

**Analyse der zellulären Seneszenz renaler Tubuluszellen
und deren spezifischer Beeinflussung durch
siRNA vermittelten Knockdown der Schlüsselkomponenten
p53 und p16^{INK4a}
in verschiedenen Mausmodellen *in vitro* und *in vivo***

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biochemikerin Birgit Berkenkamp

2020

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Rita Gerardy-Schahn

Korreferentin: Prof. Dr. med. Dr. Anette Melk, PhD

Tag der Promotion: 30.09.2020

Zusammenfassung

Eine durchschnittliche Lebenserwartung von nur 30 Jahren wurde von der Weltbevölkerung Schätzungen zufolge noch vor 100 Jahren erreicht. Im Jahr 2016 betrug sie, unter anderem durch medizinischen Fortschritt, bereits 72 Jahre. Das bedeutet nicht, dass die Menschen heute gesünder sind als ihre Eltern, denn auch altersassoziierte Krankheiten wichtiger Organe wie der Niere nehmen zu. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) als Maß für die Nierenfunktion sinkt jährlich um 1 ml/min allein aufgrund des Alterungsprozesses, weitere Faktoren wie Ischämie während Operationen verschlechtern die GFR zusätzlich. Therapieoptionen werden dringend benötigt. Senescente Zellen akkumulieren hauptsächlich im Tubulus der Niere und stören die Organhomöostase. Mithilfe verschiedener Tiermodelle wird in der vorliegenden Arbeit die zelluläre Seneszenz der Tubuluszellen *in vitro* und *in vivo* untersucht und die Methode der RNA-Interferenz als Therapieoption evaluiert.

Im ersten Teil dieser Studie wurde die intrinsische Proliferationskapazität und Seneszenz junger und alter Tubuluszellen *in vitro* und *in vivo* verglichen und charakterisiert. *In vivo* war in der gealterten Mäuseniere im Vergleich zu der jungen Niere nach einem mitotischen Reiz verminderte Proliferation mit vermehrter Expression des Seneszenzmarkers p16^{INK4a} vergesellschaftet. Unterschiedliche Proliferation wurde *in vitro* mit verschiedenen Alterungsmodellen in dem betrachteten Zeitfenster nicht beobachtet. Zellkulturstress führte bei allen Gruppen zu einer vergleichbaren Hochregulation von Seneszenzmarkern, ohne jedoch auch morphologisch das Vollbild der Seneszenz zu zeigen. Vollständige Seneszenz wurde für zukünftige *in vitro* Studien an seneszenten Tubuluszellen erfolgreich durch ionisierende Bestrahlung erzeugt. Erste Versuche mit dem für die Alterungsforschung sehr interessanten und dem Menschen phylogenetisch nächststehenden *Callithrix jacchus* zeigten in der Niere *in vivo* eine Korrelation zwischen Alter und p16^{INK4a} Expression, zudem konnten Tubuluszellen kultiviert und einige Methoden daran getestet werden.

Im Hauptteil dieser Studie wurde das Werkzeug der RNA-Interferenz zur Verminderung zellulärer Seneszenz genutzt. Nach einer Nierenschädigung werden die seneszenzassoziierten Signalwege mit den Schlüsselkomponenten p16^{INK4a} und p53 angeschaltet und können zu verminderter Regeneration beitragen. Die systemische *in vivo* Behandlung geschädigter Mäusenieren mit p16^{INK4a} bzw. p53 siRNA störte die Signalwege auf mRNA Ebene und zeigte einige positive Effekte, aber gerade die Rolle des p53 als multiple Signalwege beeinflussendes Protein scheint vielschichtig und erfordert weitere Experimente zu Zeitpunkt und Dauer einer effektiven Behandlung.

Schlagerworte: Niere, Seneszenz, RNA-Interferenz

Abstract

Merely a hundred years ago the global population had an estimated average life expectancy of just 30 years that increased to 72 years in 2016, amongst others because of medical improvement. It does not imply that people today are healthier than their parents, because also age-related diseases of essential organs such as the kidneys rise. The glomerular filtration rate (GFR) reflecting kidney function decreases by 1 ml/min per annum because of the ageing process alone. Other factors like ischemia during major surgeries additionally worsen the GFR. New therapy options are urgently needed. Senescent cells mainly accumulate in the tubular system of the kidney and disturb the homeostasis of the organ. This study analyses cellular senescence of tubular cells by using different animal models *in vitro* and *in vivo* and it furthermore evaluates RNA interference as a therapy tool.

In the first part of this study the intrinsic proliferation capacity and senescence of young and old tubular cells was compared and characterized *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* following a mitotic signal old kidneys displayed a diminished proliferation rate together with an increased senescence marker p16^{INK4a} compared to young kidneys. *In vitro* no differences in proliferation rates could be observed during cell culturing of the diverse ageing models in this experimental setting. Cell culture stress resulted in a nearly uniform upregulation of senescence markers in all of the groups without the development of typical morphological features of cells being fully senescent. Fully senescent tubular cell cultures for further *in vitro* studies could successfully be generated by ionising irradiation. *Callithrix jacchus* is an interesting model for ageing research because of its close phylogenetic relationship to humans. First experiments with kidneys from this organism confirmed the correlation between age and the increase of the senescence marker p16^{INK4a} *in vivo* and furthermore it was possible to culture tubular cells and test some methods on them.

In the main part of this study RNA interference is used as a therapy tool to diminish cellular senescence. In the kidney senescence pathways with their key components p16^{INK4a} and p53 are upregulated after a damage and may account for an impaired regeneration of the organ. The systemic treatment of damaged murine kidneys with p16^{INK4a} or p53 siRNA *in vivo* perturbed the senescence signaling specifically at the mRNA level and showed some promising effects. But the role of p53 as a global player of several pathways seems to be complex and so further evaluation of timing and continuity is needed to result in an optimized treatment.

Keywords: Kidney, Senescence, RNA interference

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungen	6
1 Einleitung	11
Zelluläre Seneszenz in der Niere - Ziel für therapeutische RNA-Interferenz	11
1.1 Die Niere	11
1.2 Pathophysiologie der Niere	13
1.2.1 Akuter Nierenschaden durch Ischämie/Reperfusion	15
1.2.2 Akuter Nierenschaden durch Aristolochiasäuren	18
1.2.3 Chronische Nierenerkrankung	18
1.3 Zellzykluskontrolle durch zelluläre Seneszenz	20
1.3.1 Der p53-vermittelte Seneszenzweg	20
1.3.2 Der p16 ^{INK4a} -vermittelte Seneszenzweg	22
1.4 Zelluläre Seneszenz in der Niere	23
1.4.1 p16 ^{INK4a} -abhängige Seneszenz in der Niere	24
1.4.2 p53-abhängige Seneszenz in der Niere	25
1.5 Senotherapien	26
1.5.1 RNA Interferenz	27
1.5.2 siRNA als Therapeutikum für seneszente renale Tubuluszellen	28
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	30
2 Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Kommerzielle Reagenzien	31
2.1.2 Reagenzien aus eigener Herstellung	36
2.1.3 Antikörper für Immunoassays	41
2.1.4 Oligonukleotide	43
2.1.5 Gebrauchsmaterialien und sonstiges Zubehör	45
2.1.6 Geräte	46
2.1.7 Software	47
2.1.8 Versuchstiere	47

2.2	Methoden.....	48
2.2.1	Renale Ischämie-Reperfusion	48
2.2.2	Blutentnahmen und Injektionen	48
2.2.3	Organentnahmen	49
2.2.4	Aufarbeitung von Organen für die Mikroskopie.....	50
2.2.5	Histologische Färbungen.....	52
2.2.6	Immunhistochemische Färbungen.....	55
2.2.7	Molekularbiologische Methoden.....	58
2.2.8	Proteinchemische Methoden	63
2.2.9	Zellbiologische Methoden.....	66
2.2.10	Statistik.....	70
3	Ergebnisse	71
3.1	Analyse junger und alter Nieren nach einer Bleiacetat-Injektion	71
3.1.1	Gewebeschäden und Apoptose in Nieren nach Bleiacetat-Injektion	71
3.1.2	Proliferation nach Bleiacetat-Injektion	73
3.1.3	Seneszenz in jungen und alten Nieren nach Bleiacetat-Injektion	73
3.2	Charakterisierung von jungen und alten Tubuluszellkulturen	75
3.2.1	Standardisierung der primären Tubuluszellkultur.....	75
3.2.2	Proliferation in jungen und alten Tubuluszellkulturen.....	78
3.2.3	Seneszenzmarker in jungen und alten Tubuluszellkulturen.....	79
3.2.4	Vergleich von Wildtyp- und <i>Terc</i> ^{-/-} -Maus (G3) in der Zellkultur.....	81
3.2.5	Vergleich von Wildtyp- und <i>Ink4a</i> ^{-/-} -Maus in der Zellkultur.....	82
3.2.6	Die Zellzyklusinhibitorexpression im Kulturverlauf	84
3.2.7	Seneszenz durch Bestrahlung in der Tubuluszellkultur	85
3.3	Analyse und Kultivierung von Nierenzellen aus Marmosets.....	87
3.4	siRNA vermittelter Knockdown von p53 und p16 ^{INK4a}	89
3.4.1	Validierung der siRNA Sequenzen in der Tubuluszellkultur.....	89
3.4.2	siRNA vermittelter Knockdown von p53 in geschädigten Nieren.....	90
3.4.3	Knockdown von p16 ^{INK4a} mRNA in I/R geschädigten Nieren.....	105
4	Diskussion	108
4.1	Proliferationsrate des Tubulusepithels <i>in vivo</i> ist altersabhängig	108
4.2	Altersunterschiede von Tubuluszellen <i>in vitro</i>	110
4.2.1	Erfolgreiche Etablierung der primären Tubuluszellkultur	111
4.2.2	Vergleichbar gutes Wachstum der Altersgruppen in der Zellkultur	112

Inhaltsverzeichnis

4.2.3	Terc ^{-/-} -Tubuluszellen im Vergleich zum Wildtyp in der Zellkultur	114
4.2.4	Ink4a ^{-/-} -Tubuluszellen im Vergleich zum Wildtyp in der Zellkultur.....	116
4.2.5	Seneszente Tubuluszellen <i>in vitro</i> durch Bestrahlung	119
4.3	Marmosets als Modell für Seneszenz in der humanen Niere	120
4.4	siRNA als Therapeutikum für renale Tubuluszellen.....	121
4.4.1	Aufnahme der siRNA auch von geschädigten Tubuluszellen <i>in vivo</i>	122
4.4.2	p53 siRNA wirkt nach einer Nierenschädigung kurzfristig protektiv.....	123
4.4.3	Längerfristige Wirkung der p53 siRNA dosis- und zeitabhängig.....	126
4.4.4	p16 siRNA wirkt potentiell protektiv.....	128
	Literatur.....	130
	Internetseiten	144
	Abbildungen.....	145
	Tabellen.....	147
	Danksagung.....	148
	Lebenslauf.....	149
	Wissenschaftliche Publikationen.....	150

Abkürzungen

A	Absorption
AA	Aristolochic acids
Abb.	Abbildung
ADH	Antidiuretisches Hormon
AKI	acute kidney injury
ANOVA	analysis of variance
ANRIL	Anti-sense non-coding RNA in the <i>INK4/ARF</i> locus
APS	Ammoniumpersulfat
Aqp	Aquaporin
ARF	alternate reading frame
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia mutated and rad3 related
ATTAC	Apoptosis through targeted activation of caspase
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-uridine
BSA	bovine serum albumine
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Casp	Caspase
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDKI	CDK-Inhibitor
cDNA	complementary DNA
CKD	chronic kidney disease
ct	cycle threshold
d	dome
DAB	Diaminobenzidin
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAMP	Damage associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA damage response
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGF	delayed graft function

Abkürzungen

DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DRI	D-retro inverso
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Deoxyuridine-5`-triphosphate
E-Cad	E-Cadherin
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESRD	end stage renal disease
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKBP	FK506 binding protein
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
g	kontextabhängig: Gramm oder Erdbeschleunigung
G	kontextabhängig: gap (Zellzyklus) oder Generation (Mauszucht)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomerular filtration rate
ggfs.	gegebenenfalls
Gy	Gray
h	Stunde
HAVCR	Hepatitis A virus cellular receptor
HDM2	Human double minute 2
HE	Hämatoxylin/Eosin
HF	Human fibroblast
HK	Human kidney
HPF	Hauptgesichtsfeld

Abkürzungen

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPV	Humaner Papillomavirus
HRP	Horseradish peroxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
Hz	Hertz
I/R	Ischämie/Reperfusion
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
ink	Inhibitor of cdk
k	kontralateral
kb	Kilobase
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
KIM-1	Kidney injury molecule 1
l	Liter
LCN2	Lipocalin 2
LTL	Lotus tetragonolobus lectin
M	kontextabhängig: Mitosis/molar
MDM2	Mouse double minute 2
MEF	mouse embryonic fibroblast
mg	Milligramm
min	Minute
miRNA	Micro RNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
mRNA	Messenger RNA
MT	Masson Trichrom
MTLA	Medizinisch technische Laboratoriumsassistentin
MVZ	Medizinisches Versorgungszentrum
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen
ng	Nanogramm
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
nm	Nanometer

Abkürzungen

nt	Nukleotid
NTC	no template control
OAT	Organic anion transporter
OD	Optische Dichte
P	Passage
p.a.	pro analysi
päd.	pädiatrisch
PAS	Periodic acid Schiff
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEC	proximale tubule epithelial cell
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RB	Retinoblastoma
Ref	Referenz
REGM	renal epithelial cell growth medium
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	ribonucleic acid
RNAi	ribonucleic acid interference
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species
RT	Kontextabhängig: Raumtemperatur oder Real Time
S	Kontextabhängig: Segment oder Synthesis
SA	senescence associated
SASP	senescence associated secretory phenotype
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
si	small interfering
SNC	senescent cell
STASIS	stress and aberrant signaling-induced senescence
T	Tag

Abkürzungen

TAMRA	Tetramethylrhodamin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxynucleotidyltransferase
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
U	Umdrehung
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl	vergleichsweise
vWF	Von Willebrand-Faktor
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β D-galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel
ZO	Zonula occludens
α -SMA	α -Smooth muscle actin
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar

1 Einleitung

Zelluläre Seneszenz in der Niere - Ziel für therapeutische RNA-Interferenz

Nieren sind überlebenswichtige Organe, deren Funktion bei einseitigem Versagen noch durch die verbliebene gesunde Niere, nach beidseitigem Versagen potentiell nur durch regelmäßige Dialyse bzw. durch eine Nierentransplantation übernommen werden kann. Die Verbesserung der Lebensqualität und die Verminderung des Sterblichkeitsrisikos für die Patienten, aber auch die Senkung der hohen Kostenbelastung für das Gesundheitssystem sind wichtige Gründe, um die Therapieoptionen bei Nierenerkrankungen zu erweitern.

1.1 Die Niere

Die Nieren sind paarweise in der Bauchhöhle angeordnete lebenswichtige Organe mit einem komplexen Aufbau und vielfältigen Funktionen. Eine wichtige Funktion der Niere ist die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Fremdsubstanzen über eine als Harn oder Urin bezeichnete wässrige Flüssigkeit. Die Filtration von täglich 180 l Blutplasma über die humane Niere führt zur Ausscheidung von 1-2 l Harn.

Die Niere ist über die Arteria renalis und die Vena renalis an den Blutkreislauf angeschlossen, die zusammen mit dem Nierenbecken als Nierenstiel aus der Nierenhilus genannten Mulde austreten. Makroskopisch und mikroskopisch kann man im Parenchym der Niere die äußere Nierenrinde (Cortex) und das innere Nierenmark (Medulla) unterscheiden.

Eine der funktionellen Einheiten der Niere ist der harnleitende Kanal, der aus einem Nephron und einem Sammelrohr besteht. Über eine Million dieser harnleitenden Kanäle sind zusammen mit interstitiellem Bindegewebe, Gefäßen und Nerven in dichter Packung angeordnet. Die Kanäle münden schließlich als Sammelrohr in die Nierenkelche, die wiederum in das Nierenbecken münden. Das Nierenbecken ist bereits Teil des Harnleiters, der den Harn zur Blase führt.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere, das Nephron, besteht aus dem Nierenkörperchen mit Filterfunktion und dem Tubulus als ein die Ausscheidung bzw. Resorption selektierendes Röhrensystem. Das Nierenkörperchen wird von einem Kapillarknäuel (Glomerulum) und einer das Glomerulum umgebenden zweischichtigen Kapsel mit einem Lumen (Bowman-Kapsel) umhüllt. Die äußere Schicht der Kapsel aus einschichtigem Plattenepithel bildet eine Begrenzung, während die innere Schicht aus spezialisierten Zellen, den Podozyten besteht. Die Kapillaren, die Podozyten und eine dazwischenliegende Basalmembran bilden zusammen die Blut-Harnschranke, durch die zunächst ein Primärharn genanntes Ultrafiltrat in das

Kapsellumen filtriert wird. Das Kapsellumen geht direkt in das Hauptstück des Röhrensystems, den proximalen Tubulus, über. Das Röhrensystem besteht funktionell aus einschichtigem Epithel und beginnt mit dem proximalen Tubulus (Hauptstück), der über den Intermediärtubulus (Überleitungsstück) in den distalen Tubulus (Mittelstück) führt, der seinerseits in das Sammelrohr übergeht. Während der Primärharn das System durchläuft, werden ca. 99 % des Ultrafiltrats rückresorbiert: Wasser durch Osmose, die gelösten Substanzen durch Diffusion oder aktive Transportprozesse.

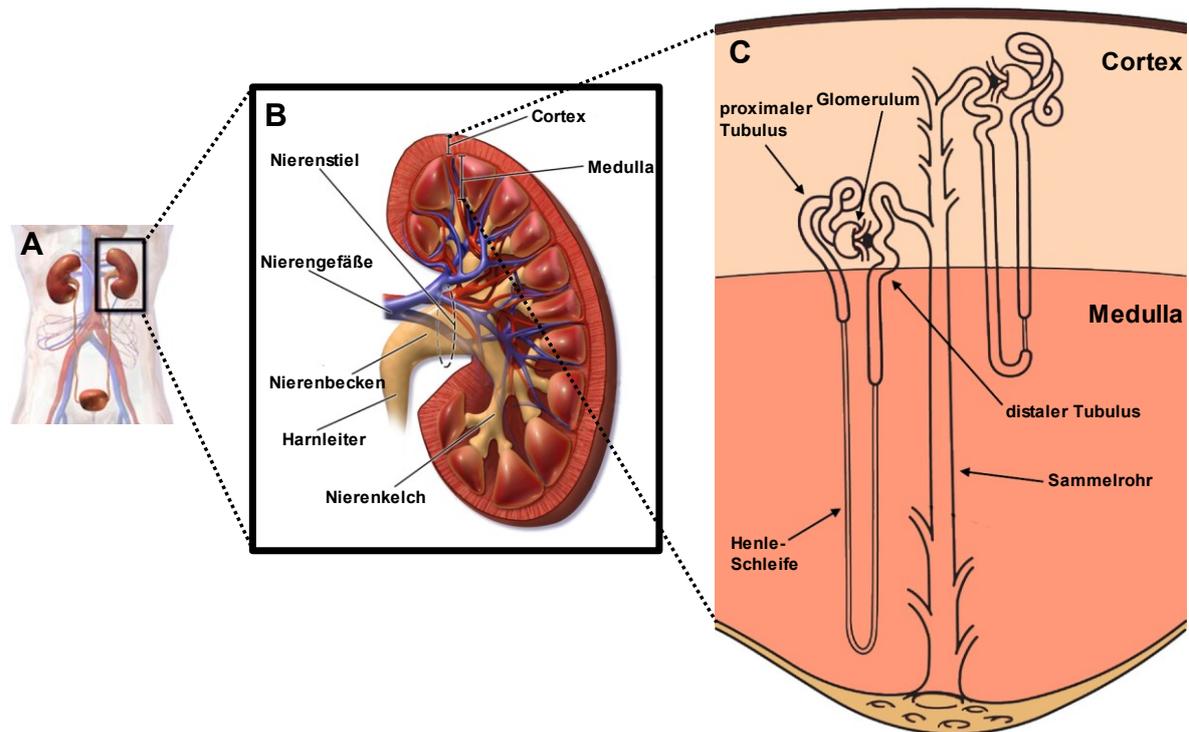


Abb. 1 Lage und Architektur der Säugerniere

Schematisch dargestellt ist die Lage der Nieren im Bauchraum (A), die makroskopisch sichtbaren Strukturen einer frontal aufgeschnittenen Niere (B) und die Organisation eines harnleitenden Kanals (C).

A und B modifiziert nach Blausen.com staff, 2014; C modifiziert nach Artwork by Holly Fischer

Der proximale Tubulus setzt sich histologisch aus zwei Abschnitten zusammen: der Pars contorta beginnend an der Bowman-Kapsel und der Pars recta. Hier werden bereits ca. 75 % des Primärharns rückresorbiert. Das polare Epithel weist lumenseitig einen Bürstensaum und basalseitig tiefe Einfaltungen zur Oberflächenvergrößerung auf (Geneser und Schwerdtfeger, 1990). Ultrastrukturell wird der proximale Tubulus in drei Segmente (S1-S3) unterteilt, da diese Zelleigenschaften in der Pars contorta (S1) am ausgeprägtesten sind und im Verlauf der Pars recta (S2 und S3) stetig abnehmen (Schafer und Barfuss, 1982). Als Henle Schleife wird ein Abschnitt bezeichnet, der aus der Pars recta des proximalen Tubulus, dem Intermediärtubulus und der Pars recta des distalen Tubulus besteht. Hier findet durch einen speziellen NaCl-Transportmechanismus, dem Gegenstrommultiplikationssystem, ein Großteil der

Harnkonzentration statt. Der distale Tubulus wird in Pars recta, Macula densa und Pars contorta unterteilt. Die Pars contorta und das Sammelrohr regulieren mithilfe von weiterem Wasserentzug unter dem Einfluss des Antidiuretischen Hormons (ADH) abschließend die Harnkonzentration. Die Zellen der Macula densa sind über den Kontakt zum extraglomerulären Mesangium und den juxtaglomerulären Zellen Teil des juxtaglomerulären Apparats und fungieren dort als Osmosensoren. Der juxtaglomeruläre Apparat liegt jedem Glomerulum unmittelbar an und reguliert den Elektrolythaushalt und den Blutdruck (Geneser und Schwerdtfeger, 1990).

Der Aufbau und die Funktionen der Niere sind beim Menschen und vielen höheren Säugetieren, einschließlich der Maus, grundsätzlich gleich (Campbell und Reece, 2003); in Abb. 1 ist schematisch eine Übersicht der Architektur der einzelnen Bestandteile dargestellt.

1.2 Pathophysiologie der Niere

Eine akute Krankheitsphase der Niere, internationale Abkürzung AKI (Acute Kidney Injury), definiert durch das Auftreten struktureller Schäden und funktioneller Beeinträchtigungen innerhalb weniger Stunden, ist mit einem erhöhten Risiko der Chronifizierung, abgekürzt CKD (Chronic Kidney Disease), und schließlich dem terminalen Organversagen (ESRD für End Stage Renal Disease), assoziiert. Eine Diagnose des akuten Krankheitsgeschehens erfolgt über das Absinken der glomerulären Filtrationsrate, einen erhöhten Serumkreatininwert und/oder eine verminderte Urinausscheidung (Abb. 2). Der Serumkreatininwert unterliegt jedoch vielen Faktoren wie z.B. Alter, Muskelmasse oder Diäten und reagiert nicht unmittelbar auf akute Funktionsverluste (Chawla und Kimmel, 2012; Makris und Spanou, 2016). Andere potentielle Biomarker wie die von geschädigtem Tubulusepithel vermehrt gebildeten Proteine HAVCR1 (Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1), auch KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1) genannt, bzw. LCN2 (Lipocalin 2), häufig und im weiteren Text bezeichnet als NGAL (Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin), sind derzeit in verschiedenen Evaluationsphasen (Kashani *et al.*, 2017). Pathophysiologisch werden bei AKI häufig mitochondriale und endotheliale Dysfunktion, geschädigte Tubuluszellen und Entzündungsreaktionen beobachtet (Duann *et al.*, 2016).

In Industrienationen sind vor allem Krankenhauspatienten von AKI betroffen, während in Entwicklungsländern auch größere Teile der Allgemeinbevölkerung durch dort kursierende Krankheiten und schlechte Lebensbedingungen daran erkranken. Die Auslöser für AKI sind vielfältig und oft multifaktoriell und reichen von genetischen Ursachen über Sepsis und toxische Schädigungen bis hin zu Schäden durch unzureichende Blutversorgung des Organs (Ischämie) (Makris und Spanou, 2016).

Ischämie mit anschließender Wiederdurchblutung (Reperfusion) tritt wiederum z.B. bei Schock, Schwangerschaft, vor allem aber auch bei chirurgischen Komplikationen und bei jeder Nierentransplantation auf (Lameire *et al.*, 2013). Während ein adaptiver Reparaturmechanismus das Gewebe vollständig regenerieren kann, führen das Versagen und/oder die Fehlsteuerung von Reparaturprozessen zur Chronifizierung bzw. zu terminalem Organversagen (Abb. 2). Klinische Daten aus großen Datenbanken belegen signifikante Korrelationen zwischen dem Auftreten von AKI und der Entwicklung zu CKD (8,8-fach erhöhtes Risiko) oder sogar ESRD (3,3-fach erhöhtes Risiko). Neben der Schwere, der Dauer und der Häufigkeit der AKI-Episoden zählt unter anderem das Alter (biologisch/chronologisch) zu den Risikofaktoren für das Fortschreiten der Nierenerkrankung (Basile *et al.*, 2016; Heung und Chawla, 2014).

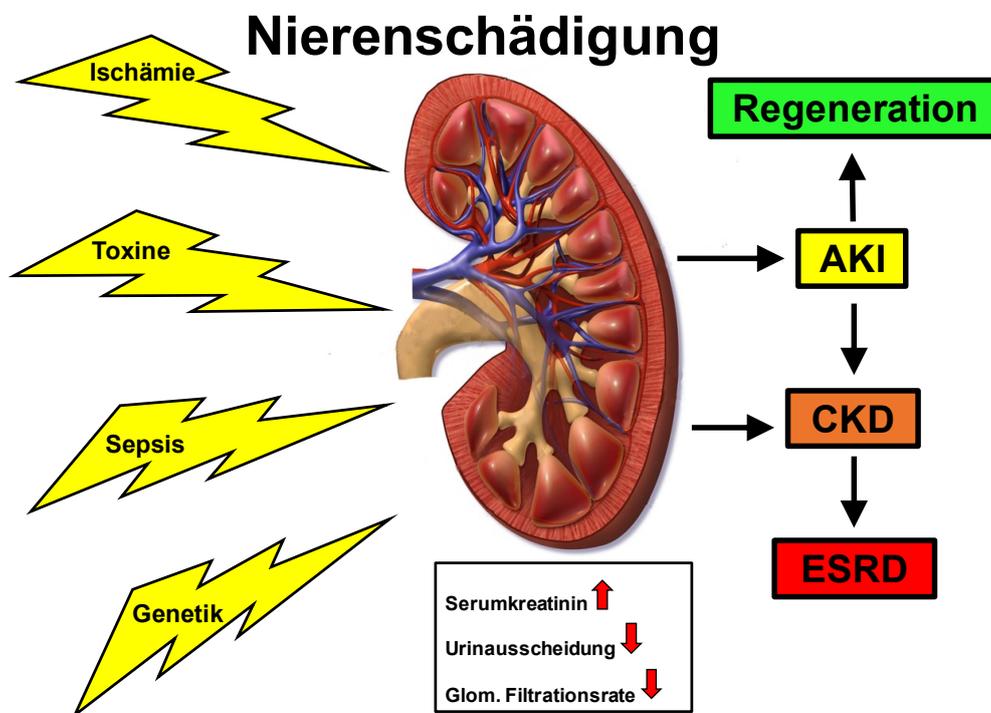


Abb. 2 Prominente Auslöser von Nierenschäden und mögliche Folgen für das Organ
Niere modifiziert nach Blausen.com staff, 2014

Tierexperimentelle (Krankheits)-Modelle *in vivo* und *in vitro* sind in diesem Zusammenhang bedeutsam, um physiologische und pathologische Reaktionen besser zu verstehen, aber auch um neue Therapieansätze zu evaluieren.

Eine Nierenschädigung durch Ischämie/Reperfusion (I/R) kann im Mausmodell durch eine Unterbrechung der renalen Blutversorgung durch das temporäre Abklemmen der Nierengefäße hervorgerufen werden (Tewes *et al.*, 2017). Eine weitere Möglichkeit, eine Nierenschädigung im Mausmodell zu erzeugen, ist die Verabreichung von nephrotoxischen Substanzen, wie den Aristolochiasäuren (AA) (Shibutani *et al.*, 2007).

Im Folgenden werden einige pathophysiologische Mechanismen der Nierenschädigung und als Konsequenz aus diesen Erkenntnissen ein potentieller Therapieansatz näher erläutert. Im Fokus stehen dabei die proximalen Tubuluszellen, deren akute (sogar auch selektive) Schädigung zu tubulo-interstitieller Fibrose mit dauerhaftem Funktionsverlust führen kann (Bonventre, 2014; Venkatachalam *et al.*, 2010).

1.2.1 Akuter Nierenschaden durch Ischämie/Reperfusion

Die Reaktion des komplex aufgebauten Nierenparenchyms auf eine Hypoxie führt von Zellschädigungen bis hin zum Zelltod. Während einer Ischämie kommt es in der Niere zu einem generalisierten oder auch nur lokalisierten Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen und einem gestörten Abtransport von Stoffwechsel- und Abfallprodukten. Ein zentrales Problem ist vor allem die durch den Sauerstoffmangel bedingte Umstellung des Energiestoffwechsels der Zellen vom aeroben zum anaeroben Metabolismus, was unter anderem einen Mangel an ATP (Adenosintriphosphat) zur Folge hat. Aktive ATP-verbrauchende Transportprozesse wie z.B. die Arbeit der Ionenpumpen gegen den elektrochemischen Gradienten in der Zellmembran sind reduziert, die Lysosomen und das Zytoskelett werden instabil. Die Zellen schwellen an und die Zellstruktur bricht zusammen. Die Zell-Polarität ändert sich und damit Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen (Molitoris, 2004; Salvadori *et al.*, 2015). Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) akkumulieren nicht korrekt gefaltete Proteine, die Stressantworten auslösen (Zuk und Bonventre, 2016).

Mitochondrien sind nicht nur Energielieferanten der Zellen und der Hauptbildungsort von ROS (Reactive Oxygen Species), sondern auch potentielle Mediatoren des Zelltods (Shadel und Horvath, 2015). In physiologischen Konzentrationen fungieren ROS als homöostatisch wirkende Signalmoleküle, bei Überproduktion durch eine Fehlfunktion der Elektronentransportkette schädigen sie alle wichtigen Biomoleküle wie Proteine, Lipide und Nukleinsäuren (Duann *et al.*, 2016; Ratliff *et al.*, 2016). Die Mitochondrien-Homöostase aus Biogenese, Fusion, Fragmentierung und Mitophagie ist während einer Hypoxie gestört (Agarwal *et al.*, 2016). Durch die Überproduktion von ROS und eine gestörte Ca^{2+} -Homöostase öffnet sich die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore. Durch Wassereinstrom schwellen und gegebenenfalls platzen die Mitochondrien und entlassen den Cofaktor der Atmungskette NADH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrogen), Ca^{2+} und proapoptotische Faktoren in das Zytosol. Bei schweren Zellschädigungen führen diese Mechanismen zum Zelltod (Kezic *et al.*, 2016). Bei ROS-vermittelten DNA-Schäden ist unter anderem der Ablauf des Zellzyklus gestört (Rottenberg und Hoek, 2017).

Als komplexe Antwort auf die Gewebeschädigung wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die, wenn ausgewogen im Hinblick auf die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren, die Geweberegeneration unterstützt. Eine Schlüsselkomponente für die Aktivierung der Entzündungsreaktion durch geschädigte Zellen ist die Freisetzung von DAMPs (Damage Associated Molecular Pattern), die durch Rezeptorbindung epitheliale, endotheliale, dendritische Zellen, Lymphozyten, Mono- und Makrozyten aktivieren (Rabb *et al.*, 2016). Als frühe Antwort der angeborenen Immunabwehr werden unter anderem neutrophile Leukozyten und Makrophagen an den Ort der Schädigung gelockt, später dann auch Zellen der adaptiven Immunabwehr (Bonventre und Yang, 2011).

Am Endothel kommt es durch den Verlust von Zell-Zell-Kontakten zu einer erhöhten Permeabilität mit Einstrom von Flüssigkeit in das Interstitium. An der Zelloberfläche werden vermehrt Proteine exponiert, die Leukozyten und Thrombozyten anlocken. Die Einwanderung von Leukozyten, Ödeme, Thrombosen, die Produktion von vasokonstriktorisch wirksamen Substanzen und die verminderte Produktion von Vasodilatoren tragen potentiell zu einer Ausweitung der Zirkulationsstörung bei (Bonventre und Yang, 2011; Salvadori *et al.*, 2015; Zuk und Bonventre, 2016). Eine Reperfusion bringt zwar die dringend benötigte Sauerstoffzufuhr, die aber nicht nur positive Effekte hat: die Überproduktion von ROS, der Ablauf des programmierten Zelltods, die weitere Zufuhr von Komponenten des angeborenen und adaptiven Immunsystems (Saat *et al.*, 2016).

Eine erfolgreiche Reparatur stellt den Blutfluss wieder her, entfernt Nephrotoxine und repariert das renale Parenchym. Jedoch sind die Reparaturmechanismen komplex und umfassen unter anderem eine ausbalancierte Zellzykluskontrolle (Humphreys *et al.*, 2016). In der gesunden Niere ist die Anzahl der proliferierenden Zellen sehr gering, das Absterben von Zellen ist jedoch ein Proliferationsreiz und aktiviert die Zellzyklusmaschinerie. Eine Fehlsteuerung der Zellzyklusproteine trägt zu dem Übergang einer akuten in eine chronische Schädigung bei (Agarwal *et al.*, 2016; Kellum und Chawla, 2016).

1.2.1.1 Schädigung des proximalen Tubulus durch Ischämie/Reperfusion

Überproportional erniedrigt verglichen mit dem Rest des Organs ist der Blutfluß in der äußeren Medulla in Tiermodellen und damit wahrscheinlich auch in der humanen Niere (Bonventre und Yang, 2011). Im Tiermodell zeigt sich dabei histologisch eine auffällige Schädigung des Epithels im S3-Segment des proximalen Tubulus (Venkatachalam *et al.*, 2015). Die proximalen Tubuluszellen sind im Gegensatz zu distalen Tubuluszellen vergleichsweise empfindlich gegenüber einer Hypoxie, da sie die Glykolyse als anaeroben Energiestoffwechselweg während

einer Ischämie nicht nutzen können und ihnen damit relativ noch weniger ATP zur Verfügung steht (Agarwal *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2015). Zudem sind die proximalen Tubuluszellen, bedingt durch die Transportprozesse, metabolisch hochaktiv und reich an Mitochondrien (Agarwal *et al.*, 2016). Der unter Hypoxie gestörten Mitochondrien-Homöostase kommt daher im proximalen Tubulus eine besondere Bedeutung zu: zum einen durch den mitochondrial vermittelten Zelltod, zum anderen durch die Produktion von ROS. Als Folge einer Ischämie verlieren die Zellen die Integrität des Zytoskeletts, den Bürstensaum und die Zellpolarität. Daraus kann die Ablösung der Zellen von der Basalmembran in das Tubuluslumen resultieren und Tubuluszellen sowie Proteinzylinder werden als Zeichen der Schädigung im Urin gefunden (Bonventre und Yang, 2011; Zuk und Bonventre, 2016). Tubuläre Transportprozesse sind wegen des ATP-Mangels massiv gestört, die Ansammlung von nicht resorbierbaren, in höheren Konzentration toxischen Substanzen, führt zu weiteren Zellschäden (Makris und Spanou, 2016). Typische histopathologische Kennzeichen einer tubulären Schädigung sind somit eine tubuläre Dilatation, intraluminale Zylinder, abgeflachte Zellen und eine zellfreie Basalmembran (Abb. 3) (Broekema *et al.*, 2005).

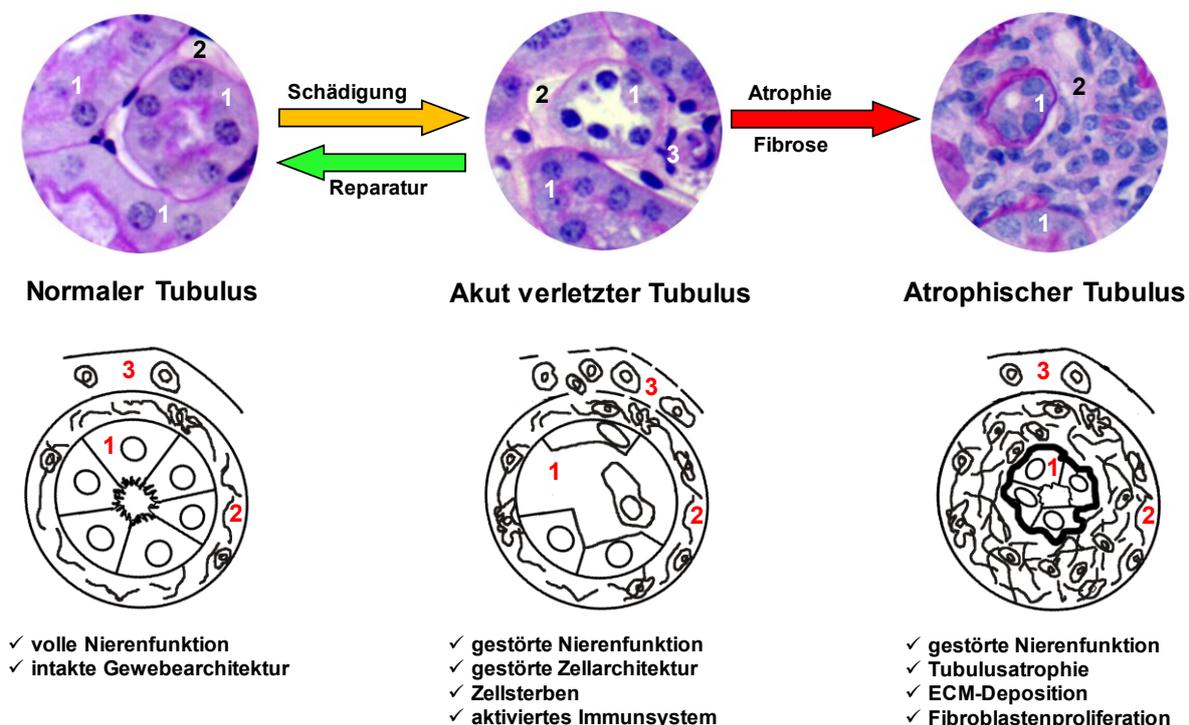


Abb. 3 Schematische Darstellung des akuten und chronischen Tubulusschadens
 Proximaler Tubulus (1), Interstitium (2) und Blutgefäße (schematisch mit Immunzellen) (3)

Als einen wichtigen Reparaturmechanismus für die verletzten Tubuli haben Fate-Mapping-Techniken nachgewiesen, dass verbliebene Tubuluszellen nach einem Schaden proliferieren und den Zellverlust ersetzen können (Bonventre, 2014). Voraussetzung für die erfolgreiche Zellerneuerung ist der vollständige Durchlauf des Zellzyklus, der aber unter anderem durch DNA-Schäden in Folge von ROS-Überproduktion gestört werden kann.

1.2.2 Akuter Nierenschaden durch Aristolochiasäuren

Aristolochiasäuren (AA = Aristolochic acids) sind Nitrophenanthrencarbonsäuren und kommen natürlicherweise in allen Pflanzenteilen von mehr als 500 Pflanzen, hauptsächlich aber in der Gattung *Aristolochia* oder *Asarum*, vor. Diese Pflanzenteile werden mitunter in chinesischen Kräutermischungen in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet, die AA kommen aber in bestimmten Regionen auch über natürliche Mechanismen in die Nahrungskette. Eine Ingestion dieser Substanzen führt dosisabhängig zu AKI mit akuter Nephrotoxizität im Cortex. Biopsien zeigen neben tubulärer Atrophie und Tubulusverlusten massive interstitielle Fibrose im Cortex. Erst im späteren Verlauf weisen auch die Glomeruli pathologische Zeichen wie Glomerulosklerose auf. Ein akuter Effekt ist das apoptotische/nekrotische Zellsterben im proximalen Tubulus mit dem Auslösen einer Entzündungsreaktion. Eine Hypothese für die spezifische Toxizität von AA für proximale Tubuluszellen ist deren Verteilung im Körper über das Blut, möglicherweise an Albumin gebunden und daher nicht glomerulär filtriert, aus dem sie aktiv durch z.B. basolaterale organische Anionentransporter (OAT) in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen werden. Durch Verstoffwechslung entstehen AA-DNA-Addukte mit genotoxischen Effekten. Weitere Folgen können chronische Verläufe, terminales Organversagen und Urogenitalkarzinome sein (Jadot *et al.*, 2017). Auch nach dieser Schädigung müssen die verbleibenden Tubuluszellen proliferieren, um das zerstörte funktionelle Gewebe zu ersetzen. Eine Störung des Zellzyklus durch AA wurde für kultivierte renale proximale Tubuluszellen *in vitro* bereits nachgewiesen und spielt möglicherweise auch *in vivo* eine Rolle für die Chronifizierung (Li *et al.*, 2006).

1.2.3 Chronische Nierenerkrankung

Der Begriff CKD wird für Nierenerkrankungen verschiedener Ursachen benutzt und wurde von der globalen Non-Profit-Organisation KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) als eine länger als drei Monate anhaltende abnormale Nierenstruktur oder -funktion definiert (Levey *et al.*, 2005).

Ein fortschreitender Nierenfunktionsverlust mit Abnahme der Filtrationsleistung beruht auf der Zerstörung der funktionellen renalen Parenchymarchitektur, die sukzessive durch fibrotische Strukturen ersetzt wird (Bonventre, 2014).

Histologisch findet man Glomerulosklerose, eine Abnahme der Kapillarendichte, tubuläre Atrophie und tubulointerstitielle Fibrose durch Ablagerung von extrazellulärer Matrix (ECM) (Abb. 3). In diversen Tiermodellen inklusive der Maus führt ein durch z.B. I/R oder Nephrotoxine erzeugter akuter Nierenschaden in der Langzeitbeobachtung zu der Bildung von Fibrose, einem hervorstechenden Merkmal der Organzerstörung (Basile *et al.*, 2016).

Die wichtige Rolle des proximalen Tubulus für das Krankheitsgeschehen wurde unter anderem in einem Tiermodell nachgewiesen, bei dem dosisabhängig durch eine selektive toxische Schädigung des proximalen Tubulus allein bereits CKD-Merkmale wie Fibrose und Glomerulosklerose herbeigeführt werden konnten (Grgic *et al.*, 2012).

Studien haben gezeigt, dass es eine altersabhängige Beziehung zwischen sowohl AKI als auch CKD und höherem Lebensalter gibt (Coca, 2010; Fraser und Blakeman, 2016). Die Nieren älterer Patienten zeigen eine verspätete und/oder verminderte Regenerationsfähigkeit, eine Reaktion, die auch in Tiermodellen beobachtet wurde (Melk *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014). Das hat nicht nur Konsequenzen für den nierenerkrankten Patienten an sich, sondern auch für potentielle Nierentransplantationen. Das Alter einer Spenderniere ist eine Hauptdeterminante für das Langzeitüberleben des Transplantats, je älter der Spender, desto schlechter ist die Überlebensrate (Koppelstätter *et al.*, 2008). Der steigende Anteil älterer Menschen mit altersbedingten Nierenerkrankungen resultiert in einem erhöhten Bedarf an Spenderorganen. Die Therapieoption Organtransplantation ist jedoch durch die zur Verfügung stehenden Spenderorgane limitiert. Um die Versorgung mit Spenderorganen zu steigern werden trotz der möglicherweise eingeschränkten Regenerationsfähigkeit daher auch Nieren älterer Spender transplantiert (Schmitt und Melk, 2012).

Ein in diesem Zusammenhang erfolgversprechender therapeutischer Angriffspunkt zur Verbesserung der Regenerationsfähigkeit von älteren Spenderorganen ist der Signalweg der zellulären Seneszenz, der die Proliferationskapazität des Tubulusepithels durch das Auslösen des Zellzyklusarrests dauerhaft vermindert.

1.3 Zellzykluskontrolle durch zelluläre Seneszenz

Der Begriff zelluläre Seneszenz wurde in den 1960er Jahren erstmals von einem Forscher namens Hayflick verwendet, der die Beobachtung gemacht hatte, dass sich humane Zellen *in vitro* in der Zellkultur nicht unendlich teilen können (Hayflick, 1965).

Zelluläre Seneszenz beschreibt den Zustand von lebenden Zellen, die zwar metabolisch aktiv sind, im Gegensatz zu quieszenten Zellen aber nicht wieder in den Zellzyklus eintreten. Bislang ist noch kein Biomarker bekannt, der eine Zelle spezifisch als seneszent markiert, es können aber Merkmale beschrieben werden, die viele der seneszenten Zellen aufweisen (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007). Seneszente Zellen sind häufig größer als normal, zeigen eine Aktivität der SA- β -Galaktosidase (Senescence Associated) und die meisten exprimieren den Zellzyklusinhibitor p16^{INK4a}.

Wichtige Merkmale, die vor allem bei der Organhomöostase eine Rolle spielen, sind unter anderem eine verminderte Proliferation durch den Zellzyklusarrest und die potentielle Sekretion von auto- und parakrin aktiven Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteasen durch die permanente Aktivität der DDR-Signalwege (DNA Damage Response), genannt SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype) (Rodier und Campisi, 2011).

Da seneszente Zellen im Laufe des Lebens in Organen akkumulieren, dabei aber nicht wie potentiell proliferierende Zellen zur Zellerneuerung zur Verfügung stehen und des Weiteren proinflammatorische Zytokine und andere ungünstige Faktoren sezernieren, wird der Mechanismus der zellulären Seneszenz als wichtiger Beitrag zur Organalterung angesehen (de Magalhaes und Passos, 2017). Involviert sind zwei interagierende Hauptsignalwege, die auch unabhängig voneinander einen Zellzyklusarrest auslösen: der p16^{INK4a} und der p53 Tumorsuppressor vermittelte Signalweg (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007). Entwicklungsbiologisch liegt der Seneszenz ein Tumorsuppressormechanismus zugrunde, von dem junge Organismen durch Schutz vor Tumoren profitieren, der aber bei gealterten Organismen Erkrankungen mitverursacht und unterstützt. Seneszente Zellen sind daher in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus bei der Entwicklung von Therapieansätzen gerückt, die unter dem Oberbegriff Senotherapie zusammengefasst werden.

1.3.1 Der p53-vermittelte Seneszenzweg

Das Hayflick-Phänomen wurde später mit einer Verkürzung der Telomere in Zusammenhang gebracht. Als Telomere werden Strukturen am Ende der eukaryotischen Chromosomen bezeichnet, die aus nicht-kodierenden repetitiven DNA-Sequenzen und assoziierten Proteinen bestehen. Diese Abschnitte aus sich wiederholenden Hexanukleotiden bei Menschen und

Mäusen sind mehrere Kilobasenpaare lang, schützen die Chromosomenenden vor Rekombination und Degradation und haben eine wichtige Funktion bei der DNA-Replikation. Durch das sogenannte Endreplikationsproblem verlieren die Zellen bei jeder Zellteilung Basenpaare am Chromosomenende. Da es sich um nicht-kodierende Telomersequenzen handelt, ist dieses Phänomen erst ein Problem, wenn die Telomere sich nach vielen Zellteilungen auf eine kritische Länge verkürzt haben. Die reverse Transkriptase Telomerase kann diesen Verlust durch Neusynthese ersetzen, jedoch bilden nicht alle Zellen dieses Enzym (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007). Bei Mäusen ist das Enzym in vielen Zellen aktiv, beim Menschen nur in sehr wenigen, unter anderem in Krebszellen und einigen Stamm- und Immunzellen. Eine kritische Telomerlänge kann zu Chromosomenfusionen und Rekombinationen führen und damit die genomische Stabilität der Zelle gefährden (Westhoff *et al.*, 2010).

Als Antwort darauf, aber auch auf andere Formen der DNA-Schädigung, z.B. ROS-bedingte Schäden, wird in der Zelle der DDR-Apparat aktiviert. Die Antwort auf DNA-Schäden ist komplex und umfasst Signalkaskaden und Effektorsysteme mit Einfluss auf verschiedene biologische Prozesse wie Replikation, Zellzyklus oder auch Apoptose. Die aktivierten "Master-Kinasen" des DDR-Systems wie z. B. ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) und ATR (Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3 related) phosphorylieren p53, das dadurch der HDM2 (Human Double Minute 2)- bzw. MDM2 (Mouse Double Minute 2)-vermittelten Degradation entgeht und stabilisiert wird. p53 akkumuliert und induziert die Expression des CDKIs (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor) p21^{CIP1} (Chandrasekaran *et al.*, 2017; Nicolai *et al.*, 2015).

Cycline sind Schlüsselemente der Zellzyklusmaschinerie und bilden zusammen mit ihren zugehörigen CDKs (Cyclin-Dependent Kinase) Holoenzyme, die Ziel-Proteine phosphorylieren, um den Zellzyklus voranzutreiben. Die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (RB) durch die Cyclin E/CDK2- und Cyclin D/CDK4/6-Komplexe führt zur Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktoren. Diese wiederum aktivieren weitere unter anderem für den Zellzyklusübergang der G1-Phase (Gap, präsynthetisch) in die S-Phase (Synthesis) essentielle Gene (Giacinti und Giordano, 2006).

Eine prominente Funktion von p21^{CIP1}, nämlich die Inhibierung der CyclinE/CDK2 und CyclinD/CDK4/6-Komplexe, verhindert die Phosphorylierung von RB und damit die Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktoren: Es resultiert der Zellzyklusarrest. Bei der Vermittlung eines G2/M (Mitosis)-Arrests wird von p21^{CIP1} ebenfalls die Phosphorylierung von RB und damit die Expression von G2/M-Übergangsgenen blockiert (Abb. 4).

Weiterhin aktiviert $p21^{CIP1}$ die Ubiquitin E3-Ligase APC^{Cdh1} , die Cyclin B1 und andere mitotische Regulatoren zur Degradation markiert (Gire und Dulic, 2015).

$p53$ und $p21^{CIP1}$ haben jedoch nicht nur Schlüsselfunktionen in diesem wichtigen Seneszenz-Signalweg, sondern insbesondere $p53$ ist in multiple Prozesse wie Apoptose, Metabolismus, Autophagie und Translation involviert (Vilborg *et al.*, 2010).

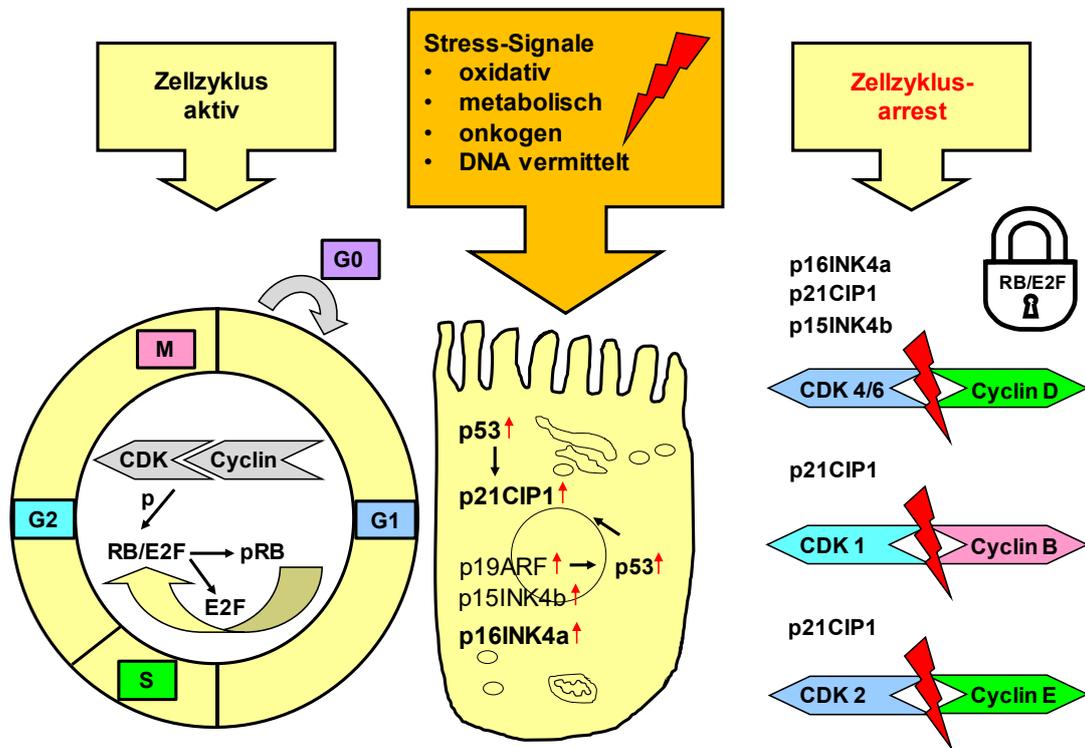


Abb. 4 Schematische Darstellung einiger Komponenten des stressbedingten Zellzyklusarrests

1.3.2 Der $p16^{INK4a}$ -vermittelte Seneszenzweg

Der oft STASIS (Stress and Aberrant Signaling-Induced Senescence) genannte Zellzyklusarrest wird durch die Aktivierung des *INK4/ARF* (Inhibitor of cdk/Alternate Reading Frame) Genlocus durch zelluläre Stressoren wie z.B. oxidativen, metabolischen und onkogenen Stress oder auch DNA-Schäden vermittelt (Abb. 4).

Der Locus kodiert verschiedene Proteine und das nicht-kodierende Transkript ANRIL (Anti-sense Non-coding RNA in the *INK4/ARF* Locus; AK148321 in der Maus), das den Locus epigenetisch reguliert. Das *CDKN2A* Gen in diesem Locus kodiert gleich zwei Proteine in verschiedenen Leserahmen: das prominente Seneszenzmarkerprotein $p16^{INK4a}$ (Exon 1 α , 2, 3) und das Protein $p14^{ARF}$ ($p19^{ARF}$ in der Maus, Exon 1 β , 2). Das *CDKN2B* Gen in diesem Locus kodiert das Protein $p15^{INK4b}$ (Abb. 5). Die Expressionskontrolle des $p16^{INK4a}$ ist komplex und involviert mehrere Transkriptionsfaktoren und epigenetische Mechanismen. Auf ein Stresssignal hin gebildet, bindet und inhibiert das $p16^{INK4a}$ Protein direkt CDK4/6 und

verhindert damit die Phosphorylierung von RB und subsequent die Freisetzung von E2F-Transkriptionsfaktoren. Die Folge ist wiederum der G1/S-Zellzyklusarrest. Auch das p15^{INK4b} Protein bindet und inhibiert CDK4/6, während p14^{ARF} bzw. p19^{ARF} HDM2 bzw. MDM2 blockiert und damit über eine p53 Stabilisierung antiproliferierend wirkt (Abb. 4) (D'Arcangelo *et al.*, 2017; Kong *et al.*, 2016).

