

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Nekroinflammation als Pathomechanismus
für chronisch-auf-akutes Nierenversagen
nach ischämischer Tubulusnekrose**

Dissertation

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

vorgelegt von

Franziska Anna Kraft

aus Gießen

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: PD Dr. Bärbel Lange-Sperandio

Prof. Dr. Walter Hofmann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Dr. med. univ. Alexander Holderied

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 09.01.2020

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2014 bis Oktober 2016 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München durchgeführt (Leitung Prof. Dr. med. M. Reincke). Die Arbeit wurde betreut durch Herr Prof. Dr. med. Hans Joachim Anders und Herr Dr. med. Dr. univ. Alexander Holderied.

Förderung der Arbeit

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München unter Leitung von Herrn Univ. Prof. Dr. Thomas Gudermann gefördert.

Eine zusätzliche Unterstützung bestand durch die Munich International Nephrology and Internal Medicine Research School der LMU München.

Rechtliche Grundlage der Tierversuche

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffe an Versuchstieren wurde darauf geachtet, das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche sind durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt worden (Tierversuchsantragsnummer 55.2-1-54-2532-175.2014). Ein von der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) zertifizierter Kurs der Kategorie B wurde hierfür erfolgreich absolviert.

Aus dieser Arbeit gingen folgende Publikationen hervor:

Nakazawa D, Kumar SV, Marschner J, Desai J, Holderied A, Rath L, **Kraft F**, Lei Y, Fukasawa Y, Moeckel GW, Angelotti ML, Liapis H, Anders HJ.

Histones and Neutrophil Extrazellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI

J Am Soc Nephrol. 2017 Jun;28(6):1753-1768.

Weidenbusch M, Rodler S, Song S, Romoli S, Marschner JA, **Kraft F**, Holderied A, Kumar S, Mulay SR, Honarpisheh M, Kumar Devarapu S, Lech M, Anders HJ.

Gene expression profiling of the Notch-AhR-IL-22 axis at homeostasis and in response to tissue injury

Biosci Rep. 2017 Dec 22;37(6). pii: BSR20170099.

Honarpisheh M, Foresto-Neto O, Steiger S, **Kraft F**, Koehler P, von Rauchhaupt E, Potempa J, Adamowicz K, Koziel J, Lech M.

Aristolochic acid I determine the phenotype and activation of macrophages in acute and chronic kidney disease

Sci Rep. 2018 Aug 15;8(1):12169. doi: 10.1038/s41598-018-30628-x. PMID:30111809

Die Ergebnisse wurden präsentiert:

Vorträge:

Franziska Anna Kraft, „*Trying to stop the loop behind...*“, - Statusseminar des Graduiertenkollegs FöFoLe, Juni 2015, Herrsching

Poster:

Franziska Anna Kraft, Julian A. Marschner, Alexander Holderied, Hans-Joachim Anders, *The auto amplifying interaction between regulated necrosis and the inflammatory Microenvironment associates with long-term outcome after acute tubular necrosis*, 1. Platz Posterpreis der DoktaMed 2016, München

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Franziska Anna Kraft, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation zum Thema:

Nekroinflammation als Pathomechanismus für chronisch-auf-akutes Nierenversagen nach ischämischer Tubulusnekrose

selbstständig verfasst und mich außer der angebenen Hilfsmittel keiner weiteren bedient habe. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schriftum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der 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, 10.02.2020

Ort, Datum

Franziska Anna Kraft

Unterschrift

Gewidmet meinen Eltern

in großer Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das akute Nierenversagen	1
1.1.2. Klinischer Stellenwert und Epidemiologie des akuten Nierenversagens	3
1.1.3. Ätiologie des akuten Nierenversagens.....	5
1.1.4. Pathophysiologie und Verlauf der durch Ischämie ausgelösten akuten Tubulusnekrose	7
1.2. Das chronische Nierenversagen	11
1.2.1. Definition, Epidemiologie und Ätiologie des chronischen Nierenversagens.....	11
1.2.2. Das chronisch-auf-akute Nierenversagen.....	13
1.3. Nekroinflammation	14
1.3.1. Theorie der Nekroinflammation	14
1.3.2. Pathophysiologie der Nekroinflammation	16
1.4. Ziel des Projektes und Hypothese	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Geräte.....	22
2.1.2. Chemikalien.....	23
2.1.3. Tierhaltung und Tierexperimente.....	24
2.1.4. Histologie	25
2.1.5. Genexpressionsanalyse	26
2.1.6. Enzym-gekoppelter Adsorptionstest (ELISA)	30
2.1.7. Software	30
2.2. Methoden	31
2.2.1. Tierhaltung und tierexperimentelle Methoden.....	31
2.2.2. Genexpressionsanalyse	41
2.2.3. Gewebe- und Immunhistologie.....	46
2.2.4. Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	52
2.2.5. Statistische Auswertung	53
3. Ergebnisse	54
3.1. Einfluss der Ischämiezeit bei unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung	54
3.1.1. Einfluss der Ischämiezeit auf die fortgesetzte Nierenschädigung.....	54
3.1.2. Einfluss der Ischämiezeit auf die fortgesetzte Entzündungsantwort	56
3.1.3. Einfluss der Ischämiezeit auf den fortgesetzten Zelltod.....	58

3.1.4.	Einfluss der Ischämiezeit auf die Nierenatrophie und Fibroisierung.....	61
3.1.5.	Einfluss der Ischämiezeit auf Zellzyklus und Hypertrophie	64
3.2.	Charakterisierung der Dynamik und des Zeitverlaufes der Vorgänge nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung.....	66
3.2.1.	Übersicht: Zeitlicher Verlauf der Genexpressionslevel von Biomarkern nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung	66
3.2.2.	Verlauf und Dynamik der Tubulusschädigung	69
3.2.3.	Verlauf und Dynamik des Entzündungsgeschehens.....	69
3.2.4.	Verlauf und Dynamik des Zelltodes	73
3.2.5.	Verlauf und Dynamik der Nierenatrophie und Fibrose	73
3.2.6.	Verlauf und Dynamik von Zellzyklusmarkern	76
3.3.	Therapeutische Blockade von Entzündung und Zelltod nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung.....	77
3.3.1.	Zelltodblockade	77
3.3.2.	Entzündungsblockade	82
4.	Diskussion	86
4.1.	Nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung kommt es zu fortgesetztem Zelltod und Entzündung	87
4.2.	Einfluss der Ischämiezeit auf die Entwicklung eines chronisch-auf-akuten Nierenversagens.....	88
4.3.	Nekroinflammation als Pathomechanismus für ein chronisch-auf-akutes Nierenversagen	90
4.4.	Therapeutische Blockade der Nekroinflammation.....	92
4.5.	Limitationen der Studie.....	97
5.	Zusammenfassung.....	99
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	101
7.	Danksagung	104
8.	Literaturverzeichnis	105

1. Einleitung

1.1. Das akute Nierenversagen

1.1.1. Definition und Diagnostik des akuten Nierenversagens

Akutes Nierenversagen (ANV) – ein Syndrom, 25 Namen [1] und über 35 Definitionen [2]. Kaum eine andere Erkrankung entzog sich so lange einer einheitlichen Beschreibung – ein Umstand, der in Studien zu erheblichen Schwankungen führte und einem dringend benötigten erfolgreicherem Management für Prävention, Diagnostik und Forschung entgegenwirkte [3]. Erst im Jahr 2012 wurde durch die Initiative der Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) eine Leitlinie veröffentlicht, in der die bis dahin geltende Einteilung nach RIFLE (Akronym für Risiko, Schädigung, Versagen, Verlust, terminales Nierenversagen, engl. Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage-Kidney-Disease) und deren Erweiterung durch das Acute Kidney Injury Network (AKIN) zusammengefasst wurde [4]. Demnach handelt es sich beim ANV um eine akut einsetzende, rasche Abnahme der Nierenfunktion, die über Tage anhält, prinzipiell reversibel ist und als Leitsymptome einen Rückgang der Urinausscheidung und der glomerulären Filtrationsrate (GFR) sowie einen Anstieg des Serumkreatinins aufweist [5]. Es kommt zu einer Retention harnpflichtiger Substanzen und zu einer Störung des Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes. Die genauen Kriterien sind in Tabelle (Tab.) 1 zusammengefasst.

Vermehrt gibt es Studien zu neuen Biomarkern, die im Gegensatz zu Kreatinin und GFR eine frühere und genauere Diagnose des ANV mit Hinweisen auf die Ätiologie und damit auch eine gezieltere Therapie ermöglichen sollen [6, 7]. Diese lassen sich grundsätzlich in Biomarker für Nierenschädigung, für die Einschränkung der Nierenfunktion und für Regeneration unterteilen. In Abbildung (Abb.) 1 wird ein Überblick gegeben. Der klinische Stellenwert dieser ist derzeit noch mit Vorsicht zu betrachten. Gerade bei Patienten mit hoher Komorbidität zeigen sich Limitationen in der Aussagekraft [8-10] und ein signifikant additiver Nutzen im klinischen Entscheidungsprozess konnte in Studien bisher nicht belegt werden [11, 12].

Tab. 1: Vergleich der Stadieneinteilungen des akuten Nierenversagens nach RIFLE, AKIN und KDIGO durch von Anstieg des Serumkreatinins, der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Urinausscheidung. Daten nach [5].

Stadium	Anstieg Serumkreatinin (im Vergleich zum Ausgangswert)			Urinausscheidung (ml/kg KG/h)
	RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss, End-Stage) 2004	AKIN (Acute Kidney Injury Network) 2007	KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) 2012	RIFLE, AKIN, KDIGO
I Risk	x 1,5 oder GFR Abfall > 25 %	x 1,5 oder Anstieg um 0,3 mg/dl	x 1,5 oder Anstieg um > 0,3 mg/dl in 48 h	< 0,5 über 6 h
II Injury	x 2 oder GFR Abfall > 50%	x 2	x 2	< 0,5 über 12 h
III Failure	x 3 oder falls Ausgangswert > 4 mg/dl akuter Anstieg um > 0,5 mg/dl) oder GFR Abfall > 75 %	x 3 oder falls Ausgangswert > 4 mg/dl akuter Anstieg um > 0,5 mg/dl oder Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie	x 3 oder Kreatinin > 4,0 mg/dl oder Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie oder bei Patienten unter 18 Abfall GFR auf < 35 ml/min/1.73 m ²	< 0,3 über 24 h oder Anurie über 12 h
Loss	Persistierendes Nierenversagen > 4 Wochen	-	-	
End-Stage	Persistierendes Nierenversagen > 3 Monate	-	-	

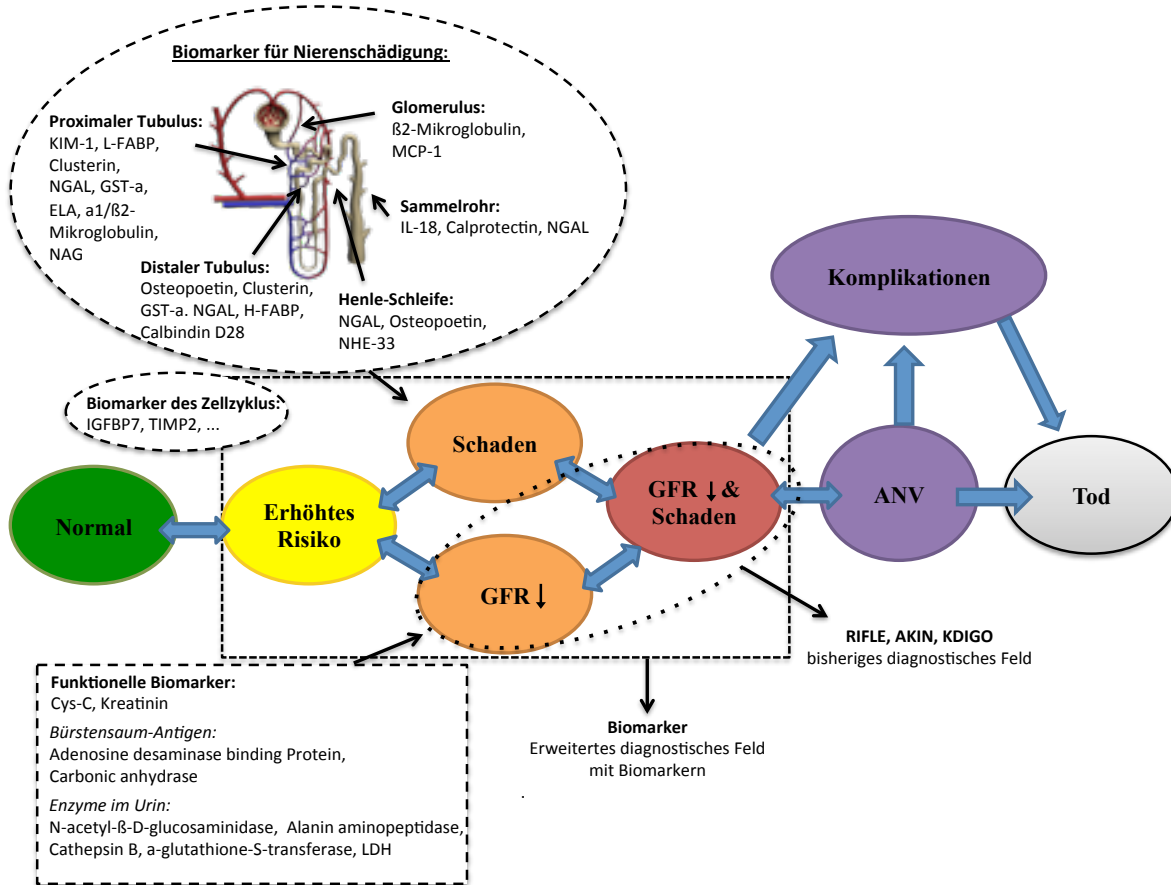


Abb. 1: Konzeptionelles Modell zum akuten Nierenversagen (ANV) und derzeitiger Biomarker.

Die aktuellen Diagnosekriterien eines ANV nach KDIGO greifen erst spät, wenn ein Nierenschaden bereits manifest und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) merkbar gesunken ist. Neue Biomarker haben ein breiteres diagnostisches Feld und sind differenzierter in ihrer Aussagekraft. Es wird grundsätzlich zwischen Biomarkern für Nierenschädigung, für den Zellzyklus und für die Nierenfunktion unterschieden. Eigene Grafik nach [6, 7, 13].

1.1.2. Klinischer Stellenwert und Epidemiologie des akuten Nierenversagens

Die Bedeutung des ANV in der Medizin ist im Wandel. Wurde es früher häufig als passagere Komplikation angesehen, ist heute bekannt, dass es als unabhängiger Risikofaktor für Mortalität fungiert und multiple Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben kann. Patienten sterben nicht mehr nur ‚mit‘ dem ANV, sondern ‚wegen‘ diesem [14-16].

Ein Blick auf die Zeitachse und die demografische Entwicklung zeigt dabei die wachsende Relevanz des Krankheitsbildes: Die alternde Bevölkerung, vermehrte Komorbidität und sensitivere Diagnostik lassen die Inzidenzzahlen seit Jahren steigen [17-19]. In entwickelten Ländern wird von einer Häufigkeit des ANV bei Krankenhauseinweisung zwischen 3,4 % und 9,6 % ausgegangen – mit einer Mortalität von bis zu 20 % [20]. In einer weltweiten

Studie unter Anwendung der KDIGO-Kriterien zeigte sich, dass 1 von 5 Erwachsenen (21,6 %) und 1 von 3 Kindern (33,7 %) während eines Krankenhausaufenthaltes ein ANV durchleben, verbunden mit einer gemittelten Mortalität von 23,9 % bei Erwachsenen und 13,8 % bei Kindern [21]. Dieselben Diagnosekriterien führen auf Intensivstationen zu Inzidenzraten eines ANV von über 50 % [22]. Patienten dort erhalten zu 4–5 % renale extrakorporale Ersatzverfahren, die dann mit einer Mortalitätsrate von 50-60 % verbunden sind. Von den Überlebenden bleiben 5–20 % dauerhaft dialysepflichtig [18, 23]. In Abb. 2 wird ein Überblick über die Inzidenz- und Mortalitätsrate des ANV weltweit gegeben.

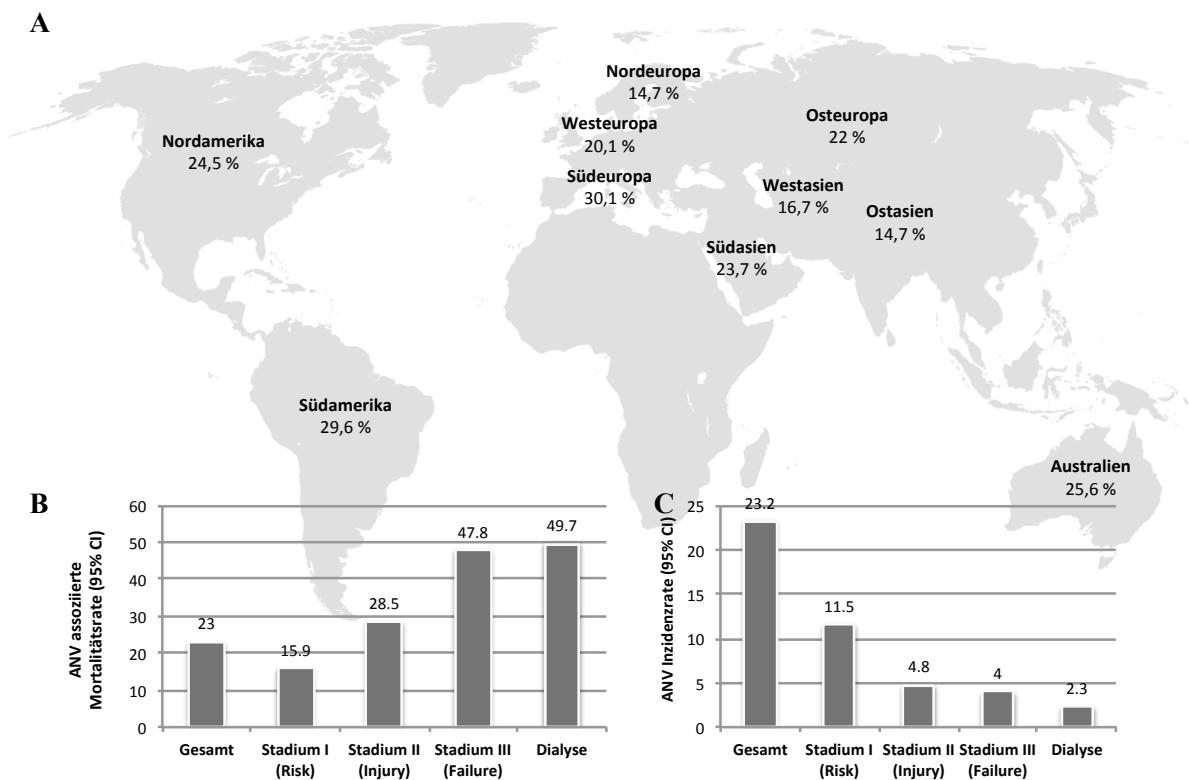


Abb. 2: Inzidenz und Mortalität des akuten Nierenversagens (ANV) weltweit 2013. Eigene Abb. mit Daten nach [21].

A: Inzidenzrate des ANV nach Kidney-Disease-Global-Outcome(KDIGO)-Definition in verschiedenen geografischen Zonen.

B: Gemittelte ANV-assozierte Mortalitätsrate nach Krankheitsstadium gemäß KDIGO-Definition.

C: Gemittelte Inzidenzrate des ANV nach Krankheitsstadium nach KDIGO-Definition.

Angesichts dessen ist es nicht verwunderlich, dass das ANV auch ökonomisch von erheblicher Bedeutung für das Gesundheitssystem ist [24, 25]. In einer im Jahr 2005 erschienenen Studie von Chertow et al. zeigte sich, dass selbst moderate Formen mit einem Anstieg des Serumkreatinins von $> 0,5$ mg/dl den Krankenhausaufenthalt schon um 3,5 Tage verlängerten und Mehrkosten von 4800 \$ pro Patient verursachten. Bei einem Anstieg von > 2 mg/dl ergab sich eine Summe von 24.000 \$. Würden die ermittelten Daten dieser Untersuchung auf die gesamten USA hochgerechnet und würde man von 20 % weniger als den ermittelten mittleren Kosten ausgehen, entspräche dies Kosten von 10 Billionen \$ jährlich bei einer Inzidenz von 5 % [26]. Kerr et al. berichten in England von 1,02 Billionen \$ Mehrkosten für ANV-assoziierte Behandlungen, was mehr als 1 % des National-Health-System-Budgets entspricht, ohne die Kosten für die Nachsorge zu berücksichtigen [24].

1.1.3. Ätiologie des akuten Nierenversagens

Die Ursachen des ANV lassen sich grundsätzlich in drei Kategorien einteilen: prärenal, intrarenal und postrenal. Die Übergänge zwischen diesen sind nicht immer klar getrennt und auch Kombinationen kommen vor [27].

Das prärenale ANV stellt mit etwa 60 % die häufigste Form dar [5]. Ursache ist meist eine Hypoperfusion, die etwa bei Hypovolämie, einem Abfall des Herzzeitvolumens durch Schock oder einer systemischen Vasodilatation bei Sepsis oder Zytokin-vermittelter renaler Vasokonstriktion entsteht. Auch können Medikamente, wie Angiotensinkonversionsenzym-(ACE)-Hemmer, Angiotensin-II-Blocker oder Diuretika dafür verantwortlich sein [5, 28, 29]. Am zweithäufigsten ist das ANV intrarenal bedingt mit etwa 35% [5]. Je nachdem, welcher histologische Teil der Niere von einer Schädigung betroffen ist, werden weitere Unterformen unterschieden [27]. Am häufigsten mit etwa 85 % ist hier die akute Tubulusnekrose (ATN). Die Ursachen der ATN lassen sich grundsätzlich in ischämische und toxische Faktoren differenzieren und zeigen weltweit eine große Variabilität. Das postrenale ANV bildet mit 5 % die seltenste Ursache und entsteht etwa durch eine Abflussstörung der ableitenden Harnwege bei angeborenen Fehlbildungen, durch Prostatahyperplasie, durch Steine im Harnabflussstrakt oder durch Tumore [30]. In Abb. 3 wird ein Überblick über Ursachen und Folgen des ANV gegeben.

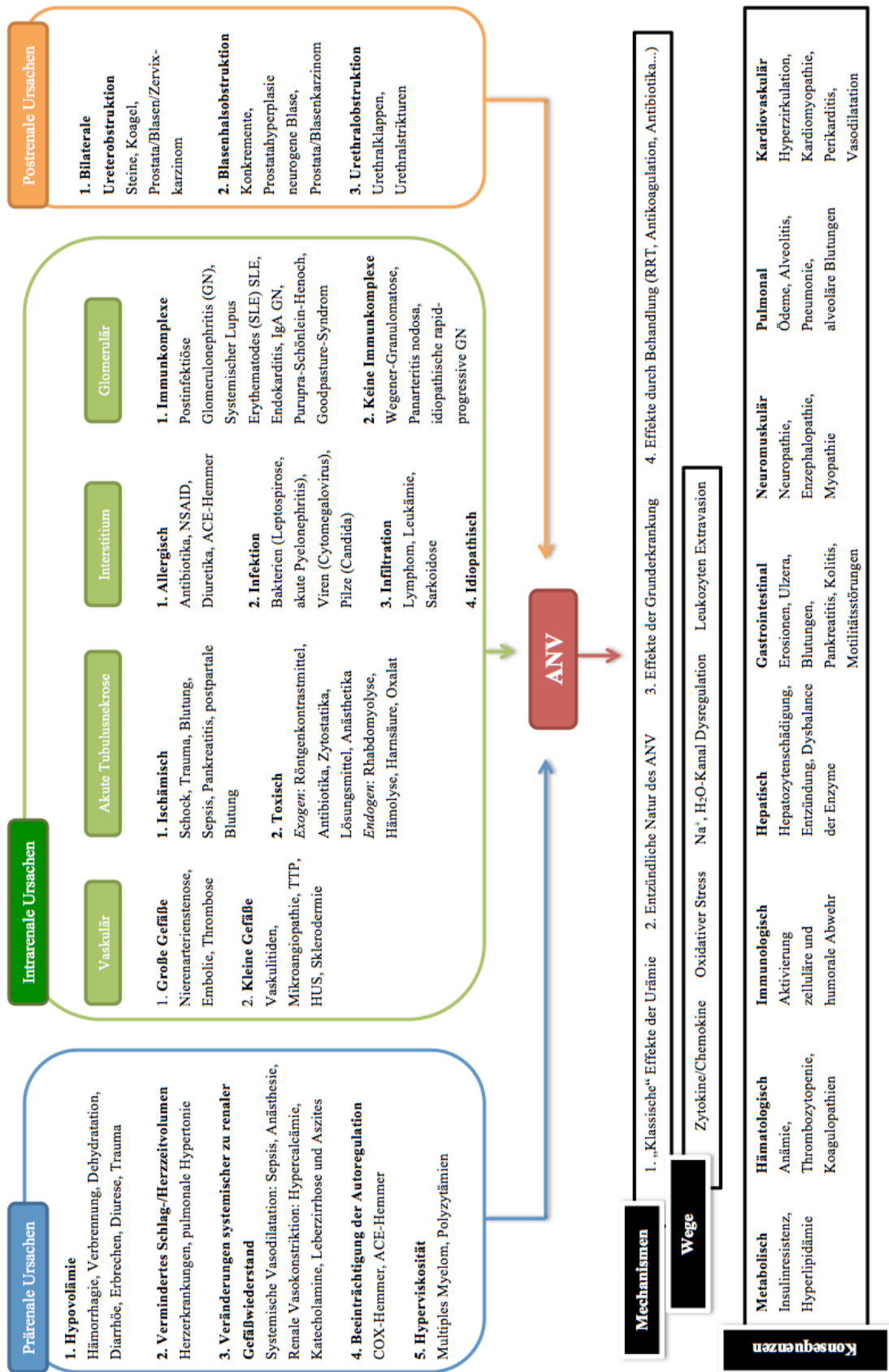


Abb. 3: Einteilung der Ursachen des akuten Nierenversagens (ANV) mit Beispielen und Folgen für den Organismus nach Unterkategorien. Eigene Abb. nach [5, 27, 31]

1.1.4. Pathophysiologie und Verlauf der durch Ischämie ausgelösten akuten Tubulusnekrose

In diesem Abschnitt soll nun näher auf die durch Ischämie ausgelöste ATN eingegangen werden, da diese die Basis für das Verständnis des in dieser Arbeit verwendeten tierexperimentellen Modells der unilateralen Ischämie-Reperfusionverletzung (uIRI) bildet. Das Grundprinzip dahinter geht bereits aus dem Namen hervor: Nach einer vorübergehenden kritisch verminderten oder aufgehobenen Durchblutung kommt es zur Wiederherstellung der Perfusion und zur Reoxygenierung [32]. Im Organismus führt dies zu einem komplexen, dynamischen Prozess, der vaskuläre, tubuläre und entzündliche Komponenten beinhaltet [33].

Verlauf und Phasen der ischämischen Tubulusnekrose

Bei der ischämischen ATN lassen sich konzeptionell vier Phasen unterscheiden: Initiations-, Extensions-, Erhaltungs- und Regenerationsphase [34] (siehe Abb. 4). Klinisch sind diese oft nicht eindeutig voneinander zu trennen. Als theoretisches Modell helfen sie jedoch dabei, den Verlauf und die Pathophysiologie der ATN näher zu verstehen.

Die Initialphase dauert wenige Stunden bis maximal einen Tag. Durch renale Ischämie kommt es zu zellulären Schäden und Dysfunktionen. Die GFR, der Filtrationsdruck und die renale Perfusion nehmen ab. Hauptangriffspunkt der Hypoxie durch Hypoperfusion sind die epithelialen Zellen im S3-Segment der proximalen Tubuli und im Bereich der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife [35]. An die Initialphase schließt sich die Extensionsphase an, in der die Hypoxie fortbesteht und die Entzündungsantwort einsetzt. Beide Ereignisse betreffen vor allem die äußere Markregion der Niere, in der die Zellen nun zunehmend dem Zelltod zugeführt werden [36]. Durch den entstehenden Zellschaden fällt die GFR indes weiter. Bei den proximalen Tubuluszellen im äußeren Kortex erreicht die Durchblutung bereits wieder annähernd normale Level, hier beginnen schon erste Reparaturprozesse [37]. In der anschließenden Erhaltungsphase stabilisiert sich die GFR, die Diurese befindet sich an ihrem Tiefpunkt. Abhängig von der Schwere der Ischämie, den Komorbiditäten und den klinischen Rahmenbedingungen dauert es etwa 7–21 Tage, bis die Phase der Erholung eintritt [38]. Es kommt zur Regeneration und im besten Fall zur vollständigen Normalisierung der GFR. Dieses Modell wurde um das chronische und terminale Nierenversagen als Langzeitprognose erweitert.

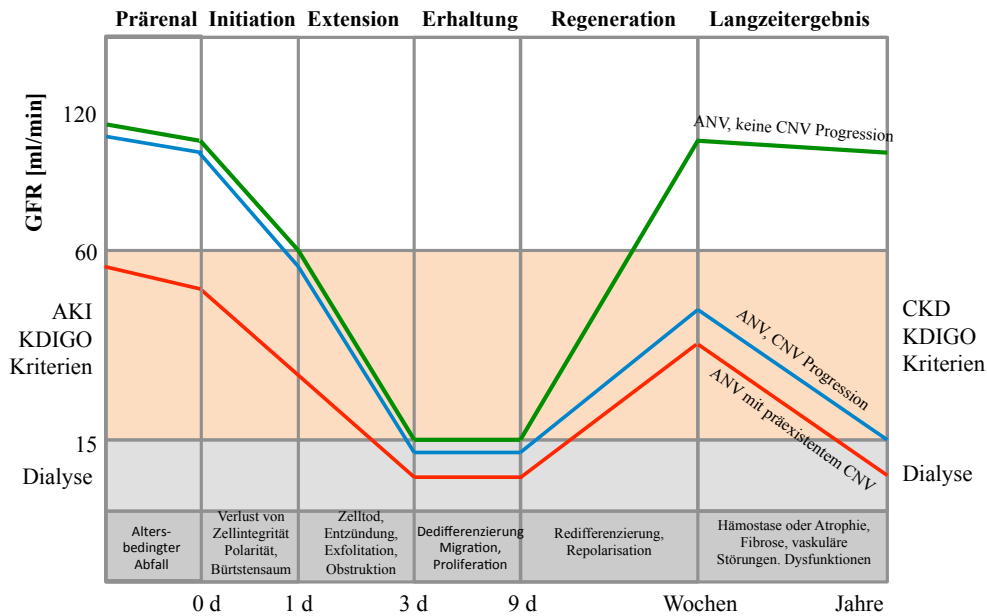


Abb. 4: Verlauf und Phasen der akuten Tubulusnekrose über die Zeitachse.

Dargestellt ist der Verlauf der akuten Tubulusnekrose über die Zeitachse. Es ergibt sich eine Unterteilung in die Initiations-, die Extensions-, die Erhaltungs- und die Regenerationsphase. Abhängig von der Ausgangsfunktion der Niere – hier repräsentiert durch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) – ergeben sich nach einem Akuten Nierenversagen (ANV) unterschiedliche Langzeitprognosen. Es kann eine vollständige Regression (grüne Linie), ein chronisches Nierenversagen (CNV) (blaue Linie) oder eine Dialysepflichtigkeit (rote Linie) entstehen. Abb. angelehnt an [37] und [39].

Pathophysiologie der ischämischen Tubulusnekrose

Die Niere erhält etwa 20 % des Herzzeitvolumens, um ihre Regulations- und Ausscheidungsfunktion ausüben zu können. Allein 80 % hiervon werden von den proximalen Tubuli benötigt [40]. Bei der Beschreibung der Pathophysiologie stehen daher die proximalen Tubulusepithelzellen im S3-Segment in der äußeren Markregion im Fokus [35]. Dabei sind sie nicht nur von den Schädigungsprozessen betroffen, sondern gestalten diese auch aktiv mit. Die Beschreibung dieses komplexen Vorganges wird in der Einleitung bewusst unkompliziert gehalten und soll lediglich die Grundlage zum Verständnis der Arbeit liefern.

Jeder Glomerulus der Niere verfügt über ein zuführendes (Vas afferens) und ein wegführendes Gefäß (Vas efferens). Über diese wird durch Vasokonstriktion bzw. Vasodilatation über verschiedene Faktoren und das Renin-Angiotensin-System (RAAS) der Blutdruck reguliert [40]. Dieser Autoregulationsmechanismus versagt jedoch, wenn der

Perfusionsdruck unter die Grenze von 80 mmHg mittlerer arterieller Druck (MAD) fällt [41]. Es kommt zu einer Störung in der Balance vasoaktiver Substanzen und Faktoren, zu Endothelschäden [42], Ödembildung, Aktivierung von Gerinnungskaskaden, Mikrotromben und Zytokinfreisetzung. Dies führt zur Progression der insuffizienten Durchblutungssituation und Schädigung [43]. Die akute Hypoxie resultiert in einem Verlust der Zellpolarität und des Zellverbandes [44]. Verschiedene biochemische Prozesse werden in Gang gesetzt, die zu einem Mangel des universellen Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) führen. Der normale Zellstoffwechsel ist nicht mehr möglich. Die Zellen sterben durch verschiedene Formen des Zelltodes, wie Nekrose, Apoptose oder Autophagie [45, 46]. Bei der Apoptose kommt es zur Bewahrung der Membranintegrität. Die Zelle schrumpft und Zellreste werden durch Phagozyten entsorgt [47, 48]. Die Nekrose von Zellen (siehe Abschnitt 1.3) führt zur Ruptur der inneren und äußeren Membran und zur Freisetzung von sogenannten ‚schädigungsassoziierten molekularen Mustern‘ (Danger-associated Molecular Patterns, DAMPs) in den Extrazellularraum, die dann lokale und periphere Leukozyten aktivieren [49]. Erkannt werden diese Alarmmoleküle durch sogenannte ‚Pathogene-Mustererkennungsrezeptoren‘ (Pathogen-Recognition Receptor, PRR) an der Zelloberfläche von renalen Parenchymzellen und Leukozyten. In der Folge werden Zytokine und Chemokine frei, die zur Aktivierung und Verstärkung der adaptiven Immunantwort führen [50]. In Abb. 5 ist der Prozess schematisch dargestellt. Im Abschnitt ‚Nekroinflammation‘ wird näher auf diese Wechselwirkungen eingegangen.

Regeneration und Reparatur

Nach der ischämisch bedingten Schädigung der Niere und einhergehender Immunantwort kommt es zur Initiierung eines Erholungsprozesses. Dieser umfasst endogene Entzündungsinhibitoren, die Hochregulation von Reparaturgenen, das Aktivwerden von Zellen des Immunsystems, die Entsorgung von Zellbestandteilen und tubuläre Regenerationsmechanismen über renale Stammzellen [38]. Es ist Gegenstand aktueller Diskussionen, woher die Zellen für die Reparaturvorgänge im Tubulusepithel stammen und welchen Anteil strukturelle und kompensatorische, sowie vorwiegend funktionelle Mechanismen bei der Restitution der GFR haben. Eine bedeutende Rolle hierbei sollen spezielle Cluster-of-Differentiation(CD)-24/CD133-positive Zellen, sog. ‚renale Progenitorzellen‘ innehaben, die als Zelllinien-festgelegte Stammzellen noch ausdifferenzieren und Verluste ausgleichen können [51]. Je nach Lokalisation können diese so

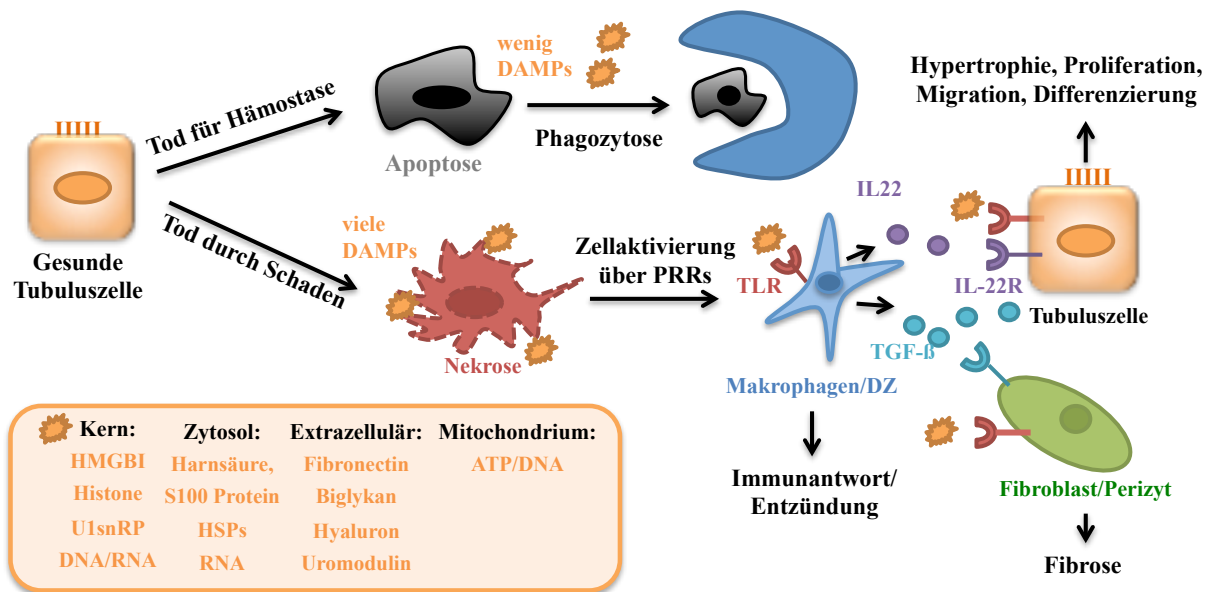


Abb. 5: Freisetzung und Wirkung von schädigungsassoziierten molekularen Mustern (DAMPs).

Begehen die Zellen Apoptose, eine programmierte Form des Zelltodes, bleiben die Membranen intakt und es werden nur wenige schädigungsassoziierte Muster (DAMPs) freigesetzt. Durch schädigende Einflüsse, wie Hypoxie oder Toxine, kommt zur Nekrose, die ein Zerreißen der Zellmembranen zur Folge hat. Die dabei frei werdenden DAMPs können aus unterschiedlichen Kompartimenten oder auch aus dem Extrazellularraum stammen. Über Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), wie Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR) auf Makrophagen, dendritischen Zellen (DZ), epithelialen Tubuluszellen und Fibroblasten werden diese erkannt und haben multiple Auswirkungen auf die Immunantwort, Entzündungsprozesse, Fibrose und Regeneration. Eigene Abb. angelehnt an [52].

z. B. an der Bowman'schen Kapsel Podozyten oder am Beginn des proximalen Tubulusepithels Tubuluszellen bilden [51, 53]. Diesen Ergebnissen kritisch gegenüber stehen Studien anderer Forschergruppen, die konträr hierzu vorwiegend experimentelle Studien am Mausmodell durchführten. So sehen Humphreys et al. weder die Proliferation von Progenitorzellen an der Bowman'schen Kapsel noch deren Migration als Voraussetzung für eine fokussierte Regeneration. Gemäß ihrer Studien wird die tubuläre Wunde hauptsächlich durch bereits dedifferenzierte, überlebende Tubuluszellen verschlossen [54].

Prinzipiell wäre den Theorien folgend also eine vollständige Regeneration möglich; in der Praxis ist dies jedoch nur selten der Fall. Unvollständige Reparaturen des Tubulusapparates, persistierende Entzündungsreaktionen, Fibrose und exzessive Umstrukturierungen der extrazellulären Matrix führen dazu, dass ein ANV in ein chronisches oder terminales

Nierenversagen übergehen kann [55] (siehe Abschnitt 1.2.2.). Als Ursachen hierfür werden u. a. die Entstehung einer chronischen Hypoxie durch den Verlust peritubulärer Gefäße [42], der Prozess der Nekroinflammation [56], oxidativer Stress und eine Störung in der Regulation des Immunsystems mit chronischer Aktivierung der Makrophagen [57, 58] diskutiert. Unklar ist, warum es zur Fibrose kommt. Lange dachte man, die sogenannte ‚epitheliale-mesenchymale Transition‘ (EMT) sei der alleinige Mechanismus hierfür [59]; in aktuellen Studien wird der Ursprung der Myofibroblasten eher in Perizyten und perivaskulären Fibroblasten gesehen [60-62]. Das Verständnis der Entstehung des tubulären Schadens und seiner Reparatur stellt einen grundlegenden Schritt für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien gegen die Entwicklung des chronisch-auf-akuten Nierenversagens dar. Die aktuelle Kontroverse bezüglich dieses Themas zeigt, dass hier noch eine große und vielversprechende Herausforderung für die Zukunft liegt [63].

1.2. Das chronische Nierenversagen

1.2.1. Definition, Epidemiologie und Ätiologie des chronischen Nierenversagens

Das chronische Nierenversagen (CNV) bezeichnet eine irreversible Abnahme der exkretorischen (glomerulär, tubulär) und inkretorischen (endokrinen) Nierenfunktion. Durch die KDIGO wurde im Jahr 2012 eine neue Ursache-GFR-Albuminurie(CGA)-Klassifikation erarbeitet, die Einzug in den klinischen Alltag gehalten hat. Chronische Nierenerkrankungen werden anhand der Ursache (C = Cause), GFR (G1–G5), und Albuminurie (A1–A3) klassifiziert [64]. In Tab. 2 ist diese Stadieneinteilung anhand des prozentualen Anteils der jeweiligen Stadien des CNV bei der erwachsenen Bevölkerung in den USA von 1999–2006 zur Veranschaulichung der Verteilung der Stadien dargestellt.

Die chronische Niereninsuffizienz stellt eine der größten Herausforderungen der Nephrologie in der Zukunft dar, wie ein Blick auf die Epidemiologie und Mortalität beweist. Die weltweite Prävalenz wird derzeit auf etwa 8–16 % geschätzt [65]. Das Lebenszeitrisiko, mit 40 Jahren ein CNV zu erreichen, liegt bei 1:50 (2 %) [66]. Mit über 35 % ist die diabetische Nephropathie die häufigste Ursache, gefolgt von primären und sekundären Glomerulonephritiden (15 %), polyzystischen Nierenerkrankungen (10 %), chronisch tubulointerstitiellen Erkrankungen und vaskulären Nephropathien [5].

Tab. 2: Stadieneinteilung des chronischen Nierenversagens anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und Albuminausscheidung. Gezeigt ist der prozentuale Anteil der erwachsenen Bevölkerung in den USA von 1999–2006.

Stadien des chronischen Nierenversagens nach KDIGO (2012)			Stadien der Albuminausscheidung			
			A1	A2	A3	Gesamt
			< 30 mg/g Kreatinin	30–299 mg/g Kreatinin	> 300 mg/g Kreatinin	
			< 3 mg/mmol	3 - 30 mg/mmol	> 30 mg/mmol	
Stadien der GFR (ml/min/1,73 m ²)	G1	> 90	54 %	3,6 %	0,4 %	58 %
	G2	60–89	32,3 %	2,9 %	0,3 %	35,5 %
	G3a	45–59	3,6 %	0,8 %	0,2 %	4,6 %
	G3b	30–44	1 %	0,4 %	0,2 %	1,6 %
	G4	15–29	0,2 %	0,1 %	0,1 %	0,4 %
	G5	< 15	0,0 %	0,0 %	0,1 %	0,1 %
	Gesamt		91 %	7,8 %	1,3 %	100 %

Dargestellt ist die Stadieneinteilung des chronischen Nierenversagens anhand von GFR und Albuminausscheidung nach Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO). Die Farben stehen für das Risiko, ein Nierenversagen zu bekommen. Grün: geringes Risiko; Gelb: leicht erhöhtes Risiko; Orangefarben: hohes Risiko; Rot: sehr hohes Risiko. Tab. modifiziert nach [5]. Die Zahlen stehen für den Prozentteil der erwachsenen Bevölkerung mit diesem Schweregrad in den USA in den Jahren 1999–2006 aus dem National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999–2006) [67].

Unabhängig von der Grunderkrankung führt ein CNV über Jahre hinweg progredient zu einer terminalen Niereninsuffizienz. Versagen konservative Therapiemaßnahmen, wird eine renale Nierenersatztherapie, wie die Hämodialyse oder eine Nierentransplantation, angewandt. Jedes Jahr beginnen um die 440 000 Patienten weltweit eine solche Nierenersatztherapie [64]. Die Mortalitätsrate dieser Patienten ist hoch, sie betrug 2003 in Europa 15,6 %, in den USA sogar 21,7 % [68]. Im Rahmen der Global-Burden-of-Disease-Studie wurde das CNV als eine der drei Todesursachen, die von 1990 bis 2010 den größten Anstieg zu verzeichnen hatten, direkt nach HIV und Diabetes mellitus, identifiziert [69].

