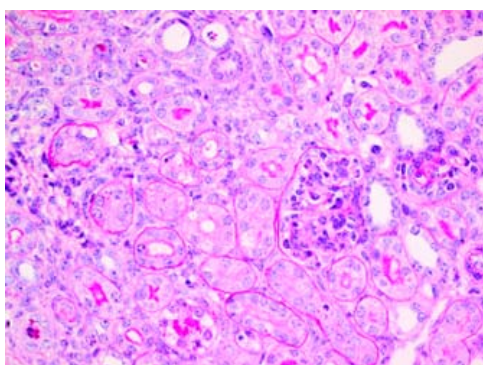


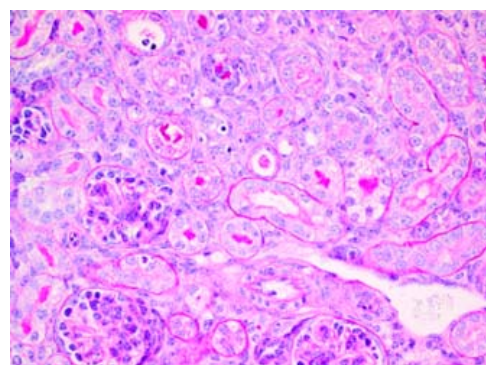
Abbildung 21: Morphometrische Analyse der Ki-67-positiven Zellen (tubulär/interstitiell) in den kontralateralen Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n = 8), \*\*\* p < 0,001.

### 3.3.5 Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die tubuläre Atrophie

Die tubuläre Atrophie in neonatalen Mausnieren wurde mittels PAS-Färbung ermittelt (Abbildung 22). Die Anzahl atrophischer Tubuli ist für proximale Tubuli in Tabelle 11 und für distale Tubuli in Tabelle 12 angegeben. Einen Vergleich zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe in ureterligierten Nieren zeigt Abbildung 23 und in kontralateralen Nieren Abbildung 24. In dieser Analyse konnten die Werte nicht auf die scheinoperierte Kontrolle bezogen werden und werden deshalb als Mittelwerte angegeben.



(A) Tag 14: UUU



(B) Tag 14: UUU + AG 490

Abbildung 22: PAS-Färbung neonataler ureterligierter Nieren am 14. Lebenstag nach Vehikelbehandlung (A) bzw. Tyrphostin AG 490-Behandlung (B).

Die unilaterale Ureterligatur führte in allen ureterligierten Nieren zu einem progredienten Anstieg der tubulären Atrophie proximaler Tubuli. Am 3. Lebenstag betrug die tubuläre Atrophie proximaler Tubuli in der Vehikelgruppe  $0,3 \pm 0,3$  versus der scheinoperierten Kontrolle mit  $0,0 \pm 0,0$ . Am 7. und 14. Lebenstag zeigte sich ein signifikanter Anstieg der tubulären Atrophie proximaler Tubuli ( $17,2 \pm 1,6$  versus  $0,0 \pm 0,0$ ; bzw.  $54,0 \pm 4,8$  versus  $0,1 \pm 0,1$ , 540 %, jeweils  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Die Ureterligatur führte auch in den kontralateralen Nieren zu einem Anstieg der tubulären Atrophie proximaler Tubuli von  $0,0 \pm 0,0$  am 3. und 7. Lebenstag auf das 6-Fache am 14. Lebenstag ( $0,6 \pm 0,3$  versus  $0,1 \pm 0,1$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Dieser Anstieg war jedoch nicht signifikant.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einer Reduktion der tubulären Atrophie proximaler Tubuli. Diese war jedoch nicht signifikant. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Atrophie proximaler Tubuli am 3. Lebenstag um 100,0 % ( $0,0 \pm 0,0$  versus Vehikelgruppe mit  $0,3 \pm 0,3$ ), am 7. Lebenstag um 35,5 % ( $12,3 \pm 2,1$  versus  $17,2 \pm 1,6$ ) und am 14. Lebenstag um 1,2 % ( $53,4 \pm 4,8$  versus  $54,0 \pm 5,2$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. In den kontralateralen Nieren reduzierte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Atrophie proximaler Tubuli am 14. Lebenstag um 83,3 % ( $0,1 \pm 0,1$  versus  $0,6 \pm 0,3$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Auch dieses Ergebnis war nicht signifikant. Am 3. und 7. Lebenstag führte Tyrphostin AG 490 mit jeweils  $0,0 \pm 0,0$  atrophischen proximalen Tubuli zu keinem Unterschied der tubulären Atrophie proximaler Tubuli zwischen Behandlungs- und Vehikelgruppe.

	UO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	$0,0 \pm 0,0$	$0,3 \pm 0,3$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
7. Lebenstag	$12,3 \pm 2,1$	$17,2 \pm 1,6$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
14. Lebenstag	$53,4 \pm 4,8$	$54,0 \pm 5,2$	$0,1 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,3$	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$

**Tabelle 11: tubuläre Atrophie proximaler Tubuli (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), UO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**

Die unilaterale Ureterligatur führte in den ureterligierten Nieren außerdem zu einem Anstieg der tubulären Atrophie distaler Tubuli nach dem 3. Lebenstag. Die tubuläre Atrophie distaler Tubuli stieg signifikant am 7. Lebenstag auf  $9,4 \pm 3$  versus  $0,0 \pm 0$  atrophische distale Tubuli ( $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag auf das 54-Fache ( $5,4 \pm 1$  versus  $0,1 \pm 0$ ,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. Die unilaterale Ureterligatur führte in den kontralateralen Nieren zu einer Reduktion der tubulären Atrophie distaler Tubuli am 14. Lebenstag ( $0,0 \pm 0,0$  versus  $0,1 \pm 0,1$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Diese war jedoch nicht signifikant. Am 3. und 7. Lebenstag zeigte sich mit jeweils  $0,0 \pm 0,0$  atrophischen distalen Tubuli kein Unterschied der tubulären Atrophie distaler Tubuli zwischen Vehikel- und scheinoperierter Kontrollgruppe.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in den ureterligierten Nieren zu folgenden, jedoch nicht signifikanten Veränderungen der tubulären Atrophie distaler Tubuli. Tyrphostin AG 490 bewirkte am 3. Lebenstag mit jeweils  $0,0 \pm 0$  atrophischen distalen Tubuli in Behandlungs- und Vehikelgruppe keine Veränderung der tubulären Atrophie distaler Tubuli. Dann steigerte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Atrophie distaler Tubuli am 7. Lebenstag auf das 1,3-Fache ( $12,3 \pm 6$  versus  $9,4 \pm 3$ ) und reduzierte sie am 14. Lebenstag um 14,0 % ( $4,6 \pm 1$  versus  $5,4 \pm 1$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. In den kontralateralen Nieren reduzierte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Atrophie distaler Tubuli am 14. Lebenstag um 100 % ( $0,0 \pm 0,0$  versus  $0,1 \pm 0,1$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Am 3. und 7. Lebenstag führte die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 mit jeweils  $0,0 \pm 0,0$  atrophischen distalen Tubuli zu keinem Unterschied der tubulären Atrophie distaler Tubuli zwischen Behandlungs- und Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
7. Lebenstag	$12,3 \pm 6,0$	$9,4 \pm 2,8$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$
14. Lebenstag	$4,6 \pm 1,4$	$5,4 \pm 1,4$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$

Tabelle 12: tubuläre Atrophie distaler Tubuli (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle

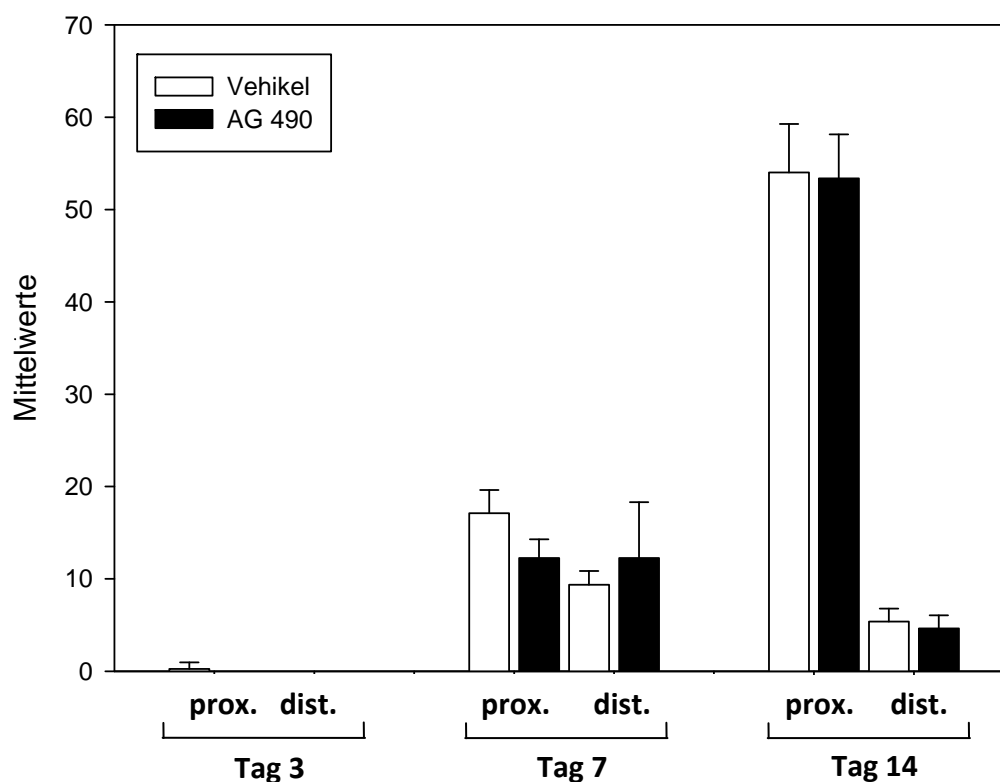


Abbildung 23: Morphometrische Analyse atrophischer proximaler und distaler Tubuli in ureterligierten Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n=8).



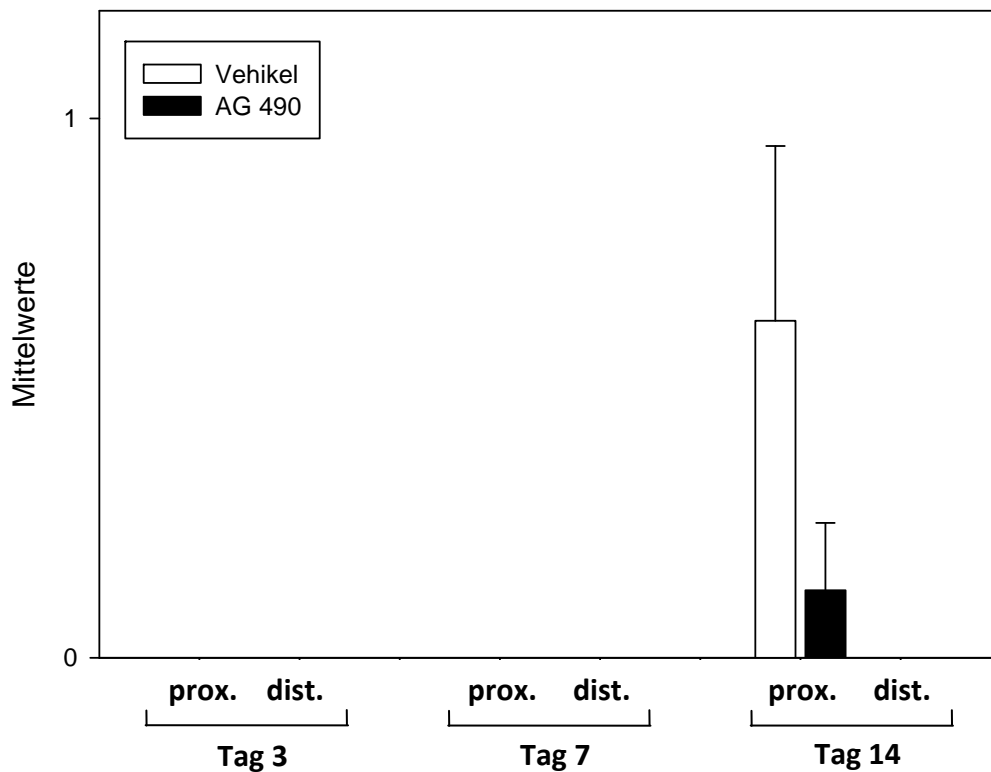
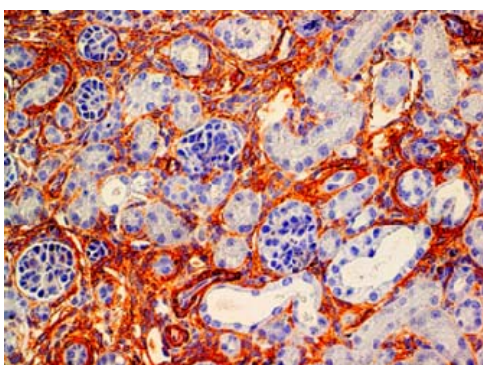


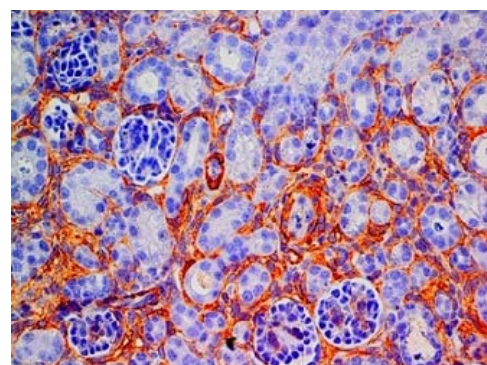
Abbildung 24: Morphometrische Analyse atrophischer proximaler und distaler Tubuli in den kontralateralen Nieren am 3., 7. Und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n = 8).

### 3.3.6 Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die interstitielle Fibrose

Die interstitielle Fibrose wurde in neonatalen Mausnieren mittels  $\alpha$ -SMA-Antikörperfärbung für aktivierte Myofibroblasten und Masson-Trichrome-Färbung für Kollagen ermittelt (Abbildung 25 und Abbildung 27). Die Anzahl  $\alpha$ -SMA-positiven Felder ist in Tabelle 13 angegeben. Den Vergleich zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe zeigt Abbildung 26. Die Anzahl Kollagen-positiver Felder ist in Tabelle 14 angegeben. Den Vergleich zwischen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe bezogen auf die scheinoperierte Nieren (Sham) zeigt Abbildung 28. Ein quantitativer Vergleich beider Färbungen ist wegen der unterschiedlichen Rastergröße nicht möglich.



(A) Tag 14: UUO



(B) Tag 14: UUO + AG 490

Abbildung 25:  $\alpha$ SMA-Färbung neonataler ureterligierter Nieren am 14. Lebenstag nach Vehikelbehandlung (A) bzw. Tyrphostin AG 490-Behandlung (B).