Chromosom 9 (Mensch)/4 (Maus)

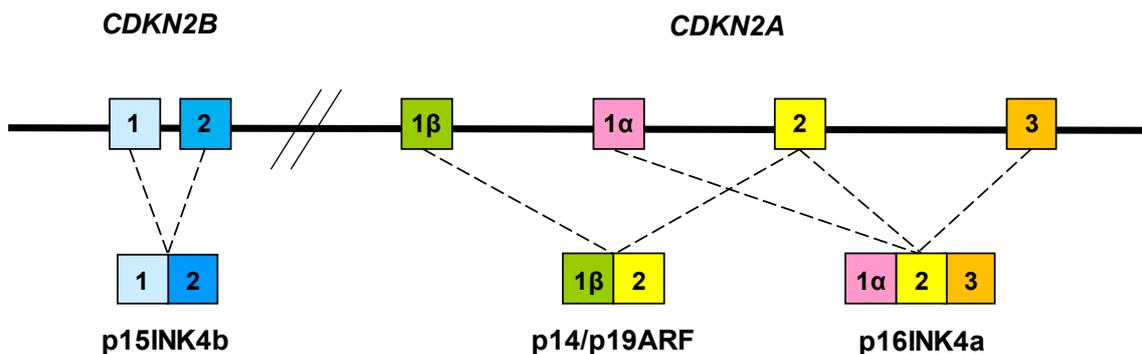


Abb. 5 Schematische Darstellung der Organisation der Gene *CDKN2A* und *CDKN2B*

1.4 Zelluläre Seneszenz in der Niere

Mit steigendem Lebensalter altert auch das Organ Niere. Der Phänotyp der Nierenalterung zeigt sich in charakteristischen funktionellen und morphologischen/histologischen Veränderungen. Funktionelle Veränderungen betreffen sowohl die Tubuli als auch die Glomeruli und äußern sich über einen erhöhten renalen Gefäßwiderstand, einen erniedrigten renalen Plasmafluss und eine erhöhte Filtrationsfraktion. Morphologisch haben alternde Nieren eine geringere kortikale Masse und verlieren kontinuierlich funktionierende Nephrone. Histologisch finden sich tubuläre Atrophie, Glomerulosklerose, interstitielle Fibrose und chronische Entzündungszeichen (Abb. 3). Zudem ist die adäquate Antwort auf einen Schaden vermindert. Seneszente Zellen akkumulieren hauptsächlich im Tubulusepithel, wobei die altersabhängige Akkumulation langsam voranschreitet. Zusätzlich akkumulieren seneszente Zellen stressinduziert, z. B. mit AKI als potentem Stressor (Schmitt und Melk, 2012, 2017). Die seneszenten Zellen sind auf der einen Seite metabolisch hochaktiv und sezernieren proinflammatorische Zytokine, Chemokine, profibrotische Wachstumsfaktoren und Proteasen, auf der anderen Seite aber durch den Zellzyklusarrest teilungsunfähig (Rodier und Campisi, 2011).

Mithilfe von Tiermodellen wie der Maus oder auch dem Primaten *Callithrix jacchus* (Common marmoset) kann Seneszenz in der Niere sowohl *in vivo* als auch in der primären renalen Tubuluszellkultur *in vitro* untersucht und manipuliert werden.

1.4.1 p16^{INK4a}-abhängige Seneszenz in der Niere

In der unverletzten humanen und auch der murinen Niere steigt das p16^{INK4a} Level als Marker für seneszente Zellen mit dem Alter an, wobei p16^{INK4a} hauptsächlich im Tubulus nachgewiesen wurde (Jacobi *et al.*, 2011).

In Tiermodellen ist ein signifikanter Anstieg von p16^{INK4a} durch die Einwirkung verschiedener Stressoren auf die Niere wie z.B. I/R, Transplantatabstoßung, Bluthochdruck oder diabetische Nephropathie dokumentiert (Schmitt und Melk, 2012). In einem Maustransplantationsmodell war der Anstieg von p16^{INK4a} nach dem Transplantationsstress in alten Nieren schneller und ausgeprägter als in jungen Nieren.

In der humanen (Transplantat-) Niere korreliert die p16^{INK4a} Expression mit Glomerulosklerose, interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie (Melk *et al.*, 2009). Das Ausmaß der p16^{INK4a} Expression in humanen Implantatbiopsien ist zusammen mit dem Spenderalter ein aussagekräftiger Biomarker für die Transplantatfunktion ein Jahr nach der Transplantation. Der altersabhängige p16^{INK4a} Anstieg in der humanen Niere ist, wenn auch schwach, negativ mit dem Proliferationsmarker Ki67 korreliert, einem Marker, der in allen kontinuierlich proliferierenden Zellen in der G1, S, G2 und M Phase des Zellzyklus nachweisbar ist (nicht aber in G0) (Schmitt und Melk, 2012). Allerdings ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass sich in der unverletzten Niere die ohnehin sehr geringe Anzahl der proliferierenden Zellen von jungen und alten humanen und murinen Nieren nicht signifikant unterscheidet. Das ändert sich, wenn die Niere einem proliferativen Reiz ausgesetzt ist: Nach I/R oder Transplantation im Mausmodell finden sich signifikant weniger proliferierende Zellen in alten verglichen mit jungen Nieren (Melk *et al.*, 2009; Schmitt und Melk, 2017).

Dass die Proliferation mit Seneszenz in Zusammenhang steht, legen auch die Daten von genetisch manipulierten Tieren nahe. Der Verlust des *Ink4a* Genlocus inaktiviert den p16^{INK4a}-abhängigen Seneszenzweg und so ist die Anzahl Ki67 positiver, proliferierender Zellen signifikant höher in Nieren von *Ink4a*^{-/-}-Mäusen nach I/R verglichen mit Wildtypnieren. Parallel dazu zeigen die *Ink4a*^{-/-}-Nieren eine bessere Nierenfunktion und weniger tubuläre Atrophie sowie interstitielle Fibrose (Braun *et al.*, 2012).

Um altersabhängige Unterschiede der Proliferationskapazität im Tubulusepithel ohne den Einfluss massiver Gewebeschäden zu untersuchen, kann im Tiermodell ein Proliferationsreiz auch durch Gabe von Bleiacetat als mitogenes Agens ausgelöst werden (Choi *et al.*, 1972).

1.4.2 p53-abhängige Seneszenz in der Niere

Im Menschen ist die Telomerlänge mit der Lebensspanne und der Regenerationsfähigkeit von Organen als Antwort auf Stressoren verknüpft (Blasco, 2007). Im Gegensatz zu den Nagern verkürzen sich beim Menschen die Telomere nicht nur in allen getesteten Geweben inklusive der Niere, sondern zeigen auch bei altersabhängigen Krankheitsbildern eine gesteigerte Verkürzung (Westhoff *et al.*, 2010). In der humanen Niere verkürzen sich die Telomere mit dem Alter stärker im Cortex als in der Medulla und insgesamt liegt die Rate zwischen hochproliferativen Zellen wie Lymphozyten und wenig proliferierendem Gewebe wie dem Gehirn oder der Muskulatur (Melk *et al.*, 2000). Eine kritische Verkürzung bzw. Dysfunktion der Telomere aktiviert den p53-Seneszenzweg. Hierbei findet sich wegen fehlender Spezifität des auslösenden Signals jedoch keine Korrelation zwischen Länge und Expression. Weiterhin wurde in der menschlichen Niere keine Korrelation zwischen der Telomerlänge und der renalen Funktion gefunden und der Nachweis eines Zusammenhangs zwischen Telomerlänge und renaler Regenerationsfähigkeit fehlt im humanen System. Sowohl Telomerverkürzung als auch die Aktivierung des p53-Seneszenzweges wurde jedoch in Tiermodellen nach I/R beobachtet (Melk *et al.*, 2000; Naesens, 2011).

In einem tierexperimentellen Alterungsmodell, der *Terc*^{-/-}-Maus, ist die Neusynthese der Telomere durch den Knockdown der essentiellen Telomerase RNA-Komponente blockiert. In höheren Generationen führt diese auch in den Keimzellen stattfindende sukzessive Telomerverkürzung bereits bei jungen Tieren zu einem Altersphänotyp. Einen Zusammenhang zwischen Telomerverkürzung und Nierenregenerationsfähigkeit stellen I/R-Experimente mit *Terc*^{-/-}-Mäusen her, deren Telomere in der 4. Generation (G4) die beim Menschen auftretende Telomerverkürzung nachempfinden. G4-Nieren zeigen signifikant mehr akuten tubulären Schaden und entwickeln signifikant mehr interstitielle Fibrose als Wildtypnieren (Schildhorn *et al.*, 2015; Westhoff *et al.*, 2010).

Eine toxische Schädigung des Tubulusepithels durch AA aktiviert ebenfalls den p53-Seneszenzweg. Das Signal für die gesteigerte Expression von p53 erfolgt wahrscheinlich unter anderem über die DDR-Signalwege mit subsequenter Aktivierung von p21^{CIP1} (Romanov *et al.*, 2015).

Sowohl die p53 als auch die p16^{INK4a} vermittelte Seneszenz ist somit ein potenzielles Ziel für Senotherapien bei Nierenerkrankungen, zunächst im Tiermodell, aber auch im humanen System.

1.5 Senotherapien

Das vermehrte Auftreten von seneszenten Zellen, bezeichnet als SNCs (Senescent Cells), in Geweben mit altersbedingten Erkrankungen wird mittlerweile in vielen Studien beobachtet, allerdings belegen nur wenige Studien bislang einen kausalen Zusammenhang (Childs *et al.*, 2017).

Zur Erforschung, ob die SNCs im jeweiligen Krankheits- und Organ-spezifischen Kontext eine physiologisch negative und/oder positive Funktion in Bezug auf den Heilungsprozess haben oder nur eine Folgeerscheinung einiger Erkrankung sind, können im Tierversuch SNCs bereits selektiv aus Geweben entfernt und der Effekt untersucht werden.

Eine dieser als Senolyse bezeichneten Methoden nutzt transgene Mäuse (INK-ATTAC; Apoptosis through targeted activation of caspase), die ein FKBP-Casp8-Fusionsprotein (FK506 binding protein-Caspase 8) unter der Kontrolle eines $p16^{INK4a}$ Promotor-Fragments exprimieren. Bei Aktivierung des $p16^{INK4a}$ Signalweges wird in diesen Zellen auch FKBP-Casp8 produziert und der programmierte Zelltod kann jederzeit über systemische Gaben der synthetischen Substanz AP20187 eingeleitet werden. AP20187 dimerisiert das Fusionsprotein, was die Aktivierung der Caspase 8 und somit die Apoptosekaskade auslöst. Bei Mäusen, bei denen im Alter von 12 Monaten mit der Behandlung begonnen wurde, wurde sowohl eine Verlängerung der Gesundheits- als auch der Lebensspanne beobachtet verglichen mit Mäusen bei denen während des physiologischen Alterungsprozesses $p16^{INK4a}$ in den Geweben akkumuliert. Die Nieren der mit AP20187 behandelten Mäuse zeigten zudem weniger Glomerulosklerose (Baker *et al.*, 2016).

Auch für den p53 Signalweg sind bereits senolytische Interventionen beschrieben: Durch die Gabe des DRI (D-Retro Inverso)-modifizierten Peptids FOXO4-DR1 wird die FOXO4/p53-Interaktion gestört und p53 vermittelte Apoptose findet statt. In natürlich gealterten Mäusen hatte die senolytische Therapie einen positiven Effekt auf die renale Filtrationsleistung. Medikamente aus der Gruppe der DRI-modifizierten Peptide werden bereits in klinischen Studien z.B. zur Tumorbehandlung eingesetzt (Baar *et al.*, 2017).

Das komplette Eliminieren von seneszenten Zellen ist für die Grundlagenforschung ein wichtiger Baustein, um zellbiologische Zusammenhänge weiter aufzuklären. Die Übertragung auf das humane System für therapeutische Zwecke birgt jedoch viele Herausforderungen. Zum Beispiel sind Genmanipulationen am Menschen kritisch und auch die Rolle und Notwendigkeit der Seneszenz für physiologische Vorgänge wie Wundheilung oder Tumorsuppression darf nicht unbeachtet bleiben.

Neben senolytischen gibt es auch eine Reihe von senostatischen Ansätzen, um die negativen Effekte der zellulären Seneszenz zu reduzieren. Dabei werden jeweils nur Teile des seneszenten Phänotyps Ziel der Interventionen, wie z.B. die Störung des SASP durch pharmakologische Inhibitoren des JAK/STAT Signalweges (Xu *et al.*, 2015) oder auch durch RNAi (Ribonucleic acid Interference)-vermittelten Knockdown des SASP regulierenden alternativen Splicingfaktors PTBP1 (Georgilis *et al.*, 2018). Derartige Interventionen sind nicht unumkehrbar und damit im humanen System einsetzbar und teilweise bereits eingesetzt.

RNA-Interferenz mit dem p16^{INK4a}- und dem p53 Signalweg als transiente Störung der zellulären Seneszenz in renalen Tubuluszellen ist unter anderem Gegenstand dieser Arbeit.

1.5.1 RNA Interferenz

Das Phänomen der epigenetischen Genregulation durch kleine RNAs wurde in den 1990er Jahren zunächst in Pflanzen (Napoli *et al.*, 1990) und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1991), später auch in weiteren Organismen wie dem Zebrafisch *Danio rerio* (Wargelius *et al.*, 1999), der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Kennerdell und Carthew, 1998) und Säugerzellen (Wianny und Zernicka-Goetz, 2000) entdeckt und RNA-Interferenz (RNAi) genannt. In *Drosophila* fungiert die RNA-Interferenz zum Beispiel als Virusabwehr. Seitdem wurden verschiedene Effektor-RNAs und ihre Wirkmechanismen klassifiziert.

Bei dem Mechanismus der siRNA-vermittelten (small interfering RNA) Interferenz stören kleine doppelsträngige, ~20-30 Nukleotide (nt) lange RNA-Moleküle mit zielspezifischen Sequenzen eine Zielgenexpression auf posttranskriptionaler Ebene (Abb. 6).

Der generelle Mechanismus beinhaltet einen Initiatorschritt, bei dem lange doppelsträngige RNA (dsRNA) von dsRNA-bindenden Proteinen wie RDE-4 in *C. elegans* und R2D2 in *Drosophila* erkannt und mit dem Protein Dicer in Kontakt gebracht wird (Liu *et al.*, 2003; Tabara *et al.*, 2002). Die Nuklease Dicer ist ein hochkonserviertes Mitglied aus der RNase III-Familie und wurde in diversen Organismen von der Hefe bis zur murinen und humanen Zelle nachgewiesen (Bernstein *et al.*, 2003; Hutvagner *et al.*, 2001; Volpe *et al.*, 2002).

Dicer spaltet die langen dsRNAs in kurze dsRNAs (~21-23 nt) mit überhängenden 3'-Enden (= siRNAs) (Blaszczyk *et al.*, 2001). Während eines Effektorschritts wird die Ziel-RNA von dem Ribonucleoproteinkomplex RISC (RNA-Induced Silencing Complex) degradiert, der als minimale Komponenten die siRNA in Verbindung mit einem Argonautenprotein enthält (Hammond *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2005).

Argonautenproteine sind ebenfalls hochkonserviert und besitzen eine RNA-bindende Domäne und eine Domäne mit Endonukleaseaktivität (Cerutti *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2003). Die siRNA sorgt über die sequenzabhängige Bindung an die Ziel-RNA für die Spezifität der endonukleolytischen Spaltung (Hammond *et al.*, 2000).

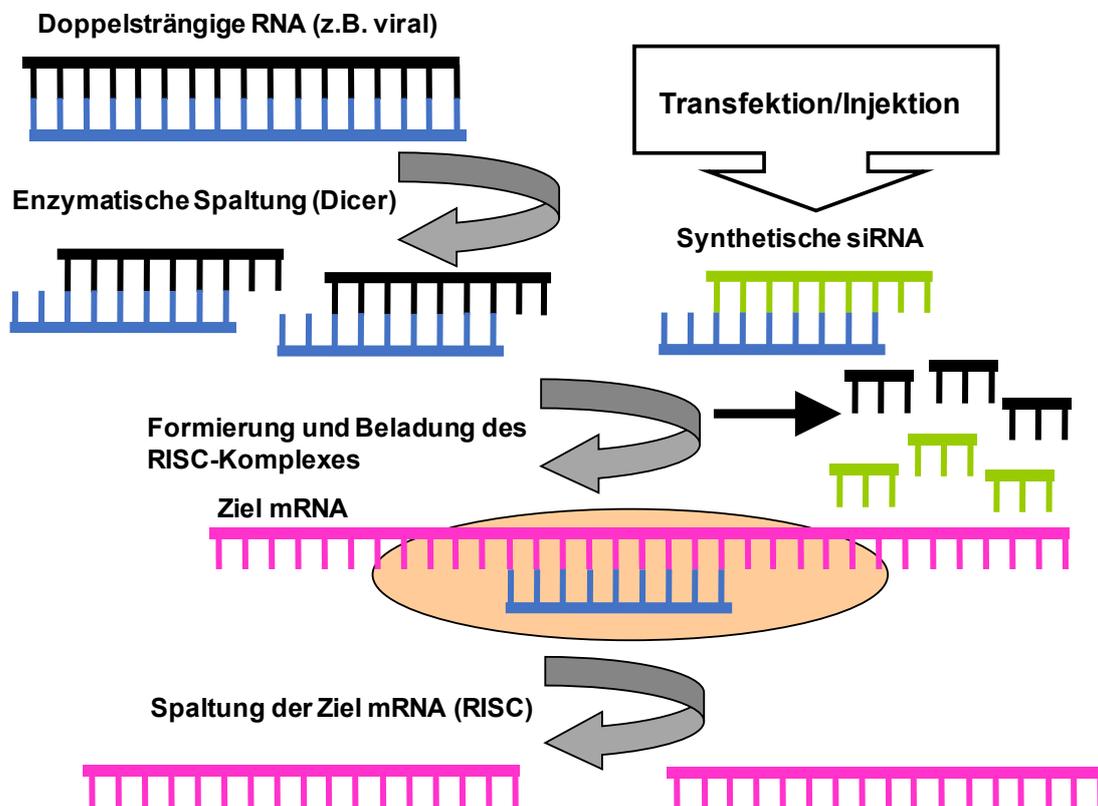


Abb. 6 Schematische Darstellung der RNA-Interferenz

Die Nutzung der siRNA zur spezifischen Manipulation von Genexpression geht über Forschungsanwendungen in Zellkultur und Tiermodell bereits weit hinaus: Derzeit laufen ca. 20 klinische Studien mit miRNA- und siRNA-basierten Therapeutika und zahlreiche Patente sind angemeldet. Die Einsatzbereiche umfassen unter anderem die Virusabwehr und Krebsbekämpfung. Zielorgane sind z.B. das Auge, der Respirationstrakt und auch die Niere (Chakraborty *et al.*, 2017).

1.5.2 siRNA als Therapeutikum für seneszente renale Tubuluszellen

Das therapeutische Werkzeug siRNA bietet einige Vorteile wie z.B. das verhältnismäßig einfache, aber individuell spezifische Design gegen eine Vielzahl verschiedener Zielsequenzen, die transiente Wirkung im Zytoplasma sowie im Kern und die vergleichsweise geringe Toxizität des Nukleotidmetabolismus. Demgegenüber stehen Herausforderungen wie eine vorzeitige Degradation und die Aufnahme ausschließlich in den gewünschten Zelltyp. Chemische

Modifikationen können die Degradation der siRNA hinauszögern und verschiedene Aufnahmevehikel das Einbringen in die Zelle ermöglichen. Während für die meisten Zelltypen ein Aufnahmevehikel notwendig ist, akkumuliert systemisch verabreichte, nackte siRNA vornehmlich in der Niere und wird mit dem Urin ausgeschieden (Kawakami und Hashida, 2007; Robb *et al.*, 2005).

Positive Resultate aus Experimenten mit systemisch verabreichter gegen das proapoptotische p53 gerichteter, fluoreszenzmarkierter siRNA in geschädigten Rattennieren bildeten eine Grundlage für humane klinische Studien mit p53 siRNA: Durch die Fluoreszenzmarkierung wurde nachgewiesen, dass die siRNA zunächst glomerulär filtriert und bereits 3 Minuten nach der systemischen Injektion fast ausschließlich von den proximalen Tubuluszellen endozytiert wird, aber nach 24 Stunden nahezu verschwunden ist. Weiterhin wurde die Wirksamkeit des Knockdowns in der durch I/R geschädigten Rattenniere dokumentiert, die unter RNAi-Therapie histologisch einen signifikant reduzierten akuten Tubulusschaden und signifikant weniger apoptotische Tubuluszellen zeigte (Molitoris *et al.*, 2009).

Derzeit wird der siRNA-basierte p53-Inhibitor namens QPI-1002 in verschiedenen klinischen Studienphasen für folgende Anwendungen getestet: Prophylaxe gegen AKI während kardiovaskulärer Operationen und gegen eine verzögerte Transplantatfunktion (DGF, Delayed Graft Function) nach Transplantation einer postmortal entnommenen Spenderniere. Erste Ergebnisse für die DGF-Anwendung zeigten unter siRNA-Therapie (Einzeldosis) eine reduzierte DGF-Rate sowie eine kürzere Dialyse-Dauer und -Frequenz. Signifikant verbessert war die Zeit für die erste Dialyse und die GFR (Glomerular Filtration Rate) an Tag 30 nach der Transplantation (Peddi *et al.*, 2014).

Bei diesen humanen und weiteren tierexperimentellen Studien mit p53 siRNA liegt der Fokus auf der Nutzung gegen den akuten Nierenschaden (Fujino *et al.*, 2013; Imamura *et al.*, 2010). Darüber hinaus zeigen Experimente an genetisch manipulierten Tieren bzw. der Einsatz von chemischen p53 Inhibitoren oder Stabilisatoren im Tierversuch bislang keine konsistenten Ergebnisse. Zu dem Zellzyklusinhibitor p16^{INK4a} sind zum Thema Seneszenz und Nierenerkrankung bislang keine siRNA-Studien veröffentlicht, sondern ausschließlich Daten von genetisch manipulierten Tieren.

Es besteht daher weiterer Forschungsbedarf zu dem potentiell therapeutischen Nutzen von p53 bzw. p16^{INK4a} siRNA, um den Beitrag von seneszenten Tubuluszellen zum Fortschreiten von Nierenerkrankungen zu verringern.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Zelluläre Seneszenz wird durch die zwei Hauptsignalwege mit ihren Schlüsselproteinen p16^{INK4a} und p53 vermittelt (Campisi und d'Adda di Fagagna, 2007).

Während des natürlichen Alterungsprozesses, aber auch durch Stressfaktoren wie I/R, akkumulieren senescente für das Markerprotein p16^{INK4a} positive Zellen in der Niere (Braun *et al.*, 2012; Melk *et al.*, 2004). Der p16^{INK4a}-Signalweg ist mit Transplantatnephropathie assoziiert und Mäuse, die mit *Ink4a*^{-/-}/*Arf*^{-/-}-Nieren transplantiert wurden, haben eine signifikant verbesserte Überlebensrate (Braun *et al.*, 2012). Sowohl eine Telomerverkürzung als auch die Aktivierung des p53-Seneszenzweges wurde in Tiermodellen nach I/R beobachtet (Melk *et al.*, 2000; Naesens, 2011).

Zum einen befinden sich senescente Zellen im Zustand des Zellzyklusarrestes und sind damit unfähig zu proliferieren, zum anderen sezernieren sie diverse Faktoren, die die Organhomöostase beeinflussen (Rodier und Campisi, 2011). Zelluläre Seneszenz könnte somit einen allgemeinen Mechanismus darstellen, durch den Alter, aber auch Stressfaktoren die regenerative Kapazität der Niere erschöpfen.

Ein Ziel dieser Arbeit war die weitere Analyse der zellulären Seneszenz versus der Proliferationskapazität speziell in renalen Tubuluszellen verschiedener Alterungsmodelle sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Dazu wurde *in vivo* der Einfluss eines mitogenen Agens auf die Proliferationskapazität der Niere verschieden alter Mäuse untersucht. *In vitro* wurde die renale Tubuluszellkultur standardisiert und Seneszenz- und Proliferationsmarker in Kulturen von verschieden alten bzw. genetisch veränderten (*Ink4a*^{-/-} und *Terc*^{-/-}) Mäusen verglichen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Evaluation der Hypothese, dass das Ausschalten der Seneszenzsignalwege in der Niere *in vivo* zu einer verminderten Nierenschädigung bzw. zu verbesserter Regeneration führt. Es wurde die RNA-Interferenz als Interventionsstrategie gewählt und *in vitro* zunächst jeweils eine effiziente siRNA Sequenz für den transienten Knockdown von p16^{INK4a} und p53 etabliert. Der Effekt systemischer Gaben jeweils einer der siRNAs sowohl auf das Ausmaß der Nierenschädigung als auch auf verschiedene Marker wurde dann *in vivo* mit zwei verschiedenen Schadensmodellen (I/R und AA-Intoxikation) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kommerzielle Reagenzien

Tabelle 1 Reagenzien, Enzyme, Medikamente

Reagenzien, Enzyme, Medikamente	Firma
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
10x PCR- Puffer (ohne MgCl ₂) (Polymerase Chain Reaction)	R. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-βD-galactopyranoside (X-Gal)	Peqlab Ltd., Fareham, GB
Accutase	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Acrylamid/Bis Lösung (37.1:1) 30 %	Bio-Rad, Hercules, USA
Amersham™ ECL™	GE Healthcare, Chicago, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, Hercules, USA
Anilinblau-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aprotinin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua ad iniectabilia	B Braun, Melsungen, D
Aristolochiasäuren	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Benzamidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Biebrich´s Scharlachfuchsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bleiacetat	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, D
Bouinsche Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA (Bovine Serum Albumine)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, Hercules, USA
Bromphenolblau	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
BSA (Albumin Fraktion V)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Citronensäuremonohydrat (C ₆ H ₈ O ₇) x H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, D
Collagenase I	usb, Cleveland, USA
cOmpete, Mini	Roche, Basel, CH

Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 1	
Reagenzien, Enzyme, Medikamente	Firma
dNTPs (Desoxyribonucleosidtriphosphat; jedes dNTP 10 mM)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
DAB (Diaminobenzidin)	Dako Cytomation GmbH, Glostrup, DK
DEPC (Diethylpyrocarbonat) Treated Water	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
di-Natriumhydrogensphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
dNTPs (jedes dNTP 10 mM)	R. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, D
Eosin	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Essigsäure	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Ethanol	Merck KgaA, Darmstadt, D
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
EGTA (Ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Eukitt®	O. Kindler GmbH, Freiburg, D
FastStart <i>Taq</i> Polymerase (<i>Thermus aquaticus</i>)	R. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
FCS (Fetal Calf Serum)	Biowest, Nuaille, F
First-Strand Buffer (5x)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Fischhautgelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd 37 % (Formalin)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Gill's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glutaraldehyd	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Hämatoxylin Indikator	Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH, Seelze, D
Isofluran	Baxter, Deerfield, USA

Fortsetzung Tabelle 1	
Reagenzien, Enzyme, Medikamente	Firma
Kaliumferricyanid ($K_3[Fe(CN)_6]$)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Kaliumferrocyanid ($K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Ketamin Gräub	aniMedica GmbH, Senden-Bösensell, D
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lipofectamine [®] RNAiMAX	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
LTL (Lotus tetragonolobus Lectin)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) Stocklösung	R. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Mayer's Hämatoxylin	MORPHISTO GmbH, Frankfurt a. M., D
Medium M199	gibco by life technologies, Carlsbad, USA
Metamizol (Novalgin)	Ratiopharm
Methanol	Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, USA
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
M-MLV-Reverse Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
NaCl-Lösung (0,9 %ige steril)	B Braun, Melsungen, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($NaH_2PO_4 \times H_2O$)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumjodat ($NaIO_3$)	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N, N-Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad, Hercules, USA
Nonidet P-40	BioVision, Inc., Milpitas, USA

Material und Methoden

Fortsetzung Tabelle 1	
Reagenzien, Enzyme, Medikamente	Firma
Opti-MEM® I	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Paraffin	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	PAA Laboratories Inc., Etobicoke, Can
Perjodsäure	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS-Lösung steril (Phosphate buffered saline; Kinderklinik)	Zentralapotheke MHH, Hannover, D
Phosphomolybdänsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphorwolframsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pikrinsäurelösung (wässrig, gesättigt)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein™ Standards	Bio-Rad, Hercules, USA
Random Primers (Hexamer)	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
REGM (Renal Epithelial Cell Growth Medium)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
RNAasin®	Promega, Madison, USA
Rompun 2 %	Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Schiff's Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Siriusrot (Direct red 80)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Stickstoff (l)	Linde AG, Pullach, D
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt, D
SuperSignal® Chemiluminescent Substrate	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
SYBR Green	R. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
TaqMan® Universalmastermix	appliedbiosystems, Waltham, USA
Tissue-Tek® O.C.T Compound	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Merck KGaA, Darmstadt, D

Fortsetzung Tabelle 1	
Reagenzien, Enzyme, Medikamente	Firma
Universal blocking reagent (Power Block)	Biogenex, Fremont, USA
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Xylol-Ersatz (HistoClear)	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 2 Assays und Kits

Reagenzkit	Firma
RNeasy Micro Kit	QIAGEN, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, D
<i>Cdkn2b</i> p15INK4b (Mm00483221_m1)	appliedbiosystems, Waltham, USA
HPRT1 (Hs01003267_m1) (Hypoxanthin-Guanin- Phosphoribosyltransferase)	appliedbiosystems, Waltham, USA
<i>CDKN1A</i> p21CIP1 (Hs00355782_m1)	appliedbiosystems, Waltham, USA
In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein (TUNEL-Färbung; Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling)	R. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Trichrome Stains (Masson)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) Labeling and Detection Kit I	R. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
SYBR [®] Green	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Picrosiriusrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.2 Reagenzien aus eigener Herstellung

Tabelle 3 Lösungen für Immunhistochemie (IHC), Immunfluoreszenz (IF), Western Blots (WB)

IF Zellkultur	IHC/IF Paraffin	WB
<u>100 ml:</u>	<u>100 ml:</u>	<u>100 ml:</u>
100 ml PBS	0,05 ml Tween® 20	0,05 ml Tween® 20
Optionale Bestandteile:	ad 100 ml PBS	ad 100 ml TBS
<u>Blocken:</u>	Optionale Bestandteile:	Optionale Bestandteile
0,5-2 g BSA	<u>Blocken:</u>	<u>Blocken:</u>
0,2 g Fischgelatine	5 g Milchpulver	5 g Milchpulver
2 ml FCS	in 100 ml Lösung	in 100 ml Lösung
<u>Permeabilisieren/Waschen</u>		
0,1-0,5 ml Triton™X-100		
0,05-0,2 ml Tween® 20		
jeweils in 100 ml Lösung		

Tris-Puffer

Tabelle 4: Tris-Puffer Rezepte

0,5 M Tris-HCl	1 M Tris-HCl	1,5 M Tris-HCl	TBS
<u>pH 6,8</u>	<u>pH 8</u>	<u>pH 6,8/8,8</u>	<u>pH 7,4</u>
200 ml:	200 ml:	200 ml:	1 l:
12,114 g Tris	24,23 g Tris	36,34 g Tris	12,1 g Tris
			87,65 g NaCl
Einstellen des pH-Wertes mit konz. HCl			
ad 200 ml mit destilliertem Wasser	ad 200 ml mit destilliertem Wasser	ad 200 ml mit destilliertem Wasser	ad 1 l mit destilliertem Wasser

Mowiol Eindeckmedium

10 g Mowiol in 40 ml PBS lösen, 24 h bei RT stehen lassen

20 ml Glycerol zugeben, wieder 24 h bei RT stehen lassen

Bei 400 U/min für 15 min zentrifugieren, nur den Überstand verwenden.

Mayer's Hämatoxylin:

1 g Hämatoxylin in 1 l destilliertem Wasser lösen

0,2 g Natriumjodat hinzufügen

50 g Kaliumaluminiumsulfat-12-hydrat dazugeben (p.a.) und auf 50-60 °C erwärmen

Nach dem Erkalten 50 g Chloralhydrat und 1 g kristallines Citronensäuremonohydrat dazugeben und lösen, danach filtrieren.

Picrosiriusrot-Färbelösung:

0,5 g Siriusrot (Direct Red 80)

in 500 ml gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung (1,3%ig) lösen

0,01 M Citrat-Puffer pH 6

2,1 g Citronensäuremonohydrat

900 ml destilliertes Wasser

mit 2 M NaOH auf pH 6 einstellen (ca. 13 ml)

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

PBS für Färbungen

3,08 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat

14,37 g di-Natriumhydrogensphosphat-Dihydrat

in 1 l destilliertem Wasser lösen

4 % gepuffertes Formalin (pH 7,3)

108 ml frisch filtrierte 37 %ige Formaldehydlösung

892 ml PBS für Färbungen

20 % SDS

20 g SDS

100 ml destilliertes Wasser

4x Lämmli-Puffer

1,34 ml Tris-HCl-Puffer (1.5 M pH 6,8)

3,2 ml SDS-Lösung (20 %ig)

2 ml Glycerol

1,6 ml β -Mercaptoethanol

40 μ l Bromphenolblau (1 %ig)

1,82 ml destilliertes Wasser

1x SDS-Lauf-Puffer

3,03 g Tris

14,4 g Glycin

1 g SDS

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

1x Transfer-Puffer

3,03 g Tris

14,4 g Glycin

200 ml Methanol

1 ml SDS (20 %ig)

mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

1 % Bromphenolblau

100 mg Bromphenolblau

mit destilliertem Wasser auf 10 ml auffüllen

RIPA-Puffer

0,88 g NaCl

1 ml Nonidet P-40

0,5 g Desoxycholsäure

0,5 ml 20 % SDS

5 ml Tris-HCl-Puffer (1 M pH 8.0)

mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen

- direkt vor Gebrauch 1 Tablette cOmplete, Mini /10 ml RIPA-Puffer zugeben -

Kalter Lyse-Puffer

2 ml Tris-HCl-Puffer (1 M, pH 8.0)

0,88 g NaCl

84 mg NaF

1 ml Triton™X-100

74 mg EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O$)

38 mg EGTA ($C_{14}H_{24}N_2O_{10}$)

18 mg Na_3VO_4

mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen

- direkt vor Gebrauch Proteaseinhibitoren zugeben: 1 mM PMSF, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 3 mM Benzamidin -

10x SYBR-Mastermix

900 µl PCR-Puffer (ohne $MgCl_2$)

750 µl $MgCl_2$

90 µl dNTPs

90 µl Tween® 20 (0,1 %ig in RNase freiem H_2O)

45 µl 10x SYBR Green

2,4 ml RNase freies H_2O

Fixativ für die SA-β-Galaktosidase-Färbung

5,4 ml 37 %iges Formalin

0,2 ml Glutaraldehyd

94,4 ml PBS

0,1 M Citronensäurelösung

21,01 g Citronensäuremonohydrat

1 l destilliertes Wasser

0,2 M Natriumphosphatlösung

35,6 g di-Natriumhydrogensphosphat-Dihydrat

1 l destilliertes Wasser

0,2 M Citronensäure/Natriumphosphat-Puffer

36,85 ml 0,1 M Citronensäurelösung

63,15 ml 0,2 M Natriumphosphatlösung

SA-β-Galaktosidase-Färbe-Puffer

200 ml 0,2 M Citronensäure/Natriumphosphat-Puffer

8,76 g NaCl

2,1 g MgCl₂

800 ml destilliertes Wasser

Die Lösung muss einen pH-Wert von 6 haben.

100x SA-β-Galaktosidase-Färbelösung Supplement A

1,84 g Kaliumferrocyanid

10 ml destilliertes Wasser

100x SA-β-Galaktosidase-Färbelösung Supplement B

1,65 g Kaliumferricyanid

10 ml destilliertes Wasser

X-Gal-Lösung

0,2 g 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-βD-Galactopyranosid

10 ml N, N-Dimethylformamid

SA-β-Galaktosidase-Färbelösung ph 6

930 µl SA-β-Galaktosidase-Färbe-Puffer

10 µl 100x SA-β-Galaktosidase-Färbelösung Supplement A

10 µl 100x SA-β-Galaktosidase-Färbelösung Supplement B

50 µl X-Gal-Lösung

Tabelle 5 SDS-Gele für Western Blots

SDS-Gel für Western Blots	Laufgel	Sammelgel
	[ml]	[ml]
	10 %ig/15 %ig	5 %
30 % Acrylamid Mix	6,6/10	1,7
Tris HCl (1,5 M pH 8,8)	5/5	
Tris HCl (0,5 M pH 6,8)		2,5
destilliertes Wasser	8,2/4,8	5,7
APS (0,1 g/ml)	0,1/0,1	0,05
TEMED	0,01/0,01	0,01
10 % SDS	0,2/0,2	0,1

Zunächst wird das Laufgel zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und nach dessen Polymerisation das Sammelgel darüber gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach der Polymerisation wird der Kamm entfernt und das Gel kann beladen werden.

2.1.3 Antikörper für Immunoassays

Tabelle 6 Primär- und Sekundärantikörper

Antigen, Bestellnummer, (Klon)	Firma
Cleaved Caspase 3, 9664	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Cyclin D1, sc-20044 (DCS-6)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Cyclin D1, RM-9104 (SP6)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
E-Cadherin, sc-7870 (H-108)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
E-Cadherin, 3195 (24E10)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
S100A4, A5114	Dako Cytomation GmbH, Glostrup, DK
Ki67, MA5-14520 (SP6)	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Ki67, M7240 (MIB-1)	Dako Cytomation GmbH, Glostrup, DK
Ki67, M7248 (MIB-5)	Dako Cytomation GmbH, Glostrup, DK
p16 ^{INK4a} , sc-1207	Santa Cruz, USA Santa Cruz Biotechnology
p53, 2524 (1C12)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Lamin B1, 9087	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
pan Cytokeratin, sc-15367 (H-240)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
γ- H2A.X, 05-636	EMD Millipore, Burlington, USA
β-Actin, 82618	Abcam, Cambridge, UK
CD31, sc-376764 (H-3)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Fortsetzung Tabelle 6	
Antigen, Bestellnummer, (Klon)	Firma
eNOS (Endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase), 9572	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
CD45	BD Pharmingen, San Diego, USA
Aqp-2 (Aquaporin-2), 85876	Abcam, Cambridge, UK
F4/80, MCA497	AbD Serotec, Kidlington, UK
p21, 556431	BD Pharmingen, San Diego, USA
α -SMA (α -Smooth Muscle Actin), A5228	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), G9545	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
vWF (von Willebrand-Faktor), sc-14014	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
ZO-1 (Zonula Occludens-1), 40-2200	Invitrogen, Carlsbad, USA
Maus IgG (Immunglobulin), HRP (Horseradish Peroxidase), 7076	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Kaninchen IgG, HRP, 7074	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Ziege IgG, FITC (Fluoresceinisothiocyanat), sc-2024	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Kaninchen IgG, Alexa Fluor 555, A21428	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kaninchen IgG, Alexa Fluor® 555, A31572	Invitrogen, Carlsbad, USA
Maus IgG, Alexa Fluor® 555, A21422	Invitrogen, Carlsbad, USA
Maus IgG, Alexa Fluor® 488, A11001	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kaninchen IgG, Alexa Fluor® 488, A21206	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kaninchen IgG, HRP (Envision)	Dako Cytomation GmbH, Glostrup, DK
Maus IgG, HRP (Envision)	Dako Cytomation GmbH, Glostrup, DK

2.1.4 Oligonukleotide

Tabelle 7 siRNA Sequenzen

Ziel Protein	Sequenz 5' → 3 Sinnstrang/Gegensinnstrang
p16 ^{INK4a}	[mC] [mA]UGACGUGCGGGCACUGCUGGAAG/ C[mU]UCCAGCAG[mU]G[mC]CCGCACGUC[mA]U[mG][mC] [mA]
p53	Cy3-[mC][mC] [mA]CUACAAGUACAUG[mU][mG][mU][dT][dT]/ ACACAUGUACUUGUAGUGG[dT][dT]
p53	[mC][mC] [mA]CUACAAGUACAUG[mU][mG][mU][dT][dT]/ ACACAUGUACUUGUAGUGG[dT][dT]
Negative Kontrolle siRNA Produktnr. SIC002 (Sequenz nur dem Hersteller bekannt)	

Bezugsquelle der siRNAs: Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 8 Primer und Sonden für die TaqMan® PCR

<i>mRNA</i> (Name des Proteins)	Sequenz 5' → 3'
<i>Hprt</i> (HPRT):	
Vorwärtsprimer	TGA CAC TGG TAA AAC AAT GCA AAC T
Rückwärtsprimer	AAC AAA GTC TGG CCT GTA TCC AA
Sonde*	TTC ACC AGC AAG CTT GCA ACC TTA ACC
<i>Cdkn2a</i> (p16^{INK4a}):	
Vorwärtsprimer	GGG CAC TGC TGG AAG CC
Rückwärtsprimer	AAC GTT GCC CAT CAT CAT C
Sonde*	CCG AAC TCT TTC GGT CGT A
<i>Cdkn2a</i> (p19^{ARF}):	
Vorwärtsprimer	TCG TGA ACA TGT TGT TGA GGC TA
Rückwärtsprimer	GTT GCC CAT CAT CAT CAC CTG
Sonde*	CGG TGC GGC CCT CTT CTC AAG ATC
<i>Cdkn1a</i> (p21^{CIP1}):	
Vorwärtsprimer	CAG CCA CAG GCA CCA TGT C
Rückwärtsprimer	ACG GCG CAA CTG CTC ACT
Sonde*	ATG TCC GAC CTG TTC CGC ACA GGA

Fortsetzung Tabelle 8	
<i>mRNA</i> (Name des Proteins)	Sequenz 5' → 3'
<i>Trp53</i> (p53):	
Vorwärtsprimer	CCG ACC TAT CCT TAC CAT CAT CA
Rückwärtsprimer	AGG CAC AAA CAC GAA CCT CAA
Sonde*	CCA GAA GGT TCC CAC TGG AGT CTT CCA
<i>CDKN2A</i> (p16^{INK4a}):	
Vorwärtsprimer	CCA ACG CAC CGA ATA GTT ACG
Rückwärtsprimer	CAC TCG GGC GCT GCC
Sonde*	CAT GAC CTG GAT CGG CCT CCG A

*Die Sonde ist am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit Tetramethylrhodamin (TAMRA) gelabelt.

Tabelle 9 Primer für die SYBR® PCR

<i>mRNA</i> (Name des Proteins)	Sequenz 5' → 3'
<i>Lcn2</i> (NGAL):	
Vorwärtsprimer	TGA AGG AAC GTT TCA CCC GCT TTG
Rückwärtsprimer	ACA GGA AAG ATG GAG TGG CAG ACA
<i>Havr1</i> (KIM-1):	
Vorwärtsprimer	AAA CCA GAG ATT CCC ACA CG
Rückwärtsprimer	GTC GTG GGT CTT CCT GTA GC
<i>Colla1</i> (Kollagen I):	
Vorwärtsprimer	TGT CCC AAC CCC CAA AGA C
Rückwärtsprimer	CCC TCG ACT CCT ACA TCT TCT GA
<i>Col3a1</i> (Kollagen III):	
Vorwärtsprimer	TGG TCC TCA GGG TGT AAA GG
Rückwärtsprimer	GTC CAG CAT CAC CTT TTG GT
<i>Acta2</i> (α-SMA):	
Vorwärtsprimer	GTG CTA TGT AGC TCT GGA CTT TGA
Rückwärtsprimer	ATG AAA GAT GGC TGG AAG AGG GTC
<i>Actb</i> (β-Actin):	
Vorwärtsprimer	AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC
Rückwärtsprimer	CTC TCA GCT GTG GTG GTA A

Bezugsquelle der Primer und Sonden aus Tabelle 8 und 9: MWG-Biotech, Ebersberg, D

2.1.5 Gebrauchsmaterialien und sonstiges Zubehör

Tabelle 10 Gebrauchsmaterialien und sonstiges Zubehör

Gebrauchsmaterial/Zubehör	Firma
Deckgläschen	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Einbettkassetten	MEDITE GmbH, Burgdorf, D
EinbettSchälchen (Cryomold)	Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, USA
Färbekammern	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, D
Faltenfilter	GE Healthcare, Chicago, USA
Filme für Chemilumineszenz	GE Healthcare, Chicago, USA
Filmkassetten	GE Healthcare, Chicago, USA
Gefäßklemme	Aesculap AG, Tuttlingen, D
Infusionsschlauch	B Braun, Melsungen, D
Kanülen	B Braun, Melsungen, D
Messpipetten	SARSTEDT, Nümbrecht, D
Mikrotomklingen	Leica, Wetzlar, D
Nahtmaterial	Ethicon, Bridgewater/Cincinnati, USA
Objektträger	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
PCR Gefäße	SARSTEDT, Nümbrecht, D
PCR Platten/Streifen	appliedbiosystems, Waltham, USA
Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
QIAshredder Säulen	QIAGEN, Venlo, NL
Reagiergefäße, Röhrchen, Pipettenspitzen	SARSTEDT, Nümbrecht, D
Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, D
Sieb 40 µm (Cell Strainer)	BD, Franklin Lakes, USA
Skalpelle-Klingen	Feather® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Jp
Spritzen	B Braun, Melsungen, D
Spritzenvorsatzfilter	SARSTEDT, Nümbrecht, D
Stahlkugeln 5 mm	QIAGEN, Venlo, NL
Transfer Membranen PVDF (Polyvinylidene difluoride)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Whatman Papier	GE Healthcare, Chicago, USA
Zellkulturplatten	greiner bio-one, Kremsmünster, AT

2.1.6 Geräte

Tabelle 11 Geräte

Gerät	Firma
ABI PRISM 7700/7900HT Real Time Gerät	appliedbiosystems, Waltham, USA
Anaesthesieeinheit (Isofluran)	Univentor, Zetjun, MT
Aquariumpumpe Elite 802	KG HAGEN Deutschland GmbH & Co.
Chirurgisches Mikroskop OP-M691	Leica, Wetzlar, D
Einbettsystem	Leica, Wetzlar, D
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Inkubator	BINDER GmbH, Tuttlingen, D
Kryostat	Leica, Wetzlar, D
Magnetrührer mit Heizfunktion	IKA [®] -Werke GmbH & CO.KG, Staufen, D
Mikroskop DM LB2 mit Kamera DFC320	Leica, Wetzlar, D
Mikroskop Zellkultur Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Mini PROTEAN [®] 3/Trans-Blot [®] System	Bio-Rad, Hercules, USA
NanoDrop [™] 2000	Peqlab Ltd., Fareham, GB
Pascal Dampfdruckkammer	Dako Cytomation, Glostrup, DK
pH-Meter	METTLER TOLEDO, Columbus, USA
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, D
Real Time PCR Gerät Lightcycler 480	R. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Sicherheitswerkbank	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Stromgerät	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermocycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermoschüttler	HLC, Bovenden, D
Tischzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tissue Lyzer	QIAGEN, Venlo, NL
Vortex	Scientific Industries, Inc., New York, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Wärmetisch (Operationen) Haake C10	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
Wasserbad Paraffinschnitte	MEDAX GmbH & Co KG, Neumünster, D
Zentrifuge	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

2.1.7 Software

Tabelle 12 Software

Software	Firma
Word, Excel, Powerpoint	Microsoft, Redmond, USA
Photoshop	Adobe, San Jose, USA
GraphPad PRISM	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
ImageJ	Open Source
QWin/Leica Application Suite (LAS)	Leica, Wetzlar, D
AxioVision	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D

2.1.8 Versuchstiere

Für die Experimente wurden männliche Wildtyp (WT)- bzw. Knockout (-/-)-Mäuse eingesetzt, die unter Standardbedingungen gehalten und gezüchtet wurden (Details siehe Tabelle 13). Der C57BL/6 Mausstamm wurde und wird weltweit am meisten für Experimente genutzt und ist daher auch in der Nierenforschung ein häufig studiertes Modell mit zahlreichen zur Verfügung stehenden Daten. Bei den *Terc*^{-/-} Mäusen wurde das *Terc*-Gen ausgeknockt, in höheren Generationen wie z.B. G3 führt dies zu einer robusten Telomerverkürzung (Blasco *et al.*, 1997). Die *Ink4a*^{-/-}-Mäuse (freundlicherweise für die Zucht zur Verfügung gestellt von Dr. A. Berns; The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam) tragen eine Punktmutation, die zum Verlust des p16^{INK4a} Proteins und damit zu einem Ausfall des p16^{INK4a}-abhängigen Seneszenzweges führt (Krimpenfort *et al.*, 2001).

Tabelle 13 Detailinformationen zu den Versuchstieren

Experiment	Mausstamm	Tierlabor *	Alter **	Genotyp
Bleiacetat	C57BL/6	1	jung/alt	WT
Zellkultur	C57BL/6	1, 2	jung/alt	WT
	C57BL/6J <i>Terc</i> ^{-/-}	2	jung	<i>Terc</i> ^{-/-} G3
	129/Ola-C57BL/6J	2	alt	WT
	129/Ola-C57BL/6J <i>Ink4a</i> ^{-/-}	2	alt	<i>Ink4a</i> ^{-/-}
siRNA	C57BL/6	1, 2	jung	WT

* Phenos GmbH, Hannover (1), Zentrales Tierlabor MHH, Hannover (2)

** 3-6 Monate alt (jung) bzw. älter als 18 Monate (alt)

Die Nieren der Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) wurden mir freundlicherweise von der REBIRTH-Arbeitsgruppe Embryonic Stem Cells (Institut für Transfusionsmedizin der MHH) unter der Leitung von Dr. rer. nat. Thomas Müller zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Renale Ischämie-Reperfusion

Für die siRNA Behandlungen *in vivo* wurden sowohl akute als auch chronische Nierenschäden durch I/R erzeugt, um die Nierenregeneration nach der Störung eines Seneszenzweges zu untersuchen.

2.2.1.1 Operationstechnik

Die Tiere wurden mit einer Isofluran-Inhalationsnarkose (3 % Isofluran) auf einer körperwarmen Operationsfläche narkotisiert. Die intraoperative Analgesie erfolgte durch subkutane Injektion von Novaminsulfon-Injektionslösung (Dosis 5 mg/kg). Durch einen Schnitt in die linke Flanke wurde das Abdomen eröffnet und der linke Nierenstiel unter dem Mikroskop stumpf freipräpariert. Durch das Setzen einer nicht-traumatischen Klemme für 25 min auf den Nierenstiel wurde die Niere von der Blutzirkulation getrennt (Ischämie). Nach dem Entfernen der Klemme wurde die Wiederherstellung der Durchblutung (Reperfusion) der Niere visuell kontrolliert. Nach der Operation wurde die Wunde durch Nähte verschlossen. Zur postoperativen Analgesie wurden Novaminsulfon-Tropfen im Trinkwasser (Dosis 200 mg/kg) eingesetzt und der Zustand der Tiere wurde für 24 h postoperativ engmaschig kontrolliert. Es wurde jeweils nur die linke Niere einer 25-minütigen Ischämie ausgesetzt, die rechte Niere wurde unbehandelt *in situ* belassen, um ein möglichst langes postoperatives Überleben (maximal bis Tag 30) zu sichern.

Die Operationen wurden freundlicherweise von Dr. med S. Rong aus der Klinik für Nieren- und Hochdruckerkrankungen der MHH durchgeführt.

2.2.2 Blutentnahmen und Injektionen

Die Blutentnahmen mittels Herzpunktion erfolgten sofort nach der Tötung des Tieres durch Cervikaldislokation und vor der Organentnahme.

Die intravenösen Injektionen erfolgten entweder bei narkotisierten oder mechanisch fixierten Mäusen jeweils in die Schwanzvene. Dafür wurde der Schwanz kurz vorgewärmt, um die Venen besser sichtbar zu machen und dann die jeweilige Flüssigkeit zügig injiziert. Für intraperitoneale Injektionen wurde das mit der Hand fixierte Tier leicht kopfüber gehalten und die Injektion rechtsseitig im unteren Drittel des Abdomens appliziert. Ein Volumen von maximal 200 µl wurde nicht überschritten.

Das Serumkreatinin wurde freundlicherweise im Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Norbert Gretz gemessen.

2.2.2.1 Bleiacetat-Injektionen

Bei männlichen jungen und alten Mäusen (Wildtyp C57BL/6) mit einem Gewicht zwischen 28 und 35 g wurde einmalig Bleiacetat in der Dosis 10 mg/100 g Körpergewicht bzw. bei der Kontrollgruppe nur die Trägerflüssigkeit Aqua ad iniectabilia intravenös injiziert. Die Organentnahme erfolgte 36 Stunden nach der Bleiacetat- bzw. Kontroll-Injektion.

2.2.2.2 siRNA-Injektionen

Bei männlichen jungen Mäusen (Wildtyp C57BL/6) mit einem Gewicht zwischen 22 und 30 g wurde siRNA in der Dosis 1 nmol/g Körpergewicht bzw. bei der Kontrollgruppe nur die Kontrolle intravenös injiziert. Details zu den Versuchsgruppen und den Injektionszeitpunkten siehe Abb. 25, Abb. 27, Abb. 31, Abb. 36 und Abb. 43 im Ergebnisteil.

2.2.2.3 Aristolochiasäuren-Injektionen

Für die Erzeugung von Nierenschäden alternativ zur I/R wurden bei männlichen jungen Mäusen (Wildtyp C57BL/6) mit einem Gewicht zwischen 24 und 28 g einmalig AA in der Dosis 5 mg/kg Körpergewicht bzw. bei der Kontrollgruppe nur die Trägerflüssigkeit (DMSO) intraperitoneal injiziert.

2.2.3 Organentnahmen

Für die Organentnahme wurden die Mäuse mittels eines Isofluran-Sauerstoffgemisches (3 %) narkotisiert und anschließend durch Cervikaldislokation getötet. Nach dem Öffnen des Abdomens wurden die Nieren entnommen, gewogen, entkapselt und in Scheiben geschnitten. Repräsentative Stücke wurden sofort für mRNA- und Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für Paraffinschnitte wurden die repräsentativen Nierenstücke vor der Einbettung in Formalin bzw. Paraformaldehyd fixiert. Für Gefrierschnitte wurde das gegebenenfalls vorbehandelte Gewebe ebenfalls schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Aufarbeitung von Organen für die Mikroskopie

Gewebeproben werden nach der Entnahme zunächst chemisch oder durch Schockgefrieren konserviert, um die dynamischen Lebensprozesse zu unterbinden und die Strukturen möglichst unverändert zu erhalten. Anschließend können die für die gängigen mikroskopischen Analysen erforderlichen, sehr dünnen Schnitte präpariert werden.

2.2.4.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die Kombination aus Fixierung und Einbettung in eine Paraffinmatrix führt zu einer Stabilität des Gewebes, die es ermöglicht, sehr dünne Gewebeschnitte für eine optimale Lichtdurchlässigkeit anzufertigen.

2.2.4.1.1 Fixierungen für Paraffinschnitte

Bei der chemischen Fixierung finden komplexe chemische Reaktionen im Gewebe statt. Eine wichtige Reaktion ist die Ausbildung von Querverbindungen zwischen den Proteinen, die zum einen zu Strukturerthalt und Festigkeit des Gewebes und zum anderen zur Inaktivierung von degradierenden Enzymen führt. Fixierungsmittel wie Formalin, Paraformaldehyd (PFA) und Glutaraldehyd bewirken dabei eine besonders weitreichende Quervernetzung.

Nach der Organentnahme wurden die Gewebestücke in eine Kassette gelegt und für 24 h in frischem 4 %igem PBS-gepufferten Formalin bzw. PFA fixiert. Anschließend wurden die Kassetten in eine 70 %ige Ethanollösung überführt und bis zur Einbettung darin aufbewahrt.