1.2.2. Das chronisch-auf-akute Nierenversagen

Über viele Jahrzehnte wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem ANV um einen selbstlimitierenden Prozess handelt, bei dem es zu einer nahezu vollständigen Wiederherstellung der Nierenfunktion kommt [70]. Das fehlende Bewusstsein für einen irreversiblen Nephronenverlust und die klinische Fixierung auf das Serumkreatinin als Verlaufsparemeter und Grundlage der Definition und Diagnostik suggerierten den Ärzten eine positive Prognose. Heute ist bekannt, dass eine Normalisierung des Kreatinins Nephronenverluste von bis zu 50 % maskieren kann [71]. Verantwortlich hierfür sind kompensatorische Regenerations- und Hypertrophieprozesse der verbliebenen Nephrone. So wird ein substanzialer Nephronenverlust im Rahmen einer ANV-Episode nach aktuellen KDIGO-Kriterien oft erst im langfristigen Verlauf sichtbar, wenn der altersbedingte natürliche Nephronenverlust hinzukommt, die Kompensationsmechanismen nicht mehr ausreichen und die Patienten früher die Kriterien eines CNV erfüllen [72-76]. So konnte gezeigt werden, dass Patienten nach einem ANV ein dreifach höheres Risiko für die Entwicklung eines dialysepflichtigen CNV haben [77]. Dies zeigt, dass das eigentliche Ausmaß der Nierenschädigung unterschätzt wird, solange das ANV nur durch Funktionsmarker wie Serumkreatinin definiert wird.

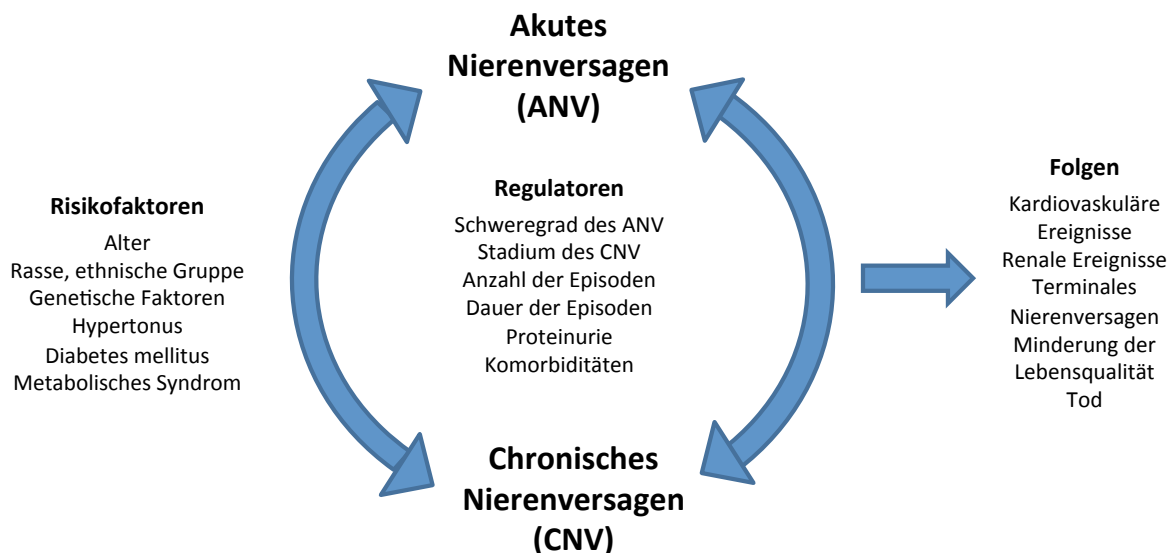


Abb. 6: Akutes und chronisches Nierenversagen als miteinander verbundene Syndrome.

Akutes und chronisches Nierenversagen sind bidirektional miteinander verbundene Syndrome, die sich allgemeine Risikofaktoren und Regulatoren teilen und zu ähnlichen Komplikationen führen. Eigene Abb. nach [72].

Der genaue pathomechanistische Zusammenhang zwischen ANV und CNV ist Gegenstand aktueller Forschungen. Irreversibler Nephronenverlust, kompensatorische Hypertrophie, Fibrosierung und Atrophie, Zellzyklusarrest und Nekroinflammation spielen hier eine wesentliche Rolle. Auf Letzterer baut diese Arbeit auf, weshalb im Folgenden speziell hierauf eingegangen wird.

1.3. Nekroinflammation

1.3.1. Theorie der Nekroinflammation

Die Nekroinflammation liefert einen Erklärungsansatz für einen fortgesetzten Nierenschaden und die sterile Entzündungsreaktion nach akuter ischämischer Tubulusnekrose; sie ist Gegenstand dieser Arbeit und der Hypothese.

Dahinter verbirgt sich ein Kreislauf, in dem sich Nekrose (definiert als Zelltod, bei dem es zum Zerreißen der Plasmamembran kommt) und Entzündung (definiert durch Zytokinfreisetzung, erhöhte vaskuläre Permeabilität und Rekrutierung von Immunzellen) gegenseitig fördern. Dieser Prozess läuft nach einem initialen Impuls noch lange weiter, ohne erneute äußere Einwirkung, und kann in einem Multiorganversagen münden [56]. In Abb. 7 wird dies schematisch verdeutlicht. Dieser Mechanismus wirkt paradox und lässt die Frage nach evolutionärer Sinnhaftigkeit aufkommen. Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es, auf das Eindringen von Pathogen schnell zu reagieren und diese zu bekämpfen. Hierfür überprüfen Neutrophile und Monozyten über ihre Rezeptoren die Umgebung nach Stoffen, die mit pathogenen Eindringlingen assoziiert sind, sogenannte ‚Pathogen-assoziierte molekulare Muster‘ (PAMPs) [78]. Ein solches Eindringen ist häufig mit dem Durchbrechen einer Barriere und sterbenden Zellen verbunden, z. B. bei offenen Wunden oder Ulzerationen. Die entstehende Entzündungsantwort sorgt für eine funktionale Barriere, um ein weiteres Eindringen von Pathogenen zu verhindern, bis die Reepithelialisierung einsetzt [79]. Sie attackiert auch eigene Zellen, um intrazelluläre Erreger zu eliminieren, falls dies nötig ist [80]. Die Immunantwort ist somit zweischneidig und die Hauptaufgabe des angeborenen Immunsystems ist es nicht, zwischen fremd und eigen zu unterscheiden, sondern zwischen gefährlich und ungefährlich [81]. Auf der einen Seite verteidigt sie den Organismus, auf der anderen Seite werden ‚Kollateralschäden‘ in Kauf genommen [80]. Auch eine sterile Entzündungsantwort aktiviert das angeborene Immunsystem über DAMPs, die von denselben

PRRs erkannt werden. Nekroinflammation ist somit als lebensschützender evolutionärer Prozess zu sehen, der bei sterilen Entzündungen unnötigerweise zusätzlichen Schaden verursacht [56].

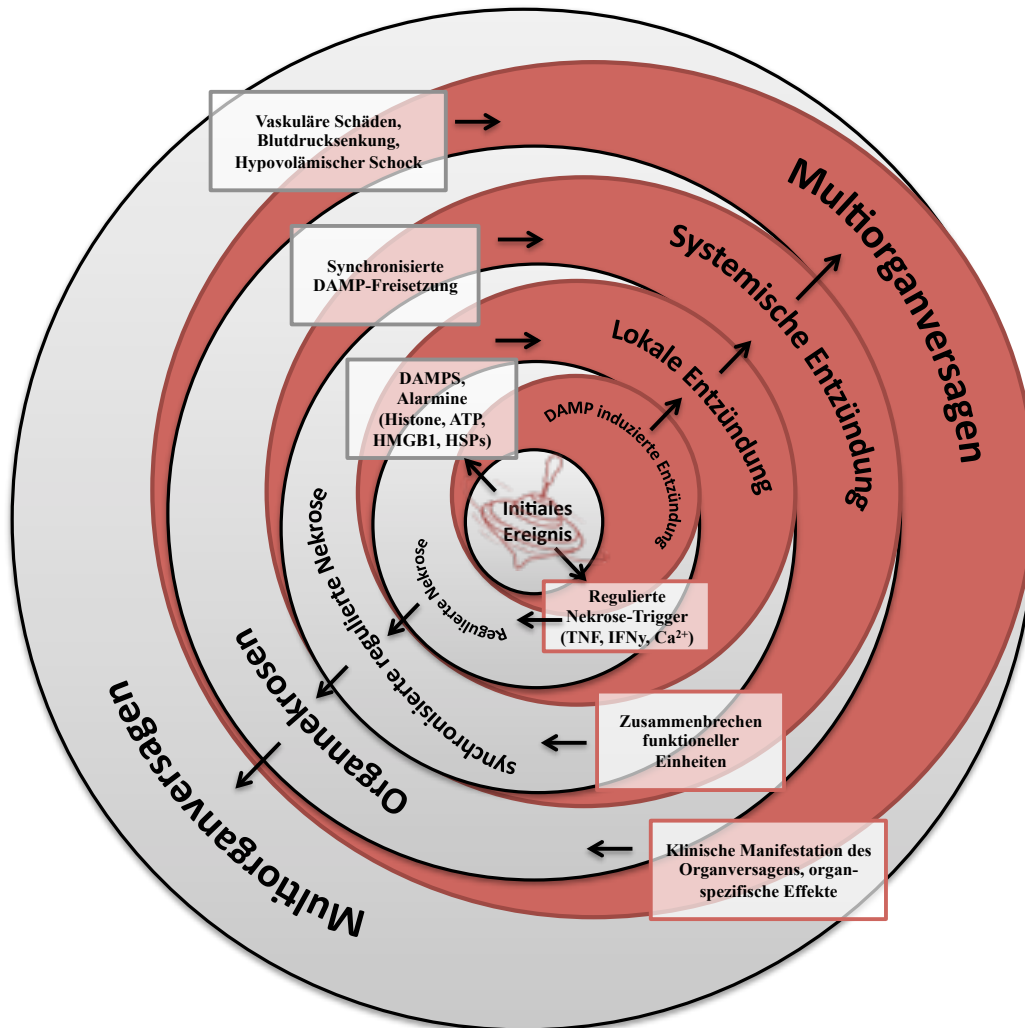


Abb. 7: Entzündung und Nekrose bedingen und fördern sich gegenseitig in einem die Organ Grenzen überschreitenden ‚Teufelskreis‘.

Ein initiales Ereignis führt zur Initiation des Nekroinflammationskreislaufs. Durch regulierte Nekrose von Zellen werden schadigungsassoziierte Muster (DAMPs) und Alarmine frei, die von Pathogen-Recognition-Rezeptoren (PRRs) erkannt werden und eine Entzündungsreaktion begünstigen. Durch die Entzündungsreaktion werden wiederum Triggerstoffe frei, die Formen der Nekrose fördern. Dieser Prozess kann sich ohne weiteres Schädigungsereignis autoamplifizieren und antreiben und im Multiorganversagen münden. Eigene Abb. angelehnt an [82].

1.3.2. Pathophysiologie der Nekroinflammation

In diesem Abschnitt soll auf die Grundmechanismen der Nekroinflammation und die verschiedenen Formen der regulierten Nekrose eingegangen werden.

Zelltod und regulierte Nekrose

Zelltod führt zum Erlöschen des Stoffwechsels und der morphologischen Integrität einer Zelle. Es wird grundsätzlich zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden [83]. Im Gegensatz zur Apoptose ist die Nekrose eine ungeordnetere Art des Zelltodes, die mit einem Verlust der Membranintegrität, der Zerstörung von Organellen und der Freisetzung von Bestandteilen der Zelle in den Extrazellularraum einhergeht [84]. Obwohl die Nekrose Bestandteil vieler Pathologien – wie Gewebisinfarkten, Atherosklerose – und von Traumata ist, wurden hier lange Zeit kaum therapeutische Möglichkeiten gesehen. Aktuelle Erkenntnisse über verschiedene Subformen einer regulierten Art der Nekrose mit spezifischen Schlüsselstellen und Molekülen eröffnen nun dieses Feld. Hier sind vor allem die Nekroptose, die Ferroptose, die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-regulierte Nekrose (MPT-RN), die Pyroptose, die NETose und der Parthanatos zu nennen. In Tab. 3 und Abb. 8 wird ein kurzer Überblick über die verschiedenen Unterformen der regulierten Nekrose, ihre Schlüssel-moleküle, Mechanismen und bereits bekannten Inhibitoren gegeben.

Tab. 3: Definition, Schlüssel-moleküle und Inhibitoren von Zelltodformen. Tab. nach [85]

	Definition	Schlüssel-moleküle	Inhibitoren
Apoptose	Charakteristisches morphologisches Erscheinungsmuster mit Chromatinkondensation und Zellschrumpfung durch Caspasenaktivierung	Initiator-Caspasen (Caspasen 8 und 10) Ausführende-Caspasen (Caspasen 3, 6 und 7)	zVAD-fmk, q-VD [86]
Nekroptose	Zelluläre Nekrose, ausgelöst durch Rezeptor-interagierende Proteinkinase-3(RIPK3)-vermittelte Phosphorylierung von ,Mixed Lineage Kinase	RIPK3 und MLKL im Nekrosom	Necrostatin [87-90], Necrosulfonamid [91]

	Domain-like Protein ^c (MLKL)		Ppm1b[92]
MPT-RN	Zelluläre Nekrose, ausgelöst durch eine mitochondriale Transitions-pore (MTP)	Cyclophilin D (CypD)	Cyclosporin A [93, 94], Sangliferin A [95]
Ferroptose	Zelluläre Nekrose, ausgelöst durch Lipidoxidation	Glutathion-peroxidase 4 (GPX4)	Ferrostatin [96] Lipoxstatin [97]
Parthanatos	Zelluläre Nekrose durch Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase-1(PARP-1)-Hyperaktivierung	PARP-1	Olaparib [98]

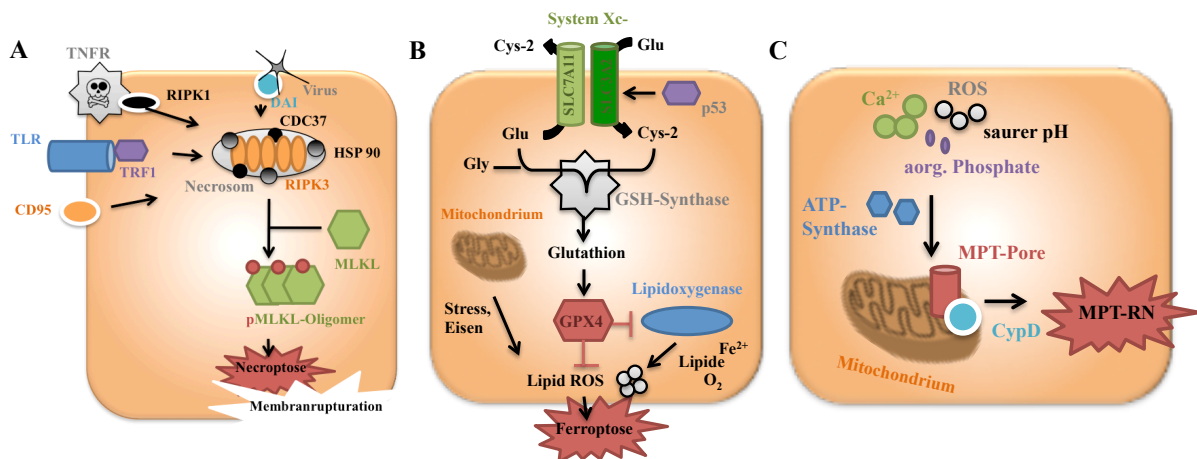


Abb. 8: Mechanismen regulierter Nekroseformen. Eigene Abb. angelehnt an [85]

A: Necroptose. Mehrere Rezeptor-interagierende Proteinkinase-3(RIPK3)-Moleküle bilden mit dem Co-Shaperon CD37 und dem Hitzeschockprotein 90 (HSP90) ein Nekrosom. Über verschiedene Mechanismen, wie Bindung von Molekülen an einen Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR), über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), durch CD95- oder DNA-abhängige Aktivierer von Interferonen (DAI) wird das Nekrosom aktiviert und kann die Pseudokinase Mixed-Lineage-Kinase Domain-like Protein (MLKL) phosphorylieren. Diese bildet dann ein Oligomer, bindet an Lipide und Proteine der Zellmembran und führt letztlich zu deren Ruptur [99, 100].

B: Ferroptose. Ferroptose ist ein eisenabhängiger Weg der regulierten Nekrose, der sich durch ein spezifisches Muster von Lipidoxidationen auszeichnet. Über das in der Plasmamembran befindliche Cystein/Glutamat-Antiporter-System X_c⁻ wird Cystein (Cys-2) im Austausch mit Glutamat (Glu) in die Zelle geschleust und mithilfe der Glutathionsynthase (GSH-Synthase) zu Glutathion verarbeitet. Das Enzym Glutathion-Peroxidase 4 (GPX4) nutzt diesen Baustoff zur Inhibierung der Entstehung

von reaktionsfreudigen und schädlichen Lipidhydroperoxiden (Lipid-ROS). Faktoren wie Stress, Ischämie und hohe Glutaminkonzentrationen stören dieses System. Über unbekannte Mechanismen kommt es durch die vermehrte Lipid-Peroxidation zu Membranschäden, zur Membranruptur und schließlich zum Tod der Zelle [96, 101, 102].

C: Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-regulierte Nekrose (MPT-RN). Die MPT-RN ist eine Cyclophilin-D(CypD)-abhängige Form der regulierten Nekrose mit ihrem Ursprung an den Mitochondrien. Bestimmte Bedingungen, wie hohe Ca^{2+} -Konzentrationen oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS), führen dazu, dass sich eine die innere und äußere Mitochondrienmembran durchspannende MPT-Pore bildet. Diese steht unter der Kontrolle von CypD. Experimentelle Daten deuten darauf hin, dass bereits die Öffnung einer einzigen Pore ausreichend ist, um die Zelle zu zerstören [96, 103, 104].

Die Entstehung des Nekroinflammationskreislaufes

Der Nekroinflammationskreislauf besteht im Wesentlichen aus zwei Mechanismen, die sich gegenseitig induzieren: Inflammation und regulierte Nekroseformen. Als Immunzellen, die an beiden dieser Prozesse teilhaben, gelten darüber hinaus Neutrophile und Makrophagen, die neutrophile extrazelluläre Fallen (NETs) bilden und NETose oder Pyroptose begehen, sowie zytotoxische Histone [105].

Sterben Zellen aufgrund von regulierter Nekrose, kommt es zu einem Zerreißen der Membranen, wodurch Zellbestandteile und Signalstoffe in den Extrazellularraum freigesetzt werden. Einige davon, wie die Alarmine, zu denen Defensine und Cathelicidin gehören, üben ihre physiologische Aufgabe aus und wirken chemotaktisch und proentzündlich [106, 107]. Andere erhalten eine neue Aufgabe und fungieren als DAMPs. Immunzellen und parenchymale Zellen erkennen dann über PRR – wie TLRs, Nod-like-receptors (NOD), C-type-lectin Receptors (CLR) oder Retinoic-Acid-inducible Gene-like-Receptors (RLR) – diese Signale [108, 109]. Daraufhin werden Mechanismen in Gang gesetzt, die zur Sekretion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine und Chemokine führen, die dann wiederum Formen der regulierten Nekrose fördern. So führt beispielsweise der Tumornekrosefaktor alpha ($\text{TNF-}\alpha$) über die Receptor-interacting Protein-Kinase 1 (RIPK1) [110, 111] und Interferon-gamma ($\text{IFN-}\gamma$) über die Januskinase(JAK)/Signal-Transducer-and-Activators-of-Transcription(STAT)-abhängige Synthese von Protein-Kinase R (PKR) [99] zur Induktion der Nekroptose, Interleukin 8 (IL-8) zur NETose von Neutrophilen [112] und die Induktion von

NLRP3 durch DAMPs zur Pyroptose [113]. In Abb. 9 ist die Theorie der Nekroinflammation kurz schematisch dargestellt.

Ein Kreislauf entsteht, der sich bis hin zum Multiorganversagen zuspitzen kann. Dies verdeutlicht ein Experiment mit einer Apoptose-defizienten *Drosophila-melanogaster*-Fliege. Eine zunächst lokale Nekrose im Flügel führte hier zu einer systemischen Entzündungsantwort, die tödlich für den gesamten Organismus verlief [114]. Grund dafür ist, dass die freigesetzten DAMPs, Alarmine und Zytokine auch in den venösen Blutfluss gelangen und dort entfernte Organschäden auslösen [115, 116].

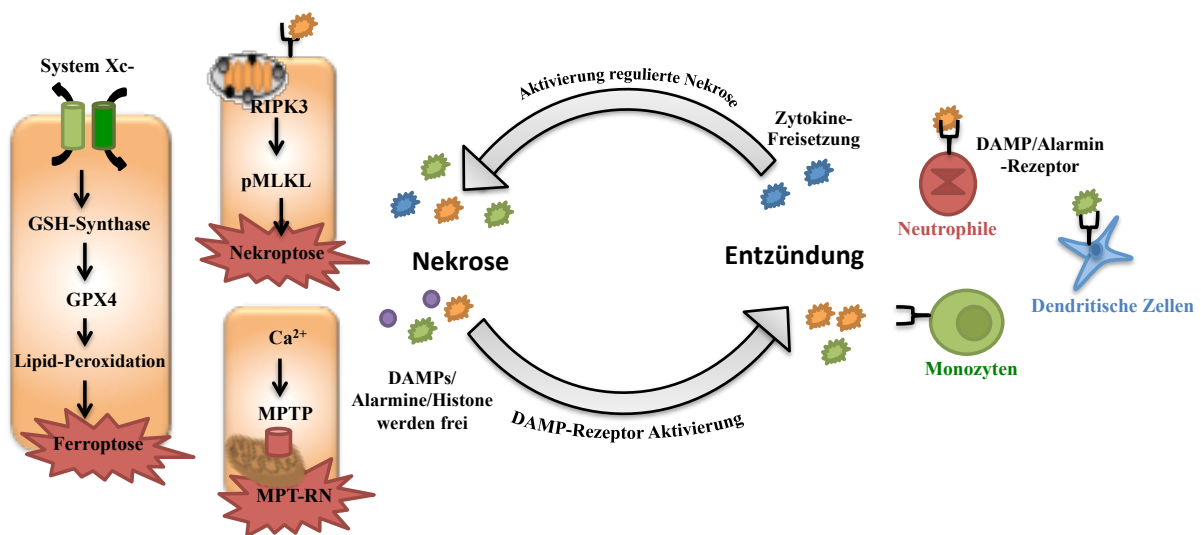


Abb. 9: Schematische Darstellung der Nekroinflammation.

Nekrotische Zellen setzen schädigungsassoziierte molekulare Muster (DAMPs) und Alarmine frei, die an ihre Rezeptoren auf Immunzellen (und Parenchymzellen) binden. Die Aktivierung der Immunzellen induziert das Freiwerden von zahlreichen proinflammatorischen Zytokinen, die wiederum verschiedene Formen der regulierten Nekrose fördern. Zu diesen gehören die Ferroptose, die Nekroptose und die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-regulierte Nekrose (MPT-RN). Bei der Ferroptose wird Glutamat über ein Cystein/Glutamat-Antiporter-System (X_C) in die Zelle geschleust und durch die Glutathion-Synthase zu Glutathion verarbeitet. Die Glutathion-Peroxidase 4 (GPX4) nutzt dieses zur Verhinderung der Entstehung von reaktiven Lipid-Spezies. Stress, Ischämie und andere Faktoren stören diesen Mechanismus und es kommt zum Zelltod. Bei der Nekroptose bilden mehrere Receptor-Interacting-Protein-Kinasen 3 (RIPK3) ein Nekrosom, das die Pseudokinase Mixed-Lineage Kinase-domain-like Protein (MLKL) phosphoryliert. Dieses Nekrosom bindet an die Membran und führt zu ihrer Ruptur. Bei der MPT-RN kommt es zur Bildung einer mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Pore (MPTP), die letztlich zur Zerstörung der Zelle führt. Eigene Abb. angelehnt an [56].

1.4. Ziel des Projektes und Hypothese

Das ANV stellt ein ernst zu nehmendes Krankheitsbild mit zunehmender Relevanz und hohen ökonomischen Kosten dar. Wurde früher davon ausgegangen, dass es sich um einen selbstlimitierenden Prozess mit nahezu vollständiger Wiederherstellung der Nierenfunktion handelt [70], ist heute bekannt, dass sich ANV und CNV gegenseitig bedingen können und keinesfalls getrennte Entitäten sind [117]. Aktuelle funktionelle Parameter im klinischen Einsatz, wie das Serumkreatinin, maskieren einen Nephronenverlust von bis zu 50 % [71] und suggerieren Regeneration, wo lediglich funktionelle Kompensation, etwa durch Hypertrophie der verbliebenen Nephronen stattfindet. Erst im Langzeitverlauf werden diese Schäden deutlich, wenn Patienten mit einem durchlebten ANV in der Krankenvorgeschichte vorzeitig an einem CNV erkranken und ihre verminderten Reserven nicht mehr ausreichen. Dieses Risiko steigt mit der Schwere des ANV [75] und der Anzahl der Episoden [118].

In Anbetracht des demografischen Wandels und steigender Inzidenzen des ANV ist es daher Aufgabe der Forschung, die Mechanismen hinter dieser Verbindung besser zu verstehen, um gezielte Behandlungsstrategien zu entwickeln und Hochrisikopatienten frühzeitig erkennen zu können.

Mit dieser Arbeit soll genau an dieser Herausforderung und Problematik angesetzt und der Prozess der Nekroinflammation – ein sich selbst amplifizierender Kreislauf zwischen Entzündung und regulierten Formen der Nekrose [56] – als möglicher pathophysiologischer Erklärungsansatz für ein chronisch-auf-akutes Nierenversagen untersucht werden. Angelehnt an epidemiologische Daten, nach denen die ATN 85 % der Ursachen eines intrarenalen ANV ausmacht [5], und an den Anspruch, nur einen akuten initialen Schädigungsmoment vorauszusetzen, soll als Schädigungsmodell die uIRI am Mausmodell verwendet werden.

In einem ersten experimentellen Schritt soll herausgefunden werden, ab welchem Schädigungsgrad es zu langfristig nachweisbarer Entzündung und zum Zelltod kommt und welchen Einfluss die Ischämiezeit auf das akute und chronische Schädigungsbild hat.

In einem zweiten Schritt soll durch unterschiedliche Reperfusionseiten das Entzündungs-, Schädigungs-, Zelltod- und Fibrosegeschehen über den Zeitverlauf betrachtet untersucht und charakterisiert werden.

Im dritten Schritt soll versucht werden die Hypothese durch gezielte therapeutische Intervention zu verifizieren. Existiert der Kreislauf der Nekroinflammation sollte es durch Gabe von Inhibitoren der regulierter Nekroseformen und von Entzündungsinhibitoren

möglich sein, sowohl die Entzündungs- als auch die Schädigungsantwort zu beeinflussen. Ebenso soll hier ein therapeutisches Zeitfenster zur einmaligen Gabe dieser Inhibitoren identifiziert werden.

Die Hypothese für die vorliegende Dissertationsarbeit lautet:

Nach akuter ischämischer Tubulusnekrose entsteht zwischen regulierten Formen der Nekrose und dem entzündlichen Mikromilieu ab einem bestimmten Schädigungsgrad ein sich selbst verstärkender Kreislauf der Nekroinflammation, der zu fortgesetzter Nierenschädigung, Entzündung und Fibrose führt. Diese auto-amplifizierende Verbindung lässt sich durch therapeutische Beeinflussung der Entzündung und regulierter Formen der Nekrose in einem bestimmten therapeutischen Zeitfenster inhibieren.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Pipetten

Multikanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
PipetierhilfePipetus-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	BD, Heidelberg
Pipetten Pipeteman ®	Gilson, Middleton, WI, USA
Pipettenspitzen Typ Glison ®	Peske, Aindling-Arnhofen, D
PipettenspitzenepT.I.P.S	Eppendorf AG, Hamburg, D

Waagen

BP 110S	Sartorius Göttingen
Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH

Zentrifugen

Centrifuge 5418 C	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Megafuge 1.0 R	HeraeusSepatech, Osterode, D

Mikroskope

Leica DM IL	Leica Microsysteme, Bensheim, Deutschland
Leitz DMRBE	Leica Microsysteme, Wetzlar, D
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG; Oberkochen, D
Axiocam HR	Carl-Zeiss-AG, Oberkochen, D

Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit

NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	Oeqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Light Cycler 480 Real-Time PCR System	Roche, Basel, CH
96-Schacht-Platten Lightcycler	Sarstedt, Nürnberg, D
Klebefolie	Roche, Basel, CH

Corning® Thermowell PCR 8 well strip tubes Merck, Darmstadt, D

Enzym-gekoppelter Enzymadsorptionstest

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus Reader Tecan, Calisheim, D
ELISA Microplate-Washer ELx50 Washer Biotek, Bad Friedrichshall, D
ELISA Platte weiß High Bind Sarstedt, Nürnberg, D

Sonstiges

Einbettkassetten Simport, Boleoeil, Kanada
Eppendorf 1,5 ml, 2 ml Eppendorf, Hamburg, D
Falcons 15ml, 25ml TPP, Trasadingen, CH
Handschuhe Reha-soft/R) satin Hartmann, Heidenheim
Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg, D
Ultra Turrax 125 Homogenisator IKA GmbH, Staufen, D
Vortex Genie 2 TM Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad HI 1210 Leica Microsystems, Solms, D
Zellkulturschalen 10cm TPP, Trasadingen, Schweiz

2.1.2. Chemikalien

Ammoniumpersulfat (APS) Bio-Rad, München, D
BSA Roche Diagnostics, Mannheim, D
Creatinine FS® -Kit DiaSysDiagnostic System, Holzheim
DMSO Merck, Darmstadt, D
EDTA Calbiochem, SanDiego, USA
H₂O₂ 30% Merck, Darmstadt, D
MgSO₄ Merck, Darmstadt, D
NaCl Merck, Darmstadt

2.1.3. Tierhaltung und Tierexperimente

Mäuse

C57BL/6 Wildtyp Mäuse Charles River Laboratories, Sulzfeld, D

Tierhaltung

Makrolone Typ II Käfige Tecniplast, Hamburg
 Tierfutter Ssniff Spezialitäten, Soest

Operation

100 Serien VaporizerforForene Smiths Medical PM, Inc., Norwell, USA
 Anatomische Pinzette Medicon, Tuttlingen, Deutschland
 Forene 100% Isofluran Aboot, Barr, CH
 Leukoplast
 Skalpell Pfammedicalag, Köln, D
 Sterile Multikompressen 5x5cm NOBA Verbandmittel, Wetter, D
 Temperaturecontrolunit HB 101/2 Panlab Bioresearch, Barcelona, Spainien
 UV-Licht Bachofer Laborgeräte, Reutlingen
 Vicryl, Polyglactin 910, PS-2 19mm Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH,
 Norderstedt, D
 YasargilAneurysm Clip Medicon, Tuttlingen, D
 Yasargil Clip ApplyingForceps Medicon, Tuttlingen, D

Narkosemix für 1000g (2,5 ml/kg Körpergewicht)

1 ml	5 mg/ml Midazolam	Ratiopharm GmbH, Ulm, D
2 ml	0,05 mg/ml Fentanyl Janssen	Janssen-Cilag, Neuss, D
1 ml	1 mg/ml Dorbenevet.	Pfizer GmbH, Berlin, D

Antagonistenmix für 1000g (8,5 ml/kg Körpergewicht)

5ml	0,1 mg/kg Flumazenil-hameln	Hameln pharma plus GmbH, Hameln, D
3 ml	0,4 mg/ml Naloxon Inresa	InresaArzneimittel GmbH, Freiburg, D
0,5 ml	5 mg/ml Atipamezol	CP-Pharma GmbH, Burgdorf, D

Interventionen

Cyclosporin-A, 50mg/ml	Sigma Aldrich, St.-Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Etanercept (Enbrel®), 50 mg/ml	Wyeth Pharma Madison, Niederlande
Ferrostatin-1	Merck Millipore, Bilerica, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, D
Necrostatin-1	Enzolifesciences, Farmingdale, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D

Organentnahme

EDTA	Calbiochem, San-Diego, USA
Formaldehydlösung 18%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNA-Later	Quiagen GmbH, Hilden, D

2.1.4. Histologie

Deckgläser	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Histosette I, Einbettkassetten	Simport, Beloeil, Canada
Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig
Schneidegerät	Jung CM 3000 Leica, Solms, D
ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, CA, USA
Ammoniumpersulfat (APES)	Bio-RAD, München
Antigen-Unmasking-Solution	Vector, Burlingame, CA, USA
Avidin	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotin	Vector, Burlingame, CA, USA
Biotinilierter Sekundär Antikörper	Vector, Burlingame, CA, USA
DAB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Mounting Medium Vecta Mount	Vector, Burlingame, CA, USA
PAS	Bio-Optica, Mailand, Italien
Paraffin	Siga-Aldrich, St. Louis, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D

Primärantikörper

Rat anti-mouse F4/80-Antikörper	Serotec, Oxford, U.K.
Rat-anti-mouse Neutrophilen-Antikörper	Serotec, Oxford, UK
Rat anti-mouse Lecthin-Antikörper	Vector, Burlingame, Ca, USA
Rat anti-mouse SMA-Antikörper	Dako, Hamburg, D

Masson-Goldner-Trichrom

Masson-Goldner-Trichrome Färbekit

Weigerts Hämatoxylinlösung A	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Weigerts Hämatoxylinlösung B	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Goldner Lösung I	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Goldner Lösung II	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Goldner Lösung III	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

TUNEL-Färbung

TUNEL Apo-Green Detectionkit

EquilibrationBuffer	Bioutil, Houston, USA
Apo-Green-Labeling-Mix	Bioutil, Houston, USA
RecombinantTdT Enzyme	Bioutil, Houston, USA
Proteinkinase K (2mg/ml)	Bioutil, Houston, USA

2.1.5. Genexpressionsanalyse

RNA-Isolation

PureLink TM RNA Mini Kit	Ambion Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
RNase Free	Gene choice, Pelicanlifescience, USA
RNAlater	Ambion® Life Technologies GmbH Darmstadt, D
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D

cDNA Herstellung

cDNA-Mastermix für eine Probe (7,5ul)

1 μ l	0,1 M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, D
0,25 μ l	Hexanucleotidmischung, 10x Konzentriert	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
4,5 μ l	5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
0,25 μ l	5g/ml linear Acrylamide	Ambion, Darmstadt, D
0,45 μ l	25 mM dNTPs	Fermentas, St.-Leon-Rot, D
0,5 μ l	40 U/ μ lRNasin	Promega, Mannheim, D
0,5 μ l	Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D

Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion

SYBRgreen-Mastermix (100ml)

20 ml	10 Taq-Puffer ohne Detergenzien	Fermentas, St-Leon, Rot, D
1500 μ l	25 mM dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot, D
40 ml	PCR Optimizer	Biotop AG, Witten, Deutschland
2000 μ l	10 mg/ml BSA	Fermentas, St. Leon-Rot, D
400 μ l	SYBERgreen I (1:100; 20% DMSO)	Fluka, Sigma-Aldrich, München, D
24 ml	25 mM MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot, D
12,1 ml	RNAse-freies Wasser	

Mastermix pro Schacht (20 μ l)

10 μ l	SYBRgreen-Mix	
0,6 μ l	10 pmol/ μ l Reverse primer	Metabion, Martinsried, D
0,6 μ l	10 pmol/ μ l Forward Primer	Metabion, Martinsried, D
0,16 μ l	Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt, D
6,64 μ l	H ₂ O	
2 μ l	cDNA (1:10)	

Primer

Primer

Metabion, Martinsried, Germany

Tab. 4: Verwendete Primer

Gen	Sequenz	GC %	E-Wert	Größe	
18S	Forward	5'GCAATTATTCCTCATGAA3'	39	0,014	1617
	Reward	3'AGGGCCTCACTAAACCAT 5'	50	0,014	
Murines α1-microglobin	Forward	5' TGCAAGTCAACACTCTCCCC 3'	55	0,015	182
	Reward	3'AGGCTGGTCTTGGAGCTTTTT 5'	47	0,005	
Murines btg1	Forward	5' GGAGCTGCTGGCAGAACAT 3'	57	0,039	203
	Reward	3' AGGACACTTCGTAGGGGTCA 5'	55	0,015	
Murines β2-Microglobin	Forward	5' TGACCGGCCTGTATGCTATC 3'	55	0,015	317
	Reward	3'TCACATGTCTCGATCCCAGTAGA 5'	47	0,0004	
Murines Bmp2	Forward	5' TTCCATCACGAAGAAGCCGTG 3'	52	0,005	147
	Reward	3' AGCTTCCTGTATCTGTTCCCG 5'	52	0,005	
Murines Bmp3	Forward	5' CGACAAGGTGTCGGAGCATA 3'	55	0,0015	164
	Reward	3'TTTGAGGAGTTCCTGCGGC 5'	57	0,039	
Murines- clusterin	Forward	5'AAAAGCCGTGCGGAATGAGA3'	50	0,015	242
	Reward	3'TCGCAAGGCGGCTTTTATTG5'	50	0,015	
Murines Calbindin 28	Forward	5' ATTCGACGCTGACGGAAGT3'	50	0,015	186
	Reward	3'TGGGTAAGACGTGAGCCAAC5'	55	0,015	
Murines CXCL2	Forward	5' ACTGAACAAAGGCAAGGCTAAC3'	45	0,001	128
	Reward	3'AGGCACATCAGGTACGATCC5'	55	0,015	
Murines CXCL1	Forward	5' CAAACCGAAGTCATAGCCACAC3'	50	0,001	173
	Reward	3'TGTTGTCAGAAGCCAGCGTT5'	50	0,015	
Murines Cyclin D1	Forward	5' TCCTCTCCAAAATGCCAGAG3'	50	0,059	110
	Reward	3'GGGTGGGTTGGAAATGAAC5'	52	0,023	
Murines CCL5	Forward	5' CCTGCTGCTTTGCCTACCTCTC3'	59	0,0004	125
	Reward	3'ACACACTTGGCGGTTCCCTTCGA5'	54	0,0004	
Murines CCR2	Forward	5' AGGCATCCATTTGCTTCTG3'	45	0,001	108
	Reward	3'CAACTCCTTCATCAGGCACA5'	50	0,001	
Murines Coll1α1	Forward	5' ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC3'	47	0,004	110
	Reward	3'TAGGCCATTGTGTATGCAGC5'	50	0,001	
Murines	Forward	5' GCCTCCTGTTCTACAAGTGGAAAG3'	52	0,0005	124

2. Material und Methoden

CSF1	Reward	3'ACTGGCAGTTCACCTGTCTGT5'	54	0,0004	
Murines	Forward	5' CCTGCTGTTACAGTTGCC3'	57	0,005	108
CCL2	Reward	3'ATTGGGATCATCTTGCTGGT5'	45	0,001	
Murines	Forward	5' CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG3'	45	0,001	91
CXCL2	Reward	3'TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC5'	55	0,001	
Murines	Forward	5' ACTTTGTGACTCAGGAGAACTGG3'		0,002	
Gsk3β	Reward	3'TCGCCACTCGAGTAGAAGAAATA5'		0,0	
Murines	Forward	5' CCTGTGCCTTACTTAGCGA3'	55	0,015	143
hgf	Reward	3'CCGGGCTGAAAGAATCAAAGC5'	52	0,005	
Murines	Forward	5' AGAAAGCCGCCTCAAACCTT3'	50	0,015	155
IL-18	Reward	3'TGTCTGATTCCAGGTCTCCATTT5'	43	0,0004	
Murines	Forward	5' CGGCCTTCCCTACTTCAC3'	61	3,2	149
IL-6	Reward	3'GCCATTGCACAACCTTTTCTCA5'	44	0,005	
Murines	Forward	5' TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG3'	55	0,2	100
iNOS	Reward	3'TGAAGAAAACCCTTGTGCT5'	45	0,2	
Murines	Forward	5' GCGAGCAAGGGTCTCTGAT3'	58	0,8	142
IGFBP7	Reward	3'ACGTTCCAGATGTCCTTGGG5'	55	0,2	
Murines	Forward	5'TCACCTTGAAGAAGTGCTGT3'		0,0	
IL-22	Reward	3'ACATGTGCTTAGCCTGTTGCT5'		0,0	
Murines	Forward	5'CAGACGTAAACAGCTCCGAATTAAG3'	44	0,0004	192
Kip1	Reward	3'GGCAGATGGTTTAAGAGTGCC5'	52	0,005	
Murines	Forward	5' GAAGTCAAAGAGCAAGAGGCAA3'	45	0,001	225
Ki-67	Reward	3'TCTTGAGGCTCGCCTTGATG5'	55	0,015	
Murines	Forward	5' TCAGCTCGGGAATGCACAA3'	53	0,8	67
KIM-1	Reward	3'TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT5'	55	0,2	
Murines	Forward	5' CATGTGCTGCCTAAGGATGA3'	50	0,0	109
Laminin (Lamb2)	Reward	3'TCAGCTTGTAGGAGATGCCA5'	50	0,2	
Murines	Forward	5' ATGTCACCTCCATCCTGGTCAG3'	55	0,019	145
NGAL	Reward	3'GCCACTTGCACATTGTAGCTCTG5'	52	0,005	
Murines	Forward	5' TGGATAAAGAAGAAGAAGCG3'	40	0,0	106
PCNA	Reward	3'GGAGACAGTGGAGTGGCTTT5'	55	0,0	
Murines	Forward	5' CAGGTCTGTTGGTGCTCAGA3'	55	0,015	133
statmin	Reward	3'TCACCTGAATATCAGAAGATGCCA5'	41	0,0004	
Murines	Forward	5' TCCTGCGACTGATCAAGGAAC 3'	52	0,005	177
ssat	Reward	3'TGGCGAACCAACAATGCTA5'	50	0,015	
Murines	Forward	5' GGAGAGCCCTGGATACCAAC3'	60	0,0	94

TGFβ1	Reward	3'CAACCCAGGTCCTTCCTAAA5'	50	0,0
Murines	Forward	5' CAGACGTAGTGATCAGAGCCAAA3'		0,0
TIMP2	Reward	3'ACTCGATGTCTTTGTCAGGTCC5'		0,0
Murines	Forward	5' AGGGTCTGGGCCATAGAACT3'		0,0
TNFα	Reward	3' CCACCACGCTCTTCTGTCTA5'		0,0

2.1.6. Enzym-gekoppelter Adsorptionstest (ELISA)

TIM-1/Kim-1/HAVCR ELISA Kit

R & D Systems, Mineapolis, USA

2.1.7. Software

Acrobat Writer

Adobe Systems Software

Adobe Photoshop elements

Adobe Systems Software

AxioVision

Carl Zeiss AG

Endnote X7

Thomsen Reuters

Image J

Wayne Rasband

Microsoft Office 2011

Microsoft corporation

Multi Experiment Viewer (MeV)

TM4

Prism 6

GraphPad, Software, La Jolla, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Tierhaltung und tierexperimentelle Methoden

Tierzucht und Tierhaltung

Für die Experimente wurden männliche ‚C57-black-6‘-(C57BL/6)-Mäuse verwendet. Die Tiere wurden im Alter von 6 Wochen vom Züchter (Charles River, Sulzfeld, D) geliefert, eine Akklimatisationszeit von 7–10 Tagen wurde eingehalten und der Versuchsbeginn wurde in die 8. Lebenswoche gesetzt. Die Haltung erfolgte nach Geschlechtern getrennt in Gruppen von maximal 5 Tieren pro Käfig. Es bestand freier Zugang zu Wasser und Nahrung. Ein 12-stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 21–23 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 45–65 % wurde gewährleistet. Käfige, Einstreu, Futter, Nestwatte und Wasser wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert und regelmäßig gewechselt. Die Haltungsbedingungen der Tiere wurden mindestens zweimal täglich durch sachkundiges Personal überprüft. Eine Markierung der Tiere erfolgte durch Ohrlochung, um eine adäquate Nachvollziehbarkeit der Konstitution und des Verbleibs der Einzeltiere zu gewährleisten. Alle Tierexperimente wurden nach den Vorschriften des Tierschutzgesetzes und mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern durchgeführt. Die Versuchsdurchführende hat hierfür ein Zertifikat der Kategorie FELASA B erworben und wurde von erfahrenen Mitarbeitern in sämtliche Techniken eingeführt.