Die unilaterale Ureterligatur führte in allen ureterligierten Nieren zu einem signifikanten und progredienten Anstieg der aktivierten Myofibroblasten. Die aktivierten Myofibroblasten traten besonders peritubulär und an den Grenzen von Mark zu Rinde und Mark zu Nierenbecken auf. Die aktivierten Myofibroblasten stiegen signifikant am 3. Lebenstag auf das 1,2-Fache (Vehikelgruppe mit  $441,9 \pm 21,2$  versus scheinoperierte Tiere mit  $360,6 \pm 4,3$   $\alpha$ -SMA-positiven Feldern,  $p < 0,05$ ), am 7. Lebenstag auf das 2,1-Fache ( $1321,8 \pm 26,5$  versus  $622,4 \pm 13,1$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag auf das 5,3-Fache ( $1657,3 \pm 38,9$  versus  $310,0 \pm 26,3$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. Die Ureterligatur führte interessanterweise auch in allen kontralateralen Nieren zu einem signifikanten und progredienten Anstieg der aktivierten Myofibroblasten. Konkret stiegen die aktivierten Myofibroblasten signifikant am 3. Lebenstag auf das 1,1-Fache ( $386,9 \pm 8,2$  versus  $360,6 \pm 4,3$ ,  $p < 0,05$ ), am 7. Lebenstag auf das 1,5-Fache ( $951,6 \pm 64,4$  versus  $622,4 \pm 13,1$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag auf das 3,4-Fache ( $1052,0 \pm 84,9$  versus  $310,0 \pm 26,3$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einer signifikanten Reduktion der aktivierten Myofibroblasten. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die aktivierten Myofibroblasten signifikant am 3. Lebenstag um 14,6 % ( $390,5 \pm 7,8$  versus Vehikelgruppe mit  $441,9 \pm 21,2$ ,  $p < 0,05$ ), am 7. Lebenstag um 51,9 % ( $682,4 \pm 68,1$  versus  $1321,8 \pm 26,5$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag um 46,0 % ( $1272,4 \pm 75,6$  versus  $1657,3 \pm 38,9$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte auch in allen kontralateralen Nieren zu einer signifikanten Reduktion der aktivierten Myofibroblasten. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die aktivierten Myofibroblasten signifikant am 3. Lebenstag um 10,5 % ( $356,8 \pm 9$  versus  $387,9 \pm 8$ ,  $p < 0,05$ ), am 7. Lebenstag um 44,4 % ( $565,3 \pm 33$  versus  $951,6 \pm 64$ ,  $p < 0,05$ ) und am 14. Lebenstag um 49,9 % ( $747,3 \pm 75$  versus  $1052,0 \pm 85$ ,  $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	$390,5 \pm 7,8$	$441,9 \pm 21,2$	$356,8 \pm 9,5$	$386,9 \pm 8,2$	$371,5 \pm 6,5$	$360,6 \pm 4,3$
7. Lebenstag	$682,4 \pm 68,1$	$1321,8 \pm 26,5$	$565,3 \pm 33,0$	$951,6 \pm 64,4$	$666,3 \pm 12,3$	$622,4 \pm 13,1$
14. Lebenstag	$1272,4 \pm 75,6$	$1657,3 \pm 38,9$	$747,3 \pm 75,3$	$1052,0 \pm 84,9$	$440,0 \pm 35,7$	$310,0 \pm 26,3$

**Tabelle 13:** interstitielle Fibrose:  $\alpha$ -SMA-positive Felder nach  $\alpha$ -SMA-Färbung (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle

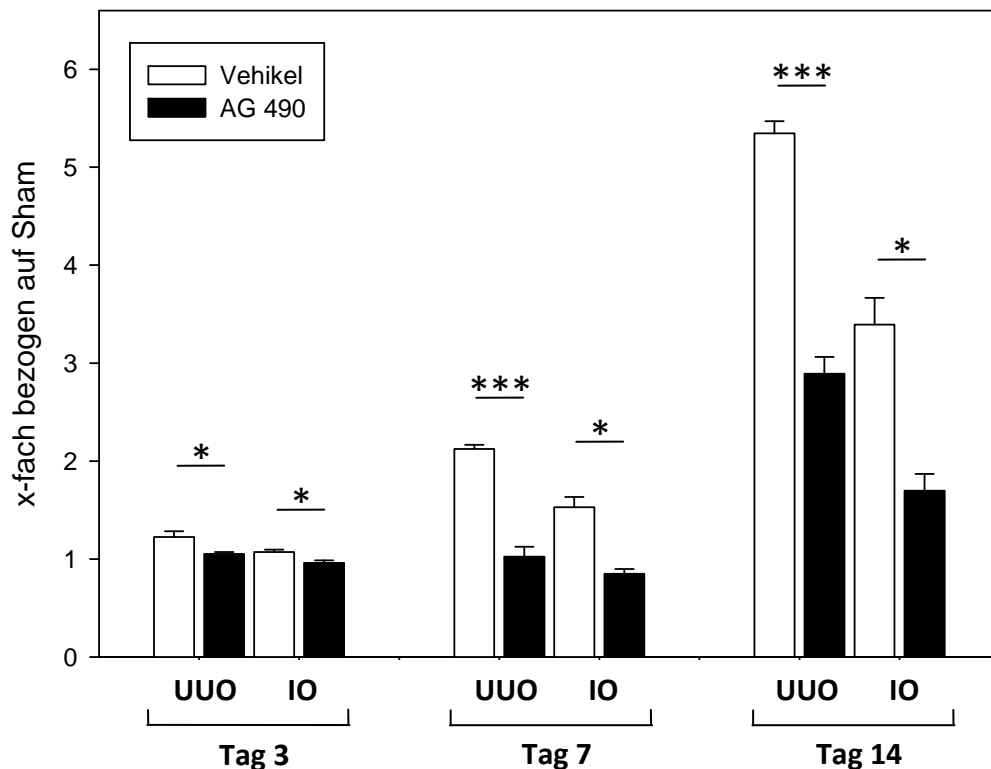


Abbildung 26: Morphometrische Analyse der  $\alpha$ SMA-positiven Felder in den ureterligierten (UUO) und den kontralateralen (IO) Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe n = 8), \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001.

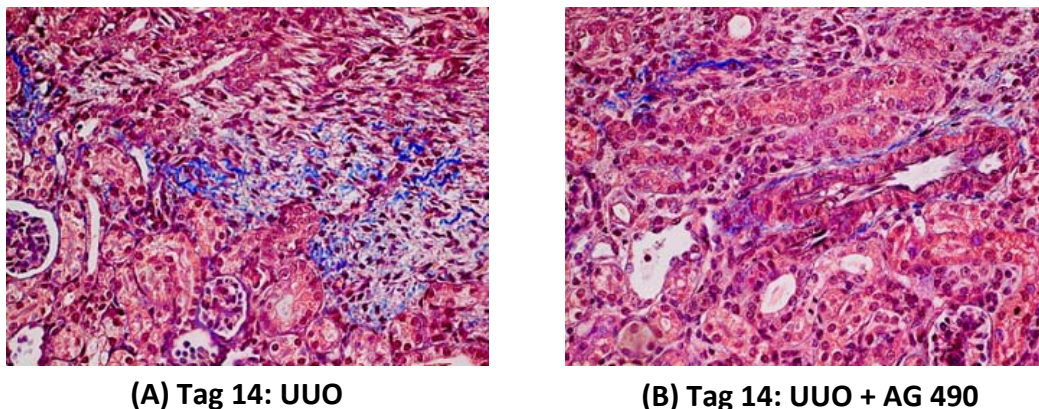


Abbildung 27: Masson-Trichrome-Färbung neonataler ureterligierter Nieren am 14. Lebenstag nach Vehikelbehandlung (A), bzw. Tyrphostin AG 490-Behandlung (B).

Die unilaterale Ureterligatur führte in allen ureterligierten Nieren zu einem signifikanten und progredienten Anstieg der Kollagenablagerung. Konkret stieg die Kollagenablagerung signifikant am 3. Lebenstag auf das 3,4-Fache (Vehikelgruppe mit  $37,8 \pm 3,3$  versus scheinoperierte Tiere mit  $11,3 \pm 1,5$  Kollagen-positiven Feldern, p < 0,001), am 7. Lebenstag auf das 21,0-Fache ( $136,9 \pm 23,2$  versus  $6,5 \pm 2,5$ , p < 0,001) und am 14. Lebenstag auf das 160,4-Fache ( $280,6 \pm 41,9$  versus  $1,8 \pm 0,03$ , p < 0,001) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. In den kontralateralen Nieren führte die Ureterligatur zu

folgenden Veränderungen der Kollagenablagerung. Am 3. Lebenstag zeigte sich eine Reduktion der Kollagenablagerung um 19,5 % ( $9,1 \pm 0,5$  versus  $11,3 \pm 1,5$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Danach stieg die Kollagenablagerung signifikant am 7. Lebenstag auf das 2,2-Fache ( $14,0 \pm 5,5$  versus  $6,5 \pm 2,5$ ,  $p < 0,001$ ) und am 14. Lebenstag auf das 20,0-Fache ( $36,0 \pm 4,8$  versus  $1,8 \pm 0,3$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte in allen ureterligierten Nieren zu einer Reduktion der Kollagenablagerung. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die Kollagenablagerung am 3. Lebenstag um 26,2 % ( $25,4 \pm 3,8$  versus Vehikelgruppe mit  $37,8 \pm 3,3$ ), am 7. Lebenstag um 33,9 % ( $87,0 \pm 13,7$  versus  $136,9 \pm 23,2$ ) und am 14. Lebenstag signifikant um 72,3 % ( $88,9 \pm 8,9$  versus  $280,6 \pm 41,9$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe. Die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 führte auch in allen kontralateralen Nieren zu einer Reduktion der Kollagenablagerung. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die Kollagenablagerung am 3. Lebenstag um 1,1 % ( $9,3 \pm 1,3$  versus  $9,1 \pm 0,5$ ), am 7. Lebenstag um 1,3 % ( $14,6 \pm 6,8$  versus  $14,0 \pm 5,5$ ) und am 14. Lebenstag signifikant um 68,3 % ( $12,6 \pm 2,6$  versus  $36,0 \pm 4,8$ ,  $p < 0,001$ ) im Vergleich zur Vehikelgruppe.

	UUO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Lebenstag	$25,4 \pm 3,8$	$37,8 \pm 3,3$	$9,3 \pm 1,3$	$9,1 \pm 0,5$	$10,3 \pm 1,5$	$11,3 \pm 1,5$
7. Lebenstag	$87,0 \pm 13,7$	$136,9 \pm 23,2$	$14,6 \pm 6,8$	$14,0 \pm 5,5$	$6,3 \pm 1,9$	$6,5 \pm 2,5$
14. Lebenstag	$88,9 \pm 8,9$	$280,6 \pm 41,9$	$12,6 \pm 2,6$	$36,0 \pm 4,8$	$2,0 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,3$

**Tabelle 14: interstitielle Fibrose: Kollagen-pos. Felder nach Masson-Trichrome Färbung (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler), UUO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle**

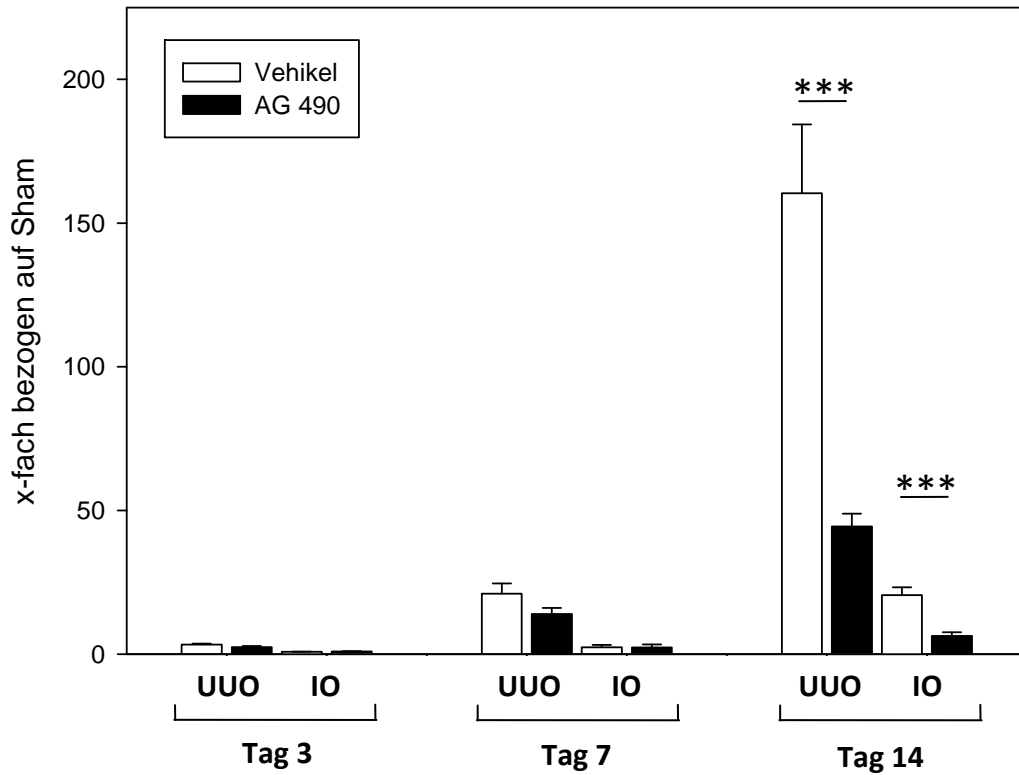


Abbildung 28: Morphometrische Analyse der Masson-Trichrome-positiven Felder in den ureterligierten (UUO) und den kontralateralen (IO) Nieren am 3., 7. und 14. Lebenstag nach unilateraler Ureterligatur am 2. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG 490-behandelten neonatalen Mäusen (pro Gruppe  $n = 8$ ), \*\*\*  $p < 0.001$ .

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung einer STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 sowohl die Leukozyteninfiltration als auch die tubulointerstitielle Schädigung nach unilateraler Ureterligatur in neonatalen Mäusen erfolgreich reduziert. Im Folgenden werden die Ergebnisse vor dem Hintergrund bereits publizierter Daten erläutert und diskutiert.