2.2.4.1.2 Einbettung der Organe

Für die Anfertigung von dünnen Gewebeschnitten für die Mikroskopie haben sich Wachse, insbesondere das Paraffin, als Einbettungsmedium bewährt. Vor dem Durchdringen mit Paraffin muss dem Gewebe jedoch mit einer aufsteigenden Alkoholreihe und einem organischen Lösungsmittel das Wasser entzogen werden, was dem Gewebe jedoch auch die Lipide entzieht. Das in 70 %igem Ethanol gelagerte Gewebe wurde in die Entwässerungsstation überführt und durch aufeinanderfolgende Inkubationsschritte in 70 %igem (3 h), 80 %igem (1 h), 90 %igem (2 x 1 h), dann 100 %igem Ethanol (3 x 1 h) und schließlich Xylol (3 x 1,5 h) entwässert und anschließend mit Paraffin durchtränkt (2 x 2 h). Danach wurde auf der 60 °C warmen Arbeitsplatte eine bodenbedeckende Schicht flüssiges Paraffin in vorgewärmte Schälchen gegossen, das Gewebestück darauf platziert, das Schälchen mit flüssigem Paraffin aufgefüllt und der Deckel der Einbettkassette darübergerlegt. Die Gewebelöcke wurden auf Eis gekühlt, aus den Schälchen gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.4.1.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffin-Gewebe-Blöcke wurden vor dem Einspannen in das Mikrotom gekühlt. Die optimale Schnittfläche wurde durch Ausrichten und Trimmen des Blocks erreicht, bevor ca. 3 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt wurden. Die gerollten Schnitte wurden in einem warmen Wasserbad kurz entfaltet und daraus direkt auf einen Objektträger gezogen. Vor der Weiterverarbeitung wurden die Schnitte getrocknet und dann bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.4.2 Herstellung von Gefrierschnitten

Für bestimmte Fragestellungen wie z.B. der Analyse der SA-β-Galaktosidase-Aktivität oder der Cy3-Fluoreszenz im Gewebe sind Paraffinschnitte ungeeignet, alternativ kommen dann native oder vorbehandelte Gefrierschnitte zur Anwendung.

2.2.4.2.1 Fixierung und Stabilisierung für Gefrierschnitte

Bei Tissue-Tek[®] O.C.T Compound handelt es sich um ein Gemisch aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen. Es diente als Einbettmedium für Gewebestücke, von denen Gefrierschnitte angefertigt werden sollten. Das so eingebettete Gewebe wurde dann bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Analysen mit nativem Gewebe wurden die Gewebestücke vor dem Schockgefrieren in einem Schälchen mit Tissue-Tek[®] O.C.T[™] Compound bedeckt und dann auf flüssigen Stickstoff gesetzt.

Für einige Analysen ist es nicht ausreichend, das Gewebe nativ in Tissue-Tek[®] O.C.T[™] Compound einzubetten, sondern es muss vorher noch fixiert und/oder stabilisiert werden. Eine Möglichkeit der Gewebestabilisierung für eine bessere Schneidbarkeit ist das Durchtränken des Gewebes mit Sucrose: Dabei wurde das native Gewebe nach der Entnahme zunächst mindestens je 1 h in einer 15 %igen und dann in einer 30 %igen Sucroselösung inkubiert und erst anschließend mit Tissue-Tek[®] O.C.T[™] Compound umhüllt und schockgefroren. Bereits bei der Entnahme in Organen enthaltene Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. Cy3 müssen direkt nach der Organentnahme und vor dem Einfrieren des Organs im Gewebe schonend fixiert werden, damit die Fluoreszenz auch auf den späteren Gefrierschnitten noch detektiert werden kann. Das Gewebe wurde nach der Entnahme für 4 h bei RT in einem 4 % PFA-/0,5 % Glutaraldehydgemisch fixiert, dann über Nacht bei 4 °C mit einer 30 %igen Sucroselösung durchtränkt und anschließend mit Tissue-Tek[®] O.C.T[™] Compound umhüllt und schockgefroren.

2.2.4.2.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die Gefrierschnitte wurden mit Hilfe eines Kryostaten angefertigt. Hierbei handelt es sich um spezielle Mikrotome, mit denen das Gewebe bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt bearbeitet werden kann.

Zunächst wurden das Kryostat und das Gewebe auf die gewünschte Schneidetemperatur gebracht (für Nieren z.B. zwischen -13 und -20 °C). Das Gewebestück wurde mithilfe eines Tropfens Tissue-Tek® O.C.T™ Compound auf dem Gefriertisch festgefroren und grob getrimmt bis eine ebene Schneidefläche entstanden war. In der Feintriebeneinstellung und mit einem Streckplättchen zur Schnittabnahme wurden ca. 4-5 µm dicke Schnitte angefertigt. Durch das Annähern des wärmeren Objektträgers an den Schnitt sprang dieser auf den Objektträger über. Die fertigen Schnitte wurden entweder bei -80 °C gelagert oder fixiert und weiterverarbeitet.

2.2.5 Histologische Färbungen

Histologische Färbungen an Gewebeschnitten werden angewendet, um verschiedene Gewebe- und Zellbestandteile mikroskopisch sichtbar bzw. voneinander unterscheidbar zu machen. Basische (kationische) Farbstoffe färben dabei positiv geladene Strukturen und saure (anionische) Farbstoffe färben negativ geladene Strukturen. Die genauen Färbemechanismen sind oft nicht bekannt, jedoch spielen elektrostatische Bindungen eine Rolle. Für quantitative Auswertungen wurden, wenn möglich, mindestens 10 nichtüberlappende Fotos von dem jeweiligen Präparat gemacht und entweder einzelne Bestandteile ausgezählt oder mittels einer Software (z.B. ImageJ, Qwin V3 oder Photoshop) Flächen ausgemessen und auf eine Gesamtheit bezogen.

Vor jeder Färbung mussten die Paraffinschnitte durch die Inkubation in einer Xylol- und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert werden:

1. 3 x 5 min Xylol
2. 2 x 5 min Ethanol (100 %)
3. 5 min Ethanol (70 %)
4. 5 min Ethanol (50 %)
5. 5 min destilliertes Wasser

Nach der Färbung wurden die Schnitte wieder dehydriert und mit Xylol durchtränkt, um sie durch das Eindecken mit dem Einschlussharz Eukitt als Präparat mikroskopieren und lagern zu können:

1. 20 x dippen in Ethanol (50 %)
2. 20 x dippen in Ethanol (70 %)
3. 20 x dippen in Ethanol (100%)
4. 20 x dippen in Ethanol (100 %)
5. 20 x dippen in Xylol
6. 20 x dippen in Xylol
7. Eukitt auftragen, mit einem Deckgläschen bedecken und aushärten lassen.

2.2.5.1 Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Eine weit verbreitete Farbstoffkombination in der Histologie, die unterschiedlichen Gewebebestandteilen zur mikroskopischen Analyse ausreichend Kontrast verleiht, ist der Einsatz von Hämatoxylin und Eosin (HE). Das Hämatoxylin färbt in seiner basischen Form Hämalaun Zellkernmaterial blau und das saure Eosin fast alle zytoplasmatischen Strukturen rosa. Die HE-Färbung wurde als Übersichtsfärbung auf Nierenschnitten angewendet.

Nach dem Entparaffinieren wurden die Schnitte wie folgt bei Raumtemperatur (RT) gefärbt:

1. 2 min frisch filtriertes Gill's Hämatoxylin
2. kurz spülen in destilliertem Wasser
3. 5 min frisches Leitungswasser
4. kurz spülen in destilliertem Wasser
5. 30 s - 1min Eosin
6. in frischem destilliertem Wasser spülen
7. Schnitte entwässern und mit Eukitt eindecken

2.2.5.2 Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung

Mithilfe der PAS-Färbung werden kohlenhydratreiche Makromoleküle wie Glykogen und Glykoproteine rot angefärbt. Zunächst oxidiert die Perjodsäure freie Hydroxylgruppen benachbarter Kohlenstoffatome unter Spaltung der Bindungen zwischen den Kohlenstoffatomen zu Aldehydgruppen, die wiederum mit dem Schiff's-Reagenz (Fuchsin-schweflige Säure) einen roten Komplex bilden.

Bei Nierenschnitten werden dadurch z.B. der Bürstensaum und die Basalmembran als wichtige Bestandteile zur Beurteilung eines eventuellen Schadens der Tubulusstruktur rot angefärbt.

1. 5 min 1 %ige frische Perjodsäure
2. 3 x 2 min destilliertes Wasser
3. 25 min filtriertes Schiff's Reagenz
4. 5 min mit Leitungswasser spülen
5. kurz mit destilliertem Wasser spülen
6. 40 min Mayer's Hämatoxylin
7. 10 min mit Leitungswasser wässern
8. Schnitte entwässern und mit Eukitt eindecken

In den PAS-gefärbten Präparaten wurde der akute Schaden nach folgender Vorgehensweise beurteilt (modifiziert aus Broekema *et al.*, 2005):

Für jedes Schadensmerkmal wurden pro Blickfeld Schadenspunkte von 0-4 (0: normal, 1: <25 % geschädigte Tubuli, 2: 25-50 % geschädigte Tubuli, 3: 50-75 % geschädigte Tubuli, 4: 75-100 % geschädigte Tubuli) vergeben, aufsummiert und gemittelt.

Schadensmerkmale der Tubulusstruktur

- Dilatation
- nackte Basalmembran
- Zellabflachung
- Verlust des Bürstensaums
- Zylinder im Tubuluslumen

Für die Quantifizierung der tubulären Atrophie wurde die Fläche der atrophischen Tubuli ausgemessen und auf die tubuläre Gesamtfläche bezogen.

2.2.5.3 Masson-Trichrom-Färbung

Trichrom-Färbungen wurden generell benutzt, um Kollagen und Muskelgewebe voneinander zu unterscheiden. Die für diese Experimente verwendete Masson-Trichrom (MT)-Färbung besteht aus Farbstoffen, die Zellkerne rotviolett (Hämatoxylin), Kollagen hellblau (Anilinblau) und Zytoplasma rosa (Scharlachfuchsin) färben und dient zur Analyse des gebildeten Kollagenanteils im Nierengewebe nach einem Schadensereignis. Für die Auswertung wurden die hellblau erscheinenden Areale in den Präparaten quantifiziert.

1. 12 - 24 h Fixierung in Bouin'scher Lösung
2. mit Leitungswasser spülen bis das Wasser klar ist
3. kurz mit destilliertem Wasser spülen
4. 10 min frisch filtriertes Gill's Hämatoxylin
5. mit Leitungswasser spülen, bis das Wasser klar ist
6. kurz mit 50 °C warmem destilliertem Wasser spülen
7. 15 min Biebrich's Scharlachfuchsin-Lösung
8. 8 x mit Leitungswasser spülen
9. 3 x 3 min mit destilliertem Wasser spülen
10. 10 min Inkubation in einem Gemisch aus:
57,5 ml Phosphorwolframsäure und 57,5 ml Phosphomolybdänsäure frisch
filtrieren und dann mit 115 ml destilliertem Wasser versetzen
11. 25 min Anilinblau-Lösung
12. 2 x 10 s Entfärben in 1 %iger Essigsäure
13. 20 s 70 % Ethanol
14. 20 s 96 % Ethanol
15. 2 x 10 dips 100 % Ethanol
16. 2 x 10 dips Xylol und mit Eukitt eindecken.

2.2.5.4 Picrosiriusrot-Färbung

Mit dem Farbstoff Siriusrot können Kollagene (Typ I und III) angefärbt werden. Lichtmikroskopisch sind die Kollagene rot und unter dem Polarisationsmikroskop erscheint Kollagen I orange-gelb und Kollagen III grün.

1. 1 h RT Inkubation in Picrosiriusrot-Färbelösung
2. 2 x 2 min Waschen in mit Eisessig angesäuertem Wasser (0,5%ig)
3. Schnitte entwässern und mit Eukitt eindecken

Für die Auswertung wurden mithilfe der Polarisationsmikroskopie die birefringent erscheinenden Areale in den Präparaten quantifiziert.

2.2.6 Immunhistochemische Färbungen

Bei der Immunhistochemie werden einzelne Zellbestandteile möglichst spezifisch angefärbt. Die Spezifität wird durch Primär-Antikörper erzeugt, die gegen den nachzuweisenden Bestandteil gerichtet sind. Entweder sind die Primärantikörper direkt mit der Substanz gekoppelt, die eine Detektion ermöglicht oder man arbeitet mit markierten Sekundärantikörpern, die gegen den Primärantikörper gerichtet sind. Bei der

Immunfluoreszenz-Technologie wird die Bindung an den zu analysierenden Zellbestandteil durch einen spezifischen Antikörper mit der mikroskopischen Auswertung mithilfe von Fluoreszenz-Signalen kombiniert. Dabei kommen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper zum Einsatz. Die Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht auch grundsätzlich das Anfärben von verschiedenen Komponenten im gleichen Präparat. Ein anderes Nachweissystem nutzt das an den Antikörper gekoppelte Enzym HRP, das durch die Reaktion mit dem Substrat DAB ein dunkelbraunes Präzipitat im Präparat produziert. Die dunkelbraune Färbung kann lichtmikroskopisch ausgewertet werden und bleibt länger stabil als die Fluoreszenz. Für quantitative Auswertungen wurden, wenn möglich, mindestens 10 sich nicht überlappende Fotos von dem jeweiligen Präparat gemacht und entweder einzelne Zellen ausgezählt oder mittels einer Software Flächen ausgemessen und auf eine Gesamtheit bezogen.

2.2.6.1 HRP-Färbung auf Paraffinschnitten

Nach der Entparaffinierung und vor der eigentlichen Färbung muss bei Paraffinschnitten eine Antigendemaskierung stattfinden. Die Demaskierung dient zur Wiederherstellung der Immunreaktivität, die durch den Fixierungs- und Einbettungsprozess beeinträchtigt wurde. Eine Standardmethode dafür ist die Erhitzung des Gewebes in einem Dampfdruckkocher in Citrat-Puffer (10 mM, pH 6). Danach wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch eine 15 minütige Inkubation bei RT in 3 %igem H₂O₂ in destilliertem Wasser geblockt und das Gewebe durch Waschen in einer Waschlösung mit 0,1 % Tween[®] 20 permeabilisiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Grundprotokoll:

1. 3 x 5 min mit Waschlösung waschen
2. 1 h Inkubation bei RT in einer Blocklösung
3. über Nacht Inkubation bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:200)
4. 3 x 5 min mit Waschlösung waschen
5. 30 min Inkubation bei RT mit gebrauchsfertigem Envision Sekundärantikörper
6. 3 x 10 min mit Waschlösung waschen
7. variable Inkubation bei RT mit DAB (1 Tropfen DAB in 1 ml DAB Substratpuffer)
unter visueller Kontrolle bis zur optimalen Farbentwicklung
8. 5 min mit destilliertem Wasser waschen
9. 5 min Inkubation bei RT in Mayers Hämatoxylin
10. in Leitungswasser spülen bis das Wasser klar bleibt
11. Schnitte entwässern und mit Eukitt eindecken

2.2.6.2 Immunfluoreszenz-Färbung von Paraffinschnitten

Auch für Immunfluoreszenz-Färbungen auf Paraffinschnitten wurde das Gewebe zunächst in einem Dampfdruckkocher in Citrat-Puffer (10 mM, pH 6) demaskiert. Das weitere Vorgehen erfolgte nach dem Grundprotokoll:

1. 3 x 5 min mit PBS waschen
2. 1 h Inkubation bei RT in einer Blocklösung
3. über Nacht Inkubation bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:50-400)
4. 3 x 5 min mit Waschlösung waschen
5. 30 min Inkubation bei RT mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (1:200)
6. 3 x 5 min mit Waschlösung waschen
7. Eindecken und Kernfärbung mit Mowiol + DAPI (3,3 µg/ml)

Bei Doppelfärbungen wurden zunächst die beiden Primär- und danach die beiden Sekundärantikörper (jeweils unterschiedlich markiert) zusammen inkubiert. Bei markierten Primärantikörpern bzw. bei dem markierten LTL (Agglutinin, kein Antikörper) wurde nach dem Waschschrift (4.) direkt eingedeckt.

2.2.6.3 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellkulturen

Vor der eigentlichen Immunfluoreszenz-Färbung müssen Zellkulturzellen fixiert und permeabilisiert werden, um die Zellstrukturen zu bewahren und das Eindringen der Färbekomponenten zu gewährleisten. Weiterhin müssen unspezifische Antikörperbindungsstellen mithilfe von Proteinmischen blockiert werden.

Die Zellen wurden zunächst 2 x mit PBS gewaschen und dann nach folgendem Grundprotokoll gefärbt:

1. a) Fixierung für 10-15 min bei RT in 4 %igem PFA in PBS oder
b) für 5 min in Methanol bei -20 °C (nur für E-cadherin)
2. 3 x 5 min mit PBS waschen
3. Blocken und Permeabilisieren für 30-45 min bei RT in Blocklösung
4. 3 x 5 min waschen mit Waschlösung
5. 1 h Inkubation mit dem Primärantikörper bei RT (Verdünnung 1:50-400)
6. 3 x 5 min waschen mit Waschlösung
7. 30 min Inkubation bei RT mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (1:200)
8. 3 x 5 min waschen mit Waschlösung
9. Bedecken und Kernfärbung mit PBS + DAPI (0,2 µg/ml)

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

2.2.7.1 RNA-Extraktion aus Organen und Zellkulturen

Für die Gewinnung von mRNA aus Geweben und Zellkulturen wurden die RNA-Isolierungskits der Firma QIAGEN verwendet. Das Isolierungs-Prinzip beruht auf einer Kombination der Bindungseigenschaften einer Silikat-Membran und der Säulen-Zentrifugationsgeschwindigkeit. Das verwendete Puffersystem mit hohen Salzkonzentrationen führt zu der Anreicherung von mRNA (>200 Nukleotiden), da die kleineren RNAs selektiv ausgeschlossen werden. Der Guadininthiocyanat enthaltende, denaturierende RLT-Puffer (versetzt mit 10 µl β-Mercaptoethanol/ml Puffer) bewirkt eine Zellyse und inaktiviert sofort RNasen, um intakte RNA zu erhalten. Die Zugabe von 70 %igem Ethanol zu dem Lysat stellt die Bindungsbedingungen der mRNA an die Silikat-Membran der Säule her. Durch Waschschrte werden Kontaminationen entfernt und die RNA schließlich mit RNase freiem Wasser eluiert.

2.2.7.1.1 RNA-Extraktion aus Organen

Für eine RNA-Extraktion wurden die Gewebestücke direkt nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Isolierung erfolgte mit dem RNeasy MiniKit von QIAGEN: Ein etwa streichholzkopfgroßes Gewebestück wurde in ein Eppendorfgefäß mit 600 µl RLT-Puffer gegeben und im Tissue Lyzer 2 x 3 min bei 30 Hz zerkleinert. Das Lysat wurde in eine QIAshredder Säule in einem Sammelgefäß überführt und 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumenteil 70 %igem Ethanol gemischt. 700 µl dieser Flüssigkeit wurden in eine RNeasy spin Säule in einem Sammelgefäß überführt, 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Mit 700 µl RW1- und danach 500 µl RPE-Puffer wurde dieser Vorgang jeweils in derselben Säule wiederholt. Nach einer erneuten Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurde die Säule 2 min und nach dem Verwerfen des Durchflusses nochmal 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und die RNA durch die Zugabe von 40 µl RNase freiem Wasser und anschließendem Zentrifugieren eluiert. Die RNA-Konzentration des Eluats wurde bestimmt und das Eluat dann entweder direkt in eine Analyse eingesetzt oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das Zentrifugieren erfolgte jeweils bei >8000 g.

2.2.7.1.2 RNA-Extraktion aus Zellkulturen und frisch isolierten Tubuli

Die Isolierung erfolgte mit dem RNeasy MicroKit von QIAGEN: Die durch die Zentrifugation der Verdaususpension erhaltenen Pellets aus frisch isolierten Tubuli wurden direkt mit RLT-

Puffer versetzt. Für die mRNA-Isolierung aus der Zellkultur wurde zunächst das Kulturmedium aus der Kulturschale abgesaugt und eine adäquate Menge des RLT-Puffers (z.B. 350 µl/6-well) auf die Zellen pipettiert. Mithilfe eines Gummischabers wurden die Zellen vom Plastikboden gelöst. Das jeweilige Lysat wurde dann in eine QIAshredder Säule in einem Sammelgefäß überführt und 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit einem Volumenteil 70 %igem Ethanol gemischt. Die Probe wurde in eine RNeasy MinElute spin Säule in einem Sammelgefäß überführt, 15 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Mit 700 µl RW1- und danach 500 µl RPE-Puffer wurde dieser Vorgang jeweils in derselben Säule wiederholt. Nach einer weiteren Zugabe von 500 µl 80 %igem Ethanol wurde die Säule 2 min und nach dem Verwerfen des Durchflusses nochmal 5 min zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und die RNA durch die Zugabe von 20 µl RNase freiem Wasser und anschließendem Zentrifugieren eluiert. Die RNA-Konzentration des Eluats wurde bestimmt und das Eluat dann entweder direkt in eine Analyse eingesetzt oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zentrifugierschritte erfolgten jeweils bei >8000 g.

2.2.7.1.3 RNA Konzentrationsbestimmung

RNA-Lösungen haben ein Absorptionsmaximum im UV-Bereich bei 260 nm und die Konzentrationen können aus den gemessenen $A_{260\text{nm}}$ -Werten über das Lambert-Beer'sche-Gesetz berechnet werden. Danach hat eine Lösung mit $A_{260\text{nm}}=1,0$ eine RNA-Konzentration von ~ 40 µg/ml Einzelstrang-RNA.

Die RNA-Konzentration und Reinheit einer Probe wurden mithilfe eines NanoDrop Spektralphotometers gemessen. Dafür wurden 1 µl Probe auf den Messplatz des Geräts pipettiert und die RNA-Konzentration in ng/µl automatisch aus der Absorption der Probe bei 260 nm berechnet. Zusätzlich wurden die Ratios 260/280 nm (reine RNA ~2) und 260/320 nm (reine RNA 1,8-2,2) Ratios ausgegeben, um über Verunreinigungen der RNA zu informieren.

2.2.7.2 Complementary DNA-Synthese

Aus mRNA umgeschriebene DNA, genannt cDNA (complementary DNA) repräsentiert ebenfalls die mRNA Population in Gewebe oder Zellen. Als Probematerial für die Analysen mittels quantitativer Real-time PCR (RT-PCR) diente die stabilere cDNA. Das Enzym M-MLV Reverse Transkriptase ist eine rekombinante DNA-Polymerase, die aus einem RNA- oder DNA-Strang den komplementären DNA-Strang (bis zu 7 kb lang) synthetisiert. Als Startpunkt für die Neusynthese brauchen DNA-Polymerasen einen kurzen doppelsträngigen Abschnitt. Dafür werden Random Hexamers, ein Gemisch aus verschiedenen hexameren

Oligonukleotiden, eingesetzt, die idealerweise zunächst mit komplementären Sequenzen auf allen mRNAs hybridisieren. Außer des Enzyms und der RNA werden dem Reaktionsgemisch (Mastermix) noch First-Strand Buffer (optimaler pH-Wert/MgCl₂ als Enzym-Cofaktor), RNasin (RNase Inhibitor), Desoxynukleosidtriphosphate (4 verschiedene dNTPs zu gleichen Teilen), BSA (erhöht die Ausbeute) und RNase freies Wasser zugesetzt. Die DNA-Polymerase synthetisiert bei 37 °C, die Reaktion wird durch Erhitzen auf 97 °C beendet.

Ein Aliquot 2 x Mastermix wurde in einem Reaktionsgefäß mit der RNA versetzt, der Reaktionsansatz gemischt und die cDNA-Synthese in dem entsprechend programmierten Thermocycler durchgeführt (Protokoll siehe Tabelle 14).

Tabelle 14 Pipettierschema und Thermocycler-Protokoll für die cDNA-Synthese

[µl]	2 x Mastermix	Thermocycler-Protokoll
7,4	RNase freies H ₂ O	5 min Raumtemperatur
8,0	5x First-Strand Buffer	60 min 37 °C
1,0	dNTPs (10 mM jedes dNTP)	5 min 97 °C
0,4	BSA (1 %)	
0,4	DTT (0,1 M)	
0,8	RNasin	
0,6	Random Hexamers (1 µg)	
1,4	M-MLV Reverse Transkriptase	
[µl]	Proben-Zugabe	
x	RNA (1 µg)	
20-x	RNase freies H ₂ O	

Die 40 µl cDNA wurden anschließend für den Einsatz in der Real-time PCR noch mit 60 µl RNase freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.2.7.3 Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Das Grundprinzip einer PCR ist die *in vitro* Replikation von durch spezifische Primer flankierten DNA-Abschnitten mithilfe von thermostabilen DNA-Polymerasen. Dabei besteht ein Verdopplungszyklus jeweils aus dem thermischen Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs, der Anlagerung der Vorwärts- bzw. Rückwärts-Primer an den komplementären Einzelstrang und der Neusynthese des komplementären Strangs durch die *Taq*-Polymerase. Bei der RT-PCR kann dieser Vorgang in Echtzeit verfolgt und quantifiziert werden, da die Amplifikation unter optimalen Bedingungen exponentiell erfolgt. Um verschiedene Proben mit unterschiedlichen cDNA-Gehalten dennoch quantitativ miteinander vergleichen zu können, wurde neben dem zu

analysierenden Gen auch ein Haushaltsgen wie *Hprt* untersucht. Die Basisexpression der Haushaltsgene soll dabei idealerweise bei allen untersuchten Proben nahezu gleich sein. Zum Vergleich von Proben aus verschiedenen Durchläufen wurde auf jeder Platte die gleiche Poolprobe mitgeführt und deren Werte zum Ausgleich von Inter-Assay-Schwankungen in die Berechnung miteinbezogen. Zur Erkennung eventueller unspezifischer Reaktionen wurde eine NTC-Probe (No Template Control) mitgeführt, die statt einer DNA-Probe Wasser enthielt und somit keine positive Reaktion zeigen durfte.

2.2.7.3.1 TaqMan™-Technologie

Bei der Fluoreszenz-detektierenden TaqMan™-Technologie werden neben spezifischen Primern Oligonukleotid-Sonden eingesetzt, die folgende Komponenten enthalten: den 5'-Reporter-Farbstoff FAM, den 3'-Quencher-Farbstoff TAMRA und ein 3'-OH-blockierendes Phosphat. Die Sonden binden komplementäre Bereiche innerhalb des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Dabei befindet sich der Reporter-Farbstoff in räumlicher Nähe zum Quencher-Farbstoff und ein Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) zwischen den Farbstoffen führt zu einer Unterdrückung der Fluoreszenz. Während der Neusynthese des komplementären Strangs wird die Sonde durch die Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase abgebaut, Reporter und Quencher entfernen sich voneinander und ein zur Amplifizierung proportionales Fluoreszenzsignal wird emittiert und detektiert.

Diese Technologie wurde für die Analyse folgender mRNAs eingesetzt: *Hprt*, *HPRT1*, *Cdkn2b*, *Cdkn2a*, *CDKN2a*, *Cdkn1a*, *CDKN1A* und *Trp53*.

Tabelle 15 Pipettierschema und Thermocycler-Protokoll für die TaqMan™-PCR

[μ l]	1 x Reaktionsansatz	Thermocycler-Protokoll
0,375	Vorwärts Primer (20 μ M)	2 min 50 °C
0,375	Rückwärts Primer (20 μ M)	10 min 95 °C
0,25	Sonde (10 μ M)	1. 15 s 95 °C
2	MgCl ₂ (25 mM)	2. 1 min 60 °C
12,5	Universalmastermix	50 Zyklen der Schritte 1 und 2
4,5	RNAse freies H ₂ O	
[μ l]	Proben-Zugabe	
5	cDNA	

Nach dem Pipettieren einer PCR-Platte wurde diese mit Deckeln bzw. Folie verschlossen, kurz anzentrifugiert und zur Analyse ins PCR-Gerät (ABI PRISM 7700 Sequence Detector) gestellt.

Das Grundprotokoll (siehe Tabelle 15) war außer für *HPRT1*, *CDKN1A* und *Cdkn2b* für alle Parameter gleich; für die Analyse der letztgenannten mRNAs wurden statt der einzelnen Primer und einer Sonde pro Probe 1,25 µl eines fertigen Primer/Sonden-Gemisches eines TaqMan® Gene Expression Assays pipettiert.

2.2.7.3.2 SYBR Green Technologie

Der SYBR-Green Farbstoff wird bei dieser Technologie anstelle einer Sonde eingesetzt. Der Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA (dsDNA) und dieser Farbstoff/DNA-Komplex emittiert dann proportional zum dsDNA-Gehalt der Probe Licht. Diese Technologie wurde für die Analyse folgender mRNAs eingesetzt: *Lcn2*, *Havcr1*, *Coll1a1*, *Col3a1* und *Acta2*.

Tabelle 16 Pipettierschema und Thermocycler-Protokoll für die SYBR-PCR (1)

	mRNAs: <i>Lcn2</i>, <i>Havcr1</i>, <i>Acta2</i>	
[µl]	1 x Reaktionsansatz	Thermocycler-Protokoll
0,38	Vorwärts Primer (20 µM)	3 min 95 °C
0,38	Rückwärts Primer (20 µM)	1. 15 s 95 °C
0,4	100x Referenz Farbstoff	2. 1 min 60 °C
12,5	2 x SYBR Mastermix-Puffer	35 Zyklen der Schritte 1 und 2
6,35	RNAse freies H ₂ O	
[µl]	Proben-Zugabe	
5	cDNA	

Tabelle 17: Pipettierschema und Thermocycler-Protokoll für eine SYBR-PCR (2)

	mRNAs: <i>Coll1a1</i>, <i>Col3a1</i>	
[µl]	1 x Reaktionsansatz	Thermocycler-Protokoll
0,6	Vorwärts Primer (20 µM)	5 min 95 °C
0,6	Rückwärts Primer (20 µM)	1. 15 s 95 °C
0,1	<i>Taq</i> (Fast start)	2. 30 s 57 °C
10	10 x SYBR Mastermix	3. 30 s 72 °C
6,2	RNAse freies H ₂ O	40 Zyklen der Schritte 1 bis 3
[µl]	Proben-Zugabe	
2,5	cDNA	

2.2.7.3.3 Quantitative Berechnung der relativen Genexpression

Der C_T (cycle threshold)-Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem das gemessene Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über das Hintergrundsignal hinaus ansteigt. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte mit der $\Delta\Delta^{CT}$ -Methode. Die C_T -Werte des Zielgens (z.B. *Trp53*) wurden von den C_T -Werten des Haushaltsgens (z.B. *Hprt*) subtrahiert ($= \Delta C_T$). Das ΔC_T einer Probe wurde anschließend von dem Mittelwert des ΔC_T -Werts der Poolproben subtrahiert ($= \Delta\Delta C_T$) und dieser Wert logarithmiert ($= 2^{\Delta\Delta C_T}$). Da die Proben zumeist in Doppelbestimmung analysiert wurden, wurde aus den 2 logarithmierten Werten wiederum der Mittelwert gebildet ($=$ relative mRNA Expression).

Formel 1: Formel nach Pfaffl zur Berechnung der relativen Genexpression (Pfaffl, 2001)

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Haushaltsgen}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Probe} - \Delta C_T \text{ Kontrolle (Pool)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{\Delta\Delta C_T}$$

2.2.8 Proteinchemische Methoden

Proteinchemische Methoden werden häufig angewandt, um eine Genexpression durch die Analyse der Bildung des zugehörigen Proteins nachzuverfolgen. Denn zum einen korreliert die Menge an gebildeter mRNA nicht notwendigerweise mit der Proteinmenge und zum anderen können auf der Proteinebene für die Funktion wichtige posttranslationale Modifikationen nachgewiesen werden.

2.2.8.1 Protein-Extraktion aus Organen und Zellkulturen

Für viele Analysen wie z.B. dem Western Blot müssen die Proteine zunächst aus den Zellen extrahiert werden. Die Zellen werden in Pufferlösungen aufgenommen und die Zellstrukturen werden mechanisch und/oder mit Detergenzien aufgebrochen. Das zügige Arbeiten auf Eis und die Zugabe von Proteaseinhibitoren hemmt dabei die Degradation der zu untersuchenden Proteine.

2.2.8.1.1 Protein-Extraktion aus Organen

Für die Proteinextraktion wurden die Gewebestücke direkt nach der Entnahme in flüssigen Stickstoff getaucht und anschließend bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Ein etwa streichholzkopfgroßes Gewebestück wurde in ein Eppendorfgefäß mit 100 - 150 μl RIPA-Puffer gegeben und im Tissue Lyzer 2 x 3 min bei 30 Hz zerkleinert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C mit höchster Geschwindigkeit in einer

Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und nach der Bestimmung des Proteingehalts mit der Bradford-Methode entweder direkt zur Analyse eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 bis -80 °C gelagert.

2.2.8.1.2 Protein-Extraktion aus Zellkulturen für Western Blots

Für die Proteinextraktion aus Zellkulturen wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und dann je nach zu analysierendem Parameter wie folgt behandelt:

Auf Eis wurde die entsprechende Menge Lyse-Puffer zugegeben, die Zellen wurden mit einem Gummischaber vom Boden der Platte abgeschabt und die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einem Lyse- und Zentrifugationsschritt (4 °C, 15 min, 15000 g) wurde der Überstand abpipettiert, ggfs. die Proteinkonzentration bestimmt und entweder direkt zur Analyse eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 bis -80 °C gelagert.

E-Cadherin, pan-Cytokeratin, vWF und S100A4:

Die Suspension (kalter Lyse-Puffer: 12,5 µl/6-well) wurde 30 min bei 4 °C geschüttelt, gevortext und dann zentrifugiert.

p53:

Die Suspension wurde aus mehreren Vertiefungen (RIPA-Puffer: 80 µl/6-well) in einem Eppendorfgefäß mit Stahlkugel gepoolt, im Tissue Lyzer für 3 min bei 30 Hz aufgeschlossen und dann zentrifugiert.

p16^{INK4a}:

Die Zellen wurden in 2 x Lämmli-Puffer (80 µl/6-well) aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß überführt, 10 min bei 98 °C inkubiert und dann zentrifugiert.

2.2.8.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode bestimmt: Der in ungebundener Form rote Farbstoff Coomassie[®]-Brilliant-Blau G-250 bildet unter Verschiebung des Absorptionsmaximums mit basischen und aromatischen Aminosäureresten einen blauen Komplex. Es wurde z.B. jeweils 1 µl Probe mit 800 µl H₂O und 200 µl Bradford-Reagenz versetzt, 5 min inkubiert und dann die A_{595 nm} in einer Küvette am NanoDrop Spektralphotometer gemessen. Über das Mitführen einer Standardreihe aus wässriger BSA-Lösung im linearen Messbereich wurde dann näherungsweise (ausreichend für die gleichmäßige Beladung eines SDS-Gels) die Proteinkonzentration einer Probe ermittelt.

2.2.8.3 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wird angewendet, um Proteine aus einem Proteingemisch der Molekülmasse nach aufzutrennen. In einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Kammer wird an das mit den Proben beladene Gel eine elektrische Spannung angelegt unter der negativ geladene Moleküle zur Anode wandern. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb: Kleine Moleküle wandern schneller, die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe trennen sich der Größe nach auf. Das Gel besteht aus polymerisiertem Acrylamid, das mit Methylenbisacrylamid quervernetzt ist. Die Polymerisation wird mit der Zugabe von APS gestart und durch TEMED katalysiert. 10 µl Proteinprobe (20-50 µg) wurde zunächst mit 3,2 µl 4 x Lämmli-Puffer versetzt und 10 min bei 95 °C aufgekocht. Der Proben-Puffer enthält Bromphenolblau zur Markierung der Lauffront. β-Mercaptoethanol, SDS und das Aufkochen bewirken eine Denaturierung und Entfaltung der Proteine. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer mit dem 1 x Lauf-Puffer gestellt und die Proben und ein mitgeführter Größenmarker wurden dann einzeln in verschiedene Taschen des Gels pipettiert. Eine Spannung von 100 V wurde angelegt und die Elektrophorese bis zur gewünschten Position der Lauffront durchgeführt. Das Gel konnte dann anschließend z.B. im Western Blot eingesetzt werden.

2.2.8.4 Western Blot

Als Western Blot wird eine Technik bezeichnet, bei der Proteine von einem Medium (z.B. einem SDS-Gel) auf eine Trägermembran übertragen werden, um darauf über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden zu können. Die Übertragung von einem SDS-Gel auf die Membran erfolgt häufig elektrophoretisch in einer Kammer. In dem senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feld wandern die negativ geladenen SDS-Proteinkomplexe in Richtung der Anode. Die Proteine bleiben dann z.B. aufgrund hydrophober Wechselwirkungen auf einer PVDF-Membran haften. Die Detektion eines spezifischen Proteins auf der Membran erfolgt z.B. durch HRP-gekoppelte Antikörper, die mit einem Luminol-basierten Substrat Chemilumineszenz erzeugen. Diese Lichtreaktion kann z.B. durch das Auflegen von Röntgenfilmen und deren nachfolgender Entwicklung dauerhaft dokumentiert und ausgewertet werden.

Für den Transfer vom SDS-Gel zur PVDF-Membran wurde die Membran zunächst in Methanol und dann in 1 x Transfer-Puffer gelegt, das Gel nur in 1x Transfer-Puffer. Zwischen zwei Platten einer Halterung und jeweils zwei Schwämmen und zwei Lagen Whatman-Papier wurden das Gel und die Membran luftblasenfrei aufeinander fixiert und in die Elektrophoresekammer mit 1x Transfer-Puffer überführt. Es wurde für eine Stunde eine

Spannung von 100 V angelegt, während des Transfers wurde die Apparatur gekühlt. Eine Übertragung des angefärbten Größenmarkers auf die Membran zeigte einen erfolgreichen Transfer an und der Proteinnachweis auf der Membran durch HRP-markierte Antikörper konnte nach folgendem Grundprotokoll durchgeführt werden:

1. Waschen in 1 x TBS
2. Inkubation für 1 h bei RT in Blocklösung
3. Inkubation über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper
4. Waschen 3 x 15 min in Waschlösung
5. Inkubation für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper
6. Waschen 3 x 15 min in Waschlösung
7. Herstellung des ECL-Reagenz durch Mischen von Lösung 1 und 2 zu gleichen Teilen
8. Membran mit der ECL-Gebrauchslösung bedecken und 1 min inkubieren
9. Membran abtupfen, in einer Röntgenkassette mit Folie und Film bedecken
10. Film abhängig von der Reaktion belichten lassen und den Film entwickeln

2.2.8.4.1 Western Blot - semiquantitative Auswertung

Für eine semiquantitative Auswertung wurde neben dem Zielprotein auch ein Haushaltsprotein wie GAPDH oder β -Actin detektiert, um Schwankungen des Gesamtproteingehalts der Proben auszugleichen. Die Intensität der Banden wurde mithilfe der ImageJ-Software gemessen und mithilfe des Tabellenkalkulationsprogramms Excel relativ quantifiziert. Die Probe (Ref) mit dem höchsten Wert für das Haushaltsprotein wurde als Referenz gesetzt und daraus die Zielproteinwerte der anderen Proben über deren Haushaltsprotein-Wert entsprechend hochgerechnet.

$[\text{Haushaltsprotein}_{\text{Ref}}]/[\text{Haushaltsprotein}_{\text{Probe}}] * [\text{Zielprotein}_{\text{Probe}}] = [\text{Zielprotein}_{\text{Probe}}] \text{ nivelliert}$

2.2.9 Zellbiologische Methoden

2.2.9.1 Die Kultivierung von primären renalen Tubuluszellen

Primäre Zellkulturen werden unter anderem für Experimente genutzt, in denen *in vivo*-Phänomene an einem bestimmten Zelltyp des Gewebes *in vitro* weiter untersucht werden sollen. Zwar werden die Zellen dabei aus ihrer physiologischen Umgebung in eine künstliche überführt, behalten aber im Gegensatz zu den stark veränderten Zelllinien grundsätzlich ihre individuelle genetische Ausstattung und ihre intakten Signalwege. Alle Schritte wurden mit sterilen Lösungen und Instrumenten durchgeführt. Nach der Organentnahme wurde außer bei den Schritten im Wasserbad und in der Zentrifuge an einer Sicherheitswerkbank gearbeitet. Vor

der Nierenentnahme wurden die Mäuse mittels eines 0,1 ml Ketamin/Rompun-Gemisches pro 10 g Körpergewicht narkotisiert und das Abdomen mit einer Schere längs und quer entlang der Rippen geöffnet. Die Haut wurde seitlich fixiert. Das Zwerchfell wurde geöffnet und die Rippen seitlich oben fixiert, um das Herz freizulegen. Das vaskuläre System wurde mit 5 -7 ml einer sterilfiltrierten eiskalten Perfusions-Lösung (0,125 % Collagenase Typ I in M199 + 1 % Penstrep) perfundiert. Die Collagenase-Lösung wurde mit einer Spritze in die linke Herzspitze injiziert: 1 ml Lösung wurde langsam eingespritzt, dann wurde die rechte Kammer vorsichtig eingeschnitten und die Lösung bis auf einen Rest von 1,5 ml langsam weiter eingespritzt. Das Loch in der rechten Kammer wurde mithilfe einer Pinzette geschlossen und die restliche Lösung schnell injiziert. Die Leber hob sich bei diesem Vorgang und wurde blass. Sofort wurden dann die Nieren entnommen, auf Eis die Kapsel entfernt und die Nieren mit einem Skalpell quer in Scheiben geschnitten. Die Medulla wurde verworfen, das kortikale Gewebe zu einem feinen Brei gehackt und in ein 12 ml Röhrchen mit 7 ml Perfusionslösung gegeben. Mit einer sterilen Klinge wurde die Mitte des Röhrchendeckels kreuzweise eingeschnitten und eine 1 – 2 ml Pipette eingeführt, die an eine Aquariumpumpe angeschlossen war. Durch die Pumpe wurde Luft über die Pipette in den Verdauansatz befördert, der durch die daraus resultierende Luftblasenbewegung kontinuierlich durchmischt wurde. Der Collagenase-Verdau erfolgte für 40 min bei 37 °C im Wasserbad. Nach einer fünfminütigen Inkubation der Lösung auf Eis wurde der Überstand vorsichtig verworfen, das Sediment in 12 ml M199 (1 % Penstrep) resuspendiert und durch ein 40 µm Sieb gefiltert. Der Durchfluß wurde für 5-10 min bei 120 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und in x ml (z.B. 8 ml) REGM aufgenommen. Die OD_{600nm} dieser Zellsuspension wurde bestimmt und durch die Zugabe von weiterem REGM auf eine Aussaatdichte von ca. 0,3 OD_{600nm} eingestellt. In einer Zellkulturplatte wurden z.B. 2 ml Zellsuspension/6-well ausgesät und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der erste Mediumwechsel erfolgte für gewöhnlich an Kulturtag 4 oder 5. Dafür wurde das alte Medium abgesaugt und durch frisches steriles Medium ersetzt. Weitere Mediumwechsel erfolgten dann im Abstand von 2 - 3 Tagen. Für eine Passage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und der Zell-Kulturgefäß-Kontakt durch Inkubation mit Accutase (Maus) bzw. Trypsin (Marmoset) für 15 min bei 37 °C und anschließendem mehrfachen Auf- und Abpipettieren des Gefäßinhaltes gelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, das Zellpellet in dem gewünschten Volumen REGM aufgenommen und erneut in Kulturgefäße ausgesät. Für die Erzeugung von seneszenten primären murinen Tubuluszellen wurden die Zellen an Kulturtag 6 zunächst mit 10 Gy bestrahlt, am nächsten Tag passagiert und 1:4 gesplittet wieder ausgesät und an Kulturtag 16 geerntet. Die zugehörigen Kontrollkulturen wurden ohne Bestrahlung ebenso behandelt.

2.2.9.2 Transfektion von primären Tubuluszellkulturen mit siRNA

Die Transfektion wurde jeweils an Kulturtag 3 nach folgendem Basisprotokoll durchgeführt und die Zellen wurden anschließend an Kulturtag 5 oder 6 ohne Mediumwechsel für die Analyse geerntet.

Dieser Ansatz gilt für eine Vertiefung in einer 12-well-Platte (~3,9 cm²) und wurde bei Verwendung anderer Kulturgefäße entsprechend umgerechnet.

1. Mediumwechsel in dem Kulturgefäß
2. a) 0,75 µL siRNA (20 µM) + 125 µL Optimem I in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettieren und kurz vortexen
3. b) 2,5 µL Lipofectamine™ RNAiMAX Transfektionsreagenz + 125 µL Optimem I in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettieren und kurz vortexen
4. Zusammenpipettieren von a) und b) in einem Eppendorfgefäß, kurz vortexen und 15 min bei RT inkubieren
5. Zugabe dieses Komplexes zu einer Vertiefung der Kulturplatte, die bereits 1 ml Medium enthält und vorsichtiges Mischen

2.2.9.3 BrdU-Assay

Der BrdU-Assay ist eine zellbiologische Methode zur Messung der Zellproliferation. Bromdesoxyuridin kann anstatt Thymidin bei der DNA-Synthese proliferierender Zellen eingebaut und anschließend mithilfe von monoklonalen Primärantikörpern in Kombination mit z.B. Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörpern *in situ* mikroskopisch nachgewiesen werden. Der Test wurde gemäß Packungsbeilage mit dem BrdU-Kit von Roche durchgeführt. Nach den Inkubationsschritten in den jeweiligen Reagenzien wurde jeweils 3 x mit Wasch-Puffer gewaschen.

1. Inkubation der Zellen für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ mit BrdU-haltigem Medium (10⁰µM)
2. Inkubation der Zellen mit dem Ethanol-Fixativ für 20 min bei -20 °C
3. Inkubation der Zellen mit Anti-BrdU-Arbeitslösung für 30 min bei 37 °C
4. Inkubation der Zellen mit Anti-mouse-Ig-Fluorescein-Arbeitslösung für 30 min bei 37 °C
5. Für die Kernfärbung wurden die Zellen mit PBS + DAPI (0,2 µg/ml) bedeckt

Für die Auswertung wurden in 10 zufälligen HPFs (Hauptgesichtsfeld) alle BrdU- bzw. DAPI-positiven Zellen ausgezählt und anschließend der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl (DAPI-positiv) bestimmt.

2.2.9.4 SA- β -Galaktosidase-Färbung

Ein anerkannter Biomarker für seneszente Zellen ist die SA- β -Galaktosidase. Im Gegensatz zu quieszenten Zellen zeigen seneszente Zellen diese β -Galaktosidase Aktivität, die vermutlich auf die Überexpression und Akkumulation der endogenen lysosomalen β -Galaktosidase zurückzuführen ist, bei einem pH-Wert von 6. Allerdings zeigen auch nahezu konfluente Zellen *in vitro* diese Aktivität. Histochemisch resultiert aus der enzymatischen Spaltung des chromogenen Substrats X-Gal ein mikroskopisch auf Einzelzellebene detektierbares blaues Präzipitat. Als positive Kontrolle kann diese Reaktion auch bei pH 4 durchgeführt werden, da bei diesem pH-Wert nahezu alle Zellen β -Galaktosidase-Aktivität zeigen. Die Zellen in der Zellkulturschale wurden 1 x mit PBS gewaschen und dann für 15 min bei RT in einem PBS-gepufferten Gemisch aus 2 %igem Formaldehyd und 0,2 %igem Glutaraldehyd fixiert. Unaufgetaute Gefrierschnitte wurden direkt für 5 min in die Fixierlösung gestellt. Die Färbelösung pH 6 wurde jeweils frisch angesetzt. Zellen bzw. Gefrierschnitte wurden 2 x mit PBS gewaschen und bei 37 °C in einem Inkubator ohne CO₂-Zusatz (senkt den pH-Wert der Lösungen!) in der Färbelösung (pH 6) im Dunkeln inkubiert (4-16 h). Die Inkubationszeit variierte jeweils, war aber innerhalb einer Serie zu vergleichender Präparate immer gleich. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt, die Kerne gegebenenfalls mit DAPI in PBS gegengefärbt und die Zellen mikroskopiert und fotografiert. Für die Zellkultur-Auswertung wurden in 10 zufälligen HPFs alle SA- β -Galaktosidase positiv gefärbten bzw. DAPI-positiven Zellen ausgezählt und anschließend der prozentuale Anteil der SA- β -Galaktosidase positiven Zellen an der Gesamtzellzahl (DAPI-positiv) bestimmt. Für die Gefrierschnitt-Auswertung wurden in mindestens 5 zufälligen HPFs entweder der prozentuale Anteil der blau gefärbten Fläche an der Gesamtfläche mithilfe der Photoshop Software bestimmt oder Zellen einzeln ausgezählt und auf die Gesamtheit bezogen.

2.2.9.5 TUNEL-Färbung

Im Zuge des programmierten Zelltods, der Apoptose, kommt es zu einem enzymatischen Abbau der hochmolekularen DNA zu kleinen Doppelstrangmolekülen. In der DNA einer apoptotischen Zelle treten zudem vermehrt Einzelstrangbrüche auf. Die TUNEL-Methode weist diese Einzelstrangbrüche nach, indem das Enzym Terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) die Polymerisation von mit Fluorescein gelabelten Nukleotiden an freien 3'-OH-Enden der DNA katalysiert. Zellen mit Einzelstrangbrüchen können so im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Die Zellen wurden mit dem *In situ* cell death detection Kit nach Packungsbeilage wie folgt analysiert:

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. 50 µl der TUNEL-Reaktionsmischung wurden auf die Zellen pipettiert und es folgte eine Inkubation bei 37 °C im Dunkeln. Die Zellen wurden 3 x mit PBS gewaschen und die Kerne mit DAPI in PBS gegengefärbt. Für die Auswertung wurden in 10 zufälligen HPFs alle TUNEL- bzw. DAPI-positiven Zellen ausgezählt und anschließend der prozentuale Anteil der TUNEL-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl (DAPI-positiv) bestimmt.

2.2.10 Statistik

Die Statistik-Analysen wurden mit der Prism 4.0 Software durchgeführt.

Die Daten sind überwiegend als Mittelwert + SEM (Standard error of the mean) dargestellt, in Abb. 22 A und Abb. 22 B sind Korrelationsdiagramme gezeigt. Für den statistischen Vergleich zweier Gruppen wurde der t-Test angewendet. Mehr als zwei Gruppen wurden mit einer zweifaktoriellen ANOVA (analysis of variance) und dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni (Bleiacetat- und Zellkultur-Experimente) bzw. einer einfaktoriellen ANOVA und anschließendem Dunnet`s Test (p53 siRNA Tag 30) verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse junger und alter Nieren nach einer Bleiacetat-Injektion

Um die intrinsische Proliferationskapazität von jungem und altem Tubulusgewebe als Antwort auf einen mitogenen Reiz unabhängig von einem multiple Signalwege auslösenden Gewebeschaden zu untersuchen, wurde ein mitogener Reiz durch eine Injektion mit Bleiacetat gesetzt. Das Nierengewebe von jungen und alten Mäusen wurde 36 Stunden nach der Injektion mit Kontroll-Substanz bzw. Bleiacetat neben Proliferation auch auf Gewebeschäden, Apoptose und die Expression von Seneszenzmarkern hin untersucht.

3.1.1 Gewebeschäden und Apoptose in Nieren nach Bleiacetat-Injektion

Um Gewebeschäden durch Bleiacetat in unserem Versuchsansatz auszuschließen, wurden die Nieren beider Altersgruppen 36 Stunden nach der Injektion mit Kontroll-Substanz bzw. Bleiacetat entnommen und analysiert.

Für die Histologie wurden die Schnitte mit HE gefärbt und im Mikroskop beurteilt (Abb. 7 A). Die Integrität des empfindlichen Bürstensaums proximaler Tubuli wurde histochemisch durch eine LTL-Agglutinationsreaktion quantifiziert (Abb. 7 D). Mit beiden Methoden waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen zu detektieren.

Auf mRNA-Ebene zeigten die untersuchten Markerproteine KIM-1 (Abb. 7 B) und NGAL (Abb. 7 C) keine signifikanten Unterschiede zwischen mit Kontroll-Substanz bzw. Bleiacetat behandeltem Nierengewebe. Im Vergleich zu den Injektionsbehandlungen regulierten sowohl junge als auch alte Nieren schon 24 Stunden nach einer I/R-Schädigung die mRNAs der Schadensmarker KIM-1 (Abb. 7 B) bzw. NGAL (Abb. 7 C) signifikant hoch. Das Bleiacetat verursachte somit im Kurzzeitversuch keine mikroskopisch und molekularbiologisch detektierbaren Zellschäden im Vergleich zur Kontroll-Substanz (Abb. 7 A-D).

Weiterhin konnte in einer immunhistochemischen Analyse des Apoptose-Markerenzym Cleaved Caspase 3 keine durch das Bleiacetat signifikant veränderte Apoptose-Rate festgestellt werden (Abb. 7 E).

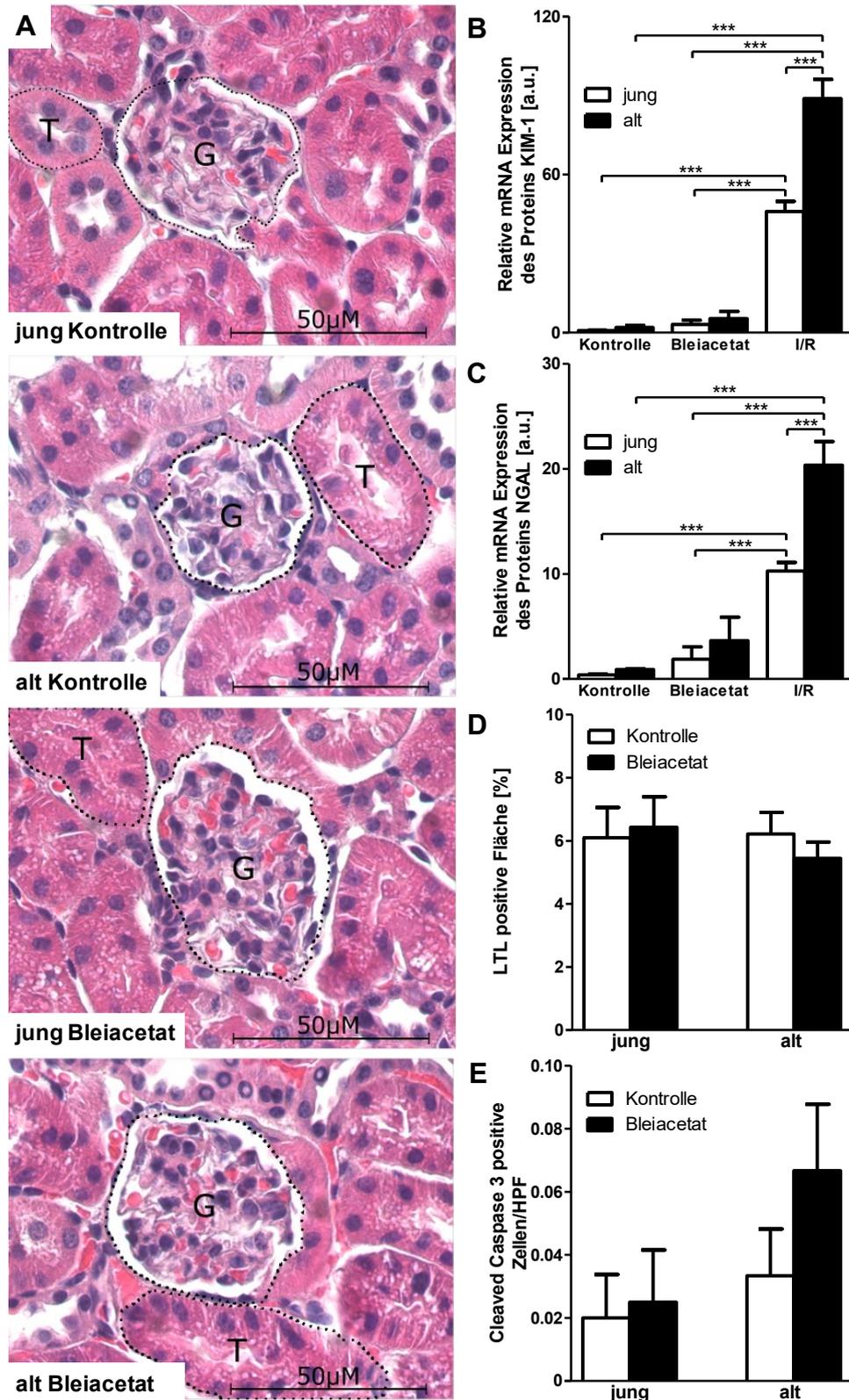


Abb. 7 Kein detektierbarer Gewebeschaden durch Bleiacetatinjektion

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen HE-gefärbter Nierenschnitte (G = Glomerulum; T = Tubulus) (A), die relative Expression der Proteine KIM-1 (B), NGAL (C) auf mRNA Ebene und die LTL-Färbung des Bürstensaums (D) von jungen und alten Mäusen nach Injektion mit Kontroll-Substanz bzw. Bleiacetat, sowie der Anteil an Cleaved Caspase 3 positiven Zellen (E). Bleiacetat vermittelt keine detektierbaren Gewebeschäden verglichen mit der I/R, die einen signifikanten mRNA Anstieg der Schadensmarker KIM-1 (B) bzw. NGAL (C) auslöst. n = 3-5, Mittelwert + SEM, ***p<0.001. Die Analysen A-D wurden von N. Susnik (PhD) erstellt. Daten modifiziert dargestellt in Abb. 1 aus (Berkenkamp, Susnik *et al.*, 2014).