Unilaterale Ischämie-Reperfusion der Niere

Die uIRI ist ein Modell zur Induzierung eines ANV. Durch Abklemmung der Nierengefäße für einen festgelegten Zeitraum (sog. ‚Ischämiezeit‘) wird ein ischämischer Schaden in der betroffenen Niere ausgelöst. Unmittelbar danach erfolgt die Lösung der Klemme und die Niere wird für die ebenfalls im Experimentdesign festgelegte Reperfusionzeit wieder reperfundiert. Die kontralaterale Niere bleibt dabei unberührt. Das Modell ist von intrinsischen Faktoren wie Alter, Geschlecht, Gewicht und Zyklus der Maus sowie von extrinsischen Faktoren, wie Ausrüstung, Operateur und Temperatur, abhängig. Um Schwankungen möglichst zu minimieren und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden in den Experimenten ausschließlich männliche, 8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse vom selben Züchter verwendet, die unter standardisierten Bedingungen operiert wurden. Vorarbeiten zeigten, dass von allen möglichen Einflussfaktoren des Modells die Körpertemperatur der

Mäuse mit den wesentlichsten Effekt auf den Schweregrad und die Konstanz des induzierten Parenchymschadens hat [119]. So geht Hypothermie mit weniger Schaden und Entzündung einher [120, 121]. In der Transplantationsmedizin ist dieses Phänomen bereits seit Langem bekannt, weshalb z. B. bei Transplantationen das Organ gekühlt und der Empfänger in Hypothermie versetzt wird [122]. Es wurde daher im Labor ein spezielles Verlaufsprotokoll entwickelt, das es erlaubt, die Temperatur der Mäuse während der Operation konstant zwischen 36,5 und 38,5 °C zu halten [119]. Dieses besteht aus einer Heizplatte (Kleintier-OP-Tisch M12511, Medax GmbH, De) als OP-Tisch, rektaler Online-Temperaturmessung via RET-3-iso-Rektal-Sonden und Thermes USB (Physitemp Instruments, Inc., USA), Rotlicht-Wärmelampe sowie Eierbrüter-Inkubatoren (Octagon 20 Advance, Brinseaproducts Ltd., UK). In Abb. 10 ist das Prinzip der Temperaturkontrolle veranschaulicht.

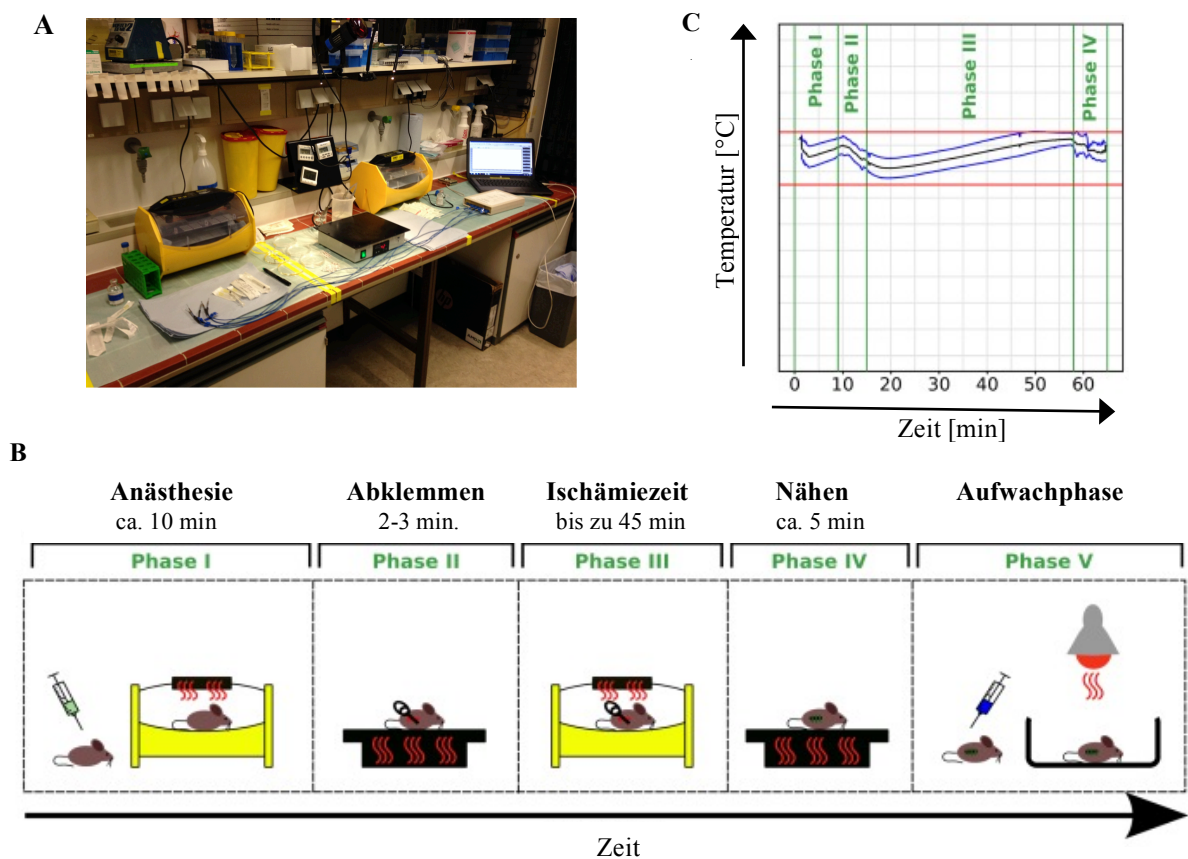


Abb. 10: Prinzip der Temperaturkontrolle während der experimentellen Durchführung einer unilateralen Ischämie-Reperfusionverletzung (uIRI).

A: Versuchsaufbau für eine temperaturkontrollierte Ischämie-Reperfusion-Operation. Eigene Abb.

B: Darstellung der unterschiedlichen Hilfsmittel und Methoden, um eine konstante Körpertemperatur der Mäuse während der verschiedenen Phasen zu ermöglichen. Abb. nach [119].

C: Mithilfe des Aufbaus gelingt es, die Temperatur der Mäuse in allen Phasen der OP konstant zwischen 36,5 und 38,5 °C zu halten. Abb. nach [119].

Vor Beginn der Operation wurden drei Lösungen vorbereitet:

1. **Narkosemix** (2,5 ml/kg Körpergewicht (KG)) aus den drei Komponenten: Medetomidin (0,5 mg/kg KG), Midazolam (5 mg/kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG) für Analgesie, Amnesie und Hypnose
2. **Antagonistenmix** (8,5 ml/kg KG) aus Atipamezol (2,5 mg/kg KG), Flumazenil (0,5 mg/kg KG) und Naloxon (1,2 mg/kg KG) zum Antagonisieren des Narkosemixes
3. **Buprenorphin** (16,67 ml/kg KG) für die postoperative Analgesie

Der Maus wurde der Narkosemix intraperitoneal (i.p.) im unteren rechten Quadranten in einem Winkel von 30–45 °C injiziert. Abhängig vom KG der Maus entsprach dies einem Volumen von 100–150 µl. Nach etwa 10–20 min wurde dessen Wirkung über den Zwischenzehreflex überprüft. Um eine Verringerung der Körpertemperatur zu vermeiden, verweilte die Maus für diese Zeit in dem ersten der beiden Hühnerei-Inkubatoren mit 37 °C Innentemperatur. Zu Beginn des Eingriffs wurde das Versuchstier seitlich auf der 42 °C warmen Wärmeplatte mit zwei Klebstreifen an Schultern und Beinen fixiert, sodass die linke Körperhälfte nach oben zeigte. Zur Prophylaxe von Hornhautschäden wurden die Augen mit Bepanthen-Augensalbe versorgt. Für die Temperaturüberwachung wurde eine nummerierte ‚RET-3-Iso‘-Sonde mit etwas Bepanthen-Creme rektal eingeführt und mit einem Klebestreifen am Schwanz befestigt. Anschließend wurde die Haut auf Höhe des Rippenbogens rasiert und desinfiziert. Durch einen ca. 1 cm langen Hautschnitt wurde die Flanke eröffnet und das Bauchfell wurde freigelegt. Ein zweiter maximal 1 cm langer Schnitt durch die tieferen subkutanen Schichten eröffnete die Bauchhöhle. Die Niere wurde dann im Retroperitonealraum aufgesucht und mit einer großen Pinzette vorsichtig an ihrem Pol herausgehoben. Nun wurden die Nierengefäße durch Applikation der Mikroaneurysmaklemmen vor ihrer Mündung in die Niere und nach Abgang aus der Bauchschlagader abgeklemmt. Eine anschließende weißliche Verfärbung und ein Ablassen der Niere gaben einen Hinweis auf die korrekt erfolgte Ischämie. Sofort wurde eine Stoppuhr gestartet. Dieser ischämische Zustand wurde für die im Experimentdesign festgelegte Ischämiezeit (15–45 min) aufrechterhalten. Die operierte Niere wurde mit einem sterilen, in warmer 0,9%-NaCl-Lösung getränkten Tupfer bedeckt, um den Wärme- und Flüssigkeitsverlust möglichst gering zu halten. Die Maus befand sich in dieser Zeit in dem zweiten Inkubator mit 39 °C Innentemperatur. Mithilfe der rektalen Sonde wurde ihre Körpertemperatur überwacht und stets zwischen 36,5 °C und 38,5 °C gehalten. Falls nötig,

wurde zusätzlich Wärme durch eine Rotlichtlampe appliziert oder die Maus wurde durch tropfenweises Aufbringen von Wasser auf das Fell gekühlt. Nach Ablauf der Ischämiezeit wurde auf der Wärmeplatte die Mikroaneurysmaklemme entfernt, die Niere färbte sich nun wieder rötlich als Zeichen der erfolgreichen Reperfusion. Im Anschluss wurde sie wieder in ihr Nierenlager reponiert. Um den intraoperativen Volumenverlust auszugleichen wurden 200 µl warme, sterile 0,9%-NaCl-Lösung i.p. verabreicht. Zum Verschluss der Wunde wurde die Unterhaut in Einzelkopfnahntechnik mit 2–3 Stichen mit einem resorbierbaren ‚VicrylEthicon‘-5-0-Faden verschlossen. Abschließend wurden der Maus gewichtsadaptiert 200 µl des Antagonistenmixes gespritzt. Bis zur vollständigen Aufhebung der Narkose verblieb die Maus im 39 °C warmen Hühnerei-Inkubator und wurde dann in einen sauberen und autoklavierten Käfig gelegt. Zur Analgesie erhielt die Maus direkt postoperativ 0,005 mg/kg KG Buprenorphin subkutan (s. c.), weitere Gaben erfolgten mit gleicher Dosierung alle 12 Stunden für mindestens 3 aufeinanderfolgende Tage. Nach Erreichen der definierten Reperfusionszeit (24 h bis 5 Wochen) wurde die Maus getötet und ihre Organe entnommen. In Abb. 11 ist das verwendete Experimentdesign mit den verwendeten Ischämie- und Reperfusionszeiten ohne Interventionen zur Übersicht zusammengefasst.

Interventionen nach unilateraler Ischämie-Reperfusionsverletzung

Behandlung mit Etanercept

Etanercept (Enbrel®) ist ein dimeres Fusionsprotein mit immunsuppressiven und antientzündlichen Eigenschaften. Es besteht aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des löslichen TNF-Rezeptors 2 (TNFR2/p75) und einer Fc-Domäne des humanen Immunglobulin G 1 (IgG1). Als ‚falscher Rezeptor‘ bindet es mit hoher Affinität das proinflammatorische TNF- α , wodurch dieses nicht mehr wirksam werden kann [123, 124]. Im Experiment wurde den Mäusen je 10 mg/kg KG i.p. nach 35 min Ischämiezeit injiziert. Die Zeitpunkte der Injektion variierten dabei von Gruppe zu Gruppe zwischen 1 h vor sowie 3 h, 6 h und 12 h nach der Operation. Als Reperfusionszeit wurden 24 h gewählt. In Abb. 12 ist das Experimentdesign gezeigt.

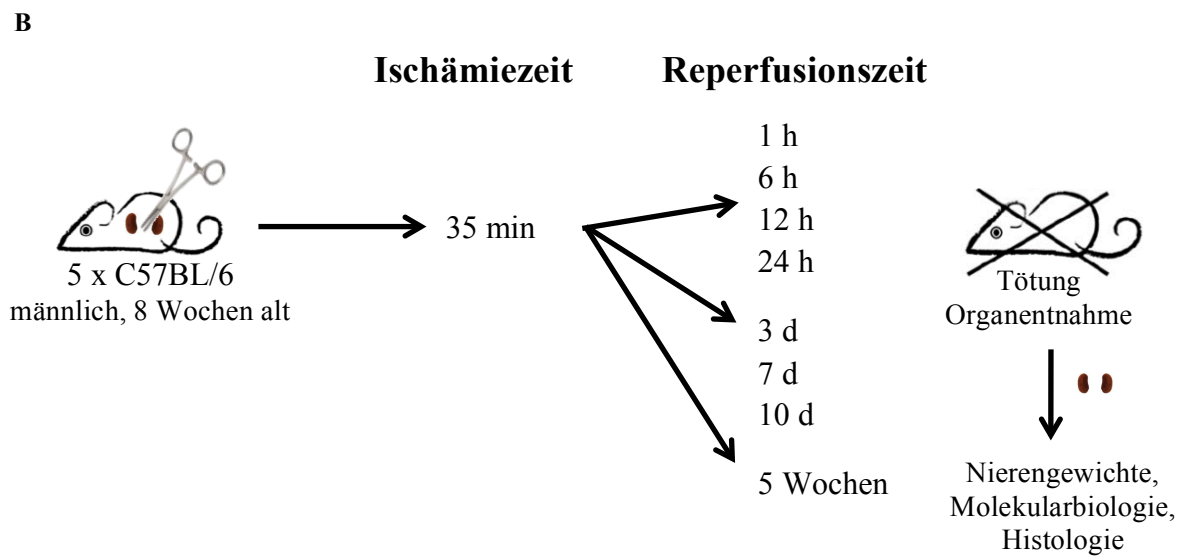
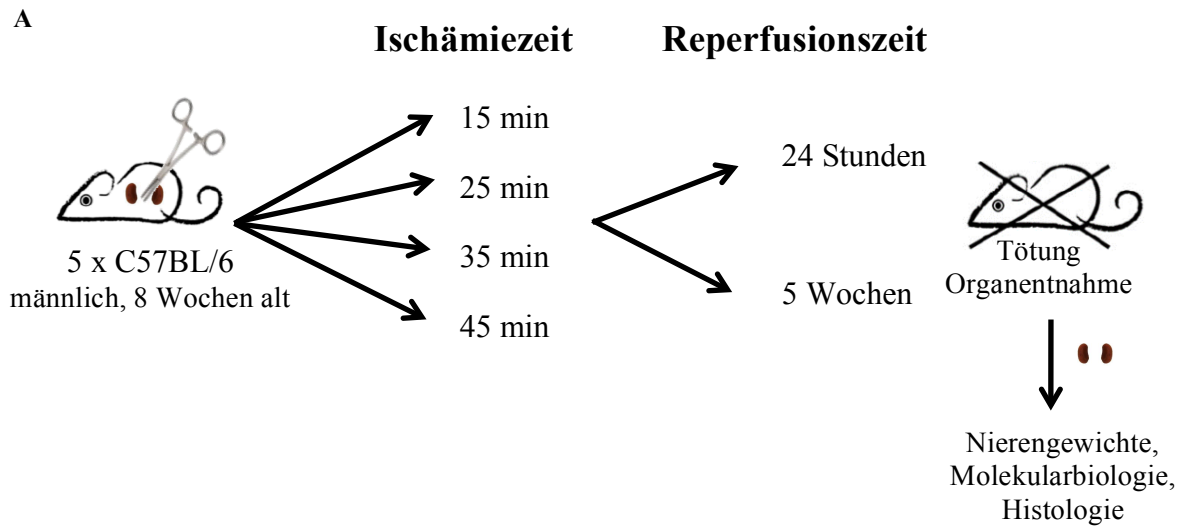


Abb. 11: Experimentdesign zur Untersuchung des Einflusses der Ischämiezeit (A) und Reperfusionszeit (B) bei unilateraler Ischämie- Reperfusionsverletzung

Für die Experimente wurden verschiedene Reperfu- und Ischämiezeiten verwendet. Jede Gruppe bestand aus 5 männlichen, 8 Wochen alten C57BL/6-Mäusen. Nach Ablauf der Reperfu-zeit wurde das Tier getötet und das Gewebe für molekularbiologische und histologische Untersuchungen weiterverarbeitet.

A: Im ersten Experimentansatz wurden variierende Ischämiezeiten von 15–45 min bei einer Reperfu-zeit von jeweils 24 h oder 5 Wochen gewählt.

B: Im zweiten Experimentansatz wurde die gleiche Ischämiezeit von 35 min, bei einer variierenden Reperfu-zeit von 1 h bis hin zu 5 Wochen gewählt.

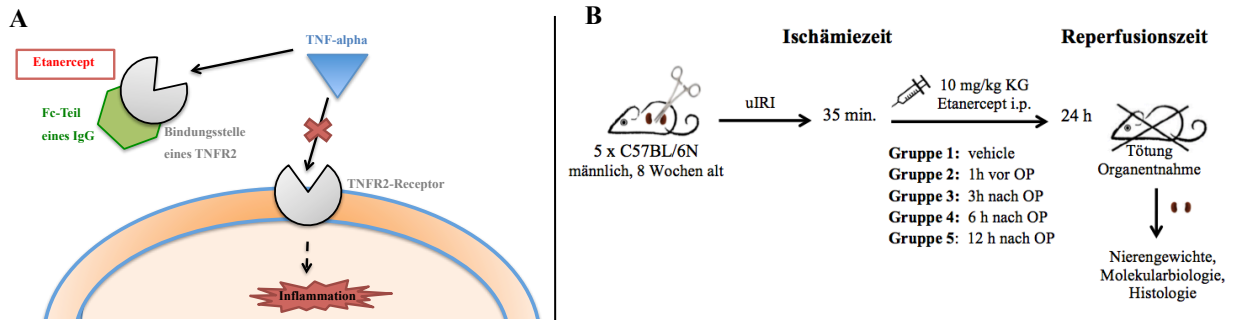


Abb. 12: Wirkungsweise von Etanercept und Experimentdesign

A: Schematisch dargestellte Wirkungsweise von Etanercept. Etanercept besteht aus einer Ligandenbindungsdomäne des löslichen TNF-Rezeptors 2 (TNFR2) und bindet mit hoher Affinität an Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α). Das proinflammatorische TNF- α kann so nicht mehr an seinen echten Rezeptor binden und eine Entzündungsantwort fördern. Eigene Abb. nach [123].

B: Für die Experimente wurden pro Gruppe 5 männliche, 8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse verwendet und einer unilateralen Ischämie-Reperfusion (uIRI)-Operation unterzogen. Die Ischämiezeit betrug 35 min, die Reperfusionszeit 24 h. Den Mäusen wurden einmalig 10 mg/kg KG Etanercept intraperitoneal (i.p.) injiziert – je nach Gruppe 1 h vor oder 3, 6 oder 12 h nach der Operation. Nach Ablauf der Reperfusionszeit wurde das Tier getötet, die Organe wurden entnommen, das Nierengewicht wurde ermittelt und das Gewebe wurde für molekularbiologische und histologische Untersuchungsmethoden weiterverarbeitet.

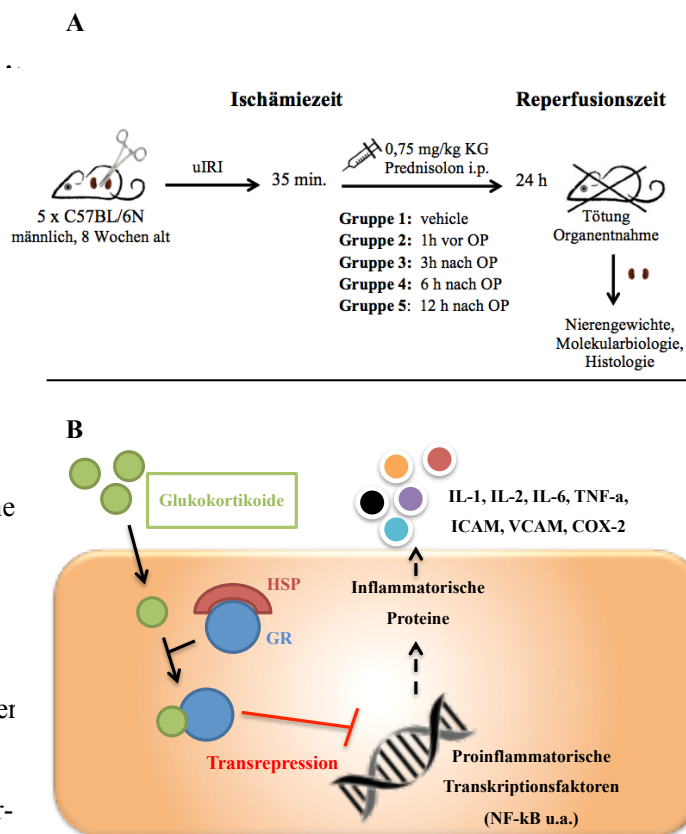
Behandlung mit Prednisolon

Prednisolon (1,2-Dehydrocortisol) ist ein synthetisches Glukokortikoid zur Unterdrückung von Entzündungs- und Immunreaktionen. Diese Wirkung resultiert vor allem aus der Hemmung des Transkriptionsfaktors NF κ B und zahlreicher Gene proentzündlicher Proteine (IL-1, IL-6, intrazelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM), vaskuläres Zelladhäsionsprotein (VCAM), TNF- α , Cyclooxygenase-2 (COX-2)). Die Nebenwirkungen korrelieren mit Dosis und Therapiedauer. Einmalige hohe Steroiddosen werden bei Menschen als nahezu nebenwirkungsfrei beschrieben [125]. In dem Experiment dieser Arbeit wurde an je 5 männlichen, 8 Wochen alten C57BL/6-Mäusen eine uIRI mit 35 min Ischämie- und 24 h Reperfusionszeit durchgeführt. Jeder Gruppe wurden einmalig 0,75 mg/kg KG Prednisolon i.p. verabreicht. Die Zeitpunkte zur Injektion variierten zwischen den Gruppen (1 h vor, 3 h, 6 h, 12 h nach der Operation). Die schematische Wirkungsweise von Prednisolon und das Experimentdesign sind in Abb. 13 gezeigt.

Abb. 13: Wirkungsweise und Experimentdesign für die Intervention mit Prednisolon nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung

A: Operations-Plan für den Ablauf des Experimentes

B: Molekulare Wirkungsweise von Glukokortikoiden. Die intrazellulären Glukokortikoidrezeptoren (GR) sind in unlegiertem Zustand an Hitzeschockproteine (HSP) gebunden. Die Bindung von Glukokortikoiden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors und er transloziert in den Zellkern. Dort bindet er an Zielgene und hemmt zahlreiche Transkriptionsfaktoren wie ‚Nuclear-Factor-Kappa-light-Chain-Enhancer of activated B-Cells‘ (NfκB). Eigene Abb. nach [125]



Behandlung mit Ferrostatin-1, Necrostatin-1 und Cyclosporin A

Ferrostatin-1 (3-Amino-4-Cyclohexylaminobenzolische Acidethylester, $C_{15}H_{22}N_2O_2$) ist ein Inhibitor der Erastin- und ROS-abhängigen Ferroptose [126]. Es wird vermutet, dass es als Fänger von lipidischen ROS fungiert und mit seiner N-Cyclohexen-Domäne in der biologischen Membran verankert ist [127] (siehe Abb. 15A).

Necrostatin-1 (Methylthiohydantion-DL-Tryptophan, $C_{13}H_{13}N_3OS$) ist ein Inhibitor der RIPK-1-Kinase, der als Schlüsselenzym der Nekroptose gilt [128]. Seine protektive Rolle für die renalen Tubuluszellen im ischämischen und toxischen Modell bei präemptiver Applikation wurde bereits bestätigt [87, 95, 129]. Die Wirkungsweise ist schematisch in Abb. 15B dargestellt.

Cyclosporin A ($C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$) wird als Immunsuppressivum z. B. nach Transplantationen, bei rheumatoider Arthritis oder bei Psoriasis eingesetzt. Es bindet zusammen mit dem Immunophilin Cyclophilin A (Poly-cis-trans-Isomerase) an die Phosphatase Calcineurin, wodurch es zur Hemmung der Lymphozytenproliferation und zur Immunsuppression kommt.

Zusätzlich wirkt es als spezifischer Inhibitor von Cyclophilin D (CypD). Dieses ist ein wesentlicher Bestandteil der MPT-RN (siehe Abb. 15C).

Nach einer Ischämiezeit von 35 min wurde jeder Gruppe mit je 5 männlichen, 8 Wochen alten C57Bl/6-Mäusen eine Mischung aus 10 mg/kg KG Ferrostain-1 und 1,65 mg/kg KG Necrostatin-1 i.p. im rechten unteren Quadranten des Abdomens sowie 2 mg/kg KG Cyclosporin A intravenös gespritzt. Der Zeitpunkt der Intervention variierte dabei zwischen 1 h vor sowie 3, 6 und 12 h nach der Operation. Die Mäuse wurden nach 24 h Reperfuionszeit getötet und ihre Organe entnommen (siehe Abb. 14).

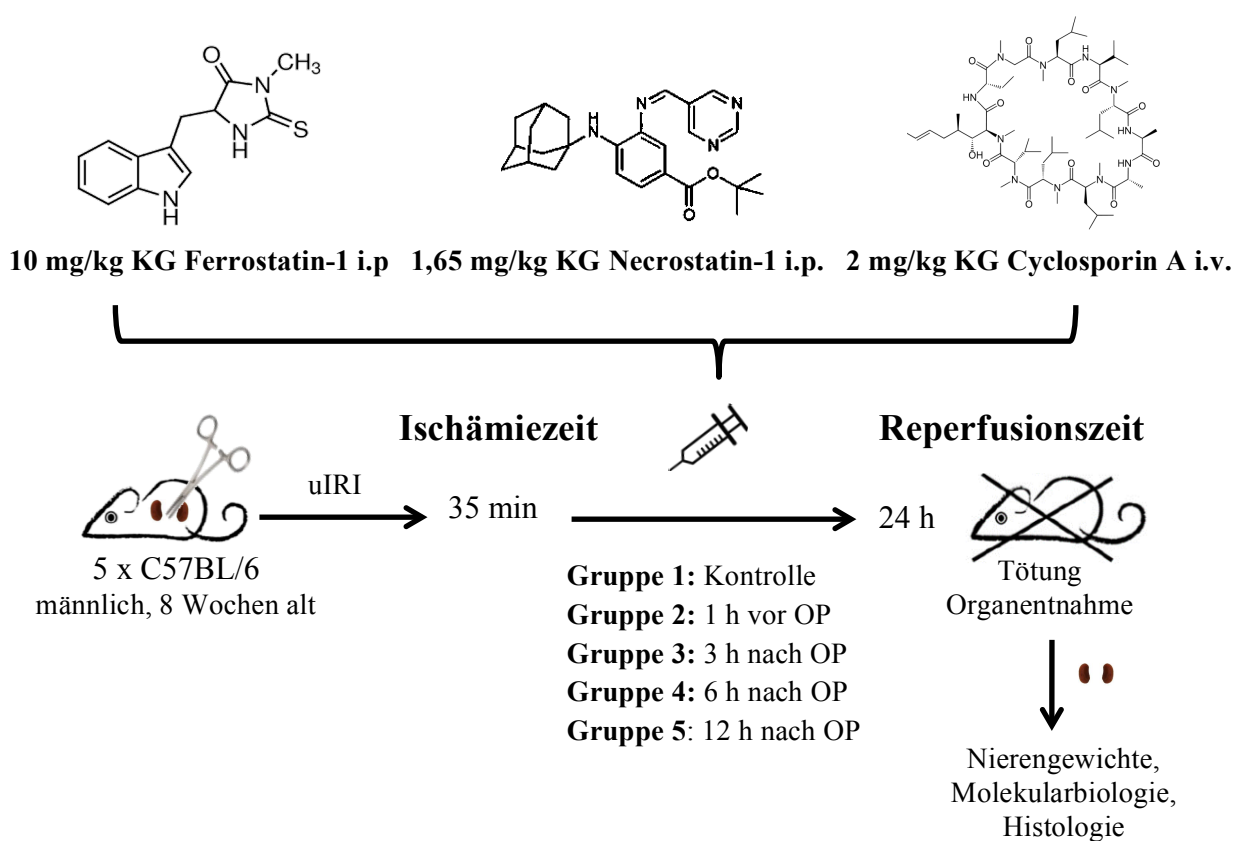


Abb. 14: Experimentdesign für die Zelltodblockade nach unilateraler Ischämie-Reperfuionsverletzung

Für die Experimente wurden pro Gruppe 5 männliche, 8 Wochen alte C57BL/6-Mäuse verwendet. Die Ischämiezeit betrug bei allen 35 min, die Reperfuionszeit 24 h. Den Mäusen wurden einmalig 10 mg/kg KG Ferrostain-1 und 1,65 mg/kg KG Necrostatin-1 intraperitoneal (i.p.) sowie 2 mg/kg KG Cyclosporin A intravenös (i.v.) injiziert – je nach Gruppe 1 h vor oder 3, 6 oder 12 h nach der Operation. Nach Ablauf der Reperfuionszeit wurde das Tier getötet, die Organe wurden entnommen und das Gewebe wurde weiterverarbeitet.

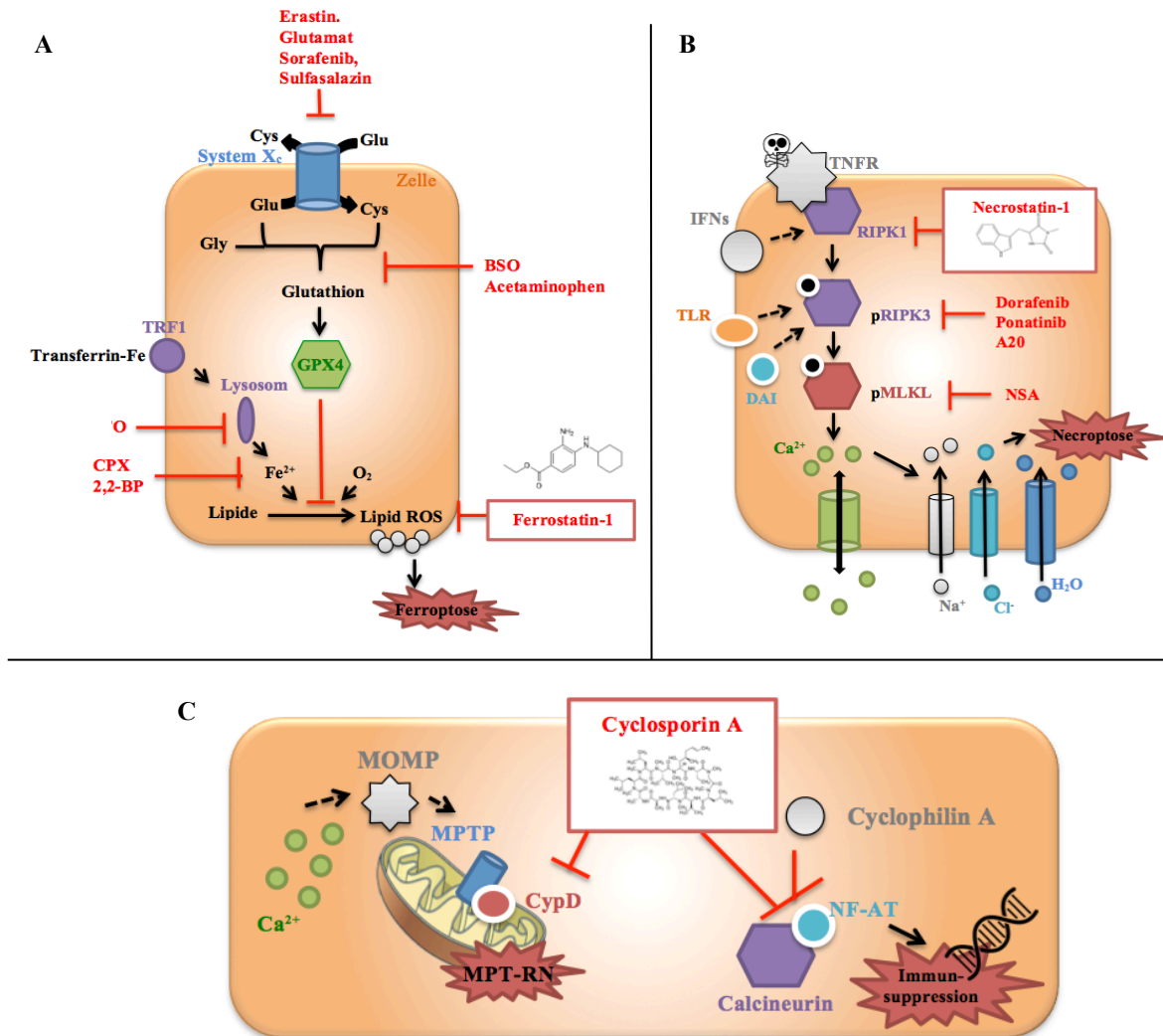


Abb. 15: Angriffspunkte der verwendeten Inhibitoren der regulierten Nekrose

A: Schematische Darstellung der Hemmung der Ferroptose durch Ferrostatin-1. Über ein Glutamat(Glu)/Cystein(Cys)-Antiporter-Xc-System wird Cystein in die Zelle geschleust und zu Glutathion weiterverarbeitet. Die Glutathionperoxidase 4 (GPX4) braucht dieses und Eisen (Fe²⁺), um die Entstehung von lipidischen Sauerstoffspezies (ROS) zu vermeiden, die zum Verlust der Plasmaintegrität führen können. Ferrostatin ist mit seiner N-Cyclohexen-Domäne in der biologischen Membran verankert und fungiert als Fänger der lipidischen ROS. Weitere hier hemmend wirkende Substanzen sind mit ihren Angriffspunkten eingezeichnet: L-Buthionin-Sulfoximin (BSO), Deforaximin (DFO), Cyclopirox (CPX), 2,2-biyridil (2,2-BP).

B: Schematische Darstellung der Hemmung der Nekroptose durch Necrostatin-1. Nach Aktivierung z. B. durch den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR), über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), CD95 oder den DNA-abhängigen Aktivator von Interferon (DAI) phosphoryliert die Rezeptor-interagierende Proteinkinase (RIPK1) mehrere RIPK3, die ein Nekrosom bilden. Die Pseudokinase Mixed-Lineage-Kinase-Domain-like Protein (MLKL) kann dann RIPK3 phosphorylieren, dies führt zu

Wassereinstrom, zellulärer Volumenzunahme und Membranruptur. Necrostatin-1 ist ein Inhibitor von RIPK1 und greift so in diesen Prozess ein.

C: Schematische Darstellung der Hemmung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-regulierten Nekrose (MPT-RN) durch Cyclosporin A. Dieses wirkt als spezifischer Inhibitor von Cyclophilin D (CypD) als wesentlicher Bestandteil der MPT-Pore. Durch diese kommt es zu einem Austausch zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol, was zu Depolarisation und Zellschwellung führt. Zusätzlich bindet Cyclosporin A zusammen mit Cyclophilin A an die Phosphatase Calcineurin. Diese kann dann den Nuclear Factor of activated T-cells (NF-AT) nicht mehr phosphorylieren. Eine Sekretion von immunstimulierenden Stoffen bleibt aus. Eigene Abb. nach [85].

Applikation der Testsubstanzen

Intraperitoneale Applikation von Etanercept, Prednisolon, Ferrostatin-1 und Necrostatin-1

Die anti-entzündlichen Substanzen Etanercept, Prednisolon sowie die Zelltodinhibitoren Ferrostatin-1 und Necrostatin-1 wurden i.p. injiziert. Hierfür wurde das Tier mittels Nackengriff fixiert und mit dem Kopf leicht nach dorsal gekippt gehalten, um die Organe aus dem Injektionsgebiet zu mobilisieren und eine Verletzung dieser zu vermeiden. Die Bauchwand wurde im unteren rechten Quadranten in Richtung Bauchmitte mit einem Winkel von 30–45° punktiert und die Testsubstanz injiziert.

Intravenöse Applikation von Cyclosporin A

Die Applikation von Cyclosporin A erfolgte intravenös über die V. facialis. Das Tier wurde hierfür zunächst mit Isofluran in Kurznarkose versetzt. Im inneren Augenwinkel wurde dann in einem Winkel von 30–45° eine 30G-Nadel angesetzt und zur Punktion der V. facialis vorsichtig vorgeschoben.

Euthanasie und Organentnahme

Nach Ablauf der Reperfusionzeit wurden die Mäuse unter Isofluran-Kurzarkose durch zervikale Dislokation getötet. Teilweise wurden vorher noch eine Urin- und Blutprobe entnommen. Die Blutentnahme erfolgte unter Isofluran-Inhalationsnarkose über Punktion der V. facialis mit einer 4-mm-Lanzette. Nach einer medianen Laparotomie Tier wurden die Nieren entnommen. Beide Organe wurden von ihrer Kapsel gelöst, gewogen und in 3 Teile geteilt. Der obere Pol diente der Untersuchung mittels molekularbiologischer Methoden und wurde in ein 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß mit ca. 1 ml RNAlater-Lösung gegeben und sofort bei -20 °C gelagert. Der mittlere Teil wurde in eine histologische Kasette gegeben und für 24 h in eine 4%ige Formalinlösung eingelegt, bevor diese dann mit Ethanol ausgewaschen und ein Paraffinschnitt angefertigt wurde. Der untere Nierenpol wurde in einem 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß mit 3 eingestochenen Löchern im Deckel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Der verbleibende Rest der Maus wurde fachgerecht entsorgt.

2.2.2. Genexpressionsanalyse

Gewinnung von Ribonukleinsäure (RNA)

Die Gewinnung der RNA aus dem in RNAlater konservierten oberen Nierenpol erfolgte mithilfe des ‚PureLink‘-RNA-Mini-Kits von ‚Ambion‘ nach bewährtem Schema. In Abb. 16 wird ein Überblick über die einzelnen Schritte bis zur Gewinnung der isolierten RNA gegeben.

Im Anschluss wurde die Integrität der gewonnenen RNA durch RNA-Gelelektrophorese überprüft. Hierfür wurden jeweils 2 μl der Probe mit 5 μl RNA-Ladepuffer vermischt und für 25 min bei 65 °C und dann für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf 2%iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetragen und es wurde für 30 min eine Spannung von 90 V angelegt. War die RNA von hoher Reinheit, zeigten sich in der Dunkelkammer unter UV-Licht deutliche, voneinander abgrenzbare Banden.

Für die Bestimmung des RNA-Gehaltes nach der Isolation wurde ein ‚NanoDrop‘-Spektrofotometer verwendet. Dieser Schritt war notwendig, um das Volumen der RNA-Lösung für die Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) zu berechnen. Nach Reinigung und Kalibrierung des Gerätes mit RNase-freiem Wasser wurden 2 μl aus der

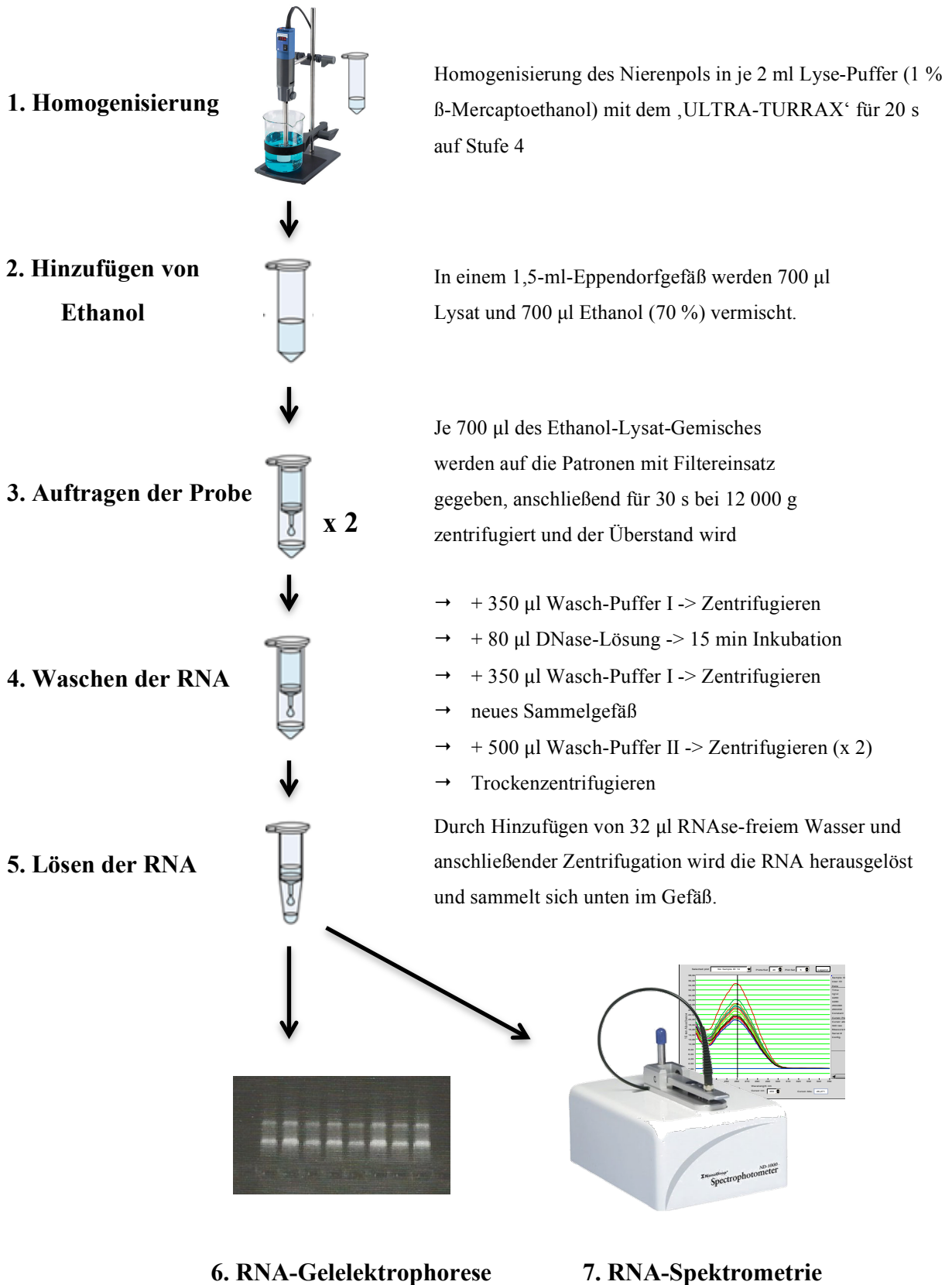


Abb. 16: Prozess der Isolation von RNA aus dem Nierengewebe. Abb. angelehnt an und modifiziert mit eigenen Abb. nach [130]

zuvor kurz mit dem Vortex gemischten Probe auf die Messoberfläche pipettiert und die Messung wurde gestartet. Die Software gab einen Konzentrationswert der RNA in ng/μl an und bestimmte das 260-nm/280-nm-Verhältnis. Dieses Verhältnis zeigte die Reinheit der RNA an und sollte zwischen 1,7 und 2,2 liegen. Davon abweichende Werte waren Zeichen für Protein-Kontaminationen und DNA-Verunreinigungen; RNA-Konzentrationen zwischen 0,7 und 1,4 ng/μl wurden akzeptiert.