### 4.1 Reduktion der Leukozyteninfiltration durch Tyrphostin AG 490

Nach unilateraler Ureterligatur (UUO) in neonatalen Mäusen am 2. Lebenstag kommt es zu einer ausgeprägten Infiltration der obstruierten Niere mit Makrophagen. Diese Entzündungszellen sind bereits einen Tag nach OP nachweisbar und ihre Anzahl nimmt bis zum 14. Lebenstag progredient zu. So war in der vorliegenden Arbeit bereits 24 h nach Ureterligatur eine 1,4-fach höhere Anzahl infiltrierender Makrophagen in der neonatalen Niere nachweisbar, die bis zum 14. Lebenstag auf das mehr als 5-Fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle anstieg. Im Vergleich dazu kommen Makrophagen in der neonatalen Niere physiologischerweise nur vereinzelt vor [72]. Dieses Ergebnis der progredienten Makrophageninfiltration nach UUO bestätigt bisherige Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen [27, 73]. Auch in adulten Mausnieren ist nach Ureterligatur eine signifikante Zunahme der Makrophageninfiltration nachweisbar [35, 74, 75]. Makrophagen konnten außerdem erneut als der dominierende Zelltyp des UUO-induzierten Leukozyteninfiltrats nachgewiesen werden. Funktionell wirken Makrophagen nach Ureterligatur pro-inflammatorisch durch die Sekretion von Zytokinen TNF- $\alpha$ , IL-6, CCL2 (CC-Chemokin Ligand 2), CXCL9 (CXC-Chemokine Ligand 9) und zytotoxischen Substanzen [72, 76]. Sie phagozytieren apoptotische Zellreste und induzieren tubuläre Apoptose [27]. Makrophagen fördern die Proliferation von interstitiellen Fibroblasten sowie die Produktion extrazellulärer Matrix und wirken damit auch pro-fibrotisch [27]. So korreliert das Ausmaß der interstitiellen Makrophageninfiltration nach neonataler Ureterligatur mit dem Schweregrad der interstitiellen Fibrose [77, 78]. Dementsprechend konnte eine systemische Makrophagendepletion, bzw. die Blockade von Adhäsionsmolekülen oder Chemokinrezeptoren, sowohl die interstitielle Makrophageninfiltration als auch die interstitielle Fibrose nach Ureterligatur erfolgreich reduzieren [79-82].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 in den ureterligierten Nieren neonataler Mäuse zu einer transienten Reduktion der Makrophageninfiltration führt. Dieser Effekt konnte 24 h nach Ureterligatur mit einer Reduktion der Makrophagenanzahl um 30,9 % erreicht werden. Im weiteren Verlauf blieb die Makrophageninfiltration unter STAT3-Blockade zwar reduziert, war aber im Vergleich zur Vehikelgruppe nicht mehr signifikant vermindert. Wie lässt sich die

Leukozytenreduktion durch die STAT3-Blockade erklären? Der Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert unter anderem verschiedene Mediatoren der Zelladhäsion wie Twist-1 und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) [36]. Diese Adhäsionsmoleküle vermitteln die Infiltration von Makrophagen und T-Lymphozyten. Nach Ureterligatur ist eine vermehrte Expression von ICAM-1 in der obstruierten Niere nachweisbar. Pang et al. konnten in adulten Mäusen zeigen, dass die STAT3-Blockade die ICAM-1-Expression reduziert [35]. Darüber hinaus reduziert die Blockade von ICAM-1 durch Antisense-Oligonukleotide in ureterligierten Nieren die Makrophageninfiltration [80]. Entsprechend bewirkte auch die Blockade von Selektinen und verschiedenen anderen Adhäsionsmolekülen eine Reduktion der renalen Makrophagenanzahl nach Ureterligatur. Dies ist auch in neonatalen Mäusen für einen Antagonisten des Chemokinreceptor-1 gezeigt worden [27]. Zudem zeigen neonatale Selektin-Knockout Mäuse ebenso wie neonatale ICAM-1- und RAGE-Knockout-Mäuse (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) eine Reduktion der Makrophageninfiltration nach Ureterligatur. Auch in adulten Osteopontin-Knockout-Mäusen mit UO konnte eine Makrophagenreduktion gezeigt werden [81, 82]. Daher basiert die kurzzeitige Reduktion der Makrophageninfiltration im neonatalen Mausmodell durch Tyrphostin AG 490 wahrscheinlich auf einer reduzierten Expression von Adhäsionsmolekülen. Auch in anderen renalen Krankheitsmodellen konnte die STAT3-Blockade eine Reduktion der Makrophageninfiltration bewirken. Für Tyrphostin AG 490 konnte diese Reduktion im Tiermodell der Adriamycin-induzierten Nephropathie, der renalen Ischämie-Reperfusion und der Lupusnephritis gezeigt werden. Dabei reduzierte Tyrphostin AG 490 auch die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 oder CCL2 [70, 83, 84]. Vergleichbar dazu zeigen Knockdown-Mäuse mit einer maximal 25-prozentigen STAT3-Aktivität im Rahmen des Streptozotocin-induzierten Diabetes eine signifikant reduzierte Makrophageninfiltration im Vergleich zu Wildtypmäusen [85]. Der STAT3-Knockdown reduziert auch die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und CCL2. Entsprechend reduzierte auch die STAT3-Blockade durch ein SOCS1-ähnliches Peptid im Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes die Infiltration von Makrophagen sowie die Expression pro-inflammatorischer Zytokine [86]. Damit scheint die STAT3-abhängige Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und die konsekutive Makrophageninfiltration eine Gemeinsamkeit vieler renaler Erkrankungen zu sein.

Zusätzlich sind möglicherweise auch Faktoren der Angiogenese an der Makrophageninfiltration beteiligt. Zwei entsprechende Effektoren der STAT3-Signalkaskade sind HIF1 $\alpha$  (Hypoxie induzierter Faktor) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Der Knockdown von HIF1 $\alpha$  in renalen Tubuluszellen reduzierte die Makrophageninfiltration in adulte Rattennieren signifikant um 60 % 8 Tage nach Ureterligatur, während die Gabe von VEGF in neonatalen Ratten die Makrophageninfiltration am 7. Lebenstag auf das 1,5-Fache steigerte [87, 88]. Diese pro-inflammatorische Wirkung von VEGF wird überwiegend auf eine gestörte Mikroarchitektur der neugebildeten Gefäße zurückgeführt [89]. Damit könnte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die Makrophageninfiltration auch über eine verminderte Expression der angiogenesefördernden Faktoren HIF1 $\alpha$  und VEGF reduzieren.

Ein anderer STAT3-Inhibitor, Mefunidone, reduzierte die Makrophagen- und Monozyteninfiltration in adulten Ratten 3, 7 und 14 Tage nach Ureterligatur um bis zu 60 % [75]. Ein direkter Vergleich mit unseren Ergebnissen ist aufgrund von Unterschieden bezüglich der Nachweismethode und des Lebensalters der Versuchstiere nicht möglich. Jedoch zeigt diese deutliche Reduktion die enorme Bedeutung von STAT3 für die Infiltration von Makrophagen.

Methodisch ist anzumerken, dass der Oberflächenmarker F4/80 für den Nachweis von Makrophagen zwar etabliert ist, andererseits aber auch nur bedingt selektiv und unzureichend sensitiv ist. F4/80 wird von verschiedenen Makrophagen-Subpopulationen, die im renalen Interstitium nebeneinander vorkommen, unterschiedlich stark exprimiert [76, 79, 90]. Dies könnte die ermittelte Anzahl renaler Makrophagen verzerren und signifikante Unterschiede verschleiern. Um eine ausreichende Sensitivität und Selektivität zu erreichen, erscheint deshalb die Verwendung zusätzlicher Makrophagen-Marker als sinnvoll [90]. Ein vielversprechender Marker könnte Galectin-3 sein. Galectin-3 wird nach UUU von Makrophagen vermehrt sezerniert; es aktiviert Myofibroblasten und induziert renale Fibrose [91]. Deshalb könnte eine Galectin-3-Färbung besonders pathophysiologisch relevante Makrophagen-Subpopulationen erfassen.

Neben Makrophagen infiltrieren nach einer unilateralen Ureterligatur auch T-Lymphozyten die neonatale Mausniere. Die Anzahl der T-Lymphozyten stieg in der vorliegenden Arbeit am 7. Lebenstag auf das ca. 4-Fache und am 14. Lebenstag auf das ca. 50-Fache an. Interessanterweise führte die Ureterligatur ab dem 7. Lebenstag auch in den kontralateralen Nieren zu einer signifikanten Zunahme der T-Lymphozyteninfiltration. Konkret nahm die T-Zellinfiltration in diesen Nieren am 7. Lebenstag auf das ca. 2-Fache und am 14. Lebenstag auf das 1,6-Fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle zu. Dies bestätigt die bisherigen Daten unserer Arbeitsgruppe zu neonatalen Mäusen sowie die Daten zu adulten Mäusen mit Ureterligatur [27, 75]. Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 in den ureterligierten Nieren neonataler Mäuse zu einer signifikanten T-Zellreduktion führt. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die Anzahl infiltrierender T-Lymphozyten zu allen Untersuchungszeitpunkten um bis zu 55 %. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Liu et al., die in adulten Ratten zeigen konnten, dass der STAT3-Inhibitor Mefunidone die renale T-Lymphozyteninfiltration 3, 7 und 14 Tage nach Ureterligatur in adulten Tieren ebenfalls um ca. 50 % reduziert [75]. Wie lässt sich dieser Effekt der STAT3-Blockade erklären? Die Rekrutierung von T-Lymphozyten aus dem Blutgefäßsystem verläuft vergleichbar zur Rekrutierung von Makrophagen und folgt einer Kaskade von hochregulierten Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Die erfolgreiche Reduktion der T-Lymphozyteninfiltration durch Tyrphostin AG 490 basiert damit wahrscheinlich auch auf einer reduzierten Expression verschiedener Chemokine und Adhäsionsmoleküle. So konnte in Krankheitsmodellen wie der Adriamycin-induzierten Nephropathie und der Lupusnephritis eine aufgrund der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 reduzierte T-Lymphozyteninfiltration gezeigt werden, die im zweiten Fall auch von einer reduzierten Expression des Adhäsionsmoleküls CCL-2 begleitet war [84]. Ebenfalls reduzierte die STAT3-Blockade im Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes



die Infiltration von T-Lymphozyten [86]. Ebenso wurde der Effekt einer STAT3-Blockade im Modell der Cyclosporin-induzierten Nephropathie und der Ischämie-Reperfusion untersucht. Dabei reduzierte Tyrphostin AG 490 die Infiltration von T-Zellen und Makrophagen signifikant [92].

Um die Bedeutung der T-Lymphozyteninfiltration für die Pathophysiologie der obstruktiven Uropathie zu klären, wurden bereits vor vielen Jahren Ureterligaturen in adulten SCID-Mäusen (Severe Combined Immunodeficiency) durchgeführt [93]. Diese genetisch veränderten Mäuse weisen eine schwere Bildungs- und Reifungsstörung der B- und T-Lymphozyten auf. Da in der peripheren Blutbahn keine reifen Lymphozyten vorhanden sind, fehlt den SCID-Mäusen auch die Lymphozytenfunktion. Nach Ureterligatur war im Nierenparenchym der SCID-Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen keine T-Lymphozyteninfiltration nachweisbar. Jedoch waren die tubulointerstitielle Entzündung, die tubuläre Apoptose und die interstitielle Fibrose nahezu identisch ausgeprägt [93]. Damit konnte nachgewiesen werden, dass T-Lymphozyten keinen wesentlichen Einfluss auf die Pathophysiologie der unilateralen Ureterligatur haben. Die Makrophageninfiltration war dagegen in SCID-Mäusen vergleichbar zu den Wildtypmäusen ausgeprägt [93]. Dies weist einerseits auf eine unabhängige renale Infiltration dieser beiden Leukozytenpopulationen und andererseits auf die zentrale Bedeutung der Makrophagen nach Ureterligatur hin.

Neben Makrophagen und T-Lymphozyten wandern nach neonataler Ureterligatur in geringem Umfang auch neutrophile Granulozyten in die Niere ein. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Zelltyp nicht untersucht. Untersuchungen an adulten Mäusen zeigen jedoch, dass die STAT3-Blockade durch S3I-201 auch neutrophile Granulozyten reduziert [35].

Zusammenfassend reduzierte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie die renale Infiltration von Makrophagen und T-Lymphozyten. Beides entspricht den Ergebnissen, die mit weiteren STAT3-Inhibitoren im adulten UUU-Modell erzielt wurden. Da besonders Makrophagen die tubulointerstitielle Inflammation nach UUU vermitteln und im Sinne eines Circulus vitiosus aufrechterhalten, ist ihre Reduktion durch Tyrphostin AG 490 von großer Relevanz.

## **4.2 Reduktion der renalen Apoptose durch Tyrphostin AG 490**

Als Folge der Ureterligatur kommt es in den neonatalen Mausnieren zu einer deutlichen Zunahme der tubulären Apoptose und einer Abnahme der tubulärer Proliferation [27, 94]. Damit stört die Ureterligatur in neonatalen Nieren nicht nur das physiologische Verhältnis zwischen Apoptose und Proliferation, sondern beschränkt auch das Entwicklungspotenzial der sich noch entwickelnden Niere.

Entsprechend führte die Ureterligatur am 2. Lebenstag auch in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Zunahme der tubulären Apoptose in der neonatalen Mausniere. Konkret stieg die Anzahl apoptotischer Tubuluszellen in den ureterligierten Nieren am

3. Lebenstag auf das 1,3-Fache und bis zum 14. Lebenstag weiter auf das über 40-Fache an. Dieser progrediente Anstieg setzte sich nach neonataler Ureterligatur bis zum ca. 21. Lebenstag fort [73]. Die tubuläre Apoptose war dabei stärker ausgeprägt als in adulten Nieren [27, 95, 96]. Die segmentspezifischen Auslöser der tubulären Apoptose nach Ureterligatur sind die tubuläre Dilatation, die Hypoxie, der oxidative Stress und die Freisetzung von Zytokinen [27, 97]. Entsprechend tritt die tubuläre Apoptose nach UO initial in den dilatierten Sammelrohren und im Verlauf in allen Tubulusabschnitten auf [96]. Sie ist im distalen Tubulus immer ausgeprägter als im proximalen. Pro-apoptotische Zytokine wie Angiotensin II, p53, TNF $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 und Signaltransduktoren wie c-Jun werden nach Ureterligatur hochreguliert oder vermehrt aktiviert [96]. Insgesamt führt die ausgeprägte tubuläre Apoptose nach Ureterligatur zu tubulärer Atrophie und einem Nephronverlust [21].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die tubuläre Apoptose in neonatalen Nieren signifikant reduziert. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Apoptose am 3. Lebenstag um ca. 30 %, am 7. Lebenstag um ca. 65 % und am 14. Lebenstag um über 50 % im Vergleich zur Vehikelgruppe. Wie lässt sich diese anti-apoptotische Wirkung der STAT3-Blockade erklären? Der Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert unter anderem die pro-apoptotischen Faktoren TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , c-Jun und Fas, sowie die überlebensfördernden Proteine Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2) und Survivin [32, 33, 45]. TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  erhöhen wiederum selbst die STAT3-Aktivität, was ihre pro-apoptotische Wirkung verstärkt [33, 36]. Nach Ureterligatur werden TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 und c-Jun vermehrt exprimiert und aktiviert und können so die Apoptose renaler Zellen induzieren [96]. Ein weiterer Mechanismus, der die Apoptose tubulärer Zellen beeinflusst, ist die Autophagie [98]. Die Autophagie beschreibt den lysosomalen Abbau geschädigten Zellmaterials, der dem Zellüberleben dient [99, 100]. Nach Ureterligatur tritt die Autophagie in proximalen Tubuluszellen neben apoptotischen Zellen auf [99]. Eine Hemmung der Autophagie resultiert in einer vermehrten Apoptose tubulärer Zellen und einer gesteigerten interstitiellen Fibrose [100, 101]. STAT3 moduliert und inhibiert nach aktuellem Wissen den Prozess der Autophagie [102]. Möglicherweise führt die STAT3-Blockade deshalb auch durch eine gesteigerte Autophagie zu ihrem anti-apoptotischen Effekt.