3.1.2 Proliferation nach Bleiacetat-Injektion

Die quantitative Analyse des Proliferationsmarkers Ki67 zeigte, dass die Injektion von Bleiacetat zu einer signifikant gesteigerten *in vivo* Proliferationsrate in jungen Mäusenieren führte sowohl im Vergleich zu den mit Bleiacetat behandelten alten Nieren als auch zu den jungen mit Kontroll-Substanz behandelten Nieren (Abb. 8 A und B).

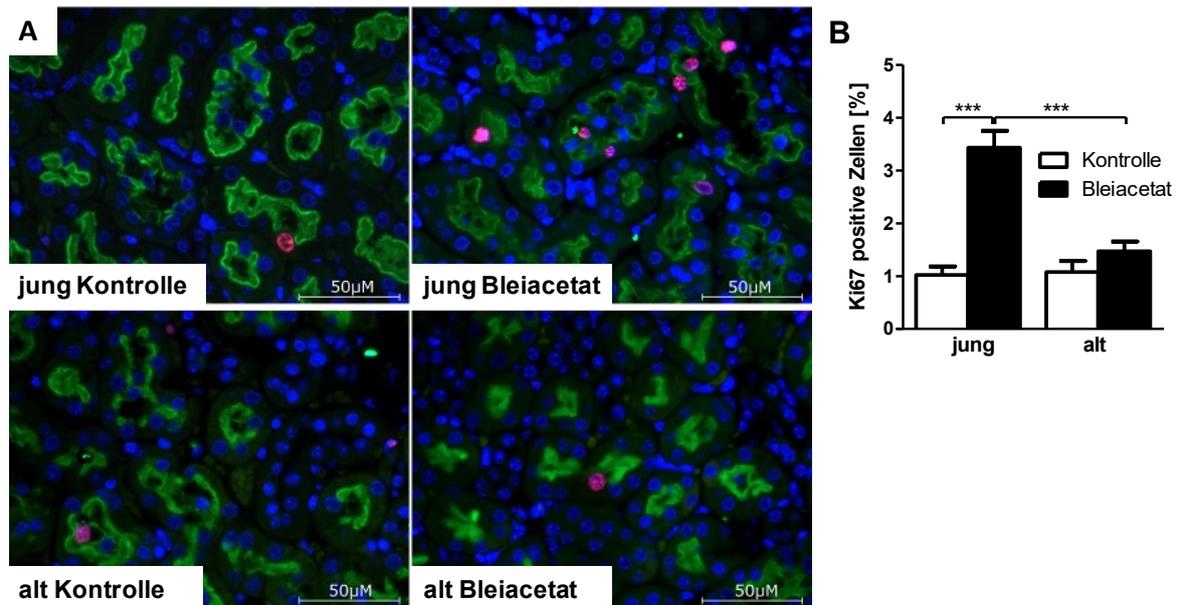


Abb. 8 Signifikant höhere Proliferationsrate in jungen Nieren nach Injektion mit Bleiacetat

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Ki67-Färbung (rot) in proximalen Tubuli (Bürstensaum: grün) von jungen und alten Mäusen nach Injektion mit Kontroll-Substanz bzw. Bleiacetat (A) und die Quantifizierung der Ki67 positiven Zellen (B), deren Anteil nach Injektion mit Bleiacetat in jungen gegenüber alten Nieren signifikant erhöht ist. n = 5, Mittelwert + SEM, ***p<0.001. Die Experimente aus A und B wurden von N. Susnik (PhD) durchgeführt.

Daten modifiziert dargestellt in Abb. 2 aus (Berkenkamp, Susnik *et al.*, 2014).

3.1.3 Seneszenz in jungen und alten Nieren nach Bleiacetat-Injektion

Die Injektion mit Bleiacetat führte bei jungen verglichen mit alten Nieren zu einer signifikant höheren Proliferationsrate, daher wurde das Nierengewebe auf Seneszenz als einer möglichen Ursache für diesen Unterschied untersucht.

In alten mit Kontroll-Substanz injizierten Nieren konnten signifikant mehr γ -H2A.X⁺/Ki67⁻ (Abb. 9 A und B) und SA- β -Galaktosidase (Abb. 9 C) positive Zellen gezählt werden als in jungen mit Kontroll-Substanz injizierten Nieren. Alte mit Bleiacetat injizierte Nieren hatten weiterhin signifikant mehr SA- β -Galaktosidase positive Zellen als die alten mit Kontroll-Substanz injizierten bzw. die jungen mit Bleiacetat injizierten Nieren (Abb. 9 C).

Alte Nieren zeigten zudem eine signifikant höhere mRNA-Expression des Seneszenzmarkers p16^{INK4a} im Vergleich zu den jungen Nieren und zwar sowohl für die mit Kontroll-Substanz als auch für die mit Bleiacetat injizierten Tiere (Abb. 9 D). Die mRNA-Expression von p21^{CIP1} folgte diesem Trend, war aber nur schwach signifikant für die mit Kontroll-Substanz injizierten Tiere (Abb. 9 E).

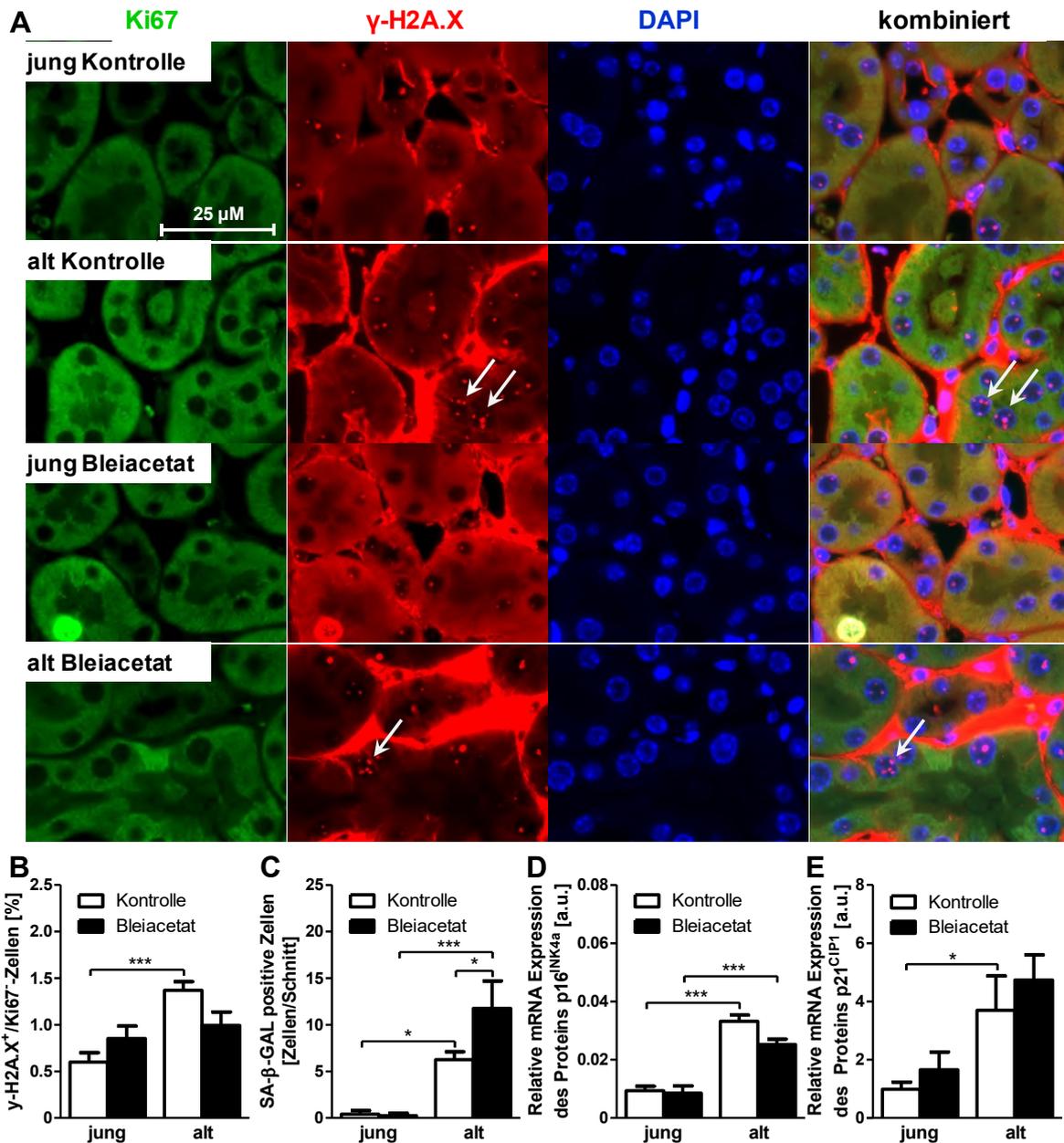


Abb. 9 Signifikant erhöhte Seneszenzmarker in alten Nieren

Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der Ki67/γ-H2A.X-Färbung (Pfeile zeigen auf Ki67 negative, > 4 foci aufweisende γ-H2A.X positive Zellen) in den Nieren von jungen und alten Mäusen nach Injektion mit Kontroll-Substanz bzw. Bleiacetat (A) und die Quantifizierung der Ki67+/γ-H2A.X+ (B) bzw. SA-β-Galaktosidase positiven Zellen (C), deren Anteil in mit Kontroll-Substanz injizierten alten gegenüber jungen Nieren signifikant erhöht ist. Die Analyse der relativen mRNA-Expressionslevel der Proteine p16^{INK4a} (D) und p21^{CIP1} (E) unterstützt diese Signifikanz. n = 3-5, Mittelwert + SEM, *p<0.05, ***p<0.001. Die Experimente für A-C wurden von A. Baisanry (PhD) und D von N. Susnik (PhD) erstellt.

Daten modifiziert dargestellt in Abb. 2 aus (Berkenkamp, Susnik *et al.*, 2014).

3.2 Charakterisierung von jungen und alten Tubuluszellkulturen

Als *in vitro*-Modell zur weiterführenden Charakterisierung der intrinsischen Regenerationsfähigkeit von renalen Tubuluszellen wurde die primäre Zellkultur von murinen Tubuluszellen, nachfolgend auch als PTECs (proximale tubule epithelial cell) bezeichnet, ausgewählt. Dafür wurde ein bereits bestehendes Isolations- und Kulturprotokoll zwecks Standardisierung modifiziert, um möglichst gleichbleibende Bedingungen für die Vergleichsuntersuchungen jung/alt zu schaffen.

3.2.1 Standardisierung der primären Tubuluszellkultur

Die Isolierung des gewünschten Zelltyps, nämlich der kortikalen Tubuluszellen, erfolgte zunächst durch einen mehrstufigen Prozess aus mechanischer und enzymatischer Zerkleinerung der Nieren. Die Abtrennung der Tubuli von den anderen Bestandteilen wie z.B. der Glomeruli aus der Gewebesuspension erfolgte durch selektives Sieben. Die isolierten Tubuli wurden in einem Zellkulturmedium speziell für renale Epithelzellen suspendiert und auf Zellkulturplatten kultiviert (Abb. 10 G). Da die Aussaatdichte für den Anwachsenerfolg der Tubuli eine Rolle spielt, aber die Auszählung der Tubuli mithilfe einer Zählkammer zur Dichtebestimmung nicht geeignet war, wurde die Suspension über die Einstellung eines bestimmten OD_{600nm}-Wertes standardisiert. Die Aussaatdichte wurde anschließend noch semiquantitativ mikroskopisch in der Aussaatschale kontrolliert.

Die epitheliale Herkunft der Mehrheit der angewachsenen Zellen wurde durch die Analyse von Zelltypmarkern mittels Western Blot bzw. Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die PTECs waren im Western Blot und in der Immunfluoreszenz positiv für die Epithelzellmarker E-Cadherin (Abb. 10 A und E) und pan-Cytokeratin (Abb. 10 D und F), hingegen im Western Blot negativ für den Endothelzellmarker von Willebrand-Faktor (vWF) (Abb. 10 C) und den Fibroblastenmarker S100A4 (Abb. 10 B). Im Western Blot zeigten Lysate aus Kontrollzellkulturen sowohl für den von Willebrand-Faktor (Abb. 10 C; HUVEC = humane Endothelzellen) als auch für das S100A4-Protein (Abb. 10 B; MEF = murine Fibroblasten aus Embryonen und HF = humane Fibroblasten) die zelltypischen positiven Reaktionen.

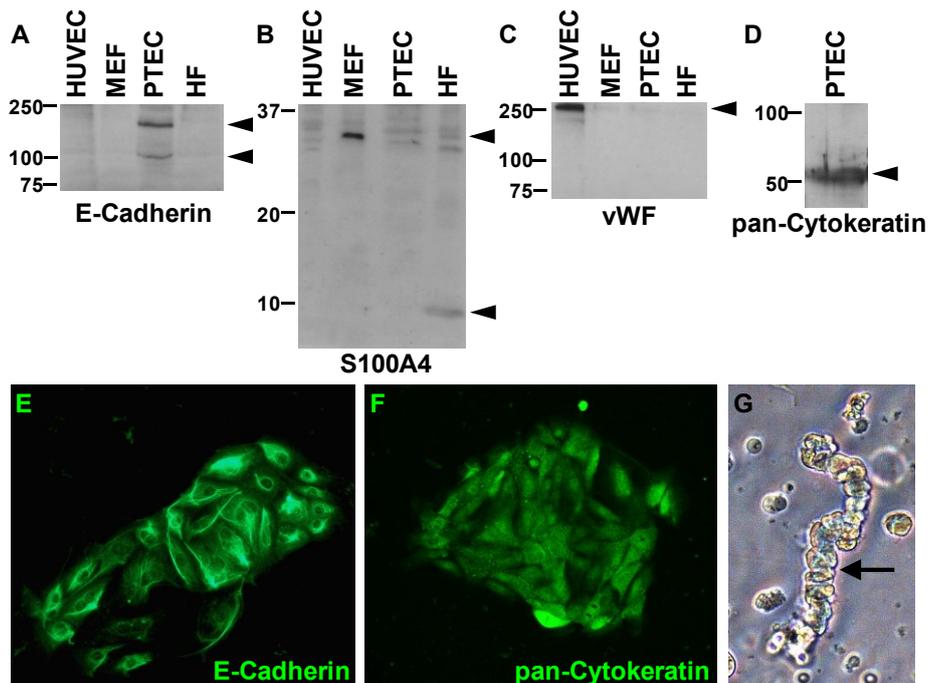


Abb. 10 Überwiegend epitheliale Zellen in der Tubuluszellkultur

Dargestellt ist der Nachweis der Zelltypmarker E-Cadherin (A, E) und pan-Cytokeratin (D, F) für Epithelzellen, S100A4 (B) für Fibroblasten, vWF (C) für Endothelzellen mittels Western Blot (A-D) aus Lysaten verschiedener Zelltypen (HUVEC, MEF, PTEC, HF) sowie Immunfluoreszenz (E, F) in PTECs und ein frisch isolierter Tubulus (G). Die jeweiligen Zelltypen zeigen die zelltypischen Marker.

Vergleiche auch die Darstellung von Epithelzellmarkern in Abb. 6 aus (Berkenkamp, Susnik *et al.*, 2014).

Um in einem folgenden Versuchsteil das Zellkulturverhalten der PTECs im Hinblick auf Proliferation, Apoptose und Seneszenz von verschiedenen Gruppen (z.B. Alter, Genotyp, Behandlung) miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst die Zellkultur der jungen C57BL/6 Wildtyp-Maus als Referenzkultur betrachtet. Da sich die zelluläre Zusammensetzung einer primären Zellkultur mit steigender Kulturdauer in der artifiziellen Umgebung unter Umständen stark verändern kann und in diesem Versuch die Zellen möglichst ihre ursprünglichen Eigenschaften beibehalten sollten, wurde ein Kurzzeitprotokoll gewählt. Die Zellen wurden zunächst an den Kulturtagen 3, 6 und 10 analysiert.

Unter dem Mikroskop konnte man an Tag 3 bereits kleine, aus den Tubulusstückchen herausgewachsene Zellinseln beobachten, die sich im Verlauf durch Zellteilung und später auch durch individuelles Zellwachstum stetig vergrößerten, um an Tag 10 einen nahezu konfluenten Zellrasen gebildet zu haben (Abb. 11 A-C).

Für die Charakterisierung der Proliferation konnte an den Kulturtagen 3 und 6 mit 14 bzw. 19 % ein signifikant höherer Anteil BrdU positiver Zellen als an Tag 10 mit 4 % gezählt werden (Abb. 11 D-F; Abb. 12 B). Trotzdem war die Zellzahl/HPF an Tag 10 signifikant höher als an Tag 6 und die Kultur hatte an diesen beiden Tagen signifikant mehr Zellen als an Tag 3 (Abb. 12 A).

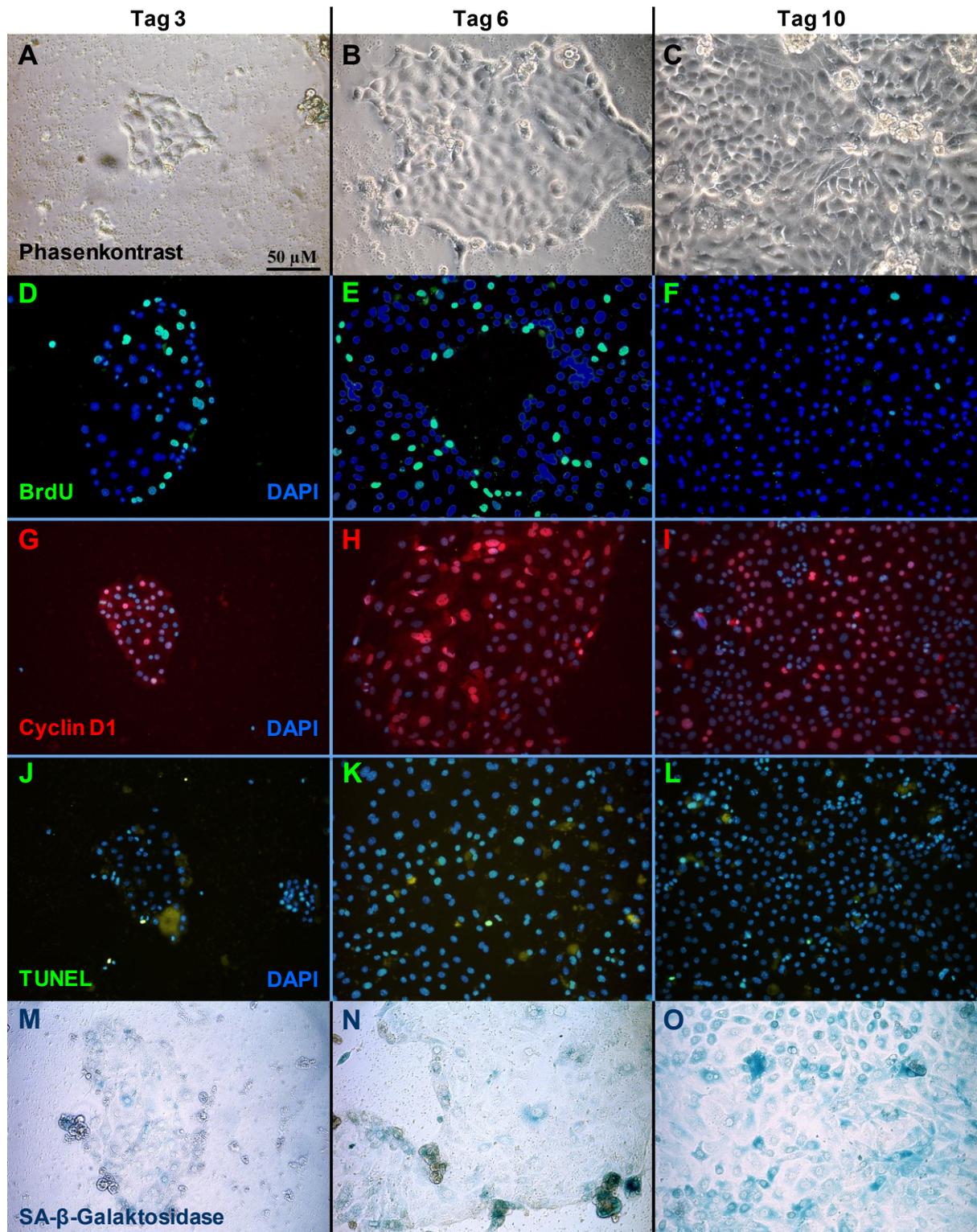


Abb. 11 Mikroskopie der Tubuluszellkultur des jungen Wildtyps an Tag 3, 6 und 10.

Dargestellt sind repräsentative Fotos der quantitativ ausgewerteten Analysen aus Abb. 12 für die PTEC-Kulturtage 3, 6 und 10: Zellzahl (A-C), BrdU Assay (D-F), Cyclin D1-Färbung (G-I), TUNEL-Färbung (J-L) und SA-β-Galaktosidase-Färbung (M-O).

Der insgesamt kleine Anteil an apoptotischen Zellen von maximal 3 % war an Tag 3 jeweils signifikant größer als an Tag 6 und 10 (Abb. 11 J-L; Abb. 12 D). Dagegen konnte ein stetig steigender Anteil von seneszenten Zellen von Tag 3 bis Tag 10 beobachtet werden, mit

signifikant mehr SA- β -Galaktosidase positiven Zellen an Tag 10 als an Tag 3 und 6 (Abb. 11 M-O; Abb. 12 E). Der Anteil an Cyclin D1 positiven Zellen blieb im Kulturverlauf auf einem konstanten Niveau von ca. 55 % (Abb. 11 G-I; Abb. 12 C).

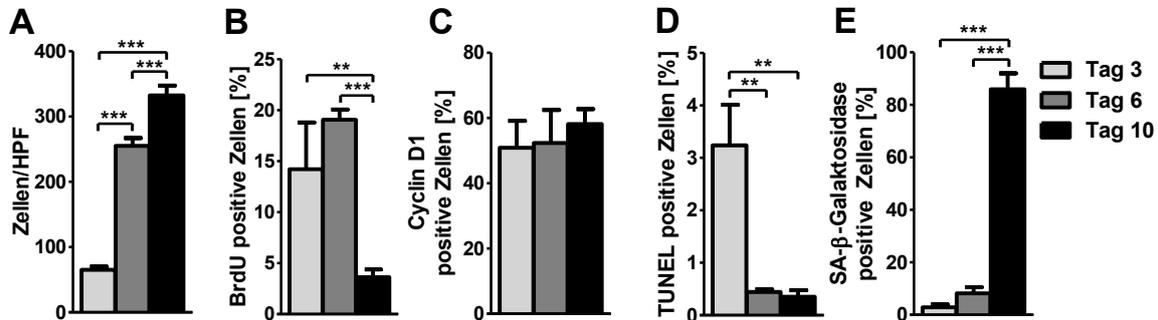


Abb. 12 Quantifizierung der mikroskopischen Analysen der Tubuluszellkultur des jungen Wildtyps

Dargestellt ist die quantitative Analyse folgender Parameter im Kulturverlauf von Tag 3 über Tag 6 bis Tag 10 der PTECs: Zellzahl/HPF (A), der prozentuale Anteil der BrdU positiven Zellen als Proliferationsmarker (B), der prozentuale Anteil Cyclin D1 positiver Zellen (C), der prozentuale Anteil der TUNEL positiven Zellen (D) als Apoptosemarker und der prozentuale Anteil der SA- β -Galaktosidase positiven Zellen als Seneszenzmarker (E). Die Proliferation und die Seneszenz verhalten sich wie erwartet gegenläufig im Kulturverlauf (B und E). n = 4-8, Mittelwert + SEM **p < 0.01; ***p < 0.001.

3.2.2 Proliferation in jungen und alten Tubuluszellkulturen

Das für die Kultivierung der renalen Epithelzellen verwendete Zellkulturmedium enthält den Wachstumsfaktor EGF (Epidermal Growth Factor) als mitogenes Agens, um die Proliferation der Zellen in der artifiziellen Umgebung zu induzieren und aufrechtzuerhalten. Um eventuelle Unterschiede in der Proliferationskapazität von jungen und alten Tubuluszellen auch auf diesen mitogenen Reiz hin zu untersuchen, wurden die Zellen jeweils an Tag 3 und 6 mithilfe der Proliferationsmarker Ki67 (Abb. 13 A) und BrdU (Abb. 13 B) analysiert.

An keinem der untersuchten Zeitpunkte unterschieden sich die prozentualen Anteile an Ki67 bzw. BrdU positiven Zellen von jungen und alten Tubuluszellen (Abb. 13 A und B). Kulturtag 10 wurde grundsätzlich nicht in die Auswertungen miteinbezogen, da einige Kulturen zu diesem Zeitpunkt bereits konfluent waren. Nichtsdestotrotz gab es die Beobachtung, dass die alten Zellkulturen an Tag 10 tendenziell weniger Flächenbewuchs zeigten als die jungen Kulturen. Ausgezählt hatten die jungen Zellkulturen an Tag 10 tatsächlich eine signifikant höhere Zellzahl/HPF als die alten Zellkulturen (Abb. 13 C). Das Zuführen von Bleiacetat als zusätzliches mitogenes Agens führte in der Zellkultur an Tag 6 im Gegensatz zu den *in vivo*-Experimenten nicht zu detektierbaren Proliferationsunterschieden zwischen jungen und alten Tubuluszellen (Abb. 13 D).

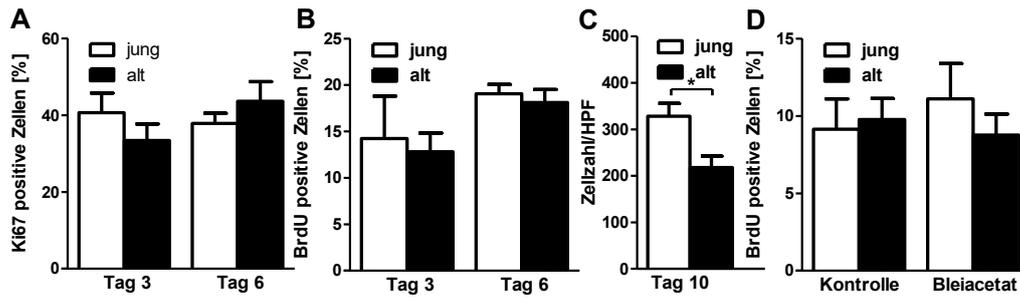


Abb. 13 Proliferationsanalyse in jungen und alten Tubuluszellkulturen

Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Ki67 (A) bzw. BrdU (B) positiven Zellen der Zellkultur von jungen und alten Nieren von Kulturtag 3 bis Kulturtag 6. (C) quantifiziert für diese beiden Gruppen die Zellzahl/HPF an Kulturtag 10. (D) zeigt den prozentualen Anteil an BrdU positiven Zellen in der Zellkultur von jungen und alten Nieren an Kulturtag 6 nach Zugabe von Kontrolle bzw. Bleiacetat. Junge und alte Zellkulturen weisen keine signifikanten Unterschiede der Proliferationsmarker auf und auch Bleiacetat hat in der Kultur keinen detektierbaren Einfluss. $n = 4 - 8$, Mittelwert + SEM, $*p < 0.05$. Die Experimente für (D) wurden von N. Susnik (PhD) erstellt.

Daten (B und D) modifiziert dargestellt in Abb. 5 (E und F) aus (Berkenkamp, Susnik *et al.*, 2014).

3.2.3 Seneszenzmarker in jungen und alten Tubuluszellkulturen

Wie bereits dargestellt, zeigten die alten Nieren *in vivo* eine signifikant erhöhte mRNA Expression der Proteine $p16^{\text{INK4a}}$ und $p21^{\text{CIP1}}$. Für die Seneszenzanalyse auf mRNA-Ebene wurden bei jungen und alten Tieren zunächst die frisch isolierten Tubuli untersucht, um den Zustand vor der Zellkultur zu bestimmen. Von dem Seneszenzmarker $p16^{\text{INK4a}}$ (Abb. 14 B) wurde signifikant mehr mRNA in alten Tubuli exprimiert, wohingegen es bei $p15^{\text{INK4b}}$ (Abb. 14 A), $p19^{\text{ARF}}$ (Abb. 14 C) und $p21^{\text{CIP1}}$ (Abb. 14 D) keine signifikanten Unterschiede gab.

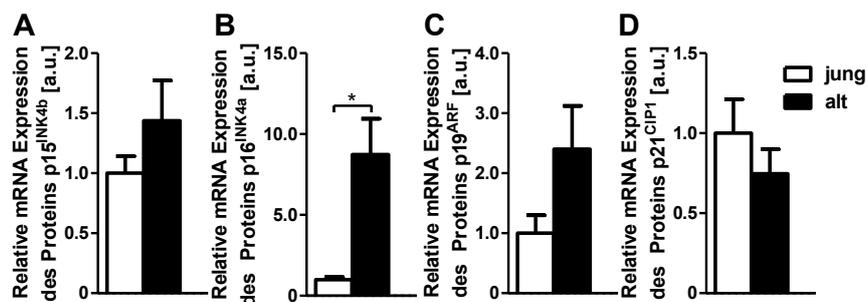


Abb. 14 Vergleich jung versus alt der CDKI mRNA Expression in isolierten Tubuli

Dargestellt ist die relative mRNA Expression der Proteine $p15^{\text{INK4b}}$ (A), $p16^{\text{INK4a}}$ (B), $p19^{\text{ARF}}$ (C) und $p21^{\text{CIP1}}$ (D) in jungen und alten Tubuli. Alte Tubuli exprimieren signifikant mehr mRNA des Proteins $p16^{\text{INK4a}}$ (B) als junge Tubuli. $n = 3 - 4$, Mittelwert + SEM, $*p < 0.05$.

Daten (A - C) modifiziert dargestellt in Abb. 5 (A-C) aus (Berkenkamp, Susnik *et al.*, 2014).

Die Seneszenzmarker bzw. Zellzyklusinhibitoren wurden im Verlauf der Tubuluszellkultur von jungen und alten Wildtyp-Mäusen von Tag 0 über Tag 3 bis Tag 6 quantifiziert und statistisch mit einer zweifaktoriellen ANOVA (Alter/Kulturtag) analysiert (Abb. 15 A-E). Der Anstieg der mRNA Expression der Proteine $p15^{\text{INK4b}}$ (Abb. 15 A), $p16^{\text{INK4a}}$ (Abb. 15 B), $p19^{\text{ARF}}$ (Abb. 15 C) und $p21^{\text{CIP1}}$ (Abb. 15 D) ausgehend von den isolierten Tubuli bis zum Kulturtag 6 war in

beiden Altersgruppen insbesondere für p19^{ARF} (ca. 3500-fach) so groß, dass zur adäquaten Darstellung in vergleichbaren Diagrammen eine logarithmierte Skalierung verwendet werden musste. Bei beiden Altersgruppen führte der Kultivierungsprozess an sich zu einem statistisch signifikanten Anstieg dieser Marker von Tag 0 zu Tag 6 und auch von Tag 3 zu Tag 6 (Abb. 15 A-D). Die Aktivität der SA-β-Galaktosidase wurde nur an Tag 3 und Tag 6 untersucht, folgte aber diesem Trend: Beide Altersgruppen hatten an Tag 6 signifikant mehr SA-β-Galaktosidase positive Zellen in der Kultur als an Tag 3 (Abb. 15 E). Eine altersrelevante Signifikanz gab es lediglich an Tag 6, an dem sich die jungen von den alten Kulturen signifikant bei der mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} und p19^{ARF} (Abb. 17 A und C; in Abb. 15 nicht dargestellt) unterschieden.

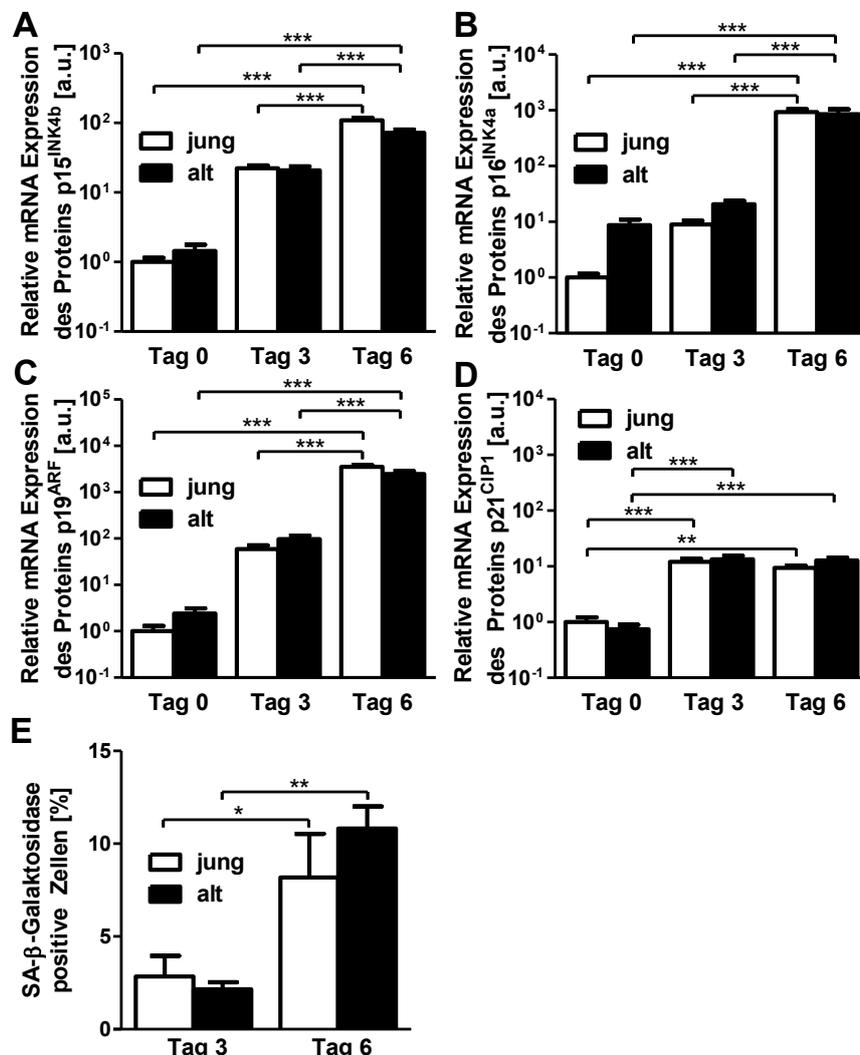


Abb. 15 Vergleich jung versus alt der CDKI mRNAs bzw. Seneszenzmarker im Verlauf der Zellkultur
 Dargestellt ist jeweils der Verlauf der relativen mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (A), p16^{INK4a} (B), p19^{ARF} (C) und p21^{CIP1} (D) während der Isolierung und Kultivierung von jungen und alten Tubuluszellen von Tag 0 über Tag 3 bis Tag 6, sowie die Quantifizierung SA-β-Galaktosidase positiver Zellen (E) in diesen Kulturen an Tag 3 und Tag 6. Die CDKI mRNAs steigen bei beiden Altersgruppen während der Kultivierung stark und signifikant an. n = 3 -11, Mittelwert + SEM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.
 Daten (außer D) modifiziert dargestellt in Abb. 5 (A-D) aus (Berkenkamp, Susnik *et al.*, 2014).

3.2.4 Vergleich von Wildtyp- und *Terc*^{-/-}-Maus (G3) in der Zellkultur

Junge *Terc*^{-/-}-Mäuse (G3), bei denen es aufgrund der Inaktivität der Telomerase zu sukzessiver Telomerverkürzung kommt, wurden als Alterungsmodell in die Zellkulturversuche miteinbezogen.

Zunächst ergab die Analyse der frisch isolierten Tubuli, dass sowohl die Tubuli junger Wildtypen als auch die Tubuli junger *Terc*^{-/-}-Mäuse (G3) eine signifikant niedrigere mRNA Expression des Proteins p16^{INK4a} zeigten als die Tubuli alter Wildtyp-Mäuse (Abb. 16 B). Die mRNA Expression des Proteins p21^{CIP1} dagegen war in den Tubuli junger *Terc*^{-/-}-Mäuse (G3) signifikant höher als in den Tubuli der jungen und auch der alten Wildtyp-Mäuse (Abb. 16 D). Die mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} und p19^{ARF} war statistisch bei allen Gruppen gleich, die Tubuli alter Wildtyp-Mäuse zeigten jedoch jeweils den höchsten Wert (Abb. 16 A, C).

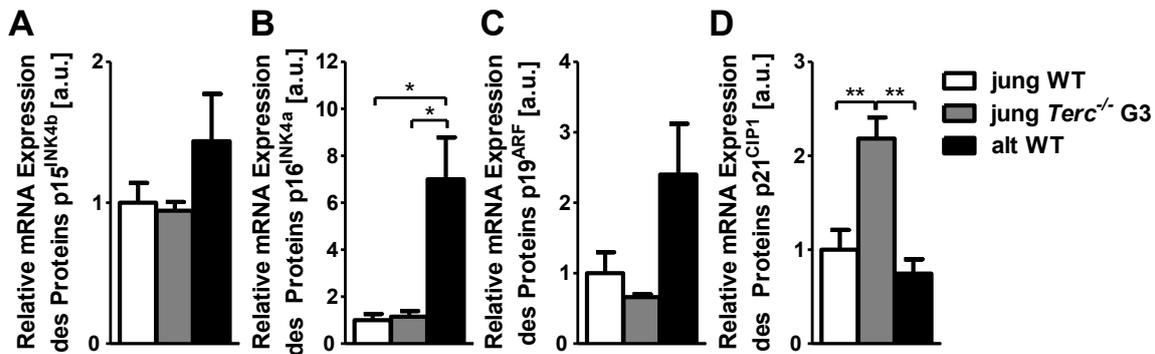


Abb. 16 Vergleich der CDKI mRNA Expression in Tubuli von Wildtyp- und *Terc*^{-/-}-Mäusen (G3)

Dargestellt sind die relativen mRNA Expressionen der Proteine p15^{INK4b} (A), p16^{INK4a} (B), p19^{ARF} (C) und p21^{CIP1} (D) in den frisch isolierten Tubuli von jungen Wildtyp-, jungen *Terc*^{-/-} (G3)- und alten Wildtyp-Mäusen. Die Tubuli von alten Wildtyp-Mäusen exprimieren signifikant mehr mRNA des Proteins p16^{INK4a} und die Tubuli von jungen *Terc*^{-/-} (G3)-Mäusen signifikant mehr mRNA des Proteins p21^{CIP1} als die jeweiligen anderen Gruppen. n = 3 - 4, Mittelwert + SEM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Die Seneszenzmarker bzw. Zellzyklusinhibitoren und ein Proliferationsmarker wurden wiederum im Kulturverlauf der Tubuluszellen von jungen und alten Wildtyp- bzw. von jungen *Terc*^{-/-} (G3)-Mäusen von Tag 0 über Tag 3 bis Tag 6 quantifiziert und statistisch mit einer zweifaktoriellen ANOVA (Alter/Kulturtag) analysiert (Abb. 17 A-F). Eine altersabhängige Signifikanz zeigte sich bei den Mehrfachvergleichen einzig an Tag 6, an dem die PTECs der jungen Wildtyp-Mäuse jeweils eine höhere mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (Abb. 17 A) und p19^{ARF} (Abb. 17 C) als die Kulturen der jungen *Terc*^{-/-} (G3)- und auch der alten Wildtyp-Mäuse aufwiesen. Ebenfalls an Tag 6 wiesen die PTECs der jungen *Terc*^{-/-} (G3)-Mäuse signifikant weniger SA-β-Galaktosidase (Abb. 17 E) und mehr BrdU (Abb. 17 F) positive Zellen auf als sowohl die PTECs der jungen und auch der alten Wildtyp-Mäuse.

Wie bereits für den Vergleich der PTECs von jungen und alten Wildtyp-Mäusen beschrieben (vgl. Abb. 15 A-D), führte wiederum bei allen Gruppen, mit Ausnahme von p21^{CIP1} von Tag 3 zu Tag 6 in der Kultur der jungen *Terc*^{-/-}-Mäuse (G3), der Kultivierungsprozess an sich zu einem statistisch signifikanten Anstieg der CDKI mRNA Expression von Tag 0 zu Tag 3 und auch von Tag 0 zu Tag 6 (Abb. 17 A-D, Kulturdauerabhängige Signifikanzen hier aber nicht dargestellt).

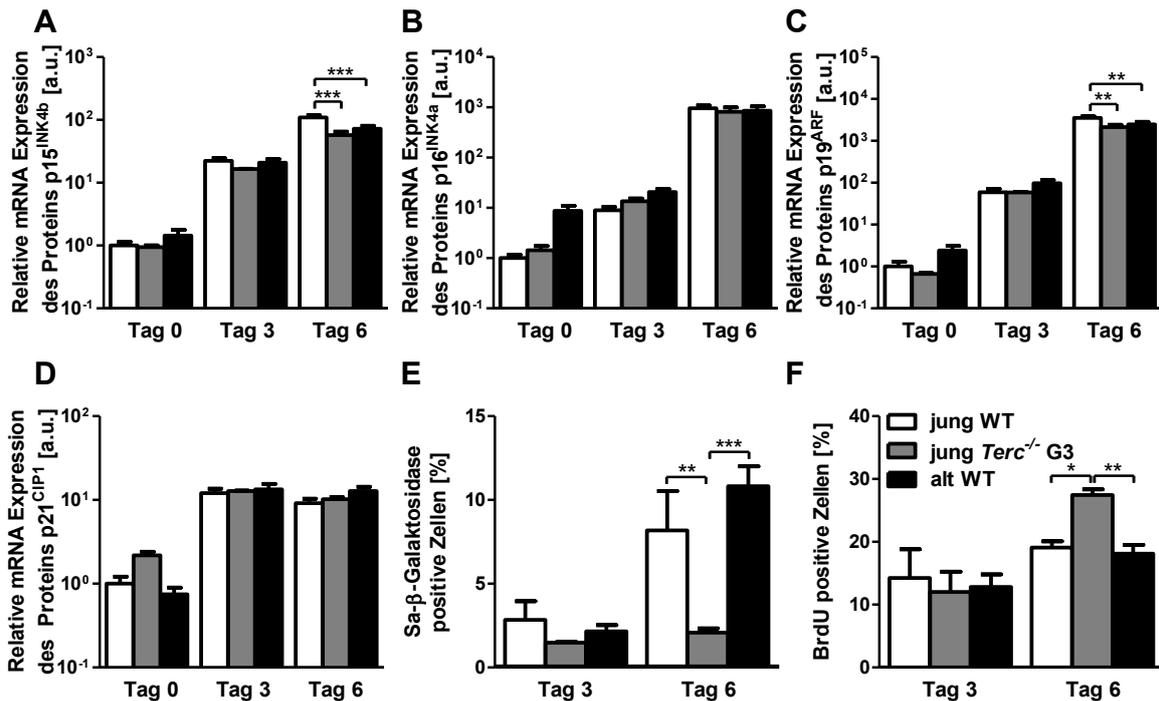


Abb. 17 Vergleich der Seneszenz und Proliferation von Wildtyp und *Terc*^{-/-}(G3) in der Zellkultur
 Dargestellt ist jeweils der Verlauf der relativen mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (A), p16^{INK4a} (B), p19^{ARF} (C) und p21^{CIP1} (D) während der Isolierung und Kultivierung von Tubuluszellen von jungen und alten Wildtypen bzw. jungen *Terc*^{-/-}-Mäusen (G3) von Tag 0 über Tag 3 bis Tag 6, sowie die Quantifizierung SA-β-Galaktosidase (E) bzw. BrdU (F) positiver Zellen in diesen Kulturen an Tag 3 und Tag 6. Innerhalb der Gruppen gibt es an Tag 6 signifikante altersabhängige Unterschiede für p15^{INK4b} (A), p19^{ARF} (C), SA-β-Galaktosidase (E) und BrdU (F). n = 3 - 11, Mittelwert + SEM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

3.2.5 Vergleich von Wildtyp- und *Ink4a*^{-/-}-Maus in der Zellkultur

Als Gegenpol zu dem *Terc*^{-/-}-Alterungsmodell wurden auch die Tubuluszellen alter *Ink4a*^{-/-}-Mäuse mit funktionslosem p16^{Ink4a}-Seneszenzweg und die der dazugehörigen alten Wildtyp-Mäuse in der Zellkultur untersucht. Die Analyse der frisch isolierten Tubuli ergab, dass die Tubuli alter Wildtyp-Mäuse eine signifikant höhere mRNA Expression des Proteins p19^{ARF} (Abb. 18 B) zeigten als die Tubuli alter *Ink4a*^{-/-}-Mäuse, es bei der mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (Abb. 18 A) und p21^{CIP1} (Abb. 18 C) dagegen keine Unterschiede gab.

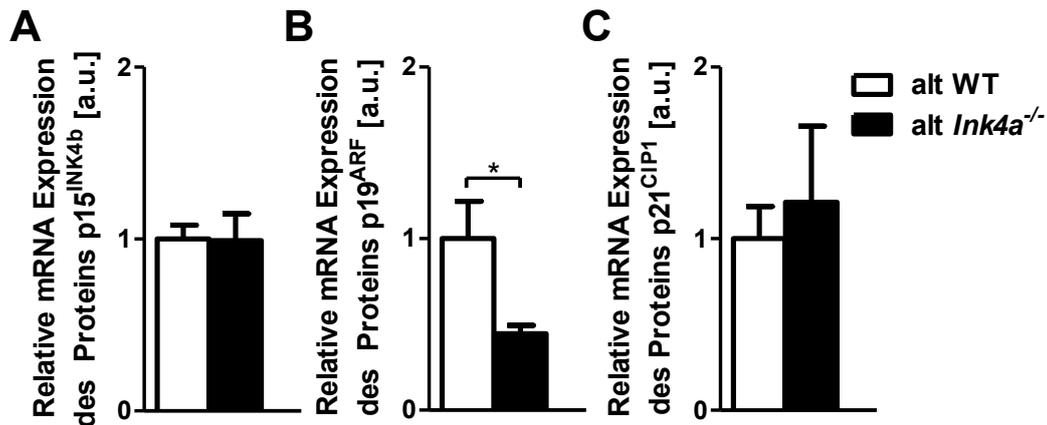


Abb. 18 Vergleich der CDKI mRNA Expression in Tubuli von Wildtyp- und *Ink4a*^{-/-}-Mäusen

Dargestellt sind die relativen mRNA Expressionen der Proteine p15^{INK4b} (A), p19^{ARF} (B) und p21^{CIP1} (C) in frisch isolierten Tubuli von alten Wildtyp- und alten *Ink4a*^{-/-}-Mäusen. Die Tubuli alter Wildtyp-Mäuse zeigen eine signifikant höhere mRNA Expression des Proteins p19^{ARF} (B). n = 4, Mittelwert + SEM. *p < 0.05.

Auch für diese beiden Alterungsmodelle alte Wildtyp- versus alte *Ink4a*^{-/-}-Maus wurden die Zellzyklusinhibitoren im Kulturverlauf von Tag 0 über Tag 3 bis Tag 6 quantifiziert und statistisch mit einer zweifaktoriellen ANOVA (Alter/Kulturtag) analysiert (Abb. 19 A-C).

Eine modellabhängige Signifikanz zeigte sich bei den Mehrfachvergleichen einzig an Tag 6, an dem die Tubuluszellkulturen der alten *Ink4a*^{-/-}-Mäuse jeweils eine höhere mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (Abb. 19 A) und p19^{ARF} (Abb. 19 B) als die Kulturen der alten Wildtyp-Mäuse aufwiesen. Weiterhin führte der Kultivierungsprozess an sich wiederum zu signifikanten zeitabhängigen mRNA Expressionsunterschieden (Abb. 19 A-C, Kulturdauer-abhängige Signifikanzen hier nicht dargestellt). Die mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (Abb. 19 A) und p19^{ARF} (Abb. 19 B) stieg in beiden Gruppen von Tag 0 und Tag 3 zu Tag 6 hoch signifikant an, die mRNA Expression des Proteins p21^{CIP1} dagegen von Tag 0 zu Tag 3 und Tag 6 (Abb. 19 C).

Eine gruppenabhängige Signifikanz zeigte sich bei den Mehrfachvergleichen einzig an Tag 6, an dem die Tubuluszellkulturen der alten *Ink4a*^{-/-}-Mäuse jeweils eine höhere mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (Abb. 19 A) und p19^{ARF} (Abb. 19 B) als die Kulturen der alten Wildtyp-Mäuse aufwiesen.

Beide Gruppen hatten an Tag 6 den gleichen Anteil an proliferierenden Zellen (Abb. 19 E), aber die Kulturen der alten Wildtyp-Mäuse hatten einen signifikant höheren Anteil an SA-β-Galaktosidase positiven Zellen (Abb. 19 D). Die SA-β-Galaktosidase (Abb. 19 D) sowie die BrdU positiven Zellen (Abb. 19 E) konnten für diese Gruppen nur an Tag 6 analysiert werden.

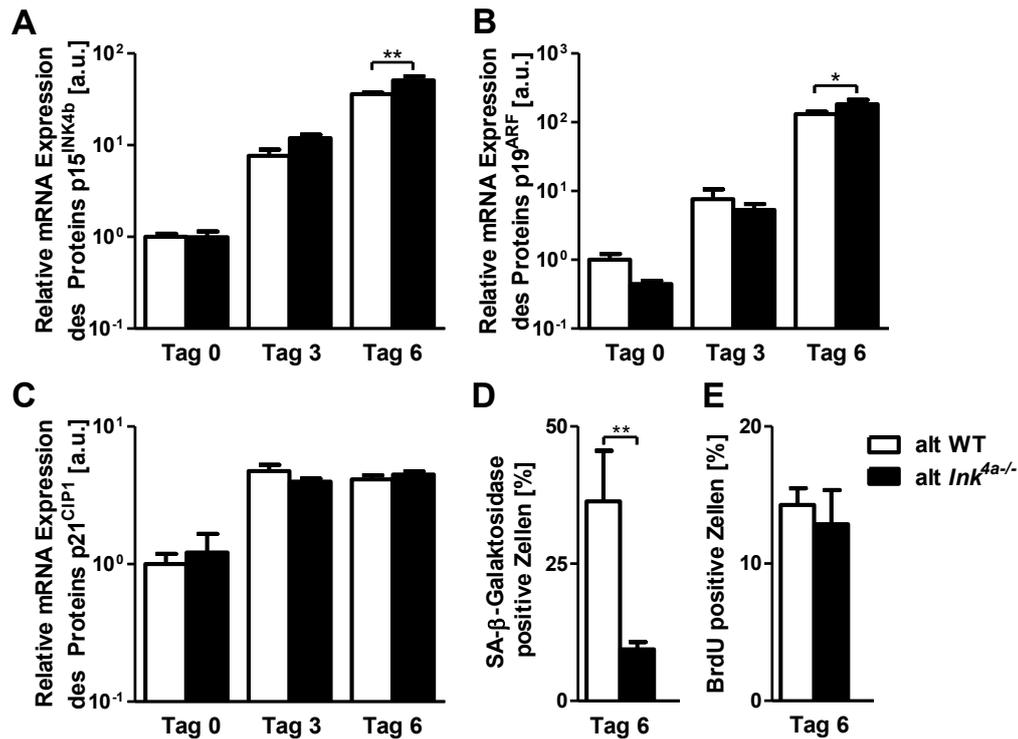


Abb. 19 Vergleich der Seneszenz und Proliferation von Wildtyp und *Ink4a*^{-/-} in der Zellkultur

Dargestellt ist jeweils der Verlauf der relativen mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (A), p19^{ARF} (B) und p21^{CIP1} (C) während der Isolierung und Kultivierung von Tubuluszellen alter Wildtyp- bzw. *Ink4a*^{-/-}-Mäuse von Tag 0 über Tag 3 bis Tag 6, sowie die Quantifizierung SA-β-Galaktosidase (D) bzw. BrdU (E) positiver Zellen in diesen Kulturen an Tag 6. Innerhalb der Gruppen gibt es an Tag 6 signifikante Unterschiede für p15^{INK4b} (A), p19^{ARF} (B) und SA-β-Galaktosidase (D). n = 4, Mittelwert + SEM, *p < 0.05, **p < 0.01.

3.2.6 Die Zellzyklusinhibitorexpression im Kulturverlauf

Zur Veranschaulichung des nur durch die Kulturbedingungen erzeugten Stresses wird die CDKI mRNA Expression des jungen Wildtyps im Verlauf der Tubuluszellkultur (Abb. 20) zusammengefasst dargestellt.

Die Analyse der mRNA-Level der Zellzyklusinhibitoren p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p19^{ARF} und p21^{CIP1} zeigte, dass die frisch isolierten Tubuli jeweils die geringste mRNA Expression im Vergleich zu den kultivierten Zellen aufwiesen. Insbesondere an Tag 6 war der Unterschied des Expressionslevels im Vergleich zu den Tubuli für alle mRNAs hoch signifikant.

Die mRNA Expressionslevel der Proteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p19^{ARF} stiegen im Kulturverlauf kontinuierlich bis Tag 6 an (p15^{INK4b} ~ 70-fach, p16^{INK4a} ~ 900-fach, p19^{ARF} ~ 3500-fach) während die mRNA Expression von p21^{CIP1} (12-fach) von Tag 3 bis Tag 6 ein Plateau zeigte (Abb. 20). Damit wurden zwar von Beginn der Inkulturnahme an Seneszenz-assoziierte mRNAs (Abb. 20) und auch die SA-β-Galaktosidase-Aktivität (Abb. 11 M-O, Abb. 12 E) in den Tubuluszellen hochreguliert, aber sogar an Tag 10 zeigten nur wenige Zellen die typische Morphologie seneszenten Zellen (vergleiche Abb. 11 O).