Die RNA-Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$c(\mu\text{g/ml}) = \text{Extension bei 260 nm} * \text{Verdünnungsfaktor} * 1 \text{ optische Dichte (für RNA 40 } \mu\text{g/ml)}$$

Reverse Transkription

Nachdem die RNA aus dem Gewebe isoliert, ihre Konzentration mittels Spektrometrie bestimmt und die Reinheit durch Gel-Elektrophorese bestätigt wurde, erfolgte die Umschreibung in komplementäre DNA (cDNA) mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Damit diesem Enzym genügend Baustoffe zur Verfügung standen, wurde in der Vorbereitung ein Mastermix angesetzt. Für eine Probe bestand dieser aus: 1 μl Dithiothreitol (DTT), 0,25 μl Hexanucleotidmischung, 4,5 μl 5-x-Erststrang-Puffer, 0,25 μl 5 g/ml Linear Acrylamide, 0,45 μl 25 mM Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP) und 0,5 μl RNasin®. Nach Berechnung des erforderlichen Volumens der mRNA-Probe für die Umschreibung von 2 μl RNA wurde dieses Volumen in ein Corning®-Thermowell-Gefäß gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 13,2 μl aufgefüllt. Daraufhin wurde die Mischung mit dem Vortex durchmischt und im Thermocycler bei 65 °C für 5 min inkubiert und anschließend für weitere 5 min auf Eis gestellt. In einem neuen Corning®-Thermowell-Gefäß wurden dann je 7,45 μl des Mastermixes und 15 μl des verdünnten RNA-RNase-freien Wasser-Gemisches zusammengegeben, vorsichtig mittels Auf- und Abpipettieren vermischt und schließlich wurden pro Probe 0,5 μl Superscript II hinzugegeben. Zusätzlich wurde eine RT⁻-Gruppe angesetzt, bei der die Reverse Transkriptase durch 0,5 μl Wasser ersetzt wurde. Diese diente später als Kontrolle, um festzustellen, ob die mRNA mit genomischer DNA kontaminiert war. Im Thermocycler wurde das komplette Reaktionsgemisch dann zunächst für 90 min bei für das Superscript II optimalen 42 °C und abschließend noch für 5 min bei 85 °C inkubiert, um die enzymatische Reaktion durch die Hitze zu stoppen. Die Probe wurde dann direkt weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit

Die Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit (engl. Real-Time Polymerase-Chain-Reaction, RT-PCR) wurde 1985 von Kary B. Mullis entwickelt und ist heute eine der bedeutsamsten Methoden der Molekularbiologie für Amplifikation, Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren. Die PCR besteht aus mehreren Zyklen. Jeder Zyklus gliedert sich in 3 Phasen, die bei unterschiedlicher Temperatur ablaufen: Denaturierung (95 °C), Anlagerung (5 °C unterhalb des Primer-Optimums) und Elongation (70–72 °C, je nach Optimum der verwendeten Polymerase). Bei der Denaturierung erfolgt durch die hohe Temperatur eine Auftrennung der DNA-Doppelstränge. Je höher der Guanin-Cytosin(GC)-Gehalt der DNA, umso länger sollte diese Phase dauern. Im zweiten Schritt wird die Temperatur auf 60 °C heruntergefahren. Hier lagern sich die sogenannten ‚Primer‘ an die entstandenen Einzelstränge an. Dies sind komplementäre Oligonukleotide, die die Sequenz des DNA-Abschnitts begrenzen, der nachgewiesen oder vervielfältigt werden soll. An ihnen setzt bei der Elongation die Polymerase an und synthetisiert bei ausreichend vorhandenen Baustoffen einen komplementären Strang. Durch Einbringen eines fluoreszierenden Farbstoffes, wie das hier verwendete SYBR-Green, kann eine quantitative Bestimmung in Echtzeit erfolgen. Der Farbstoff interkaliert in die entstandene Doppelstrang-DNA und die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Menge des entstandenen Produkts.

Zu Beginn der PCR sind nur wenige Zielsequenzen vorhanden und die Amplifizierungsrate ist gering. In fortgeschrittenen Zyklen kann das Problem auftauchen, dass zu viele Produkte vorhanden sind und dass diese mit sich selbst hybridisieren. Entscheidend für die Quantifizierung ist daher der Zeitraum dazwischen, in dem eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz erfolgt. Der Beginn dieser Phase wird durch den Schwellenwertzyklus (engl. Threshold-Cycle-value, C_t -Wert) markiert. Dieser wird erreicht, wenn das detektierte Fluoreszenzsignal erstmals signifikant den Wert der Hintergrundfluoreszenz überschreitet. Der C_t -Wert des Zielorgans wird mit dem eines Haushaltsgenes – ein Gen, das in allen Proben gleichermaßen vorhanden ist – als endogene Referenz verglichen. In den Experimenten wurde hierfür 18S verwendet. Gemäß $\Delta C_t = C_{t18S} - C_{tGen}$ ergibt sich so für den Expressionswert des Zielgens: $2^{\Delta C_t}$.

In dieser Arbeit wurde für die quantitative RT-PCR ein ‚LightCycler 480‘ mit SYBR-Green-Detektions-System verwendet. Die benötigten Primer wurden zunächst recherchiert, größtenteils eigenständig designt, auf Dimere und Funktionstüchtigkeit überprüft und im Verhältnis 1:10 mit Diethyldicarbonat-behandeltem Wasser (DEPC) verdünnt.

Nach Planung der Verteilung der Gene und Primer auf der 96-Schacht-Platte wurde in jeden Schacht Folgendes pipettiert:

10 µl	Mastermix mit SYBR-Green (Material)
0,6 µl	5'-3' Primer (1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt)
0,6 µl	3'-5' Primer (1:10 mit DEPC-Wasser verdünnt)
0,16 µl	Taq-Polymerase
8,64 µl	Aus 0,2 µl DNA Probe (RT+ oder RT-) mit 8,44 µl DEPC-Wasser

Die Proben wurden auf Eis pipettiert und mit Ausnahme der Taq-Polymerase wurde alles mit dem Vortex vorsichtig vermischt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit des SYBR-Greens wurde währenddessen eine Lichteinstrahlung vermieden und es wurde verdunkelt gearbeitet. Zusätzlich zu RT⁻-Proben wurden noch Schächte ausschließlich mit Wasser gefüllt, um die Kontamination des PCR-Mastermixes zu überprüfen. Nach dem Auftragen wurde die 96-Schacht-Platte mit Klebefolie versiegelt und für 2 min bei 4 °C und 280 g zentrifugiert.

Im ‚LightCycler‘ wurde dann die RT-PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

Tab. 5: Parameter des ‚LightCycler 480‘ bei der Durchführung der Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

	Dauer	Temperatur (°C)	Zyklen
Vordenaturierung	5 min	95	1
Denaturierung	15 s	95	
Anlagerung	45 s	60	40 Wiederholungen
Extension	30 s	72	
Schmelzkurve	5 s	95	1
	10 min	Schrittweise von 65 – 95	

Mittels ‚Microsoft-Excel‘ wurden abschließend die C_t -Werte ausgewertet ($2^{C_t_{18S} - C_t_{Gen}}$) und mit dem Programm ‚GraphPad PRISM‘ wurden entsprechende Graphen erstellt.

Primerdesign

Funktionsfähige und spezifische Primer sind essenziell für ein brauchbares PCR-Ergebnis. Ein großer Teil der in den Experimenten verwendeten Primer wurde hierfür selbst designt. Verwendet wurde hierfür zunächst das Portal ‚Ensemble.org‘, um die codierenden Sequenzen und Transkripte zu identifizieren und zu kopieren und um dann die Primer mittels ‚Primer-BLAST‘ zu generieren. Die Primerpaare (jeweils 18–24 Nukleotide) amplifizieren dabei einen komplementären Strang mit einer Produktlänge von 120 bis max. 250 Basenpaaren (bp). Die Schmelztemperatur (T_m) sollte zwischen 59°C und 60 °C liegen. Es wurde ein GC-Gehalt von 50 % angestrebt, auch das 3`-Ende sollte möglichst GC-haltig sein zur Erhöhung der Primerspezifität. Mittels der Internetplattform ‚LocalAlignment Search Tool‘ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurde dann die Spezifität des Primers überprüft und die Nukleotidsequenzen wurden mithilfe von Datenbanken auf statistische Signifikanz verglichen. Damit der Primer eine hohe Spezifität für seine Sequenz hat, wurden hier nur solche mit niedrigem E-Wert sowie 100 % ‚Query‘ und ‚Ident‘ weiterverwendet. Im letzten Schritt der Primertestung wurden diese dann in einem PCR-Durchlauf mit verschiedenen Proben getestet, darunter eine stark und eine weniger positive RT^+ -Probe des Zielgenes, RT^- -Proben und Wasser. Neben dem zu erwartenden Expressionslevel wurde hier besonders auf korrekte Schmelzkurven geachtet, um Primer-Dimere oder nicht spezifisch amplifizierte Produkte auszuschließen.

2.2.3. Gewebe- und Immunhistologie

Herstellung der Paraffinschnitte

Nach Organentnahme wurde der mittlere Nierenteil zunächst für 24 h in Histokassetten in 4%iger Formalinlösung gelagert, mit Ethanol ausgewaschen und in Paraffin gebettet. Die Paraffinblöcke wurden dann in der Frontalebene in je 2 µm dicke Scheiben geschnitten und auf Ammoniumperoxidsulfat-(APS)-behandelten Objektträgern für 12 h im Trockenschrank

bei 37 °C inkubiert. Für die Ausschwemmung des Paraffins wurden die Schnitte für 3 x 5 min in Xylol gewaschen. Die Rehydrierung im Anschluss erfolgte mit einer absteigenden Ethanolreihe: 3 x 3 min 100 % Ethanol, 2 x 3 min 95 % Ethanol, 1 x 3 min 70 % Ethanol. Abschließend wurde noch für 2 x 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt wurden dann verschiedene Färbetechniken angewendet.

Periodsäure-Schiff-Färbung

Die Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS-Färbung) wurde benutzt, um den histologisch sichtbaren Schaden im Nierengewebe mittels tubulärem Schädigungsindex (engl. Tubular-Injury-Score, TIS) zu beurteilen.

Für die Färbung wurden die Schnitte zunächst für 5 min in Periodsäure (HIO₄) inkubiert. Dadurch wurden die freien Hydroxylgruppen, die z. B. in kohlenhydrathaltigen Komponenten des renalen Tubulussystems vorkommen, zu Aldehyden oxidiert. Nach Auswaschung mit destilliertem Wasser wurde dann fuchsinschwefelige Säure aufgetragen und es wurde nochmals für 20 min inkubiert. Fuchsinschwefelige Säure bildet mit den entstandenen Aldehydgruppen rot-violette Komplexe, die im histologischen Bild zu sehen sind. Anschließend wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt, nach 2 min gewaschen, der Schnitt kurz in 90%ige Alkohollösung getaucht und im Anschluss getrocknet.

Masson-Goldner-Trichromfärbung

Die Masson-Goldner-Trichromfärbung dient der Darstellung des Bindegewebes. Mit Eisenhämatoxylinlösung erfolgt zunächst eine Kernfärbung. In der eigentlichen Trichromfärbung werden dann Farbstoffe eingesetzt, die sich in ihrer Molekülgröße unterscheiden und unterschiedlich schnell in das Gewebe eindringen. Die Goldner-Lösung I färbt Muskulatur und Zytoplasma (Ponceau) sowie Bindegewebe rot (Säurefuchsin). Mit der Goldner-Lösung II wird das Bindegewebe wieder entfärbt (Phosphorwolframsäure) und Erythrozyten werden orangefarben (Orange G) dargestellt. Die dritte Goldner-Lösung färbt das Bindegewebe grün (Lichtgrün SF).

Im ersten Schritt wurden alle entparaffinierten Schnitte mit Eisenhämatoxylinlösung nach Weigert für max. 3 min gefärbt und unter fließendem Leitungswasser gespült. Als nächstes

wurde die Färbung mit Goldner-Lösung I für 10 min und eine halbminütige Spülung mit 1%iger Essigsäure durchgeführt. Dann wurde die Goldner-Lösung II bis zur Entfärbung des Bindegewebes aufgetragen; dies trat nach 1–3 Minuten ein. Die Überprüfung erfolgte unter dem Mikroskop. Nach erneutem Spülen mit 1%iger Essigsäure für 30 s wurde mit Goldner-Lösung III für 6 min gegengefärbt. Im letzten Schritt wurde noch einmal mit 1%iger Essigsäure für 2–5 min gespült und es wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 % nach 96 % nach 100 % und mit Xylol ausgewaschen. Abschließend wurden die Schnitte eingedeckt.

Immunhistochemie

Wie bei den histochemischen Färbungen erfolgte auch hier zunächst eine Herstellung von Paraffinschnitten und eine anschließende Entparaffinierung in zuvor beschriebener Weise. Für die immunhistochemische Färbung wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) benutzt. Hierbei bindet zunächst ein primärer Antikörper an das gewünschte Epitop. Ein biotinylierter sekundärer Antikörper bindet dann an den primären Antikörper. Wird nun Avidin hinzugegeben, bindet dies mit einer seiner insgesamt vier Bindungsstellen an das Biotin des sekundären Antikörpers. Die übrigen drei Bindungsstellen des Avidins können mit anderen biotinhaltigen Makromolekülen besetzt werden. So entsteht ein Biotin-Avidin-Komplex, bei dem viele Enzymmoleküle an einen primären Antikörper gekoppelt sind (siehe Abb. 17). Die Farbreaktion wird dann mit löslichen Substanzen durchgeführt, die das Enzym in einen unlöslichen Farbstoff überführen. Dieser fällt aus und färbt das Antigen an seinem Ort an. Die Intensität ist in groben Abstufungen mit der Menge des Antigens proportional.

Zunächst wurde für die Färbung die endogene Peroxidase blockiert. Hierfür wurden die Schnitte in einem Gemisch aus 20 ml 30%igem H_2O_2 und 180 ml Methanol für 20 min im Dunkeln inkubiert und nach kurzem Schwenken zweimal für 5 min in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Als Nächstes erfolgte die Demaskierung. Hier kommt es durch Reaktionen mit Formalin zu Antigen-Vernetzungen, die den Zugang zu den Epitopen der Antigenoberfläche erschweren. Bei der Demaskierung wurden daher die Schnitte für 10 min mit 300 ml Aqua dest. und 3 ml Demaskierungslösung in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Alle 2,5 min wurde der Wasserstand überprüft und wieder aufgefüllt. Nach 20 min wurden die Schnitte erneut in PBS gewaschen. Zur Blockade des endogenen Biotins wurde

nun ein Tropfen Avidin mit 15 min Inkubationszeit hinzugegeben. Selbiges wurde mit Biotin wiederholt. Nun wurde der Primärantikörper aufgetragen und entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und für 30 min in der Feuchtkammer belassen. Gleiches wurde dann mit der ABC-Lösung wiederholt. Dazwischen wurde immer wieder mit PBS gewaschen. Zur Visualisierung des Avidin-Biotin-Komplexes wurde anschließend eine Mischung aus 4 ml Diaminobenzidin (DAB), 1 ml NaCl und 500 µl H₂O₂ verwendet und es wurde mit Methylgrün gegengefärbt. Die überschüssige Farbe wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe von 96 %–100 % und mit Xylol entfernt. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit ‚VectaMount‘ eingedeckt und getrocknet.

Terminal-Desoxyribonucleotidyltransferase-mediated-Desoxyuridin-Triphosphat-Nick-End-Labeling-Färbung

Die TUNEL(Terminal-Desoxyribonucleotidyltransferase(TdT)-mediated-Desoxyuridin-Triphosphat (dUTP)-Nick-End-Labeling)-Färbung ist eine Methode zur Anfärbung von DNA-Fragmenten im histologischen Präparat. Es wurde das ‚TUNEL Apo-Green Detection Kit‘ von biotools.com verwendet. Hierbei wird das freie 3'-OH-Ende von DNA-Fragmenten durch das Enzym TdT mit markierten Fluorescein(FITC)-12-dUTP-Nukleotiden versehen, die dann aufgrund ihrer Fluoreszenz im Mikroskop sichtbar gemacht werden können (siehe Abb. 17).

Zunächst wurden die Schnitte mit Xylol und absteigender Ethanolreihe entparaffiniert und rehydriert. Auf jeden Schnitt wurden anschließend für 8–20 min 100 µl einer 20-µg/ml-Proteinkinase-K-Lösung gegeben, um das Gewebe für die folgenden Reagenzien durchlässiger zu machen. Nach einem 5-minütigen Waschvorgang mit 0,2 % Triton x-100 enthaltender PBS wurden die Proben für 5–10 min mit Equilibrierungs-Puffer bedeckt. Dann wurden 50 µl der zuvor vorbereiteten Reaktions-Mischung (34 µl ddH₂O, 34 µl Equilibrierungs-Puffer, 5 µl Apo-Green-Mix, 1 µl TdT-Enzym) aufgetragen und es wurde für 60 min inkubiert. Eine Lichtexposition wurde währenddessen vermieden. Danach wurde 3 Mal mit PBS gewaschen und der Kern wurde mit 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI) angefärbt. Es erfolgte eine letzte Spülung mit PBS. Im Anschluss wurden die Schnitte sofort unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Apo-Green-Fluoreszenz zeigte sich bei 520 ± 20 nm, blaue DAPI-Fluoreszenz bei 460 nm. Nach etwa 24 h war die Färbung vollständig verblasst und nicht mehr auswertbar.

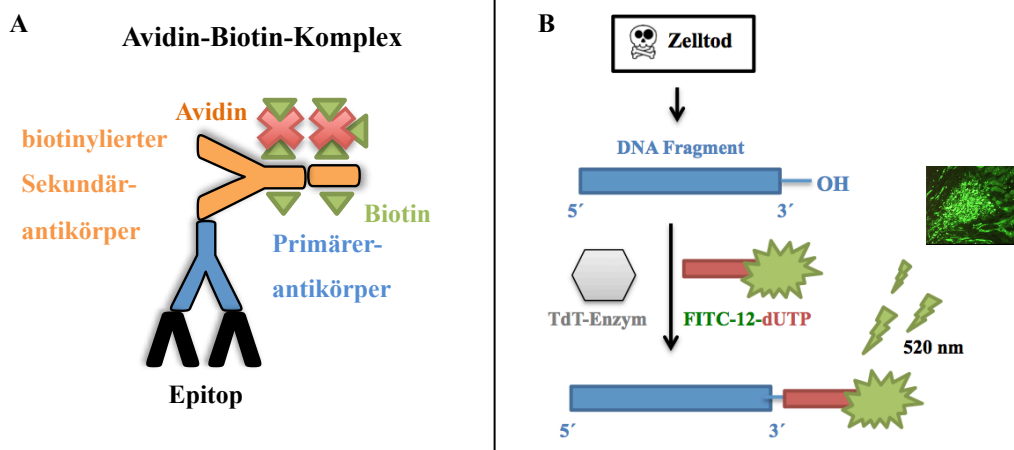


Abb. 17: Immunhistochemie

A: Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode). Ein Primärantikörper bindet an das gewünschte Epitop. An diesen bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper. Wird Avidin hinzugegeben, kann dies mit seinen vier Bindungsstellen an das Biotin des Sekundärantikörpers binden und Avidin-Biotin-Komplexe bilden. Beide werden dann in einen unlöslichen Farbstoff überführt und sichtbar gemacht. Eigene Abb. nach [131].

B: Prinzip der Terminal-Desoxyribonucleotidyltransferase-mediated-Desoxyuridin-Triphosphat-Nick-End-Labeling-Färbung (TUNEL-Färbung). Das freie 3'-OH-Ende der bei einem Zelltod entstehenden DNA-Fragmente wird durch das TdT-Enzym mit markierten FITC-12-dUTP-Nukleotiden versehen, die aufgrund ihrer Fluoreszenz im Mikroskop sichtbar gemacht werden können. Eigene Abb. nach [132].

Histologische Evaluation der Zellen

Periodsäure-Schiff-Färbung

Unter dem Lichtmikroskop wurden die PAS-Schnitte auf die Integrität der Tubuli und auf Tubulusschäden hin untersucht. Der Schwerpunkt lag hier auf dem S3-Segment des proximalen Tubulus. Zur Evaluation wurde der TIS verwendet. Für vier Kategorien (Bürstensaumverlust, Tubulusdilatation, Nekrose und Zylinder) wurden in aufsteigendem Schweregrad jeweils 0–10 Punkte vergeben und eine Gesamtpunktzahl ermittelt. Eine Punktzahl von 0 entsprach dabei einer gesunden Niere, eine von 30–40 einer nahezu vollständig zerstörten. Es wurden jeweils 3 Gesichtsfelder pro Niere bei 100x Vergrößerung ausgezählt und gemittelt. Die endgültige Punktzahl ergab sich dann aus dem Mittelwert aller fünf Nieren pro Gruppe.

Neutrophile-, Ki-67- und TUNEL-Färbung

Für die Auswertung der immunhistochemischen Färbetechniken wurden zunächst drei Bilder pro Niere für alle fünf Mäuse pro Gruppe in gleicher Vergrößerung am Mikroskop aufgenommen. Anschließend wurde mittels ‚ImageJ‘ jeweils das färbungstypische Merkmal quantifiziert. In der Neutrophilenfärbung entsprach dies den punktförmigen, schwarz angefärbten Neutrophilen, bei Ki-67 dem dunkel angefärbten Protein und in der TUNEL-Methode dem Anteil an grüner sichtbarer Fluoreszenz des an die DNA-Fragmente angeschlossenen FITC-12. Hierfür wurde das Bild zunächst am PC in seine 8-Bit-Form umgewandelt und anschließend wurde in ‚ImageJ‘ die Farbschwelle (eng. Threshold) so eingestellt, dass nur noch die Farbe von Interesse angezeigt wurde. Über die Analysefunktion des Programmes konnten dann die Gesamtfläche und die prozentuale Fläche ermittelt werden (siehe Abb. 18). Dabei wurden pro Niere drei Aufnahmen der gleichen Vergrößerung gemacht und der erhaltene Wert wurde gemittelt. Der Endwert ergab sich dann aus dem Mittel aus allen fünf Nieren einer Gruppe. Alle Bilder eines Experiments wurden an einem Stück mit gleichen Einstellungen am Mikroskop aufgenommen und mit derselben Farbschwelle eingestellt, um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erzielen. Abschließend wurden die Ergebnisse mit ‚Microsoft Excel‘ oder ‚GraphPad PRISM‘ ausgewertet und grafisch dargestellt.

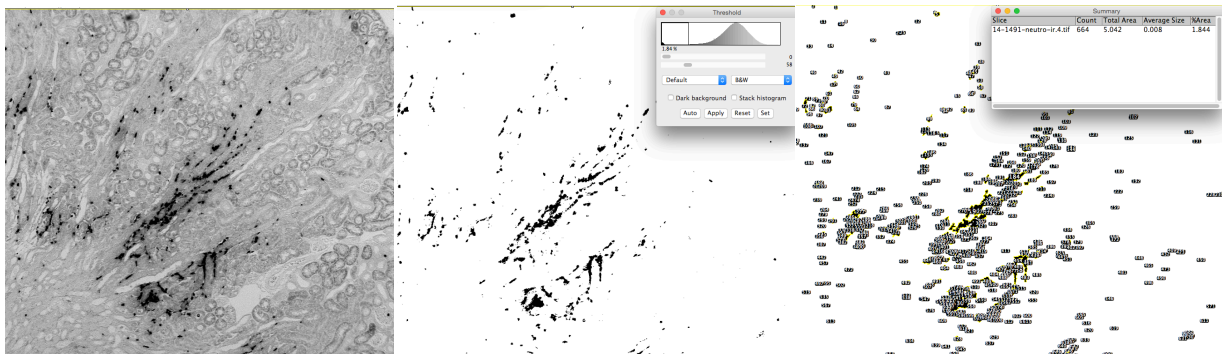


Abb. 18: Histologische Auswertung der Neutrophilenfärbung mithilfe von ‚ImageJ‘

Nach 8-Bit-Transformation des Bildes wurde die Farbschwelle entsprechend eingestellt und der prozentuelle Anteil der ‚schwarzen Neutrophilen‘ wurde ermittelt. Eigene Abbildung.

2.2.4. Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest

Bei dem Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA) handelt es sich um eine immunologische Methode zur Detektion von Peptiden, Proteinen, Antikörpern und Hormonen. Grundlage der Technik ist eine Antigen-Antikörper-Komplex-Bildung mit einer enzymatischen Farbreaktion [133].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt, bei dem die zu analysierende Substanz zwischen zwei primären Antikörpern gebunden ist – dem Fänger- und dem Erkennungsantikörper. Zunächst wurde eine 96-Schacht-Platte mit einem spezifischen Fängerantikörper gegen das gesuchte Antigen beschichtet. Nach Zugabe einer Probe, die dieses enthält, bildete sich ein Antigen-Antikörper-Komplex. In einem Waschschrift wurde dann der überschüssige, nicht gebundene Teil entfernt. Nun erfolgte die Zugabe des Erkennungsantikörpers, der an diesen Komplex binden kann. Der Antikörper war mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nach erneutem Waschen wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin hinzugegeben. Dieses wird von HRP umgewandelt, was einen Farbumschlag erzeugt. Durch Zugabe von Schwefelsäure (H₂SO₄) wurde der Vorgang dann beendet. Das Ausmaß des Farbumschlags wurde fotometrisch bestimmt und mit einer Standardreihe verglichen.

Muriner Kidney-Injury-Molecule-1 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest

Dieser ELISA zur Detektion von Kidney-Injury-Molecule-1 (KIM-1) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde die 96-Schacht-Platte vorbereitet, mit je 100 µl des in 1 ml PBS verdünnten Fängerantikörpers pro Schacht beschichtet und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde zunächst 3 Mal mit dem Waschpuffer (400 µl pro Schacht, 0,05 % Tween 20® in PBS) gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde die Platte invertiert und auf einem sauberen Tuch ausgeklopft. Daraufhin wurden pro Schacht 300 µl des Blockpuffers (1 % Bovines Serum-Albumin (BSA) in PBS) hinzugegeben und die Platte wurde für 1 h stehen gelassen. Nach erneutem Waschvorgang wurden nun je 100 µl der Probe oder der verdünnten Standardreihe nach zuvor überlegtem Schema aufgetragen. Die Platte wurde versiegelt, für 2 h inkubiert und gewaschen. Nun wurden je 100 µl des Erkennungsantikörpers aufpipettiert, erneut für 2 h inkubiert und gewaschen. Anschließend wurden in jeden Schacht 100 µl des Streptavidin-

HRP gegeben, die Palette wurde versiegelt und für 20 min im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte ein fünfter Waschvorgang und 100 μ l Substratlösung (1:1-Mischung aus H_2O_2 und Tetramethylbenzidin) wurde hinzugegeben. Nach 20 min wurden 50 μ l Stopplösung (2N H_2SO_4) hinzugefügt und die Reaktion wurde gestoppt. Sofort wurde das Ausmaß der Färbung im Fotometer bei 45 nm gemessen. Zur Korrektur und zum Ausgleich von Artefakten wurde noch eine Messung bei 540 nm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte dann mithilfe von ‚Microsoft Excel‘. Hierfür wurde zunächst der 450-nm-Wert vom 540-nm-Wert subtrahiert und es wurde eine Standardkurve erstellt. Mithilfe des Verdünnungsfaktors konnte dann die Menge an KIM-1 berechnet und der Quotient aus dem KIM-1/Kreatinin-Wert gebildet werden.

2.2.5. Statistische Auswertung

Die experimentellen Gruppen bestanden aus je 5 Mäusen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung (\pm SEM) angegeben, der den Quotienten aus Standardabweichung und Quadratwurzel der Anzahl der Proben darstellt. Grafisch wird der SEM als Fehlerbalken angezeigt. Die Gruppen wurden mittels Student's t-Test verglichen. Der Vergleich mehrerer Gruppen erfolgte mittels ‚One-Way-Analysis of Variance‘ (One-Way-ANOVA) mit Post-hoc-Bonferronikorrektur. Die p-Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. In der grafischen Auswertung wurde die statistische Signifikanz durch Sterne markiert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die grafische Darstellung und die statistischen Analysen wurden mithilfe der ‚GraphPad-PRISM‘-Software durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss der Ischämiezeit bei unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung

Zunächst sollte eine mögliche Schädigungsschwelle identifiziert werden, ab der es zu einer progressiven und noch nach Wochen nachweisbaren Nierenzellschädigung kommt. Hierfür wurde eine uIRI mit unterschiedlichen Ischämiezeiten durchgeführt. Die Reperfusionzeit wurde im ersten Teilansatz auf 24 h gesetzt, um das akute Geschehen und die frühe Phase zu beobachten. Im zweiten Ansatz betrug die Reperfusionzeit 5 Wochen für die Beobachtung der chronischen Ereignisse. Das Experimentdesign hierfür ist im Methodenteil dieser Arbeit in Abb. 11A zusammengefasst.

3.1.1. Einfluss der Ischämiezeit auf die fortgesetzte Nierenschädigung

Zunächst wurde zur Quantifizierung der Nierenschädigung die Expression verschiedener Schädigungsmarker mithilfe der PCR untersucht. Das Zellmembranglykoprotein KIM-1 wird bei einem Zellschaden von proximalen Tubuluszellen abgeschilfert und gilt als früher und sensitiver Schädigungsmarker [134]. Es ist darüber hinaus selbst in die Pathogenese des Schadens involviert und spielt eine Rolle bei der Regeneration nach ANV [135, 136]. Neutrophilengelatase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) ist ein im distalen Nephron produziertes und frühzeitig bei tubulärem Schaden hochreguliertes Protein, dessen erhöhte Serumlevel bereits vor denen des Serumkreatinins nachzuweisen sind [137]. Clusterin gehört zu den HSP und zeigt erhöhte Werte beim Untergang von Nierenzellen. Seine sekretorische Form gilt darüber hinaus als antiapoptotisch [138].

Für eine Reperfusionzeit von 24 h zeigte sich in der RT-PCR bei allen Ischämiezeiten eine signifikant erhöhte Expression der Marker gegenüber der kontralateralen Niere und gegenüber den Nieren der gesunden Kontrollgruppe. Die höchsten Werte wurden jeweils bei 35 min Ischämiezeit erreicht (Abb. 19A). Im chronischen Ansatz mit 5-wöchiger Reperfusionzeit ließ sich eine statistisch signifikante Erhöhung aller drei Schädigungsmarker nur noch in der ischämischen Niere nach 35 oder 45 min Ischämiezeit finden. Bei einer Ischämiezeit von 15 oder 25 min waren kaum erhöhte Expressionslevel zu verzeichnen. In der Gruppe mit einer Ischämiezeit von 45 min war die höchste Differenz in den Expressionslevels von KIM-1, NGAL und Clusterin gegenüber der Kontrollgruppe zu sehen (Abb. 19B).

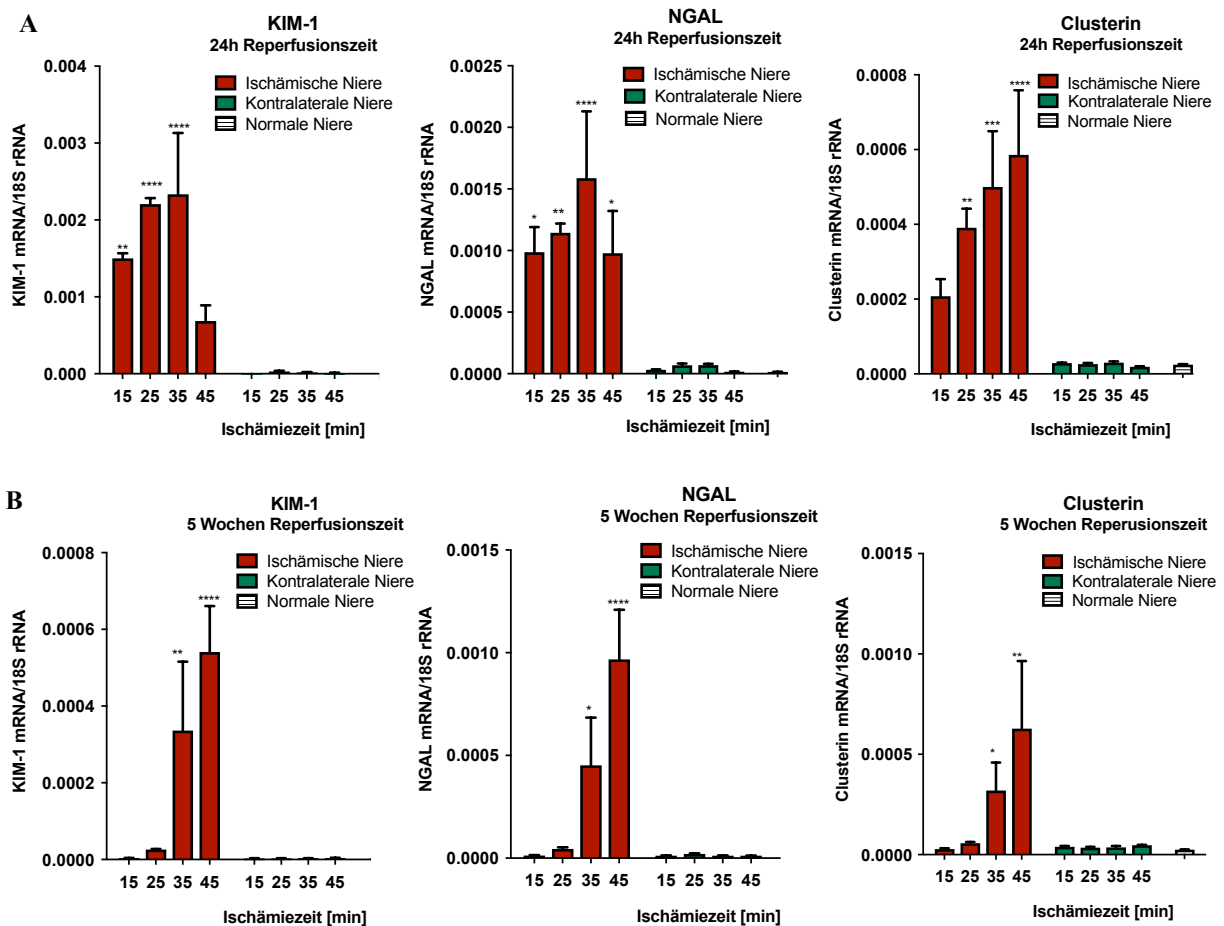


Abb. 19: Genexpressionslevel von Schädigungsmarkern nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung (uIRI) in Abhängigkeit von der Länge der Ischämiezeit

Nach Abklemmung der linken Nierengefäße von je 5 C57BL/6-Mäusen für 15, 25, 35 oder 45 min erfolgte nach Ablauf der Reperusionszeit die Nierenentnahme. Die mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR für verschiedene Schädigungsmarker quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als jeweilige GenmRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Expression bei gesunden Mäusen (normale Niere).

A: Genexpressionslevel der Schädigungsmarker für unterschiedliche Ischämiezeiten (15, 25, 35, 45 min) und 24 h Reperusionszeit.

B: Genexpressionslevel der Schädigungsmarker für unterschiedliche Ischämiezeiten (15, 25, 35, 45 min) und 5 Wochen Reperusionszeit.

Zur histologischen Quantifizierung der Schädigung wurde der TIS bestimmt. Die Ergebnisse spiegeln die Beobachtungen auf Genexpressionsebene wieder (Abb. 20C). Auch hier fanden sich nach 24 h in allen Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte Punktzahlen und signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 20A), die nach 5 Wochen

abnahmen (Abb. 20B). Gegenüber der kontralateralen Niere signifikant erhöhte Schädigungen ließen sich nur ab einer Ischämiezeit von 35 min mit einem Mittel von $15,6 \pm 1,17$ SEM und bei 45 min mit $28,2 \pm 0,58$ SEM nachweisen. Zwischen dem Mittelwert \pm SEM der Gruppen mit 45 min und 35 min bzw. 35 und 25 min Ischämiezeit bestand jeweils eine 4-fache Signifikanz ($p < 0,0001$).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die Expression von Schädigungsmarkern in der RT-PCR und das histologische Bild in der PAS-Färbung direkt mit der Länge der Ischämiezeit bei uIRI korrelieren. Eine höhere Ischämiezeit ist mit stärkeren Schäden verbunden. Ab einer Ischämiezeit von 35 min kommt es zu Schäden, die auch 5 Wochen später noch signifikant erhöht nachzuweisen sind.

3.1.2. Einfluss der Ischämiezeit auf die fortgesetzte Entzündungsantwort

Ein wesentlicher Hauptakteur der Nekroinflammation ist die Entzündungsreaktion. Ebenso wie in dem vorherigen Abschnitt für die Beurteilung des Nierenschadens erläutert, wurde mit PCR-Markergenen für das Entzündungsgeschehen gearbeitet, um den Effekt der Ischämiezeit auf die Entzündungsreaktion in der akuten und chronischen Phase nach uIRI zu untersuchen. Als relevante Gene in der RT-PCR dienten hier das proinflammatorische und vor allem von Makrophagen sezernierte Zytokin $\text{TNF-}\alpha$, als Mitglied der CC-Subfamilie der Chemokine der CC-Chemokine-Ligand 2 (CCL2, auch Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP1)), der an Orten der Entzündung von Monozyten, T-Gedächtniszellen und dendritischen Zellen gebildet wird und die Infiltration und Migration von Monozyten und Basophilen reguliert [139], und Interleukin 6 (IL-6), das nach Bindung an seinen Rezeptor am JAK-STAT- und MAP-Kinase-Weg wirkt und als Aktivator der Akute-Phase-Proteine und Lymphozyten-stimulierenden Faktoren angesehen wird [140].

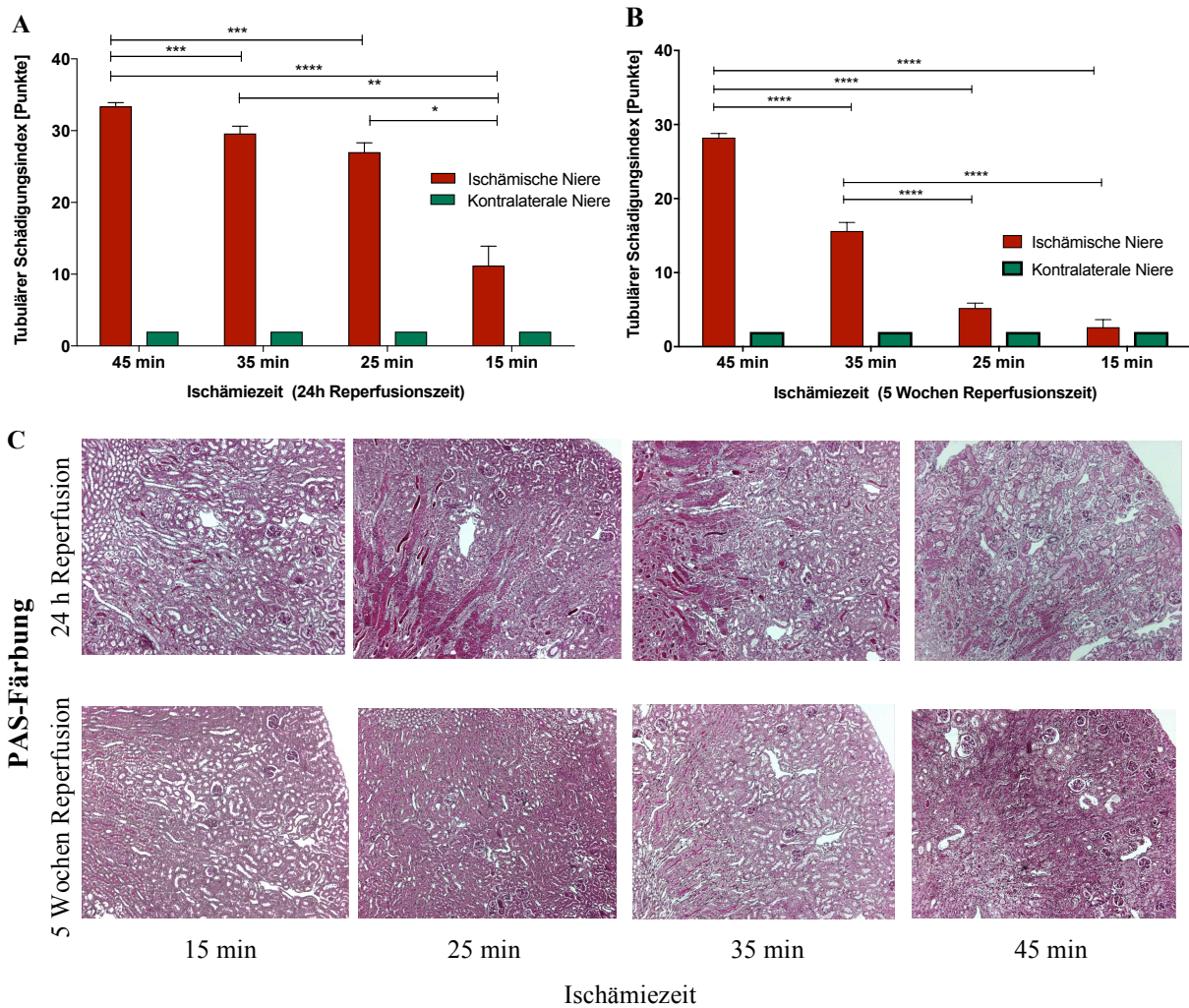


Abb. 20: Tubulärer Schädigungsindex in der Periodsäure-Färbung für unterschiedliche Ischämiezeiten nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung (uIRI) mit 24 h und 5 Wochen Reperusionszeit

Nach uIRI mit je 25, 35 oder 45 min Ischämiezeit pro Gruppe erfolgte nach 24 h bzw. 5 Wochen Reperusionszeit die Nierenentnahme. Die Nierenschnitte wurden mit Periodsäure (PAS) angefärbt. Die Quantifizierung des Nierenschadens erfolgte mithilfe des tubulären Schädigungsindex (TIS). Es wurden je 0–10 Punkte für 4 Kategorien (Bürstensaumverlust, Tubulusdilatation, Nekrose und Zylinder) vergeben. Es wurden verblindet jeweils 3 Gesichtsfelder in 100x Vergrößerung pro Niere untersucht. Die Punktzahl ergibt sich aus dem Mittelwert aller 5 Mäuse pro Gruppe \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

A: Ergebnisse des TIS für 24 h Reperusionszeit nach uIRI mit 35 min Ischämiezeit.

B: Ergebnisse des TIS für 5 Wochen Reperusionszeit nach uIRI.

C: Repräsentative Bildausschnitte der PAS-Färbung. Vergrößerung 50x.

Eine Ischämiezeit von 35 und 45 min resultierte in höheren Expressionsleveln aller Entzündungsmarkergene, sowohl bei 24-stündiger als auch bei 5-wöchiger Reperfusionzeit (Abb. 21A und B). Die Schwelle, um eine signifikante Erhöhung der Entzündungsmarker nach 5 Wochen zu erreichen, lag bei einer Ischämiezeit von 35 min (Abb. 24B). Zur histologischen Betrachtung der Entzündungsantwort wurden die Nierenschnitte mittels eines Ly-6B.2-Antikörpers immunohistochemisch gefärbt. Dieser Antikörper färbt ins Gewebe immigrierende neutrophile Granulozyten. Diese sind mit die ersten Immunzellen am Entzündungsgeschehen und mitverantwortlich für Phagozytose, Degranulation und die Formierung von NET. Die Ergebnisse sind in Abb. 24C dargestellt. Nach 24 h Reperfusion zeigte sich eine signifikante Erhöhung der positiven Fläche erst ab einer Ischämiezeit von 45 min.

Zusammenfassend zeigt sich, dass für eine ausgedehnte und lang anhaltende Immunantwort eine Ischämiezeit von mindestens 35 min erforderlich zu sein scheint. Die Schwere der Ischämie korreliert mit dem Ausmaß der Entzündungsreaktion.

3.1.3. Einfluss der Ischämiezeit auf den fortgesetzten Zelltod

Nachdem der Einfluss der Ischämiezeit auf Nierenschädigung und Entzündung untersucht wurde, galt es nun, den zweiten Hauptakteur der Nekroinflammation zu untersuchen – die regulierte Nekrose bzw. den Zelltod.

Hierfür wurden die Nierenschnitte der Mäuse nach einer uIRI mit 15, 25, 35 oder 45 min Ischämiezeit nach Ablauf der Reperfusionzeit von 5 Wochen mittels immunhistologischer TUNEL-Färbung angefärbt. Es waren noch 5 Wochen nach uIRI positiv angefärbte Zellbestandteile und damit sterbende Zellen für alle Ischämiezeiten nachweisbar. Je höher die Ischämiezeit, umso mehr Fluoreszenz war erkennbar. Die höchsten Werte wurden für eine Ischämiezeit von 45 min erreicht (Abb. 22A und B). Die kontralaterale Niere zeigte sich dunkel bei nahezu keiner Positivität.