Zusammengefasst beruht die anti-apoptotische Wirkung der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie deshalb wahrscheinlich auf zwei Säulen. Zum einen könnte Tyrphostin AG 490 den Einfluss der pro-apoptotischen Faktoren reduzieren und andererseits überlebensfördernde Faktoren wie z.B. die Autophagie unterstützen. In Übereinstimmung mit unseren Daten reduzierte die STAT3-Blockade bereits in anderen Krankheitsmodellen wie der renalen Ischämie-Reperfusion oder der Cyclosporin-induzierten Nephropathie die tubuläre Apoptose. In diesen Modellen führte z.B. oxidativer Stress über die JAK2/STAT3-Signalkaskade zu einer reduzierten Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl2 [70, 92]. Die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 milderte die verminderte Expression dieser anti-apoptotischen Proteine ab und hemmte außerdem die Aktivierung der apoptoseassoziierten Caspasen [92, 103]. Zusätzlich

reduzierte Tyrphostin AG 490 in humanen proximalen Tubuluszellen die durch ATP-Depletion induzierte Apoptose [57]. Die duale anti-apoptotische Wirkung von Tyrphostin AG 490, die einerseits durch die Hemmung pro-apoptotischer Proteine und andererseits durch die Unterstützung überlebensfördernder Faktoren hervorgerufen wird, ist deshalb auch im Tiermodell der obstruktiven Uropathie der wahrscheinliche Wirkmechanismus.

Im Gegensatz zu der erfolgreichen Reduktion der tubulären Apoptose durch Tyrphostin AG 490 in neonatalen Nieren führte die STAT3-Blockade durch S3I-201 in adulten Mäusen mit Ureterligatur zu keiner Apoptose-Reduktion [35]. Interessanterweise sind bezüglich der tubulären Apoptose einige Unterschiede zwischen neonatalen und adulten Nieren bekannt. In neonatalen Nieren tritt die tubuläre Apoptose später, dann aber deutlich ausgeprägter auf [94]. Die Ursache dafür ist bislang unklar. Möglicherweise sind die neonatalen Tubuluszellen aufgrund ihrer metabolischen Unreife initial weniger empfindlich gegenüber der UUO-induzierten Hypoxie [104]. Im Verlauf leiden sie durch ihren steigenden Energiebedarf möglicherweise jedoch vermehrt unter der anhaltenden Hypoxie. Unter Berücksichtigung dieser Unterschiede könnte es mehrere Erklärungsansätze für die fehlende Wirksamkeit der STAT3-Blockade in adulten Nieren geben. Zum einen könnte in adulten Nieren eine STAT3-unabhängige Induktion der Apoptose beteiligt sein, die folglich nicht durch eine STAT3-Blockade beeinflussbar wäre. Zum anderen könnte auch der unterschiedliche Mechanismus der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490, bzw. S3I-201, relevant sein, denn S3I-201 ist ein direkter STAT3-Inhibitor, der die Aktivierung von STAT3 und seine DNA-Bindung hemmt. Dagegen hemmt Tyrphostin AG 490 als Tyrosinkinaseinhibitor die JAK2-abhängige Aktivierung von STAT3. Der direkte Vergleich von Tyrphostin AG 490 und S3I-201 in vitro in humanen Prostatakrebszellen zeigte, dass beide Substanzen sowohl STAT3, aktiviertes pSTAT3 und die Apoptoserate signifikant reduzieren, eine parallele Gabe aber zu keiner Wirkungsverstärkung führt [105]. Durch ihren unterschiedlichen Angriffspunkt könnte sich die Wirkung von Tyrphostin AG 490 und S3I-201 jedoch bezüglich der Apoptose möglicherweise unterscheiden.

Interessanterweise ist die tubuläre Apoptose neben dem Beginn und der Dauer auch von der Schwere der Obstruktion (komplette Ureterligatur versus partielle) abhängig. So konnte gezeigt werden, dass eine partielle Ligatur des Harnleiters in neonatalen Mäusen im Vergleich zur kompletten Ureterligatur weniger tubuläre Apoptose verursacht [73]. Zusätzlich variiert die Apoptose segmentspezifisch und ist in den distalen Tubuli aufgrund der ausgeprägten Dilatation am stärksten ausgeprägt [97]. Auf Zellebene ist eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber Apoptose auch Zellzyklus abhängig [106]. Zusammenfassend führte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Reduktion der UUO-induzierten tubulären Apoptose.

Auch die Apoptose interstitieller Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Nach Ureterligatur nahm die interstitielle Apoptose in den neonatalen Mausnieren progressiv und signifikant zu. Konkret stieg die interstitielle Apoptose am 7. Lebenstag auf das knapp 3-Fache und bis zum 14. Lebenstag auf das über 25-Fache an. Bisherige Daten

zeigen einen weiteren Anstieg bis zum 21. Lebenstag [73]. Dabei ist auch die Apoptose interstitieller Zellen vom Schweregrad der Obstruktion abhängig [73]. In adulten Nieren steigt die interstitielle Apoptose nach Ureterligatur kontinuierlich an [96, 107]. Konkret zeigten Pang et al. einen signifikanten Anstieg der interstitiellen Apoptose auf das über 5-Fache 7 Tage nach Ureterligatur [35]. Welcher interstitielle Zelltyp dabei genau betroffen ist, wurde von Pang et al. und auch in der vorliegenden Arbeit nicht differenziert. Der zelluläre Anteil des renalen Interstitiums besteht aus Fibroblasten, Myofibroblasten, den Perizyten renaler Blutgefäße und infiltrierenden Leukozyten. Nach Ureterligatur steigt direkt die Anzahl der einwandernden Makrophagen und T-Lymphozyten an. Darüber hinaus nimmt im Langzeitverlauf die Anzahl der Fibroblasten und Myofibroblasten im Interstitium besonders deutlich zu [21].

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die interstitielle Apoptose in den neonatalen Nieren nach Ureterligatur signifikant reduziert. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die interstitielle Apoptose am 3. Lebenstag um knapp 30 %, am 7. Lebenstag um über 60 % und am 14. Lebenstag um über 40 % im Vergleich zur Vehikelgruppe. Auch in den kontralateralen Nieren reduzierte Tyrphostin AG 490 die interstitielle Apoptose, konkret um mehr als 25 % am 3. Lebenstag. Die anti-apoptotische Wirkung der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 könnte hier, entsprechend der Apoptose tubulärer Zellen, auf die Hemmung pro-apoptotischer Faktoren (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 und c-Jun) und die Förderung anti-apoptotischer Faktoren (Bcl-2, Autophagie) zurückzuführen sein. Auch ein sekundär nephroprotektiver Effekt der STAT3-Blockade durch weniger Apoptose der reduzierten renalen T-Zellen ist denkbar.

Im Gegensatz zu unseren neonatalen Daten führte die STAT3-Blockade durch S3I-201 in adulten Nieren zu einer Zunahme der interstitiellen Apoptose auf das ca. 1,7-Fache 7 Tage nach Ureterligatur [35]. Dieser Unterschied lässt sich möglicherweise folgendermaßen erklären. Zum einen gehen nach Ureterligatur in neonatalen, bzw. adulten Nieren möglicherweise unterschiedliche interstitielle Zellpopulationen in Apoptose über. Dies ist bislang jedoch noch nicht untersucht worden. Zum anderen könnte auch der unterschiedliche Angriffspunkt der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 49 bzw. S3I-201 eine mögliche Ursache der unterschiedlichen Effekte sein. Zusammenfassend führte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 nach Ureterligatur neonataler Mäuse zu einer signifikanten Reduktion der UO-induzierten interstitiellen Apoptose.

Die vorliegende Arbeit untersuchte zusätzlich die Apoptose glomerulärer Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass die glomeruläre Apoptose nach Ureterligatur in den neonatalen Nieren signifikant und progredient zunimmt. Die glomeruläre Apoptose stieg am 7. Lebenstag um ca. 50 % und am 14. Lebenstag auf das über 10-Fache an. Ursächlich für die glomeruläre Apoptose nach Ureterligatur ist eine renale Vasokonstriktion mit Ischämie und Hypoxie. Auch das UO-induzierte Zytokin TGF- $\beta$  ist an der Vermittlung der glomerulären Apoptose beteiligt. Dementsprechend ist eine pro-apoptotische Wirkung von TGF- $\beta$  auf Podozyten bekannt [108]. Ein Verlust von Podozyten ist für die Nierenfunktion besonders

gravierend, da Podozyten einen entscheidenden strukturellen Teil des glomerulären Filterapparats darstellen und nur eine sehr begrenzte Regenerationskapazität besitzen. Ihr Verlust ist langfristig mit Glomerulosklerose, Proteinurie und chronischem Nierenversagen verbunden [109].

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 in den ureterligierten Nieren neonataler Mäuse die glomeruläre Apoptose signifikant reduziert, konkret um 46 % am 14. Lebenstag. Dazu sind bislang keine vergleichbaren Daten bekannt. Die anti-apoptotische Wirkung der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 ist auch hier wahrscheinlich auf die Hemmung von pro-apoptotischen Faktoren (TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 und c-Jun) und die Förderung von anti-apoptotischen Faktoren (Bcl-2, Autophagie) zurückzuführen. Auch bei glomerulären Nierenerkrankungen wie z.B. der Lupusnephritis oder der IgA-Nephritis ist eine STAT3-Aktivierung in den Glomeruli bekannt und für den Organerhalt von Nachteil. So korreliert die Anzahl der glomerulären Zellen mit STAT3-Aktivität bei beiden Glomerulonephritiden mit einer abnehmenden Nierenfunktion [110]. Auch im tierexperimentellen Modell der anti-Thy1.1-Antikörper-induzierten Glomerulonephritis vermittelt STAT3 die Progression der Erkrankung [111]. Zusätzlich dazu zeigen mesangiale Zellen in adulten Nieren eine STAT3-Aktivierung nach Ureterligatur [112].

Methodisch ist jedoch anzumerken, dass die TUNEL-Färbung nicht selektiv für Apoptose ist. Die nachgewiesene DNA-Fragmentierung kann auch bei regulierter Nekrose auftreten. Diese Unterscheidung ist insofern interessant, da diese verschiedenen Formen des Zelltodes unterschiedlich starke lokale Immunreaktionen hervorrufen. Die Apoptose beschreibt einen präzise regulierten Vorgang des enzymatischen Zellabbaus. Dabei werden sämtliche Zellreste von Nachbarzellen aufgenommen, sodass kein pro-inflammatorisches Zellmaterial frei wird [101]. Dagegen löst die Nekrose den Verlust der Membranintegrität mit interstitieller Freisetzung des Zellinhalts und einer konsekutiven Inflammationsreaktion aus. Deshalb resultiert Nekrose z.B. beim akuten Nierenversagen in einem stärkeren Verlust der Nierenfunktion als Apoptose [101]. Nach Ureterligatur können Apoptose und Nekrose segmentspezifisch auftreten. Zur Differenzierung können jeweils spezifische Enzyme und die Zellmorphologie herangezogen werden [101, 113].

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie die Apoptose von tubulären, interstitiellen und glomerulären Zellen reduziert und damit protektiv für den Organerhalt wirkt.

### **4.3 Wirkung von Tyrphostin AG 490 auf die renale Proliferation**

Als Folge der Ureterligatur kommt es in neonatalen Mausnieren zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation tubulärer Zellen [23]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte die Abnahme der tubulären Proliferation in den neonatalen Nieren eindrucksvoll bestätigt

werden. Konkret nahm die tubuläre Proliferation in den ureterligierten Nieren am 3. Lebenstag um knapp 50 % und am 14. Lebenstag um 66 % ab. Auch in den kontralateralen Nieren reduzierte die Ureterligatur die Proliferation von Tubuluszellen um 60 % am 3. Lebenstag. Damit führt die Ureterligatur in den neonatalen Nieren zu einer Einschränkung des tubulären Entwicklungspotenzials und zu einer deutlichen Reduktion der Nephronmasse. [23]. Im Gegensatz zu diesen neonatalen Daten nimmt in adulten Mausnieren die tubuläre Proliferation nach Ureterligatur zu und zeigt einen Gipfel 3-6 Tage nach OP [95, 96, 107]. Die Proliferation war dabei in atrophischen Tubuli im Vergleich zu benachbarten Tubuli ohne Atrophiezeichen besonders ausgeprägt [114]. Auch in anderen Krankheitsmodellen zeigten adulte Mausnieren im Rahmen einer tubulären Reparatur eine gesteigerte Proliferation von Tubuluszellen. Dies war im Vergleich dazu in der sich noch entwickelnden neonatalen Niere nicht nachweisbar [114].

Die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 führte in neonatalen ureterligierten Nieren erfreulicherweise zu einem signifikanten Anstieg der tubulären Proliferation. Konkret stieg die Proliferation tubulärer Zellen in den ureterligierten Nieren am 14. Lebenstag auf das 3-Fache im Vergleich zur Vehikelgruppe an. Wie lässt sich dieser proliferative Effekt der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 erklären? Die Transkriptionsaktivität von STAT3 betrifft u.a. auch das Protein p21, das wesentlich an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist [32, 33]. Darüber hinaus kann auch TGF- $\beta$ , das durch die Ureterligatur STAT3-abhängig induziert wird, zum Zellzyklusarrest führen [96]. Die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 könnte damit die Zunahme der tubulären Proliferation über eine verminderte Expression dieser beiden Inhibitoren des Zellzyklus bewirken. Möglicherweise handelt es sich bei der proliferativen Wirkung der STAT3-Blockade zusätzlich auch um einen sekundären Effekt der reduzierten Leukozyteninfiltration und Zytokinsekretion [35]. Bisher sind keine vergleichbaren Daten zu tubulärer Proliferation unter STAT3-Blockade bekannt. Interessanterweise steigerte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Proliferation auch in den kontralateralen Nieren, konkret auf das 3,4-Fache am 14. Lebenstag im Vergleich zur Vehikelgruppe. Zu diesem Untersuchungszeitpunkt waren sowohl in der obstruierten als auch in der kontralateralen Niere mehr proliferierende Tubuluszellen als in der scheinoperierten Kontrolle nachweisbar. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die UUO-induzierte Reduktion der tubulären Proliferation hemmt und im Verlauf sogar zu einer Zunahme der tubulären Proliferation führt.