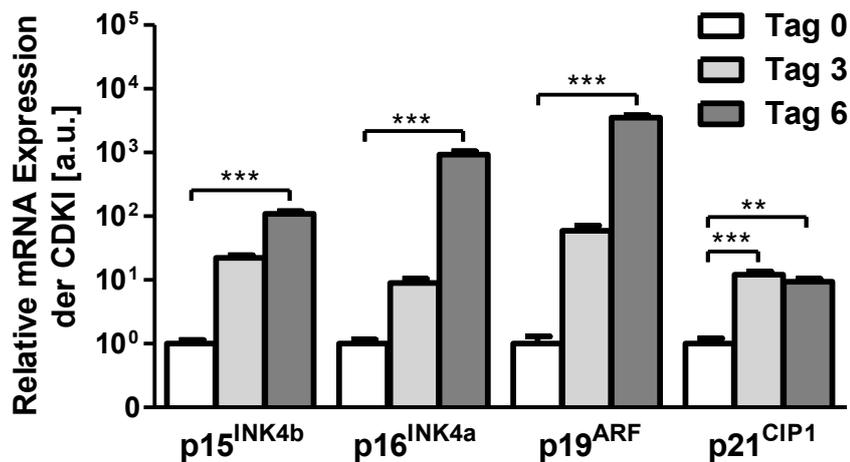


Abb. 20 CDKI mRNA Expression im Verlauf der Tubuluszellkultur der jungen C57BL/6 Wildtyp-Maus
 Dargestellt ist die quantitative Analyse der mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p19^{ARF} und p21^{CIP1} aus frisch isolierten Tubuli (Tag 0) und im Kulturverlauf von Tag 3 bis Tag 6 der Tubuluszellkultur. An Tag 6 ist das mRNA Level aller CDKIs signifikant höher als an Tag 0. n = 3 - 10, Mittelwert + SEM, **p<0.01, ***p<0.001.

3.2.7 Seneszenz durch Bestrahlung in der Tubuluszellkultur

Für Zellkulturexperimente an seneszenten Tubuluszellen ist der alleinige Vorgang der kurzzeitigen Kultivierung von Tubuluszellen alter Mäuse nicht ausreichend. Ionisierende Strahlung erzeugt DNA-Doppelstrangbrüche und aktiviert damit unter anderem Seneszenz- und Apoptosesignalwege. PTECs wurden an Kulturtag 6 mit 10 Gy bestrahlt, für weitere 10 Tage kultiviert und anschließend auf Seneszenz- Proliferations- und Apoptosemarker untersucht und mit unbestrahlten PTECs gleicher Kulturdauer verglichen.

Die PTECs exprimierten auch nach dieser Behandlung typische Marker wie ZO-1, Aqp-2 und E-Cadherin (E-Cad; Abb. 21 H) und konnten damit weiterhin den renalen Tubulusepithelzellen zugeordnet werden. Die bestrahlten PTECs zeigten typische morphologische Kennzeichen von seneszenten Zellen wie Zellabflachung und Zellvergrößerung im Gegensatz zu den unbestrahlten PTECs, die deutlich kleiner und noch eher spindelförmig waren (Abb. 21 B).

Auf Proteinebene hatten beide Kulturen vergleichbare p16^{INK4a}-Level, während die bestrahlte Kultur sowohl mehr p21^{CIP1}, mehr p53 und auch mehr Cyclin D1 produzierte, aber wie erwartet weniger des Seneszenzmarkers Lamin B1 (Abb. 21 A).

Die bestrahlten Zellen hatten zudem einen signifikant größeren Anteil an SA-β-Galaktosidase (Abb. 21 B und C), Ki67/γ-H2A.X (Abb. 21 B und D) und Cyclin D1 (Abb. 21 I) positiven Zellen, während der Anteil an proliferierenden BrdU positiven Zellen signifikant kleiner war (Abb. 21 B und E). Die Apoptoserate war bei beiden, unbestrahlten und bestrahlten, PTECs gering und nicht signifikant verschieden (Abb. 21 F und G).

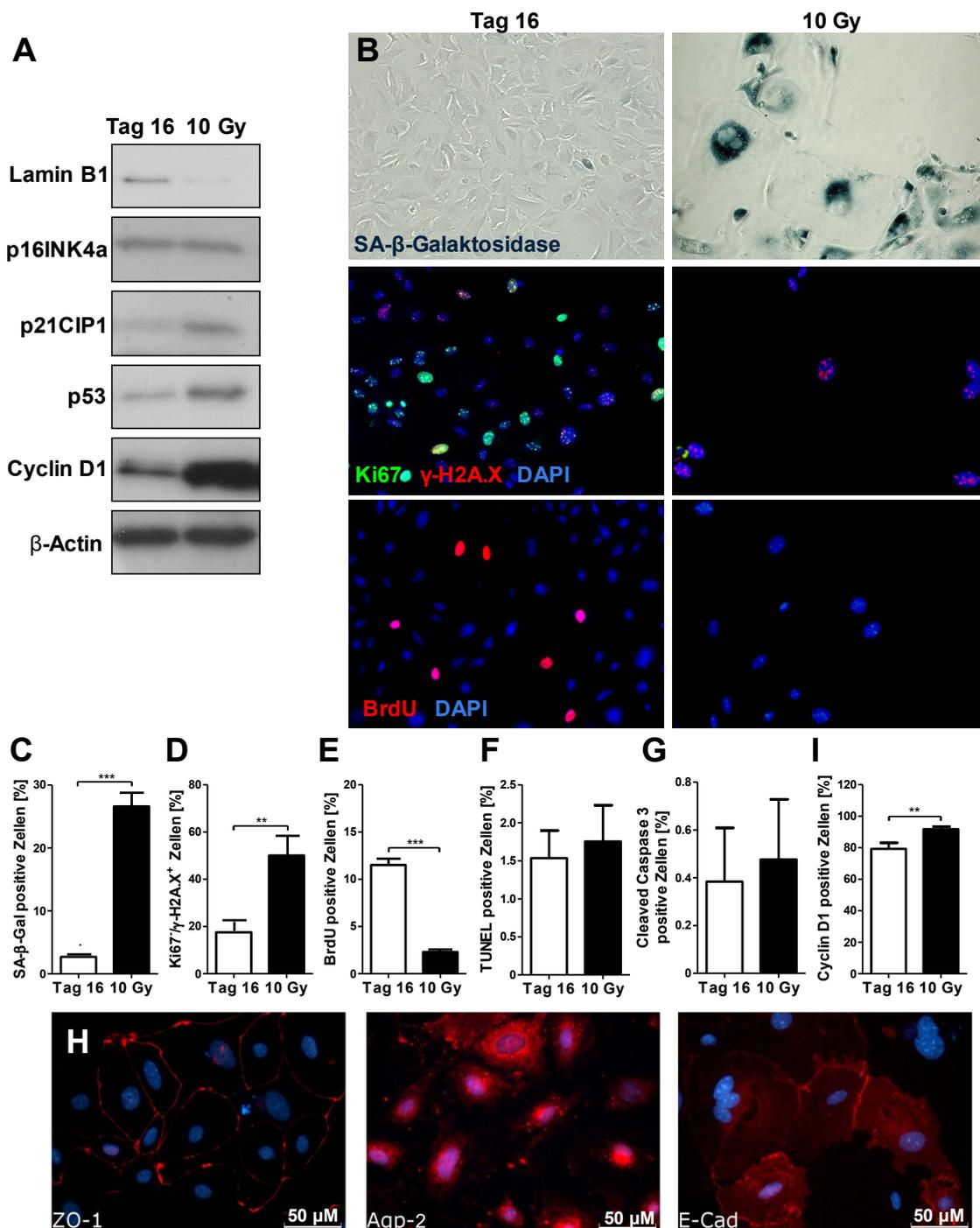


Abb. 21 Bestrahlung mit 10 Gy erzeugt seneszente Tubuluszellen

Dargestellt ist der Vergleich von Seneszenz, Proliferation und Apoptose in unbestrahlten und bestrahlten (10 Gy) PTECs an Kulturtag 16. (A) zeigt repräsentative Western Blots der relativen Proteinlevel des Seneszenzmarkers Lamin B1, der Zellzyklusregulatoren p16^{INK4a}, p21^{CIP1}, p53 und Cyclin D1 mit β-Actin als Ladekontrolle. In (B) sind repräsentative Aufnahmen der SA-β-Galaktosidase-Aktivität, der Ki67/γ-H2A.X- und der BrdU-Färbung zu sehen. In den unbestrahlten und bestrahlten Kulturen wurden die SA-β-Galaktosidase (C), die Ki67/γ-H2A.X (D), die BrdU (E), die TUNEL (F), die Cleaved Caspase 3 (G) und die Cyclin D1 (I) positiven Zellen quantifiziert. Die bestrahlten Kulturen zeigen morphologisch und auf molekularer Ebene vermehrt Anzeichen von Seneszenz, exprimieren aber weiterhin für renale Tubuluszellen typische Marker wie ZO-1, Aqp-2 und E-Cadherin (H). Mittelwert + SEM, **p<0.01, ***p<0.001. Die Experimente wurden mit Ausnahme von F und I von A. Baisantry (PhD) erstellt.

Daten (außer I) modifiziert dargestellt in Abb. 6 aus (Berkenkamp, Susnik *et al.*, 2014).

3.3 Analyse und Kultivierung von Nierenzellen aus Marmosets

Marmosets (*Callithrix jacchus*) sind nicht-humane Primaten und erfahren steigendes Interesse als Modellorganismen für die Seneszenzforschung. Eine Analyse der seneszenzassoziierten Zellzyklusinhibitoren p16^{INK4a} (Abb. 22 A) und p21^{CIP1} (Abb. 22 B) in Nierengewebe ergab für den Seneszenzmarker p16^{INK4a} eine signifikante Korrelation zwischen der mRNA Expression und dem chronologischen Lebensalter der Tiere. Die aus verschiedenen alten Nieren in Kultur gebrachten Tubuluszellen zeigten mäßiges bis gutes Wachstum, konnten problemlos passagiert werden und wurden in einer nicht-konfluenten Kultur bis maximal Tag 28 kultiviert. Mikroskopisch waren neben wenigen anderen Zellformen hauptsächlich spindelförmige epitheliale Zellen zu sehen. Vereinzelt konnte die Formierung von für die humane Tubuluszellkultur typischen kuppelförmigen Erhebungen (englisch: domes) beobachtet werden, in denen der Zellmonolayer sich von der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes abhob (Abb. 22 C). Ausgehend von den unprozessierten Nieren von zwei 40 Monate alten Tieren bis zum Kulturtag 28 in Passage 2 (P2) der zugehörigen Tubuluszellkulturen konnte ein kontinuierlicher Anstieg der mRNA-Level der Proteine p16^{INK4a} (~ 3500-fach) und p21^{CIP1} (~ 150-fach) festgestellt werden (Abb. 22 D).

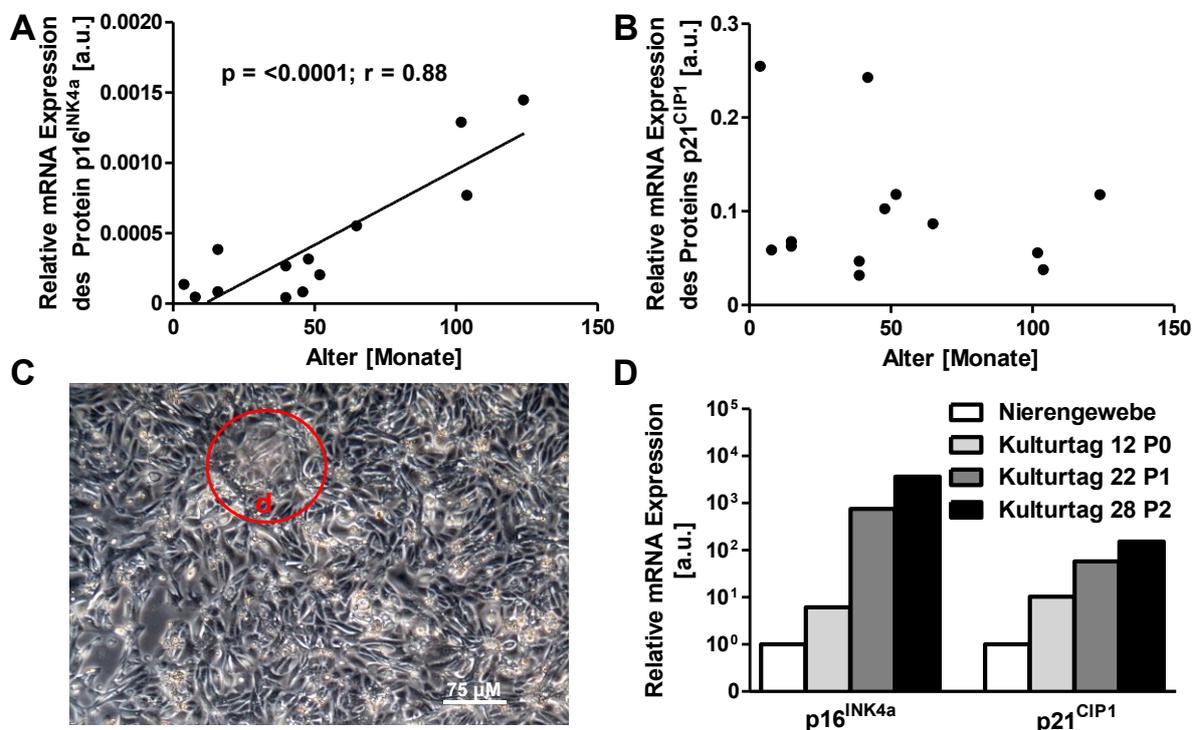


Abb. 22 CDKI mRNA Expression in Marmoset-Nieren und zweier Tubuluszellkulturen

Dargestellt ist die Korrelation der mRNA-Level der Proteine p16^{INK4a} (A) bzw. p21^{CIP1} (B) und dem chronologischen Lebensalter der Marmoset-Nieren (n = 13). (C) zeigt eine der Kulturen mit einem kleinen "dome" (d) an Tag 22 (P1) im Phasenkontrast. (D) zeigt die normalisierten mRNA-Level der Proteine p16^{INK4a} und p21^{CIP1} in Nierengewebe und im Kulturverlauf von Tag 12 (P0) über Tag 22 (P1) bis Tag 28 (P2) der Nierenzellkultur von zwei 40 Monate alten Marmosets.

Die Gruppe der Primaten bildet unter den Versuchstieren nur eine kleine Gruppe, daher werden Antikörperreaktivitäten firmenseits häufig nicht getestet. Für mögliche zukünftige Experimente mit Marmoset-Gewebe wurden daher mittels Immunfluoreszenz folgende Antikörper auf ihre Reaktivität in der Marmoset-Zellkultur getestet: Antikörper gegen pan-Cytokeratin (H-240, Abb. 23 A), E-Cadherin (H-108, Abb. 23 B), von Willebrand-Faktor (H-300, Abb. 23 C), S100A4 (Abb. 23 D), γ -H₂A.X (20E3, Abb. 23 E) und Ki67 (MIB-1, Abb. 23 F). Alle getesteten Antikörper zeigten eine gute Reaktivität mit den Marmoset-Zellen und die detektierte subzelluläre Lokalisierung der Antigene war plausibel (Abb. 23 A-F).

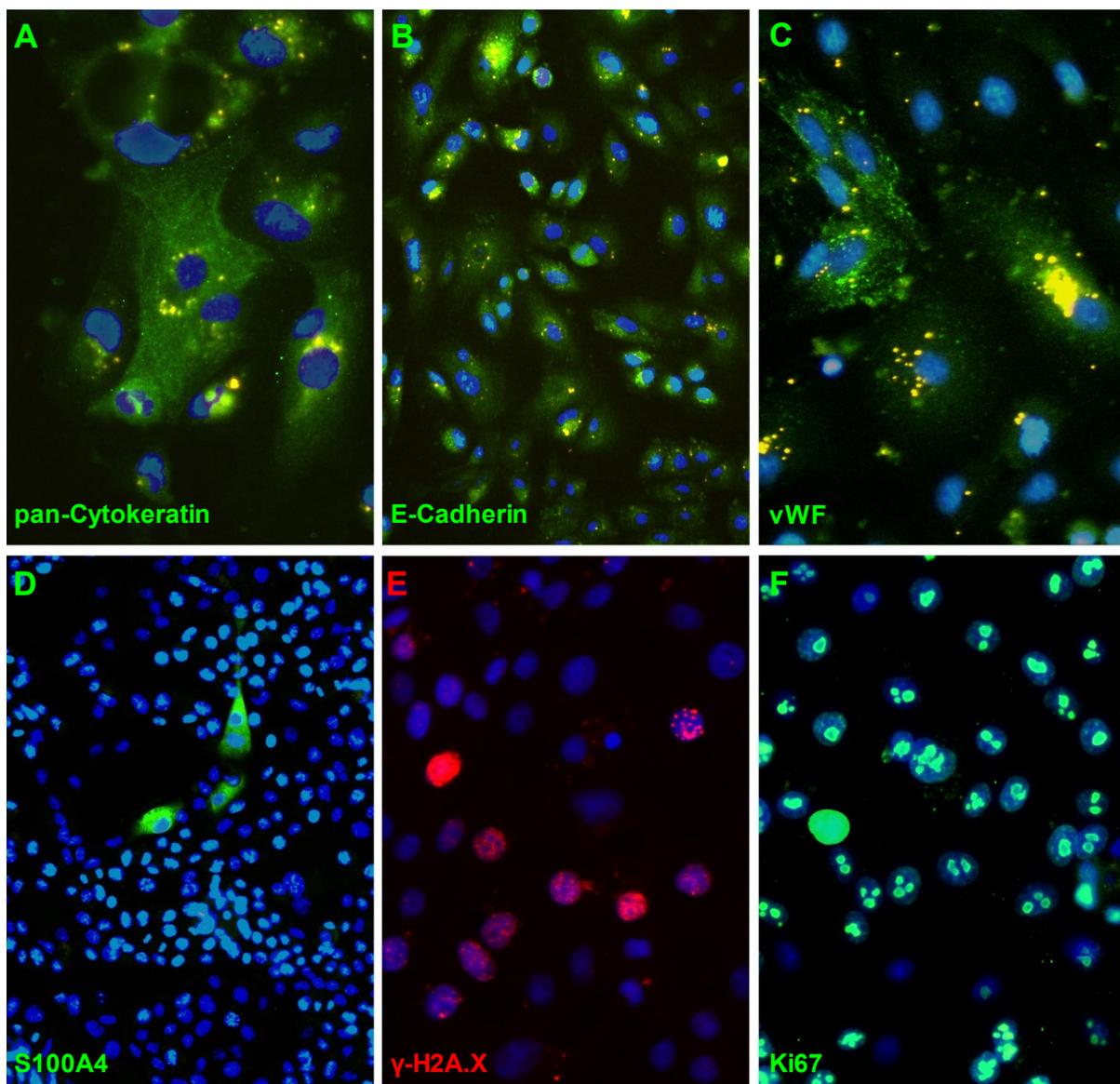


Abb. 23 Immunfluoreszenzfärbungen in der Marmoset-Tubuluszellkultur

Dargestellt sind Immunfluoreszenzfärbungen in der Marmoset Tubuluszellkultur mit folgenden Antikörpern: pan-Cytokeratin (A), E-Cadherin (B), von Willebrand-Faktor (C), S100A4 (D), γ -H₂A.X (E) und Ki67 (F). Die Kerne sind mit DAPI blau gefärbt.

3.4 siRNA vermittelter Knockdown von p53 und p16^{INK4a}

Gealtertes Nierengewebe kann sich funktionell nach Schädigungen nicht so gut regenerieren wie das Gewebe jüngerer Individuen. Dem Phänomen der zellulären Seneszenz wird dabei eine wichtige Rolle zugesprochen, denn in älterem Gewebe finden sich vermehrt seneszente Zellen. Da seneszente Zellen sich nicht nur im Zustand des Zellzyklusarrests befinden und damit nicht zur Organregeneration beitragen können, sondern durch ihr Sekretionsverhalten auch auf einer weiteren Ebene die Organhomöostase beeinflussen, sind diese Zellen ein Ziel therapeutischer Ansätze. In den nachfolgenden Kapiteln werden die Resultate eines transienten siRNA vermittelten Knockdowns der mRNAs der seneszenzassoziierten Proteine p53 und p16^{INK4a} nach I/R- bzw. AA-vermittelter Nierenschädigung beschrieben.

3.4.1 Validierung der siRNA Sequenzen in der Tubuluszellkultur

Die für den *in vivo* Gebrauch stabilisierten siRNA-Sequenzen gegen die mRNAs der Proteine p16^{INK4a} bzw. p53, nachfolgend als p16 siRNA bzw. p53 siRNA bezeichnet, wurden vor dem Einsatz in I/R-Experimenten mithilfe der Tubuluszellkultur auf ihre Effizienz getestet.

Für den Einsatz in der schwer zu transfizierenden renalen Primärkultur wurden verschiedene Transfektionsreagenzien und Transfektionsprotokolle getestet, um einen Knockdown auf mRNA-Ebene von mindestens 70 % zu erreichen. Als Transfektionsreagenz wurde RNAiMax ausgewählt, da die qualitative mikroskopische Analyse einer mit diesem Reagenz in Kombination mit fluoreszenzmarkierter siRNA (rot) transfizierten Tubuluszellkultur die meisten transfizierten Zellen zeigte (Abb. 24 A-C).

Die Transfektion der Zellen mit p16 siRNA erfolgte an Tag 4, die Ernte der Zellen an Tag 6. Die Analyse ergab einen signifikanten p16^{INK4a} Knockdown auf mRNA-Ebene von 83 % (Abb. 24 D). Auch auf Proteinebene konnte im Western Blot makroskopisch ein robuster Knockdown beobachtet, aufgrund methodischer Schwierigkeiten aber nicht quantifiziert werden (Abb. 24 E).

Die Transfektion der Zellen mit p53 siRNA erfolgte an Tag 3, die Ernte der Zellen an Tag 6. Die Analyse ergab einen signifikanten p53 Knockdown auf mRNA-Ebene von 75 % (Abb. 24 F) und auf Proteinebene von 65 % (Abb. 24 G und H).

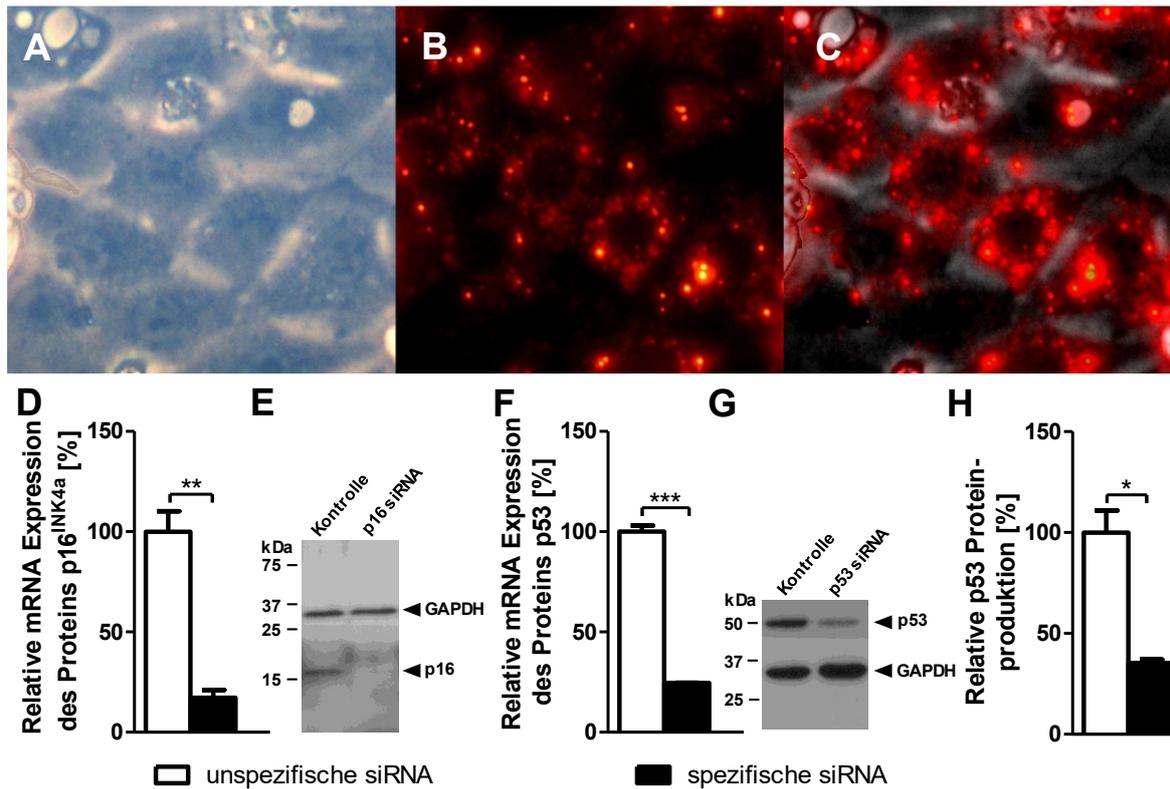


Abb. 24 Knockdown von p16^{INK4a} und p53 mRNA und Protein in der Tubuluszellkultur

Dargestellt ist die Aufnahme von fluoreszenzmarkierter siRNA in kultivierten Tubuluszellen (A-C), sowie die Analyse des Knockdowns auf mRNA- und Proteinebene für p16^{INK4a} (D, E) und p53 (F-H) in der Zellkultur. n = 2 - 3, Mittelwert + SEM, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Daten (F-H) modifiziert dargestellt in Abb. 2 (A-C) aus (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

3.4.2 siRNA vermittelter Knockdown von p53 in geschädigten Nieren

Nach erfolgreicher Identifizierung effizienter siRNA-Sequenzen mithilfe der renalen Zellkultur, wurde die Wirkung von systemischen siRNA-Injektionen auf geschädigtes Nierengewebe in verschiedenen Tierexperimenten untersucht. Dabei wurde zunächst anhand eines Vorversuchs mit p53 siRNA sichergestellt, dass geschädigte Nieren die siRNA aufnehmen und anschließend ein signifikant reduziertes mRNA-Level des Proteins p53 aufweisen. Darauf aufbauend wurde die Wirkung der siRNAs in verschiedenen experimentellen Settings getestet.

3.4.2.1 Nachweis des p53 mRNA Knockdowns in Nieren nach I/R

Die siRNA Aufnahme und der mRNA Knockdown des Proteins p53 wurde in I/R-geschädigten Mäusenieren kontrolliert. Dabei wurden der zeitliche Ablauf und die Dosierung in Anlehnung an bereits publizierte p53 siRNA-Experimente in Rattennieren in einem Kurzzeitprotokoll zusammengefasst (Molitoris *et al.*, 2009). Die linken Nieren wurden zunächst einer 25-minütigen Ischämie mit anschließender Reperfusion unterzogen, bevor den Tieren einmalig

4 Stunden nach Ende der Ischämie entweder Kontroll-Substanz oder Cy3-markierte p53 siRNA in die Schwanzvene injiziert wurde. Für mRNA-, Apoptose- und Biodistributionsanalysen wurden jeweils beide Nieren 7,5 bzw. 24 Stunden, für letzteres zusätzlich 5 Stunden nach I/R entnommen (Abb. 25).

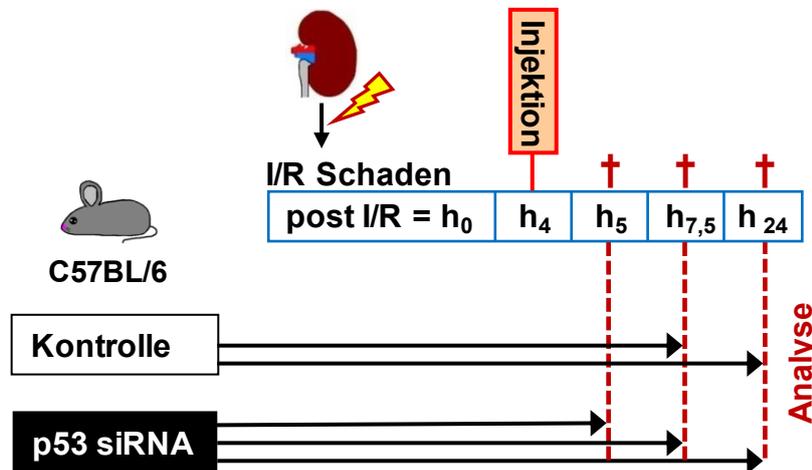


Abb. 25 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Lokalisierung und Wirkung der p53 siRNA
4 Stunden (h) nach Schädigung der linken Mäusenieren durch 25-minütige I/R wurde Kontroll-Substanz oder Cy3-markierte p53 siRNA injiziert. Die Entnahme und Analyse der Nieren erfolgte jeweils 5, 7,5 und 24 h nach I/R. Versuchsaufbau modifiziert aus Abb. 1 (Baisanry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

Die mikroskopische Analyse ergab, dass die Cy3-Fluoreszenz bereits 1 Stunde nach der Injektion (= 5 h nach I/R) vornehmlich im proximalen Tubulus des Cortex (Abb. 26 A) und sowohl in den ungeschädigten Tubuli der rechten Niere (Abb. 26 B) als auch in den geschädigten Tubuli der linken Niere (Abb. 26 C) lokalisiert war. Die proximalen Tubuli wurden mithilfe einer grünfluoreszierenden LTL-Markierung des Bürstensaums (Abb. 26 A und B) identifiziert, wobei zu beachten ist, dass der Bürstensaum durch I/R schwer geschädigt wird und dann ganz fehlen kann (Abb. 26 C). Während in den geschädigten Tubuli sowohl 5 Stunden (Abb. 26 D; = 1 h nach Injektion) als auch 7,5 Stunden (Abb. 26 E; = 3,5 h nach Injektion) nach I/R noch eine robuste Fluoreszenz zu sehen war, war nach 24 Stunden (Abb. 26 F; = 20 h nach Injektion) bereits ein deutlicher Abfall der Intensität zu beobachten. 24 Stunden nach I/R zeigten die mit p53 siRNA behandelten Nieren gegenüber den mit Kontroll-Substanz behandelten Nieren signifikant weniger Cleaved Caspase 3 positive Zellen im Cortex (Abb. 26 G). Im Vergleich zu nicht operierten, unbehandelten Tieren war das mRNA Level des Proteins p53 in den geschädigten Nieren sowohl 7,5 als auch 24 Stunden nach I/R signifikant erhöht und die mit p53 siRNA behandelten Nieren wiesen gegenüber den mit Kontroll-Substanz behandelten Nieren 7,5 Stunden nach I/R signifikant weniger mRNA des Proteins p53 auf (Abb. 26 H).

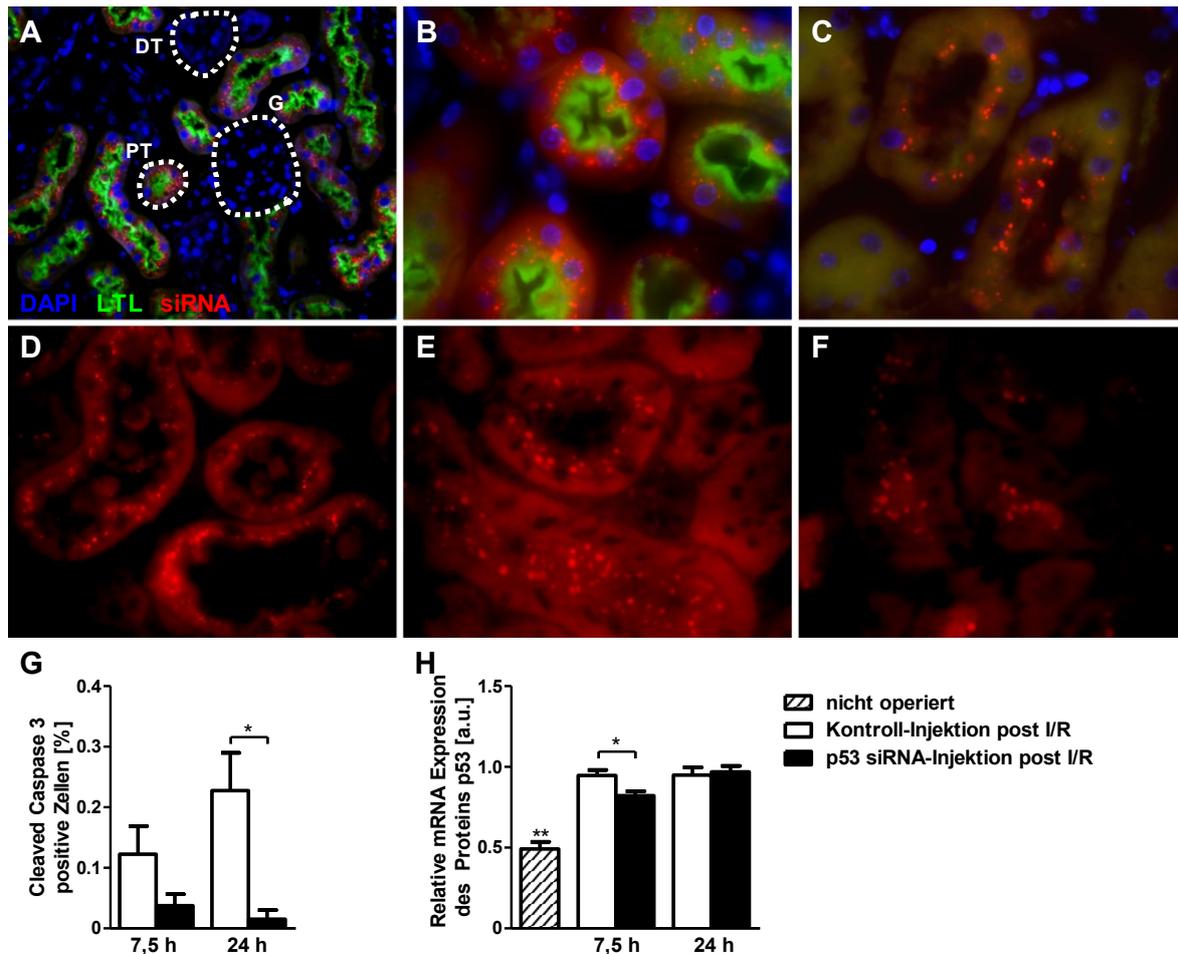


Abb. 26 Biodistribution und mRNA Knockdown des Proteins p53 durch p53 siRNA in Mäusenieren

Dargestellt ist die Lokalisierung von systemisch injizierter Cy3-markierter p53 siRNA in kontralateralen (A, B) und I/R Nieren (C) 1 h nach Injektion (= 5 h nach I/R), sowie die Verteilung und Intensität der Fluoreszenz 5 h (D), 7,5 h (E) und 24 h (F) nach I/R. G zeigt den Anteil Cleaved Caspase 3 positiver Zellen in I/R Nieren von mit Kontroll-Substanz bzw. mit p53 siRNA injizierten Tieren 7,5 bzw. 24 h nach I/R. H zeigt das relative mRNA Level des Proteins p53 in nicht operierten, unbehandelten Nieren und in den I/R Nieren von mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA injizierten Tieren 7,5 bzw. 24 h nach I/R. $n = 2 - 4$, Mittelwert + SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. Daten (B, C, G, H) modifiziert dargestellt in Abb. 2 (D-F) aus (Baisantray, Berkenkamp *et al.*, 2019).

3.4.2.2 Analyse der p53 siRNA-Wirkung 14 Tage nach I/R

Das vorangegangene Experiment mit fluoreszenzmarkierter siRNA hatte gezeigt, dass die siRNA nur Stunden nach einer Injektion wieder aus den Tubuluszellen geschleust bzw. abgebaut wird. Da sich seneszente Zellen nicht nur initial zum Zeitpunkt der Schädigung im Gewebe befinden, sondern vermehrt im Verlauf nach einem Schadensereignis entstehen, wurde die siRNA bei allen nachfolgenden Experimenten mit zeitlichem Abstand mehrfach injiziert. In dem hier beschriebenen Experiment wurde jeweils die linke Niere durch 25-minütige I/R geschädigt, die p53 siRNA bzw. die Kontroll-Substanz mehrfach (12 h vor I/R, direkt nach I/R und an Tag 3, 5, 7, 10 nach I/R) als Einzeldosis systemisch injiziert und die Nieren an Tag 14 nach I/R entnommen und analysiert (Abb. 27).

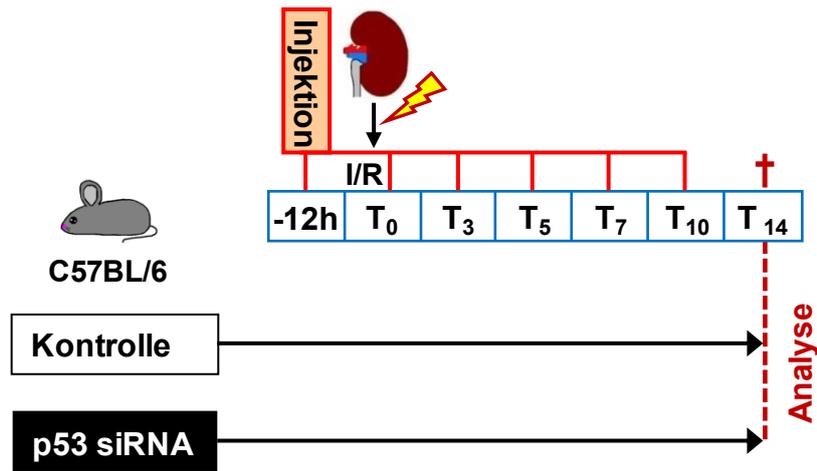


Abb. 27 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Wirkung der p53 siRNA an Tag 14 nach I/R 12 h vor, unmittelbar nach und jeweils an Tag (T) 3, 5, 7 und 10 nach Schädigung der linken Mäusenieren durch 25-minütige I/R wurde Kontrolle oder p53 siRNA injiziert. Die Entnahme und Analyse der Nieren erfolgte an Tag 14 nach I/R.

Versuchsaufbau modifiziert aus Abb. 1 (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

Während der Organentnahme war ein makroskopisch auffälliger Unterschied zwischen den Nieren der beiden Behandlungs-Gruppen zu sehen: die mit p53 siRNA behandelten Nieren (Abb. 28 B) hatten eine rosigere Farbe und schienen damit besser durchblutet zu sein als die mit Kontroll-Substanz behandelten Nieren (Abb. 28 A). Weiterhin zeigten die mit p53 siRNA behandelten Nieren einen Trend für ein höheres Gewicht (Abb. 28 C) und signifikant weniger Cleaved Caspase 3 positive Zellen (Abb. 28 D). Die mit p53 siRNA behandelten Nieren hatten zudem signifikant weniger Ki67 positive Zellen (Abb. 28 E) im Cortex.

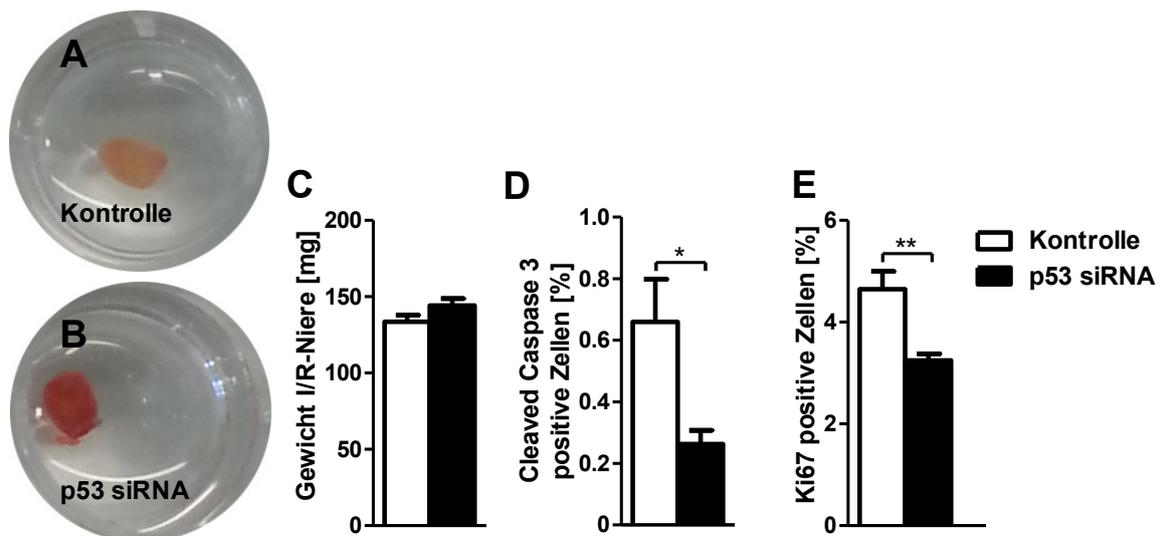


Abb. 28 Morphologie, Apoptose und Proliferation an Tag 14 nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Nierenstücke von mit Kontrolle (A) bzw. p53 siRNA (B) behandelten Nieren an Tag 14 nach I/R. Die Diagramme zeigen das Gewicht der I/R-Nieren (C), die Cleaved Caspase 3 (D) sowie die Ki67 (E) positiven Zellen im Cortex der mit Kontrolle bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 14 nach I/R. n = 3 - 4, Mittelwert + SEM, *p<0.05, **p<0.001.

Daten (E) modifiziert dargestellt in Abb. 3 (E) aus (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

Ein Unterschied durch die Behandlung war auch für die Seneszenzmarker festzustellen: Mit p53 siRNA behandelte Nieren hatten signifikant weniger durch die SA- β -Galaktosidase-Reaktion gefärbte Bereiche (Abb. 29 A-C) und signifikant weniger Ki67/ γ -H2A.X positive Zellen (Abb. 29 D-F). Auf mRNA Ebene zeigte sich für die mit p53 siRNA behandelten Nieren eine signifikant geringere mRNA Expression des Proteins p21^{CIP1} und auch ein starker Trend für eine geringere mRNA Expression des Proteins p16^{INK4a} (Abb. 29 G), während sich die mRNA Level der Proteine p53 und p19^{ARF} zwischen den Gruppen nicht signifikant voneinander unterschieden (Abb. 29 H).

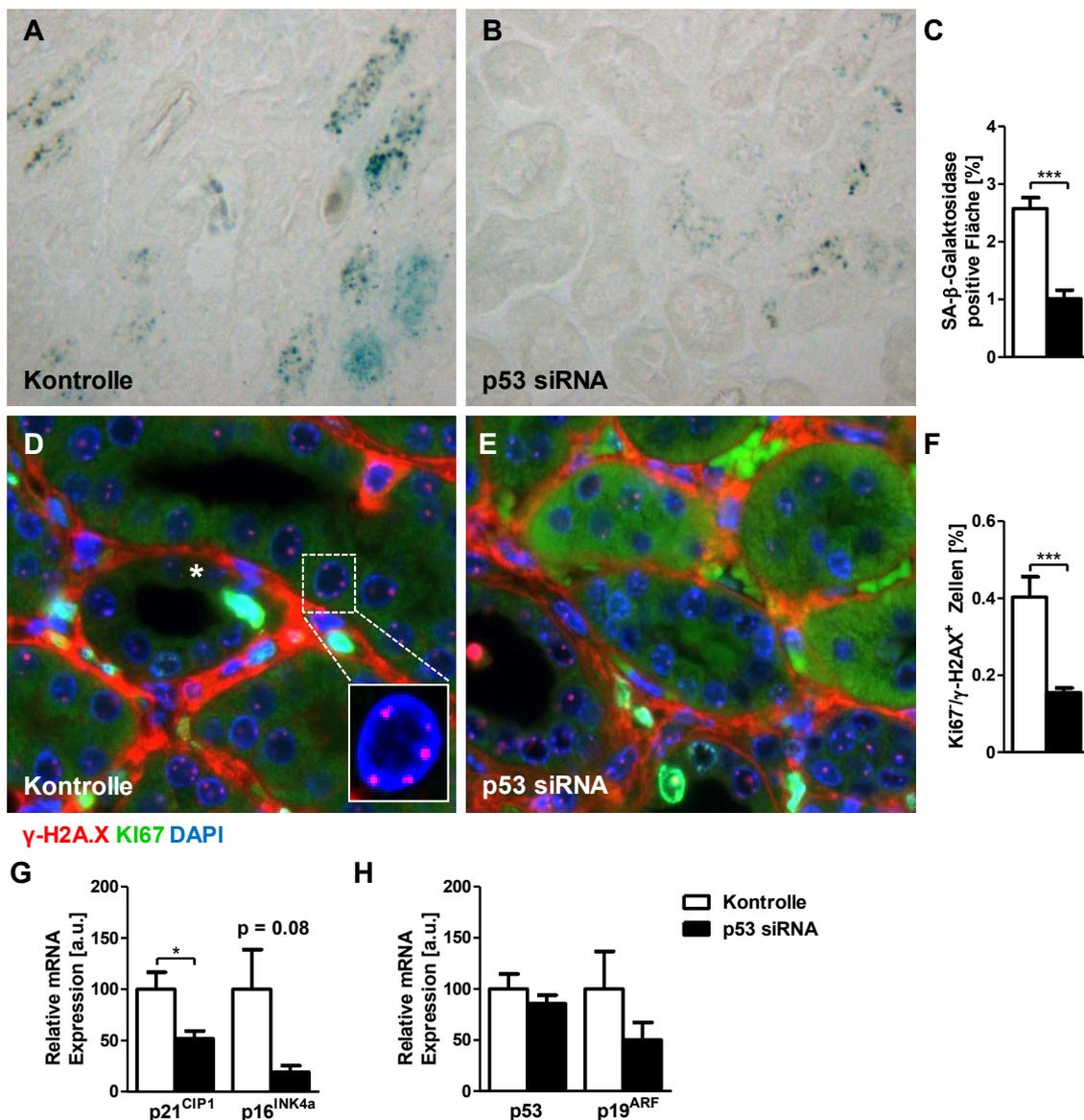


Abb. 29 Analyse der Seneszenzmarker an Tag 14 nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Bilder der SA- β -Galaktosidase-Reaktion von mit Kontroll-Substanz (A) bzw. p53 siRNA (B) behandelten Nieren an Tag 14 nach I/R und die zugehörige quantitative Auswertung (C). Analog dazu werden in (D-F) die Daten für die Ki67/ γ -H2A.X-Färbung gezeigt. Darunter werden die relativen mRNA Expressionen der Proteine p21^{CIP1} und p16^{INK4a} (G) bzw. p53 und p19^{ARF} (H) der beiden Gruppen ausgewertet. Nieren, die mit p53 siRNA behandelt wurden, zeigen weniger Seneszenz.

n = 3 - 4, Mittelwert + SEM, *p<0.05, ***p<0.005. Die Daten D-F wurden von A. Baisantry (PhD) erstellt.

Daten (A-G) modifiziert dargestellt in Abb. 3 (G-K) aus (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

In Abb. 30 A und B sind repräsentative Bilder der Gewebeintegrität an Tag 14 nach I/R für die mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren gezeigt. Die quantitative Auswertung der Histologie ergab für den akuten Gewebeschaden eine signifikant geringere Schädigung für die mit p53 siRNA behandelten Nieren (Abb. 30 C). Auch das Ausmaß des chronischen Gewebeschadens war bei den mit p53 siRNA behandelten Nieren signifikant geringer (Abb. 30 D). Zudem exprimierten die mit p53 siRNA behandelten Nieren signifikant weniger mRNA der als Schadensmarker geltenden Proteine KIM-1 für proximale (Abb. 30 E) bzw. NGAL für distale Tubuli (Abb. 30 E). Gemäß der quantitativen Auswertung der Fibrosemarker mittels Realtime-PCR produzierten die mit p53 siRNA behandelten Nieren signifikant weniger mRNA der Proteine α -Smooth Muscle Actin (α -SMA), Kollagen III und auch weniger Kollagen I (Abb. 30 F). Auch die histologische Analyse der MT-Färbung als Maß für die Fibrosebildung zeigte eine tendenziell geringere Anfärbung fibrotischer Strukturen für die mit p53 siRNA behandelten Nieren im Cortex (Daten nicht gezeigt).

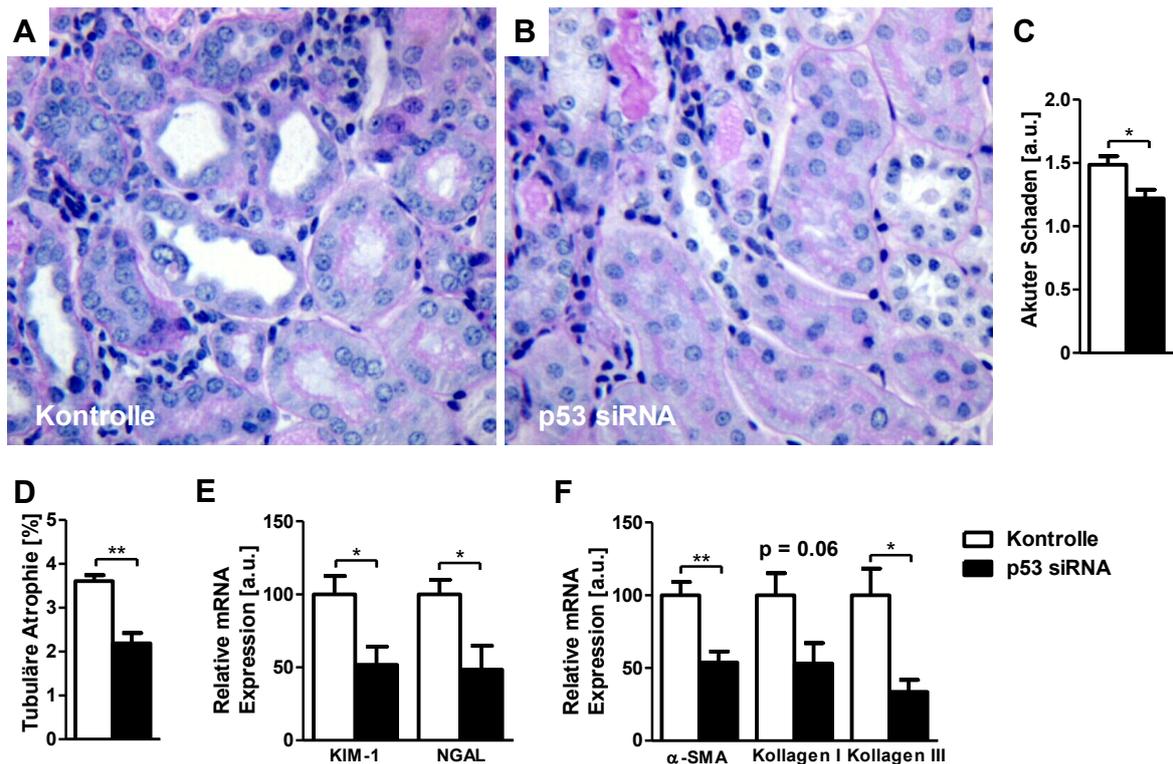


Abb. 30 Analyse der Schadensmarker an Tag 14 nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Bilder der PAS-Reaktion von mit Kontroll-Substanz (A) bzw. p53 siRNA (B) behandelten Nieren an Tag 14 nach I/R und die dazugehörigen quantitativen Auswertungen des akuten Schadens (C) und der tubulären Atrophie (D). Weiterhin sind die Diagramme der relativen mRNA Expressionen der Schadensmarker Kim-1 und NGAL (E) und der Fibrosemarker α -SMA, Kollagen I und Kollagen III (F) für die beiden Gruppen gezeigt. Die mit p53 siRNA behandelten Nieren zeigen weniger Schaden und auch Fibrose. n = 4, Mittelwert + SEM, *p<0.05, **p<0.01. Die Daten aus D wurden von A. Baisantry (PhD) erstellt. Daten modifiziert dargestellt in Abb. 3 (A-D, F) aus (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

Der prozentuale Anteil der CD45 positiven Zellen im Cortex als allgemeiner Marker für Zellen, die an der Immunreaktion beteiligt sind, war für die mit p53 siRNA behandelten Nieren kleiner, der Unterschied war aber nicht signifikant.

Bedingt durch die Biodistribution der siRNA sind bei den histologischen Auswertungen vornehmlich die Daten des äußeren Bereichs des Nierencortex gezeigt.

3.4.2.3 Analyse der p53 siRNA-Wirkung 14 Tage nach AA-Intoxikation

In einem alternativen Schadensmodell mit p53 siRNA Behandlung wurden die Nieren ebenfalls an Tag 14 zur Analyse entnommen. Zuvor wurden die Nieren durch Intoxikation mit einer intraperitonealen Einzeldosis AA geschädigt (Tag 0) und anschließend wurde den Tieren an Tag 3, 5, 7 und 10 systemisch eine Einzeldosis Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA injiziert (Abb. 31).

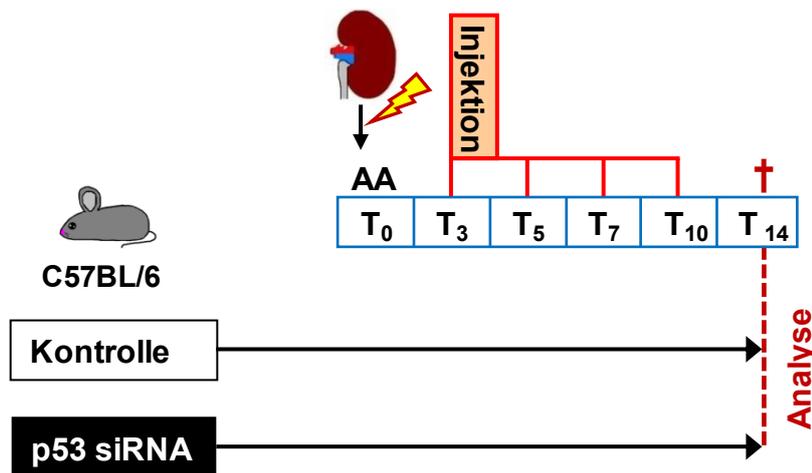


Abb. 31 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Wirkung der p53 siRNA an Tag 14 nach AA
 Nach Schädigung der Mäusenieren durch eine AA-Injektion wurde jeweils an Tag 3, 5, 7 und 10 Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA injiziert. Die Analyse der Nieren erfolgte an Tag 14 nach AA-Intoxikation.
 Versuchsaufbau modifiziert aus Abb. 1 (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

Makroskopisch war bei der Organentnahme kein Unterschied im Aussehen der Nieren festzustellen, jedoch hatten die mit p53 siRNA behandelten Nieren ein signifikant höheres Gewicht als die mit Kontroll-Substanz behandelten Nieren (Abb. 32 A). Da in diesem Versuchsaufbau, im Gegensatz zu den nur einseitig geschädigten Nieren der I/R Experimente, beide Nieren geschädigt wurden, konnte das Serumkreatinin als ein Parameter für die Nierenfunktion gemessen werden. Bei den mit p53 siRNA behandelten Tieren wies das Serumkreatinin einen signifikant niedrigeren Wert auf (Abb. 32 B). Der starke Trend für weniger apoptotische Zellen im Cortex unter p53 siRNA Behandlung war nicht signifikant (Abb. 32 C).

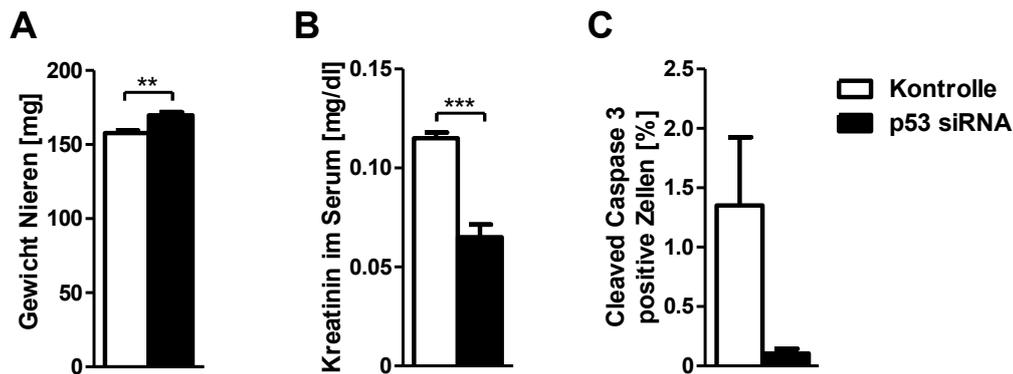


Abb. 32 Gewicht, Kreatinin und Apoptose an Tag 14 nach AA-Intoxikation

Dargestellt ist die quantitative Auswertung des Nierengewichts (A), des Serumkreatininlevels (B) und der Cleaved Caspase 3 positiven Zellen (C) der mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 14 nach AA-Intoxikation. Die mit p53 siRNA behandelten Nieren sind schwerer und zeigen eine verbesserte Funktion. n = 4, Mittelwert + SEM, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Als Maß für Seneszenz wurde die CDKI mRNA Expression untersucht und zeigte sowohl für die Proteine p16^{INK4a} (Abb. 33 A), p19^{ARF} (Abb. 33 B) und p21^{CIP1} (Abb. 33 C) deutlich niedrigere Werte bei den mit p53 siRNA behandelten Nieren, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Die mRNA Expression des Proteins p53 war dagegen bei beiden Gruppen nahezu gleich (Abb. 33 D).