3. Ergebnisse

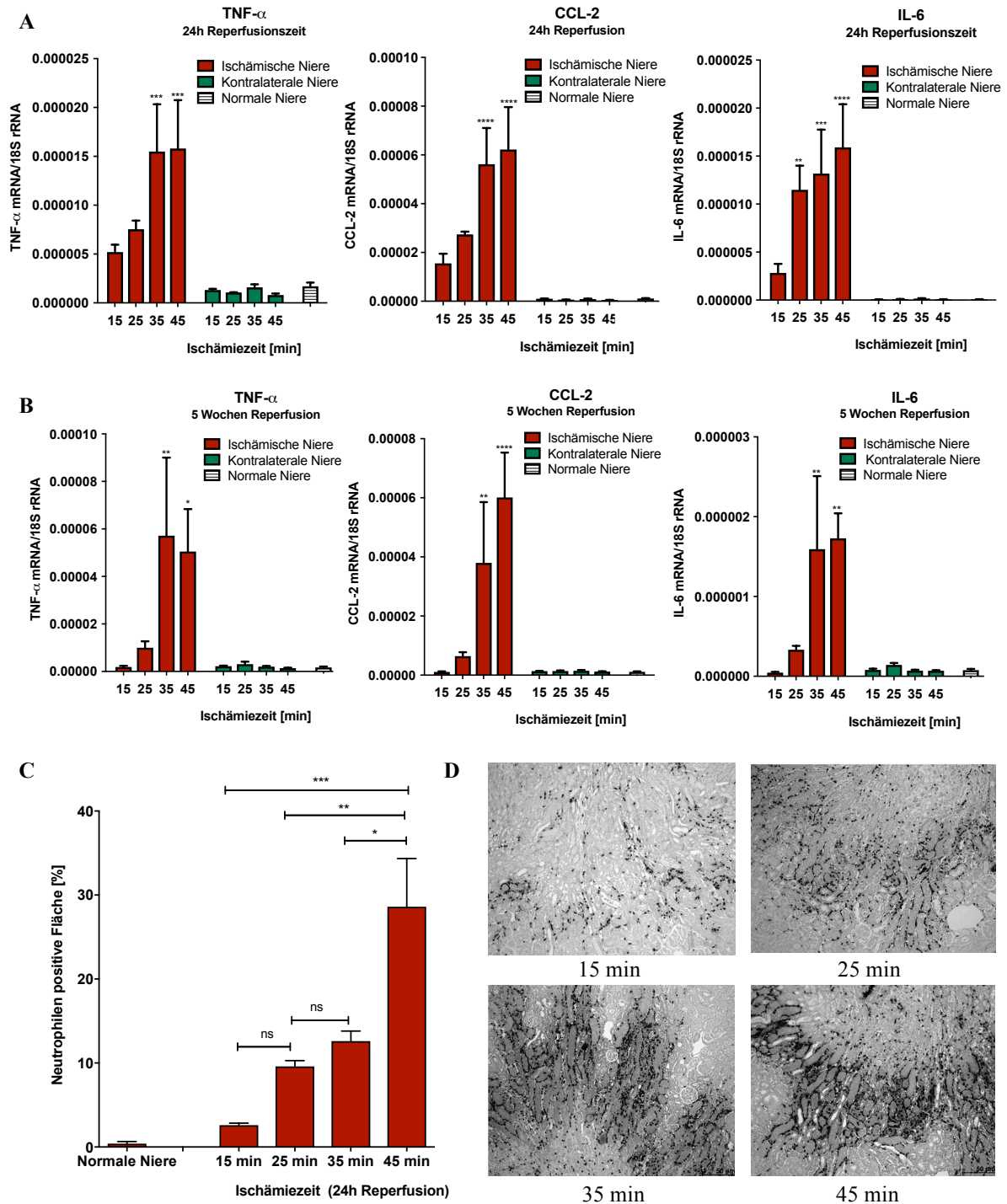


Abb. 21: Einfluss der Länge der Ischämiezeit bei unilateraler Ischämie-Reperfuersverletzung (uIRI) auf das Entzündungsgeschehen

A/B: Je 5 C57BL/6-Mäuse wurden einer uIRI mit 15, 25, 35 oder 45 min Ischämiezeit unterzogen. Nach Erreichen der Reperfuerszeit von 24 h (A) bzw. 5 Wochen (B) erfolgte die Nierentnahme. Die mRNA wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und durch RT-PCR quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als jeweilige Gen-mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Expression bei gesunden C57BL/6-Mäusen (normale Niere).

C: Die Nierenschnitte wurden mit einem Ly6B.2-Antikörper gefärbt und die Neutrophilen-Infiltration wurde durch Detektion der positiven Fläche mit ‚Image-J‘ quantifiziert. Pro Gruppe wurden jeweils alle 5 Mäuse

betrachtet und pro Niere wurden je 3 Nierenausschnitte in 100x Vergrößerung ausgewertet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM.

D: Repräsentative Bilder der Neutrophilen-Färbung für verschiedene Ischämiezeiten nach 24 h Reperfusion. Vergrößerung 100x.

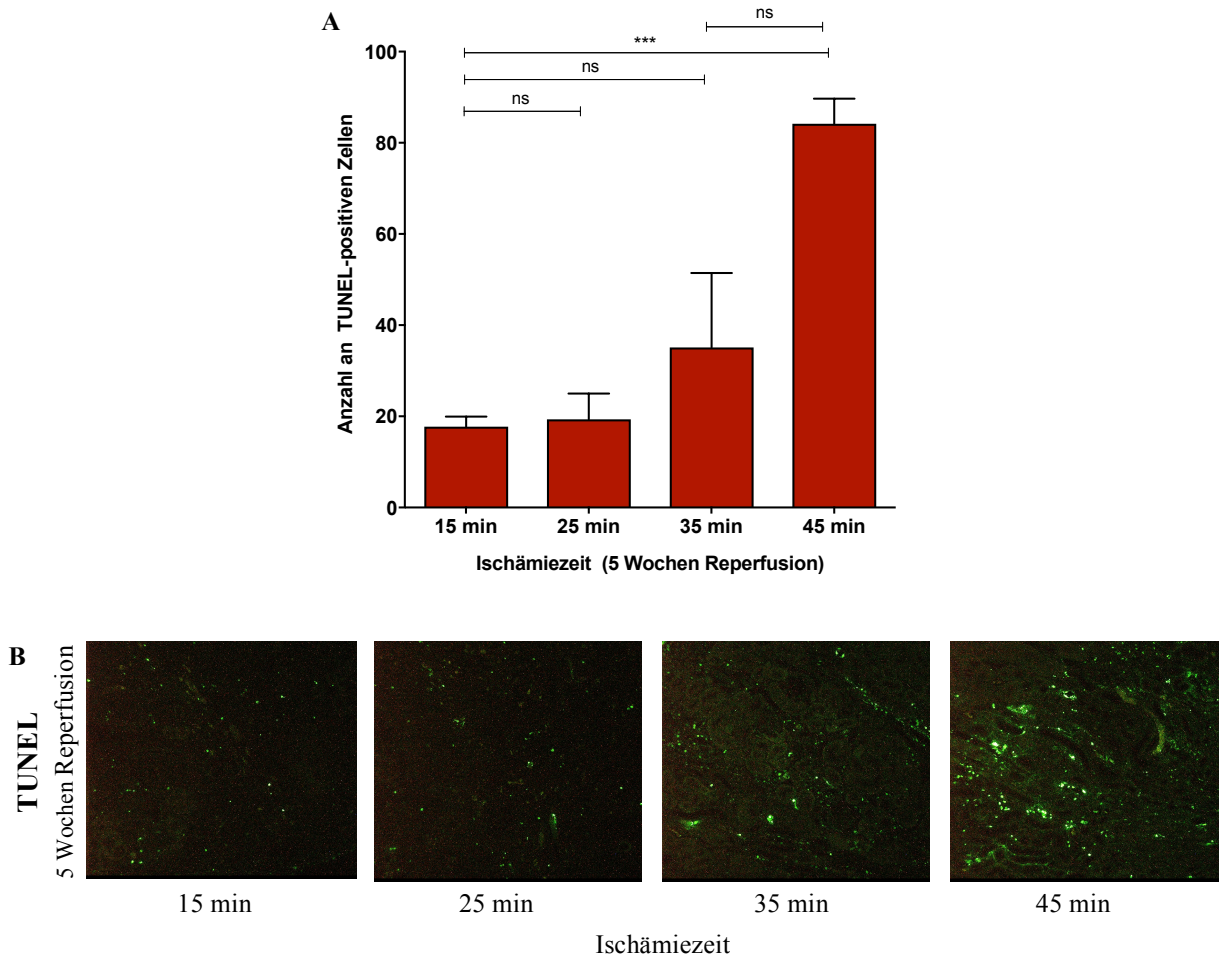


Abb. 22: Fortgesetzter Zelltod nach unilateraler Ischämie-Reperfusion (uIRI) in Abhängigkeit von der Ischämiezeit in der TUNEL-Färbung

A: Die linke Niere von je 5 C57BL/6-Mäusen pro Gruppe wurde für 15, 25, 35 oder 45 min abgeklemmt und anschließend reperfundiert. Nach 5 Wochen erfolgte die Nierenentnahme. Die Nierenschnitte wurden immunohistochemisch mittels TUNEL gefärbt und die positiv fluoreszierenden Zellen wurden mittels ‚Image-J‘ quantifiziert. Pro Niere wurde der Mittelwert aus 3 Bildern in 100x Vergrößerung gebildet. Die Daten ergeben sich aus dem Mittelwert \pm SEM aller 5 Mäuse pro Gruppe. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

B: Repräsentative Nierenausschnitte der ischämischen Niere nach TUNEL-Färbung für verschiedene Ischämiezeiten nach 5 Wochen Reperfusionszeit. Vergrößerung 100x.

3.1.4. Einfluss der Ischämiezeit auf die Nierenatrophie und Fibroisierung

Eine progressive Nierenschädigung fördert fibrotische Umbau- und Umstrukturierungsprozesse. Das Ausmaß der irreversibel verloren gegangenen Nephrone könnte dabei das Langzeitergebnis nach einem ANV determinieren.

Um den Einfluss der Ischämiezeit auf diesen Prozess zu untersuchen, wurden nach Ablauf der Reperfusionzeit von 5 Wochen die Nieren der Mäuse, die einer Ischämiezeit von 15, 25, 35 bzw. 45 min bei uIRI ausgesetzt waren, untersucht. Das Nierengewicht wurde als Parameter für Nephronenverlust, Nierenatrophie und chronischen Nierenschaden herangezogen. In Abb. 23A ist der Mittelwert des Delta-Nierengewichtes (Gewicht gesunde, kontralaterale – operierte, ischämische Niere) für jede Gruppe dargestellt.

Ein signifikant erhöhtes Delta-Nierengewicht zeigte sich ab einer Ischämiezeit von 35 min (Abb. 23A). Eine höhere Ischämiezeit war mit einem zunehmend stärker ansteigenden Gewicht der kontralateralen Niere und einer Abnahme des Gewichtes der ischämischen Niere verbunden, was zu größeren Differenzen im Delta-Nierengewicht führte. Ergänzend zeigen Fotos der Nieren auch makroskopisch eine starke Atrophie der ischämischen Niere bei Ischämiezeiten von 35 min und 45 min sowie eine Hypertrophie der nicht operierten Niere (Abb. 23B). Zur histologischen Beurteilung des fibrotischen Umbaus wurde eine Masson-Trichrom-Färbung angefertigt; auch hier zeigte sich mit steigender Ischämiezeit ein zunehmender fibrotischer Umbau (Abb. 23C).

Ergänzend zu diesen Auswertungen wurden die Genexpressionslevel verschiedener Fibrosemarker (transformierender Wachstumsfaktor-beta 1 (TGF- β 1), Kollagen Typ I alpha-1-chain (Coll1 α 1) und Laminin mittels RT-PCR untersucht. Für Reperfusionzeiten von 24 h (Abb. 24A) und 5 Wochen (Abb. 24B) findet sich ab einer Ischämiezeit von 35 min oder höher eine signifikante Erhöhung in der Expression der Fibrosegene. Im akuten Ansatz mit einer Reperfusionzeit von 24 h zeigen sich die höchsten Expressionswerte von TGF- β 1, coll1 α 1 und Laminin bei einer Ischämiezeit von 35 min, im chronischen Ansatz mit einer Reperfusionzeit von 5 Wochen bei einer Ischämiezeit von 45 min.

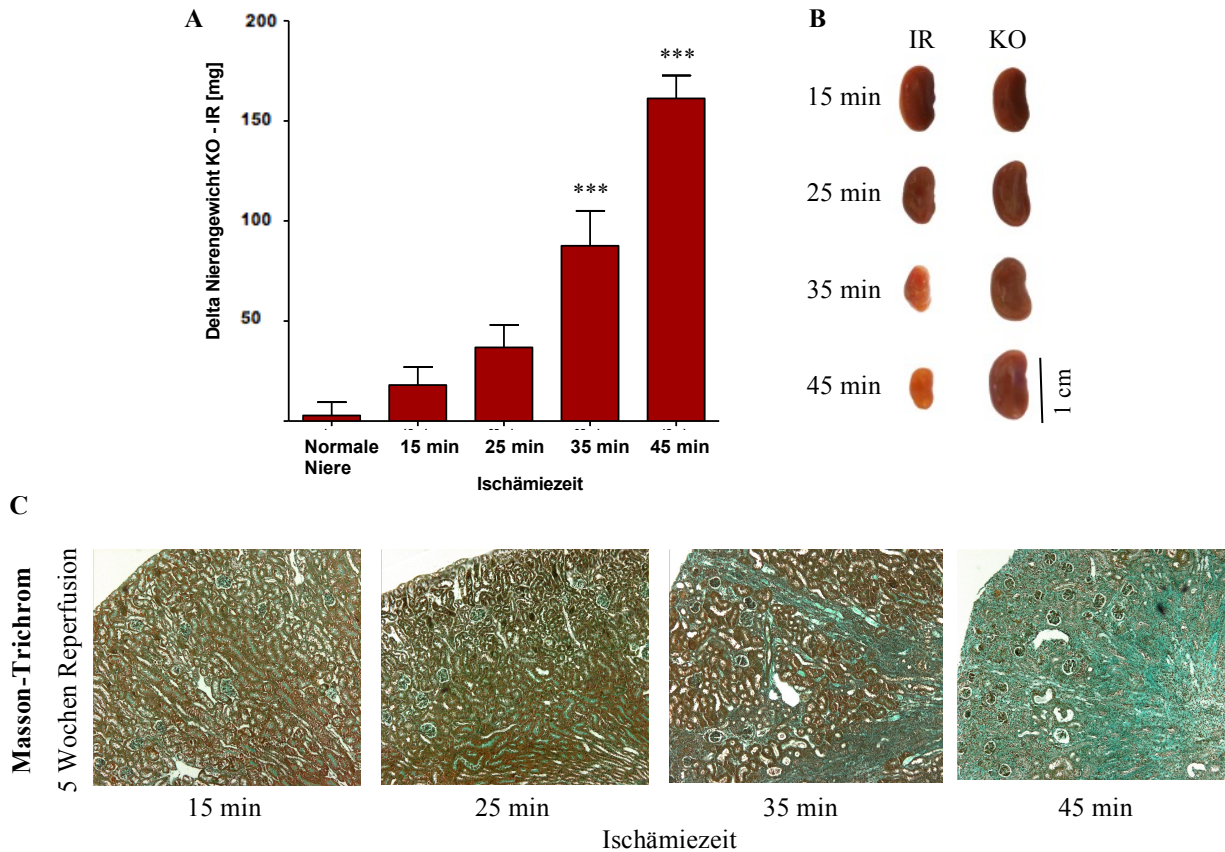


Abb. 23: Einfluss der Ischämiezeit auf Nierenatrophie und Fibrose nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung (uIRI)

An je 5 C57BL/6 Mäuse wurde eine uIRI mit unterschiedlicher Ischämiezeit (15, 25, 35, 45 min) und 5 Wochen Reperfusion durchgeführt. Die Nieren wurden entnommen und gewogen.

A: Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM des Delta-Nierengewichtes aus dem Gewicht der kontralateralen Niere (KO) abzüglich dem der ischämischen Niere (IR) mit $n = 5$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber normalen, nicht operierten Nieren.

B: Fotos der entnommenen Nieren nach 5 Wochen mit aufsteigender Ischämiezeit.

C: Repräsentative Nierenschnitte der ischämischen Nieren in der Masson-Trichrom-Färbung nach 5 Wochen Reperfusion. Vergrößerung 50x.

Zusammenfassend zeigt sich, dass es nach uIRI zu einer Atrophie und fibrotischen Umbau der ischämischen Niere kommt. Die kontralaterale, nicht operierte Niere hypertrophiert. Eine längere Ischämiezeit ist mit einem stärker ausgeprägten Umbauprozess verbunden. Als Schwelle für langfristig signifikante Veränderungen konnte eine Ischämiezeit von 35 min identifiziert werden. Dies konnte auf Genexpressionsebene, histologisch und durch das Nierengewicht bestätigt werden.

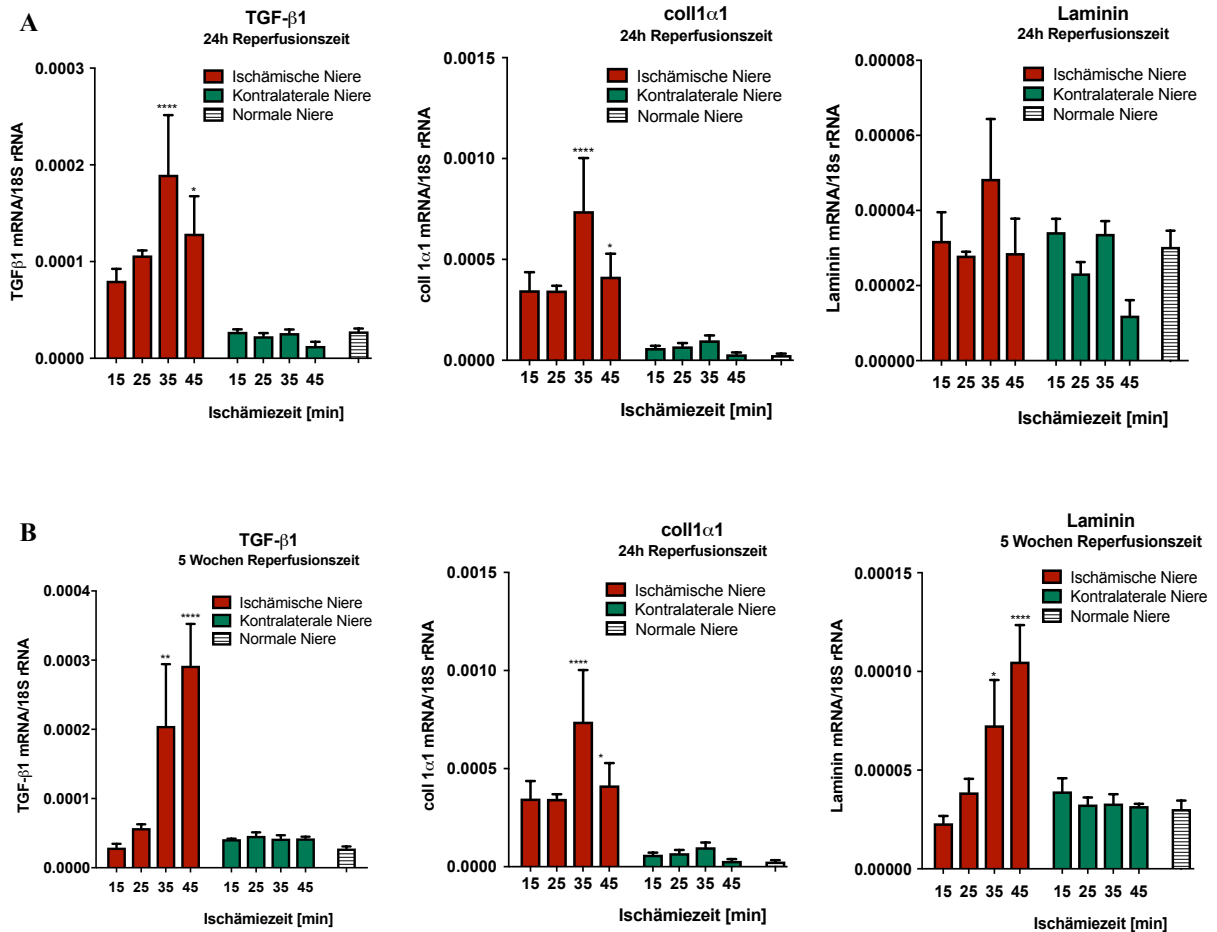


Abb. 24: Genexpressionslevel verschiedener Fibrose- und Bindegewebsmarker nach unilateraler Ischämie-Reperfuationsverletzung (uIRI) in Abhängigkeit von der Länge der Ischämiezeit

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde eine uIRI durchgeführt. Nach Ablauf der Reperfuationszeit wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR für verschiedene Fibrosemarker quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Gen mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber nicht operierten Mäusen.

A: Genexpressionslevel von Fibrose- und Bindegewebsmarkern in der RT-PCR für unterschiedliche Ischämiezeiten (15, 25, 35, 45 min) und 24 h Reperfuationszeit nach uIRI.

B: Genexpressionslevel von Fibrose- und Bindegewebsmarkern in der RT-PCR für unterschiedliche Ischämiezeiten (15, 25, 35, 45 min) und 5 Wochen Reperfuationszeit nach uIRI.

3.1.5. Einfluss der Ischämiezeit auf Zellzyklus und Hypertrophie

Gemäß Hypothese besteht ein fortgesetzter Nierenschaden nach akutem Schädigungsereignis. Bereits in der Einleitung wurde auf die Problematik der Maskierung eines bleibenden Nierenschadens durch kompensatorische Mechanismen und Hypertrophie der kontralateralen Niere eingegangen. In dieser Arbeit werden die kontrovers diskutierten Themen Zellzyklus, Proliferation und Regeneration bewusst nur am Rande angeschnitten. Dennoch sollte ein kurzer Blick auf Anhaltspunkte hierfür auf Genexpressionsebene geworfen werden.

Metalloproteinase-Inhibitor 2 (engl. Tissue-Inhibitor of Metalloproteinases 2, TIMP2) und Insulin-Like Growth-Factor-Binding-Protein 7 (IGFBP7) sind zwei bekannte Biomarker für den Zellzyklusarrest. Als Detektionsset im Urin sind sie als ‚NephroCheck‘ zur frühen Erkennung eines ANV bereits im klinischen Einsatz [141, 142]. Wie in Abb. 25A zu sehen ist zeigte sich in unserem Experiment, dass bei beiden Markern 24 h nach der Operation noch keine signifikant erhöhten Expressionslevel zu erkennen waren. Fünf Wochen nach dem Eingriff zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression gegenüber gesunden Nieren bei einer Ischämiezeit von mindestens 35 min (Abb. 25B).

Ki-67 ist ein Protein, das in allen Phasen des Zellzyklus gebildet wird, außer in der G0-Phase. In dieser Phase ruht die Zelle [143]. Es eignet sich daher als Marker, um die Fraktion einer Zellpopulation zu bestimmen, die aktiv in Hypertrophie- oder Umbauprozesse eingeschlossen ist und nicht in ihrem bisherigen Ruhestatus verweilt. Schon nach 24 h Reperfusion wurde ab einer Ischämiezeit von 35 min ein signifikanter Anstieg des Genexpressionslevels von Ki-67 beobachtet. Alle anderen Ischämiezeiten zeigten keine signifikanten Erhöhungen (Abb. 25A). Nach einer Reperfusionszeit von 5 Wochen fand sich bei 35 und 45 min Ischämiezeit eine signifikante Erhöhung der Genexpression gegenüber der nicht operierten Kontrollgruppe (Abb. 25B).

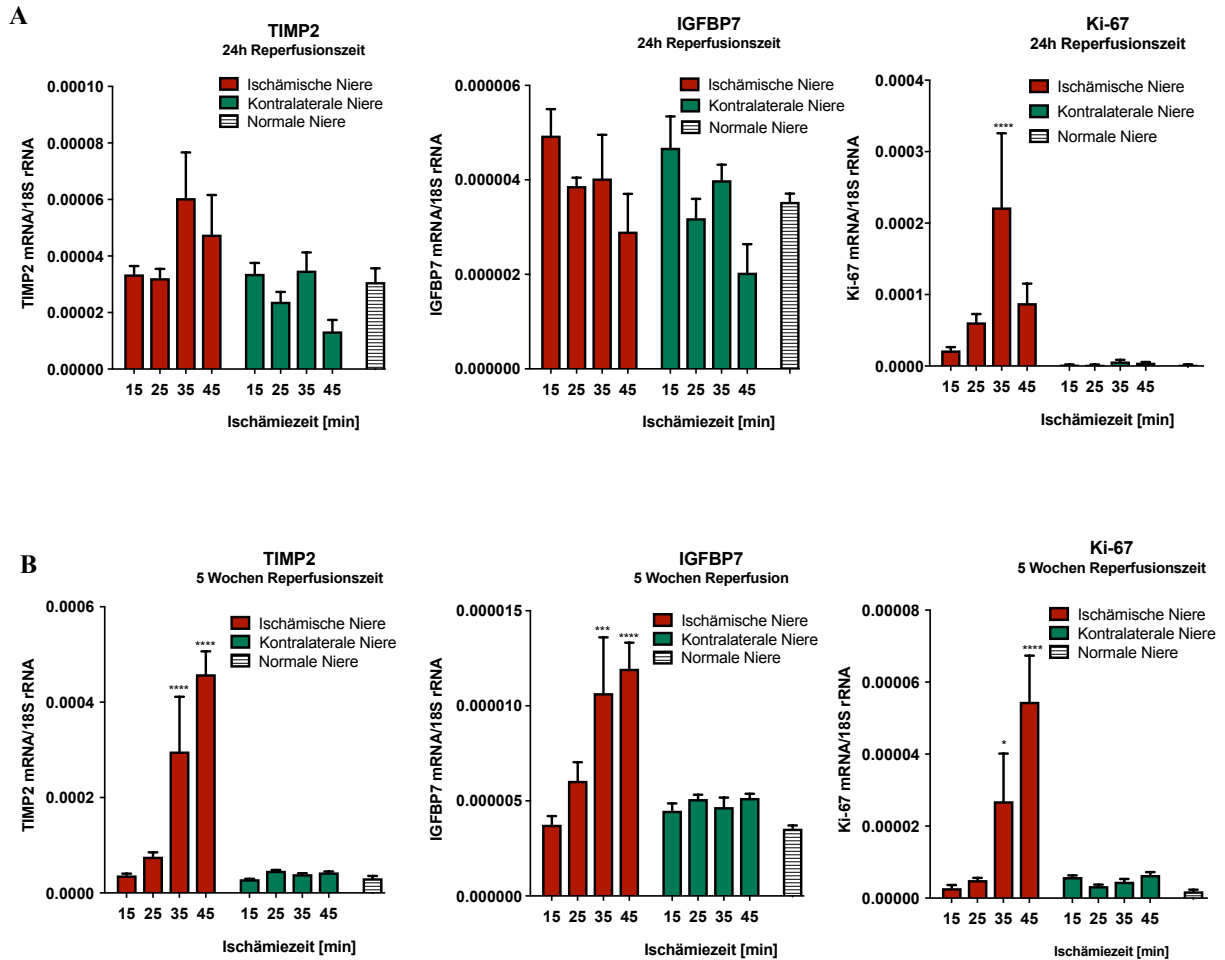


Abb. 25: Zellzyklusarrest und Zellzyklusaktivierungsmarker in Abhängigkeit von der Ischämiezeit nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung (uIRI)

Je 5 C57BL/6-Mäuse wurden einer uIRI mit definierter Ischämie- und Reperusionszeit unterzogen. Die mRNA der Nieren wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels RT-PCR quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als jeweilige Gen-mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Expression bei nicht operierten C57BL/6-Mäusen.

A: Genexpressionslevel von TIMP2, IGFBP7 und Ki-67 nach Ischämiezeiten von 15, 25, 35 und 45 min und einer Reperusionszeit von 24 h bei uIRI.

B: Genexpressionslevel von TIMP2, IGFBP7 und Ki-67 nach Ischämiezeiten von 15, 25, 35 und 45 min und einer Reperusionszeit von 5 Wochen bei uIRI.

3.2. Charakterisierung der Dynamik und des Zeitverlaufes der Vorgänge nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung

Die Ergebnisse aus den vorherigen Experimenten haben gezeigt, dass nur nach einer Ischämiezeit von mindestens 35 min auch nach Wochen eine Nierenzellschädigung, eine Entzündungsreaktion, Fälle von Zelltod, eine Fibrose und Umbauprozesse beobachtbar sind.

In einem zweiten experimentellen Ansatz sollten nun Einblicke in die Dynamik dieser Prozesse über die Zeitachse verteilt gewonnen werden. Darüber hinaus sollten Surrogatparameter für Entzündung, Schädigung und Regeneration gefunden und Rückschlüsse in Bezug auf mögliche therapeutische Interventionen gezogen werden. Hierfür wurde in Anknüpfung an die Vorergebnisse die Ischämiezeit auf 35 min festgelegt und die Reperusionszeit wurde variiert (0 min, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 3 d, 7 d, 10 d und 5 Wochen). In Abb. 11B im Methodenteil dieser Arbeit ist das Experimentdesign zusammengefasst.

3.2.1. Übersicht: Zeitlicher Verlauf der Genexpressionslevel von Biomarkern nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung

Um einen Einblick in die Abläufe in der Zelle auf Genexpressionsebene zu gewinnen, wurde ein Panel aus Biomarkern für Entzündung, Schädigung, Fibrose und Zellzyklus zusammengestellt und es wurde ihre Expression für die verschiedenen Reperusionszeitpunkte nach 35 min uIRI bestimmt. Für jedes Gen zeigte sich hier in einer Art ‚Zeitstrahl‘ ein spezifischer Verlauf der Genexpression über die Zeit.

In Abb. 26 ist die jeweilige Gen-mRNA/18S-rRNA auf einer log₂-skalierten und farbcodierten Skala dargestellt. Zu sehen sind sowohl die ischämische als auch die kontralaterale Niere. Ergänzend sind die Ergebnisse aus dem Experimentdesign davor in Kapitel 3.3.1 mit gleicher Reperusions- und unterschiedlicher Ischämiezeit in gleicher Weise dargestellt. In Abb. 27 ist die Genexpression als Fold-Change für Schädigungs- (KIM-1), Entzündungs- (TNF- α , IL-6), Fibrose- (TGF- β 1) und Zellzyklusarrest-Marker (TIMP2) über die Reperusionszeit zusammenfassend dargestellt.

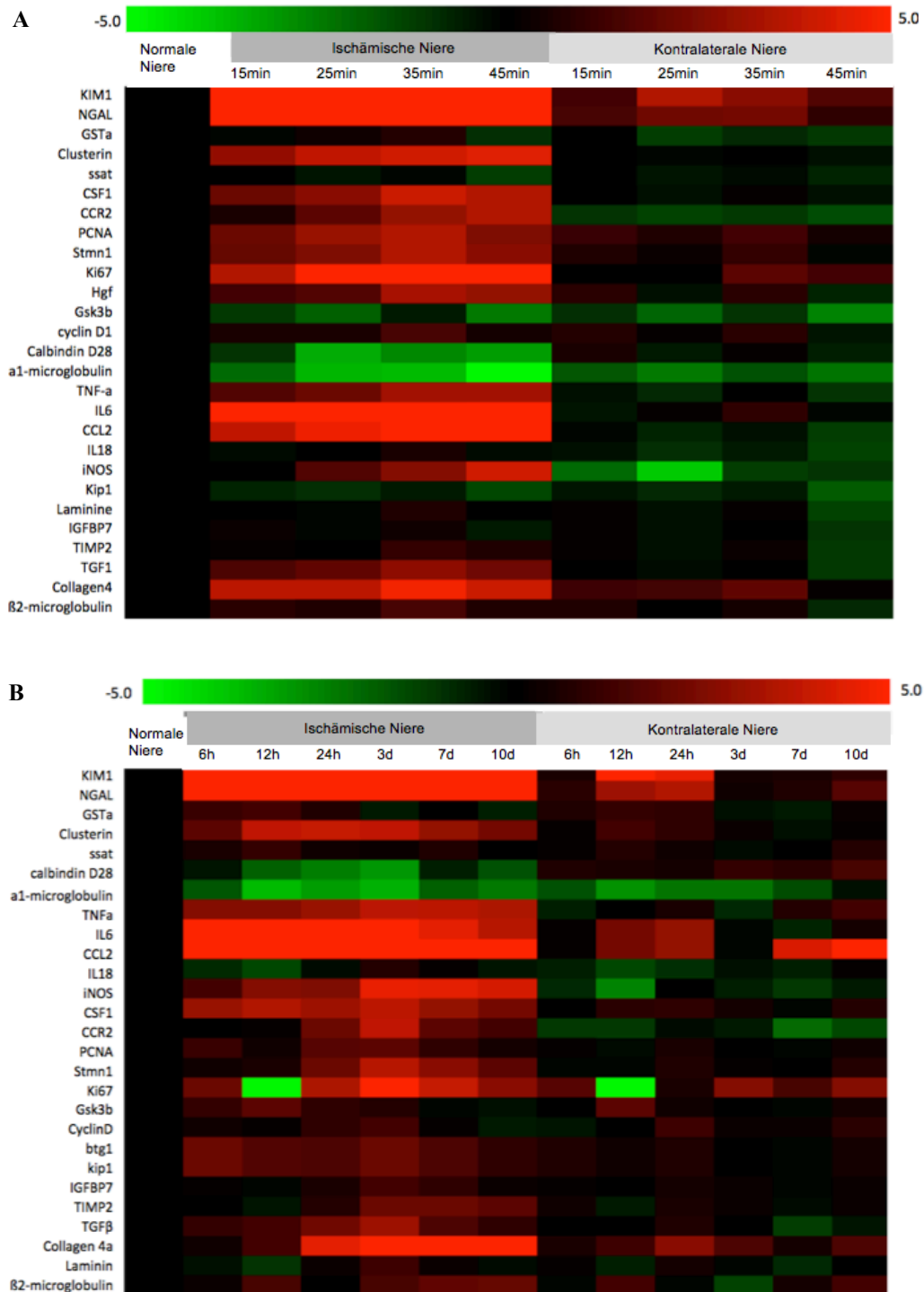


Abb. 26: Genexpressionslevel von Biomarkern nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung (uIRI) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Ischämie- und Reperusionszeiten

A: An je 5 männlichen C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde eine uIRI mit unterschiedlichen Ischämiezeiten (15, 25, 35 und 45 min) durchgeführt. In der RT-PCR wurden die Genexpressionslevel für ein Panel von Biomarkern quantifiziert. Der erhaltene Gen mRNA/18S rRNA-Wert wurden mithilfe des M4 MEV-Programmes auf eine log₂ Skala übertragen und die Dynamik der Expression mit einer Farbcodierung dargestellt.

B: An je 5 männlichen C57BL/6 Mäusen wurde eine 35min uIRI durchgeführt und die Reperusionszeit variiert (6h, 12h, 24h, 3d, 7d, 10d). Die Aufarbeitung und Darstellung erfolgte in gleicher Weise wie bei 26A.

Abb. 26 und 27 sollen zunächst als Übersicht dienen. Im Folgenden wird dann in Zusammenschau mit anderen Untersuchungstechniken kategorisch auf die einzelnen Ergebnisse näher eingegangen.

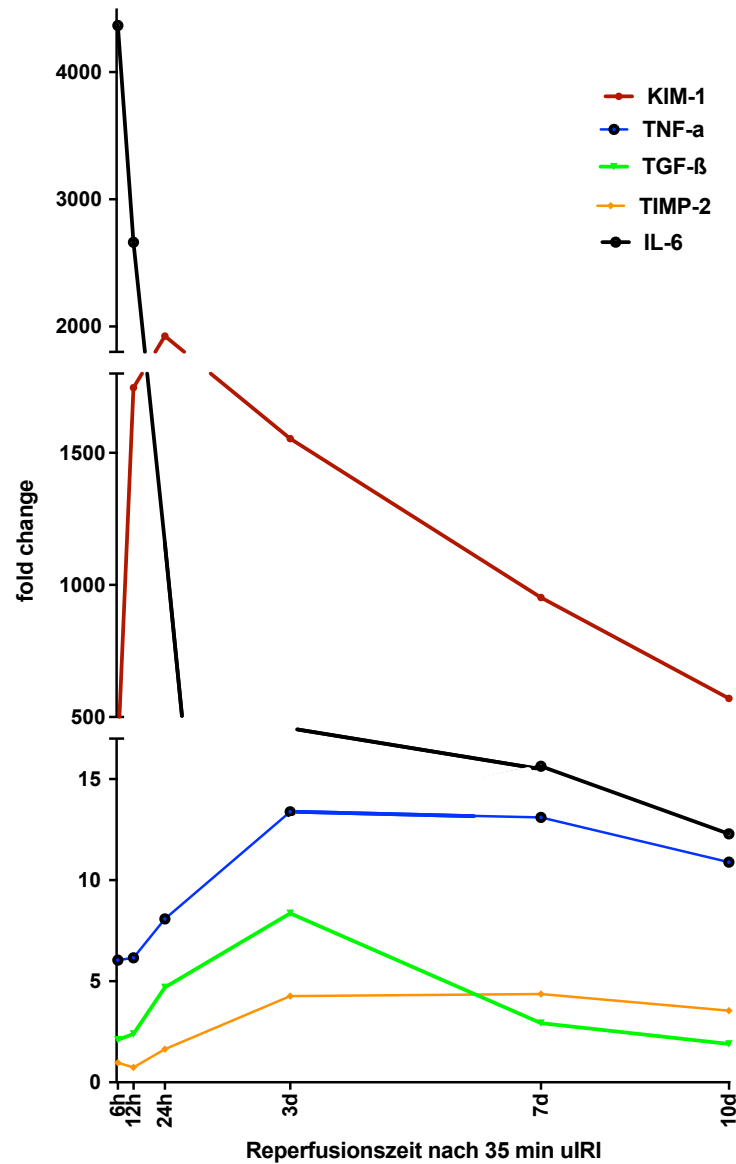


Abb. 27: Veränderungen in der Genexpression von Biomarkern für Entzündung, Schädigung, Fibrose und Zellzyklus über verschiedene Reperfusionzeiten

An je 5 C57BL/6-Mäusen pro Gruppe wurde eine uIRI mit einer Ischämiezeit von 35 min durchgeführt und das Experiment zu verschiedenen Reperfusionzeitpunkten beendet. Dargestellt ist die Genexpression als Fold Change für Schädigungs- (KIM-1), Entzündungs- (TNF- α , IL-6), Fibrose (TGF- β 1) und Zellzyklusarrestmarker (TIMP2) in der RT-PCR über verschiedenen Reperfusionzeitpunkte.

3.2.2. Verlauf und Dynamik der Tubulusschädigung

Zur Darstellung der Dynamik der Tubulusschädigung nach uIRI wurde in der RT-PCR die Expression von KIM-1, NGAL und Clusterin als Schädigungsmarker bestimmt. Zusätzlich erfolgte eine histologische Auswertung mittels TIS in der PAS-Färbung.

In der PCR zeigte sich, dass die Expressionsanstiege von KIM-1, NGAL und Clusterin weitgehend parallel verliefen (Abb. 28A, B, C). Die höchsten Werte wurden zwischen 6 h und 3 d nach 35 min uIRI erreicht. Direkt nach Induzierung der Ischämie stiegen sie zunächst schnell an und erreichten nach etwa 24 h bereits ihr Maximum. Auch nach 5 Wochen blieben sie noch signifikant erhöht im Vergleich zur kontralateralen und der nicht operierten Gruppe. In der Auswertung der PAS-Schnitte wurden die höchsten Punktzahlen im TIS zwischen 6 h und 72 h mit einem Maximum nach 24 h ermittelt (Abb. 28D und E).

3.2.3. Verlauf und Dynamik des Entzündungsgeschehens

Wie in Abschnitt 3.1.2 genannt, dienten zur Beschreibung der Entzündungsreaktion und ihres proinflammatorischen Mikromilieus in der RT-PCR die Entzündungsmarker TNF- α , CCL-2 und IL-6.

Die Darstellung ihrer Expression zu den verschiedenen Reperfusionzeiten ergab einen spezifischen Verlauf über die Zeitachse für jeden dieser Marker (Abb. 29A, B, C). Während die Schädigungsmarker KIM-1, NGAL und Clusterin, wie in 3.2.2. beschrieben, bereits zwischen 6 h und 3 d ihr Maximum erreichten, war dies bei TNF- α und CCL-2 erst zwischen d 3 und d 7 der Fall. Zwischen diesen beiden Zeitpunkten befand sich die Expression nahezu auf einem Plateau und fiel ab Tag 7 langsam ab (Abb. 29A, B). Als Akute-Phase-Protein erreichte IL-6 sein Maximum bereits 6 h nach uIRI und befand sich nach 3 d wieder annähernd auf dem Ausgangsniveau (Abb. 29C).

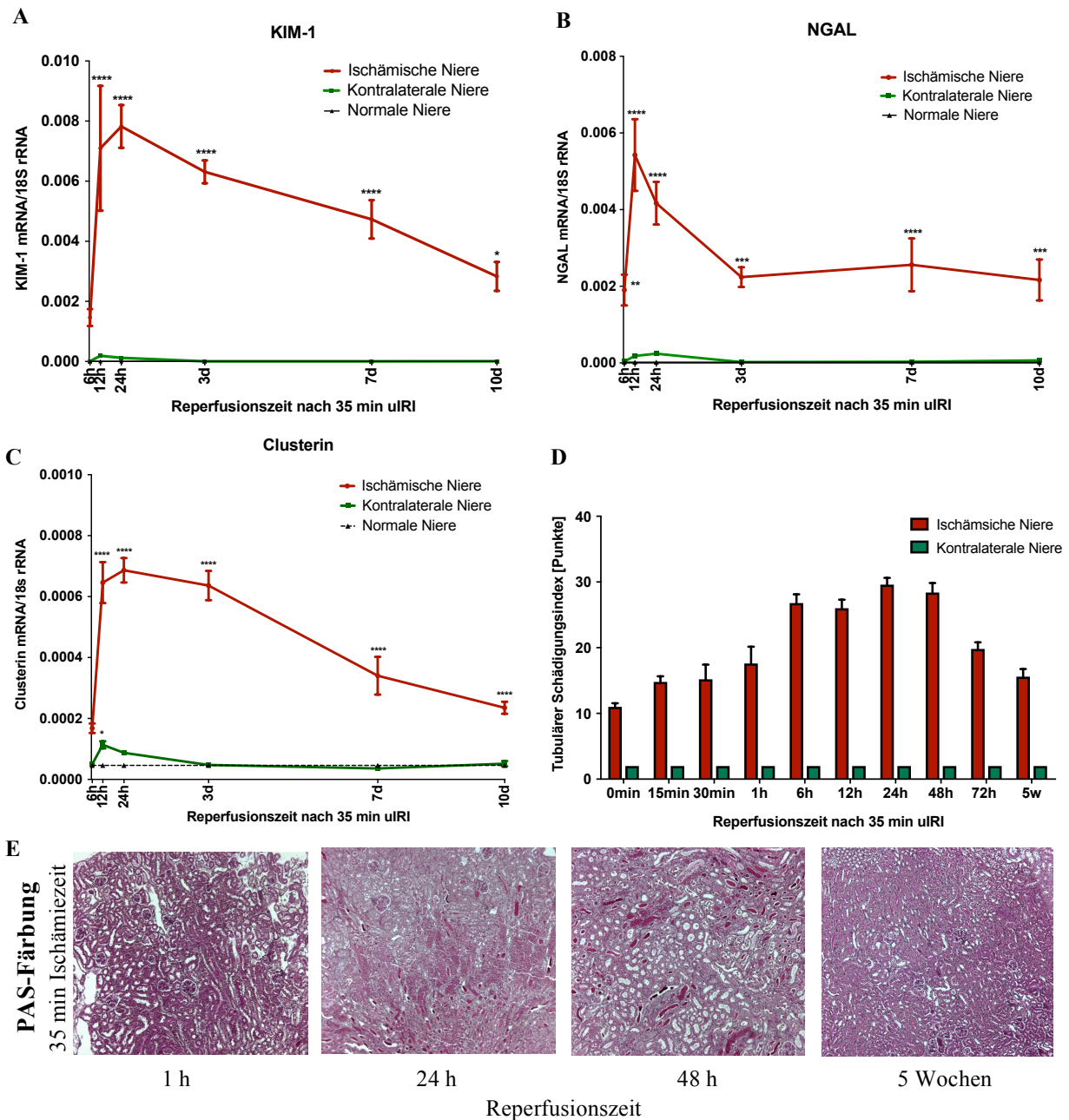


Abb. 28: Verlauf der Genexpressionslevel von Schädigungsmarkern nach 35 min unilateraler Ischämie-Reperfuzeit (uIRI) in Abhängigkeit von der Reperfuzeit und Histologie

A/B/C: An je 5 C57BL/6-Mäusen pro Gruppe wurde eine uIRI mit einer Ischämiezeit von 35 min durchgeführt. Die Reperfuzeit variierte zwischen 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 5 Wochen. Dargestellt ist die Gen-mRNA/18S rRNA für verschiedene Schädigungsmarker in der RT-PCR. Die Daten stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Expression bei nicht operierten C57BL/6-Mäusen.

D: In der PAS-Färbung der Nierenschnitte wurde der tubuläre Schädigungsindex (TIS) bestimmt. Es wurden je 0–10 Punkte für 4 Kategorien (Bürstensaumverlust, Tubulusdilataion, Nekrose und Zylinder) vergeben. Die Punktzahl ergibt sich aus dem Mittelwert aller 5 Mäuse \pm SEM pro Gruppe.

E: Repräsentative Bilder der PAS-Färbungen für verschiedene Reperfuzeiten nach 35 min uIRI. Vergrößerung 50x.