Nach Ureterligatur zeigte außerdem auch die Proliferation der interstitiellen Zellen neonataler Nieren signifikante Veränderungen. Die interstitielle Proliferation in der Niere war initial nach 24h um 46 % reduziert und nahm im Verlauf deutlich zu. Sie stieg am 7. Lebenstag auf das über 3-Fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. Im Interstitium proliferierende Zellen sind neben Fibroblasten, Myofibroblasten und Perizyten vor allem infiltrierende Leukozyten und darunter vor allem die Makrophagen. Die Makrophagenanzahl wird nicht nur durch die Rekrutierung aus dem Blutgefäßsystem, sondern auch durch ihre lokale Proliferation beeinflusst [115]. Proliferierende Makrophagen und

Fibroblasten wirken renal sowohl pro-inflammatorisch als auch pro-fibrotisch. Die UUO-induzierte interstitielle Proliferation führt damit zu einer weiteren renalen Schädigung. In adulten Mausnieren ist ein zweigipfliger Anstieg der interstitiellen Proliferation nach Ureterligatur bekannt. Dabei proliferieren initial vorwiegend Fibroblasten, während später überwiegend Leukozyten betroffen sind [96]. Die UUO-induzierte Proliferation von Fibroblasten wird in adulten Nieren u.a. durch den hochregulierten Wachstumsfaktor PDGF (Platelet-derived growth factor) induziert [96].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die interstitielle Proliferation in neonatalen Mausnieren nach Ureterligatur signifikant reduziert. Konkret reduzierte Tyrphostin AG 490 die Proliferation interstitieller Zellen am 7. Lebenstag in den ureterligierten Nieren um knapp 85 % und in den kontralateralen Nieren um knapp 90 % im Vergleich zur Vehikelgruppe. Dies stimmt mit bisherigen Daten überein, wonach die interstitielle Proliferation in adulten Nieren 7 Tage nach Ureterligatur durch STAT3-Blockade durch S3I-201 um ca. 80 % reduziert war [35]. Wie lässt sich dieser Effekt der STAT3-Blockade erklären? Die Transkriptionsaktivität von STAT3 betrifft u.a. auch Wachstumsfaktoren wie FGF (fibroblast growth factor) [32]. Die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 könnte durch die reduzierte Expression von FGF zu einer Reduktion der interstitiellen Proliferation beitragen. Zusätzlich könnte auch die Reduktion von TGF- $\beta$  durch die STAT3-Blockade eine Rolle spielen. TGF- $\beta$ 1 führt in Fibroblasten in vitro zu epigenetischen Veränderungen, die kontinuierlich die Proliferation der Fibroblasten stimulieren [114]. TGF- $\beta$ 1 ist eines der zentralen Zytokine nach Ureterligatur und an der gesteigerten Proliferation interstitieller Fibroblasten beteiligt. Die STAT3-Blockade führte über die Reduktion der Leukozyteninfiltration und der nachfolgend reduzierten Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine zu einer verminderten Freisetzung von TGF- $\beta$ 1. Entsprechend reduzierte die STAT3-Blockade durch S3I-201 in adulten Nieren nach Ureterligatur nicht nur die interstitielle Proliferation, sondern auch die Expression von TGF- $\beta$  und seinem Rezeptor T $\beta$ RII [35]. Zusammenfassend reduzierte die STAT3-Blockade die UUO-induzierte interstitielle Proliferation im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie, was im Hinblick auf die parallel reduzierte Fibrose als Nephroprotektion gewertet werden kann.

## **4.4 Reduktion der tubulären Atrophie durch Tyrphostin AG 490**

Zur Atrophie des renalen Tubulussystems kommt es infolge unterschiedlicher renaler Schädigungen [97]. In der vorliegenden Arbeit führte die Ureterligatur neonataler Nieren zu einer progredienten und signifikanten Zunahme atrophischer Tubuli. Dabei betraf die Atrophie sowohl die proximalen als auch die distalen Tubuluszellen. Konkret nahm die Atrophie proximaler Tubuli am 7. Lebenstag um das 57-Fache gegenüber dem 3. Lebenstag zu und stieg am 14. Lebenstag weiter auf das über 500-Fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. In distalen Tubuli war die Atrophie erstmals am 7. Lebenstag

nachweisbar und nahm am 14. Lebenstag auf das über 50-Fache zu. Dies entspricht den bereits publizierten Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen [27, 116].

In der vorliegenden Arbeit führte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 zu keiner signifikanten Reduktion der Atrophie, weder in proximalen noch in distalen Tubuli der neonatalen Mausnieren. Nur tendenziell war eine Abnahme der tubulären Atrophie durch Tyrphostin AG490 nachweisbar. Ursächlich ist dafür vermutlich in erster Linie die reduzierte tubuläre Apoptose, die eine Voraussetzung der tubulären Atrophie ist. Auch vorausgegangene Daten unserer Arbeitsgruppe wiesen eine Korrelation zwischen der Anzahl apoptotischer Tubuluszellen und der Anzahl atrophischer Tubuli auf [27]. Diesbezüglich könnte deshalb in der vorliegenden Arbeit ein sekundärer Effekt der STAT3-Blockade vorliegen. Für adulte Nieren gibt es keine vergleichbaren Daten zum Effekt einer STAT3-Blockade nach Ureterligatur. Die STAT3-Blockade wurde jedoch im Modell der Cyclosporin-induzierten Nephropathie und der Ischämie-Reperfusion untersucht. Dabei reduzierte Tyrphostin AG 490 die tubuläre Atrophie in adulten Nieren [92].

Unabhängig von der STAT3-Blockade fiel im neonatalen UUO-Modell auf, dass überwiegend proximale Tubuli atrophisch wurden. Dieser segmentspezifische Unterschied basiert wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Sensitivität von proximalen und distalen Tubuli gegenüber Schädigungsreizen. Die distalen Tubuli sind durch den Harnstau einer Dilatation ausgesetzt, die tubuläre Apoptose und peritubuläre Fibrose induziert. Die proximalen Tubuli leiden dagegen stärker unter der UUO-induzierten Vasokonstriktion, Hypoxie und Inflammation [97]. Da die proximalen Tubuluszellen den Großteil der tubulären Resorptions- und Sekretionsleistung erbringen, sind sie durch ihren hohen Energie- und Sauerstoffverbrauch besonders anfällig gegen Hypoxie und oxidativen Stress. [30, 117]. Innerhalb der proximalen Tubuli scheint tierexperimentell die glomerulotubuläre Verbindung besonders empfindlich gegen Schädigungsreize zu sein. Die Folge davon ist eine glomerulotubuläre Diskonnektion mit atubulären Glomeruli und aglomerulären Tubuli, wie sie experimentell nach neonataler Ureterligatur gezeigt wurde [118]. Langfristig führt die tubuläre Atrophie durch den Verlust funktioneller Nephrone zu einer irreversiblen Einschränkung der Nierenfunktion. Interessanterweise ist die tubuläre Atrophie tierexperimentell und klinisch einer der besten Prädiktoren der Progression chronischer Nierenerkrankungen [119].

## **4.5 Reduktion der aktivierten Myofibroblasten durch Tyrphostin AG 490**

Die Ureterligatur führt außerdem zu einem gravierenden renalen Umbau, der von einer massiven Ablagerung extrazellulärer Matrix begleitet und interstitielle Fibrose genannt wird. Die matrixproduzierenden Zellen sind dabei vorwiegend aktivierte Myofibroblasten, die nach Ureterligatur in der obstruierten Niere nachweisbar sind. In der vorliegenden Arbeit führte die Ureterligatur neonataler Mäuse zu einer progredienten und signifikanten Zunahme dieser aktivierten Myofibroblasten. Dabei stieg die Zahl der  $\alpha$ -SMA-positiven



Myofibroblasten bis zum 14. Lebenstag auf das 5,3-Fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. Dies bestätigt die Daten von Yoo et al., die zeigen konnten, dass die Zunahme aktivierter Myofibroblasten von der Dauer und Schwere der Obstruktion abhängig ist [73]. Im Vergleich zu den ureterligierten Nieren war auch in den kontralateralen Nieren ein transients Anstieg der Myofibroblasten nachweisbar, der nach dem 7. Lebenstag wieder kontinuierlich abnahm. Die Anzahl der Myofibroblasten in der kontralateralen Niere blieb nach Ureterligatur jedoch stets höher als in der scheinoperierten Kontrolle [23]. In der vorliegenden Arbeit waren die Myofibroblasten besonders häufig im Markbereich der Niere, an der Grenze zwischen Rinde und Mark und peritubulär lokalisiert. Auch in adulten Mausnieren sind die  $\alpha$ -SMA-positiven Myofibroblasten nach UUO überwiegend im Nierenmark nachweisbar [21, 35, 74, 95].

Die vorliegende Arbeit zeigte erstmals, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die Anzahl der Myofibroblasten in der neonatalen Mausniere nach Ureterligatur signifikant reduziert. Bereits am 3. Lebenstag und damit 24 h nach Ureterligatur wurde eine Reduktion der Myofibroblasten um 15 % und am 7. bzw. 14. Lebenstag um 51 % bzw. 46 % im Vergleich zur Vehikelgruppe erreicht. Ähnliche Effekte zeigte die Behandlung mit Tyrphostin AG 490 auch in der kontralateralen Niere. Wie lässt sich diese erfolgreiche Reduktion der Myofibroblasten durch die STAT3-Blockade erklären? Der Transkriptionsfaktor STAT3 kann u.a. die Expression von Wachstumsfaktoren wie FGF und pro-fibrotischen Zytokinen wie TGF- $\beta$ 1 stimulieren [32]. TGF- $\beta$ 1 führt in Fibroblasten in vitro zu epigenetischen Veränderungen, die kontinuierlich die Proliferation der Fibroblasten stimulieren [114]. Denn neben dem Tiermodell der unilateralen Ureterligatur sind diese residenten Fibroblasten und Perizyten auch in anderen renalen Krankheitsmodellen als Hauptquelle der aktivierten Myofibroblasten bekannt und stellen damit die Hauptursache der interstitiellen Fibrose dar [98, 120, 121]. Die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 könnte durch die reduzierte Expression von FGF und TGF- $\beta$ 1 die Proliferation von Fibroblasten und Perizyten hemmen und dadurch die Anzahl aktivierter Myofibroblasten reduzieren.

Zusätzlich speisen weitere Mechanismen den Pool der aktivierten Myofibroblasten. Makrophagen können durch ihre Umwandlung in aktivierte Myofibroblasten zum Myofibroblastenpool beitragen [98]. Dieser Prozess der Umwandlung wird als Makrophagen-Myofibroblasten-Transition (MMT) bezeichnet [98]. Entsprechend konnten in adulten Mausnieren nach Ureterligatur einzelne Zellen mit einer Koexpression typischer Oberflächenmarker beider Zellreihen nachgewiesen werden [78]. Nach Ureterligatur wird die MMT vermutlich durch das UUO-induzierte Zytokin TGF- $\beta$  vermittelt [122]. Entsprechend könnte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die MMT einerseits durch die reduzierte Expression von TGF- $\beta$  und andererseits durch die bereits gezeigte Reduktion der Makrophageninfiltration hemmen. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen reduzierte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 bereits in anderen renalen Krankheitsmodellen wie z.B. der Adriamycin-induzierten Nephropathie sowohl die Makrophageninfiltration als auch die Expression von  $\alpha$ -SMA [83]. Entsprechend ist auch eine krankheitsübergreifende pro-fibrotische Wirkung renaler Makrophagen bekannt [27].

Neben der MMT ist auch die Umwandlung von geschädigten Tubulusepithelzellen in aktivierte Myofibroblasten möglich [98, 123, 124]. Bei dieser epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) verlieren die Tubuluszellen neben ihrer Polarität und Zelladhäsion auch ihre epithelialen Marker (z.B. Keratin und E-Cadherin) und exprimieren de novo mesenchymale Marker (z.B. Vimentin und  $\alpha$ -SMA). Die betroffenen Tubuluszellen lösen sich von der tubulären Basalmembran ab und wandern ins Interstitium ein, um sich dort zu Myofibroblasten zu differenzieren und Matrixkomponenten zu sezernieren [119]. In adulten Nieren ist ein Gipfel der EMT 8 Tage nach Ureterligatur bekannt [27]. In neonatalen Nieren tritt die EMT mit dem Nachweis mesenchymaler Marker ab dem 5. Lebenstag kontinuierlich ansteigend auf [27]. Fatalerweise resultiert die renale EMT neben der Fibrose auch in tubulärer Atrophie, denn die betroffenen Tubuluszellen verharren entweder im Zellzyklusarrest oder emigrieren [125-127]. Lösen sich mehr Zellen aus dem epithelialen Verband, als ersetzt werden, resultiert der Verlust funktioneller Nephrone [119]. Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist auch nach onkologischem Forschungsstand an der EMT beteiligt [128]. Entsprechend konnte bereits in verschiedenen Krankheitsmodellen für Tyrphostin AG 490 und andere STAT3-Inhibitoren eine Hemmung der EMT gezeigt werden [129, 130]. Die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 könnte daher sowohl die MMT als auch die EMT hemmen. Entsprechend aktueller Daten trägt die EMT jedoch zu höchstens 5 % der interstitiellen Fibrose in der Niere bei [131].

Neuerdings werden auch Endothelzellen als Quelle der aktivierten Myofibroblasten diskutiert [98, 124]. Die sogenannte endothelial-mesenchymale-Transition verstärkt zudem die Rarifizierung des interstitiellen Kapillarnetzes und die tubuläre Hypoxie [131]. Zusammenfassend resultiert die Differenzierung zu aktivierten Myofibroblasten aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener renaler Zelltypen und einer Vielzahl lokaler Mediatoren [120]. Auch der Transkriptionsfaktor HIF1 $\alpha$  (Hypoxie induzierter Faktor-1 $\alpha$ ), der ebenfalls STAT3-abhängig exprimiert wird, ist daran beteiligt. So führt die genetische Ablation von HIF1 $\alpha$  in renalen Tubuluszellen zu einer Reduktion aktivierter Myofibroblasten in der ureterligierten Niere [87]. Deshalb könnte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die Anzahl aktivierter Myofibroblasten möglicherweise auch durch eine verminderte HIF1 $\alpha$ -Expression reduzieren.

Unsere neonatalen Ergebnisse bestätigen die bisherigen Ergebnisse in adulten Nieren, in denen der STAT3-Inhibitor S3I-S01 die Expression von  $\alpha$ -SMA 7 Tage nach Ureterligatur reduzierte [35]. Zusätzlich nahm auch die Expression von TGF- $\beta$  und seinem Rezeptor T $\beta$ RII ab. Allerdings führte S3I-S01 14 Tage nach Ureterligatur zu keinem signifikanten Effekt mehr auf die Expression von  $\alpha$ -SMA [35]. Dagegen zeigte Tyrphostin AG 490 in der vorliegenden Arbeit keinen vergleichbaren Wirkungsverlust. Der unterschiedliche Angriffspunkt von Tyrphostin AG 490 und S3I-S01 könnte hier eine Rolle spielen. Auch im Rahmen anderer renaler Krankheitsmodelle konnte die STAT3-Blockade die Expression von  $\alpha$ -SMA signifikant reduzieren. Dies ist im Fall der Adriamycin-induzierten Nephropathie für Tyrphostin AG 490 und bezüglich der Streptozotocin-induzierten diabetischen Nephropathie für SOCS1 und 3 (Suppressor Of Cytokine Signaling) gezeigt worden [83, 132].

Interessanterweise werden aktivierte Myofibroblasten inzwischen nicht nur als Produzenten extrazellulärer Matrix gesehen. Vielmehr können sie aufgrund ihrer Sekretion von Chemokinen, Zytokinen und Sauerstoffradikalen selbst als Entzündungszellen betrachtet werden, die interstitielle Fibrose hervorrufen [120]. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die UUO-induzierte Zunahme der aktivierten Myofibroblasten in neonatalen Nieren nach Ureterligatur drastisch reduziert, was als eine erfolgreiche Behandlung und Vorbeugung interstitieller Fibrose gewertet werden muss.