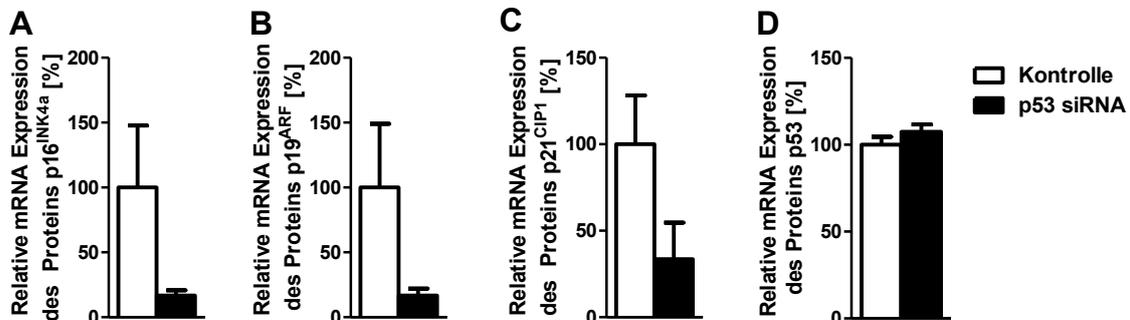


Abb. 33 CDKI und p53 mRNA Expression an Tag 14 nach AA-Intoxikation

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der relativen mRNA Level der Proteine p16^{INK4a} (A), p19^{ARF} (B), p21^{CIP1} (C) und p53 (D) der mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 14 nach AA-Intoxikation. Die siRNA Behandlung senkt die mRNA Level der CDKIs, aber nicht das des Proteins p53. n = 4, Mittelwert + SEM.

Für die Schadensanalyse war ein ähnlicher Trend zu beobachten: Die mit p53 siRNA behandelten Nieren zeigten in der histologischen Auswertung des Cortex einen geringeren Schaden (Abb. 34 A-C) sowie auch eine geringere mRNA Expression der Schadensmarker Kim-1 (Abb. 34 D) und NGAL (Abb. 34 E). Die Unterschiede waren jeweils nicht signifikant.

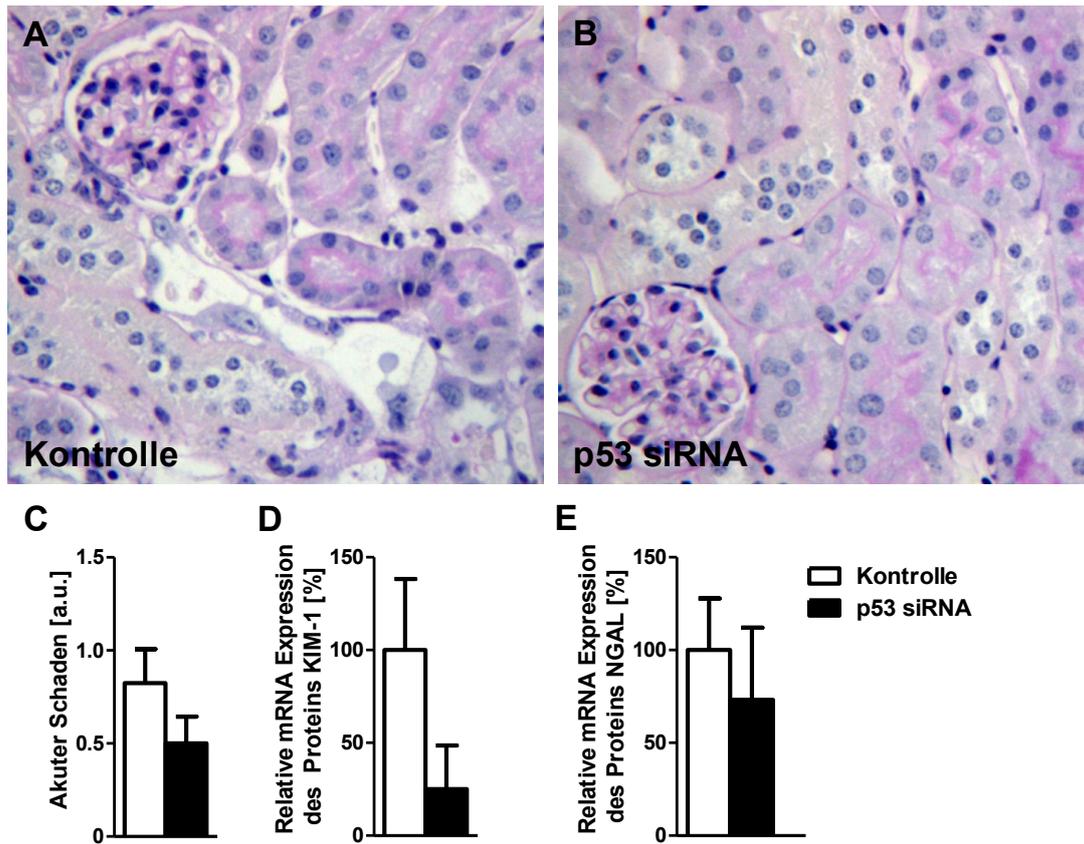


Abb. 34 Schadensmarkeranalyse an Tag 14 nach AA-Intoxikation

Dargestellt sind repräsentative Bilder der PAS-Reaktion von mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 14 nach AA-Intoxikation (A und B). Darunter ist die quantitative Auswertung des akuten Schadens (C) und der relativen mRNA Level der Proteine KIM-1 (D) und NGAL (E) der mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren. Letztere zeigen tendenziell den geringeren Schaden. n = 4, Mittelwert + SEM.

Die Fibrose war im Cortex an Tag 14 nach AA-Intoxikation in beiden Gruppen nur gering ausgebildet (< 1 %) und es waren keine Unterschiede zu detektieren (Abb. 35 A und B).

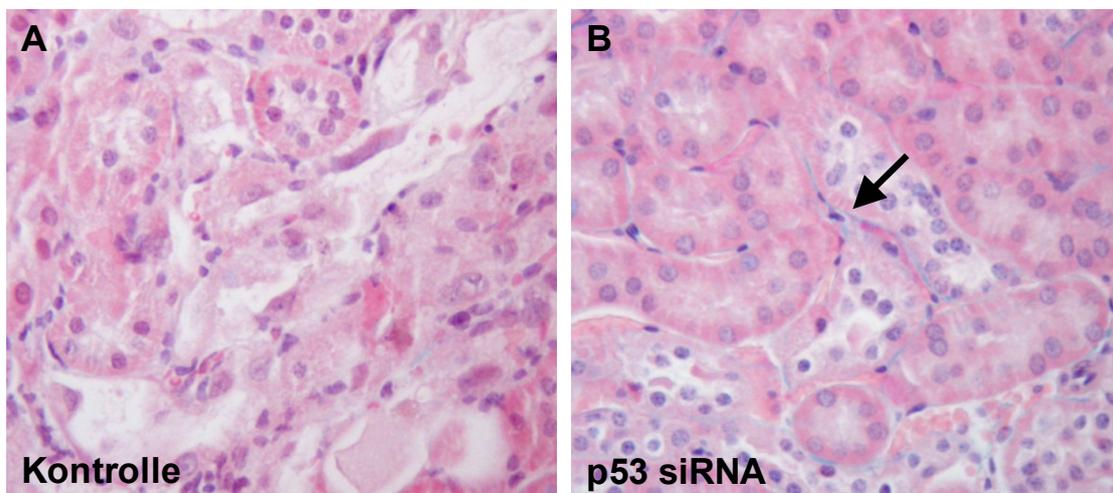


Abb. 35 Fibrosebildung an Tag 14 nach AA-Intoxikation

Dargestellt sind repräsentative Bilder der MT-Färbung von der mit Kontroll-Substanz (A) bzw. p53 siRNA (B) behandelten Nieren an Tag 14 nach AA-Intoxikation. Die Fibrosebildung (hellblaue Areale; Beispiel siehe Pfeil) ist mit < 1 % nur gering ausgeprägt.

3.4.2.4 Analyse der p53 siRNA-Wirkung 30 Tage nach I/R

Nachdem die Kurzzeitexperimente teils signifikante Unterschiede zwischen den mit Kontroll-Substanz und p53 siRNA behandelten Nieren in Bezug auf Apoptose, Seneszenzmarker, Fibrose und auch Gewebeschäden gezeigt hatten, wurde das experimentelle Design für die Vertiefung der Erkenntnisse ausgeweitet: Der Versuchszeitraum wurde auf 30 Tage nach I/R verlängert, die Gruppengröße wurde für statistische Zwecke erhöht und die Gruppenanzahl vergrößert. Dabei wurde als Schädigung der Niere die I/R als ein auch im humanen System klinisch sehr relevantes Modell gewählt.

Die Nieren aller Tiere wurden einer linksseitigen 25-minütigen Ischämie mit anschließender Reperfusion unterzogen (Tag 0) und nach folgendem Schema mehrfach durch systemische Injektionen einer Einzeldosis behandelt (Abb. 36).

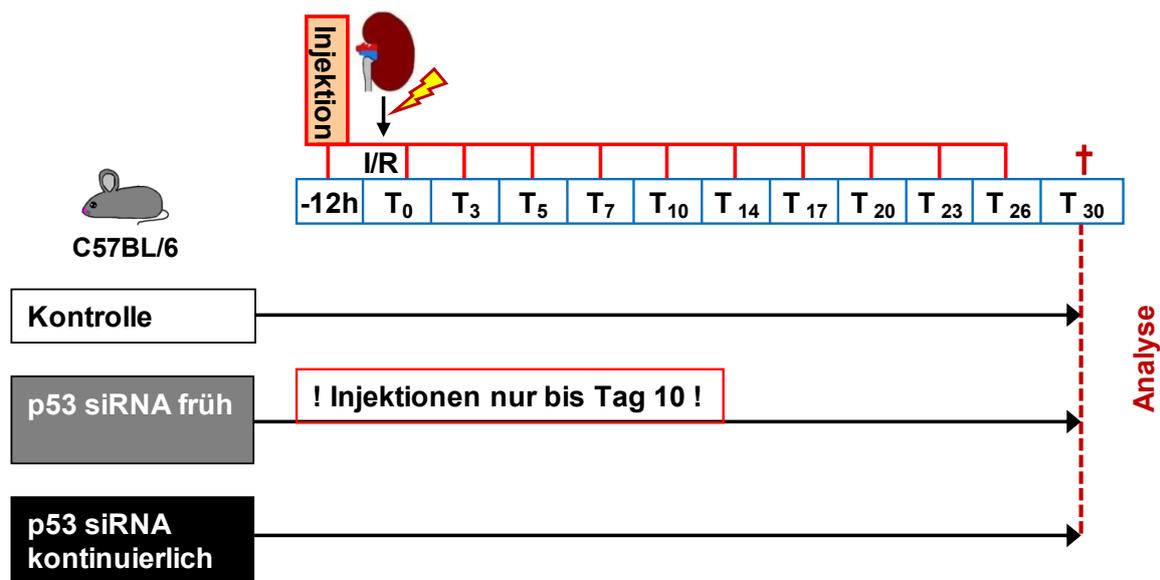


Abb. 36 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Wirkung der p53 siRNA an Tag 30 nach I/R 12 Stunden vor, direkt nach Schädigung der linken Mäusenieren durch 25-minütige I/R und jeweils an Tag 3, 5, 7, 10 bei allen Gruppen, bei der Kontroll- und der p53 siRNA kontinuierlichen Gruppe zusätzlich an Tag 14, 17, 20, 23 und 26 wurde Kontroll-Substanz oder p53 siRNA injiziert. Die Entnahme und Analyse der Nieren erfolgte an Tag 30 nach I/R.

Versuchsaufbau modifiziert aus Abb. 1 (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

Bei der Organentnahme an Tag 30 nach I/R war bereits makroskopisch sichtbar bei allen Gruppen eine Schrumpfung der I/R-Niere um ca. 50 % des Gewichts verglichen mit der kontralateralen Niere festzustellen (Abb. 37 A-C). Ein Vergleich des I/R-Nierengewichts zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 37 D). Auch der Anteil der Cleaved Caspase 3 (Abb. 37 E) bzw. Ki67 (Abb. 37 F) positiven Zellen im Cortex waren zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

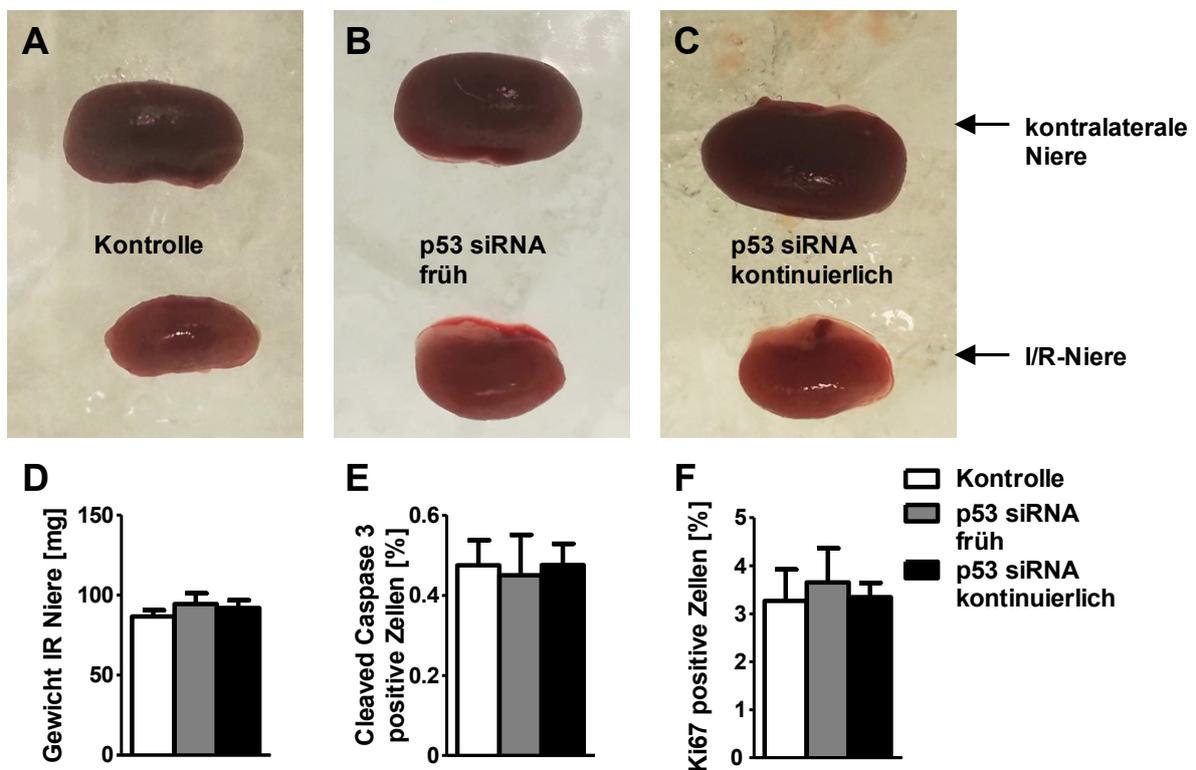


Abb. 37 Morphologie, Apoptose und Proliferation an Tag 30 nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Nieren von mit Kontroll-Substanz (A), früh mit p53 siRNA (B) und kontinuierlich mit p53 siRNA (C) behandelten Nieren an Tag 30 nach I/R. Die Diagramme zeigen das Gewicht der I/R-Nieren (D), die Cleaved Caspase 3 (E) bzw. die Ki67 (F) positiven Zellen der unterschiedlich behandelten Gruppen zum gleichen Zeitpunkt. Bei diesen Parametern sind keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen detektierbar. n = 6-7, Mittelwert + SEM.

Die Analyse der Seneszenzmarker ergab, dass die mit Kontroll-Substanz behandelte Gruppe sowohl signifikant mehr durch die SA- β -Galaktosidase-Reaktion angefärbte Areale (Abb. 38 A und B) als auch signifikant mehr Ki67/ γ -H2A.X positive Zellen (Abb. 38 C und D) zeigte als die früh und auch die kontinuierlich mit p53 siRNA behandelte Gruppen. Die mit Kontroll-Substanz behandelte Gruppe hatte ebenfalls ein höheres mRNA-Level des Proteins p16^{INK4a} gegenüber den mit p53 siRNA behandelten Gruppen, das aber nur im Vergleich mit der früh mit p53 siRNA behandelten Gruppe statistische Signifikanz erreichte (Abb. 38 E). Bei der quantitativen Analyse der mRNA Expression der Proteine p19^{ARF} (Abb. 38 F), p21^{CIP1} (Abb. 38 G) und p53 (Abb. 38 H) waren keine signifikanten Unterschiede zu detektieren.

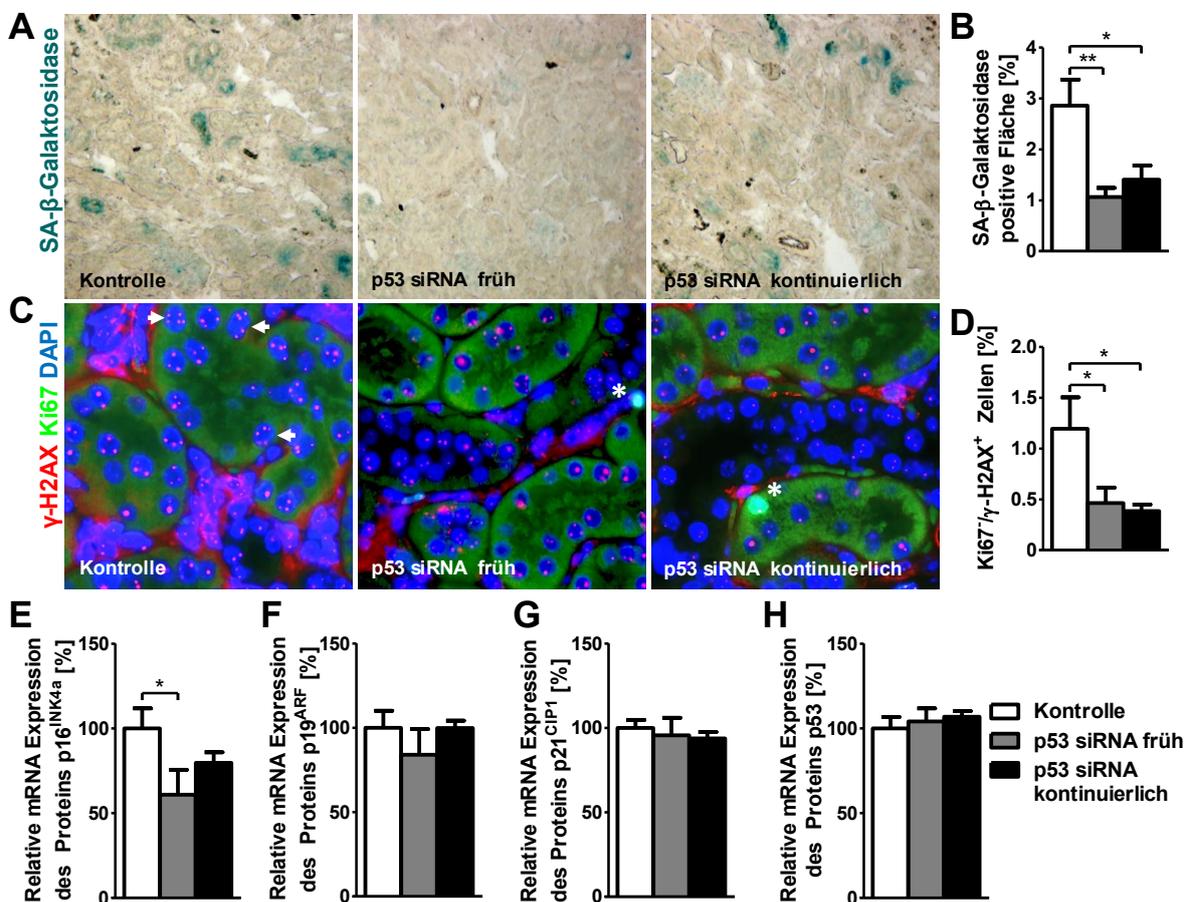


Abb. 38 Seneszenzmarkeranalyse an Tag 30 nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Bilder der SA- β -Galaktosidase-Reaktion und der zugehörigen quantitativen Auswertung der mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 30 nach I/R (A und B). C und D zeigen analog für diese Gruppen die Quantifizierung der Ki67/ γ -H2A.X positiven Zellen (weiße Pfeile in C; Asterix markiert Ki67 positive Zellen). Darunter sind die Diagramme der relativen mRNA Expression der Proteine p16^{INK4a} (E), p19^{ARF} (F), p21^{CIP1} (G) und p53 (H) in mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 30 nach I/R zu sehen. Die mit Kontroll-Substanz behandelten Nieren zeigen erhöhte Seneszenzmarker. n = 6 - 7, Mittelwert + SEM, *p<0.05, **p<0.01. Die Daten A-E wurden von A. Baisantry (PhD) erstellt. Daten (A-E) modifiziert dargestellt in Abb. 4 (A-E) aus (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

An Tag 30 nach I/R wiesen die früh mit p53 siRNA behandelten Nieren signifikant weniger atrophisches Tubulusgewebe auf als die Nieren der mit Kontroll-Substanz behandelten Gruppe und auch tendenziell weniger als die kontinuierlich mit p53 siRNA behandelten Nieren (Abb. 39 A und B). Für die mikroskopische Analyse der Fibrosebildung in den I/R-Nieren ergab sich das gleiche Bild: Sowohl in der Picosiriusrot-Färbung (Abb. 39 C und D) als auch in der α -SMA-Färbung (Abb. 39 E und F) wiesen die I/R-Nieren der früh mit p53 siRNA behandelten Mäuse signifikant weniger fibrotische Areale auf als die der mit Kontroll-Substanz behandelten Gruppe. Die MT-Färbung zeigte analog für die früh mit p53 siRNA behandelte Gruppe tendenziell die geringsten fibrotischen Anteile, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen (Daten nicht gezeigt).

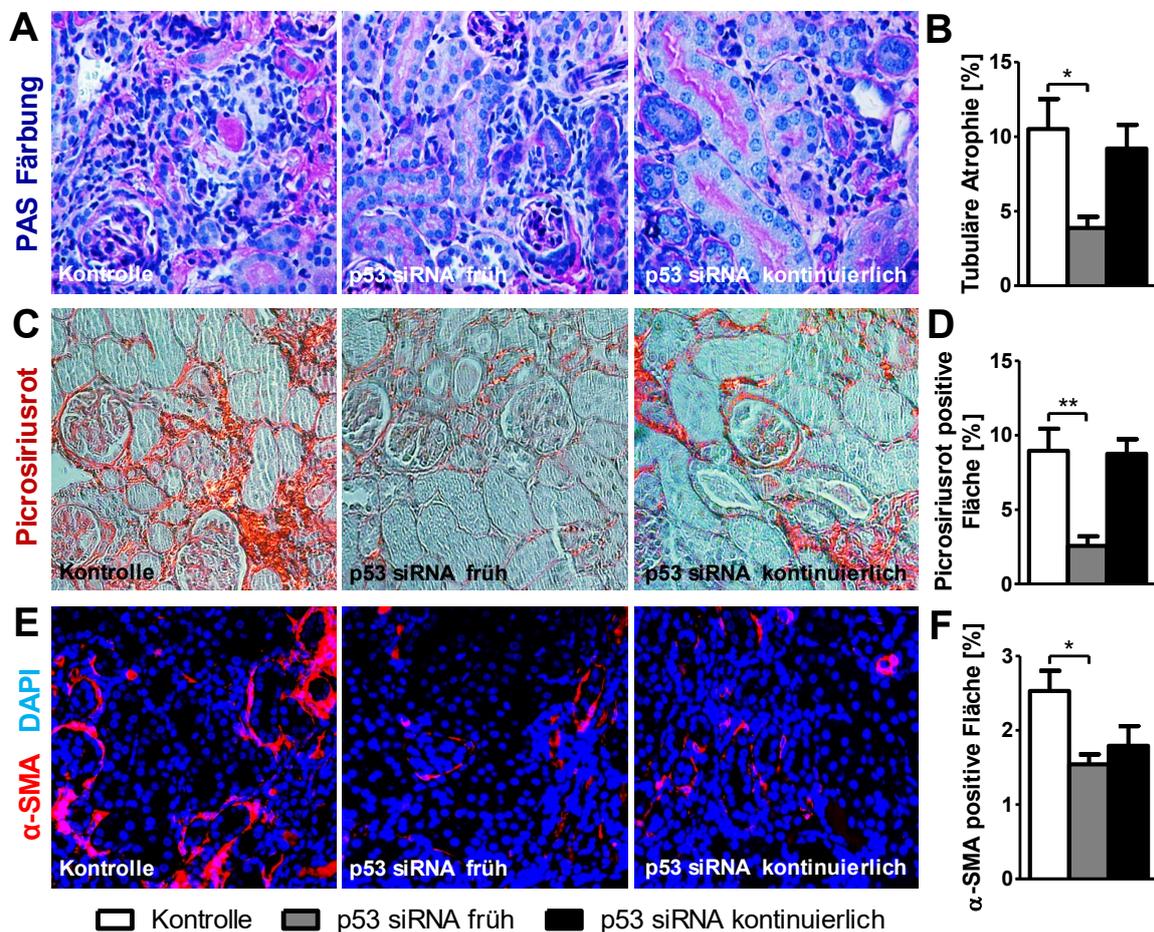


Abb. 39 Mikroskopische Analyse der I/R Nieren an Tag 30 nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Bilder der PAS-Reaktion und der zugehörigen quantitativen Auswertung der mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 30 nach I/R (A und B). C und D zeigen analog für diese Gruppen die Quantifizierung der Picosiriusrot-Färbung. Entsprechend sind die Daten für die α -SMA-Färbung als weitere Fibroseanalyse in E und F zu sehen. Die früh mit p53 siRNA behandelten Nieren zeigen jeweils signifikant weniger Atrophie bzw. Fibrose im Gewebe als die der mit Kontroll-Substanz behandelten Gruppe. n = 6 - 7, Mittelwert + SEM, *p<0.05, **p<0.01. Die Daten A, B, E und F wurden von A. Baisantry (PhD), die Daten C und D von Dr. I. Sørensen-Zender erstellt.

Daten (A-F) modifiziert dargestellt in Abb. 5 (A-F) aus (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

Auch in der mRNA-Analyse war ein positiver Trend für die früh mit p53 siRNA behandelte Gruppe zu erkennen: Diese Gruppe zeigte für die mRNA Expression der Schadensmarker KIM-1 (Abb. 40 A) und NGAL (Abb. 40 B) und auch der Fibrosemarker α -SMA (Abb. 40 C), Kollagen I (Abb. 40 D) und Kollagen III (Abb. 40 E) die jeweils geringsten Werte.

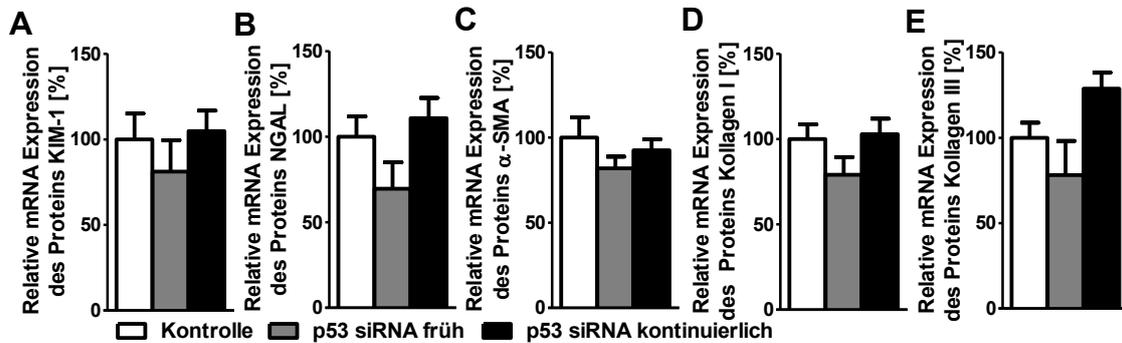


Abb. 40 mRNA Analyse der Schadens- und Fibrosemarker an Tag 30 nach I/R

Dargestellt sind die relativen mRNA Level der Schadensmarker KIM-1 (A), NGAL (B) sowie der Fibrosemarker α -SMA (C), Kollagen I (D) und Kollagen III (E) der mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 30 nach I/R. Die früh mit p53 siRNA behandelten Nieren zeigen die geringsten Werte. n = 6 - 7, Mittelwert + SEM.

Für die Detektion der Immunreaktion in dem Nierengewebe wurde der allgemeine Leukozytenmarker CD45 und der murine Makrophagenmarker F4/80 verwendet.

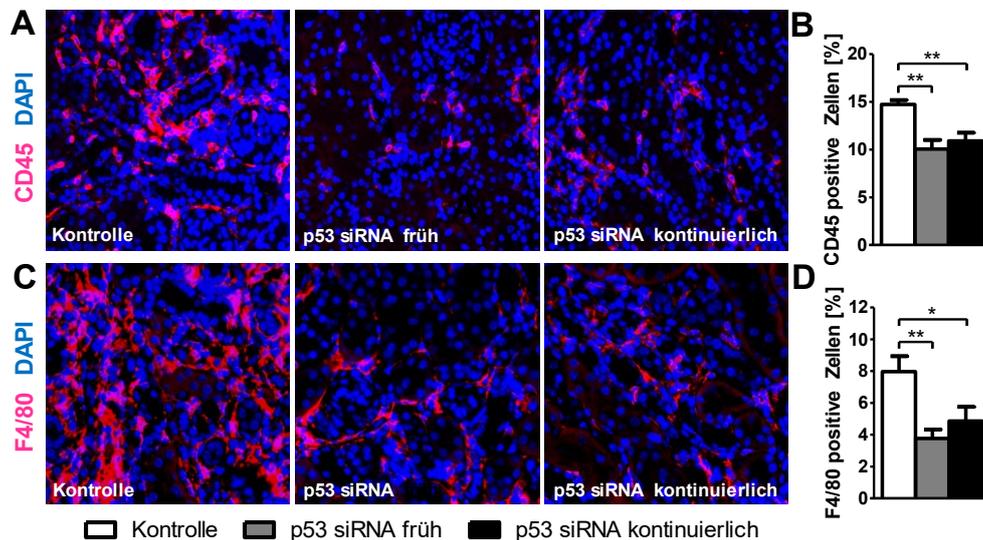


Abb. 41 Quantifizierung der Leukozyten und Makrophagen in I/R Nieren an Tag 30 nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Bilder der CD45-Färbung (A) und der zugehörigen quantitativen Auswertung (B) der mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 30 nach I/R. C und D zeigen analog für diese Gruppen die Quantifizierung der F4/80-Färbung. Die Nieren der mit Kontroll-Substanz behandelten Gruppe zeigen jeweils signifikant mehr Leukozyten und auch Makrophagen im Nierengewebe als die früh und auch die kontinuierlich mit p53 siRNA behandelten Gruppen. n = 6 - 7, Mittelwert + SEM, *p < 0.05, **p < 0.01. Die Daten A, B, C und D wurden von A. Baisantry (PhD) erstellt.

Daten (A-D) modifiziert dargestellt in Abb. 6 (A-D) aus (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

In Bezug auf die Immunreaktion hatte die mit Kontroll-Substanz behandelte Gruppe statistisch signifikant den größten Anteil an CD45 (Abb. 41 A und B) und auch F4/80 (Abb. 41 C und D) positiven Zellen gegenüber beiden mit p53 siRNA behandelten Gruppen.

Ein zentraler Aspekt für die Nierenregeneration nach einem Schaden ist die ausreichende Versorgung des Organs mit Blut. Als Marker für die Gefäßdichte wurden daher die CD31 positiven Zellen bzw. die eNOS positive Fläche quantifiziert. Dabei zeigte die früh mit p53 siRNA behandelte Gruppe signifikant mehr CD31 positive Zellen als die mit Kontroll-Substanz bzw. die kontinuierlich mit p53 siRNA behandelten Gruppen (Abb. 42 A und B). Für die Analyse der eNOS positiven Fläche war die gleiche Tendenz zu erkennen, auch hier statistisch signifikant (Abb. 42 C und D).

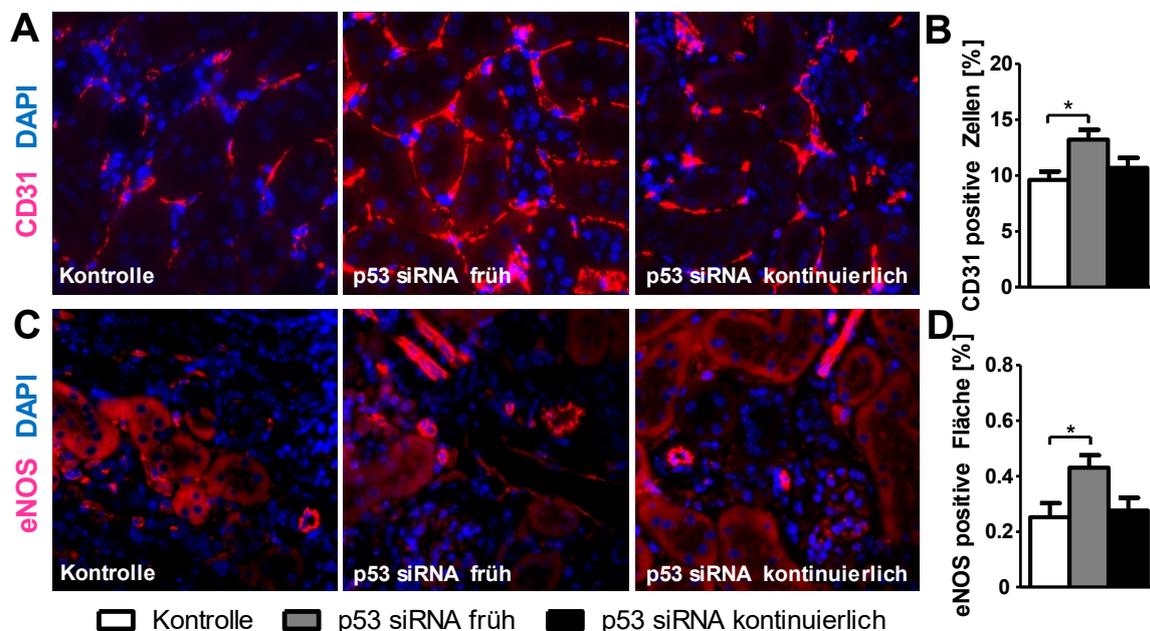


Abb. 42 Gefäßanalyse in I/R Nieren an Tag 30 nach I/R

Dargestellt sind repräsentative Bilder der CD31-Färbung (A) und der zugehörigen quantitativen Auswertung der mit Kontroll-Substanz bzw. p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 30 nach I/R (B). C und D zeigen analog für diese Gruppen die Quantifizierung der eNOS-Färbung. Die Nieren der früh mit p53 siRNA behandelten Gruppe haben jeweils signifikant mehr CD31 positive Zellen und auch eine größere eNOS positive Fläche als die mit Kontroll-Substanz behandelte Gruppe. n = 6 - 7, Mittelwert + SEM, *p<0.05. Die Daten A, und B wurden von Raj Bhayadia (PhD), C und D wurden von A. Baisantry (PhD) erstellt.

Daten (A-D) modifiziert dargestellt in Abb. 7 (A-D) aus (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

3.4.3 Knockdown von p16^{INK4a} mRNA in I/R geschädigten Nieren

3.4.3.1 Analyse der p16 siRNA-Wirkung 28 Tage nach I/R

Das mRNA Level des Proteins p16^{INK4a} ist in Mäusenieren an Tag 14 nach I/R signifikant höher als in den Nieren nicht operierter Kontrolltiere (Braun *et al.*, 2012) und auch an Tag 30 nach I/R ist es in den I/R-Nieren signifikant höher als in den zugehörigen kontralateralen Nieren (Abb. 43 A). Für das p16 siRNA Knockdown Experiment in geschädigten Mäusenieren wurde als Schadensmodell daher wiederum eine 25-minütige Ischämie der linken Niere gewählt und an den Tagen 7, 14, 18, 22 und 25 nach I/R jeweils eine Einzeldosis Kontroll-Substanz oder p16 siRNA systemisch injiziert (Abb. 43 B).

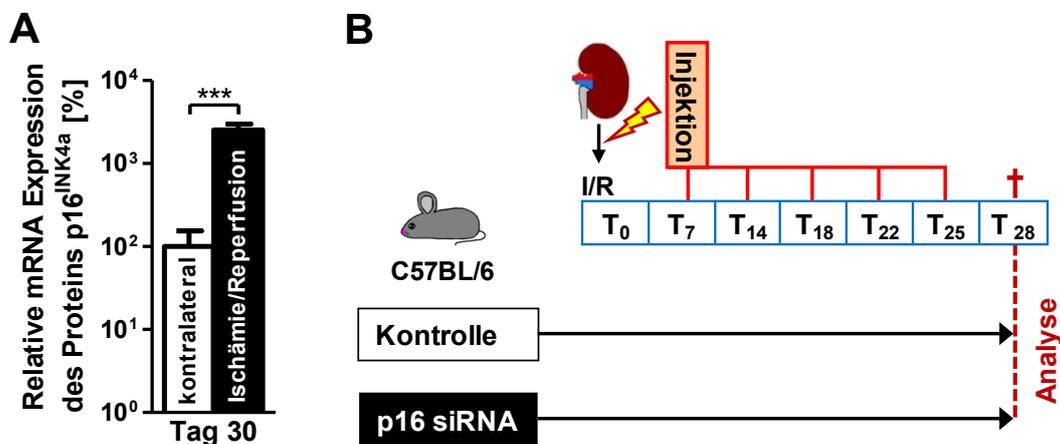


Abb. 43 mRNA Level des Proteins p16^{INK4a} nach I/R und Versuchsaufbau des p16 siRNA-Experiments

Dargestellt ist die Quantifizierung des mRNA Levels des Proteins p16^{INK4a} in kontralateralen und I/R-Nieren an Tag 30 nach I/R aus einem vorangegangenen Experiment (A). Für das p16 siRNA Experiment wurde nach Schädigung der linken Mäusenieren durch 25-minütige I/R jeweils an Tag 7, 14, 18, 22 und 25 entweder Kontrolle oder p16 siRNA injiziert. Die Entnahme und Analyse der Nieren erfolgte an Tag 28 nach I/R (B). n = 6, Mittelwert + SEM, ***p < 0.001.

Versuchsaufbau modifiziert aus Abb. 1 (Baisantry, Berkenkamp *et al.*, 2019).

Die I/R-Nieren beider Gruppen waren an Tag 28 makroskopisch sichtbar deutlich kleiner als die jeweilige kontralaterale Niere (Abb. 44 A), die I/R-Nieren der mit p16 siRNA behandelten Gruppe waren jedoch signifikant schwerer als die der mit Kontroll-Substanz behandelten Gruppe (Abb. 44 B). In den mit der p16 siRNA behandelten Nieren waren tendenziell weniger Cleaved Caspase 3 (Abb. 44 C) und mehr Ki67 positive Zellen vorhanden (Abb. 44 D und E).

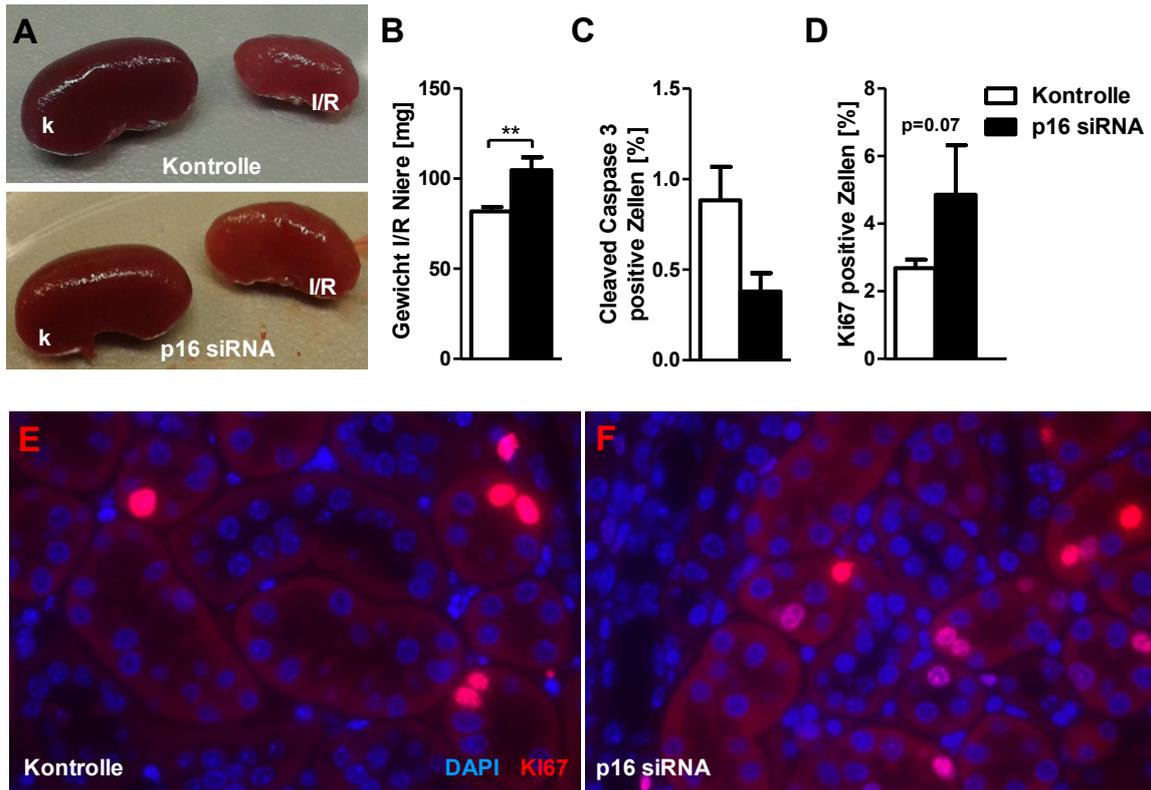


Abb. 44 Morphologie, Apoptose und Proliferation an Tag 28 nach I/R

Dargestellt sind in (A) repräsentative kontralaterale (k) bzw. I/R Nieren von mit Kontroll-Substanz bzw. p16 siRNA behandelten Tieren an Tag 28 nach I/R. Die Diagramme zeigen das Gewicht der I/R Nieren (B), die Cleaved Caspase 3 (C) sowie die Ki67 (D) positiven Zellen im Nierengewebe der mit Kontroll-Substanz bzw. p16 siRNA behandelten Nieren an Tag 28 nach I/R. Darunter sind repräsentative Bilder der dazugehörigen Ki67-Färbung in mit Kontroll-Substanz (E) bzw. p16 siRNA (F) behandelten Nieren an Tag 28 nach I/R zu sehen. Die mit p16 siRNA behandelten Nieren sind signifikant schwerer. n = 3-6, Mittelwert + SEM, **p<0.01.

Die quantitative Analyse der CDKI Expression zeigte jeweils starke Trends für geringere mRNA Level der Proteine p15^{INK4b} (Abb. 45 A), p16^{INK4a} (Abb. 45 B), p19^{ARF} (Abb. 45 C) und ein signifikant geringeres mRNA Level des Proteins p21^{CIP1} (Abb. 45 D) in den mit p16 siRNA behandelten Nieren.

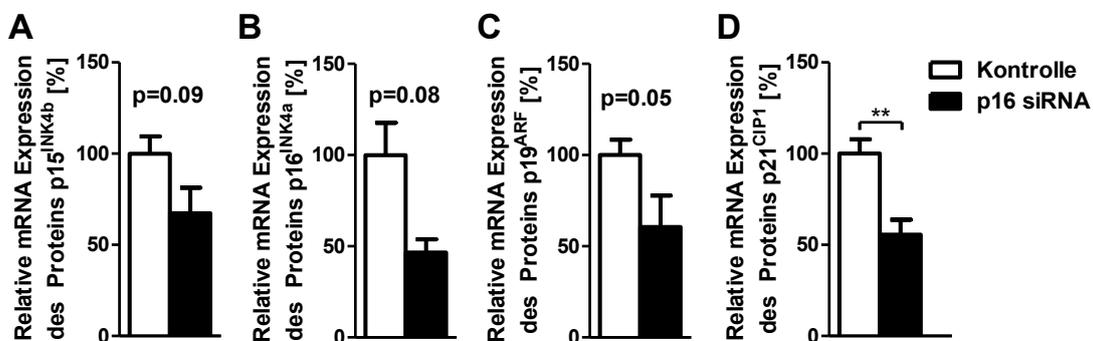


Abb. 45 mRNA Analyse der CDK-Inhibitoren an Tag 28 nach I/R

Dargestellt sind die relativen mRNA Level der Proteine p15^{INK4b} (A), p16^{INK4a} (B), p19^{ARF} (C) und p21^{CIP1} (D) in mit Kontroll-Substanz bzw. p16 siRNA behandelten Nieren an Tag 28 nach I/R. Die mit p16 siRNA behandelten Nieren zeigen jeweils die geringsten Werte, für das mRNA Level des Proteins p21^{CIP1} wird das Signifikanzniveau erreicht. n = 3 - 6, Mittelwert + SEM, **p<0.01.

Das Schadensausmaß war in den mit p16 siRNA behandelten Nieren tendenziell geringer als in der mit Kontroll-Substanz behandelten Gruppe, erreichte jedoch weder für die tubuläre Atrophie (Abb. 46 A) noch für die mRNA Expression der Schadensmarker NGAL (Abb. 46 B) und KIM-1 (Abb. 46 C) statistische Signifikanz.

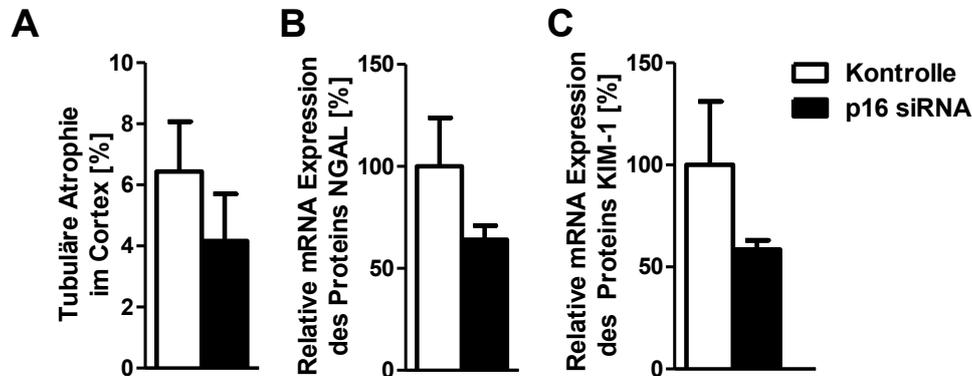


Abb. 46 Tubuläre Atrophie und Schadensmarkerexpression an Tag 28 nach I/R

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der tubulären Atrophie (A) und der relativen mRNA Level der Schadensmarker NGAL (B) und KIM-1 (C) in mit Kontroll-Substanz bzw. mit p16 siRNA behandelten Nieren an Tag 28 nach I/R. Die mit p16 siRNA behandelten Nieren zeigen auch hier jeweils die geringsten Werte, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. n = 3 - 6, Mittelwert + SEM.

Auch die Analyse der Fibrosebildung mittels MT-Färbung (Abb. 47 A) und der mRNA Expression der Proteine α -SMA (Abb. 47 B), Kollagen I (Abb. 47 C) und Kollagen III (Abb. 47 D) zeigte den starken Trend, dass die mit p16 siRNA behandelten Nieren weniger Fibrose gebildet hatten als die der mit Kontroll-Substanz behandelten Gruppe. Einzig das geringere mRNA Level des Fibrosemarkers Kollagen I in den mit p16 siRNA behandelten Nieren (Abb. 47 C) erreichte statistische Signifikanz.

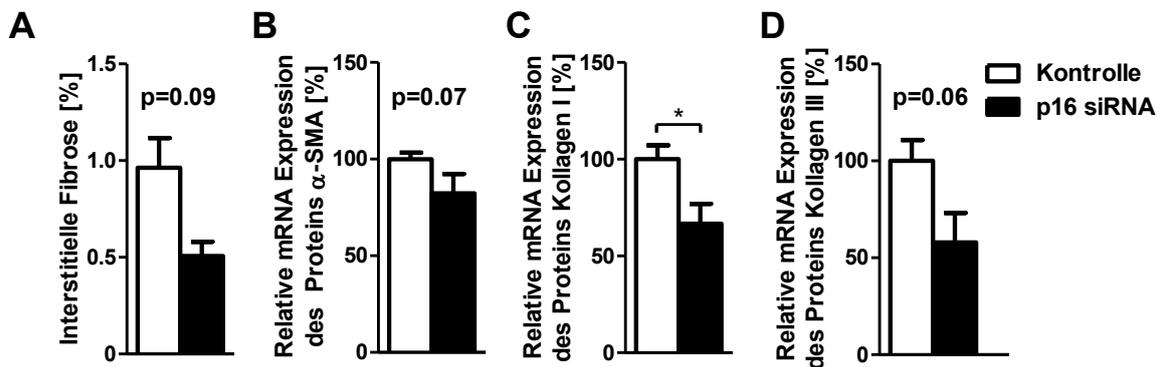


Abb. 47 Fibrosemarkeranalyse an Tag 28 nach I/R

Dargestellt ist die quantitative Auswertung der MT-Färbung (A) und der relativen mRNA Level der Fibrosemarker α -SMA (B), Kollagen I (C) und Kollagen III (D) in mit Kontroll-Substanz bzw. mit p16 siRNA behandelten Nieren an Tag 28 nach I/R. Die mit p16 siRNA behandelten Nieren zeigen auch hier jeweils die geringsten Werte, für das mRNA Level des Fibrosemarkers Kollagen I wird das Signifikanzniveau erreicht. n = 3 - 6, Mittelwert + SEM, *p<0.05.

4 Diskussion

4.1 Proliferationsrate des Tubulusepithels *in vivo* ist altersabhängig

Renales Tubulusepithel hat grundsätzlich eine beachtliche Kapazität an Zellen, die nach einer Schädigung schnell aus dem Zustand der Quieszenz heraus proliferieren (Humphreys *et al.*, 2008) (Witzgall *et al.*, 1994). Einige tierexperimentelle Arbeiten wiesen bereits darauf hin, dass der Übergang von der Quieszenz in die Proliferation nach einer Gewebeschädigung bei älteren Individuen verspätet und/oder vermindert stattfindet (Schmitt *et al.*, 2008) (Miya *et al.*, 2012). Nach einer Nierenschädigung laufen jedoch multiple Prozesse ab, die Einfluss auf die Untersuchung einer Altersabhängigkeit der Proliferation nehmen können.

Bleiacetat ist bereits in der Literatur als Stimulans der Proliferation epithelialer Tubuluszellen in der Niere beschrieben (Choie *et al.*, 1972). Bleiacetat wird von proximalen Tubuluszellen nach glomerulärer Filtration über die Bürstensaummembran aufgenommen und intrazellulär unter anderem in den Kern transportiert. Die mitotische Wirkung beruht bei einer niedrigen Dosierung ohne Zelluntergang nicht auf der Notwendigkeit, untergegangenes Gewebe zu ersetzen (Choie und Richter, 1972) (Fowler, 1992). Um die Proliferationskapazität des Tubulusepithels von jungen und alten Mäusenieren ohne eine massive Schädigung des Gewebes zu vergleichen, wurde daher eine einmalige Behandlung mit Bleiacetat als mitogenes Agens gewählt.

Bei der Nierengewebeanalyse 36 Stunden nach der Bleiacetatinjektion wurde zunächst auf mikroskopischer und molekularbiologischer Ebene geprüft, dass in keiner der Gruppen signifikante Gewebeschäden durch die Behandlung entstanden waren. Weder die Übersichtfärbung (Abb. 7 A) noch die Färbung des Bürstensaums (Abb. 7 D) zeigten detektierbare Schäden nach der Bleiacetat-Behandlung und es fand auch keine signifikant vermehrte Apoptose statt (Abb. 7 E). Auf mRNA-Ebene werden die Schadensmarker KIM-1 (Abb. 7 B) und NGAL (Abb. 7 C) zwar nach I/R massiv hochreguliert, nicht jedoch durch Bleiacetatgabe. Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, in unverletzten Nieren die altersabhängige Proliferationsfähigkeit zu untersuchen.

Die Proliferation wurde durch die Bestimmung des prozentualen Anteils der Ki67 positiven Zellen in sowohl mit Kontroll-Substanz als auch mit Bleiacetat behandelten jungen und alten Nieren untersucht. Unter der Behandlung mit Kontroll-Substanz hatten beide Altersgruppen eine vergleichbar niedrige Proliferationsrate von ca. 1 %. Während die Anzahl der proliferierenden Zellen in jungem Tubulusepithel nach Bleiacetatgabe signifikant auf ca. 3,5 % anstieg, stagnierte die Proliferationsrate des alten Tubulusepithels (ca. 1,5 %) nahezu (Abb. 8 A

und B). Überraschenderweise war die Proliferationsrate nach Bleiacetat-Gabe in den Mäusen zwar signifikant, aber nur moderat erhöht, verglichen mit einer publizierten Proliferationsrate aus Experimenten mit Ratten (Vogetseder *et al.*, 2007) (Vogetseder *et al.*, 2008).

Zellen, die sich im Zustand des permanenten Zellzyklusarrests befinden, können auf mitotische Reize nicht mit Proliferation reagieren, daher wurden die Gruppen auch auf Seneszenzmarker hin untersucht. Unter der Kontrollbehandlung hatten die alten Nieren für alle untersuchten Seneszenzmarker signifikant erhöhte Werte verglichen mit den jungen Nieren. Auch nach Bleiacetatgabe war noch ein starker Trend in diese Richtung zu sehen, wenn auch nicht mehr signifikant für alle Marker, so doch hochsignifikant für die mRNA Expression des Proteins p16^{INK4a} (Abb. 9 A-E) (Berkenkamp *et al.*, 2014).

Diese Ergebnisse weisen somit, wie auch die Experimente mit massiver Schädigung des Nierengewebes (Schmitt *et al.*, 2008) (Miya *et al.*, 2012), auf einen intrinsischen Mangel an Proliferationskapazität von älterem Tubulusgewebe und assoziierter zellulärer Seneszenz als einer der möglichen Ursachen hin.

Durch welche Mechanismen seneszente Zellen im Laufe des Lebens in den Organen akkumulieren und die Organhomöostase im Detail beeinflussen, ist jedoch längst nicht abschließend geklärt und diese Thematik rückt zunehmend in den Fokus der Forschung. Wertvolle Erkenntnisse liefern in diesem Zusammenhang Experimente mit genetisch manipulierten Organismen. Ein interessantes Maus-Modell (*Ercc1*^{-Δ}) simuliert das humane XFE Progeroid Syndrom, bei dem die Expression der DNA Reparatur Endonuclease ERCC1-XPF reduziert ist. Als Folge davon sind DNA-Reparaturmechanismen gestört und es entstehen und akkumulieren vergleichbare DNA Schäden in manipulierten Tieren früher als in Wildtyp-Mäusen, begleitet von altersassoziierten Erkrankungen. Weiterhin ist in diesem Modell die mRNA Expression des p16^{INK4a} Proteins in der Niere bei sowohl den jungen *Ercc1*^{-Δ}-Mäusen als auch den alten Wildtypen signifikant erhöht gegenüber den jungen Wildtypen (Yousefzadeh *et al.*, 2020). Eine weitere Bestätigung dafür, dass irreparable DNA-Schädigung ein bedeutsamer Faktor im Alterungsprozess ist.