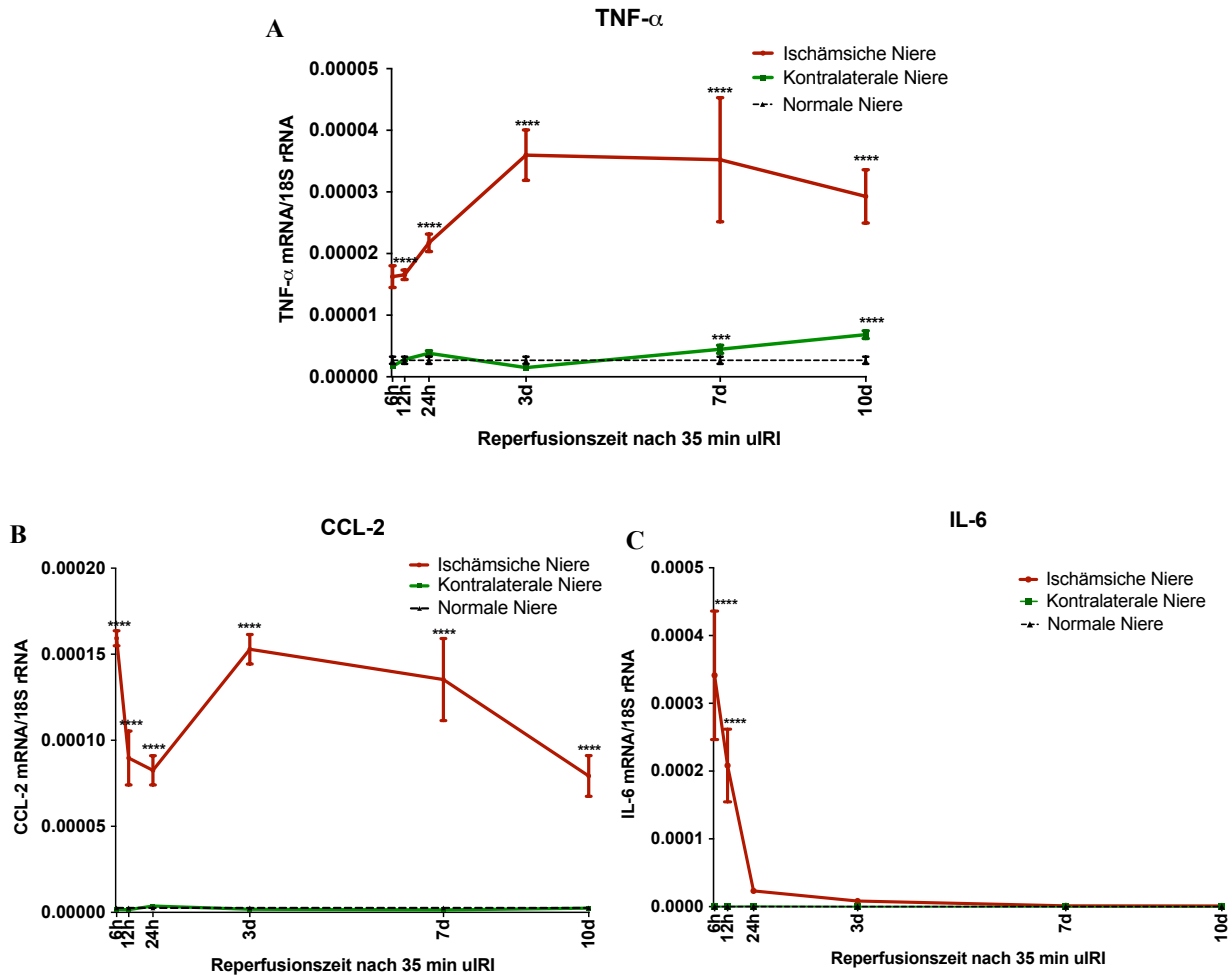


Abb. 29: Verlauf der Genexpressionslevel von Entzündungsmarkern nach unilateraler Ischämie-Reperfusionsverletzung (uIRI) in Abhängigkeit von der Reperusionszeit

An je 5 C57BL/6-Mäusen pro Gruppe wurde eine uIRI mit 35 min Ischämiezeit und unterschiedlichen Reperusionszeiten (6 h, 12 h, 24 h, 3 d, 7 d, 10 d) durchgeführt. In der RT-PCR wurde die RNA für verschiedene Entzündungsmarker quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als jeweilige Gen mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Expression bei nicht operierten Mäusen.

Für eine histologische Betrachtung des Entzündungsgeschehens wurden die Nierenschnitte mittels einer Neutrophilen-Färbung gefärbt und ausgewertet (Abb. 30A). Bereits bei einer Reperusionszeit von 15 min zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Neutrophilenzahl, die zwischen 1 h und 6 h stark anstieg. Das Maximum der histologisch sichtbaren Neutrophileninfiltration wurde 12 h nach uIRI erreicht.

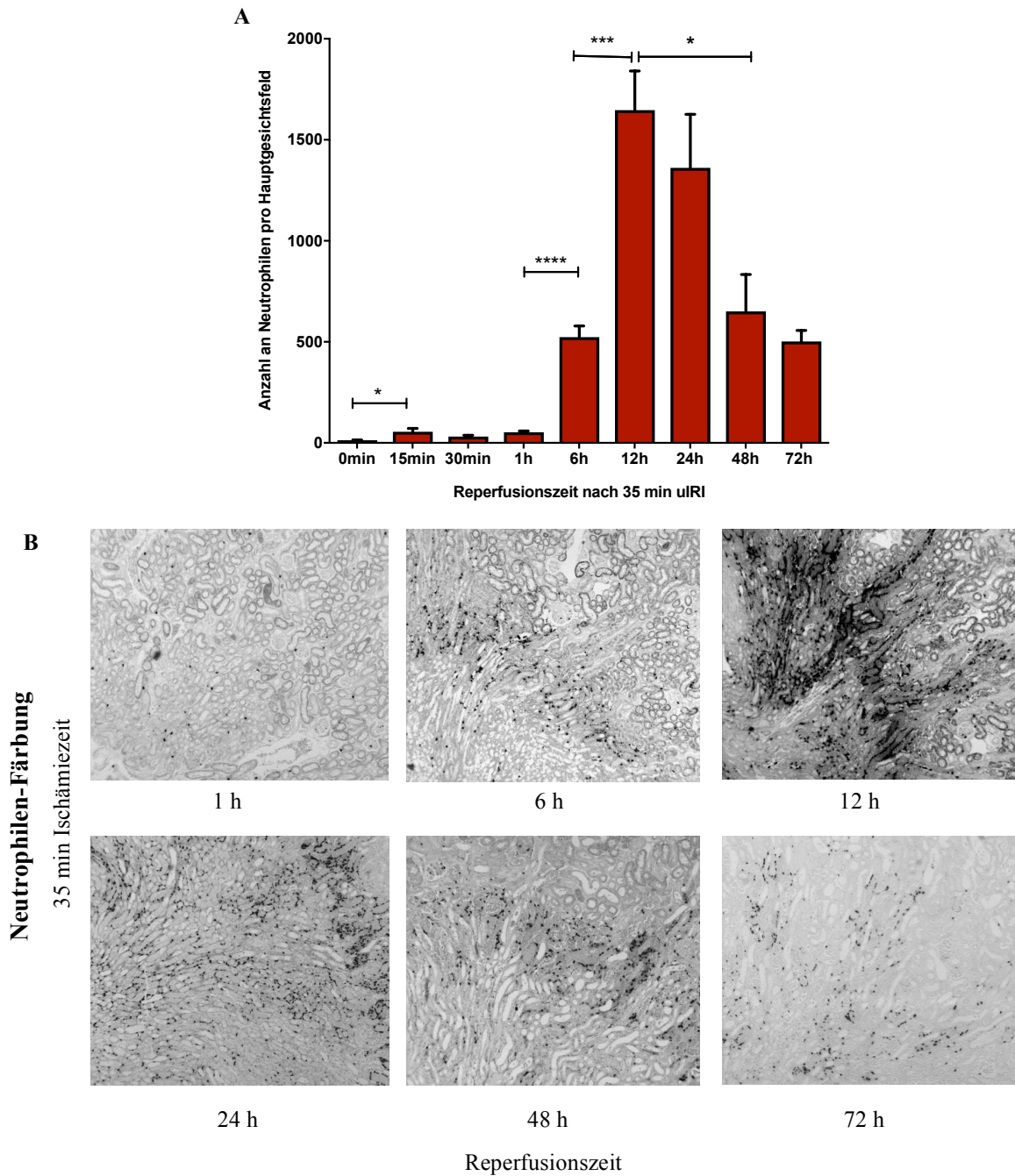


Abb. 30: Einfluss der Reperusionszeit nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung (uIRI) auf die Neutrophilen-Infiltration

Nach uIRI mit einer Ischämiezeit von 35 min von je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe erfolgte nach Ablauf der Reperusionszeit (0 min, 15 min 30 min, 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) die Nierenentnahme. Die Nierenschnitte wurden mit einem Neutrophilen-Antikörper immunohistochemisch gefärbt.

A: Quantifizierung der Neutrophilen-Infiltration mittels Auszählung positiver Zellen mit ‚Image-J‘. Pro Gruppe wurden jeweils alle 5 Mäuse betrachtet und pro Niere je 3 Nierenausschnitte in 100x Vergrößerung ausgewertet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

B: Repräsentative Nierenausschnitte der Neutrophilen-Färbung zu verschiedenen Reperusionszeiten nach 35 min uIRI. Vergrößerung 100x.

3.2.4. Verlauf und Dynamik des Zelltodes

Zur Darstellung von sterbenden Zellen wurden erneut die TUNEL-Färbung und die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Die Auswertung erfolgte durch Messung der TUNEL positiven Fläche der ischämischen Niere in Prozent. Es zeigte sich ein Anstieg der positiv fluoreszierenden Fläche bis zu einer Reperfusionzeit von 6 h auf $38,2 \pm 9 \%$ (Abb. 31A und B). Ein signifikanter Abfall des Prozentanteils ließ sich 24 h nach uIRI verzeichnen; 5 Wochen nach der initialen Operationen zeigte sich im Vergleich zur gesunden Kontrolle weiterhin ein signifikant erhöhter Wert. Die kontralaterale Niere zeigte zu allen Zeiten nahezu keine Positivität.

3.2.5. Verlauf und Dynamik der Nierenatrophie und Fibrose

Als Parameter für Nierenatrophie wurden die Nierengewichte der ischämischen und kontralateralen Nieren gemessen (Abb. 32A). Unmittelbar im Anschluss an die Operation (0 min Reperfusionzeit) war für die kontralateralen Nieren ein Mittelwert von $164 \pm 6,8$ mg zu verzeichnen, bei den ischämischen Nieren einer von $174,9,3$ mg. Es zeigte sich, dass die Kurven beider Nieren bis zu einem Zeitpunkt von ca. 7 Tagen nahezu parallel verliefen und dass die Nieren bis zum vierten Tag leicht an Gewicht zunahmten (Abb. 34A). An Tag 7 überschneiden sich die Gewichtskurven von kontralateraler und Ischämischer Niere. Von hier an ist die Atrophie und Gewichtsabnahme der ischämischen Niere mit einer Gewichtszunahme der kontralateralen Niere assoziiert. Nach 5 Wochen zeigte sich für die ischämischen Nieren ein Gewicht von nur $138,2 \pm 4,1$ mg, während die kontralateralen Nieren ein deutlich höheres von $185 \pm 4,4$ mg aufwiesen.

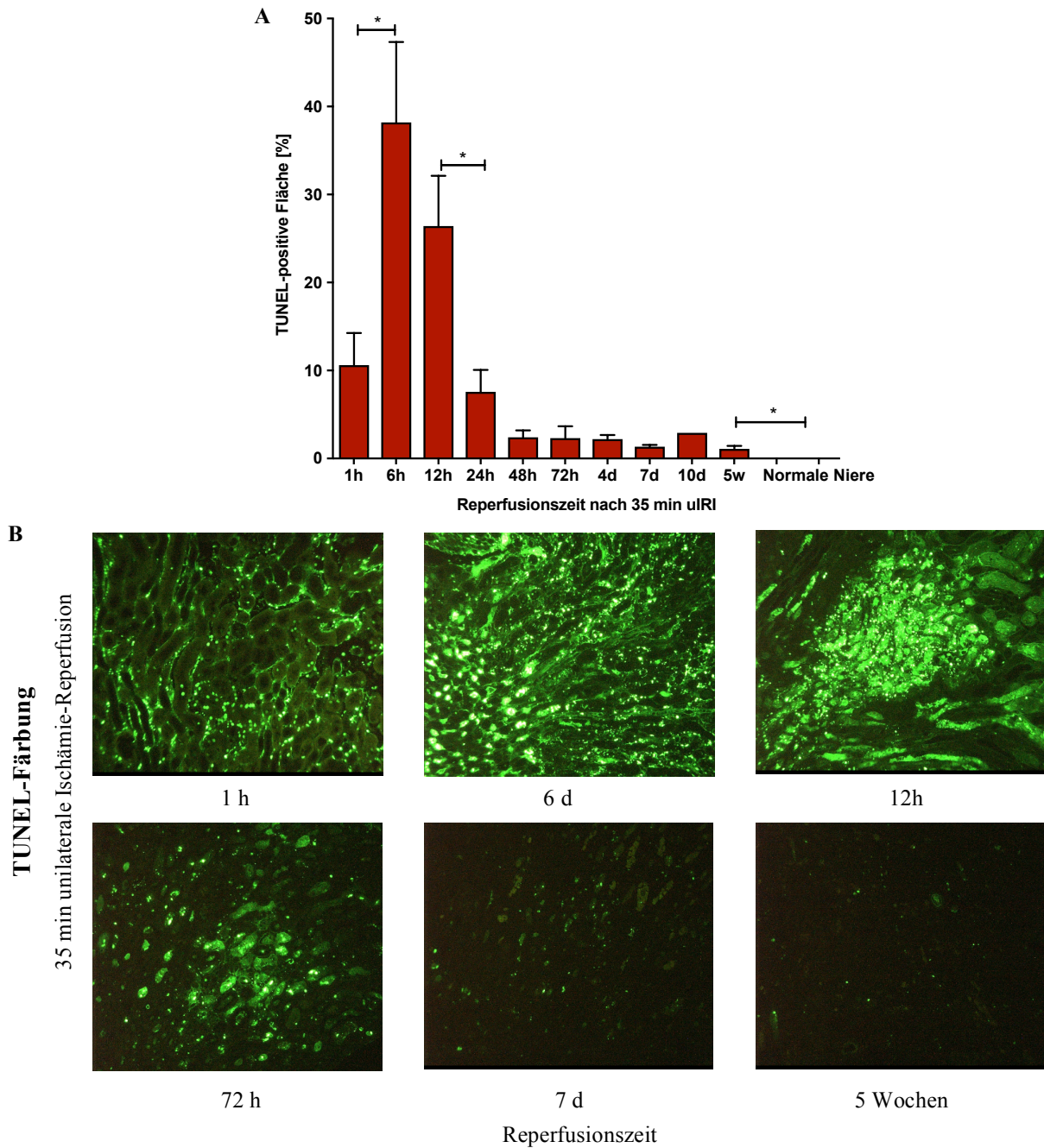


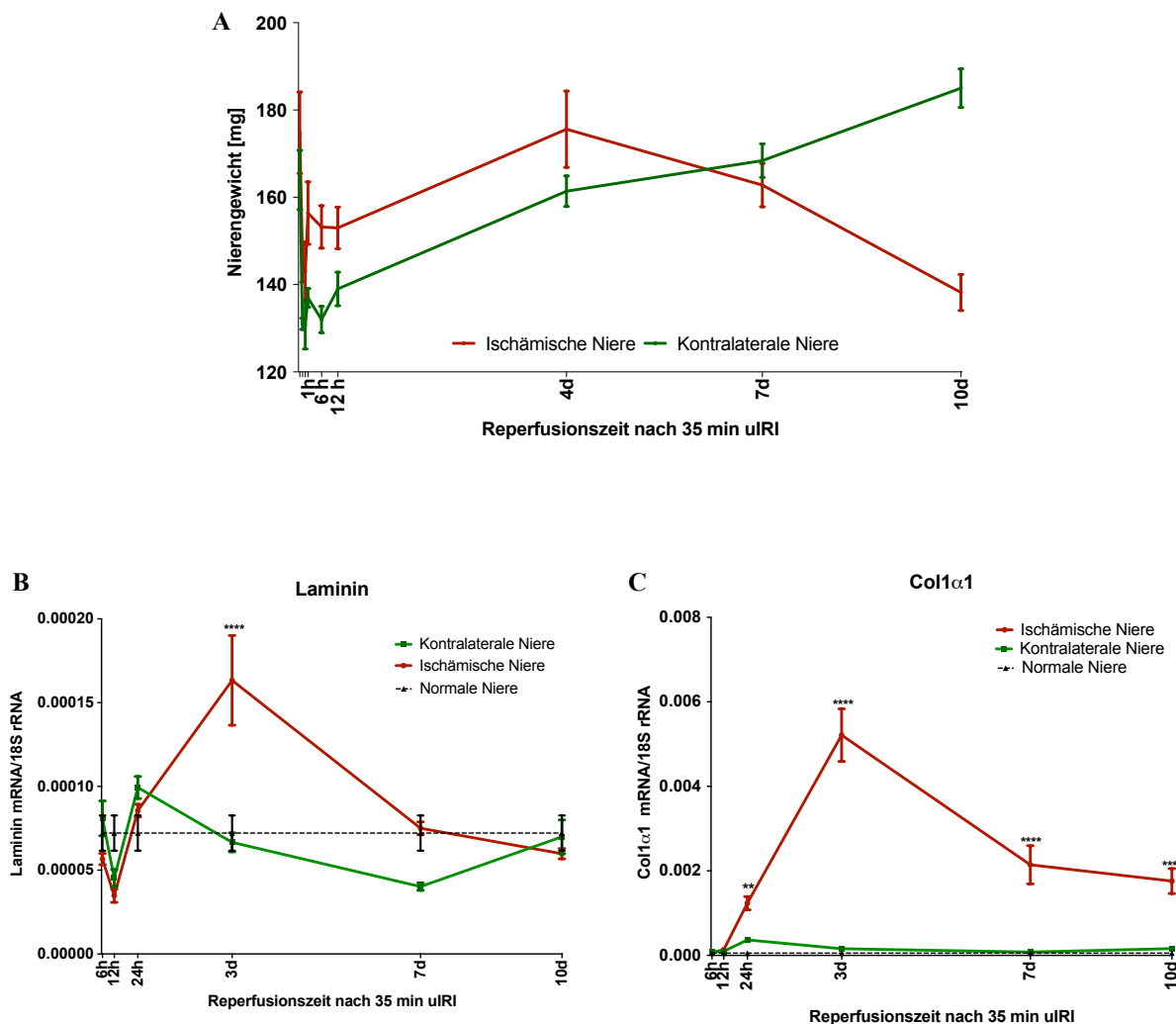
Abb. 31: TUNEL-Färbung nach unilateraler Ischämie-Reperfusionsverletzung (uIRI) mit 35 min Ischämiezeit in Abhängigkeit von der Reperfusionzeit

A: Die linke Niere von je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde für 35 min abgeklemmt und anschließend reperfundiert. Nach 1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 7 d, 10 d bzw. 5 Wochen erfolgte die Nierenentnahme. Die Nierenschnitte wurden mittels TUNEL angefärbt und die positiv fluoreszierende Fläche mit ‚Image J‘ bestimmt. Pro Niere wurde der Mittelwert aus drei Bildern in 100-facher Vergrößerung gebildet. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

B: Repräsentative Fotos der TUNEL-Färbung der ischämischen Niere zu verschiedenen Reperfusionzeiten nach 35 min uIRI. Vergrößerung 100x.

Ergänzend zum Nierengewicht wurden mittels RT-PCR die Genexpressionslevel der bereits vorher verwendeten Fibrosemarker $TGF-\beta 1$, $Col1\alpha 1$ und Laminin untersucht und ein spezifischer Verlauf über die Zeitachse wurde erstellt (Abb. 32B, C, D). Bei allen drei Genen zeigten sich zunächst steigende Expressionswerte nach uIRI, die an Tag 3 ihr Maximum erreichten und dann rückläufig waren. Auch nach 10 Tagen erreichten sie ihr Anfangsniveau nicht.

Zusammenfassend zeigt sich, dass es nach uIRI zu einer Atrophie und zu einem fibrotischen Umbau der ischämischen Niere kommt, während die kontralaterale Niere an Gewicht zunimmt – dies zeichnet sich vor allem ab Tag 7 ab. Bereits 24 h nach uIRI kommt es zur vermehrten Expression von Kollagen und Zelladhäsionsgenen, die nach Tag 3 ihren Höhepunkt erreicht.



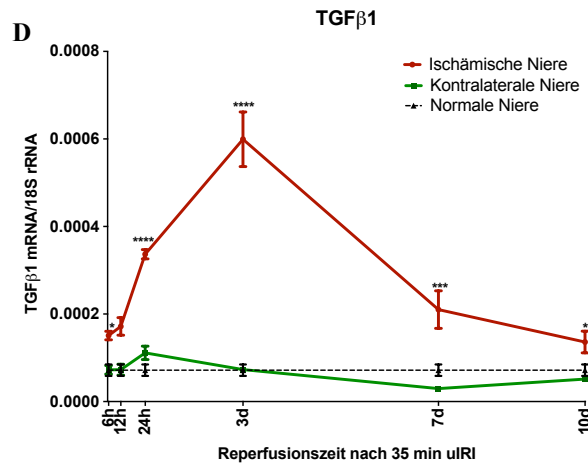


Abb. 32: Nierengewicht und Genexpression von Fibrosemarkern zu verschiedenen Reperfuionszeiten nach unilateraler Ischämie-Reperfuionsverletzung (uIRI)

Je 5 C57BL/6-Mäuse pro Gruppe wurden einer uIRI mit 35min Ischämiezeit unterzogen. Nach Erreichen der Reperfuionszeit (1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 7 d, 10 d) wurden die Nieren entnommen, gewogen und das Gewebe wurde für molekularbiologische Methoden weiterverarbeitet.

A: Nierengewichte der kontralateralen und ischämischen Nieren zu verschiedenen Reperfuionszeiten. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus allen 5 fünf Mäusen einer Gruppe.

B/C/D: Genexpressionslevel von TGF- β 1, Laminin und Coll1 α 1 in der RT-PCR. Daten dargestellt als mRNA/18S rRNA als Mittelwert \pm SEM für jede Gruppe zu verschiedenen Reperfuionszeitpunkten. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Expression bei nicht operierten C57BL/6-Mäusen.

3.2.6. Verlauf und Dynamik von Zellzyklusmarkern

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, zu welchen Zeiten nach uIRI die Zelle ihre Hauptsignale für Schaden, Entzündung, Zelltod und Umbauprozesse erhält. Nun sollte die Dynamik der Zellzyklusmarker zu verschiedenen Reperfuionszeiten untersucht werden.

Hierfür wurde zunächst die Genexpression der bereits aus den Vorexperimenten bekannten Zellzyklusarrestmarker IGFB7 und TIMP2 mittels RT-PCR betrachtet. Wie in Abb. 33A und B zu sehen ist, stieg die Genexpression ab 24 h langsam an und erreichte an Tag 3 einen Höhepunkt. Bis Tag 7 befand sie sich nahezu auf einem Plateau und fiel im Anschluss wieder ab. Die Genexpression von Ki-67 als Zellzyklusaktivitätsmarker stieg nach uIRI zunächst bis zu einem Maximalwert an Tag 3 steil an und fiel dann ab. An Tag 7 erreichte sie fast die

Werte einer gesunden Niere. Bei der kontralateralen Niere war an Tag 3 und Tag 10 nach uIRI eine Hochregulation der Genexpression von Ki-67 zu verzeichnen (siehe Abb. 33C). Um Ki-67 auch histologisch zu quantifizieren, wurden die Nierenschnitte mit einem Ki-67-Antikörper gefärbt. Bis 48 h nach uIRI waren kaum Ki-67-positive Zellen zu finden. Ab Tag 2 ergaben sich signifikante Unterschiede zur kontralateralen Niere (Abb. 33D und E).

Es zeigt sich somit, dass nach uIRI Veränderungen im Zellzyklus stattfinden – sowohl in der ischämischen als auch in der kontralateralen Niere. Diese Veränderungen starten verzögert nach etwa 24 h und erreichen bereits an Tag 3 ihren Höhepunkt auf Genexpressionsebene.

3.3. Therapeutische Blockade von Entzündung und Zelltod nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung

Die ersten Experimente dienten dazu, einen fortgesetzten Nierenschaden, Entzündung und Zelltod nach einem initialen Schädigungsereignis nachzuweisen. Entsprechend der Hypothese könnten sich hier erste Hinweise auf einen sich selbst verstärkenden ‚Nekroinflammationskreislauf‘ als Pathomechanismus für einen fortgesetzten Nierenschaden finden. Der zweite Teil der Hypothese besagt, dass dieser Kreislauf durch phasengerechte therapeutische Beeinflussung der Entzündung und der regulierten Nekrose in einem bestimmten therapeutischen Fenster inhibiert werden kann. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Interventionen mit spezifischen Hemmern der Entzündung und der regulierten Nekrose durchgeführt.

3.3.1. Zelltodblockade

Existiert Nekroinflammation und handelt es sich bei den hauptverantwortlichen Zelltodformen um regulierte Formen der Nekrose, so sollte es möglich sein, diese zu inhibieren und damit den entstehenden Schaden zu reduzieren. Um dies zu testen, wurden Ferrostatin-1, Necrostatin-1 und Cyclosporin A nach 35-minütiger uIRI zu verschiedenen Zeitpunkten injiziert. Das Experiment wurde nach 24 h Reperusionszeit beendet. Das Experimentdesign und die einzelnen Substanzen sind in Abb. 14 und 15 in Abschnitt 2.2.1. bereits beschrieben.

3. Ergebnisse

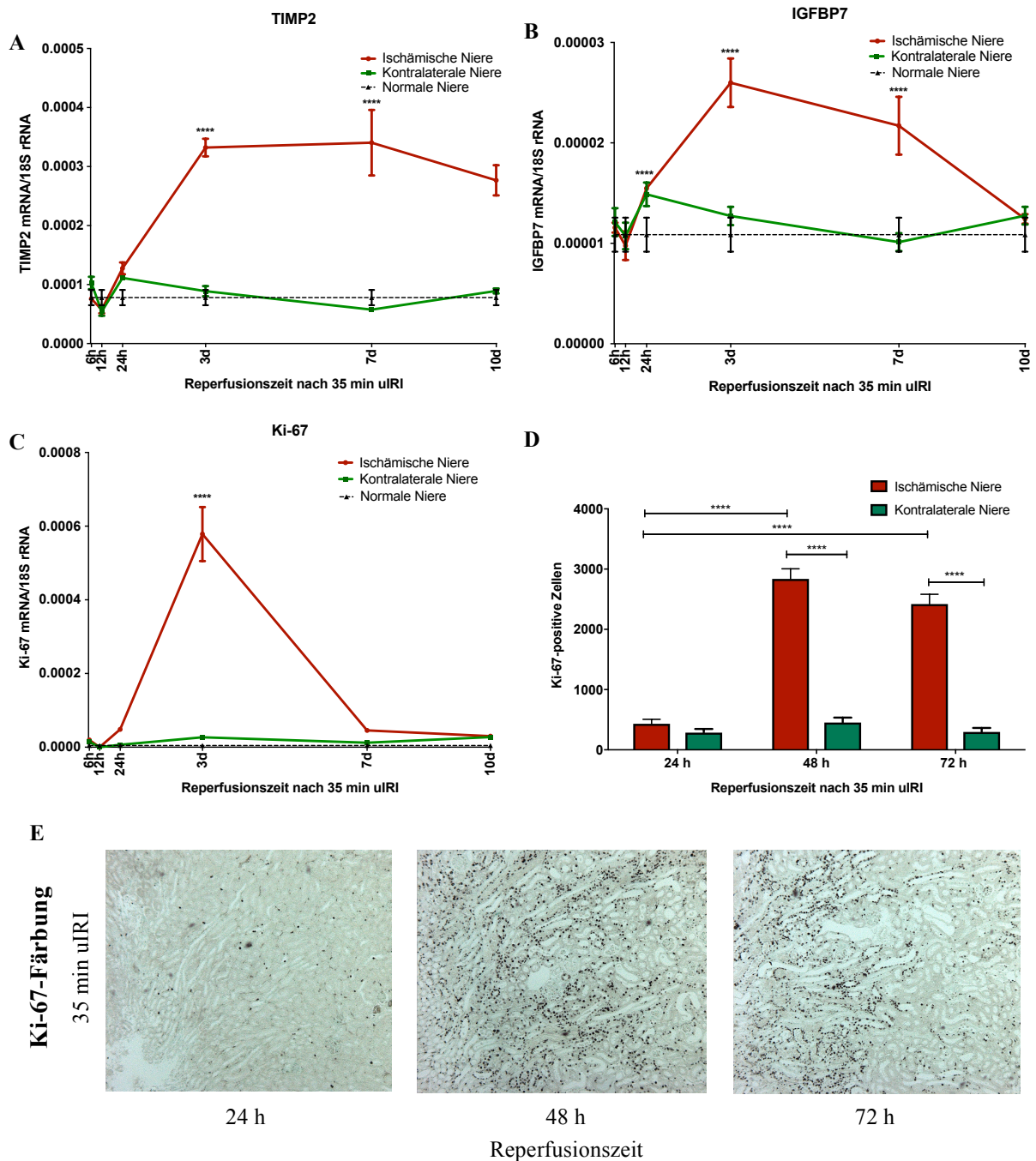


Abb. 33: Zellzyklusmarker nach unilateraler Ischämie-Reperfusionsverletzung (uIRI) in Abhängigkeit von der Länge der Reperfusionzeit

A/B/C: Je 5 C57BL/6 Mäuse pro Gruppe wurden einer uIRI mit 35 Ischämiezeit unterzogen. Nach Erreichen der Reperfusionzeit (1 h, 6 h, 12 h, 24 h, 2 d, 3 d, 7 d, 10 d) wurde das Experiment beendet. Dargestellt sind die Genexpressionslevel von Zellzyklusmarkern. Daten ergeben sich aus dem Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Vehicle-Gruppe.

D: Die Nierenschnitte der Mäuse mit Reperfusionzeiten von 24 h, 48 h und 72 h wurden mittels eines Ki-67 Antikörpers angefärbt und mit ‚Image-J‘ die Anzahl der positiven Zellen bestimmt. Pro Niere wurde der Mittelwert aus 3 Bildern in 100x Vergrößerung ermittelt und der Mittelwert \pm SEM aller fünf Mäuse pro Gruppe bestimmt.

E: Repräsentative Bilder der Ki-67-Färbung. Vergrößerung 100x.

Reduzierte Tubuluszellschädigung durch Injektion von Ferostatin-1, Necrostatin-1 und Cyclosporin A nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung

In der RT-PCR zeigte sich je nach Injektionszeitpunkt der Zelltodinhhibitoren eine unterschiedlich starke Unterdrückung der Genexpression der bereits in den ersten Experimenten verwendeten Schädigungsmarker (Abb. 34A, B, C). Eine signifikante Reduktion vom KIM-1, NGAL und Clusterin im Vergleich zur Vehicle-Gruppe, die nur NaCl erhielt, konnte nur in der Gruppe mit Injektion der Zelltodinhhibitoren 1 h vor uIRI erzielt werden. Eine Gabe 3 h danach resultierte nur bei KIM-1 und Clusterin in einer signifikanten Reduzierung der Genexpression. Bei Gabe 6 h nach uIRI war nur noch KIM-1 relevant vermindert und nach 12 h war gar kein signifikanter Effekt mehr zu verzeichnen. Additiv hierzu wurden die unmittelbar vor Beendigung der Reperfusionszeit gewonnenen Urinproben der Mäuse mit einem murinen KIM-1-ELISA ausgewertet. Es zeigte sich hier eine signifikante Reduzierung des Kim-1-/Kreatinin-Wertes für die Injektionszeitpunkte 1 h vor bis 6 h nach uIRI im Vergleich zur Vehicle-Gruppe. Die Auswertung der PAS-Färbung erfolgte mittels TIS zur Quantifizierung des Nierenschadens und unterstützt die Ergebnisse auf Genexpressionsebene (Abb. 34C und D). Die niedrigste Punktzahl im Vergleich zur Vehicle-Gruppe ergab sich in der Gruppe mit präemptiver Injektion 1 h vor uIRI. Bei Injektion 12 h nach uIRI war kein signifikanter Unterschied mehr zu verzeichnen.

Reduzierte Entzündung durch Injektion von Ferostatin-1, Necrostatin-1 und Cyclosporin A nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung

Zur Untersuchung der Entzündungsreaktion wurde in der RT-PCR die mRNA von CCL-2, TNF- α , IL-6 und CCL-5 quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 35A dargestellt. Die stärkste Reduzierung im Vergleich zur Vehicle-Gruppe zeigte sich für alle 4 Gene für die Injektion der Substanzen 1 h vor der Operation; 3 h danach war eine signifikante Reduzierung für TNF- α , CCL2 und CCL-5 nachweisbar. Eine Intervention nach 6 h oder 12 h führte noch zu relevanten Veränderungen bei TNF- α , IL-6 und CCL-5.

Histologisch wurden die Nierenschnitte mit einem Neutrophilen-spezifischen Antikörper gefärbt. Es zeigte sich eine Reduzierung der signalpositiven Fläche für die präemptive Gruppe und für die Gruppe mit der Injektion 3 h nach uIRI – allerdings erwiesen sich diese nicht als statistisch signifikant.

3. Ergebnisse

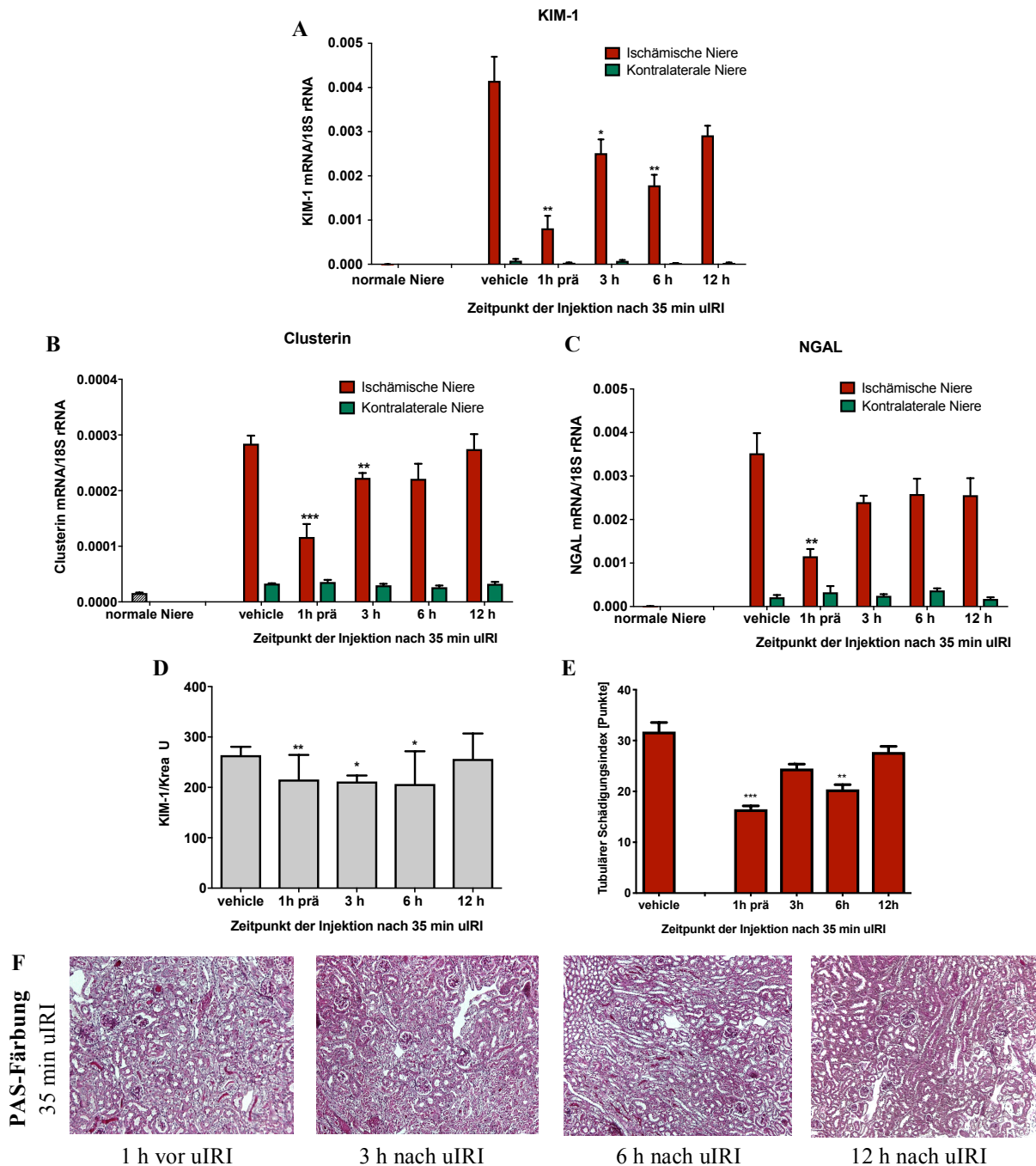


Abb. 34: Reduzierte Nierenschädigung durch Inhibition der regulierten Nekrose nach unilateraler Ischämie-Reperfusionsverletzung (uIRI)

An je 5 C57BL/6 Mäusen wurde eine uIRI mit 35 min Ischämie- und 24 h Reperfusionszeit durchgeführt. 1 h vor, 3 h, 6 h, 12 h nach Operation wurden einmalig je 10 mg/kg KG Ferostatin-1, 1,65 mg/kg KG Necrostatin-1 i.p., 2 mg/kg KG Cyclosporin A i.v. injiziert. Die Vehicle-Gruppe erhielt NaCl.

A/B/C: RT-PCR der Nierenproben für Marker einer Schädigung. Die Daten sind dargestellt als jeweilige Gen mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwerte von 5 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Vehicle-Gruppe.

D: KIM-1 ELISA der Urinproben vor Euthanasie. KIM-1/Kreatinin-Wert dargestellt als Mittel \pm SEM für $n = 5$.

E: Auswertung der PAS-Färbung der Nierenschnitte mithilfe des tubulären Schädigungsindex. Es wurden je 3 Gesichtsfelder pro Niere untersucht und der Mittelwert aller 5 Mäuse gebildet.

F: Repräsentative Bilder der PAS-Färbungen. Vergrößerung 100x.

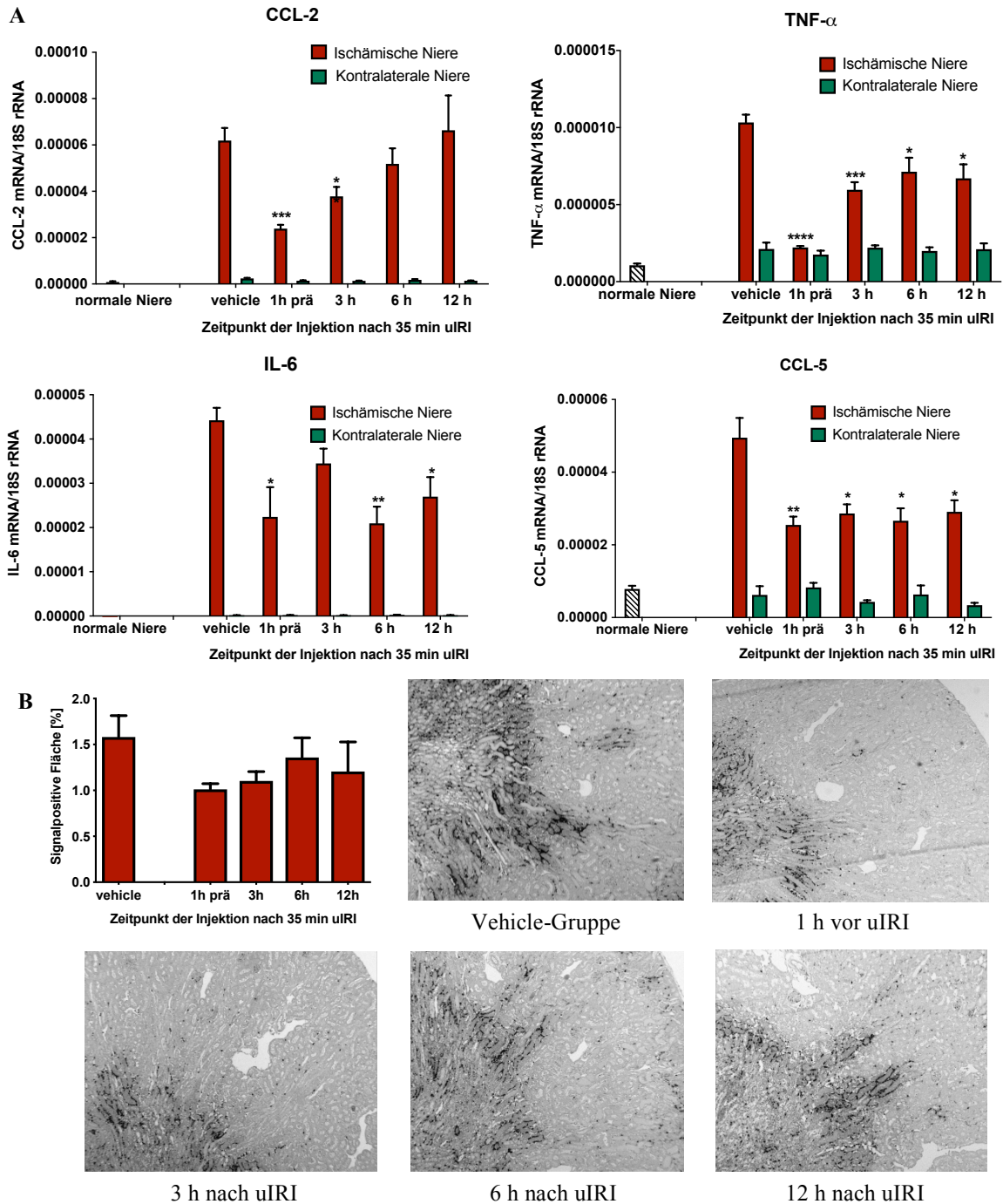


Abb. 35: Reduzierte Entzündungsreaktion durch Inhibition der regulierten Nekrose nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung (uIRI)

An je 5 C57BL/6- Mäusen wurde eine uIRI mit 35 min Ischämie- und 24 h Reperfuionszeit durchgeführt. Es wurden 1 h vor sowie 3 h, 6 h und 12 h nach Operation einmalig je 10 mg/kg KG Ferostatin-1, 1,65 mg/kg KG Necrostatin-1 i.p., 2 mg/kg KG Cyclosporin A i.v. injiziert. Die Vehicle-Gruppe erhielt NaCl.

A: Genexpressionslevel für Entzündungsmarker in der RT-PCR. Die Daten sind dargestellt als Gen mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ gegenüber der Vehicle-Gruppe.

B: In der Neutrophilen-Färbung wurde die signalpositive Fläche bestimmt. Betrachtet wurden jeweils 3 Gesichtsfelder in 100x Vergrößerung pro Niere. Der Endwert ergibt sich aus dem Mittelwert \pm SEM für $n = 5$. Gezeigt sind repräsentative Bilder der Färbung. Vergrößerung 50x.

Veränderungen des Nierengewichtes und Umstrukturierung der Niere nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung durch Injektion von Ferostatin-1, Necrostatin-1 und Cyclosporin A

In den ersten Experimenten erfolgte eine Auswertung des Nierengewichtes und verschiedener Fibrose- und Zellzyklusmarker in der RT-PCR zur Beurteilung der Atrophie und des Langzeitverlaufes. Deshalb sollte nun auch analysiert werden, ob sich diesbezüglich durch Inhibierung der regulierten Nekrose mittels Ferostatin-1, Necrostatin-1 und Cyclosporin A eine Veränderung zeigt.

Hierfür wurde nach Ablauf der Reperusionszeit das Delta-Nierengewicht (Gewicht der ischämischen – Gewicht der kontralateralen Niere) errechnet. Wie in Abb. 36A zu sehen ist, zeigte sich für die Gruppe, der die Inhibitoren 1 h vor uIRI injiziert wurden, eine signifikante Reduzierung des Delta-Nierengewichtes. Auch bei einer Injektion 3 h nach uIRI zeigte sich noch eine signifikante Verminderung gegenüber der Vehicle-Gruppe.