## **4.6 Reduktion der interstitiellen Fibrose durch Tyrphostin AG 490**

Die Ureterligatur führte in den neonatalen Mausnieren erwartungsgemäß zu einem progredienten und signifikanten Anstieg der interstitiellen Fibrose. Dabei stieg die Anzahl der Kollagen-positiven Rasterfelder in den ureterligierten Nieren am 14. Lebenstag bis auf das ca. 160-Fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an. In den kontralateralen Nieren führte die Ureterligatur zu einer geringeren Zunahme auf das ca. 20-Fache. Diese Ergebnisse bestätigen die bisher von uns und anderen Arbeitsgruppen publizierten Daten zur Entwicklung interstitieller Fibrose nach UUO [23, 27, 73]. Auch in adulten Nieren ist nach Ureterligatur eine deutliche Zunahme der interstitiellen Kollagenablagerungen bekannt [35, 74, 95, 99, 133-135].

In der vorliegenden Arbeit konnten wir jetzt erstmals zeigen, dass die tägliche subkutane Behandlung mit dem STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG 490 die interstitielle Fibrose der neonatalen Mausniere nach Ureterligatur signifikant reduziert. Durch die Tyrphostin AG 490-Behandlung wurde eine Reduktion der interstitiellen Kollagenablagerung um 72 % in den ureterligierten und um 68 % in den kontralateralen Nieren jeweils am 14. Lebenstag erreicht. Bereits am 7. Lebenstag war eine Reduktion der Kollagenablagerung in Tyrphostin-behandelten Mäusen im Vergleich zur Vehikelgruppe nachweisbar, die dann am 14. Lebenstag signifikant war. Wie lässt sich dieser anti-fibrotische Effekt der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 erklären? Mehrere Mechanismen scheinen dabei eine Rolle zu spielen. Wesentlich ist sicher die bereits gezeigte Reduktion der aktivierten Myofibroblasten, die zur Reduktion der Matrixproduktion beiträgt. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Blockade der STAT3-vermittelten pro-fibrotischen TGF- $\beta$ -Expression [35]. Darüber hinaus reguliert die STAT3-Signalkaskade auch die Expression von Matrixmetalloproteasen wie MMP-1 und -2 [33]. Diese Enzyme sind für den Abbau der extrazellulären Matrix zuständig [120, 131]. Daher könnte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die interstitielle Fibrose auch durch eine gesteigerte Expression von Matrixmetalloproteasen günstig beeinflussen. Zusätzlich steigert STAT3 auch die Expression eines Inhibitors der Matrixmetalloproteasen, TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases 1) [33]. TIMP-1 ist auch als wichtiger Faktor des Zellüberlebens von Myofibroblasten bekannt [120]. Daher reduziert die

STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die interstitielle Fibrose möglicherweise auch durch eine verminderte Expression von TIMP-1.

Darüber hinaus korreliert die STAT3-Aktivität in interstitiellen Myofibroblasten adulter Nieren mit interstitieller Fibrose und einer eingeschränkten Nierenfunktion [35]. Möglicherweise erhöht die STAT3-Aktivität dabei die Syntheserate der Myofibroblasten. Entsprechend ist STAT3 auch in Modellen anderer progressiv fibrotischer Nierenerkrankungen, wie der Glomerulosklerose und der diabetischen Nephropathie stark aktiviert [110, 136]. Daher reduziert die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 die interstitielle Fibrose möglicherweise auch durch eine Reduktion der Syntheserate aktivierter Myofibroblasten.

Zusätzlich unterstützt wahrscheinlich auch die Reduktion der Lymphozyteninfiltration den anti-fibrotischen Effekt der STAT3-Blockade. So konnte in adulten Mäusen gezeigt werden, dass einzelne T-Zell-Subpopulationen nach Ureterligatur einen pro-fibrotischen Effekt aufweisen und die selektive Depletion von CD4-positiven T-Lymphozyten die Entwicklung interstitieller Fibrose reduziert. Zusätzlich führte die selektive Gabe von Th2-Zellen in adulten Mäusen mit selektivem T-Zelldefekt nach Ureterligatur zu ausgeprägterer Fibrose als bei der Gabe von Th1-Zellen [137]. Wir konnten in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Reduktion der Makrophagen- und T-Lymphozyteninfiltration durch die STAT3-Blockade von einer signifikanten Reduktion der interstitiellen Fibrose begleitet wurde. Entsprechend könnte die Reduktion der interstitiellen Fibrose auch auf der reduzierten Infiltration von pro-fibrotischen Makrophagen und T-Lymphozyten beruhen. Zusammenfassend kommen damit mehrere Mechanismen in Frage, die die erfolgreiche Reduktion der interstitiellen Fibrose durch die STAT3-Blockade erklären.

In Übereinstimmung mit unseren neonatalen Daten ist in adulten UUO-Modellen bereits mehrfach eine Reduktion der interstitiellen Fibrose durch STAT3-Blockade nachgewiesen worden [35, 75, 138]. Pang et al. konnten zeigen, dass die STAT3-Blockade durch S3I-201 die interstitielle Fibrose um ca. 60 % reduziert [35]. Ein vergleichbares Ergebnis erzielte die STAT3-Blockade durch Mefunidone in adulten Ratten mit Ureterligatur [75]. Neben dem Tiermodell der Ureterligatur reduzierte die Blockade von STAT3 ebenso in anderen experimentellen Nierenerkrankungen die interstitielle Kollagenablagerung [86, 132]. Extrarenal führte die Hemmung des JAK2/STAT3-Signalwegs mehrfach zu einer Reduktion von Fibrose [139, 140]. Tyrphostin AG 490 reduzierte die hepatische Fibrose dabei nicht nur, sondern konnte sie sogar teilweise rückgängig machen [141]. Zusammenfassend ist die interstitielle Fibrose nach Ureterligatur ein dynamischer Prozess mit reparativen und destruktiven Elementen. Sobald die Produktion der extrazellulären Matrix ihre Degradation überwiegt, resultiert eine progrediente Matrixakkumulation und Vernarbung der Niere. Diese renale Fibrosierung führt langfristig über die folgenden Mechanismen zu einem irreversiblen Verlust von Nierenfunktion, denn zum einen reduziert die erhöhte Steifheit des Nierenparenchyms den Blutfluss der peritubulären Kapillaren. Dies verstärkt die UUO-induzierte tubuläre Hypoxie. Zum anderen nimmt das Interstitium durch die

Matrixablagerungen mehr und mehr Raum ein [120]. Die verlängerten Diffusionswege resultieren in weiterer Hypoxie und einer Zunahme der Fibrose [114]. Die geschädigten Tubuluszellen verlieren ihr Regenerationspotenzial und gehen durch Apoptose, Nekrose, oder die epithelial-mesenchymale-Transition verloren [98]. Zusammen führen all diese Mechanismen über die tubuläre Atrophie und den Verlust funktioneller Nephrone zur Niereninsuffizienz, die bei Patienten mit obstruktiver Uropathie bekannt ist.

Die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 reduzierte in der vorliegenden Arbeit die Entwicklung interstitieller Fibrose. Damit stellt Tyrphostin AG 490 eine therapeutische Möglichkeit zum Erhalt der Nierenfunktion im Rahmen angeborener obstruktiver Uropathien dar.

## **4.7 Verträglichkeit von Tyrphostin AG 490 und Überblick der histologischen Effekte**

Da der Transkriptionsfaktor STAT3 möglicherweise auch im Rahmen der Nephrogenese eine Rolle spielt, ist im neonatalen Tiermodell eine selektive Hemmung eben derjenigen STAT3-Aktivierung zu bevorzugen, die durch die Ureterligatur induziert wird [51]. Nach Ureterligatur führen vor allem Entzündungsmediatoren über Zytokin- oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren zu einer JAK2-abhängigen Aktivierung von STAT3. Nur wenige der bekannten STAT3-Inhibitoren ermöglichen solch eine selektive STAT3-Blockade. Tyrphostin AG 490 könnte durch die Hemmung der Phosphorylierungsaktivität der Tyrosinkinase JAK2 diese pathologische Aktivierung von STAT3 verhindern und die physiologische STAT3-Aktivität aufrecht erhalten. Erwartungsgemäß wurde die tägliche, subkutane Injektion von Tyrphostin AG 490 gut vertragen und führte zu keinem Unterschied bezüglich der neonatalen Entwicklung, des Körpergewichts, der Motorik oder des Sozialverhaltens zwischen der Behandlungs- und Vehikelgruppe über einen Zeitraum von 2 Wochen nach der Geburt.

Einen Überblick über die histologischen Effekte der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG 490 im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie bietet Tabelle 15 für die ureterligierten Nieren und Tabelle 16 für die kontralateralen Nieren. Zusammenfassend erwies sich Tyrphostin AG 490 als potenter STAT3-Blocker, der sich aufgrund seiner guten Wirkung und fehlenden Nebenwirkungen im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie möglicherweise zu einem neuen therapeutischen Baustein in der Behandlung angeborener obstruktiver Uropathien entwickeln könnte.

Ureterligierte Nieren (UUO)	Kontrollgruppe			Tyrphostin AG 490		
	3	7	14	3	7	14
<b>Leukozyteninfiltration</b>						
Makrophagen	↑↑ <sup>1</sup>	↑↑ <sup>3</sup>	↑↑ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>1</sup>	↓↓	↓↓
T-Lymphozyten	↑↑	↑↑ <sup>3</sup>	↑↑ <sup>3</sup>	↓↓↓ <sup>2</sup>	↓↓↓ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>3</sup>
<b>Apoptose</b>						
tubulär	↑↑ <sup>2</sup>	↑↑ <sup>3</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>3</sup>	↓↓↓ <sup>3</sup>	↓↓↓ <sup>3</sup>
interstitiell	↑↑	↑↑ <sup>3</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>2</sup>	↓↓↓ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>3</sup>
glomerulär	↑	↑↑ <sup>2</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>1</sup>	↓↓ <sup>2</sup>	↓↓ <sup>3</sup>
<b>Proliferation</b>						
tubulär	↓↓ <sup>3</sup>	↓↓	↓↓↓ <sup>3</sup>	↑↑	↑	↑↑↑ <sup>3</sup>
interstitiell	↓↓ <sup>3</sup>	↑↑ <sup>3</sup>	↓↓	↓↓	↓↓↓ <sup>3</sup>	↓↓
<b>tubuläre Atrophie</b>						
proximale Tubuli	(↑)	(↑) <sup>3</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↓↓↓	↓↓	↓
distale Tubuli	=	(↑) <sup>3</sup>	↑↑↑ <sup>1</sup>	=	↑↑	↓↓
<b>interstitielle Fibrose</b>						
aktivierte Myofibroblasten	↑↑ <sup>1</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>1</sup>	↓↓↓ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>3</sup>
Kollagenablagerung	↑↑ <sup>3</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↓↓	↓↓	↓↓↓ <sup>3</sup>

Tabelle 15: Veränderungen ureterligierter Nieren im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie bezogen auf scheinoperierte Kontrollen, semiquantitativ = keine Veränderung, ↑/↓ Anstieg/Reduktion < 10%, ↑↑ Anstieg 10-100%, ↓↓ Reduktion 10-50%, ↑↑↑ Anstieg > 100%, ↓↓↓ Reduktion > 50%, () keine Prozentangabe möglich, qualitativ 1 p < 0,05, 2 p < 0,01, 3 p < 0,001.

kontralaterale Nieren (IO)	Kontrollgruppe			Tyrphostin AG 490		
	3	7	14	3	7	14
<b>Leukozyteninfiltration</b>						
Makrophagen	↑↑	↑	↑↑	↓↓	↓↓	↓↓
T-Lymphozyten	↓	↑↑ <sup>2</sup>	↑↑ <sup>3</sup>	↓↓	↓↓	↓↓
<b>Apoptose</b>						
tubulär	↑↑	↑↑	↑↑	↓↓	↓↓	↓↓
interstitiell	↑↑	↓↓	↓	↓↓ <sup>1</sup>	↓↓	↓↓
glomerulär	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓	↓↓	↑↑
<b>Proliferation</b>						
tubulär	↓↓↓ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>1</sup>	↓↓ <sup>1</sup>	↑↑	↑	↑↑↑ <sup>3</sup>
interstitiell	↓↓	↑↑ <sup>1</sup>	↑↑	↓↓	↓↓↓ <sup>3</sup>	↓↓
<b>tubuläre Atrophie</b>						
proximale Tubuli	=	=	↑↑↑	=	=	↓↓↓
distale Tubuli	=	=	↓↓↓	=	=	↓↓↓
<b>interstitielle Fibrose</b>						
aktivierte Myofibroblasten	↑ <sup>1</sup>	↑↑ <sup>3</sup>	↑↑ <sup>3</sup>	↓↓ <sup>1</sup>	↓↓ <sup>1</sup>	↓↓ <sup>1</sup>
Kollagenablagerung	↓↓	↑↑↑ <sup>3</sup>	↑↑↑ <sup>3</sup>	↓	↓	↓↓↓ <sup>3</sup>

Tabelle 16: Veränderungen kontralateraler Nieren im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie bezogen auf scheinoperierte Kontrollen, semiquantitativ = keine Veränderung, ↑/↓ Anstieg/Reduktion < 10%, ↑↑ Anstieg 10-100%, ↓↓ Reduktion 10-50%, ↑↑↑ Anstieg > 100%, ↓↓↓ Reduktion > 50%, qualitativ 1 p < 0,05, 2 p < 0,01, 3 p < 0,001.

## 5 Ausblick

Konnatale obstruktive Uropathien führen durch eine zytokinvermittelte Entzündungsreaktion und die Entwicklung interstitieller Fibrose zu einem Verlust funktioneller Nephrone. Sie stellen den Hauptgrund für die chronisch terminale Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit im Kindesalter dar. Klinisches Ziel ist es deshalb, relevante Harntraktobstruktionen frühzeitig zu erkennen und rechtzeitig zu behandeln. Die Indikation zur Operation der angeborenen Ureterabgangsstenose ist aktuell an die szintigraphische Verschlechterung der Partialfunktion gebunden, sodass eine Entlastung der Obstruktion frühestens nach der zweiten Szintigraphie im Alter von mehreren Monaten erfolgt. Tierexperimentelle partielle UUO-Modelle zeigen, dass zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich bereits eine Parenchymschädigung eingetreten ist, die trotz Operation fortschreitet [9, 22, 26]. Deshalb sind neue diagnostische Ansätze nötig, um frühzeitig eine relevante Harntransportstörung zu erkennen.

Die quantitative Magnetresonanztomographie könnte die bisherige Bildgebung ohne weitere Strahlenbelastung unterstützen, ist aber im Säuglingsalter in der Regel mit einer Sedierung oder Narkose verbunden [11]. Vielversprechender ist aktuell die Analyse von Biomarkern im Urin der Patienten mit Ureterabgangsstenose. Ihre Konzentration kann nicht-invasiv Aufschluss über das Ausmaß der Entzündungsreaktion in der Niere oder den Grad der tubulointerstitiellen Schädigung geben. Entsprechend der aktuell publizierten Daten werden im Frühstadium u.a. inflammationsassoziierte Zytokine (u.a. TGF- $\beta$ ) ausgeschieden [15, 142, 143]. Gleiches gilt für das Chemokin CCL2, das die Rekrutierung von Makrophagen vermittelt und auch als Monozyten-chemotaktisches-Protein (MCP-1) bekannt ist [144]. Eine erhöhte Konzentration an Angiotensinogen im Urin kann ebenfalls als Ausdruck einer Renin-Angiotensin-Aldosteron-Aktivierung eine schwere Obstruktion anzeigen [145]. Die spätere Phase der tubulointerstitiellen Schädigung scheinen NGAL (Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin), KIM-1 (kidney injury molecule 1) und Kollagenfragmente sensitiv abzubilden [146-148]. Auch phosphoryliertes STAT3 könnte möglicherweise als Biomarker der Krankheitsaktivität, wie bereits bei der akuten rheumatoiden Arthritis gezeigt, zur Prognoseabschätzung beitragen [149]. Durch eine bessere Risikostratifizierung könnten Patienten mit schweren Harntransportstörungen früher diagnostiziert und Patienten mit grenzwertigen Befunden enghemmaschiger kontrolliert werden.