Kein Modell jedoch simuliert den humanen Alterungsphänotyp perfekt, da verschiedene der zahlreichen zellbiologischen Mechanismen der DNA-Reparatur gestört sein können und damit gegebenenfalls auch kontextspezifische Pathologien erzeugen.

Zellen mit irreparablen DNA-Schäden können potentiell sowohl zu Krebszellen transformieren als auch sterben, z.B. durch programmierten Zelltod, als auch in den Zustand der Seneszenz übergehen (Petr *et al.*, 2020). Seneszente Zellen beeinflussen das Gewebe nicht nur durch ihre

eigene Teilungsunfähigkeit, sondern auch durch ihren sekretorischen Phänotyp, genannt SASP. Dabei wird im Zusammenhang mit Seneszenz auch von dem Konzept der antagonistischen Pleiotropie gesprochen: Seneszenz spielt bei verschiedenen Prozessen eine Rolle, die auch gegensätzlich sein können, wie z.B. Tumorsuppression und Tumorgenese. Es wurde beobachtet, dass die Zusammensetzung der sezernierten Signalmoleküle, Proteasen und regulatorischen Faktoren in verschiedenen Zeitphasen nach Auslösen des Prozesses variiert. Die SASP-vermittelte Regenerationsfähigkeit von Gewebe hängt von der Dauer der Sekretion ab: In jungem Gewebe wird die Reprogrammierung und Proliferation benachbarter Zellen durch kurzzeitige Sekretion von SASP gefördert. Die Akkumulation von seneszenten Zellen in altem Gewebe, z.B. durch irreparable DNA-Schäden und ineffektive Entfernung der Zellen, führt zu einer andauernden SASP-Sekretion mit zeitabhängig veränderter Zusammensetzung, die die Nachbarzellen im Zustand andauernder Dedifferenzierung hält und somit die Regeneration behindert (Borodkina *et al.*, 2018).

4.2 Altersunterschiede von Tubuluszellen *in vitro*

Als Antwort auf einen mitogenen Reiz zeigte älteres Tubulusepithel von Mäusen *in vivo* eine verminderte Proliferationskapazität bei gleichzeitig signifikant gesteigerter mRNA Expression des Seneszenzmarkers p16^{INK4a} (Berkenkamp *et al.*, 2014).

Um diese Unterschiede weiter zu charakterisieren, wurde die primäre murine Tubuluzellkultur als Modell ausgewählt, da immortalisierte Zellen aufgrund ihrer in der Regel fehlgesteuerten Seneszenzsignalwege für diese Art von Untersuchung ungeeignet sind. Zum Beispiel sind die Seneszenzwege in den durch die HPV-Gene E6/E7 (Human Papillomavirus) immortalisierten HK-2-Zellen (Human kidney-2) durch E6-Bindung an p53 und E7-vermittelte RB-Degradierung gestört (Ryan *et al.*, 1994). Weiterhin bietet die primäre Zellkultur die Möglichkeit, einzelne Individuen mit ihren individuellen Eigenschaften wie z.B. Alter und/oder gentechnischen Manipulationen zu untersuchen (Lidzbarsky *et al.*, 2018).

In einer Studie im humanen System wurde der Zusammenhang zwischen der p16^{INK4a} Expression in Fibroblasten eines individuellen Donors *in situ* und der Ausprägung verschiedener Seneszenzmarker wie z.B. SA-β-Galaktosidase, ROS und p16^{INK4a} in der korrespondierenden Fibroblasten-Kultur *in vitro* untersucht, hier jedoch keine Korrelationen gefunden (Waaiker *et al.*, 2018).

Für die Gewinnung der Zellen kam ein Protokoll zum Einsatz, bei dem das Nierengewebe zunächst mechanisch und enzymatisch zerkleinert und die Tubulusstückchen anschließend durch Sieben von anderen Gewebestrukturen isoliert wurden. Der Vorgang der Überführung

der Zellen in eine artifizielle Umgebung und die Kulturbedingungen allein können bereits diverse Signalwege und damit den Phänotyp der untersuchten Zellen beeinflussen (Unterluggauer *et al.*, 2007). Aus diesem Grund wurde für die Vergleichbarkeit der unterschiedlich alten bzw. genetisch manipulierten Zellen das Protokoll in Bezug auf Aussaatdichte, Zellkulturgefäße, Mediumwechsel etc. soweit wie möglich standardisiert und für die Analyse ein Kurzzeitprotokoll gewählt.

4.2.1 Erfolgreiche Etablierung der primären Tubuluszellkultur

Als Basis für die weiteren Untersuchungen wurde die Kultur eines jungen Wildtyps (C57BL/6) an den Kulturtagen 3, 6 und 10 charakterisiert und sichergestellt, dass die Kultur hauptsächlich aus den gewünschten Tubulusepithelzellen besteht (Abb. 10). Verdrängung des gewünschten Zelltyps durch Überwuchs mit Fibroblasten ist ein bekanntes Problem der primären Zellkultur, das durch Selektion während der Präparation und der spezifischen Zusammensetzung des Zellkulturmediums minimiert werden kann (Sato, 2008). Der Kultivierungsprozesses vom Zeitpunkt der Ausplattierung bis Kulturtag 10 führte zu fast vollständigem Bewuchs der Kulturschalen (Abb. 11 A-C). An Tag 10 zeigte die Kultur dann eine signifikant erniedrigte Proliferation (Abb. 11 F; Abb. 12 B) und eine signifikant erhöhte SA- β -Galaktosidaseaktivität (Abb. 11 O; Abb. 12 E) gegenüber sowohl Tag 3 als auch Tag 6. An Tag 10 waren die Kulturschalen nahezu konfluent bewachsen, sodass die erniedrigte Proliferation und die stark erhöhte SA- β -Galaktosidaseaktivität ohne die entsprechende seneszente Morphologie des Hauptanteils der Zellen am ehesten einer Kontaktinhibition zuzuschreiben ist (Abb. 11 A-C und M-O) (Leontieva und Blagosklonny, 2014). Tag 10 wurde daher für Vergleichsuntersuchungen in Bezug auf Seneszenz als ungeeignet angesehen und damit grundsätzlich nicht miteinbezogen. Während die SA- β -Galaktosidaseaktivität und die Proliferation sich während der Kultivierung plausibel gegenläufig verhielten, war der prozentuale Anteil an Cyclin D1 positiven Zellen an den untersuchten Kulturtagen mit ca. 50 % erstaunlicherweise nahezu konstant (Abb. 11 G-I; Abb. 12 C). Verglichen mit dem Tubulusepithel *in vivo* (~5 %) war der Anteil der Cyclin D1 positiven Zellen zudem in der Zellkultur auf einem hohen Niveau (Berkenkamp *et al.*, 2014). Als wichtiger Bestandteil des Zellzyklus bindet und aktiviert Cyclin D1 die CDK4/6-Kinase zwecks Phosphorylierung von RB. Daraufhin wird der Transkriptionsfaktor E2F freigesetzt und Gene für die Progression des Zellzyklus werden transkribiert (Dichl, 2002). Das Level der Cyclin D1 Expression wird auf Proliferationssignale hin auf mehreren Ebenen reguliert und Zellkulturen werden im Wachstum gehemmt, wenn ihnen Cyclin D1 entzogen wird (Yang *et al.*, 2006). Im Gegesatz dazu wurde auch bereits gezeigt, dass Überexpression von Cyclin D1

inhibitorisch auf das Wachstum wirken kann und dass seneszente Fibroblasten erhöhte Cyclin D1-Level aufweisen (Han *et al.*, 1999) (Burton *et al.*, 2007). Die konstante Expression von Cyclin D1 parallel zu abnehmender Proliferation und gesteigertem Seneszenzmarker war in der nicht voll seneszenten Zellkultur mit den vorliegenden Daten zunächst eine Beobachtung, deren Interpretation weitere Experimente erfordert.

4.2.2 Vergleichbar gutes Wachstum der Altersgruppen in der Zellkultur

Die Tubuluszellkulturen von jungen und alten Wildtypmäusen (C57BL/6) wurden in Bezug auf Proliferation und Seneszenzmarker miteinander verglichen. Im Tierversuch zeigten die jungen Nieren eine signifikant gesteigerte Proliferation gegenüber alten Nieren nach Gabe eines mitogenen Agens (Abb. 8 A und B) (Berkenkamp *et al.*, 2014).

Die Proliferationsanalyse durch Auszählung von Ki67 (Abb. 13 A) und BrdU (Abb. 13 B und D) positiven Zellen in der Zellkultur zeigte überraschenderweise keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen, auch nicht nach Bleiacetatzugabe (Abb. 13 D). Die in der Zellkultur (bis ca. 40 % Ki67 positive Zellen) gegenüber dem Tierversuch *in vivo* (ca. 1-3 % Ki67 positive Zellen) weit höher liegenden Proliferationsraten des Tubulusepithels sind vermutlich der Zusammensetzung des Zellkulturmediums geschuldet, dessen Wachstumsfaktoren wahrscheinlich den potentiellen Effekt des Bleiacetats überkommen (Zhuang *et al.*, 2004).

Tag 10 wurde aus den weiter oben genannten Gründen grundsätzlich nicht in die Auswertungen miteinbezogen, trotzdem war auffällig, dass an Tag 10 signifikant weniger alte Tubuluszellen pro HPF bei der mikroskopischen Untersuchung zu sehen waren (Abb. 13 C). Diese Beobachtung unterstreicht frühere Ergebnisse, dass Tubuluszellkulturen von älteren Tieren an Kulturtag 10 eine signifikant kleinere Fläche aufweisen als die Kulturen jüngerer Tiere (Schmitt *et al.*, 2008). Da sich die Proliferationsrate zwischen den Altersgruppen in diesem Versuchsansatz jedoch nicht signifikant unterschieden hat, sind ein vermindertes Anwachsen von Tubuli, eine verlängerte Generationszeit und ein vermehrtes Absterben von Zellen drei mögliche Gründe für das relative Zelldefizit in der alten Kultur. Das Auftreten von signifikant mehr TUNEL positiven Zellen in der alten Kultur an Tag 6 wies in diesen Experimenten auf ein vermehrtes Zellsterben hin (Daten nicht gezeigt). Über eine verlängerte Generationszeit lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren, da die Proliferationsanalyse keine Unterschiede für die Altersgruppen aufzeigte. Eine unterschiedliche Generationszeit bzw. ein unterschiedliches Anwachsverhalten wurde mit diesem Versuchsdesign nicht ausdrücklich untersucht. Eine Nachfrage zu diesen Aspekten bei einem kommerziellen Hersteller für humane renale

epitheliale Zellkulturen lieferte die Aussage, dass auch die Nieren älterer Spender zur Zellkulturpräparation generell gut geeignet sind. In zwei repräsentativen Qualitätszertifikaten von altersverschiedenen, für kommerzielle Zwecke präparierten humanen renalen epithelialen Zellkulturen (Cortex), sind zu dieser Fragestellung beispielhaft folgende (modifizierte) Informationen zu finden:

Tabelle 18 Informationen zur Kultivierung von humanen renalen epithelialen Zellen (modifiziert)

Spenderalter	Passage	Viabilität [%]	Generationszeit [h]	Verdopplungen
45 Jahre	2	92	30	>14
85 Jahre	2	95	22	>14

In diesem Beispiel haben die Zellen des älteren Spenders sogar eine leicht höhere Viabilität und eine deutlich kürzere Generationszeit. Die Angaben beziehen sich jedoch nur auf eine bestimmte Phase der Zellkulturen, eine Kultivierung der Zellen darüber hinaus würde möglicherweise altersbedingte Unterschiede aufdecken.

Weiterhin wurde die CDKI mRNA Expression in frisch isolierten Tubuli als Ausgangsmaterial der Zellkultur beider Altersgruppen analysiert. Die Tubuli der alten Mäusenieren hatten eine signifikant höhere mRNA Expression des prominenten Seneszenzmarkers p16^{INK4a} (Abb. 14 B), während für die Proteine p15^{INK4b} (Abb. 14 A), p19^{ARF} (Abb. 14 C) und p21^{CIP1} (Abb. 14 D) keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden. Das reproduziert wiederum die Beobachtung, dass p16^{INK4a} mit steigendem Alter in Nierengewebe, aber auch anderen Organen akkumuliert (Krishnamurthy *et al.*, 2004) und dass speziell auch isoliertes Tubulusgewebe diesem Trend folgt. Auch in den alten Nieren der Bleiacetatversuche war das mRNA Level des Proteins p16^{INK4a} signifikant erhöht (Abb. 9 D) (Berkenkamp *et al.*, 2014).

Vergleicht man die Seneszenzmarker im Verlauf der jungen und alten Tubuluszellkultur, so fällt auf, dass junge und alte Zellen die gleichen Verlaufsmuster zeigten, aber mit Ausnahme der Proteine p15^{INK4b} und p19^{ARF} (Abb. 15 A/C, Signifikanz nicht dargestellt) keine signifikanten altersrelevanten Unterschiede in der CDKI mRNA Expression (Abb. 15 A-D) und auch der SA-β-Galaktosidaseaktivität (Abb. 15 E) an den einzelnen Kulturtagen 3 und 6 aufwiesen. Die signifikant unterschiedlichen mRNA Level der Proteine p15^{INK4b} und p19^{ARF} werden an anderer Stelle im Text diskutiert.

Zusammengefasst wies die Proliferations- und Seneszenzanalyse renaler epithelialer Zellen in der Zellkultur in dem betrachteten Zeitraum keine belastbaren Parallelen mit der intrinsisch verminderten Proliferationskapazität bzw. der gesteigerten Seneszenz von alten Nieren *in vivo* auf. Die Zellkultur ist ein sehr artifizielles System: Nicht nur fehlen die dreidimensionalen Wechselwirkungen mit den anderen Zelltypen, auch die chemische Zusammensetzung der

Umgebung in Bezug auf z.B. Sauerstoff, Signalmoleküle sowie Elektrolyte ist stark verändert, was zu einem Kulturschock führen kann (Sherr und De Pinho, 2000). Das bewirkte schon in der jungen Tubuluszellkultur eine Hochregulierung der CDKI mRNA Expression. Zum Beispiel wurden p15^{INK4b}, p16^{INK4a} und p19^{ARF} während der Kulturdauer kontinuierlich hochreguliert, während das p21^{CIP1} Level zunächst anstieg und dann auf konstantem Niveau blieb (Abb. 20). Auch während der Kultivierung von humanen Epithelzellen der Brustdrüse wurde ein kontinuierliches Ansteigen des p16^{INK4a} Levels beobachtet, sowie ein initiales Ansteigen des p21^{CIP1} Levels, das dann auf einem konstanten Niveau blieb (Brenner *et al.*, 1998). Ein Extrembeispiel ist die mRNA Expression des Proteins p19^{ARF}: Sie betrug an Kulturtag 10 das ca. 4000-fache des Ausgangswertes von isolierten Tubuli (nicht dargestellt). Damit drängten die allein durch den Kultivierungsprozess bedingten hoch signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturtagen mögliche altersrelevante Unterschiede in den Hintergrund. Das trotz teilweise massiver Hochregulation der Zellzyklusinhibitoren vergleichbar gute Wachstumsverhalten von jungen und alten Tubuluszellkulturen in den betrachteten Zeiträumen steht vermutlich mit der stabilen Zufuhr des Wachstumsfaktors EGF (Epidermal Growth Factor) durch das Zellkulturmedium in Zusammenhang, obwohl die Zellen auch ohne die Zufuhr exogener Wachstumsfaktoren proliferieren können (Zhuang *et al.*, 2004). Den humanen Tubuluszellkulturen wurde darüber hinaus sogar noch Serum und Epinephrin zugeführt. Weiterhin findet möglicherweise schon eine Selektion bei der initialen Anwachsprozedur in Passage 0 statt: Bereits senescente oder anders vorgeschädigte Zellen können sich in der Kultur gar nicht erst etablieren.

4.2.3 *Terc*^{-/-}-Tubuluszellen im Vergleich zum Wildtyp in der Zellkultur

Die Tubuluszellen der C57BL/6 Wildtypmaus haben durch ihre physiologische Telomeraseaktivität und den daraus resultierenden langen Telomeren keine Proliferationslimitationen durch Aktivierung des Telomer-abhängigen Seneszenzweges. Im Gegensatz dazu ist bei *Terc*^{-/-}-Mäusen die Telomerase im gesamten Organismus inaktiv, was nach sukzessiver Verpaarung von Knockout-Tieren in höheren Generationen zu einer massiven Telomerverkürzung auch in den Tubuluszellen führt (Westhoff *et al.*, 2010). Dieses Mausmodell spiegelt die humane Situation, in der Telomerverkürzung mit steigendem Alter unter anderem in der Niere auftritt und dort der Verlust im Cortex größer ist als in der Medulla (Melk *et al.*, 2000).

Für die humane Niere wird die Telomerlänge mit der Transplantatfunktion in Zusammenhang gebracht. Eine Kombination aus der Analyse der Telomerlänge des Transplantats und der

Immunzellen des Empfängers ermöglicht Voraussagen bezüglich des Langzeitüberlebens des Transplantats (Kloda *et al.*, 2017).

Im Mausmodell zeigen die Nieren von *Terc*^{-/-}-Mäusen einer höheren Generation nach I/R sowohl stärkere akute als auch chronische Schädigungen und eine verminderte Regenerationsfähigkeit als Wildtyp-Nieren: Eine vor und nach I/R erhöhte mRNA Expression des Proteins p21^{CIP1} wird nach I/R von einer verminderten Anzahl proliferierender Ki67 positiver Tubuluszellen begleitet (Westhoff *et al.*, 2010). Ist die im Tierversuch verminderte Proliferationskapazität der durch die Telomerverkürzung vorgeschädigten Tubuluszellen der *Terc*^{-/-}-Mäuse auch in der artifiziellen Umgebung der Zellkultur zu beobachten?

Die vor der Kultivierung aus isolierten Tubuli von jungen und alten Wildtyp- und *Terc*^{-/-}-Mäusen (G3) als künstlich gealterten aber noch chronologisch jungen Organismen bestimmten CDKI mRNA Expressionen zeigten im Vergleich Unterschiede für die Proteine p16^{INK4a} und p21^{CIP1}. Die alten Wildtyp-Tubuli exprimierten signifikant mehr mRNA des Proteins p16^{INK4a} (Abb. 16 B) als die jungen Wildtyp- und auch die jungen *Terc*^{-/-}-Tubuli, wohingegen die jungen *Terc*^{-/-}-Tubuli signifikant mehr mRNA des Proteins p21^{CIP1} (Abb. 16 D) exprimierten als die jungen und auch die alten Wildtyp-Tubuli. Doppelstrangbrüche durch instabile Telomere können den durch p53/p21^{CIP1} vermittelten Seneszenzweg mit Zellzyklusarrest aktivieren und damit die Proliferation beeinträchtigen (Roake und Artandi, 2017). Eine vermehrte mRNA Expression des Proteins p21^{CIP1} auch schon in jungen *Terc*^{-/-}-Tubuli passt daher ins Bild.

Ein Vergleich der an Tag 6 gut etablierten Zellkulturen in Bezug auf die Proliferation mittels Auszählung BrdU positiver Zellen erbrachte allerdings ein unerwartetes Ergebnis. Die Kulturen der jungen *Terc*^{-/-}-Nieren hatten signifikant mehr BrdU positive Zellen als die jungen und auch alten Wildtypkulturen (Abb. 17 F). Das würde auf eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit *in vitro* im Gegensatz zu der *in vivo* beobachteten verminderten Proliferation hindeuten. Diese Beobachtung ist auf den ersten Blick überraschend, betrachtet man allerdings die Methodik des BrdU-Einbaus in neusynthetisierte DNA genauer, so wird BrdU nicht nur in proliferierenden Zellen als Baustein verwendet, sondern auch in quieszenten Zellen im Rahmen der DNA-Reparatur (Lee *et al.*, 2011). Damit kann die signifikante Erhöhung der BrdU positiven Zellen in der *Terc*^{-/-}-Zellkultur zumindest partiell der durch Telomerverkürzung vermehrten DNA-Reparatur geschuldet sein, zumal die durchschnittliche Zellzahl an Kulturtag 10 ähnlich wie beim alten Wildtyp signifikant geringer war als beim jungen Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Weiterhin könnte der Unterschied einer verlängerten Generationszeit zuzuorden sein (Saeed und Iqtedar, 2015). Um *in vitro* und auch *in vivo* Proliferation von z.B. Reparaturmechanismen zu unterscheiden, empfiehlt sich für zukünftige Versuche mindestens eine Doppelfärbung

BrdU/Ki67 bzw. die Wahl einer ganz anderen Methode.

Unerwartet war auch, dass die kultivierten *Terc*^{-/-}-Zellen gegenüber den Wildtypzellen an Tag 6 signifikant weniger SA-β-Galaktosidase-Aktivität zeigten (Abb. 17 E). Eine Erklärung, ob dieser Unterschied von dem Modell oder der Methode (Interassay-Varianz: z.B. pH-Wert!) abhängt, können nur weitere Experimente bringen.

Die Analyse der Seneszenz auf mRNA Ebene lieferte wie schon bei dem Vergleich junge/alte Tubuluszellen für die mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} (Abb. 17 A) und p19^{ARF} (Abb. 17 C) signifikante Unterschiede. Junge Wildtypzellen hatten eine signifikant höhere mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} und p19^{ARF} als alte Wildtyp- und auch junge *Terc*^{-/-}-Zellen. Die Unterschiede im mRNA Level der Proteine p16^{INK4a} und p21^{CIP1} der Tubuli hatten sich wiederum durch den Zellkulturstress nivelliert (Abb. 17 B und D). Da die mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} und p19^{ARF} auch in dem folgenden Zellkulturvergleich an Tag 6 signifikante Unterschiede aufwies, wird darauf an späterer Stelle eingegangen.

4.2.4 *Ink4a*^{-/-}-Tubuluszellen im Vergleich zum Wildtyp in der Zellkultur

Die Expression des *CDKN2A* Genlocus, der das Protein p16^{INK4a} kodiert, ist im humanen und auch im murinen System mit Seneszenz und Alterung assoziiert. Die Expression von p16^{INK4a} wird durch verschiedene Stressoren hervorgerufen, resultiert in einem Zellzyklusarrest und p16^{INK4a} positive Zellen akkumulieren in den Organen mit steigendem Alter. p16^{INK4a} ist somit ein anerkannter Marker für Seneszenz und spielt zudem eine kausale Rolle in Alterungsprozessen (Sorrentino *et al.*, 2014).

Speziell im Cortex der humanen Niere steigt das mRNA Level des Proteins p16^{INK4a} und auch die Anzahl p16^{INK4a} positiver Tubuluszellen signifikant mit dem Alter an, während für Ki67 positive Zellen eine umgekehrte Korrelation gefunden wird (Melk *et al.*, 2004). In geschädigten humanen Nieren steigt das p16^{INK4a} Level im Vergleich zu altersentsprechenden gesunden Organen sogar noch (Melk *et al.*, 2005).

Nach I/R steigt die mRNA Expression des Proteins p16^{INK4a} im Mausmodell in den ersten 30 Tagen kontinuierlich an (Lee *et al.*, 2012). Ein Vergleich der Regenerationsfähigkeit der Nieren von Wildtyp- versus *Ink4a*^{-/-}-Mäusen nach I/R ergab, dass die Wildtypnieren an Tag 30 morphologisch signifikant mehr tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose entwickelt hatten und auch funktionell eine signifikant verminderte Kreatinin-Clearance aufwiesen. In den Nieren der *Ink4a*^{-/-}-Mäuse waren zudem signifikant mehr proliferierende Ki67 positive und signifikant weniger seneszente Zellen zu detektieren (Braun *et al.*, 2012). Übertragen auf die Tubuluszellkultur würde man eine verstärkte Proliferation und weniger seneszente Zellen bei

den *Ink4a*^{-/-}-Tubuluszellen erwarten. Verglichen wurden die Zellen von alten *Ink4a*^{-/-}-Tieren und alten Wildtyp-Tieren mit dem entsprechenden genetischen Hintergrund.

Die Analyse der CDKI mRNA Expression ergab, dass die alten Wildtyp-Tubuli im direkten Vergleich ein schwach signifikant ($p = 0,047$) höheres mRNA Level des Proteins p19^{ARF} (Abb. 18 B) aufwiesen als die *Ink4a*^{-/-}-Tubuli, während es für die Proteine p15^{INK4b} (Abb. 18 A) und p21^{CIP1} (Abb. 18 C) keine statistisch relevanten Unterschiede gab. Die p19^{ARF} Expression wurde bei Anwendung der zweifaktoriellen ANOVA im Rahmen der Mehrfachvergleiche als nicht mehr signifikant verschieden berechnet, größere Fallzahlen sind notwendig, um dieses Ergebnis zu überprüfen. Trotzdem ist diese Tendenz überraschend, da in gealterten *Ink4a*^{-/-}-Tubuli p16^{INK4a} als wichtiger Vermittler der zellulären Seneszenz nicht zur Verfügung steht und man daher hätte erwarten können, dass es zu einer kompensatorischen Hochregulierung der anderen seneszenzassoziierten Proteine wie p15^{INK4b} bzw. p19^{ARF} kommt.

Während des Alterungsprozesses ist die p16^{INK4a} Expression stark mit der p19^{ARF} Expression korreliert (Krishnamurthy *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu der Situation in der Zellkultur akkumulieren seneszenzpositive, p16^{INK4a} positive Zellen in der Niere *in vivo* langfristig im Verlauf des Lebens. Sind diese Zellen gleichzeitig positiv für p19^{ARF} würde das den Unterschied erklären: In *Ink4a*^{-/-}-Nieren können Zellen mit diesen Eigenschaften nicht akkumulieren, sie werden entweder durch den Zelltod aus dem System entfernt und/oder folgen anderen Seneszenzmechanismen und regenerieren sich gegebenenfalls.

In der Zellkultur an Tag 6 konnte keine gesteigerte Proliferation (Abb. 19 E) der *Ink4a*^{-/-}-Zellen beobachtet werden. Das deckt sich mit Ergebnissen aus Studien mit MEFs. *Ink4a*^{-/-}-MEFs zeigten hier ein Wachstumsverhalten vergleichbar mit Wildtypzellen, während *Arf*^{-/-}- und auch *Ink4a*^{-/-}/*Arf*^{-/-}-Zellen verstärkt proliferierten (Sharpless *et al.*, 2004). Jedoch war der Anteil an SA- β -Galaktosidase positiven Zellen signifikant geringer als in der Wildtypkultur (Abb. 19 D). Das heißt, dass die beiden prominenten Seneszenzmarker p16^{INK4a} und SA- β -Galaktosidase in der *Ink4a*^{-/-}-Kultur plausibel vermindert waren, wobei die Expression des Proteins p16^{INK4a} und die Aktivität der SA- β -Galaktosidase auf Einzelzellniveau nicht notwendigerweise immer zusammenfallen (Noppe *et al.*, 2009).

Die CDKI mRNA Analyse ergab wiederum einen signifikanten Unterschied für das mRNA Level der Proteine p15^{INK4b} und p19^{ARF}: *Ink4a*^{-/-}-Zellen enthielten mehr mRNA des Proteins p15^{INK4b} (Abb. 19 A) und auch p19^{ARF} (Abb. 19 B) als die Wildtypzellen.

Trotz des sehr artifiziellen Zellkulturmilieus, in dem sich die Tubuluszellen der verschiedenen Altersgruppen und mit markanten genetischen Veränderungen in den untersuchten Parametern unerwartet uniform verhalten haben, fanden sich erstaunlicherweise für p15^{INK4b} und auch

p19^{ARF}, nicht jedoch für p16^{INK4a}, an Kulturtag 6 jeweils signifikante Unterschiede bei den zu vergleichenden Gruppen. Zusammengefasst war in den Kulturen der jungen Wildtyp- und der alten *Ink4a*^{-/-}-Mäuse an Kulturtag 6 die mRNA Expression der Proteine p15^{INK4b} und p19^{ARF} stärker hochreguliert (Abb. 17 A, C; Abb. 19 A, B). Es könnte sich dabei im Hinblick auf die massive Hochregulation der CDKI mRNAs insgesamt während des Kulturverlaufs und der Gruppengröße sowohl um eine artifizielle, nicht valide Beobachtung handeln oder aber um echte genetisch bzw. altersbedingte relevante Unterschiede.

In vitro können alle rekombinanten Proteine der INK4-Familie die Aktivität der Rb-Kinase gleichermaßen inhibieren und fungieren damit potentiell als Zellzyklusinhibitoren. Nichtsdestotrotz werden sie während der Mausentwicklung und -alterung differentiell exprimiert und haben neben dem Zellzyklusarrest möglicherweise noch andere Funktionen. Während p18^{INK4c} und p19^{INK4d} bereits mithilfe des Northern Blots in Embryos an Tag 7 nachgewiesen wurden, zeigten sich für p15^{INK4b} und p19^{ARF} deutliche Signale erst in den Geweben von 9-12 Wochen alten Mäusen, p16^{INK4a} wurde mit dieser Methode zu dem Zeitpunkt noch nicht nachgewiesen. Die RT-PCR-Analyse zeigte dann aber eine p16^{INK4a} Akkumulation während des Alterns (Zindy *et al.*, 1997). Aufgrund seiner prominenten Rolle als Tumorsuppressor und Seneszenzmarker gibt es zu p16^{INK4a} eine vergleichsweise Fülle von Daten in den verschiedensten Kontexten, wohingegen man zu p15^{INK4b} nur relativ wenige Informationen findet. Einige Hinweise bringen jeweils gentechnisch veränderte Organismen. In MEFs bindet p15^{INK4b} nur in Abwesenheit von p16^{INK4a} an Cdk4 und kann damit p16^{INK4a} möglicherweise als Backup funktionell ersetzen. Dennoch sind *p15^{Ink4b}*^{-/-}-Tiere im Vergleich zu *p16^{Ink4a}*^{-/-}-Tieren weniger anfällig für die Entwicklung von Tumoren (Krimpenfort *et al.*, 2007). Die MEFs von *p15^{Ink4b}*^{-/-}-Tieren weisen eine verbesserte Anwachsbarkeit und eine gesteigerte Proliferation im Vergleich mit den Wildtyp-MEFs auf, zeigen aber trotzdem Kontaktinhibierung und Seneszenz (Latres *et al.*, 2000). Beobachtungen, dass der *CDKN2B* Genlocus häufig bei hämatologischen Erkrankungen epigenetisch stillgelegt ist, weist auf eine Beteiligung bei der hämatopoetischen Differenzierung hin (Humeniuk *et al.*, 2013). Von der Tumorsuppressorfunktion und der differentiellen p15^{INK4b} Expression in der Hämatopoese bis zu verschiedenen alten bzw. genetisch veränderten renalen Tubuluszellen und deren differentieller p15^{INK4b} Expression in dem kleinen Zeitfenster ist derzeit jedoch mit den vorliegenden Daten aus der Literatur kein rationaler Zusammenhang herzustellen. Ähnliches gilt für p19^{ARF}, dessen prominente Tumorsuppressorfunktion in zahlreichen Publikationen belegt ist. Wichtige Informationen wurden auch hier mithilfe von gentechnisch veränderten Organismen gesammelt, z.B. entwickeln sich spontane Tumore in *p19^{ARF}*^{-/-}-Mäusen innerhalb

kürzerer Zeit als in Wildtypen, aber auch als in $p16^{INK4a/-}$ -Mäusen. Das gleichzeitige Ausschalten beider Gene verkürzt diese Zeitspanne noch erheblich. Weiterhin wiesen die MEFs von $p19^{ARF/-}$ -Tieren eine gesteigerte Proliferation im Vergleich mit Wildtyp-MEFs auf. Während die Wachstumsdichte zum Zeitpunkt der Konfluenz bei $p16^{INK4a/-}$ -MEFs größer ist als beim Wildtyp, haben die $p19^{ARF/-}$ -MEFs eine mit dem Wildtyp vergleichbare Dichte (Sharpless *et al.*, 2004). Betrachtet man die Tatsache, dass $p19^{ARF}$ das multiple Signalwege beeinflussende Protein p53 stabilisiert (Pomerantz *et al.*, 1998), sind gezielte Rückschlüsse bezüglich der individuellen Ausprägung der $p19^{ARF}$ Expression in der Zellkultur mit den vorliegenden Daten nicht möglich. Somit müsste die differenzielle mRNA Expression der Proteine $p15^{INK4b}$ und auch $p19^{ARF}$ in der Zellkultur an Tag 6 gegebenenfalls zunächst durch Wiederholung und Aufstocken der Gruppengröße verifiziert und erst danach durch Erweiterung der Experimente weiter aufgeklärt werden.

4.2.5 Seneszente Tubuluszellen *in vitro* durch Bestrahlung

Primäre Zellkulturen dienen unter anderem dazu, Zellfunktionen oder auch Reaktionen von einem bestimmten *in vivo*-Zelltyp *in vitro* auf z.B. Medikamente zu untersuchen. Um seneszente Tubuluszellen in der primären Zellkultur zu untersuchen, reicht die kurzfristige Kultivierung nicht aus und auch verschiedene Kultivierungsprotokolle in den Laboren erschweren die Vergleichbarkeit. Die Tubuluszellen regulieren zwar schon kurz nach der Inkulturnahme die prominenten Seneszenzmarker $p16^{INK4a}$ (Abb. 20) und SA- β -Galaktosidase (Abb. 12) herauf, ohne jedoch auch andere typische Eigenschaften wie z.B. die flache große Morphologie anzunehmen (Chen *et al.*, 2013). Starke mitotische Signale des Kulturmediums erhalten zunächst trotz massiver Hochregulierung der CDKIs die Proliferation aufrecht. Der Mechanismus entspricht möglicherweise der ektopischen Expression des Onkoproteins RAS in primären humanen Fibroblasten, in denen partielle Seneszenz einem hyperproliferativen Stadium folgt (Deng *et al.*, 2004). Eine Kultivierung bis zur Ausbildung der vollen Seneszenz birgt außerdem bei Primärkulturen die Gefahr der Dedifferenzierung bzw. der Überwucherung der Kultur mit anderen Zelltypen. Um die primäre Tubuluszellkultur für Seneszenzstudien zeitnah in einen Zustand der vollausgebildeten Seneszenz zu überführen, wurde die auch schon für andere Zellkulturen etablierte Methode der Bestrahlung mit γ -Strahlen verwendet und analysiert (Coppe *et al.*, 2010; Davalos *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012).

Durch Färbung der Kultur mit typischen Markern für renale Tubuluszellen wurde eine Dedifferenzierung bzw. Überwucherung der Kulturen weitgehend ausgeschlossen. Apoptosemarker zeigten kein vermehrtes Zellsterben in der bestrahlten Kultur. Nach der

Bestrahlung zeigte die Zellkultur jedoch als Zeichen von Seneszenz nicht nur die erhöhte Expression der p53/p21^{CIP1}-Achse, sondern auch eine erhöhte SA- β -Galaktosidase-Aktivität und eine verminderte Lamin B1 Expression. p16^{INK4a} wurde durch die Bestrahlung auf Proteinebene nicht weiter induziert. Begleitet wurden diese Marker durch eine Verminderung der proliferierenden Zellen und die typische morphologische Transformation von seneszenten Zellen (Abb. 21). Die erhöhte Expression von Cyclin D1 ist in der Literatur schon mit Seneszenz assoziiert worden (Ledda-Columbano *et al.*, 2004) (Suzuki *et al.*, 2012) (Leontieva *et al.*, 2012), die genaue Rolle von Cyclin D1 in Bezug auf Seneszenz muss jedoch noch aufgeklärt werden.

Die Bestrahlung ist somit auch für primäre renale Tubuluszellen ein valides Werkzeug, um an diesem Zelltyp *in vitro* Studien an bereits seneszenten Zellen durchführen zu können (Berkenkamp *et al.*, 2014).

4.3 Marmosets als Modell für Seneszenz in der humanen Niere

Die murine Tubuluszellkultur bietet zahlreiche Möglichkeiten für genetische und/oder chemische und physikalische Manipulationen und deren Analyse. Da das Mausmodell im Vergleich zur humanen Situation in Bezug auf Seneszenz gravierende Unterschiede wie z.B. die verschieden regulierte Aktivität der Telomerase aufweist (Lansdorp, 1997), rücken auch andere Modellorganismen in den Fokus der Seneszenzforschung. Darunter auch der kleine nicht-humane Primat Marmoset (*Callithrix jacchus*), der nicht nur eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zum Menschen, sondern auch Ähnlichkeiten bei sowohl den physiologischen als auch den pathologischen Prozessen aufweist.

Erwachsene Marmosets wiegen ca. 400 g und werden durchschnittlich 5-7 und maximal 16 Jahre alt. Sie können in Gruppen als auch einzeln gehalten werden und auch genetische Manipulationen sind möglich. Zu den Todesursachen von gealterten Tieren gehört unter anderem die chronische Nierenerkrankung mit der Entwicklung von chronischer interstitieller Nephritis und Glomerulonephropathien. In 75 % der über 8 Jahre alten Tiere wurden renale Erkrankungen nachgewiesen (Fischer und Austad, 2011) (Tardif *et al.*, 2011).

Damit ist dieses Modell für die renale Seneszenzforschung hochinteressant: Die bei Organentnahmen im Rahmen von anderen Projekten nicht benötigten Nieren wurden aufgearbeitet und analysiert. Dabei war von Interesse, ob sich die Tubuluszellen isolieren und kultivieren lassen und ob die für humane Proben getesteten Primer und Antikörper für diese Spezies ebenfalls verwendet werden können. Die angelegte Tubuluszellkultur zeigte die typische epitheliale spindelförmige Morphologie, teilweise sogar mit den für humane

Tubuluskulturen typischen flüssigkeitsgefüllten "domes" (Abb. 22 C). In dem Hauptanteil der Zellen konnten die Epithelmarker Cytokeratin und E-Cadherin mit den verwendeten Antikörpern nachgewiesen werden. Einige Zellen reagierten auch mit den Antikörpern für den von Willebrand-Faktor und das S100A4-Antigen, die Zellkultur enthielt also auch einige wenige Endothelzellen und Fibroblasten. Eine plausible Reaktivität zeigten die Antikörper gegen γ -H₂A.X und Ki67. Alle getesteten Antikörper gegen humane Proteinepitope reagierten also plausibel mit den Marmoset-Epitopen und können für Analysen verwendet werden (Abb. 23). Ähnlich verhielt es sich mit den getesteten Primern für HPRT, p16^{INK4a} und p21^{CIP1}. Es wurde analog zu der humanen und auch der murinen Situation eine signifikante Altersabhängigkeit für das mRNA Level des Proteins p16^{INK4a}, nicht aber p21^{CIP1}, in den Nieren nachgewiesen (Abb. 22 A, B). In beispielhaft getesteten Zellkulturen konnte ein Anstieg des mRNA Levels der Proteine p16^{INK4a} und p21^{CIP1} im Kulturverlauf beobachtet werden, der Trend konnte aufgrund der kleinen Fallzahl aber nicht statistisch bewertet werden (Abb. 22 D). Die Auswertung der Analysen erfolgte unter der Hypothese, dass sich HPRT auch bei *Callithrix jacchus* als Haushaltsgen eignet und dass die Primer bzw. Sonden ausreichend effizient an die bis heute in den Datenbanken nur vorhergesagten Sequenzen binden (für p16^{INK4a} wurde erst im September 2014 eine mRNA Sequenz hinterlegt).

Das sind für diesen Modellorganismus in der Seneszenzforschung grundsätzlich vielversprechende Ergebnisse, allerdings müssen viele der für die Nager bereits etablierten Protokolle erst neu getestet und validiert werden.

4.4 siRNA als Therapeutikum für renale Tubuluszellen

Eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche *in vivo* Anwendung von siRNA ist der Nachweis, dass die siRNA-Sequenz einen robusten Knockdown des gewünschten Targets bewirkt. Für diese Fragestellung eignete sich die Tubuluszellkultur sehr gut. Kommerziell erhältliche, vordesignete siRNA Sequenzen gegen die mRNA der Proteine p16^{INK4a} und p53 wurden mithilfe eines Transfektionsreagenzes in die Zellkultur eingebracht und der Knockdown Tage später auf mRNA- und Proteinebene analysiert. Primäre adhäsive Zellkulturen gelten als schwer zu transfizieren (Jordan *et al.*, 2008), daher wurde mithilfe von fluoreszenzmarkierter siRNA die Aufnahme in die Tubuluszellen beobachtet (Abb. 24 A-C).

Längst nicht alle Zellen in den Kulturschalen waren zu dem jeweiligen Beobachtungszeitraum transfiziert, unter anderem deshalb konnte auch kein 100 %iger Knockdown von mRNA bzw. Protein erreicht werden.

Für beide Targets wurde jedoch eine potente siRNA-Sequenz gefunden (Abb. 24 D-H), was speziell im Fall der mRNA des Proteins p16^{INK4a} eine Herausforderung darstellte, da sich dort nur ein kurzer Sequenzabschnitt finden lässt, der sich von der mRNA des Proteins p19^{ARF} unterscheidet. Nichtsdestotrotz war es gelungen, die mRNA des Proteins p16^{INK4a} zu über 80 % herunterzuregulieren ohne jedoch die mRNA des Proteins p19^{ARF} zu beeinflussen (Abb. 24 D, E; Daten für mRNA des Proteins p19^{ARF} nicht gezeigt).

4.4.1 Aufnahme der siRNA auch von geschädigten Tubuluszellen *in vivo*

siRNA muss zunächst in die Zellen aufgenommen werden, um dort die Expression eines Zielgens vorübergehend herunterregulieren zu können. Systemisch injizierte ¹²⁵I-markierte siRNA akkumuliert bereits während der ersten Minute nach der Injektion in der Mäuseniere ohne jedes Transfektionsvehikel, was die Niere zu einem bevorzugten Zielorgan für siRNA-basierte Therapien macht (Braasch *et al.*, 2004).

p53 siRNA mit dem Namen QPI-1002 (I5NP) war die erste systemisch injizierte siRNA im humanen System und wurde zunächst zur Behandlung von akuten Nierenschädigungen während großer kardiovaskulärer Operationen eingesetzt (Demirjian *et al.*, 2017). Eine wichtige Grundlage für die klinischen Studien waren unter anderem *in vivo* Versuche an Ratten, bei denen der zeitliche Ablauf, die Dosierung und die Wirkung von systemisch verabreichter p53 siRNA auch in durch I/R bzw. Cisplatin geschädigten Nieren evaluiert wurde (Molitoris *et al.*, 2009). Diese Versuche zielten zwar auf die anti-apoptotische Wirkung der p53 siRNA, dienten aber in der vorliegenden Arbeit als Orientierung, um die Biodistribution und Wirksamkeit von systemisch injizierter p53 siRNA in der Niere auch in dem hier verwendeten I/R-Mausmodell zu validieren. Nach 25 minütiger einseitiger Ischämie wurde die Reperfusion in der linken Niere von jungen männlichen Wildtypmäusen wiederhergestellt, nach 4 Stunden entweder Kontroll-Substanz oder Cy3-fluoreszenzmarkierte p53 siRNA systemisch injiziert und die Organe 5, 7,5 oder 24 Stunden nach I/R entnommen und analysiert (Abb. 25). Eine Stunde nach der Injektion war ein robustes Cy3-Signal in sowohl den unverletzten proximalen Tubuli der kontralateralen als auch in den geschädigten proximalen Tubuli der I/R-Nieren zu detektieren. In distalen Tubuli und Glomeruli war hingegen keine nennenswerte Fluoreszenz zu sehen (Abb. 26 A-C). Der Nachweis, dass auch geschädigte Tubuli (Verlust des Bürstensaums) die siRNA aufgenommen haben, ist bedeutend, da dieser Vorgang überhaupt erst die Voraussetzung für diese Therapieform bietet. Im zeitlichen Verlauf wurde die Fluoreszenz in den geschädigten Tubuli schwächer und schien sich in Vesikeln zum Tubuluslumen hinzubewegen (Abb. 26 D-F). Physiologisch findet man auch in ungeschädigten

Zellen ein basales p53 Level, das durch ständige Produktion gefolgt von schneller Degradation (Proteinhalbwertszeit ~ 20 min) aufrechterhalten wird und damit jederzeit eine Reaktion auf Stress ermöglicht (Jiang *et al.*, 2010). Durch die ständige "Nachproduktion" und die zeitlich sehr begrenzte Verweildauer in den Zellen ist die Wirkung einer Einzeldosis siRNA auf die p53 Expression vermutlich eher flüchtig. So wurde im Cortex der I/R-Nieren 7,5 Stunden nach I/R (= 3,5 h nach Injektion) immerhin noch ein signifikant geringeres mRNA-Level des Proteins p53 im Vergleich zu den mit Kontrolle injizierten Nieren gefunden, während das Level schon 24 Stunden nach I/R (= 20 h nach Injektion) nicht mehr unterschiedlich war (Abb. 26 H). Aufgrund methodischer Schwierigkeiten einen validen p53 Protein Assay aus Mausgewebe zu etablieren, wurde der Nachweis des p53 Knockdowns im Tierversuch ausschließlich auf mRNA Ebene geführt. Funktionell führte die Verabreichung von p53 siRNA, wie erwartet, zu einer signifikanten Reduzierung Cleaved Caspase 3 positiver und somit apoptotischer Tubuluszellen im Cortex 24 Stunden nach I/R (Abb. 26 G). Auch TUNEL positive Tubuluszellen waren unter p53 siRNA Gabe im Cortex deutlich, jedoch statistisch nicht signifikant, reduziert, während es für die Medulla keine Tendenzen gab. 7,5 Stunden nach I/R wurden in der Medulla erheblich mehr TUNEL positive Zellen (ca. 30 %) als Cleaved Caspase 3 positive Zellen (ca. 2-3 %) gezählt (Daten nicht gezeigt). Die TUNEL-Methode zeigte vor allem in der Medulla ein massives Zellsterben zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach der Schädigung und damit die Schwere der Schädigung schon nach nur 25 min Klemmzeit auf, ist aber nicht unbedingt spezifisch für apoptotische Zellen (Linkermann *et al.*, 2014).

Es konnte mit diesem Vorversuch die Verteilung und Wirkung einer systemisch injizierten Einzeldosis p53 siRNA in Tubuluszellen *in vivo* nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse waren im Vergleich zu den Ergebnissen aus den oben erwähnten Rattenversuchen (Molitoris *et al.*, 2009) durchaus stimmig, sodass damit eine Basis für das experimentelle Design der Versuche zur Verminderung von Seneszenz vor, während und nach einer Nierenschädigung geschaffen war .

4.4.2 p53 siRNA wirkt nach einer Nierenschädigung kurzfristig protektiv

Nach einer akuten Nierenschädigung, z.B. während Transplantationen oder großen kardiovaskulären Eingriffen, können seneszente Zellen im Tubulusepithel akkumulieren und die Funktion des Nierenparenchyms durch ihre eingeschränkte Teilungsfähigkeit und ihr verändertes Sekretionsverhalten nachhaltig beeinträchtigen (Ferenbach und Bonventre, 2015) (Schmitt und Melk, 2012) (Schmitt und Melk, 2017). Eine akute Schädigung der Mäuseniere durch Behandlungen wie I/R oder durch Intoxikation mit AA führt schon frühzeitig zu einem

Anstieg des p53 Levels und p53 ist ein Schlüsselprotein bei verschiedenen anderen Formen von AKI (Chen *et al.*, 2016) (Homsy *et al.*, 2011) (Molitoris *et al.*, 2009) (Mulay *et al.*, 2012) (Wei *et al.*, 2007) (Zhou *et al.*, 2010) (Yan *et al.*, 2016) (Shi *et al.*, 2016). p53 transaktiviert unter anderem p21^{CIP1} und initiiert dadurch, neben vielen weiteren zellbiologischen Mechanismen, Seneszenz (Rodier und Campisi, 2011). Langfristig kann sich daraus, analog zu der humanen Situation, eine chronische Nierenerkrankung mit der Ansammlung von seneszenten Zellen entwickeln (Schmitt und Melk, 2017).

Genetische Deletion (Ying *et al.*, 2014) (Zhang *et al.*, 2014), pharmakologische Inhibition (Chen *et al.*, 2016) (Kelly *et al.*, 2003) und auch systemische siRNA Gabe (Molitoris *et al.*, 2009) haben in den genannten Modellen eine Verbesserung der Nierenfunktion und verminderte Fibrose bewirkt. Eine p53 siRNA Behandlung bei Nierentransplantationen befindet sich derzeit in Phase III der klinischen Studie; als Output wird eine Verkürzung der Zeitspanne zum Erreichen der vollen Funktionsfähigkeit des Organs erwartet (Peddi *et al.*, 2014). Unter anderem zielt dieser Ansatz aber darauf ab, den Anteil apoptotischer Zellen zu minimieren. Neueren Erkenntnissen zufolge wurde der Anteil apoptotischer Zellen in den renalen Schadensmodellen aber möglicherweise überschätzt, da die häufig angewandte TUNEL-Färbung auch andere Formen des programmierten Zelltods erfasst (Linkermann *et al.*, 2014). Die genaue Rolle von p53 für das renale Zellsterben bleibt damit noch Gegenstand der Forschung.

Zwei der Schadensmodelle wurden in der vorliegenden Arbeit als Grundlage zur Manipulation der p53-vermittelten Seneszenz zu therapeutischen Zwecken ausgewählt: AKI durch Intoxikation mit AA und einseitige renale I/R. Zunächst wurden die Nieren durch AA-Intoxikation bzw. I/R geschädigt, durch Injektionen mit p53 siRNA- bzw. Kontroll-Substanz regelmäßig behandelt und an Tag 14 nach dem Schaden untersucht (Abb. 27 bzw. Abb. 31). Für das Modell der AA-Intoxikation sind nicht alle Analysen durchgeführt worden, da das I/R-Modell als das klinisch relevantere für weitergehende Experimente ausgewählt wurde. Bei dem Vergleich der mRNA Level in unbehandelten und behandelten Nieren ist zu beachten, dass es sich dabei nicht um isoliertes Tubulusgewebe gehandelt hat und auch andere Zelltypen dazu beigetragen haben.

Trotz der nicht signifikant verschiedenen mRNA Level des Proteins p53 zum Zeitpunkt der Organentnahme (Abb. 29 H und Abb. 33 D), konnten einige Unterschiede zwischen mit Kontrolle und p53 siRNA-behandelten Nieren festgestellt werden. So fiel bereits bei der Organentnahme der durch I/R geschädigten Nieren auf, dass die mit Kontroll-Substanz behandelten im Vergleich zu den mit p53 siRNA behandelten Nieren makroskopisch sichtbar

blasser und damit schlechter durchblutet waren (Abb. 28 A und B). Mit p53 siRNA behandelte I/R-Nieren hatten signifikant weniger apoptotische (Abb. 28 D) jedoch mehr proliferierende Zellen (Abb. 28 E). Die Seneszenzmarkeranalyse ergab signifikant weniger SA- β -Galaktosidase (Abb. 29 A-C) und γ -H2A.X⁺/Ki67⁻ positive Zellen (Abb. 29 D-F) und auch eine geringere mRNA Expression des Proteins p21^{CIP1} (Abb. 29 G) in den mit p53 siRNA behandelten I/R-Nieren. Dazu gab es einen Trend für ein geringeres mRNA Level der Proteine p16^{INK4a} (Abb. 29 G) und p19^{ARF} (Abb. 29 H). Die Schadensmarkeranalyse ergab fast durchgehend signifikante Verbesserungen durch die Behandlung mit p53 siRNA: weniger akuter (Abb. 30 A-C) und chronischer (Abb. 30 D) Schaden bei der mikroskopischen Analyse und auch auf molekularbiologischer Ebene eine geringere mRNA Expression von Schadens- (Abb. 30 E) und Fibrosemarkern (Abb. 30 F).

Funktionell resultierte die p53 siRNA-Behandlung bei den durch AA geschädigten Nieren in einem signifikant erniedrigten Level des Serumkreatinins (Abb. 32 B) und einem signifikant erhöhten mittleren Nierengewicht (Abb. 32 A). Zusammengenommen hatten die mit p53 siRNA behandelten Nieren beider Schadensmodelle eine erniedrigte Apoptoserate, erniedrigte Seneszenzmarker und weniger akuten Schaden, wenn auch, vermutlich aufgrund der kleinen Gruppengröße, nicht immer statistisch signifikant (Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30, Abb. 32, Abb. 33, Abb. 34). In Bezug auf die Fibrosebildung teilte sich das Bild. Während die p53 siRNA Behandlung nach I/R im Einklang mit den anderen Parametern zu weniger Fibrose führte (Abb. 30 F), zeigten die mit p53 siRNA behandelten Nieren nach AA-Intoxikation zu dem Zeitpunkt generell kaum mikroskopisch sichtbare Fibrosebildung (Abb. 35 A und B). In den mit p53 siRNA behandelten Nieren war nach AA-Intoxikation möglicherweise vergleichsweise wenig Tubulusgewebe zugrundegegangen und der Reparaturprozess daher schon weiter fortgeschritten (Abb. 35 B) als in den mit Kontroll-Substanz behandelten Nieren, in deren Gewebestruktur teilweise noch große Lücken resultierend aus untergegangenen Tubulusgewebe klafften (Abb. 35 A). Es ist wahrscheinlich, dass diese Gewebelücken im weiteren Zeitverlauf durch fibrotische Strukturen ersetzt worden wären (Leaf und Duffield, 2017).

Beide Modelle zeigten aber an Tag 14 nach der Schädigung unter der Behandlung mit p53 siRNA einige ermutigende renoprotektive Ergebnisse, sodass ein Folgeexperiment mit einer größeren Anzahl von Tieren, einer Ausweitung des Untersuchungszeitraums und einer Gruppenerweiterung angeschlossen wurde.

4.4.3 Längerfristige Wirkung der p53 siRNA dosis- und zeitabhängig

Die I/R geschädigte Niere hatte also bis Tag 14 von der Behandlung mit p53 siRNA profitiert. Ein starker Trend für eine verminderte Seneszenzbildung wurde begleitet von einem geringeren Gewebeschaden. Dieses positive Ergebnis wurde durch einen erweiterten Versuchsaufbau mit der Fragestellung nach der längerfristigen Wirkung der frühen Behandlung aber auch nach dem Effekt einer fortgesetzten Behandlung verfolgt. Bis zu dem Analysezeitpunkt an Tag 30 nach wiederum 25-minütiger linksseitiger Ischämie wurde der Kontrollgruppe in regelmäßigen Abständen bis Tag 26 11 x Kontroll-Substanz, der frühen Gruppe bis Tag 10 6 x p53 siRNA und der kontinuierlichen Gruppe bis Tag 26 11 x p53 siRNA injiziert (Abb. 36).

Die Organentnahme an Tag 30 zeigte für alle Gruppen eine durch nur 25 Minuten Ischämie hervorgerufene starke Schrumpfung der I/R-Niere um ca. 50 % ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 37 A-D). Rein makroskopisch war also kein Behandlungserfolg durch die p53 siRNA zu erkennen.