Als Fibrosemarker in der RT-PCR wurden erneut die Genexpressionslevel von TGF- β 1 und Ki-67 herangezogen. Während es in der Vehicle-Gruppe zu einer Hochregulierung der Genexpression von TGF- β 1 kam, wurde diese in allen Interventionsgruppen signifikant gesenkt (Abb. 38B). Der Marker Ki-67 zeigte ebenfalls eine relevante Reduzierung seiner Genexpression für die Injektionszeitpunkte 1 h vor bis 3 h nach uIRI.

3.3.2. Entzündungsblockade

Nachdem im vorangegangenen Experiment die Inhibition der regulierten Nekrose untersucht wurde, wurde nun der Versuch einer Entzündungsblockade unternommen. Für das Experimentdesign siehe Abb. 12 und Abb. 13 in Abschnitt 2.2.1.

Die Ergebnisse der RT-PCR hatten sich in den vorangegangenen Experimenten zur Beurteilung des Schädigungs- und Entzündungsgeschehens als aussagekräftig erwiesen. Orientierend wurde in diesem Teil der Arbeit nur mit dieser Methode gearbeitet und ein möglicher Effekt untersucht.

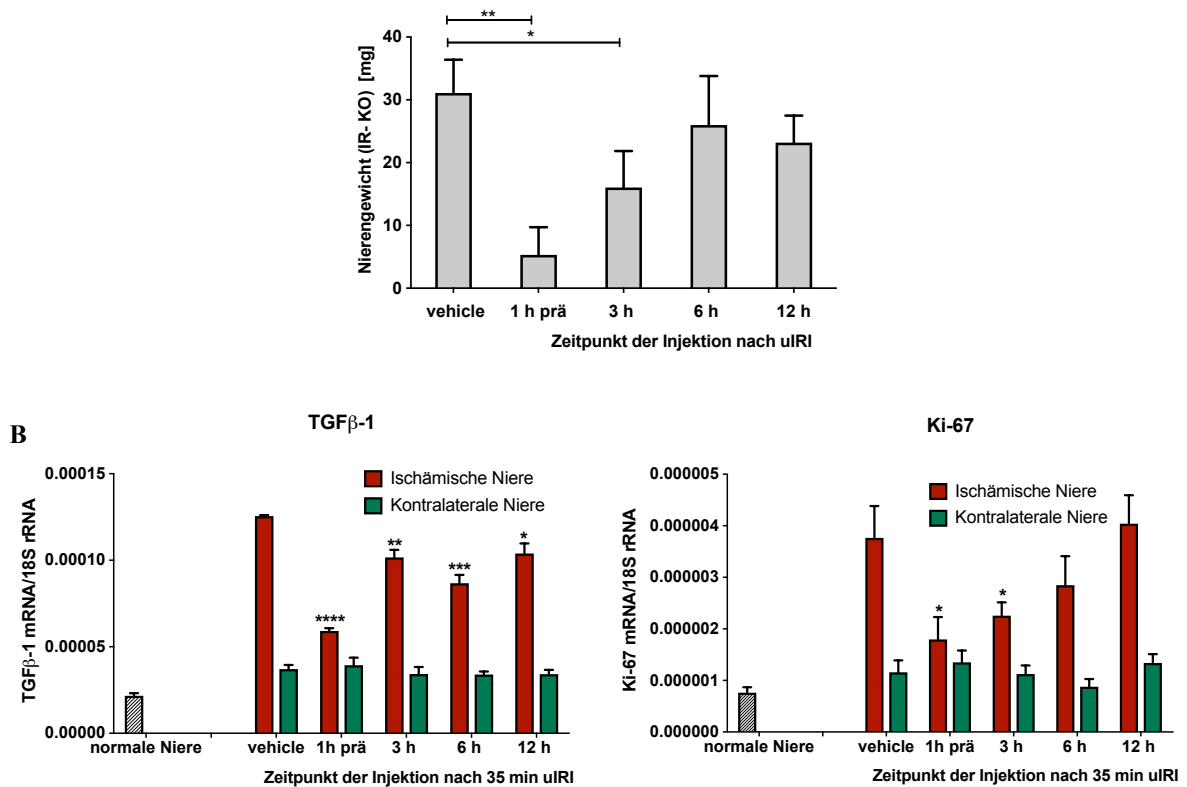


Abb. 36: Veränderungen des Nierengewichtes, der Genexpression von TGFβ-1 und Ki-67 nach uIRI durch Injektion von Inhibitoren der regulierten Nekrose

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde eine uIRI mit einer Ischämiezeit von 35 min durchgeführt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h vor, 3 h, 6 h, 12 h nach Operation) einmalig jeweils 10 mg/kg KG Ferostatin-1 und 1,65 mg/kg KG Necrostatin-1 i.p bzw. 2 mg/kg KG Cyclosporin A i.v. injiziert. Nach Ablauf einer Reperfuionszeit von 24 h wurde das Experiment beendet. Die Vehicle-Gruppe erhielt ein äquivalentes Volumen an NaCl.

A: Dargestellt ist das Delta-Nierengewicht (Gewicht der ischämischen Niere (IR) – Gewicht der kontralateralen Niere (KO)) als Mittelwert +/- SEM mit n = 5.

B: RT-PCR für verschiedene Entzündungsmarker. Die Daten sind dargestellt als jeweilige Gen mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwerte von 5 Mäusen ± SEM dar. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 gegenüber der Vehicle-Gruppe.

Effekte auf die Genexpression von Biomarkern durch Injektion von Prednisolon

Nach 35 min Ischämiezeit bei uIRI wurde den Mäusen 1 h vor, sowie 3 h, 6 h und 12 h nach der Operation 0,75 mg/kg KG Prednisolon injiziert (für das Experimentdesign siehe Abb. 12, Abschnitt 2.2.1). Wie in Abb. 39 zu sehen ist, ergab sich bis auf wenige Ausnahmen keine signifikante Reduktion der mRNA/18S rRNA-Expression der verwendeten Biomarker im Vergleich zur Vehicle-Gruppe.

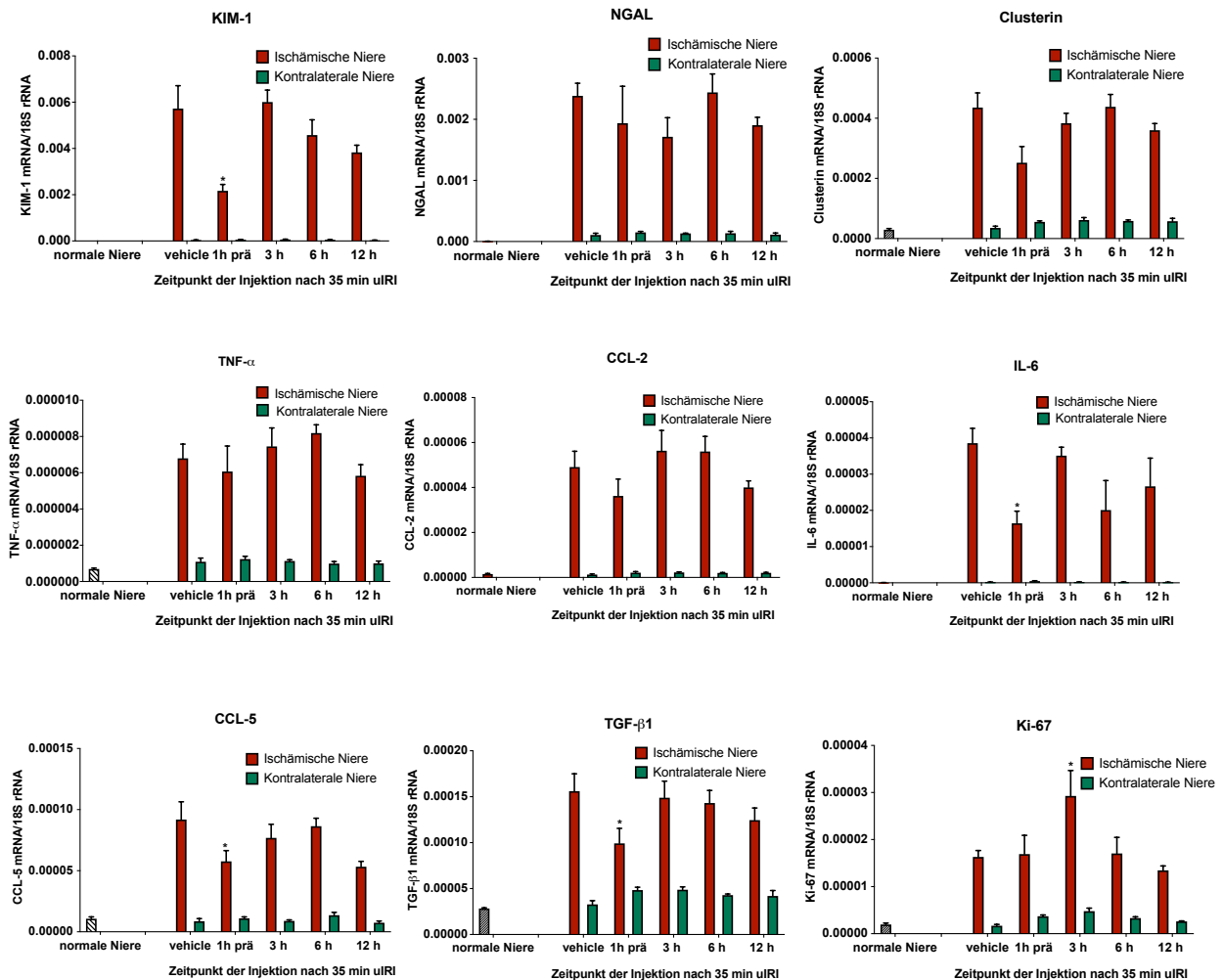


Abb. 37: Veränderungen der Genexpression von Biomarkern durch Injektion von Prednisolon nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung

An je 5 männlichen C57BL/6-Mäusen pro Gruppe wurde eine uIRI mit 35 min Ischämie- und 24 h Reperusionszeit durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h vor, 3 h, 6 h, 12 h nach Operation) wurden einmalig 0,75 mg/kg KG Prednisolon i.p. injiziert. Die Vehicle-Gruppe erhielt NaCl. Gezeigt sind die RT-PCR-Ergebnisse für verschiedene Schädigungsmarker (KIM-1, NGAL, Clusterin), Entzündungsmarker (TNF- α , CCL-2, IL-6, CCL-5), Fibrosemarker (TGF- β 1) und Proliferationsmarker (Ki-67).

Die Daten sind dargestellt als jeweilige Gen mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 gegenüber der Vehicle-Gruppe.

Effekte auf die Genexpression von Biomarkern durch Injektion von Etanercept

Ein zweiter Versuch der Entzündungshemmung sollte mit Etanercept als TNF- α -Inhibitor durchgeführt werden (für das Experimentdesign siehe Abb. 12, Abschnitt 2.2.1). Als Marker einer Tubulusschädigung waren KIM-1 und NGAL zu jedem Injektionszeitpunkt im Vergleich zur Vehicle-Gruppe signifikant reduziert. Bei TNF- α , CCL-2 und CCL-5 zeigte sich nahezu kein Effekt. Das IL-6 wurde in allen Gruppen vermindert exprimiert; Ki-67 zeigte sich zu allen Injektionszeitpunkten des Inhibitors signifikant erhöht.

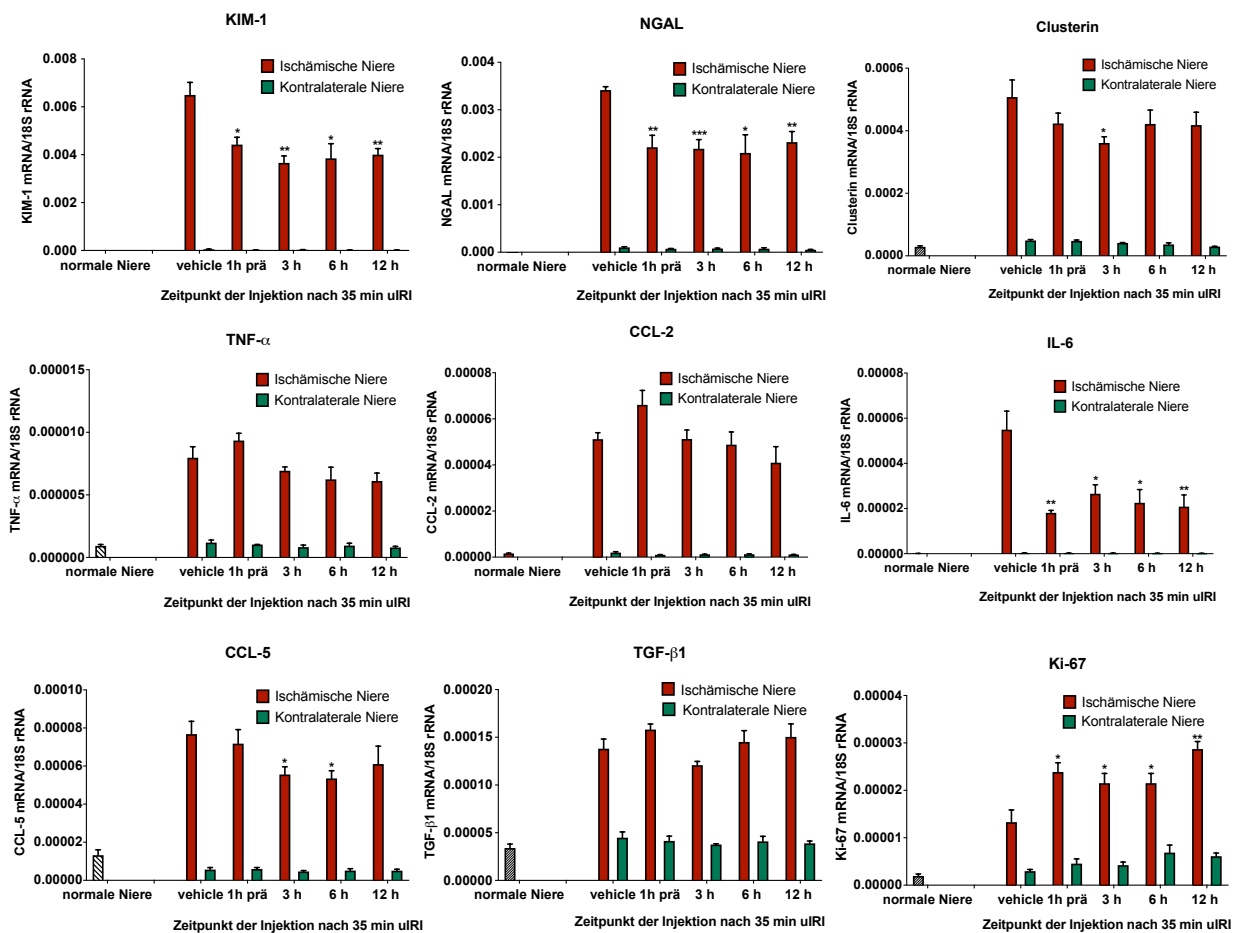


Abb. 38: Veränderungen der Genexpression von Biomarkern durch Injektion von Etanercept nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung

An je 5 C57BL/6-Mäusen pro Gruppe wurde eine uIRI mit 35 min Ischämie- und 24 h Reperusionszeit durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 h vor, 3 h, 6 h, 12 h nach Operation) wurden einmalig 10 mg/kg KG Etanercept i.p. injiziert. Gezeigt sind die Ergebnisse der RT-PCR für Schädigungsmarker (KIM-1, NGAL, Clusterin), Entzündungsmarker (TNF- α , CCL-2, IL-6, CCL-5), Fibrosemarker (TGF- β 1) und Proliferationsmarker (Ki-67). Die Daten sind dargestellt als jeweilige Gen mRNA/18S rRNA und stellen den Mittelwert von 5 Mäusen \pm SEM dar. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001 gegenüber der Vehicle-Gruppe.

4. Diskussion

Die Hypothese dieser Arbeit lautet:

Nach akuter ischämischer Tubulusnekrose entsteht zwischen regulierten Formen der Nekrose und dem entzündlichen Mikromilieu ab einem bestimmten Schädigungsgrad ein sich selbst verstärkender Kreislauf der Nekroinflammation, der zu fortgesetzter Nierenschädigung, Entzündung und Fibrose führt. Diese auto-amplifizierende Verbindung lässt sich durch therapeutische Beeinflussung der Entzündung und regulierter Formen der Nekrose in einem bestimmten therapeutischen Zeitfenster inhibieren.

Im experimentellen Ansatz am Mausmodell mittels uIRI ist es gelungen, noch fünf Wochen nach einem akuten ischämischen Ereignis einen fortgesetzten Nierenzellschaden nachzuweisen, der mit einem proentzündlichen Mikromilieu aus Zytokinen, Chemokinen und Immunzellen assoziiert ist und letztlich in Fibrose und Nierenatrophie mündet. Kompensatorisch hypertrophiert die kontralaterale Niere zur Erhaltung der Nierenfunktion. Dieser Prozess ist direkt abhängig von der Länge der Ischämie und nur bei Erreichen einer gewissen Schwelle – in den vorliegenden Experimenten ab einer 35 Ischämiezeit von 35 min – zu beobachten.

Erfolgreiche therapeutische Interventionen mit Inhibitoren der regulierten Nekrose legen die Nekrose als vorwiegende Zelltodform und treibende Kraft des Schädigungsprozesses nahe. In Zusammenschau mit den Ergebnissen einer anti-entzündlichen Therapie finden sich Hinweise auf eine nicht nur rein assoziative, sondern kausale Verbindung zwischen entstehendem entzündlichem Mikromilieu und Tubulusnekrose. Bezüglich eines therapeutischen Fensters fanden sich in den Experimenten dieser Arbeit Limitationen; am erfolgreichsten wirkte sich eine präemptive Gabe der inhibitorischen Substanzen aus, aber auch eine bis zu 12h verzögerter Gabe zeigte teilweise hemmende Effekte auf die entstehende Schädigung und Entzündungsreaktion nach uIRI. Eine Zelltod-inhibierende Therapie zeigte sich wirksamer als eine anti-entzündliche Therapie.

Im Folgenden sollen die einzelnen Punkte nun genauer aufgezeigt und diskutiert werden.

4.1. Nach unilateraler Ischämie-Reperfusionsverletzung kommt es zu fortgesetztem Zelltod und Entzündung

Bei der uIRI handelt es sich um eine durch transiente Hypoperfusion ausgelöste Nierenschädigung, die zu einem ANV führen kann. Nach Beendigung der Ischämiezeit hat die Niere in der Reperfusionsphase die Möglichkeit, sich zu regenerieren und zu reorganisieren. Anhand der Hypothese dieser Arbeit wird postuliert: Wird ein bestimmtes Schädigungsmaß erreicht, führt dies zu einem fortgesetzten Schädigungsmechanismus, der in einem Nephronenverlust und einer Nierenatrophie mündet und als unabhängiger Risikofaktor für ein CNV dient.

Dies deckt sich mit Daten, die in der Klinik an Patienten bereits erhoben wurden. Lange wurde das ANV unterschätzt, da Patienten nach diesem oft nach kurzer Zeit wieder normale Kreatinin-Werte erreichten. Große Studien zeigen nun die Langzeitfolgen auf: ein erheblich erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines CNV [73, 76, 77, 144], die Verschlechterung eines präexistierenden CNV [75, 117] und die Progression zu einem terminalen Nierenversagen [73, 145]. So beträgt laut einer Studie von Amdur et al. nach einer ATN das Risiko für die Entwicklung eines CNV Stufe IV oder höher innerhalb von 18–24 Monaten bis zu 20 % [144] – eine Erkenntnis, die in Zeiten des demografischen Wandels noch mehr an Bedeutung gewinnt. Mit den Jahren reichen die kompensatorischen Mechanismen bei zusätzlichem physiologischem Verfall nicht mehr aus und der irreversible Nephronenverlust manifestiert sich im CNV.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche spiegeln die klinischen Beobachtungen wider. Nach einer ischämisch ausgelösten ATN durch unilaterale Abklemmung der Nierengefäße bei uIRI kommt es zu einem progressiven und noch nach Wochen nachweisbaren Nephronenverlust, der von einem proentzündlichen Mikromilieu getragen wird und sich letztlich in Nierenatrophie und fibrotischer Umwandlung manifestiert. Die Nieren der operierten Mäuse zeigten bei ausreichender Schädigung auch noch fünf Wochen nach uIRI eine erhöhte Expression von tubulären Schädigungsmarkern wie KIM-1 und NGAL sowie von Zytokinen und Chemokinen wie CCL-2, TNF- α , IL-6 und CCL5. Histologisch dominierte in den ischämischen Nieren ein Bild, das durch Bürstensaumverlust, Zylinder, tubuläre Nekrose und tubuläre Dilatation geprägt war und von Zellen des Immunsystems, wie den Neutrophilen, infiltriert wurde. Mittels TUNEL-Färbung waren auch nach fünf Wochen noch frisch nekrotisierende Zellen sichtbar. Die Abnahme des Nierengewichtes, Fibrose- und

Bindegewebismarker in der PCR – wie TGF- β 1 und Coll1 α 1 – sowie das Ergebnis der Masson-Trichrom-Färbung zeigten das Endresultat dieses Prozesses: Die ischämischen Nieren wurden atroph und fibroisierten. Kompensatorisch dazu hypertrophierten die kontralateralen Nieren. Zellzyklusarrestgene, wie IGFBP7 und TIMP2, sowie das als Hypertrophiemarker verwendete Ki-67 wurden in der geschädigten Niere vermehrt exprimiert. Dies greift in die Debatte der funktionellen und strukturellen Regeneration nach ANV ein. Mit gewissen Differenzen in Modellgestaltung und Verwendung sind dies Beobachtungen, die auch von anderen Forschergruppen bestätigt wurden. So konnten Ko et al. bei der unilateralen Nephrektomie mit kontralateraler Ischämie-Reperfusion nach 4–8 Wochen [58] oder Basile et al. bei 60 min bilateraler Ischämie-Reperfusion nach 40 Wochen ähnliche strukturelle und funktionelle Veränderungen feststellen [146]. Auch von der sich zeigenden Gewichtszunahme und Hypertrophie der kontralateralen Niere wird in der Literatur berichtet [147]. Biopsien von Nieren von Patienten, die ein ANV durchlebt haben, zeigten lange Zeit später ebenfalls morphologischen Auffälligkeiten und einen fibrotischen Umbau [148, 149]. Die beobachtete interstitielle Fibrose gilt als einer der bedeutendsten, von der Grunderkrankung unabhängigen, Faktoren, der zu der Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz führen kann und gilt als negativer Prädiktor [150].

4.2. Einfluss der Ischämiezeit auf die Entwicklung eines chronisch-akuten Nierenversagens

In Bezug auf den Einfluss der Ischämiezeit konnte in den Experimenten gezeigt werden, dass erstens eine Korrelation zwischen der Länge der Ischämiezeit und der Progression hin zu einer chronischen Nierenschädigung besteht, und dass zweitens ein gewisser ‚Schwellenwert‘ zur Erzielung einer chronischen Nierenschädigung erreicht werden muss.

Als veränderbare Parameter für die Schädigungsschwere diente in den Versuchen die Veränderung der Länge der Ischämiezeit bei uIRI. Durch den standardisierten, temperaturkontrollierten Operationsablauf konnten andere Faktoren, vor allem die Temperatur als einer der größten Einflüsse bei diesem Schädigungsmodell [119], konstant gehalten und vergleichbare Versuchsbedingungen konnten geschaffen werden. In allen untersuchten Kategorien – Tubulusschädigung, Entzündungsantwort, Zelluntergang, Fibrose und Atrophie – war sowohl auf Genexpressionsebene durch Ergebnisse der PCR als auch

durch histologische und immunhistologische Färbungen eine längere Ischämiezeit mit einem höheren Anstieg der jeweiligen Parameter verbunden. Erst ab einer Ischämiezeit von 35 min konnte ein langfristiger Schaden, der durch Atrophie und fibrotischen Umbau der ischämischen Niere sichtbar wird, nachgewiesen werden.

Dieser Zusammenhang konnte auch in klinisch-epidemiologischen Studien zum ANV gezeigt werden. Chawla et al. untersuchten Patienten mit ANV in verschiedenen Stadien und zeigten, dass das Risiko, ein CNV zu entwickeln, mit der Schwere des ANV assoziiert ist. Dabei hatten Patienten mit einer vorübergehenden Dialysepflicht ein wesentlich höheres Risiko für die Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung als Patienten mit einer milderen Ausprägung des ANV [75]. Ishami et al. zeigten, dass abhängig vom Serumkreatinin-Spiegel, der repräsentierend für das Stadium des ANV stehen sollte, nach einer Herzoperation das Risiko für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz stieg [151]. Takaori et al. versuchten in einer Studie, den determinierenden Faktor und Ursprungsort für die Entstehung eines CNV zu finden. In einem Mausmodell mit Diphtherietoxin, das speziell die proximalen Tubuli schädigt, fanden sie in diesem morphologischen Teil der Niere eine Antwort. Eine einmalige Injektion von Diphtherietoxin bei Mäusen in niedriger Dosis führte zu einer reversiblen Fibrose, eine höher dosierte oder mehrmalige Gabe schwächerer Dosen resultierte in interstitieller Fibrose, Inflammation und Glomerulosklerose. Darüber hinaus vermuteten sie eine Art „intertubulären Crosstalk“ zwischen distalen und proximalen Tubuli und Fibroblasten [152]. Interessant ist dieser Vergleich vor allem deshalb, weil auch bei der uIRI die proximalen Tubuli im S3-Segment der Hauptschädigungsort sind [35, 153]. Dies konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch den Anstieg spezifischer Genexpressionsmarker dieser morphologischen Anteile, wie KIM-1 und NGAL, sowie in den histologischen Färbungen beobachtet werden. Mit ihrem Experiment beschreiben Takaori et al. ebenfalls solch eine ‚Schwelle‘ für einen irreversiblen Schaden, obgleich es sich bei ihnen um ein toxisches Modell handelte. Ebenfalls in der Diskussion ist der Zusammenhang zwischen dem Progressionsrisiko und der Frequenz der Schädigung [154]. Bei den Versuchen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nur eine einmalige Reizung bzw. therapeutische Blockade gewählt, um die Theorie der Nekroinflammation mit ihren auto-amplifizierenden Eigenschaften zu überprüfen; es ist jedoch davon auszugehen, dass hier noch einmal ein erhöhter Schaden beobachtbar gewesen wäre.

4.3. Nekroinflammation als Pathomechanismus für ein chronisch-auf-akutes Nierenversagen

In Forschung und Klinik ist die Verbindung zwischen ANV und CNV angekommen, dennoch ist der genaue Pathomechanismus hinter dieser Entwicklung noch nicht verstanden. Die Tatsache, dass die Inzidenzen des ANV stetig steigen, macht zunehmend Druck, diese Vorgänge näher zu ergründen, um so prognostisch und therapeutisch adäquat reagieren zu können.

Die Fachliteratur zeigt hier als Erklärungsansatz ein ganzes Arsenal an möglichen Faktoren auf, die pathophysiologisch eine Rolle spielen und multiple Anhalte für spezifische Therapien bieten. Die bedeutsamsten der derzeit diskutierten sind: oxidativer Stress/ROS als einer der Hauptmechanismen während eines post-ischämischen oder toxischen Nierenschadens [155-157], regulierte Zelltodformen [105, 158], mitochondriale Dysfunktion und ROS-Produktion [99, 156], immunregulatorische Lipid-Mediatoren wie Prostaglandine [159-162], Zytokine und ihre Wirkung [43, 163], Chemokine und ihre Interaktionen mit den Zellen des Immunsystems [164, 165], neutrophile Granulozyten und ihre Fähigkeit zur Formierung von NETs [166, 167], extrazelluläre toxische Histone, die bei Zellruptur freierwerden, in den Kreislauf gelangen und dort womöglich für die systemische Ausbreitung des lokalen Schadens verantwortlich sind [168-170] sowie humorale Mediatoren wie Komplementfaktoren und natürliche Antikörper [171-173]. Es handelt sich hierbei um Faktoren, die entweder Bestandteil oder Folge eines progressiven Entzündungsgeschehens und Formen regulierter Nekrose sind, eben dieser beiden großen Komponenten, die die Nekroinflammation als Gesamtkonzept eint. Nekroinflammation als Theorie schließt somit andere Pathomechanismen nicht aus, es geht vielmehr um Prioritäten und Gewichtungen.

Nekroinflammation, kurz wiederholt, beschreibt eine sich selbst verstärkende Verbindung zwischen Nekrose (definiert durch Zelltod und Membranruptur) und Entzündung (definiert durch Zytokinfreisetzung, erhöhte vaskuläre Permeabilität, Rekrutierung von Immunzellen) [82]. Über das Wechselspiel von DAMP-vermittelter Aktivierung des angeborenen Immunsystems und Zytokin-induzierter regulierter Nekrose entsteht ein sich selbst-amplifizierender Prozess, der von einer lokalen Entzündungsreaktion zu einer systemischen Antwort mit Multiorganversagen führen kann [105].

Wie zuvor beschrieben konnte in den ersten Experimenten ein fortgesetztes Entzündungsgeschehen und ein fortgesetzter Zelltod nach durch Ischämie induzierter ATN

festgestellt werden. Dies lässt auf einen Mechanismus schließen, der diese auch in der Reperfusionphase aufrechterhält und eine Progression verursacht. In dem zweiten großen experimentellen Ansatz dieser Arbeit mit gleicher Ischämie-, aber unterschiedlicher Reperusionszeit bei uIRI sollten erste Hinweise dafür gefunden werden, welche Komponenten wann führend sind.

Die Ergebnisse zeigen ein fortbestehendes entzündliches Mikromilieu, das mit einem progressiven Anstieg von Schädigungsmarkern und Zelltod assoziiert ist und letztlich in der Induktion von Fibrose und Atrophie mündet. Interessant sind hier vor allem die Höhepunkte und der Verlauf der einzelnen untersuchten Subkategorien (siehe Abb. 26, 27). Histologische PAS- und TUNEL-Färbungen zeigten, dass der größte Anstieg in Bezug auf Zellschaden und Zelltod bereits 6 h nach uIRI zu verzeichnen ist. Schädigungsmarker, wie KIM-1 oder NGAL, bestätigen dies auf Genexpressionsebene in der RT-PCR. Die Migration von Neutrophilen, als erste Verteidigungslinie der angeborenen Immunität, setzt erst kurze Zeit später ein und erreicht nach 12 bis 24 h ihr Maximum. Das proentzündliche Mikromilieu aus Zytokinen und Chemokinen, wie TNF- α oder CCL-2, entwickelt sich allmählich und erreicht sein Maximum am Tag 3. Mit diesem zeitgleich einhergehend sind zunehmende Signale der Zelle zur Expression von profibrotischen und zellzykluseintretenden Signalmolekülen wie TGF- β 1 oder Ki-67. Bis diese dann durch Gewichtsverlust und durch Atrophie der ischämischen Niere bzw. Hypertrophie der kontralateralen Niere ihre Wirkung zeigen, dauert es noch einmal etwa 3 Tage. Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass bei ischämischer Schädigung der sterile, tubuläre Schaden am Anfang des Nekroinflammationskreises steht, gefolgt von einer Antwort des Immunsystems. Durch die Hypoxie werden Formen des regulierten Zelltodes induziert, was dann sekundär zu einer verstärkten Entzündungsantwort führt. In Experimenten anderer Forschergruppen werden besonders Ferroptose, MPT-RN und Nekroptose als mögliche führende Formen der regulierten Nekrose hervorgehoben, da diese nicht, wie Pyroptose und Parthanatos, von einem ‚outside-in‘ abhängig sind [82] und beispielsweise durch die Akkumulation von hydrogen Peroxiden und ROS, die bei oxidativem Stress und zellulärer Redoxinbalance entstehen [174, 175], angestoßen werden können [126, 176]. Als Antwort auf die Induktion der Zelltodprogramme schwellen die Epithelzellen an, bis ihre Membran rupturiert. Die hierdurch freigesetzten DAMPs fördern dann die Entzündungsantwort, was zu einem proentzündlichen Milieu aus Botenstoffen, Chemokinen und Zytokinen führt. Dieses wiederum verstärken Formen der regulierten Nekrose, die nun auch eine größere Bandbreite erreichen. Der explosionsartige Anstieg TUNEL-positiver Zellen und tubulärer Schädigungsmarker nach 6 h lässt auf keinen regelmäßigen, gleich

starken Schädigungsprozess schließen. Aus der Physiologie ist bekannt, dass tubuläre Zellen als funktionelle Einheit fungieren können [40]. Es gibt Hinweise, dass eine ähnliche Verbindung auch bei Schädigung bestehen und diese Beobachtung erklären könnte. So konnten Linkermann et al. an isolierten Tubuluszellen mittels intravasaler Mikroskopie bei IRI- und Oxalat-Kristall-Modellen eine synchronisierte Tubulusnekrose beobachten, für die sie hauptsächlich die Ferroptose verantwortlich sehen [96].

4.4. Therapeutische Blockade der Nekroinflammation

Der Nekroinflammationskreis in seiner Theorie bietet zahlreiche therapeutische Ansatzpunkte für anti-entzündliche Therapien und Inhibitoren des regulierten Zelltodes. Entsprechen die oben diskutierten Assoziationen einer kausalen Verbindung, so sollte es durch die Blockade einer der beiden Hauptakteure möglich sein, auch die Verstärkung des anderen zu hemmen. In diesem Falle wären Immunsuppression und die Inhibierung der regulierten Nekrose zwei Seiten derselben Münze. Die auto-amplifizierende Natur des hypothetischen Nekroinflammationskreislaufes legt nahe, dass der Zeitpunkt der therapeutischen Intervention von wesentlicher Bedeutung für einen signifikanten Effekt ist. Im Folgenden sollen die Ergebnisse der in dieser Arbeit versuchten Interventionen und deren Interpretation in Zusammenschau mit der Literatur aufgezeigt werden.

Die Gabe von Inhibitoren der regulierten Nekrose bis 6 h nach unilateraler Ischämie-Reperfusionverletzung führt zu einer verminderten Nierenschädigung

Mit Entdeckung der regulierten Nekrose und Erforschung ihrer Mechanismen wurden neue Substanzen zur Hemmung dieser entwickelt. Wird weiterhin davon ausgegangen, dass am Anfang ein steriler Prozess steht, der durch die Hypoxie bei akuter Tubulusnekrose angestoßen wird, und dass hier regulierte Nekroseformen den ersten Anreiz geben, sollte eine Inhibierung dieser Nekroseformen eine Verbesserung des Langzeitergebnisses zur Folge haben. Für Ferroptose, Nekroptose und MPT-RN wurde bisher eine bedeutende Rolle bei IRI in experimentellen Versuchen beobachtet [56, 85, 177]. Von dem präventiven Nutzen der im Rahmen der vorliegenden Studie verwendeten Substanzen (Ferrostatin-1 zur Inhibierung der Ferroptose [96, 127], Necrostatin-1 zur Hemmung von Nekroptose [87, 129, 178] und

Cyclosporin A als Inhibitor der MPT-RN [179, 180]) wird in ischämischen und toxischen Modellen des ANV bereits berichtet. Darüber hinaus zeigen experimentelle Arbeiten von Linkermann et. al., dass eine kombinierte Gabe der Inhibitoren, wie sie im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde, einen möglichen additiven protektiven Effekt haben könnte. So waren spezielle RIPK3/CypD-Doppel-Knockout-Mäuse, die Defekte für Nekroptose und MPT-RN aufwiesen, vor einem schweren Ischämie-Reperfusionsschaden geschützt. Bei Single-Knockout-Mäusen mit nur einem Defekt zeigte sich das gleiche Schädigungsausmaß jeweils letal [95]. Eine kombinierte Gabe von Necrostatin-1 und Sangliferin A – einer Substanz ähnlich dem in dieser Arbeit verwendeten Cyclosporin A – 15 min vor der bilateralen IRI mit einer Ischämiezeit von 30 min führte zu einer starken Protektion [95]. Eine dreifach kombinierte Gabe mit Ferrostatin 1 h vor einer 50-minütigen bilateralen IRI zeigte, verglichen mit der Zweifachgabe, einen weiteren additiven Effekt [96]. Obwohl sich diese Studien von der vorliegenden in Bezug auf Durchführung des IRI-Modells, Ischämiezeit und Reperfusionszeitpunkt, sowie hinsichtlich der verwendeten Substanzen und Dosen unterscheiden, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein protektiver Effekt durch einmalige Applikation von Ferrostatin-1, Necrostatin-1 und Cyclosporin A beobachtet werden. Bereits nach einer Reperfusionszeit von 24 h zeigte sich eine signifikante Verringerung von Schädigungs- und Entzündungsmarkern, die histologisch und auf Proteinebene gesichert werden konnte. Dies lässt auf eine kausale Verbindung zwischen den Zelltodmechanismen, dem sich darauf aufbauenden Mikromilieu aus DAMPs und Alarminen und dem Entzündungsgeschehen schließen. Neu, auch in Bezug auf die derzeitige Studienlage, ist die versuchte verzögerte Gabe der therapeutischen Substanzen. Obgleich die Ergebnisse die gängige Meinung ‚je eher, desto besser‘ unterstützen, konnten in den Versuchen dieser Arbeit protektive Effekte bei bis zu 6 h verzögerter Gabe verzeichnet werden – je nach untersuchtem Biomarker sogar bei einer Verzögerung von bis zu 12 h. Limitierend ist zu sehen, dass nur ein früher Reperfusionszeitpunkt von 24 h untersucht wurde und das eine Injektion der Inhibitoren nur einmalig erfolgte. Aus therapeutischer Sicht wären längerfristige Ergebnisse, mehrmalige Gaben und funktionelle Parameter wie z. B. GFR bei einem bilateralen Modell von Interesse gewesen und sind für Folgestudien empfehlenswert.

Keinen Einfluss schien der therapeutische Eingriff auf die Einwanderung der Neutrophilen zu haben. Neutrophile stehen im Verdacht durch die Formierung von NETs die Progression und Folgeschäden des ANV zu fördern [167, 181, 182]. Dabei gibt es Hinweise, dass diese Formierungen von dem durch Tubulusnekrose entstandenen Mikromilieu abhängig sind und erst sekundär als Reaktion hierauf induziert werden [183]. Es wäre also in weiteren Studien

zu eruieren, ob in den Experimenten der vorliegenden Studie auch dieser Prozess beeinflusst wurde. Weiterhin würde dies einen Erklärungsansatz dafür liefern, warum die zuvor erwähnten RIPK3/CypD-Knockout-Mäuse von Linkermann et al. keinen ischämischen Nierenschaden erlitten, während die Gabe der inhibitorischen Substanzen allein einen solchen Schaden jedoch nur vermindern konnte. Womöglich reichte die Anzahl an frei werdenden DAMPs der sterbenden Tubuluszellen aus, um eine Formation von NETs zu induzieren. Erste vielversprechende Ergebnisse für eine zusätzlichen Protektion durch gemeinsame Gabe von Nekrose- und NET-Inhibitoren bei Ischämie-Reperfusion gibt es bereits [183].

Effekte einer anti-entzündlichen Therapie nach unilateraler Ischämie-Reperusionsverletzung

Ein zweiter Ansatz dieser Arbeit befasst sich mit der Inhibierung der Entzündungsreaktion als wesentliche Komponente der Nekroinflammation. Prednisolon ist seit Jahren in der klinischen anti-entzündlichen Therapie im Einsatz. Dennoch zeigt sich ein absteigender Trend in Bezug auf die Popularität. Zu unklar ist die genaue Wirkungsweise auf das gesamte biologische System, zu schwerwiegend sind die möglichen Nebenwirkungen. Es wird nach gezielteren therapeutischen Targets gesucht. So gibt es derzeit zahlreiche Bemühungen und Studien zur Steroidvermeidung bei Organtransplantationen [184, 185] oder bei systemischem Lupus Erythematodes [186] und auch die Effektivität in der Akutbehandlung von septischen Geschehen ist zunehmend umstritten [187]. In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich durch Einmalgabe von Prednisolon vor bzw. nach uIRI in der Genexpressionsanalyse nahezu kein Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Einzig die präemptive Gabe konnte vereinzelt die Expression von Schädigungsmarkern, wie KIM-1, und proentzündlichen Zytokinen, wie IL-6 oder CCL2, signifikant reduzieren. Hierfür gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Es ist hierbei von Bedeutung, sich die Pharmakodynamik von Glukokortikoiden zu verdeutlichen. Während der Mechanismus der akuten, innerhalb von Minuten eintretenden Wirkung noch nicht in Gänze ergründet wurde und membranstabilisierende Effekte vermutet werden, treten die genomischen Effekte von Glukokortikoiden erst nach Stunden bis Tagen ein und beruhen vermutlich auf Veränderungen auf Genexpressionsebene [5]. Prednisolon bindet hier an seinen spezifischen und zytosolischen Glukokortikoidrezeptor. Nach der Translokation des Rezeptor-Glukokortikoid-Komplexes in den Zellkern wird die Transkriptionsrate der mRNA von etwa 50–100 Proteinen verändert. Durch Hemmung des Transkriptionsfaktors NF- κ B wird die Synthese zahlreicher Mediatoren von Entzündungs-

und Immunreaktionen wie IL-1, IL-2 und TNF- α verringert [188]. Dies lässt vermuten, dass eine einmalige Gabe und der hier gewählte Beobachtungszeitpunkt von 24 h womöglich nicht ausreichend waren, um entsprechende Effekte zu sehen. Einmalgaben von Prednisolon sind in der Regel hochdosiert, während in dieser Arbeit relativ geringe Konzentrationen verwendet wurden. Zudem spricht die Theorie der Nekroinflammation und ihrer Pathophysiologie an sich dafür, dass eine Substanz, die ihr Hauptziel an der genomischen DNA hat, in der Akutphase weniger effizient ist. Am Anfang des Prozesses steht gemäß der Beobachtungen aus der vorliegenden Arbeit eine sterile Reaktion, ausgelöst durch Hypoxie. Werden die Verläufe der verwendeten Biomarker bei uIRI in den Versuchen betrachtet, sind Akute-Phase-Proteine wie IL-6 bereits nach 6 h an ihrem Maximum. Die Nekroinflammation läuft bereits ab, das Mikromilieu aus DAMP, Chemokinen und Zytokinen ist geschaffen und das Wechselspiel zwischen Nekrose und Inflammation ist nur noch schwer aufzuhalten.

Der nächste therapeutische Eingriff im Rahmen der vorliegenden Studie richtete sich deshalb direkt an einen Bestandteil dieses entstehenden entzündlichen Mikromilieus. Bei TNF- α handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin und Alarmin, das hauptsächlich von Makrophagen gebildet wird und zu Apoptose und Nekrose führen kann [189]. Es konnte hier festgestellt werden, dass TNF- α bereits wenige Stunden nach uIRI mit 35 min Ischämiezeit stark hochexprimiert wurde und auch nach 5 Wochen noch signifikant erhöht war. Etanercept ist ein löslicher TNF- α -Rezeptor, der seit Jahren erfolgreich bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder Psoriasis eingesetzt wird [190, 191]. Seine anti-inflammatorischen und anti-apoptotischen Effekte wurden in zahlreichen renalen Schädigungsmodellen – darunter chronische ischämische Insuffizienz und unilaterale urethrale Obstruktion – bewiesen [192]. Choi et al. führten ein Experiment mit Ratten durch, denen 12 h vor einer bilateralen IRI mit 35 min Ischämiezeit 10 mg/kg Etanercept injiziert wurde. Es konnte ein protektiver Effekt beobachtet werden, der an funktionellen Parametern wie Kreatinin und Harnstoff-Stickstoff, sowie an einer signifikanten Reduktion von CC-Chemokin-Ligand-2- (CCL2) und TNF- α -mRNA in der Expressionsanalyse belegt wurde [192]. Interferon-Regulatory-Factor-4 (IRF4)-defiziente Mäuse, denen dieses Molekül mit multiplen Funktionen in der Regulation der angeborenen und erworbenen Immunität [193] und des Toll-ähnlichem Rezeptor-Signalweges [194] fehlte, zeigten nach IRI eine verstärkte Nierenschädigung im Vergleich zum Wildtyp. Diese konnte durch Therapie mit Etanercept deutlich gemildert werden [195]. In einem Versuch von Lech et al. an IRAK-M-defizienten Mäusen, die einer uIRI mit 45 min Ischämiezeit unterzogen wurden, zeigte sich nach

35 Tagen durch alternierende Injektion von Etanercept ab Tag 5 nach der Operation ein signifikant geringerer Verlust an Nierenmasse. Die postischämische Niere zeigte eine geringere Fibrose, die kontralaterale Niere eine geringere Hypertrophie. Zudem konnte eine geringere Einwanderung von Makrophagen beobachtet werden [196]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde den Versuchstieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten je einmalig eine Dosis von 10 mg/kg KG Etanercept injiziert. Es zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Expression von Schädigungsmarkern in der PCR. KIM-1 und NGAL waren für alle Interventionszeitpunkte signifikant reduziert. Ein Effekt, der bei Zelltodblockade mit Ferrostatin-, Necrostatin-1 und Cyclosporin A nur bei Gabe bis 6 h nach uIRI beobachtbar war. Konträr dazu zeigte sich die Genexpression von TNF- α und CCL-2 unauffällig. Dies ist bei einem TNF- α -spezifischen Inhibitor verwunderlich. Hierbei ist zu bedenken, dass die RT-PCR genomische Effekte widerspiegelt und dass TNF- α in den vorherigen Experimenten ohne Intervention sein Maximum erst nach 3–5 Tagen erreicht hatte. Hier wären also zur genauen Beurteilung mehr Untersuchungen auf histologischer und funktioneller Ebene nötig gewesen. Interessant wäre auch eine längere Reperfusionzeit und eine repetitive Gabe – wie bei Lech et al. –, um das Langzeitergebnis zu beobachten. Es lässt sich so nur vermuten, dass Etanercept als löslicher Rezeptor die Wirkung des zytosolisch freigesetzten TNF- α abfangen und dadurch dessen stimulierende Wirkung gemildert hat. Dies reichte jedoch nicht aus, um die Entzündungsantwort der einwandernden Monozyten und Immunzellen wirksam einzuschränken. Auch gilt es, die pharmakodynamischen Eigenschaften von Etanercept zu beachten. Derzeit gibt es auch Studien mit neuen TNF- α -Inhibitoren, wie den Antikörpern Infliximab und Adalimumab, die klinisch wünschenswerte Effekte zeigen [197–200]. Im Gegensatz zu Etanercept können diese Antikörper zusätzlich membrangebundenes TNF- α , wie es beispielsweise von pro-entzündlichen M1-Makrophagen exprimiert wird, binden [201]. Eventuell hätte eine Verwendung solcher Substanzen deutlichere Effekte erzielt.