Neben der Verbesserung der Diagnostik durch die Einführung von Biomarkern könnten unsere Erkenntnisse zusätzlich dafür genutzt werden, die ausgeprägte tubulointerstitielle Entzündung bei obstruktiven Uropathien kausal mit einer gezielten anti-inflammatorischen Therapie zu behandeln. Pharmakologisch wäre eine präzise Blockade der pro-inflammatorischen Signalwege möglich. Angeborene obstruktive Uropathien zeigen allerdings eine komplexe Interaktion verschiedener Signalwege. Die primäre Wirksamkeit einzelner Therapieansätze könnte sich daher im Verlauf durch die Aktivierung alternativer Signalwege relevant abschwächen. Zusätzlich ist die Wirkung anti-inflammatorischer Therapieansätze vom Stadium der Nephrogenese und Maturation abhängig [22, 150]. Unter

---

Berücksichtigung des pathophysiologisch entscheidenden frühen Zeitfensters könnte dies für eine Kombination verschiedener Therapieansätze sprechen. Eine risikoadaptierte individuelle Therapie könnte es bei Patienten mit angeborenen obstruktiven Uropathien zukünftig erlauben, die noch vorhandene Nierenfunktion zu erhalten und langfristig einer Dialysepflichtigkeit vorzubeugen. Als neuer therapeutischer Baustein neben der Operation könnte eine spezifische anti-inflammatorische Therapie den JAK2/STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG 490 enthalten.



# Literaturverzeichnis

1. Münchner Universitätsgesellschaft, *Siegel der Ludwig-Maximilian-Universität*. unter: <http://www.unigesellschaft.de/> (abgerufen am: 21.09.2017 10:10).
2. Chevalier, R.L., et al., *Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy*. *Pediatr Nephrol*, 2010. 25(4): p. 687-697.
3. John, U., *Kongenitale uropathieassoziierte chronische Niereninsuffizienz*. *Nieren- und Hochdruckkrankh*, 2011. 40(7): p. 298-305.
4. Beetz, R. and R. Stein, *Therapiekonzepte bei konnatalen Uropathien*. *Monatsschr Kinderheilk*, 2010. 158(12): p. 1231-1240.
5. Peters, C.A., *Urinary tract obstruction in children*. *J Urol*, 1995. 154(5): p. 1874-83; discussion 1883-4.
6. Lange-Sperandio, B., *Pediatric Obstructive Uropathy*, in *Pediatric Nephrology*, D.E. Avner, et al., Hgg. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1749-1777.
7. Pohl, M., *Nephroprotektion bei konnatalen obstruktiven Uropathien*. *Monatsschr Kinderheilk*, 2010. 158(12): p. 1217-1223.
8. Lange-Sperandio, B. and H.G. Dietz, *Management von obstruktiven Harntransportstörungen*. *Kinder- und Jugendmedizin*, 2016. 16(5): p. 341-347.
9. John, U., *Prognose konnataler Uropathien*. *Monatsschr Kinderheilk*, 2010. 158(12): p. 1241-1247.
10. Bandin, F., et al., *Urinary proteome analysis at 5-year followup of patients with nonoperated ureteropelvic junction obstruction suggests ongoing kidney remodeling*. *J Urol*, 2012. 187(3): p. 1006-11.
11. Chevalier, R.L., *Prognostic factors and biomarkers of congenital obstructive nephropathy*. *Pediatr Nephrol*, 2016. 31(9): p. 1411-20.
12. Rasouly, H.M. and W. Lu, *Lower urinary tract development and disease*. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2013. 5(3): p. 307-42.
13. Song, R. and I.V. Yosypiv, *Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract*. *Pediatr Nephrol*, 2011. 26(3): p. 353-64.
14. Ingraham, S.E. and K.M. McHugh, *Current perspectives on congenital obstructive nephropathy*. *Pediatr Nephrol*, 2011. 26(9): p. 1453-61.
15. Alberti, C., *Congenital ureteropelvic junction obstruction: physiopathology, decoupling of tout court pelvic dilatation-obstruction semantic connection, biomarkers to predict renal damage evolution*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2012. 16(2): p. 213-9.
16. Simoes e Silva, A.C., et al., *Interactions between cytokines, congenital anomalies of kidney and urinary tract and chronic kidney disease*. *Clin Dev Immunol*, 2013. 2013: p. 597920.
17. Pohl, A. and B. Lange-Sperandio, *Angeborene obstruktive Harntransportstörungen der Nieren- und ableitenden Harnwege*. *pädiatrische praxis*, 2017. 87(2): p. 1-10.
18. Peters, C.A., *Congenital obstructive nephropathy: is the fog lifting?* *Kidney Int*, 2005. 67(1): p. 371-2.
19. Klein, J., et al., *Congenital ureteropelvic junction obstruction: human disease and animal models*. *Int J Exp Pathol*, 2011. 92(3): p. 168-92.
20. Chevalier, R.L., *Counterbalance in functional adaptation to ureteral obstruction during development*. *Pediatr Nephrol*, 1990. 4(4): p. 442-4.
21. Hiatt, M.J., et al., *Urinary tract obstruction in the mouse: the kinetics of distal nephron injury*. *Lab Invest*, 2013. 93(9): p. 1012-23.
22. Truong, L.D., L. Gaber, and G. Eknoyan, *Obstructive uropathy*. *Contrib Nephrol*, 2011. 169: p. 311-26.
23. Forbes, M.S., et al., *Chronic unilateral ureteral obstruction in the neonatal mouse delays maturation of both kidneys and leads to late formation of atubular glomeruli*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. 305(12): p. F1736-46.

24. Chevalier, R.L., et al., *Recovery from release of ureteral obstruction in the rat: relationship to nephrogenesis*. *Kidney Int*, 2002. 61(6): p. 2033-43.
25. Peters, C.A., *Obstruction of the fetal urinary tract*. *J Am Soc Nephrol*, 1997. 8(4): p. 653-63.
26. Chevalier, R.L., *Congenital urinary tract obstruction: the long view*. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2015. 22(4): p. 312-9.
27. Lange-Sperandio, B., et al., *Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice*. *Am J Pathol*, 2007. 171(3): p. 861-71.
28. Grande, M.T., F. Perez-Barriocanal, and J.M. Lopez-Novoa, *Role of inflammation in tubulo-interstitial damage associated to obstructive nephropathy*. *J Inflamm (Lond)*, 2010. 7: p. 19.
29. Ucero, A.C., et al., *Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction*. *Int Urol Nephrol*, 2014. 46(4): p. 765-76.
30. Dendooven, A., et al., *Oxidative stress in obstructive nephropathy*. *Int J Exp Pathol*, 2011. 92(3): p. 202-10.
31. Chevalier, R.L., *The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016. 311(1): p. F145-61.
32. GenCards Human Gene Databases, *Complete information for STAT3 gene*. unter: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STAT3> (abgerufen am: 21.8.2017 10:26).
33. Aggarwal, B.B., et al., *Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?* *Ann N Y Acad Sci*, 2009. 1171: p. 59-76.
34. Vogel, T.P., J.D. Milner, and M.A. Cooper, *The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease*. *J Clin Immunol*, 2015.
35. Pang, M., et al., *A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. *Kidney Int*, 2010. 78(3): p. 257-68.
36. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(11): p. 798-809.
37. Schindler, C., D.E. Levy, and T. Decker, *JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines*. *J Biol Chem*, 2007. 282(28): p. 20059-63.
38. Schindler, C. and C. Plumlee, *Interferons pen the JAK-STAT pathway*. *Semin Cell Dev Biol*, 2008. 19(4): p. 311-8.
39. Kamran, M.Z., P. Patil, and R.P. Gude, *Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances*. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 421821.
40. Jain, S., et al., *Auto-acetylation stabilizes p300 in cardiac myocytes during acute oxidative stress, promoting STAT3 accumulation and cell survival*. *Breast Cancer Res Treat*, 2012. 135(1): p. 103-14.
41. Chaabane, W., et al., *Renal functional decline and glomerulotubular injury are arrested but not restored by release of unilateral ureteral obstruction (UUO)*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. 304(4): p. F432-9.
42. Wen, Z., Z. Zhong, and J.E. Darnell, Jr., *Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation*. *Cell*, 1995. 82(2): p. 241-50.
43. Villarino, A.V., et al., *Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease*. *J Immunol*, 2015. 194(1): p. 21-7.
44. Harada, D., N. Takigawa, and K. Kiura, *The Role of STAT3 in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Cancers (Basel)*, 2014. 6(2): p. 708-22.
45. Fang, B., *Genetic Interactions of STAT3 and Anticancer Drug Development*. *Cancers (Basel)*, 2014. 6(1): p. 494-525.
46. O'Shea, J.J. and R. Plenge, *JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease*. *Immunity*, 2012. 36(4): p. 542-50.
47. Li, J., *JAK-STAT and bone metabolism*. *Jakstat*, 2013. 2(3): p. e23930.
48. Mogensen, T.H., *STAT3 and the Hyper-IgE syndrome: Clinical presentation, genetic origin, pathogenesis, novel findings and remaining uncertainties*. *Jakstat*, 2013. 2(2): p. e23435.
49. Milner, J.D., et al., *Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome*. *Nature*, 2008. 452(7188): p. 773-6.

50. Siveen, K.S., et al., *Targeting the STAT3 signaling pathway in cancer: role of synthetic and natural inhibitors*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. 1845(2): p. 136-54.
51. Talbot, J.J., et al., *Polycystin-1 regulates STAT activity by a dual mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. 108(19): p. 7985-90.
52. Kuratsune, M., et al., *Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction*. *Nephrology (Carlton)*, 2007. 12(6): p. 565-71.
53. Caceres-Cortes, J.R., *A potent anti-carcinoma and anti-acute myeloblastic leukemia agent, AG490*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2008. 8(7): p. 717-22.
54. Sigma Aldrich, *Tyrphostin AG 490 solid*. unter: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t3434?lang=de&region=DE> (abgerufen am: 21.8.2017 10:12).
55. Selleckchem, *AG-490*. unter: <http://www.selleckchem.com/products/AG-490.html?gclid=COzE1-vE67oCFdPltAodIgUAPw> (abgerufen am: 21.8.2017 10:24).
56. Fernandez-Sanchez, R., et al., *AG490 promotes HIF-1alpha accumulation by inhibiting its hydroxylation*. *Curr Med Chem*, 2012. 19(23): p. 4014-23.
57. Wang, J., et al., *Effect of Jak2 kinase inhibition on Stat1 and Stat3 activation and apoptosis of tubular epithelial cells induced by ATP depletion/recovery*. *J Nephrol*, 2008. 21(6): p. 919-23.
58. Gyurkovska, V., et al., *Tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 retards chronic joint inflammation in mice*. *Inflammation*, 2014. 37(4): p. 995-1005.
59. Park, J.S., et al., *JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation of regulatory T Cells and Th17 cells*. *J Immunol*, 2014. 192(9): p. 4417-24.
60. Gilbert, M., et al., *Pancreatic cancer-induced cachexia is Jak2-dependent in mice*. *J Cell Physiol*, 2014. 229(10): p. 1437-43.
61. Damm, J., et al., *The putative JAK-STAT inhibitor AG490 exacerbates LPS-fever, reduces sickness behavior, and alters the expression of pro- and anti-inflammatory genes in the rat brain*. *Neuropharmacology*, 2013. 71: p. 98-111.
62. Zhao, J., et al., *Suppression of JAK2/STAT3 signaling reduces end-to-end arterial anastomosis induced cell proliferation in common carotid arteries of rats*. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e58730.
63. Gyurkovska, V. and N. Ivanovska, *Tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 reduces liver injury in LPS-induced shock*. *Eur J Pharmacol*, 2015. 751: p. 118-26.
64. Tao, Z., et al., *JAK2/STAT3 pathway mediating inflammatory responses in heatstroke-induced rats*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015. 8(6): p. 6732-9.
65. Qian, C., et al., *Involvement of Nuclear JAK2 Signaling in AG490-Induced Apoptosis of Gastric Cancer Cells*. *The Anatomical Record*, 2013. 296(12): p. 1865-1873.
66. Sgrignani, J., et al., *Molecular Determinants for Unphosphorylated STAT3 Dimerization Determined by Integrative Modeling*. *Biochemistry*, 2015. 54(35): p. 5489-501.
67. Seo, I.A., et al., *Janus Kinase 2 Inhibitor AG490 Inhibits the STAT3 Signaling Pathway by Suppressing Protein Translation of gp130*. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2009. 13(2): p. 131-8.
68. Pallandre, J.R., et al., *Novel aminotetrazole derivatives as selective STAT3 non-peptide inhibitors*. *Eur J Med Chem*, 2015. 103: p. 163-174.
69. Goncalves, S., et al., *Tyrphostins as potential therapeutic agents for acute kidney injury*. *Curr Med Chem*, 2010. 17(10): p. 974-86.
70. Yang, N., et al., *Blockage of JAK/STAT signalling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat*. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. 23(1): p. 91-100.
71. Trautmann, A., *Die Bedeutung des Chemokinrezeptor-1 Angagonisten BX 471 im neonatalen Tiermodell der obstruktiven Uropathie*. Doktorarbeit 2008, Medizinische Fakultät Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
72. Cao, Q., Y. Wang, and D.C. Harris, *Pathogenic and protective role of macrophages in kidney disease*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. 305(1): p. F3-11.
73. Yoo, K.H., et al., *Inducible nitric oxide synthase modulates hydronephrosis following partial or complete unilateral ureteral obstruction in the neonatal mouse*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. 298(1): p. F62-71.