Trotz der offensichtlich sehr starken Gewebeschädigung durch I/R waren für die früh mit p53 siRNA behandelten Nieren noch positive Tendenzen analog zu den Ergebnissen des nur bis Tag 14 andauernden Experiments zu detektieren. Verglichen mit der Kontroll-Gruppe zeigte die früh mit p53 siRNA behandelte Gruppe signifikant weniger Seneszenz (Abb. 38 A-E) und damit vergesellschaftet weniger tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose (Abb. 39 A-F). Die an Tag 14 makroskopisch sichtbare verbesserte Durchblutung der früh mit p53 siRNA behandelten Nieren spiegelte sich an Tag 30 in signifikant mehr CD31 positiven Zellen und einer signifikant größeren eNOS positiven Fläche (Abb. 42 A-D). Der Trend für weniger Immunzellen in den mit p53 siRNA behandelten Nieren an Tag 14 (Daten nicht gezeigt), war an Tag 30 sowohl signifikant für CD45 als auch für F4/80 positive Zellen (Abb. 41 A-D).

Die Erwartung, dass eine fortgeführte Behandlung mit p53 siRNA die positiven Effekte verstärkt, hat sich allerdings nicht bestätigt. Zwar führte auch die kontinuierliche Behandlung mit p53 siRNA zu einer signifikant geringeren SA- β -Galaktosidase positiven Fläche (Abb. 38 A und B), weitere Seneszenzmarker folgten diesem Trend jedoch nicht und diese Beobachtung war auch nicht mit einer Verminderung der tubulären Atrophie und der fibrotischen Anteile assoziiert (Abb. 39 A-D). Überraschenderweise war trotz der langen Behandlung weder das mRNA Level des Proteins p21^{CIP1} (Abb. 38 G) noch das des Proteins p53 (Abb. 38 H) zwischen den Gruppen unterschiedlich. Und das sogar unter kontinuierlicher Behandlung mit p53 siRNA, obwohl die mRNA des Proteins p21^{CIP1} bereits 2 Stunden nach I/R hochreguliert und eine starke Expression bis Tag 28 nach I/R aufrechterhalten wird (Liu *et al.*, 2017) (Westhoff *et al.*, 2010). Die Immunantwort dagegen war unter kontinuierlicher

Behandlung mit p53 siRNA reduziert (Abb. 41 A-D). Der Anteil CD31 positiver Zellen und der eNOS positiven Fläche war für die kontinuierlich mit p53 siRNA behandelten Nieren vergleichbar mit den Anteilen in den mit Kontrolle behandelten Nieren (Abb. 42 A-D).

Die kurzzeitige bzw. länger andauernde Gabe von Pifithrin- α , einem p53-Inhibitor, nach I/R führte in Rattennieren zu vergleichbaren Ergebnissen. Während die Pifithrin- α Gabe das Serumkreatinin und die Apoptoserate 24 Stunden nach I/R positiv beeinflusste, konnte 8 Wochen nach I/R für die Kurzzeittherapie kein Unterschied bei der Fibrosebildung und für die Langzeittherapie sogar 30 % mehr Fibrose festgestellt werden als bei den unbehandelten Nieren. Weiterhin verbesserte die Langzeitbehandlung 4 Wochen nach I/R die Gefäßdichte nicht (Dagher *et al.*, 2012).

Zur Einordnung der Wirkung einer Blockierung des p53 auf das akute Schadensbild durch AA-Intoxikation bzw. I/R-Schädigung in Mäusenieren gibt es bereits einige Publikationen, allerdings mit teilweise widersprüchlichen Ergebnissen: Die bereits erwähnten p53 siRNA Experimente in Ratten erwiesen sich als renoprotektiv (Molitoris *et al.*, 2009). Weiterhin zeigten die Nieren von *Trp53*^{-/-}-Mäusen verglichen mit WT-Mäusen 4 Tage nach AA-Intoxikation signifikant weniger Tubulusschäden, apoptotische Zellen und hatten konsequenterweise damit auch ein signifikant niedrigeres Serumkreatininlevel. Auch eine Behandlung mit dem p53 Inhibitor Pifithrin- α konnte diesen positiven Effekt auslösen (Zhou *et al.*, 2010). In einem I/R-Schadensmodell fand sich für eine sehr ähnliche Versuchsanordnung jedoch das umgekehrte Bild: Die Nieren von *Trp53*^{-/-}-Mäusen und Pifithrin- α behandelten WT-Mäusen zeigten 24 Stunden und eine Woche nach I/R den größeren histologischen Schaden und hatten auch den höheren Serumkreatininspiegel verglichen mit WT-Mäusen (Sutton *et al.*, 2013).

Spezifischer genetischer p53 Knockout in proximalen Tubuli hingegen führte zu weniger histologischem Schaden, weniger Apoptose und einem geringeren Serumkreatininspiegel an Tag 2 nach I/R und war insgesamt renoprotektiv (Zhang *et al.*, 2014) (Ying *et al.*, 2014). Unterschiede gab es bei den beiden letztgenannten Versuchsanordnungen auch in der Immunantwort: p53 Knockout im gesamten Organismus führte im Vergleich zum Wildtyp zu einer verstärkten Infiltration mit neutrophilen Leukozyten, was bei dem Knockdown spezifisch für den proximalen Tubulus vermindert war. Die Verabreichung von p53 siRNA kommt dem Modell mit dem genetischen Knockout in proximalen Tubuli in Bezug auf den Hauptwirkungsort am nächsten, inhibiert die *Trp53* Genexpression aber trotz mehrfacher Injektionen während des Reperfusionzeitraums nicht so strikt.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Wirkung der transienten p53 Genstilllegung zur Behandlung des Ischämie-Reperfusionsschadens in Mäusenieren ergaben kein klares Bild und reihen sich damit in eine Vielzahl von inkonsistenten Beispielen auch aus anderen Organsystemen der aktuellen Literatur ein. Ein Übersichtsartikel zu den Erkenntnissen der Wirkung von p53 auf Lebererkrankungen betont die Zell-, Kontext-, Differenzierungs- und Stimulusabhängigkeit der p53 Aktivierung und darüberhinaus die Notwendigkeit der richtigen Dosierung. Während sowohl die Abwesenheit als auch die Hyperaktivierung von p53 in der Zusammenfassung der analysierten Experimente mehrheitlich kontraproduktiv war, erwies sich die moderate Aktivierung als positiv (Krstic *et al.*, 2018). Die Komplexität der Signalwege, in denen p53 eine Rolle spielt, z.B. Zelltod, Seneszenz, Metabolismus, Autophagie etc. (Krulswijk *et al.*, 2015), und deren Manipulation führt zu einem bunten Bild. In den hier beschriebenen Versuchen wurde somit durch die Behandlung mit p53 siRNA nicht nur die Ausbildung von Seneszenz beeinflusst, sondern es wurden wohl eine Vielzahl weiterer Mechanismen gestört, mit teilweise unerwarteten Ergebnissen. Die genauen molekularen und zellulären Ereignisse dieses Zusammenspiels konnten mit dem hier zugrunde liegenden Versuchsdesign mit dem Fokus auf die Nierenregeneration nicht entschlüsselt werden. Die Erkenntnis jedoch, dass die Anwendung von p53 siRNA in der Niere nicht nur positive Effekte hervorruft, sondern der Einsatz in Bezug auf Zeit und Dosierung individuell ausbalanciert werden muss, ist ein wichtiger Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

4.4.4 p16 siRNA wirkt potentiell protektiv

Während der Tumorsuppressor p53 in einer Vielzahl von unterschiedlichen Signalwegen agiert (Krulswijk *et al.*, 2015), ist die Hauptfunktion von p16^{INK4a} auch nach heutigem Erkenntnisstand der Zellzyklusarrest und damit eine Voraussetzung für die Ausbildung von Seneszenz (Serrano *et al.*, 1993) (Rayess *et al.*, 2012). Der Zellzyklusarrest ist auf der einen Seite ein potenter Antitumormechanismus (Collado und Serrano, 2010), seneszente Zellen tragen aber auf der anderen Seite zu einem langfristigen Funktionsverlust von Organen bei (Childs *et al.*, 2015). Die negative Wirkung von p16^{INK4a} positiven Zellen auf den Organismus wird unter anderem an einem Mausmodell verdeutlicht, in dem durch genetische Manipulation gezielt p16^{INK4a} positive Zellen eliminiert werden können. Die Elimination von p16^{INK4a} positiven Zellen führte zu einer verlängerten Lebensspanne ohne makroskopisch sichtbar erhöhte Tumorraten. In dieser Studie wurde auch die Niere untersucht und die Eliminierung der p16^{INK4a} positiven Zellen resultierte in signifikant verminderter Ausbildung von Glomerulosklerose (Baker *et al.*, 2016).

In einem I/R-Mausmodell hatten *Ink4a*^{-/-}-Nieren 30 Tage nach dem Schaden signifikant weniger interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie und konsequenterweise eine bessere Kreatininclearance als Wildtypnieren (Braun *et al.*, 2012). Der permanente Knockout erhöht jedoch die Gefahr der Tumorbildung und lässt sich im humanen System auch derzeit nicht anwenden. daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung eines transienten Knockdowns der mRNA des Proteins p16^{INK4a} in der Mäuseniere nach I/R untersucht. Nach 25-minütiger linksseitiger Ischämie wurde den Mäusen 5 Dosen von entweder Kontroll-Substanz oder p16 siRNA in regelmäßigen Abständen beginnend an Tag 7 systemisch injiziert und die Nieren 28 Tage nach I/R analysiert (Abb. 43 B).

Aufgrund der kleinen Gruppengrößen erreichten nur wenige Analysen statistische Signifikanz, aber es waren dennoch starke positive Trends zu erkennen. Die I/R-Nieren der mit p16 siRNA-behandelten Tiere hatten ein signifikant höheres Gewicht (Abb. 44 B) und einen Trend für weniger apoptotische Zellen (Abb. 44 C) als die nur mit Kontroll-Substanz behandelten I/R-Nieren.

Alle CDKI mRNA Expressionslevel waren in den mit p16 siRNA behandelten I/R-Nieren deutlich erniedrigt (Abb. 45 A-D), p21^{CIP1} erreichte dabei statistische Signifikanz (Abb. 45 D). Damit einher ging eine erhöhte tubuläre Proliferationsrate (Abb. 44 D), eine geringere tubuläre Atrophie (Abb. 46 A) und eine geringere Fibrosebildung (Abb. 47 A-D), ohne jedoch überall das Signifikanzniveau zu erreichen.

Tendenziell konnte durch die siRNA vermittelte Störung des p16^{INK4a}-Seneszenzweges in Tubuluszellen die Befunde der I/R-Experimente mit den *Ink4a*^{-/-}-Nieren reproduziert werden. Die Interferenz mit Seneszenz bewirkte eine vermehrte Proliferation in Tubuluszellen und eine Verminderung von chronischen Nierenschädigungen in Form von tubulärer Atrophie und interstitieller Fibrose (Braun *et al.*, 2012). Das ist für die Entwicklung von Therapien ein prinzipiell ermutigender Befund, aber auch hier sind umfangreiche Anschlussexperimente in Bezug auf erweiterte Gruppengrößen, Dosierung, Dauer der Anwendung und vor allen Dingen eine Testung der längerfristigen (Neben-)Wirkungen notwendig.

Literatur

- Agarwal, A., Dong, Z., Harris, R., Murray, P., Parikh, S. M., Rosner, M. H., Kellum, J. A., Ronco, C. (2016) Cellular and Molecular Mechanisms of AKI. *J Am Soc Nephrol*, **27**, 1288-1299.
- Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D. A., van der Pluijm, I., Essers, J., van Cappellen, W. A., van Ijcken, W. F. J., Houtsmuller, A. B., Pothof, J., de Bruin, R. W. F., Makl, T., Hoeijmakers, J. H. J., Campisi, J., de Keizer, P. L. J. (2017) Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, **169**, 132-147.
- Baisantry A., Berkenkamp B., Rong S., Bhayadia R., Sørensen-Zender I., Schmitt R., Melk A. (2019) Time-dependent p53 inhibition determines senescence attenuation and long-term outcome after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol*, **316**, F1124-F1132.
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., Saltness, R., Jeganathan, K. B., Versoza, G. C., Pezeshki, A.-M., Khazaie, K., Miller, J. D., van Deursen, J. M. (2016) Naturally occurring p16^{Ink4a}-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, **530**, 184-189.
- Basile, D. P., Bonventre, J. V., Mehta, R., Nangaku, M., Unwin, R., Rosner, M. H., Kellum, J. A., Ronco, C. (2016) Progression after AKI: Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments. *J Am Soc Nephrol*, **27**, 687-697.
- Berkenkamp, B., Susnik, N., Baisantry, A., Kuznetsova, I., Jacobi, C., Sørensen-Zender, I., Broecker, V., Haller, H., Melk, A., Schmitt, R. (2014) In Vivo and In Vitro Analysis of Age-Associated Changes and Somatic Cellular Senescence in Renal Epithelial Cells. *PLoS ONE*, **9**, e88071.
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., Hannon, G. J. (2003) Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*, **35**, 215-217.
- Blasco, M. (2007) Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol.*, **3**, 640-649.
- Blasco, M., Lee, H., Hande, M., Samper, E., Lansdorp, P., DePinho, R., Greider, C. (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, **91**, 25-34.

- Blaszczyk, J., Tropea, J. E., Bubunencko, M., Routzahn, K. M., Waugh, D. S., Court, D. L., Ji, X. (2001) Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure*, **9**, 1225-1236.
- Bonventre, J. V. (2014) Primary proximal tubule injury leads to epithelial cell cycle arrest, fibrosis, vascular rarefaction, and glomerulosclerosis. *Kidney International Supplements*, **4**, 39-44.
- Bonventre, J. V. and Yang, L. (2011) Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest*, **121**, 4210-4221.
- Borodkina, A. V., Deryabin, P. I., Glukova, A. A., Nikolsky, N. N. (2018) "Social Life" of Senescent Cells: What is SASP and Why Study It? *Acta Naturae*, **10**, 4-14.
- Braasch, D. A., Paroo, Z., Constantinescu, A., Ren, G., Öz, O. K., Mason, R. P., Corey, D. R. (2004) Biodistribution of phosphodiester and phosphothioat siRNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**, 1193-1143.
- Braun, H., Schmidt, B. M. W., Raiss, M., Baisantry, A., Mircea-Constantin, D., Wang, S., Gross, M.-L., Serrano, M., Schmitt, R., Melk, A. (2012) Cellular Senescence Limits Regenerative Capacity and Allograft Survival. *J Am Soc Nephrol*, **23**, 1467-1473.
- Brenner, A. J., Stampfer, M. R., Aldaz, C. M. (1998) Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene*, **17**, 199-205.
- Broekema, M., Harmsen, M. C., Koerts, J. A., Petersen, A. H., van Luyn, M. J. A., Navis, G., Popa, E. R. (2005) Determinants of tubular bone marrow-derived cell engraftment after renal ischemia/reperfusion in rats. *Kidney International*, **68**, 2572-2581.
- Burton, D. G., Sheerin, A. N., Ostler, E. L., Smith, K., Giles, P. J., Lowe, J., Rhys-Williams, W., Kipling, D. G., Faragher, R. G. (2007) Cyclin D1 overexpression permits the reproducible detection of senescent human vascular smooth muscle cells. *ANN NY Acad Sci*, **1119**, 20-31.
- Campbell, N. A. and Reece, J. B. (2003). Kontrolle des inneren Milieus. *Biologie*. 1111-1146.
- Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Molecular Cell Biology*, **8**, 729-740.
- Cerutti, L., Mian, N., Bateman, A. (2000) Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: The novel PAZ domain and redefinition of the PIWI domain. *Trends Biochem Sci*, **25**, 481-482.

- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Scharma, G., Doss, C. G. P., Lee, S.-S. (2017) Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, **8**, 132-143.
- Chandrasekaran, A., del Pilar Sosa Idelchik, M., Meldendez, J. A. (2017) Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biology*, **11**, 91-102.
- Chawla, L. S. and Kimmel, P. L. (2012) Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney International*, **82**, 516-524.
- Chen, H., Li, Y., Tollefsbol, T. O. (2013) Cell Senescence Culturing Methods. *Methods Mol Biol.*, **1048**,
- Chen, J., Wang, J., Li, H., Wang, S., Xiang, X., Zhang, D. (2016) p53 activates miR-192-5p to mediate vancomycin induced AKI. *Sci Rep*, **6**,
- Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., van Deursen, J. M. (2015) Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med.*, **21**, 1424-1435.
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., van Deursen, J. M. (2017) Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov*, **16**, 718-735.
- Choie, D. D. and Richter, G. W. (1972) Cell proliferation in rat kidneys after prolonged treatment with lead. *Am J Pathol*, **68**, 359-370.
- Choie, D. D., Richter, M. S., Richter, G. W. (1972) Cell Proliferation in Rat Kindey Induced by Lead Acetate and Effects on Uninephrectomy on the Proliferation. *Am J Pathol*, **68**, 359-370.
- Coca, S. G. (2010) Acute Kidney Injury in Elderly Persons. *Am J Kidney Dis.*, **56**, 122-131.
- Collado, M. and Serrano, M. (2010) Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer.*, **10**, 51-57.
- Coppe, J.-P., Patil, C. K., Rodier, F., Krtolica, A., Beausejour, C. M., Parinello, S., Hodgson, J. G., Chin, K., Desprez, P.-Y., Campisi, J. (2010) A Human-Like Senescence-Associated Secretory Phenotype Is Conserved in Mouse Cells Dependent on Physiological Oxygen. *PLoS ONE*, **5**, e9188.
- D'Arcangelo, D., Tinaburri, L., Dellambra, E. (2017) The Role of p16INK4a Pathway in Human Epidermal Stem Cell Self-Renewal, Aging and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 1591.
- Dagher, P. C., Mai, E. M., Hato, T., Lee, S.-Y., Anderson, M. D., Karozos, S. C., Mang, H. E., Knipe, N. L., Plotkin, Z., Sutton, T. A. (2012) The p53 inhibitor pifithrin- α can stimulate fibrosis in a rat model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, **302**, F284-F291.

- Davalos, A. R., Kawahara, M., Malhotra, G. K., Schaum, N., Huang, J., Ved, U., Beausejour, C. M., Coppe, J.-P., Rodier, F., Campisi, J. (2013) p53-dependent release of Alarmin HMGB1 is a central mediator of senescent phenotypes. *J. Cell Biol.*, **201**, 613-629.
- de Magalhaes, J. P. and Passos, J. (2017) Stress, cell senescence and organismal aging. *Mechanisms of Ageing and Development*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2017.07.001>.
- Demirjian, S., Ailawadi, G., Polinsky, M., Bitran, D., Silberman, S., Shernan, S. K., Burnier, M., Hamilton, M., Squiers, E., Erlich, S., Rothenstein, D., Khan, S., Chawla, L. S. (2017) Safety and Tolerability Study of an Intravenously Administered Small Interfering Ribonucleic Acid (siRNA) Post On-Pump Cardiothoracic Surgery in Patients at Risk of Acute Kidney Injury. *Kidney Int Rep*, **2**, 836-843.
- Deng, Q., Liao, R., Wu, B. I., Sun, P. (2004) High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J Biol Chem*, **279**, 1050-1059.
- Dichl, J. A. (2002) Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biology & Therapy*, **1**, 226-231.
- Duann, P., Lianos, E. A., Ma, J., Lin, P. (2016) Autophagy, Innate Immunity and Tissue Repair in Acute Kidney Injury. *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, <https://doi.org/10.3390/ijms17050662>.
- Ferenbach, D. A. and Bonventre, J. V. (2015) Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol.*, **11**, 264-276.
- Fire, A., Albertson, D., Harrison, S., Moermann, D. (1991) Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development*, **113**, 503-514.
- Fischer, K. E. and Austad, S. N. (2011) The Development of Small Primate Models for Aging Research. *ILAR J.*, **52**, 78-88.
- Fowler, B. A. (1992) Mechanisms of Kidney Cell Injury from Metals. *Environmental Health Perspectives*, **100**, 57-63.
- Fraser, S. D. and Blakeman, T. (2016) Chronic kidney disease: identification and management in primary care. *Pragmatic and Observational Research*, **7**, 21-32.
- Fujino, R., Muhib, S., Sato, N., Hasebe, N. (2013) Silencing of p53 RNA through transarterial delivery ameliorates renal tubular injury and downregulates GSK-3 β expression after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, **305**, F1617-F1627.
- Geneser, F. and Schwerdtfeger, W. K. (1990). Harnsystem. *Histologie*. 495-522.

- Georgilis, A., Klotz, S., Hanley, C. J., Herranz, N., Weirich, B., Morancho, B., Leote, A. C., D'Artista, L., Gallage, S., Seehawer, M., Carroll, T., Dharmalingam, G., Wee, K. B., Mellone, M., Pombo, J., Heide, D., Guccione, E., Arribas, J., Barbosa-Morais, N. L., Heikenwalder, M., Thomas, G. J., Zender, L., Gil, J. (2018) PTBP1-Mediated Alternative Splicing Regulates the Inflammatory Secretome and the Pro-tumorigenic Effects of Senescent Cells. *Cancer Cell*, **34**, 85-102.
- Giacinti, C. and Giordano, A. (2006) RB and cell cycle progression. *Oncogene*, **25**, 5220-5227.
- Gire, V. and Dulic, V. (2015) Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle*, **14**, 297-304.
- Grgic, I., Campanholle, B., Bijol, V., Wang, C., Sabbisetti, V. S., Ichimura, T., Humphreys, B. D., Bonventre, J. V. (2012) Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney International*, **82**, 172-183.
- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., Hannon, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- Han, E. K., Ng, S. C., Arber, N., Begemann, M., Weinstein, I. B. (1999) Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. *Apoptosis*, **4**, 213-219.
- Hayflick, L. (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exper. Cell Res.*, **37**, 614-636.
- Heung, M. and Chawla, L. S. (2014) Acute Kidney Injury: Gateway to Chronic Kidney Disease. *Nephron Clin Pract*, **127**, 30-34.
- Homsí, E., Mota da Silva, S. J., Machado de Brito, S., Boucada, I., E., P., Butori Lopes de Faria, J., Janino, P. (2011) p53-Mediated oxidative stress and tubular injury in rats with glycerol-induced acute kidney injury. *American Journal of Nephrology*, **33**, 49-59.
- Humeniuk, R., Rosu-Myles, M., Fares, J., Koller, R., Bies, J., Wolff, L. (2013) The role of tumor suppressor p15^{Ink4b} in the regulation of hematopoietic progenitor cell fate. *Blood Cancer Journal*, **3**, 1-11.
- Humphreys, B. D., Cantaluppi, V., Portilla, D., Singbartl, K., Yang, L., Rosner, M. H., Kellum, J. A., Ronco, C. (2016) Targeting Endogenous Repair Pathways after AKI. *J Am Soc Nephrol*, **27**, 990-998.
- Humphreys, B. D., Valerius, M. T., Kobayashi, A., Mugford, J. W., Socung, S., Duffield, J. S., McMahon, A. P., Bonventre, J. V. (2008) Intrinsic Epithelial Cells Repair the Kidney after Injury. *Cell Stem Cell*, **2**, 284-291.
- Hutvagner, G., Mc Lachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., Zamore, P. D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, **3**, 834-838.

- Imamura, R., Isaka, Y., Sandoval, R. M., Ori, A., Adamsky, S., Feinstein, E., Molitoris, B. A., Takahara, S. (2010) Intravital Two-Photon Microscopy Assessment of Renal Protection Efficacy of siRNA for p53 in Experimental Rat Kidney Transplantation Models. *Cell Transplantation*, **19**, 1659-1670.
- Jacobi, C., Hömme, M., Melk, A. (2011) Is cellular senescence important in pediatric kidney disease? *Pediatr Nephrol*, **26**, 2121-2131.
- Jadot, I., Decleves, A.-E., Nortier, J., Caron, N. (2017) An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, <https://doi.org/10.3390/ijms18020297>.
- Jiang, L., Sheikh, M. S., Huang, Y. (2010) Decision Making by p53: Life versus Death. *Mol Cell Pharmacol.*, **2**, 69-77.
- Jordan, E. T., Collins, M., Terefe, J., Ugozzoli, L., Rubio, T. (2008) Optimizing Electroporation Conditions in Primary and Other Difficult-to-Transfect Cells. *J Biomol Tech.*, **19**, 328-334.
- Kashani, K., Cheungpasitporn, W., Ronco, C. (2017) Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clin Chem Lab Med*, **55**, 1074-1089.
- Kawakami, S. and Hashida, M. (2007) Targeted Delivery Systems of Small Interfering RNA by Systemic Administration. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 142-151.
- Kellum, J. A. and Chawla, L. S. (2016) Cell-cycle arrest and acute kidney injury: the light and dark sides. *Nephrol Dial Transplant*, **31**, 16-22.
- Kelly, K. J., Plotkin, M., Vulgamott, S. I., Dagher, P. C. (2003) P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor. *J Am Soc Nephrol*, **14**, 128-138.
- Kennerdell, J. R. and Carthew, R. W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell*, **95**, 1017-1026.
- Kezic, A., Spasojevic, I., Lezaic, V., Bajcetic, M. (2016) Mitochondria-Targeted Antioxidants: Future Perspectives in Kidney Ischemia Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2016**, <https://doi.org/10.1155/2016/2950503>.
- Kim, J., Devalaraja-Naraschimha, K., Padanilam, B. J. (2015) TIGAR regulates glycolysis in ischemic kidney proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol*, **308**, F298-F308.

- Kloda, K., Domanski, L., Mierzecki, A. (2017) Telomere Length Assessment for Prediction of Organ Transplantation Outcome. Future or Failure: A Review of the Literature. *Med Sci Monit*, **23**, 158-162.
- Kong, Y., Sharma, R. B., Nwosu, B., Alonso, L. C. (2016) Islet biology, the CDKN2A/B locus and type 2 diabetes risk. *Diabetologia*, **59**, 1579-1593.
- Koppelstätter, C., Schratzberger, G., Perco, P., Hofer, J., Mark, W., Öllinger, R., Oberbauer, R., Schwarz, C., Mitterbauer, C., Kainz, a., Karkoszka, H., Wiecek, A., Mayer, B., Mayer, G. (2008) Markers of cellular senescence in zero hour biopsies predict outcome in renal transplantation. *Aging Cell*, **7**, 491-497.
- Krimpenfort, P., IJpenberg, A., Song, J.-Y., van der Valk, M., Nawijn, M., Zevenhoven, J., Berns, A. (2007) p15^{Ink4b} is a critical tumour suppressor in the absence of p16^{Ink4a}. *Nature*, **448**, 943-947.
- Krimpenfort, P., Quon, K., Mooi, W., Loonstra, A., Berns, A. (2001) Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature*, **413**, 83-86.
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., Sharpless, N. E. (2004) Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, **114**, 1299-1307.
- Krstic, J., Galhuber, M., Schulz, T. J., Schupp, M., Prokesch, A. (2018) p53 as a Dichotomous Regulator of Liver Disease: The Dose Makes the Medicine. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 921. <https://doi.org/10.3390/ijms19030921>.
- Krulswijk, F., Labuschagne, C. F., Vousden, K. H. (2015) p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **16**, 393-405.
- Lameire, N. H., Bagga, A., Cruz, D., De Maeseneer, J., Endre, Z., Kellum, J. A., Liu, K. D., Mehta, R. I., Pannu, N., Van Biesen, W., Vanholder, R. (2013) Acute kidney injury: an increasing global concern. *The Lancet*, **382**, 170-179.
- Lansdorp, P. M. (1997) Lessons from mice without telomerase. *J. Cell Biol.*, **139**, 309-312.
- Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Martin, J., Ortega, S., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Cordon-Cardo, C., Barbacid, M. (2000) Limited overlapping roles of p15INK4b und p18INK4c cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J*, **19**, 3496-3506.
- Leaf, I. A. and Duffield, J. S. (2017) What can target kidney fibrosis? *Nephrol Dial Transplant*, **32**, i89-i97.

- Ledda-Columbano, G. M., Pibiri, M., Cossu, C., Molotzu, F., Locker, J., Columbano, A. (2004) Aging does not reduce the hepatocyte proliferative response of mice to the primary mitogen TCPOBOP. *Hepatology*, **40**, 981-8.
- Lee, D. H., Wolstein, J. M., Pudasaini, B., Plotkin, M. (2012) INK4a deletion results in improved kidney regeneration and decreased capillary rarefaction after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, **302**, F183-F191.
- Lee, S.-H., Hao, E., Levine, F., Itkin-Ansari, P. (2011) Id3 upregulates BrdU incorporation associated with a DNA damage response, not replication, in human pancreatic β -cells. *Islets*, **3**, 358-366.
- Leontieva, O. V. and Blagosklonny, M. V. (2014) Gerosuppression in confluent cells. *Aging*, **6**, 1010-1018.
- Leontieva, O. V., Lenzo, F., Demidenko, Z. N., Blagosklonny, M. V. (2012) Hyper-mitogenic drive coexists with mitotic incompetence in senescent cells. *Cell Cycle*, **11**, 4642-4649.
- Levey, A. S., Eckardt, K.-U., Tsukamoto, Y., Levin, A., Coresh, J., Rossert, J., Zeeuw, D. D. E., Hostetter, T. H., Lameire, N., Eknoyan, G. (2005) Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International*, **67**, 2089-2100.
- Li, Y., Liu, Z., Guo, X., Shu, J., Chen, Z., Li, L. (2006) Aristolochic acid I-induced DNA damage and cell cycle arrest in renal tubular epithelial cells in vitro. *Arch Toxicol.*, **80**, 524-532.
- Lidzbarsky, G., Gutman, D., Shekhidem, H. A., Shravit, L., Atzmon, G. (2018) Genomic Instabilities, Cellular Senescence, and Aging: In Vitro, In Vivo and Aging-Like Human Syndromes. *Frontiers in Medicine*, **5**, <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00104>.
- Linkermann, A., Chen, G., Dong, G., Kunzendorf, U., Krautwald, S., Dong, Z. (2014) Regulated cell death in AKI. *J Am Soc Nephrol*, **25**, 2689-2701.
- Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Mardsen, C. G., J.M., T., Song, J. J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., Hannon, G. J. (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**, 1437-1441.
- Liu, J., Kumar, S., Dolzbenko, F., Alvarado, G. F., Guo, J., Lu, C., Chen, Y. I. J. M., Dessing, M. B., Parvez, R. K., Cippa, P. E., Krautzberger, A. M., Saribekyan, G., Smith, A. D., McMahon, A. P. (2017) Molecular characterization of the transition from acute to chronic kidney injury following ischemia/reperfusion. *JCI Insight*, **2**, <https://doi.org/10.1172/jci.insight.94716>.

- Liu, J., Xu, K., Chase, M., Ji, Y., Logan, J. K., Buchsbaum, R. J. (2012) Tiam1-regulated osteopontin in senescent fibroblasts contributes to the migration and invasion of associated epithelial cells. *J Cell Sci*, **125**, 376-386.
- Liu, Q., Rand, T. A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H. E., Smith, D. P., Wang, X. (2003) R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science*, **301**, 1921-1925.
- Makris, K. and Spanou, L. (2016) Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev*, **2**, 85-98.
- Melk, A., Ramassar, V., Helms, L. M. H., Moore, R., Rayner, D., Solez, K., Halloran, P. F. (2000) Telomere Shortening in Kidneys with Age. *J Am Soc Nephrol*, **11**, 444-453.
- Melk, A., Schmidt, B. M. W., Braun, H., Vongwiwatana, A., Urmson, J., Zhu, L.-F., Rayner, D., Halloran, P. F. (2009) Effects of Donor Age and Cell Senescence on Kidney Allograft Survival. *American Journal of Transplantation*, **9**, 114-123.
- Melk, A., Schmidt, B. M. W., Takeuchi, O., Sawatzki, B., Rayner, D. C., Halloran, P. F. (2004) Expression of p16^{INK4a} and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney International*, **65**, 510-520.
- Melk, A., Schmidt, B. M. W., Vongwiwatana, A., Rayner, D., Halloran, P. F. (2005) Increased Expression of Senescence-Associated Cell Cycle Inhibitor p16^{INK4a} in Deteriorating Renal Transplants and Diseased Kidney. *American Journal of Transplantation*, **5**, 1375-1382.
- Miya, M., Maeshima, A., Mishima, K., Sakurai, N., Ikeuchi, H., Hiromura, K., Kuroiwa, T., Nojima, Y. (2012) Age-related decline in label-retaining tubular cells: Implications for reduced regenerative capacity after injury in the aging kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, **302**, F694-F702.
- Molitoris, B. A. (2004) Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney International*, **66**, 871-883.
- Molitoris, B. A., Dagher, P. C., Sandoval, R. M., Campos, S. B., Ashush, H., Fridman, E., Brafman, A., Faerman, A., Atkinson, S. J., Thompson, J. D., Kalinski, H., Skaliter, R., Erlich, S., Feinstein, E. (2009) siRNA Targeted to p53 Attenuates Ischemic and Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*, **20**, 1754-1764.
- Mulay, S. R., Thomasova, D., Ryu, M., Anders, H. J. (2012) MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice. *Kidney International*, **81**, 1199-1211.

- Naesens, M. (2011) Replicative Senescence in Kidney Aging, Renal Disease, and Renal Transplantation. *Discov Med*, **11**, 65-75.
- Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. (1990) Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. *Plant Cell*, **2**, 279-289.
- Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Raschella, G. (2015) DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging*, **7**, <https://doi.org/10.18633/aging.100858>.
- Noppe, G., Dekker, P., de Koning-Treurniet, C., Blom, J., van Heemst, D., Dirks, R. W., Tanke, H. J., Westendorp, R. G. J., Maier, A. B. (2009) Rapid flow cytometric method for measuring senescence associated β -galaktosidase activity in human fibroblasts. *Cytometry*, **75A**, 910-916.
- Peddi, V., Ratner, L., Cooper, M., Gaber, O., Feng, S., Tso, P., Bowers, V., Naraghi, R., Budde, K., Polinsky, M., Squiers, E., Erlich, S. (2014) Treatment with QPI-1002, a Short Interfering (SI) RNA for the Prophylaxis of Delayed Graft Function. *American Journal of Transplantation*, **14**, 153.
- Petr, M. A., Tulika, T., Carmona-Marin, L. M., Scheibye-Knudsen, M. (2020) Protecting the Aging Genome. *Trends in Cell Biology*, **30**, 117-132.
- Pfaffl, M. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2001-2007.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silvermann, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.-W., Cordon-Cardo, C., DePinho, R. (1998) The INK4a Tumor Suppressor Gene Produkt P19ARF, interacts with MDM2 and Neutralizes MDM2's Inhibitor of p53. *Cell*, **92**, 713-723.
- Rabb, H., Griffin, M. D., McKay, D. B., Swaminathan, S., Pickkers, P., Rosner, M. H., Kellum, J. A., Ronco, C. (2016) Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps. *J Am Soc Nephrol*, **27**, 371-379.
- Ratliff, B. B., Abdulmahdi, W., Pawar, R., Wolin, M. S. (2016) Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, **25**, <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6665>.
- Rayess, H., Wang, M. B., Srivatsan, E. S. (2012) Cellular Senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer.*, **130**, 1715-1725.

- Rivas, F. V., Tolia, N. H., Song, J. J., Aragon, J. P., Liu, J., Hannon, G. J., Joshua-Tor, L. (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol*, **2005**, 340-349.
- Roake, C. M. and Artandi, S. E. (2017) Control of Cellular Aging, Tissue Function, and Cancer by p53 Downstream of Telomeres. *Cold Spring Harb Perspect Med*, **7**,
- Robb, G. B., Brown, K. M., Khurana, J., Rana, T. M. (2005) Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol*, **12**, 133-137.
- Rodier, F. and Campisi, J. (2011) Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.*,
- Romanov, V., Whyard, T. C., Waltzer, W. C., Grollmann, A. P., Rosenquist, T. (2015) Aristolochic acid-induced apoptosis and G2 cell cycle arrest depends on ROS generation and MAP kinases activation. *Arch Toxicol.*, **89**, 47-56.
- Rottenberg, H. and Hoek, J. B. (2017) The path from mitochondrial ROS to aging runs through the mitochondrial permeability transition pore. *Aging Cell*, **16**, 943-955.
- Ryan, M. J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S. M., Zager, R. A., Torok, S., B. (1994) HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International*, **45**, 48-57.
- Saat, T. C., van den Akker, E. K., IJzermans, J. N. M., Dor, F. J. M. F., de Bruin, R. W. F. (2016) Improving the outcome of kidney transplantation by ameliorating renal ischemia reperfusion injury: lost in translation? *J Transl Med*, **14**, <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0767-2>.
- Saeed, H. and Iqtedar, M. (2015) Aberrant gene expression profiles, during in vitro osteoblast differentiation, of telomerase deficient mouse bone marrow stromal stem cells (mBMSCs). *Journal of Biomedical Science*, **22**, <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0116-4>.
- Salvadori, M., Rosso, G., Bertoni, E. (2015) Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World J Transplant*, **5**, 52-67.
- Sato, G. (2008) Tissue culture: the unrealized potential. *Cytotechnology*, **57**, 111-114.
- Schafer, A. and Barfuss, D. W. (1982) The study of pars recta function by the perfusion of isolated tubule segments. *Kidney International*, **22**, 434-448.
- Schildhorn, C., Jacobi, C., Weissbrodt, A., Helmstedt, C., Westhoff, J. H., Hömme, M., Bhayadia, R., Gretz, N., Falk, C. S., Schmitt, R., Bröcker, V., Kränzlin, B., Melk, A. (2015) Renal phenotype of young and old telomerase-deficient mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, **150**, 65-73.

- Schmitt, R., Marlier, A., Cantley, L. G. (2008) Zsg Expression during Aging Suppresses Proliferation after Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*, **19**, 2375-2383.
- Schmitt, R. and Melk, A. (2012) New Insights on Molecular Mechanisms of Renal Aging. *American Journal of Transplantation*, **12**, 2892-2900.
- Schmitt, R. and Melk, A. (2017) Molecular mechanisms of renal aging. *Kidney International*, **92**, 569-579.
- Serrano, M., Hannon, G. J., Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, **366**, 704-707.
- Shadel, G. S. and Horvath, T. L. (2015) Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell*, **163**, 560-569.
- Sharpless, N. E., Ramsey, M. R., Balasubramanian, P., Castrillon, D. H., DePinho, R. (2004) The differential impact of p16INK4a or p19ARF deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene*, **23**, 379-385.
- Sherr, C. J. and De Pinho, R. A. (2000) Cellular senescence mitotic clock or culture shock? *Cell*, **102**, 407-410.
- Shi, M., Ma, L., Zhou, L., Fu, P. (2016) Renal Protective Effects of 17 β -Estradiol on Mice with Acute Aristolochic Acid Nephropathy. *molecules*, **21**, 1391. <https://doi.org/10.3390/molecules21101391>.
- Shibutani, S., Dong, H., Suzuki, N., Ueda, S., Miller, F., Grollman, A. (2007) Selektive Toxicity of Aristolochic Acids I and II. *DMD*, **35**, 1217-1222.
- Song, J. J., Smith, S. K., Hannon, G. J., Joshua-Tor, L. (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, **305**, 1434-1437.
- Sorrentino, J. A., Sanoff, H. K., Sharpless, N. E. (2014) Defining the Toxicology of Aging. *Trends Mol Med.*, **20**, 375-384.
- Sutton, T. A., Hato, T., Mai, E., Yoshimoto, M., Kuehl, S., Anderson, M., Mang, H., Plotkin, Z., Chan, R. J., Dagher, P. C. (2013) p53 is Renoprotective after Ischemic Kidney Injury by Reducing Inflammation. *J Am Soc Nephrol*, **24**, 113-124.
- Suzuki, A., Sakaguchi, T., Inaba, K., Suzuki, S., Konno, H. (2012) Impact of cell cycle disruption on impaired hepatic regeneration in aged livers with ischemic insult. *J Surg Res*, **173**, 267-77.
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H., Mello, C. C. (2002) The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell*, **109**, 861-871.

- Tardif, S. D., Mansfield, K. G., Ratnam, R., Ross, C. N., Ziegler, T. E. (2011) The Marmoset as a Model of Aging and Age-Related Diseases. *ILAR J.*, **52**, 54-65.
- Tewes, S., Gueler, F., Chen, R., Gutberlet, M., Jang, M., Meier, M., Mengel, M., Hartung, D., Wacker, F., Rong, S., Hueper, K. (2017) Functional MRI for characterization of renal perfusion impairment and edema formation due to acute kidney injury in different mouse strains. *PLoS ONE*, **12**, e0173248.
- Unterluggauer, H., Hütter, E., Voglauer, R., Grillari, J., Vöth, M., Bereiter-Hahn, J., Jansen-Dürr, P., Jendrach, M. (2007) Identification of cultivation-independent markers of human endothelial cell senescence in vitro. *Biogerontology*, **8**, 383-397.
- Venkatachalam, M. A., Griffin, K. A., Lan, R., Geng, H., Saikumar, P., Bidani, A. K. (2010) Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*, **298**, F1078-F1094.
- Venkatachalam, M. A., Weinberg, J. M., Kriz, W., Bidani, A. K. (2015) Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol*, **26**, <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010006>.
- Vilborg, A., Wilhelm, M. T., Wiman, K. G. (2010) Regulation of tumor suppressor p53 at the RNA level. *J Mol Med*, **88**, 645-652.
- Vogetseder, A., Palan, T., Bacic, D., Kaissling, B., Le Hir, M. (2007) Proximal tubular epithelial cells are generated by division of differentiated cells in the healthy kidney. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**, C807-813.
- Vogetseder, A., Picard, N., Gaspert, A., Walch, M., Kaissling, B., Le Hir, M. (2008) Proliferation capacity of the renal proximal tubule involves the bulk of differentiated epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **294**, C22-28.
- Volpe, T. A., Kidner, C., Hall, I. M., Teng, G., Grewal, S. I., Martienssen, R. A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**, 1833-1837.
- Waaijer, M. E. C., Gunn, D. A., van Heemst, D., Slagboom, P. E., Sedivy, J. M., Dirks, R. W., Tanke, H. J., Westendorp, R. G. J., Maier, A. B. (2018) Do senescence markers correlate in vitro and in situ with individual human donors. *Aging*, **10**, 278-289.
- Wang, X., Bonventre, J. V., Parrish, A. R. (2014) The Aging Kidney: Increased Susceptibility to Nephrotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 15358-15376.
- Wargelius, A., Ellingsen, S., Fjose, A. (1999) Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **263**, 1561-1571.

- Wei, Q., Dong, G., Yang, T., Megyesi, J., Price, P. M., Dong, Z. (2007) Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **293**, F1282-1291.
- Westhoff, J. H., Schildhorn, C., Jacobi, C., Hömme, M., Hartner, A., Braun, H., Kryzer, C., Wang, C., von Zglinicki, T., Kränzlin, B., Gretz, N., Melk, A. (2010) Telomere Shortening Reduces Regenerative Capacity after Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol*, **21**, 327-336.
- Wianny, F. and Zernicka-Goetz, M. (2000) Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol*, **2**, 70-75.
- Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C., Bonventre, J. V. (1994) Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest*, **93**, 2175-2188.
- Xu, M., Tchkonina, R., Ding, H., Ogradnik, M., Lubbers, E. R., Prietskhalava, R., White, T. A., Johnson, K. O., Stout, M. B., Mezera, V., Giorgadze, N., Jensen, M. D., LeBrasseur, N. K., Kirkland, J. L. (2015) JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci USA*, **112**, E6301-10.
- Yan, K. S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L., Zhou, M. M. (2003) Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, **426**, 468-474.
- Yan, M., Tang, C., Ma, Z., Huang, S., Dong, Z. (2016) DNA damage response in nephrotoxic and ischemic kidney injury. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **313**, 104-108.
- Yang, K., Hitomi, M., Stacey, D. W. (2006) Variations in cyclin D1 levels through the cell cycle determine the proliferative fate of a cell. *Cell Division*, **1**, <https://doi.org/10.1186/1747-1028-1-32>.
- Ying, Y., Kim, J., Westphal, S. N., Long, K. E., Padanilam, B. J. (2014) Targeted deletion of p53 in the proximal tubule prevents ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*, **25**, 2707-2716.
- Yousefzadeh, M. J., Zhao, Z., Bukata, C., Wade, E. A., McGowan, S. J., Angelini, L. A., Bank, M. P., Gurkar, A. U., McGuckian, C. A., Calubag, M. F., Kato, J. I., Burd, C. E., Robbins, P. D., Niedernhofer, L. J. (2020) Tissue specificity of senescent cell accumulation during physiologic and accelerated aging of mice. *Aging Cell*, **00**, e13094.
- Zhang, D., Liu, Y., Wei, Q., Huo, Y., Liu, K., Liu, F., Dong, Z. (2014) Tubular p53 Regulates Multiple Genes to Mediate AKI. *J Am Soc Nephrol*, **25**, 2278-2289.

- Zhou, L.,Fu, P.,Huang, X. R.,Liu, F.,Lai, K. N.,Lan, H. Y. (2010) Activation of p53 Promotes Renal Injury in Acute Aristolochic Acid Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, **21**, 31-41.
- Zhuang, S.,Dang, Y.,Schnellmann, R. G. (2004) Requirement of the epidermal growth factor receptor in renal epithelial cell proliferation and migration. *Am J Physiol Renal Physiol*, **287**, F365-372.
- Zindy, F.,Quelle, D. E.,Roussel, M. F.,Sherr, C. J. (1997) Expression of the p16^{INK4a} tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*, **15**, 203-211.
- Zuk, A. and Bonventre, J. V. (2016) Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med.*, **67**, 293-307.

Internetseiten

- <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=31118599>, 26.11.2017 (Abb. 1 A und B, Abb. 2: Blausen.com staff (2014)"Medical gallery of Blausen Medical 2014". WikiJournal of Medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436; CC BY 3.0)
- <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=24367127>, 25.11.2017 (Abb. 1 C: Artwork by Holly Fischer "Kidney Nephron"; CC BY 3.0)

Abbildungen

Abb. 1 Lage und Architektur der Säugerniere	12
Abb. 2 Prominente Auslöser von Nierenschäden und mögliche Folgen für das Organ.....	14
Abb. 3 Schematische Darstellung des akuten und chronischen Tubulusschadens	17
Abb. 4 Schematische Darstellung einiger Komponenten des stressbedingten Zellzyklusarrests	22
Abb. 5 Schematische Darstellung der Organisation der Gene <i>CDKN2A</i> und <i>CDKN2B</i>	23
Abb. 6 Schematische Darstellung der RNA-Interferenz.....	28
Abb. 7 Kein detektierbarer Gewebeschaden durch Bleiacetatinjektion.....	72
Abb. 8 Signifikant höhere Proliferationsrate in jungen Nieren nach Injektion mit Bleiacetat	73
Abb. 9 Signifikant erhöhte Seneszenzmarker in alten Nieren	74
Abb. 10 Überwiegend epitheliale Zellen in der Tubuluszellkultur.....	76
Abb. 11 Mikroskopie der Tubuluszellkultur des jungen Wildtyps an Tag 3, 6 und 10.	77
Abb. 12 Quantifizierung der mikroskopischen Analysen der Tubuluszellkultur des jungen Wildtyps	78
Abb. 13 Proliferationsanalyse in jungen und alten Tubuluszellkulturen	79
Abb. 14 Vergleich jung versus alt der CDKI mRNA Expression in isolierten Tubuli	79
Abb. 15 Vergleich jung versus alt der CDKI mRNAs bzw. Seneszenzmarker im Verlauf der Zellkultur.....	80
Abb. 16 Vergleich der CDKI mRNA Expression in Tubuli von Wildtyp- und <i>Terc</i> ^{-/-} -Mäusen (G3)	81
Abb. 17 Vergleich der Seneszenz und Proliferation von Wildtyp und <i>Terc</i> ^{-/-} (G3) in der Zellkultur.....	82
Abb. 18 Vergleich der CDKI mRNA Expression in Tubuli von Wildtyp- und <i>Ink4a</i> ^{-/-} -Mäusen	83
Abb. 19 Vergleich der Seneszenz und Proliferation von Wildtyp und <i>Ink4a</i> ^{-/-} in der Zellkultur	84
Abb. 20 CDKI mRNA Expression im Verlauf der Tubuluszellkultur der jungen C57BL/6 Wildtyp-Maus.....	85
Abb. 21 Bestrahlung mit 10 Gy erzeugt seneszente Tubuluszellen.....	86
Abb. 22 CDKI mRNA Expression in Marmoset-Nieren und zweier Tubuluszellkulturen	87
Abb. 23 Immunfluoreszenzfärbungen in der Marmoset-Tubuluszellkultur.....	88
Abb. 24 Knockdown von p16 ^{INK4a} und p53 mRNA und Protein in der Tubuluszellkultur	90

Abb. 25 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Lokalisierung und Wirkung der p53 siRNA.....	91
Abb. 26 Biodistribution und mRNA Knockdown des Proteins p53 durch p53 siRNA in Mäusenieren	92
Abb. 27 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Wirkung der p53 siRNA an Tag 14 nach I/R.....	93
Abb. 28 Morphologie, Apoptose und Proliferation an Tag 14 nach I/R.....	93
Abb. 29 Analyse der Seneszenzmarker an Tag 14 nach I/R	94
Abb. 30 Analyse der Schadensmarker an Tag 14 nach I/R.....	95
Abb. 31 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Wirkung der p53 siRNA an Tag 14 nach AA	96
Abb. 32 Gewicht, Kreatinin und Apoptose an Tag 14 nach AA-Intoxikation.....	97
Abb. 33 CDKI und p53 mRNA Expression an Tag 14 nach AA-Intoxikation.....	97
Abb. 34 Schadensmarkeranalyse an Tag 14 nach AA-Intoxikation	98
Abb. 35 Fibrosebildung an Tag 14 nach AA-Intoxikation.....	98
Abb. 36 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Wirkung der p53 siRNA an Tag 30 nach I/R.....	99
Abb. 37 Morphologie, Apoptose und Proliferation an Tag 30 nach I/R.....	100
Abb. 38 Seneszenzmarkeranalyse an Tag 30 nach I/R	101
Abb. 39 Mikroskopische Analyse der I/R Nieren an Tag 30 nach I/R	102
Abb. 40 mRNA Analyse der Schadens- und Fibrosemarker an Tag 30 nach I/R.....	103
Abb. 41 Quantifizierung der Leukozyten und Makrophagen in I/R Nieren an Tag 30 nach I/R	103
Abb. 42 Gefäßanalyse in I/R Nieren an Tag 30 nach I/R	104
Abb. 43 mRNA Level des Proteins p16 ^{INK4a} nach I/R und Versuchsaufbau des p16 siRNA-Experiments.....	105
Abb. 44 Morphologie, Apoptose und Proliferation an Tag 28 nach I/R.....	106
Abb. 45 mRNA Analyse der CDK-Inhibitoren an Tag 28 nach I/R.....	106
Abb. 46 Tubuläre Atrophie und Schadensmarkerexpression an Tag 28 nach I/R.....	107
Abb. 47 Fibrosemarkeranalyse an Tag 28 nach I/R.....	107

Tabellen

Tabelle 1 Reagenzien, Enzyme, Medikamente	31
Tabelle 2 Assays und Kits	35
Tabelle 3 Lösungen für Immunhistochemie (IHC), Immunfluoreszenz (IF), Western Blots (WB).....	36
Tabelle 4: Tris-Puffer Rezepte	36
Tabelle 5 SDS-Gele für Western Blots	41
Tabelle 6 Primär- und Sekundärantikörper	41
Tabelle 7 siRNA Sequenzen	43
Tabelle 8 Primer und Sonden für die TaqMan [®] PCR	43
Tabelle 9 Primer für die SYBR [®] PCR	44
Tabelle 10 Gebrauchsmaterialien und sonstiges Zubehör.....	45
Tabelle 11 Geräte	46
Tabelle 12 Software	47
Tabelle 13 Detailinformationen zu den Versuchstieren.....	47
Tabelle 14 Pipettierschema und Thermocycler-Protokoll für die cDNA-Synthese.....	60
Tabelle 15 Pipettierschema und Thermocycler-Protokoll für die TaqMan [™] -PCR.....	61
Tabelle 16 Pipettierschema und Thermocycler-Protokoll für die SYBR-PCR (1)	62
Tabelle 17: Pipettierschema und Thermocycler-Protokoll für eine SYBR-PCR (2)	62
Tabelle 18 Informationen zur Kultivierung von humanen renalen epithelialen Zellen (modifiziert)	113

Danksagung

Zuerst möchte ich mich von ganzem Herzen bei Frau Prof. Dr. med. Dr. Melk, PhD dafür bedanken, dass sie mir die großartige Chance gegeben hat, diese Doktorarbeit in familienfreundlicher Teilzeit in Ihrer an die Kinderklinik der MHH angeschlossenen Arbeitsgruppe „Experimentelle Transplantationsmedizin“ anzufertigen.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission, insbesondere bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Gerardy-Schahn für die Übernahme des Referats und bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Andreas Kirschning für die Übernahme des Vorsitzes.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Schmitt für seine Unterstützung während dieses Projekts und Herrn Dr. med. Rong für die Übernahme der chirurgischen Eingriffe sehr herzlich bedanken.

Ein ganz großes Dankeschön gilt natürlich allen Kollegen der AG Melk
Arpita, Carolin, Christoph, Daniela, Denise, Julian, Mäggie, Meike und Raj
und allen Kollegen der AG Schmitt
Nathan, Inga, Hayet, Marianne und Sagar
die mir oft mit Rat und vor allem auch mit Tat zur Seite gestanden haben.

Mein herzlicher Dank geht auch an Herrn Dr. rer. nat. Thomas Müller für die zur Verfügung gestellten Nieren und an weitere Kollegen verschiedener Arbeitsgruppen für ihre Hilfe mit diversem Material und diversen Methoden.

Bei Axel, Milena und Matthis möchte ich mich sehr bedanken, dass sie dieses langjährige Projekt geduldig als Familie mit mir getragen und unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Birgit Berkenkamp
geboren: am 19.05.1971 in Bielefeld
Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (Tochter *2000, Sohn *2005)

Schulische Ausbildung

1977 - 1981 Grundsule Stieghorst
1981 - 1990 Städtisches Gymnasium Oerlinghausen
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Studium und berufliche Ausbildung

10/1990 - 09/1992 Staatliche Lehranstalt für MTLA, Lemgo
Abschluss: staatlich geprüfte MTLA
10/1996 - 09/2008 Universität Bielefeld
Studium der Biochemie
Abschluss: Diplom-Biochemikerin
11/1999 - 05/2002 und 03/2005 - 05/2008 Erziehungszeit
seit 03/2009 Klinik für päd. Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen
Promotion, Thema: Interventionsstrategien zur Untersuchung
der Rolle somatischer zellulärer Seneszenz für Nierenzell-
alterung und Transplantatüberleben *in vitro* und *in vivo*

Beruflicher Werdegang

10/1992 - 01/1993	Städtisches Krankenhaus Bielefeld-Mitte Tätigkeit als MTLA
03/1993 - 05/2008	Herz- und Diabeteszentrum NRW in Bad Oeynhausen Tätigkeit als MTLA
07/2001 - 07/2002	Krankenhaus Martha Maria in München Tätigkeit als MTLA
02/2014 - 12/2016	IfM & Co.KG Institut für Milchuntersuchung Verden Tätigkeit als Laborfachkraft
seit 01/2017	MVZ Medizinisches Labor Bremen GmbH Tätigkeit als MTLA

Wissenschaftliche Publikationen

- **Berkenkamp B.**, Susnik N., Baisantry A., Kuznetsova I., Jacobi C., Sörensen-Zender I., Broecker V., Haller H., Melk A., Schmitt R. In Vivo and In Vitro Analysis of Age-Associated Changes and Somatic Cellular Senescence in Renal Epithelial Cells. PLoS ONE 2014 Feb 4;9(2): e88071.
- Baisantry A., **Berkenkamp B.**, Rong S., Bhayadia R., Sörensen-Zender I., Schmitt R., Melk A. Time-dependent p53 inhibition determines senescence attenuation and long-term outcome after renal ischemia-reperfusion. Am J Physiol Renal Physiol. 2019 Jun 1; 316(6): F1124-F1132.