Wird aufgrund der Vorergebnisse zudem weiterhin davon ausgegangen, dass der regulierte Zelltod bei ischämischem Nierenschaden den Einstieg in den Nekroinflammationskreis bildet, sollte eine Entzündungsblockade weniger effizient sein als eine Inhibierung der regulierten Nekrose. Bis die anti-entzündlichen Therapien wirksam werden können, sind so womöglich schon zahlreiche DAMPs und Alarmine im Umlauf, um die Entzündungsantwort zu triggern. Es könnte daher gemutmaßt werden, dass eine Zelltodblockade wirksamer ist als eine anti-entzündliche Therapie. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche unterstützen dies.

4.5. Limitationen der Studie

Die Aussagekraft der in der Arbeit verwendeten Experimente wird durch vielfältige Faktoren limitiert. Ein großes konzeptionelles Problem besteht in der derzeitigen Definition des ANV. Diese beruht nicht auf frühen Schädigungsmarkern, sondern auf spät reagierenden Markern der exkretorischen Funktion der Niere, wie Serum-Kreatinin und GFR [64]. Dies führt dazu, dass Nephronenverluste von bis zu 50 % maskiert werden und dass die frühe Schädigungsphase des ANV kaum abgebildet wird [71]. Dementsprechend schwierig gestaltet sich eine effiziente therapeutische Beurteilung von Substanzen, wie der hier verwendeten Inhibitoren, die in dieser ersten und frühen Phase ansetzen. Darüber hinaus bezieht die derzeitige Klassifikation einseitige Schädigungen der Niere, wie eine renale Embolie oder das in dieser Arbeit verwendete Modell der uIRI, nicht direkt ein, da Serumkreatinin und Harnausscheidung unberührt bleiben können, falls der Patient eine normale GFR und genügend renale Reserven besitzt [39]. In Zukunft wird es daher vermehrt nötig werden, alte Strukturen abzulösen, um durch Verwendung von frühen und spezifischen Schädigungsparametern wie KIM-1 und NGAL, Hochrisikopatienten zu erkennen und therapeutische Strategien entsprechend einzuleiten [7, 202]. Eine weitere Begrenzung der Aussagekraft dieser Studie besteht in der Verwendung des Tiermodells. Im Gegensatz zu menschlichen Patienten, die u. a. in Alter, Geschlecht, Gewicht und Genotyp erheblich variieren, besitzen die verwendeten Mäuse durch konsequente Inzucht nahezu einen komplett identischen Genotyp mit minimaler Genvariabilität, was die Allgemeinbevölkerung nicht abbildet [203]. Hierzu wären J-DO-Mäuse (engl. Diversity Outbred) nötig, die erst seit Kurzem zur Verfügung stehen und deren Verwendung aufgrund der großen benötigten Gruppengrößen ein politisches und ethisches Problem darstellt. Auch gibt es Daten, die auf eine mangelnde Vergleichbarkeit der Immunsysteme von Menschen und Mäusen in Tierhaltung hinweisen. Aufgrund der mangelnden Exposition gegenüber der Umwelt gleicht das Immunsystem von Labormäusen eher dem von Neugeborenen, nicht dem von Erwachsenen. Eine mögliche Lösung wäre hier die Verwendung von wilden Mäusen, was aber wieder ethische Probleme und Probleme in der Tierhaltung mit sich brächte [204]. Klinische Fälle des ANV sind oft deutlich komplexer und von multipler bzw. anderer Ursache. Die bei uIRI ausgelöste ATN stellt zwar die Hauptursache für ein renales ANV dar, bildet jedoch die anderen Ursachen nicht hinreichend ab. Diese Arbeit sollte daher nicht als Studie gesehen werden, die das ANV als Ganzes und im klinischen Alltag repräsentiert, sondern als orientierender Versuch, die Grundlagen der Pathophysiologie dahinter näher zu

erforschen. Auf gängige funktionelle Marker, wie das Serumkreatinin oder die GFR, wurde in dieser Arbeit bewusst verzichtet, da Kompensationsmechanismen durch die nicht operierte kontralaterale Niere diese Werte verfälscht hätten. Eine bilaterale IRI wäre hierfür als Modell wegweisender gewesen. Um ein ausreichend schweres ANV zu untersuchen, müsste zudem die Möglichkeit der Dialyse der Tiere bestehen, was wir derzeit in unserem Labor noch nicht etabliert haben. Bei den therapeutischen Interventionen sind jeweils nur ein kurzer Reperfusionzeitpunkt und eine einmalige Dosis verwendet worden. Effekte auf das Langzeitergebnis oder nach mehrmaligen Gaben der Substanzen wurden nicht untersucht, sind aber sicherlich für Folgestudien interessante Ansatzpunkte. Eine weitere Limitation dieser Arbeit besteht in der dominierenden Verwendung der RT-PCR als Untersuchungsmethode. Hierbei handelt es sich um eine Untersuchung auf Genexpressionsebene, die nicht unbedingt die Ergebnisse auf Proteinebene widerspiegelt [205]. Für einen quantitativen Nachweis der Regulatoren auf Proteinebene wären daher weitere Methoden, wie Western-Blot oder Durchflusszytometrie nötig. Aufgrund der Anzahl der Experimente, der untersuchten Marker und des Mangels an verfügbaren Primärantikörpern übersteigt dies jedoch den Rahmen dieser Arbeit und bietet Anreiz für kommende Studien.

5. Zusammenfassung

Das ANV mit seinen Folgen ist ein Krankheitsbild mit zunehmender Relevanz und ökonomischer Bedeutung. Aktuell wird von Inzidenzen von über 11,3 Millionen weltweit ausgegangen. Es bedarf früherer Diagnoseparameter, einem tiefergehenden pathophysiologischen Verständnis und gezielteren therapeutischen Ansatzpunkten, um diesem zu begegnen. So ruft die International Society of Nephrology zur Initiative ‚0by25‘ auf. Diese hat zum Ziel, bis zum Jahr 2025 jeden verhinderbaren Todesfall an ANV zu vermeiden [206].

Mit dieser Arbeit soll dieser Herausforderung begegnet werden. In der Hypothese wird postuliert, dass es nach akuter, ischämischer Tubulusnekrose in der Niere zu einem sich selbst verstärkenden Kreislauf der ‚Nekroinflammation‘ zwischen regulierten Formen der Nekrose und einem entzündlichen Mikromilieu kommt. Diese Verbindung lässt sich durch phasengerechte therapeutische Beeinflussung in einem bestimmten therapeutischen Fenster unterbrechen.

Sterben Zellen aufgrund von regulierter Nekrose, kommt es zu einem Zerreißen der Membranen. Hierdurch werden Zellbestandteile und Signalstoffe in den Extrazellularraum freigesetzt. Einige davon wirken chemotaktisch und proentzündlich und fungieren als DAMPs. Immunzellen und parenchymale Zellen erkennen diese über PRRs. Daraufhin kommt es zur Aktivierung von Mechanismen, die die Sekretion zahlreicher proentzündlicher Zytokine und Chemokine zur Folge haben. Diese wiederum fördern Formen der regulierten Nekrose. Ein Kreislauf entsteht, der sich bis hin zu einem Multiorganversagen steigern kann.

Die Arbeit gliedert sich zur Überprüfung der Hypothese in drei große experimentelle Abschnitte. Als Schädigungsmodell wurde die uIRI am Mausmodell verwendet, die zu einem intrarenal bedingten ANV durch ATN führen kann. Die Gefäße am linken Nierenhilus wurden für eine bestimmte Zeit (Ischämiezeit) abgeklemmt, die der kontralateralen Niere blieben unberührt. Nach Ablauf einer definierten Anzahl an Tagen (Reperfusionzeit) wurde das Experiment beendet und das Gewebe weiterverarbeitet.

Im ersten großen experimentellen Ansatz wurden unterschiedliche Ischämiezeiten und gleiche Reperfusionzeiten bei uIRI verwendet. Hier konnte eine Ischämiezeit von 35 min als Schwelle für einen fortgesetzten Nierenschaden, ein fortgesetztes Entzündungsgeschehen, fortgesetzten Zelltod und fibrotischen Umbau festgestellt werden, der auch nach 5 Wochen

noch nachweisbar war. Dies wurde mittels Genexpressionsanalysen in der RT-PCR und durch histologische Färbungen untersucht.

Im zweiten experimentellen Teil wurde mit unterschiedlichen Reperfusionzeiten bei einer gleichbleibenden Ischämiezeit von 35 min gearbeitet. Für verschiedene Biomarkergene in der RT-PCR für Entzündung, Schaden, Zellzyklus und Fibrose konnte hier ein spezifischer Verlauf über die Zeitachse für jeden Parameter gefunden und einzelne Phasen konnten näher charakterisiert werden. Diese Beobachtungen wurden durch histologische Auswertungen der unterstützt.

Im dritten experimentellen Schritt wurde versucht durch gezielte therapeutische Inhibierung von regulierten Formen der Nekrose und Entzündung als Hauptkomponenten der Nekroinflammation, die Hypothese zu verifizieren. Ebenso sollte ein therapeutisches Zeitfenster zur Injektion der Inhibitoren identifiziert werden. Hier zeigte sich bei einmaliger Gabe eines Gemisches mit Inhibitoren der regulierten Nekrose 1 h vor bis 6 h nach uIRI eine signifikante Reduktion der Entzündungs- und Schädigungsantwort. Die präemptive Gabe bewirkte die höchste Suppression. Interventionen mit entzündungshemmenden Substanzen, wie Prednisolon und Etanercept, zeigten insgesamt eine geringere Effizienz.

6. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex
AKIN	Acute Kidney Injury Network
ANV	Akutes Nierenversagen
ATN	Akute Tubulusnekrose
ATP	Adenosintriphosphat
BMP2/BMP3	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
btg1	BTG anti-proliferation Faktor 1
C57BL/6	C57 Black 6 Mäuse
CCL2/5	CC-Chemokinligand 2/5
CD	Cluster of differentiation
CdKs	Zyclin abhängige Kinasen
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CGA-Klassifikation	Ursache-GFR-Albumin-Klassifikation
CNV	Chronisches Nierenversagen
Coll1 α 1	Alpha-1-Typ-1-Kollagen
CSF1	Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor 1, syn. M-CSF
C _t -Wert	Schwellenwertzyklus, engl. treshold cycle
CXCL	CXC-Motiv Chemokinligand
CypD	Cyclophilin D
DAI	DNA-abhängiger Aktivierer von Interferon
DAMPs	Schädigungs-assoziierte molekulare Muster, engl. danger associated molecular patterns
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPX4	Glutathion Peroxidase 4
Gsk3 β	Glykogensynthase-Kinase 3
GST- α	Glutathion-S-Transferase alpha

6. Abkürzungsverzeichnis

HRP	Meerrettichperoxidase, engl. horse radish peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM 1	Intrazelluläres Adhäsions Molekül 1
IFN γ	Interferon-gamma
IGFBP7	Insulin like growth factor binding protein 7
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KG	Körpergewicht
Ki-67	Kiel-67
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
Kip1	Kinesin-like protein 1
MCP-1	Makrophagen Chemoattraktorprotein-1
MLKL	Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein
MTP	Mitochondriale transitions Pore
MPT-RN	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions regulierte Nekrose
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, engl. messenger RNA
NETs	Neutrophile extrazelluläre Fallen, engl. Neutrophil extracellular traps
NF κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGAL	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin
NOD-like receptors	Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster, engl. pathogen associated molecular patterns
PAS-Färbung	Periodsäure-Schiff-Färbung, engl. Periodic acid Schiff-Färbung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PRRs	Mustererkennungsrezeptoren, engl. Pattern recognition receptors
RIFLE	Risiko, Schädigung, Verlust, Versagen (der Nierenfunktion), terminales Nierenversagen; engl. Risk, Injury, Failure, Loss, End Stage Kidney Disease
RIPK 1/3	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1/3
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies, engl. reactive oxygen species
RT-PCR	Polymerase-Kettenreaktion in Echtzeit, engl. realtime polymerase-chain-reaction

6. Abkürzungsverzeichnis

RT+/-	Reverse Transkriptase vorhanden +/-nicht vorhanden -
s.c.	Subkutan
SEM	Mittelwert mit Standardabweichung, engl. standard error of the mean
ssat	Spermidine/spermine N(1)-acetyltransferase
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TGF- β 1	Transformierende Wachstumsfaktor-beta-familie, engl. Transforming growth factor beta 1
TIMP2	Metalloproteinase Inhibitor 2
TIS	Tubulärer Schädigungsindex, engl. Tubular injury score
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
T _m	Schmelztemperatur, engl. melting temperature
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TUNEL	Terminal-Desoxyribonucleotidyltransferase(TdT)-mediated-Desoxyuridin- Triphosphat (dUTP)-Nick-End-Labeling
uIRI	Unilaterale Ischämie-Reperfusionsverletzung engl. unilateral renal ischemia-reperfusion injury

7. Danksagung

Diese Doktorarbeit hat mich in vielen Bereichen wachsen lassen und weit mehr gelehrt als wissenschaftliches Arbeiten allein. Es war zweifelsohne eine Zeit, die mich geprägt, geformt und auf Zukünftiges vorbereitet hat.

Hierfür möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders bedanken, der mir die Möglichkeit gab in seinem Labor diese Doktorarbeit zu schreiben und mich über all die Zeit hinweg sehr gut betreut hat. Er war stets daran interessiert das Projekt bestmöglich voranzubringen, jederzeit für Gespräche bereit, Fragen wurden innerhalb kürzester Zeit gerne beantwortet, er gab mir die Möglichkeit mein Projekt vielfältig zu präsentieren und war ein großes Vorbild.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch meinem Betreuer Dr. med. Dr. univ. Alexander Holderied, der mir trotz des hohen Arbeitspensums als junger Klinikarzt stets zur Seite stand und diese Arbeit vom Konzept bis zur Abgabe begleitet hat.

Mein Dank gilt auch Herrn Julian Marschner, der mich in das wissenschaftliche und tierexperimentelle Arbeiten einführte und ohne dessen strenges Auge und Anleitung die Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich mich an dieser Stelle bei dem gesamten Laborteam bedanken, vor allem bei Herrn PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech, Simone Romoli, Mohammed Mohsen Honarpisheh, PD Dr. rer. Biol. Hum. Shrikant Ramesh Mulay, Dr. rer. biol. hum. Santhosh Kumar Vankayala Ramaiah, Dr. med. Marc Weidenbusch und den zahlreichen medizinischen Mitstudenten für die fachliche Hilfe, gute Zusammenarbeit und tolle Atmosphäre. Herr Dan Draganovici und Frau Janina Mangelbaum seien hier noch einmal gesondert genannt für die Hilfe bei den vielen histologischen Schnitten.

Mein Dank gilt auch der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mich im Rahmen des FöFoLe-Programms nicht nur finanziell unterstützte, sondern auch einen tollen Rahmen mit wissenschaftlicher Schulung und gegenseitigem Austausch schuf.

Der abschließende Dank gilt meiner Familie, die immer an mich glaubte, zur Seite stand und trotz schwer verständlicher Thematik nie müde wurde mir zuzuhören und Mut zu machen.

8. Literaturverzeichnis

1. Srisawat, N., E.E. Hoste, and J.A. Kellum, *Modern classification of acute kidney injury*. Blood Purif, 2010. **29**(3): p. 300-7.
2. Kellum, J.A., et al., *Developing a consensus classification system for acute renal failure*. Curr Opin Crit Care, 2002. **8**(6): p. 509-14.
3. Thomas, M.E., et al., *The definition of acute kidney injury and its use in practice*. Kidney Int, 2015. **87**(1): p. 62-73.
4. Kellum, J.A. and N. Lameire, *Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1)*. Crit Care, 2013. **17**(1): p. 204.
5. Herold, G., *Innere Medizin*. Köln: -G. Herold.
6. Schrezenmeier, E.V., et al., *Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance*. Acta Physiol (Oxf), 2016.
7. Wasung, M.E., L.S. Chawla, and M. Madero, *Biomarkers of renal function, which and when?* Clin Chim Acta, 2015. **438**: p. 350-7.
8. Endre, Z.H., et al., *Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function*. Kidney Int, 2011. **79**(10): p. 1119-30.
9. McIlroy, D.R., G. Wagener, and H.T. Lee, *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and acute kidney injury after cardiac surgery: the effect of baseline renal function on diagnostic performance*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(2): p. 211-9.
10. Siew, E.D., et al., *Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin moderately predicts acute kidney injury in critically ill adults*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(8): p. 1823-32.
11. Lameire, N.H., R.C. Vanholder, and W.A. Van Biesen, *How to use biomarkers efficiently in acute kidney injury*. Kidney Int, 2011. **79**(10): p. 1047-50.
12. Urbschat, A., N. Obermuller, and A. Haferkamp, *Biomarkers of kidney injury*. Biomarkers, 2011. **16 Suppl 1**: p. S22-30.
13. Murray, P.T., et al., *Potential use of biomarkers in acute kidney injury: report and summary of recommendations from the 10th Acute Dialysis Quality Initiative consensus conference*. Kidney Int, 2014. **85**(3): p. 513-21.
14. Druml, W., *Acute renal failure is not a "cute" renal failure!* Intensive Care Med, 2004. **30**(10): p. 1886-90.
15. Druml, W., *Systemic consequences of acute kidney injury*. Curr Opin Crit Care, 2014. **20**(6): p. 613-9.
16. Shiao, C.C., et al., *Long-term remote organ consequences following acute kidney injury*. Crit Care, 2015. **19**: p. 438.
17. Li, P.K., E.A. Burdmann, and R.L. Mehta, *Acute kidney injury: global health alert*. Kidney Int, 2013. **83**(3): p. 372-6.
18. Hoste, E.A. and M. Schurgers, *Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem?* Crit Care Med, 2008. **36**(4 Suppl): p. S146-51.
19. Wang, Y., et al., *Acute Kidney Injury Epidemiology: From Recognition to Intervention*. Contrib Nephrol, 2016. **187**: p. 1-8.
20. Lafrance, J.P. and D.R. Miller, *Acute kidney injury associates with increased long-term mortality*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(2): p. 345-52.
21. Susantitaphong, P., et al., *World incidence of AKI: a meta-analysis*. Clin J Am Soc Nephrol, 2013. **8**(9): p. 1482-93.

22. Hoste, E.A., et al., *Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study*. Intensive Care Med, 2015. **41**(8): p. 1411-23.
23. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. Jama, 2005. **294**(7): p. 813-8.
24. Kerr, M., et al., *The economic impact of acute kidney injury in England*. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(7): p. 1362-8.
25. Lewington, A. and P. Hall, *The cost of ignoring acute kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2014. **29**(7): p. 1270-2.
26. Chertow, G.M., et al., *Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(11): p. 3365-70.
27. Lameire, N., W. Van Biesen, and R. Vanholder, *Acute renal failure*. Lancet, 2005. **365**(9457): p. 417-30.
28. Blantz, R.C., *Pathophysiology of pre-renal azotemia*. Kidney Int, 1998. **53**(2): p. 512-23.
29. Badr, K.F. and I. Ichikawa, *Prerenal failure: a deleterious shift from renal compensation to decompensation*. N Engl J Med, 1988. **319**(10): p. 623-9.
30. Organ, M. and R.W. Norman, *Acute reversible kidney injury secondary to bilateral ureteric obstruction*. Can Urol Assoc J, 2011. **5**(6): p. 392-6.
31. Keller, C.K. and S. Geberth, *Praxis der Nephrologie*. 2010, Berlin [u.a.]: Springer. XXV, 493 S. .
32. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation*. Nat Med. **17**(11).
33. Bonventre, J.V., *Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair*. Contrib Nephrol, 2010. **165**: p. 9-17.
34. Molitoris, B.A., *Transitioning to therapy in ischemic acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(1): p. 265-7.
35. Lieberthal, W. and S.K. Nigam, *Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury*. Am J Physiol, 1998. **275**(5 Pt 2): p. F623-31.
36. Kelly, K.J., Z. Plotkin, and P.C. Dagher, *Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury*. J Clin Invest, 2001. **108**(9): p. 1291-8.
37. Sutton, T.A., C.J. Fisher, and B.A. Molitoris, *Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure*. Kidney Int, 2002. **62**(5): p. 1539-49.
38. Kanagasundaram, N.S., *Pathophysiology of ischaemic acute kidney injury*. Ann Clin Biochem, 2015. **52**(Pt 2): p. 193-205.
39. Okusa, M.D., G.M. Chertow, and D. Portilla, *The nexus of acute kidney injury, chronic kidney disease, and World Kidney Day 2009*. Clin J Am Soc Nephrol, 2009. **4**(3): p. 520-2.
40. Pape, H.-C., A. Kurtz, and S. Silbernagl, *Physiologie*. 2014, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 1024 Seiten .
41. Abuelo, J.G., *Normotensive ischemic acute renal failure*. N Engl J Med, 2007. **357**(8): p. 797-805.
42. Basile, D.P., *The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function*. Kidney Int, 2007. **72**(2): p. 151-6.
43. Bonventre, J.V. and L. Yang, *Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. J Clin Invest, 2011. **121**(11): p. 4210-21.
44. Sutton, T.A. and B.A. Molitoris, *Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure*. Semin Nephrol, 1998. **18**(5): p. 490-7.
45. Havasi, A. and S.C. Borkan, *Apoptosis and acute kidney injury*. Kidney Int, 2011. **80**(1): p. 29-40.

46. Bonegio, R. and W. Lieberthal, *Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2002. **11**(3): p. 301-8.
47. Hotchkiss, R.S., et al., *Cell death*. *N Engl J Med*, 2009. **361**(16): p. 1570-83.
48. Ravichandran, K.S., *Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways*. *Immunity*, 2011. **35**(4): p. 445-55.
49. Kurts, C., et al., *The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(10): p. 738-753.
50. Rosin, D.L. and M.D. Okusa, *Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(3): p. 416-25.
51. Angelotti, M.L., et al., *Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury*. *Stem Cells*, 2012. **30**(8): p. 1714-25.
52. Anders, H.J. and L. Schaefer, *Beyond tissue injury-damage-associated molecular patterns, toll-like receptors, and inflammasomes also drive regeneration and fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2014. **25**(7): p. 1387-400.
53. Lindgren, D., et al., *Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules*. *Am J Pathol*, 2011. **178**(2): p. 828-37.
54. Humphreys, B.D., et al., *Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(22): p. 9226-31.
55. Venkatachalam, M.A., et al., *Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. **298**(5): p. F1078-94.
56. Mulay, S.R., A. Linkermann, and H.J. Anders, *Necroinflammation in Kidney Disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2016. **27**(1): p. 27-39.
57. Duffield, J.S., *Macrophages and immunologic inflammation of the kidney*. *Semin Nephrol*, 2010. **30**(3): p. 234-54.
58. Ko, G.J., et al., *Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury*. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. **23**(3): p. 842-52.
59. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(3): p. 341-50.
60. 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.
61. Chang, F.C., et al., *Novel insights into pericyte-myofibroblast transition and therapeutic targets in renal fibrosis*. *J Formos Med Assoc*, 2012. **111**(11): p. 589-98.
62. Kriz, W., B. Kaissling, and M. Le Hir, *Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy?* *J Clin Invest*, 2011. **121**(2): p. 468-74.
63. Kramann, R., T. Kusaba, and B.D. Humphreys, *Who regenerates the kidney tubule?* *Nephrol Dial Transplant*, 2015. **30**(6): p. 903-10.
64. National Guideline, C., *KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease*. 2013.
65. Jha, V., et al., *Chronic kidney disease: global dimension and perspectives*. *The Lancet*. **382**(9888): p. 260-272.
66. Turin, T.C., et al., *Lifetime risk of ESRD*. *J Am Soc Nephrol*, 2012. **23**(9): p. 1569-78.
67. Levey, A.S., et al., *A new equation to estimate glomerular filtration rate*. *Ann Intern Med*, 2009. **150**(9): p. 604-12.
68. Foley, R.N. and R.M. Hakim, *Why is the mortality of dialysis patients in the United States much higher than the rest of the world?* *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(7): p. 1432-5.
69. Evaluation, I.f.H.M.a., *GBD arrow diagram*. available from <http://www.healthmetricsandevaluation.org/gbd/visualizations/gbd-arrow-diagram>, accessed July 30, 2013.

70. Spurney, R.F., W.J. Fulkerson, and S.J. Schwab, *Acute renal failure in critically ill patients: prognosis for recovery of kidney function after prolonged dialysis support*. Crit Care Med, 1991. **19**(1): p. 8-11.
71. Briggs, J.D., et al., *Renal function after acute tubular necrosis*. Br Med J, 1967. **3**(5564): p. 513-6.
72. Chawla, L.S., et al., *Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes*. N Engl J Med, 2014. **371**(1): p. 58-66.
73. Ishani, A., et al., *Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(1): p. 223-8.
74. Goldstein, S.L., *Acute kidney injury in children and its potential consequences in adulthood*. Blood Purif, 2012. **33**(1-3): p. 131-7.
75. Chawla, L.S., et al., *The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease*. Kidney Int, 2011. **79**(12): p. 1361-9.
76. Lo, L.J., et al., *Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease*. Kidney Int, 2009. **76**(8): p. 893-9.
77. Wald, R., et al., *Chronic dialysis and death among survivors of acute kidney injury requiring dialysis*. Jama, 2009. **302**(11): p. 1179-85.
78. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
79. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. **453**(7193): p. 314-21.
80. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
81. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
82. Linkermann, A., et al., *Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(11): p. 759-67.
83. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell Death Differ, 2009. **16**(1): p. 3-11.
84. Schweichel, J.U. and H.J. Merker, *The morphology of various types of cell death in prenatal tissues*. Teratology, 1973. **7**(3): p. 253-66.
85. Linkermann, A., *Nonapoptotic cell death in acute kidney injury and transplantation*. Kidney Int, 2016. **89**(1): p. 46-57.
86. Linkermann, A., et al., *Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2012. **81**(8): p. 751-61.
87. Tristao, V.R., et al., *Nec-1 protects against nonapoptotic cell death in cisplatin-induced kidney injury*. Ren Fail, 2012. **34**(3): p. 373-7.
88. Degterev, A., et al., *Assays for necroptosis and activity of RIP kinases*. Methods Enzymol, 2014. **545**: p. 1-33.
89. Linkermann, A., et al., *Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor-alpha-induced shock*. Mol Med, 2012. **18**: p. 577-86.
90. Takahashi, N., et al., *Necrostatin-1 analogues: critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models*. Cell Death Dis, 2012. **3**: p. e437.
91. Sun, L., et al., *Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase*. Cell, 2012. **148**(1-2): p. 213-27.
92. Chen, W., et al., *Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(4): p. 434-44.
93. Piot, C., et al., *Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2008. **359**(5): p. 473-81.

94. Gomez, L., et al., *Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients*. Cardiovasc Res, 2009. **83**(2): p. 226-33.
95. Linkermann, A., et al., *Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(29): p. 12024-9.
96. Linkermann, A., et al., *Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(47): p. 16836-41.
97. Friedmann Angeli, J.P., et al., *Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(12): p. 1180-91.
98. Fatokun, A.A., V.L. Dawson, and T.M. Dawson, *Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(8): p. 2000-16.
99. Linkermann, A. and D.R. Green, *Necroptosis*. N Engl J Med, 2014. **370**(5): p. 455-65.
100. de Almagro, M.C. and D. Vucic, *Necroptosis: Pathway diversity and characteristics*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **39**: p. 56-62.
101. Xie, Y., et al., *Ferroptosis: process and function*. Cell Death Differ, 2016. **23**(3): p. 369-79.
102. Tonnus, W. and A. Linkermann, *"Death is my Heir"--Ferroptosis Connects Cancer Pharmacogenomics and Ischemia-Reperfusion Injury*. Cell Chem Biol, 2016. **23**(2): p. 202-3.
103. Kroemer, G., L. Galluzzi, and C. Brenner, *Mitochondrial membrane permeabilization in cell death*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 99-163.
104. Bernardi, P., *The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved?* Front Physiol, 2013. **4**: p. 95.
105. Mulay, S.R., et al., *How Kidney Cell Death Induces Renal Necroinflammation*. Semin Nephrol, 2016. **36**(3): p. 162-73.
106. Oppenheim, J.J. and D. Yang, *Alarmins: chemotactic activators of immune responses*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(4): p. 359-65.
107. Chan, J.K., et al., *Alarmins: awaiting a clinical response*. J Clin Invest, 2012. **122**(8): p. 2711-9.
108. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 352-7.
109. Geijtenbeek, T.B. and S.I. Gringhuis, *Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(7): p. 465-79.
110. Kearney, C.J., et al., *RIPK1 can function as an inhibitor rather than an initiator of RIPK3-dependent necroptosis*. Febs j, 2014. **281**(21): p. 4921-34.
111. Dannappel, M., et al., *RIPK1 maintains epithelial homeostasis by inhibiting apoptosis and necroptosis*. Nature, 2014. **513**(7516): p. 90-4.
112. Yousefi, S. and H.U. Simon, *NETosis – Does It Really Represent Nature’s “Suicide Bomber”?* : Front Immunol. 2016;7:328. doi:10.3389/fimmu.2016.00328.
113. Bergsbaken, T., S.L. Fink, and B.T. Cookson, *Pyroptosis: host cell death and inflammation*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(2): p. 99-109.
114. Obata, F., et al., *Necrosis-driven systemic immune response alters SAM metabolism through the FOXO-GNMT axis*. Cell Rep, 2014. **7**(3): p. 821-33.
115. Vanden Berghe, T. and A. Linkermann, *Take my breath away: necrosis in kidney transplants kills the lungs!* Kidney Int, 2015. **87**(4): p. 680-2.
116. Zhao, H., et al., *Necroptosis and parthanatos are involved in remote lung injury after receiving ischemic renal allografts in rats*. Kidney Int, 2015. **87**(4): p. 738-48.
117. Chawla, L.S. and P.L. Kimmel, *Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome*. Kidney Int, 2012. **82**(5): p. 516-24.
118. Hsu, R.K. and C.Y. Hsu, *The Role of Acute Kidney Injury in Chronic Kidney Disease*. Semin Nephrol, 2016. **36**(4): p. 283-92.

119. Marschner, J.A., et al., *Optimizing Mouse Surgery with Online Rectal Temperature Monitoring and Preoperative Heat Supply. Effects on Post-Ischemic Acute Kidney Injury*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0149489.
120. Delbridge, M.S., et al., *The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury*. Transplant Proc, 2007. **39**(10): p. 2983-5.
121. Zager, R.A., et al., *Degree and time sequence of hypothermic protection against experimental ischemic acute renal failure*. Circ Res, 1989. **65**(5): p. 1263-9.
122. Niemann, C.U., et al., *Therapeutic Hypothermia in Deceased Organ Donors and Kidney-Graft Function*. N Engl J Med, 2015. **373**(5): p. 405-14.
123. Goffe, B., *Etanercept (Enbrel) -- an update*. Skin Therapy Lett, 2004. **9**(10): p. 1-4, 9.
124. Scott, L.J., *Etanercept: a review of its use in autoimmune inflammatory diseases*. Drugs, 2014. **74**(12): p. 1379-410.
125. Karow, T. and R. Lang-Roth, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 2015, Pulheim: Karow. 1313 S. .:
126. Dixon, S.J., et al., *Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death*. Cell, 2012. **149**(5): p. 1060-72.
127. Skouta, R., et al., *Ferrostatis inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models*. J Am Chem Soc, 2014. **136**(12): p. 4551-6.
128. Degtarev, A., et al., *Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(5): p. 313-21.
129. Zhang, L., et al., *Necrostatin-1 attenuates ischemia injury induced cell death in rat tubular cell line NRK-52E through decreased Drp1 expression*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(12): p. 24742-54.
130. ThermoFisherScientific. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fpurelink_rna_mini_kit_man.pdf&title=UHVyZUxpbmsgUk5BIE1pbmkgS210.
131. <https://www.novusbio.com/ihc-detection>.
132. http://edm.bioutil.com/bioutil/tunel-apo-green-detection-kit/2016-02-15-tunel-apo-green-detection-kit_fy.html?utm_from=bioutil.
133. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
134. Ichimura, T., et al., *Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury*. J Biol Chem, 1998. **273**(7): p. 4135-42.
135. Han, W.K., et al., *Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 237-44.
136. Huo, W., et al., *Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury*. Transplant Rev (Orlando), 2010. **24**(3): p. 143-6.
137. Devarajan, P., *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a new marker of kidney disease*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2008. **241**: p. 89-94.
138. Sansanwal, P., L. Li, and M.M. Sarwal, *Inhibition of intracellular clusterin attenuates cell death in nephropathic cystinosis*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(3): p. 612-25.
139. Deshmane, S.L., et al., *Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview*. J Interferon Cytokine Res, 2009. **29**(6): p. 313-26.
140. Jones, S.A., *Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(6): p. 3463-3468.
141. Vijayan, A., et al., *Clinical Use of the Urine Biomarker [TIMP-2] x [IGFBP7] for Acute Kidney Injury Risk Assessment*. Am J Kidney Dis, 2016. **68**(1): p. 19-28.

142. Lameire, N., et al., *The cell cycle biomarkers: promising research, but do not oversell them*. Clin Kidney J, 2016. **9**(3): p. 353-8.
143. Seigneurin, D. and P. Guillaud, *[Ki-67 antigen, a cell cycle and tumor growth marker]*. Pathol Biol (Paris), 1991. **39**(10): p. 1020-8.
144. Amdur, R.L., et al., *Outcomes following diagnosis of acute renal failure in U.S. veterans: focus on acute tubular necrosis*. Kidney Int, 2009. **76**(10): p. 1089-97.
145. Coca, S.G., S. Singanamala, and C.R. Parikh, *Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis*. Kidney Int, 2012. **81**(5): p. 442-8.
146. Basile, D.P., et al., *Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(5): p. F887-99.
147. Hostetter, T.H., *Progression of renal disease and renal hypertrophy*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 263-78.
148. Gueler, F., et al., *Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury*. Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 523-7.
149. Abdulkader, R.C., A.B. Liborio, and D.M. Malheiros, *Histological features of acute tubular necrosis in native kidneys and long-term renal function*. Ren Fail, 2008. **30**(7): p. 667-73.
150. Menn-Josephy, H., et al., *Renal Interstitial Fibrosis: An Imperfect Predictor of Kidney Disease Progression in Some Patient Cohorts*. Am J Nephrol, 2016. **44**(4): p. 289-299.
151. Ishani, A., et al., *The magnitude of acute serum creatinine increase after cardiac surgery and the risk of chronic kidney disease, progression of kidney disease, and death*. Arch Intern Med, 2011. **171**(3): p. 226-33.
152. Takaori, K., et al., *Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(8): p. 2393-406.
153. Sharfuddin, A.A. and B.A. Molitoris, *Pathophysiology of ischemic acute kidney injury*. Nat Rev Nephrol, 2011. **7**(4): p. 189-200.
154. Thakar, C.V., et al., *Acute kidney injury episodes and chronic kidney disease risk in diabetes mellitus*. Clin J Am Soc Nephrol, 2011. **6**(11): p. 2567-72.
155. Ozkok, A. and C.L. Edelstein, *Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 967826.
156. Plotnikov, E.Y., et al., *Myoglobin causes oxidative stress, increase of NO production and dysfunction of kidney's mitochondria*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1792**(8): p. 796-803.
157. Singh, I., et al., *Expression of antioxidant enzymes in rat kidney during ischemia-reperfusion injury*. Mol Cell Biochem, 1993. **125**(2): p. 97-104.
158. Vanden Berghe, T., et al., *Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. **15**(2): p. 135-47.
159. Vukicevic, S., et al., *Role of EP2 and EP4 receptor-selective agonists of prostaglandin E(2) in acute and chronic kidney failure*. Kidney Int, 2006. **70**(6): p. 1099-106.
160. Hao, C.M. and M.D. Breyer, *Physiologic and pathophysiologic roles of lipid mediators in the kidney*. Kidney Int, 2007. **71**(11): p. 1105-15.
161. Kieran, N.E., et al., *Modification of the transcriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by lipoxin analog*. Kidney Int, 2003. **64**(2): p. 480-92.
162. Chandrasekharan, J.A. and N. Sharma-Walia, *Lipoxins: nature's way to resolve inflammation*. J Inflamm Res, 2015. **8**: p. 181-92.
163. Bonventre, J.V. and A. Zuk, *Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?* Kidney Int, 2004. **66**(2): p. 480-5.

164. Segerer, S., P.J. Nelson, and D. Schlondorff, *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(1): p. 152-76.
165. Furuichi, K., S. Kaneko, and T. Wada, *Chemokine/chemokine receptor-mediated inflammation regulates pathologic changes from acute kidney injury to chronic kidney disease*. Clin Exp Nephrol, 2009. **13**(1): p. 9-14.
166. Li, L., et al., *IL-17 produced by neutrophils regulates IFN-gamma-mediated neutrophil migration in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 331-42.
167. Bolisetty, S. and A. Agarwal, *Neutrophils in acute kidney injury: not neutral any more*. Kidney Int, 2009. **75**(7): p. 674-6.
168. Allam, R., et al., *Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(8): p. 1375-88.
169. Wen, Z., et al., *Circulating histones are major mediators of systemic inflammation and cellular injury in patients with acute liver failure*. Cell Death Dis, 2016. **7**(9): p. e2391.
170. Xu, Z., et al., *Sepsis and ARDS: The Dark Side of Histones*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 205054.
171. McCullough, J.W., B. Renner, and J.M. Thurman, *The role of the complement system in acute kidney injury*. Semin Nephrol, 2013. **33**(6): p. 543-56.
172. Schwartz-Albiez, R., et al., *Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation*. Clin Exp Immunol, 2009. **158 Suppl 1**: p. 43-50.
173. Renner, B., et al., *B cell subsets contribute to renal injury and renal protection after ischemia/reperfusion*. J Immunol, 2010. **185**(7): p. 4393-400.
174. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2015. **97**: p. 55-74.
175. Malek, M., *Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment*. 2015. **4**(2): p. 20-7.
176. Yang, W.S., et al., *Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4*. Cell, 2014. **156**(1-2): p. 317-31.
177. Linkermann, A., et al., *Regulated cell death in AKI*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(12): p. 2689-701.
178. Linkermann, A., et al., *The RIP1-kinase inhibitor necrostatin-1 prevents osmotic nephrosis and contrast-induced AKI in mice*. J Am Soc Nephrol, 2013. **24**(10): p. 1545-57.
179. Linkermann, A., et al., *Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013. **110**(29): p. 12024-12029.
180. Lemoine, S., et al., *Postconditioning with cyclosporine a reduces early renal dysfunction by inhibiting mitochondrial permeability transition*. Transplantation, 2015. **99**(4): p. 717-23.
181. Mulay, S.R., et al., *Targeting Inflammation in So-Called Acute Kidney Injury*. Semin Nephrol, 2016. **36**(1): p. 17-30.
182. Hayama, T., et al., *Beneficial effect of neutrophil elastase inhibitor on renal warm ischemia-reperfusion injury in the rat*. Transplant Proc, 2006. **38**(7): p. 2201-2.
183. Nakazawa, D., et al., *Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI*. J Am Soc Nephrol, 2017. **28**(6): p. 1753-1768.

184. Engberg, H., et al., *Cancer risk and mortality after kidney transplantation: a population-based study on differences between Danish centres using standard immunosuppression with and without glucocorticoids*. *Nephrol Dial Transplant*, 2016.
185. Haller, M.C., et al., *Steroid avoidance or withdrawal for kidney transplant recipients*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016(8): p. Cd005632.
186. Doria, A., M.E. Gershwin, and C. Selmi, *From old concerns to new advances and personalized medicine in lupus: The end of the tunnel is approaching*. *J Autoimmun*, 2016. **74**: p. 1-5.
187. Yende, S. and B.T. Thompson, *Evaluating Glucocorticoids for Sepsis: Time to Change Course*. *Jama*, 2016. **316**(17): p. 1769-1771.
188. Lemmer, B., K. Brune, and G. Fülgraff, *Pharmakotherapie*. 2004, Berlin [u.a.]: Springer. XIV, 609 S. .
189. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. *Microsc Res Tech*, 2000. **50**(3): p. 184-95.
190. Ma, X. and S. Xu, *TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis*. *Biomed Rep*, 2013. **1**(2): p. 177-84.
191. Kivelevitch, D., B. Mansouri, and A. Menter, *Long term efficacy and safety of etanercept in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis*. *Biologics*, 2014. **8**: p. 169-82.
192. Choi, D.E., et al., *Pretreatment with the tumor necrosis factor-alpha blocker etanercept attenuated ischemia-reperfusion renal injury*. *Transplant Proc*, 2009. **41**(9): p. 3590-6.
193. Tamura, T., et al., *The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis*. *Annu Rev Immunol*, 2008. **26**: p. 535-84.
194. Negishi, H., et al., *Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(44): p. 15989-94.
195. Lassen, S., et al., *Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure*. *J Immunol*, 2010. **185**(3): p. 1976-83.
196. Lech, M., et al., *Macrophage Phenotype Controls Long-Term AKI Outcomes—Kidney Regeneration versus Atrophy*. *J Am Soc Nephrol*, 2014. **25**(2): p. 292-304.
197. Aringer, M., et al., *Effects of short-term infliximab therapy on autoantibodies in systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 2007. **56**(1): p. 274-9.
198. Scemla, A., et al., *Dramatic improvement of severe cryptococcosis-induced immune reconstitution syndrome with adalimumab in a renal transplant recipient*. *Am J Transplant*, 2015. **15**(2): p. 560-4.
199. Nagata, Y., et al., *Anti-TNF-alpha Agent Infliximab and Splenectomy Are Protective Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury*. *Transplantation*, 2016. **100**(8): p. 1675-82.
200. Cure, M.C., et al., *The Protective Effect of Adalimumab on Renal Injury in a Model of Abdominal Aorta Cross-Clamping*. *Adv Clin Exp Med*, 2016. **25**(2): p. 219-26.
201. Shen, C., et al., *Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept*. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. **21**(3): p. 251-8.
202. Malhotra, R. and E.D. Siew, *Biomarkers for the Early Detection and Prognosis of Acute Kidney Injury*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2016.
203. Watkins-Chow, D.E. and W.J. Pavan, *Genomic copy number and expression variation within the C57BL/6J inbred mouse strain*. *Genome Res*, 2008. **18**(1): p. 60-6.
204. Masopust, D., C.P. Sivula, and S.C. Jameson, *Of Mice, Dirty Mice, and Men: Using Mice To Understand Human Immunology*. *J Immunol*, 2017. **199**(2): p. 383-388.
205. Maier, T., M. Guell, and L. Serrano, *Correlation of mRNA and protein in complex biological samples*. *FEBS Lett*, 2009. **583**(24): p. 3966-73.

206. Raimann, J.G., M.C. Riella, and N.W. Levin, *International Society of Nephrology's 0by25 initiative (zero preventable deaths from acute kidney injury by 2025): focus on diagnosis of acute kidney injury in low-income countries*. Clin Kidney J, 2018. **11**(1): p. 12-19.