74. Zhang, L., et al., *Paclitaxel attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis by inhibiting STAT3 signaling*. Drug Des Devel Ther, 2015. 9: p. 2139-48.
75. Liu, C., et al., *Mefenidone attenuates tubulointerstitial fibrosis in a rat model of unilateral ureteral obstruction*. PLoS One, 2015. 10(6): p. e0129283.
76. Cao, Q., D.C. Harris, and Y. Wang, *Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis*. Physiology (Bethesda), 2015. 30(3): p. 183-94.
77. Nishida, M. and K. Hamaoka, *Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy*. Nephron Exp Nephrol, 2008. 110(1): p. e31-6.
78. Nikolic-Paterson, D.J., S. Wang, and H.Y. Lan, *Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. 4(1): p. 34-38.
79. Wang, Y. and D.C. Harris, *Macrophages in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2011. 22(1): p. 21-7.
80. Cheng, Q.L., et al., *Effects of ICAM-1 antisense oligonucleotide on the tubulointerstitium in mice with unilateral ureteral obstruction*. Kidney Int, 2000. 57(1): p. 183-90.
81. Bascands, J.L. and J.P. Schanstra, *Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals*. Kidney Int, 2005. 68(3): p. 925-37.
82. Lange-Sperandio, B., et al., *Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice*. Kidney Int, 2002. 61(2): p. 516-24.
83. Li, R., et al., *Inhibition of Jak/STAT signaling ameliorates mice experimental nephrotic syndrome*. Am J Nephrol, 2007. 27(6): p. 580-9.
84. Wang, S., et al., *Jak/STAT signaling is involved in the inflammatory infiltration of the kidneys in MRL/lpr mice*. Lupus, 2010. 19(10): p. 1171-80.
85. Lu, T.C., et al., *Knockdown of Stat3 activity in vivo prevents diabetic glomerulopathy*. Kidney Int, 2009. 76(1): p. 63-71.
86. Recio, C., et al., *Suppressor of Cytokine Signaling-1 Peptidomimetic Limits Progression of Diabetic Nephropathy*. J Am Soc Nephrol, 2017. 28(2): p. 575-585.
87. Higgins, D.F., et al., *Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition*. J Clin Invest, 2007. 117(12): p. 3810-20.
88. Burt, L.E., et al., *Renal vascular endothelial growth factor in neonatal obstructive nephropathy. II. Exogenous VEGF*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. 292(1): p. F168-74.
89. Mayer, G., *Capillary rarefaction, hypoxia, VEGF and angiogenesis in chronic renal disease*. Nephrol Dial Transplant, 2011. 26(4): p. 1132-7.
90. Dos Anjos Cassado, A., *F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen*. Results Probl Cell Differ, 2017. 62: p. 161-179.
91. Henderson, N.C., et al., *Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis*. Am J Pathol, 2008. 172(2): p. 288-98.
92. Neria, F., et al., *Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity*. Kidney Int, 2009. 75(2): p. 227-34.
93. Shappell, S.B., et al., *Chronic obstructive uropathy in severe combined immunodeficient (SCID) mice: lymphocyte infiltration is not required for progressive tubulointerstitial injury*. J Am Soc Nephrol, 1998. 9(6): p. 1008-17.
94. Chevalier, R.L., *Growth factors and apoptosis in neonatal ureteral obstruction*. J Am Soc Nephrol, 1996. 7(8): p. 1098-105.
95. Forbes, M.S., et al., *Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. 303(1): p. F120-9.
96. Truong, L.D., et al., *Cell apoptosis and proliferation in obstructive uropathy*. Semin Nephrol, 1998. 18(6): p. 641-51.
97. Cachat, F., et al., *Ureteral obstruction in neonatal mice elicits segment-specific tubular cell responses leading to nephron loss*. Kidney Int, 2003. 63(2): p. 564-75.
98. Eddy, A.A., *Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. 4(1): p. 2-8.
99. Li, L., et al., *Autophagy is a component of epithelial cell fate in obstructive uropathy*. Am J Pathol, 2010. 176(4): p. 1767-78.

100. Sureshbabu, A., S.A. Muhsin, and M.E. Choi, *TGF-beta signaling in the kidney: profibrotic and protective effects*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. 310(7): p. F596-f606.
101. Sancho-Martinez, S.M., J.M. Lopez-Novoa, and F.J. Lopez-Hernandez, *Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury*. Clin Kidney J, 2015. 8(5): p. 548-59.
102. You, L., et al., *The role of STAT3 in autophagy*. Autophagy, 2015. 11(5): p. 729-39.
103. Arany, I., et al., *STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells*. Kidney Int, 2006. 70(4): p. 669-74.
104. Chevalier, R.L., et al., *Responses of proximal tubular cells to injury in congenital renal disease: fight or flight*. Pediatr Nephrol, 2013.
105. Gurbuz, V., et al., *Effects of AG490 and S31-201 on regulation of the JAK/STAT3 signaling pathway in relation to angiogenesis in TRAIL-resistant prostate cancer cells*. Oncol Lett, 2014. 7(3): p. 755-763.
106. Kaissling, B., M. Lehir, and W. Kriz, *Renal epithelial injury and fibrosis*. Biochim Biophys Acta, 2013. 1832(7): p. 931-9.
107. Misaki, T., et al., *Decrease in tumor necrosis factor-alpha receptor-associated death domain results from ubiquitin-dependent degradation in obstructive renal injury in rats*. Am J Pathol, 2009. 175(1): p. 74-83.
108. Lopez-Hernandez, F.J. and J.M. Lopez-Novoa, *Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects*. Cell Tissue Res, 2012. 347(1): p. 141-54.
109. Shankland, S.J., J.W. Pippin, and J.S. Duffield, *Progenitor cells and podocyte regeneration*. Semin Nephrol, 2014. 34(4): p. 418-28.
110. Arakawa, T., et al., *Activation of signal transducer and activator of transcription 3 correlates with cell proliferation and renal injury in human glomerulonephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2008. 23(11): p. 3418-26.
111. Hirai, T., et al., *PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor suppresses mesangial cell proliferation involving STAT3 activation*. Clin Exp Immunol, 2006. 144(2): p. 353-61.
112. Matsui, F. and K.K. Meldrum, *The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease*. J Surg Res, 2012. 178(1): p. 339-45.
113. Grasl-Kraupp, B., et al., *In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note*. Hepatology, 1995. 21(5): p. 1465-8.
114. Louis, K. and A. Hertig, *How tubular epithelial cells dictate the rate of renal fibrogenesis?* World J Nephrol, 2015. 4(3): p. 367-73.
115. Engel, D.R., et al., *CX3CR1 reduces kidney fibrosis by inhibiting local proliferation of profibrotic macrophages*. J Immunol, 2015. 194(4): p. 1628-38.
116. Chevalier, R.L., et al., *Responses of proximal tubular cells to injury in congenital renal disease: fight or flight*. Pediatr Nephrol, 2014. 29(4): p. 537-41.
117. Chevalier, R.L. and M.S. Forbes, *Generation and evolution of atubular glomeruli in the progression of renal disorders*. J Am Soc Nephrol, 2008. 19(2): p. 197-206.
118. Forbes, M.S., B.A. Thornhill, and R.L. Chevalier, *Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. 301(1): p. F110-7.
119. Schelling, J.R., *Tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease progression*. Pediatr Nephrol, 2016. 31(5): p. 693-706.
120. Campanholle, G., et al., *Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. 304(7): p. C591-603.
121. Humphreys, B.D., et al., *Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Am J Pathol, 2010. 176(1): p. 85-97.
122. Wang, S., et al., *TGF-beta/Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis*. Oncotarget, 2016. 7(8): p. 8809-22.
123. Nakasatomi, M., L., et al., *Novel approach for the detection of tubular cell migration into the interstitium during Sorafenib ameliorates renal fibrosis in rats through inhibition of TGF-beta-*

- induced epithelial-mesenchymal transition*. Fibrogenesis Tissue Repair PLoS One, 2015. 810(2): p. 12e0117757.
124. Sun, Y.B., et al., *The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis*. Differentiation, 2016. 92(3): p. 102-107.
125. Lovisa, S., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis*. Nat Med, 2015. 21(9): p. 998-1009.
126. Bonventre, J.V., *Maladaptive proximal tubule repair: cell cycle arrest*. Nephron Clin Pract, 2014. 127(1-4): p. 61-4.
127. Grande, M.T., et al., *Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease*. Nat Med, 2015. 21(9): p. 989-97.
128. Wendt, M.K., et al., *STAT3 and epithelial-mesenchymal transitions in carcinomas*. Jakstat, 2014. 3(1): p. e28975.
129. Liu, R.Y., et al., *JAK/STAT3 signaling is required for TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells*. Int J Oncol, 2014. 44(5): p. 1643-51.
130. Zhang, C.H., et al., *STAT3 activation mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells*. Hepatogastroenterology, 2014. 61(132): p. 1082-9.
131. Duffield, J.S., *Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis*. J Clin Invest, 2014. 124(6): p. 2299-306.
132. Liu, Q., et al., *Therapeutic effects of suppressors of cytokine signaling in diabetic nephropathy*. J Histochem Cytochem, 2014. 62(2): p. 119-28.
133. Ni, J., et al., *Inhibition of STAT3 acetylation is associated with angiotensin renal fibrosis in the obstructed kidney*. Acta Pharmacol Sin, 2014. 35(8): p. 1045-54.
134. He, D., et al., *Preventive effects and mechanisms of rhein on renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. Biol Pharm Bull, 2011. 34(8): p. 1219-26.
135. Jia, L., et al., *Sorafenib ameliorates renal fibrosis through inhibition of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition*. PLoS One, 2015. 10(2): p. e0117757.
136. Berthier, C.C., et al., *Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy*. Diabetes, 2009. 58(2): p. 469-77.
137. Liu, L., et al., *CD4+ T Lymphocytes, especially Th2 cells, contribute to the progress of renal fibrosis*. Am J Nephrol, 2012. 36(4): p. 386-96.
138. Tang, J., et al., *Fluorofenidone protects against renal fibrosis by inhibiting STAT3 tyrosine phosphorylation*. Mol Cell Biochem, 2015. 407(1-2): p. 77-87.
139. Pedroza, M., et al., *STAT-3 contributes to pulmonary fibrosis through epithelial injury and fibroblast-myofibroblast differentiation*. FASEB J, 2015.
140. Wang, L., J. Li, and D. Li, *Losartan reduces myocardial interstitial fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats by inhibiting JAK/STAT signaling pathway*. Int J Clin Exp Pathol, 2015. 8(1): p. 466-73.
141. Luo, S., et al., *[Reversal of liver fibrosis through AG490 inhibitor-mediated inhibition of the TGFbeta1-STAT3 pathway]*. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2015. 23(12): p. 939-43.
142. Merrikhi, A. and E. Bahraminia, *Association of urinary transforming growth factor-beta1 with the ureteropelvic junction obstruction*. Adv Biomed Res, 2014. 3: p. 123.
143. Klein, J., et al., *Fetal urinary peptides to predict postnatal outcome of renal disease in fetuses with posterior urethral valves (PUV)*. Sci Transl Med, 2013. 5(198): p. 198ra106.
144. Taranta-Janusz, K., et al., *Urinary cytokine profiles in unilateral congenital hydronephrosis*. Pediatr Nephrol, 2012. 27(11): p. 2107-13.
145. Taranta-Janusz, K., et al., *Urinary angiotensinogen as a novel marker of obstructive nephropathy in children*. Acta Paediatr, 2013. 102(9): p. e429-33.
146. Lucarelli, G. and V. Mancini, *Emerging urinary markers of renal injury in obstructive nephropathy*. Biomed Res Int, 2014. 2014: p. 303298.
147. Wasilewska, A., et al., *KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2011. 26(4): p. 579-86.

148. Decramer, S., et al., *Predicting the clinical outcome of congenital unilateral ureteropelvic junction obstruction in newborn by urinary proteome analysis*. Nat Med, 2006. 12(4): p. 398-400.
149. Kuuliala, K., et al., *Constitutive STAT3 Phosphorylation in Circulating CD4+ T Lymphocytes Associates with Disease Activity and Treatment Response in Recent-Onset Rheumatoid Arthritis*. PLoS One, 2015. 10(9): p. e0137385.
150. Gonzalez, J., et al., *Dual effect of chemokine CCL7/MCP-3 in the development of renal tubulointerstitial fibrosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2013. 438(2): p. 257-63.

# Abkürzungsverzeichnis

AG 490	JAK/STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG 490
APRF	Acute Phase Rensponse Factor
Bcl	B-cell lymphoma protein
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large protein
Btk	Bruton´s tyrosin kinase
CCL	CC-Cemokin Ligand
CD3	Cluster Of Differentiation 3
Cdc	Cyclin-dependent kinase
c-Fos	Protoonkogen c-Fos
c-Jun	Protoonkogen c-Jun
c-Myc	Transkriptionsfaktor c-Myc
Cox	Cyclooxygenase
CXCL	CXC-Chemokine Ligand
d	Lebenstag
dist.	Distal
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matix
EGF	Epithelial Growth Factor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
Fas	Fas-Rezeptor
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAS	Interferon- $\gamma$ Activation Sites
G-CSF	Granulocyte Colnony Stimulating Factor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
glom.	glomerulär
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
Hsp	Hitzeschockprotein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
INF	Interferon
int.	interstitiell
IO	Intact Opposite, kontralaterale Niere
JAK	Tyrosinkinase Januskinase
kDa	Kilodalton
Ki-67	proliferationspezifisches Protein Ki-67
KIM	Kindey Injury Molecule
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LT	Lebenstag
Mcl	Myeloid leukemia cell differentiation protein
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
MMP	Matrixmetalloprotease
MMT	Makrophagen-Myofibroblasten-Transition
n	Gruppengröße
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B



---

NGAL	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin
NO	Stickstoffmonoxid
p	Signifikanzwert
P	Phosphat
p21	Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p21
PAS	Periodic-Acid-Schiff
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STAT
PKC	Proteinkinase C
pos.	positiv
prox.	proximal
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End products
s.c.	subkutan
S3I-S01	STAT3-Inhibitor S3I-S01
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SH2	Src-Homolog 2
Sham	scheinoperierte Kontrolltiere
SOCS	Suppressors Of Cytokine Signaling
STAT	Signal Transducer And Activator Of Transcription
Syk	Spleen tyrosine kinase
TGF	Transforming Growth Factor
Th17	Interleukin 17-bindende T-Helferzelle
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TK	Tyrosinkinase
TNF	Tumornekrosefaktor
tub.	tubulär
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling
Tyk	Tyrosinkinase
TβRII	TGF-β Rezeptor II
UO	Unilaterale Ureterobstruktion
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Zap	Zeta-Chain-Associated Protein Kinase
α-SMA	α-Smooth Muscle Actin

# Danksagung

Frau PD Dr. med. Bärbel Lange-Sperandio danke ich herzlichst für die Chance meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe schreiben zu dürfen und ihre sehr engagierte, kompetente und freundschaftliche Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit. Darüber hinaus sind ihre freundliche Unterstützung und ihre erfahrenen Ratschläge eine unschätzbare Hilfe auf meinem beruflichen Weg in die Pädiatrie.

Dem gesamten Nephrologischen Labor des Haunerschen Kinderspitals möchte ich für die Unterstützung danken. Besonders meine Projektpartnerin Frau Mojja Gasparitsch hat durch ihre kompetente Einarbeitung und die gemeinsame Betreuung der Versuchstiere wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ebenso möchte ich die umfassende Einarbeitung und die unermüdliche Hilfestellung bei jeglichen Fragen bezüglich der Immunhistochemie durch Frau Ursula Keller herausstellen.

Schließlich möchte ich meinen Eltern herzlichst für ihre fortwährende Unterstützung während meines Studiums danken. Besonderer Dank gebührt an dieser Stelle meinem Mann Markus Schieber, der mir unermüdlich den nötigen Rückhalt geboten hat und dessen Layoutkenntnisse die Gestaltung dieser Arbeit eindrucksvoll bereichert haben.

# Eidesstattliche Versicherung

**Schieber, Alexandra**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Die Bedeutung der STAT3-Blockade  
durch Tyrphostin AG 490 im neonatalen Tiermodell der  
obstruktiven Uropathie**

selbstständig 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, 14.06.2018

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin