

Zell-basierte Ansätze zur Therapie der renalen Fibrose

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Barbara Mara Klinkhammer

aus Aachen

Berichter: Privatdozentin Dr. med. Uta Kunter
Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Martin Zenke

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2014

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1 Die Funktion der Niere und die Folgen chronischer Niereninsuffizienz..... | 4 |
| 1.2 Adulte Stammzellen | 6 |
| 1.2.1 Mesenchymale Stammzellen / mesenchymale Stromazellen | 7 |
| 1.3 Stamm- und Progenitorzellen als Therapie der akuten und chronischen Niereninsuffizienz..... | 8 |
| 1.4 Ziel der Arbeit | 11 |
| 2. Material..... | 12 |
| 2.1 Tiere und Zellen..... | 12 |
| 2.2 Geräte..... | 12 |
| 2.3 Verbrauchsmaterialien..... | 14 |
| 2.4 Chemikalien | 15 |
| 2.5 Puffer, Lösungen und Medien | 17 |
| 2.5.1 Puffer..... | 17 |
| 2.5.2 Lösungen..... | 19 |
| 2.5.3 Zellkultur | 20 |
| 2.6 Antikörper | 22 |
| 2.6.1 Immunzytochemie..... | 22 |
| 2.6.2 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz | 22 |
| 2.6.3 Westernblot | 23 |
| 2.7 Primer und Sonden | 23 |
| 2.8 Assays & Kits | 24 |
| 2.9 Software..... | 25 |
| 3. Methoden | 26 |
| 3.1 Zellbiologische Methoden | 26 |
| 3.1.1 Isolation und Kultur mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark von Ratten..... | 26 |
| 3.1.2 Adipogene und osteogene Differenzierung von primären MSC..... | 27 |
| 3.1.2.1 Induktion adipogener Differenzierung..... | 27 |
| 3.1.2.2 Induktion osteogener Differenzierung..... | 27 |
| 3.1.3 Verdopplungszeit der Zellpopulation | 28 |
| 3.1.4 Stimulation von Fibroblasten mit konditioniertem MSC-Medium..... | 28 |
| 3.1.5 Zellfärbungen..... | 29 |
| 3.1.5.1 Enzymatische Seneszenz-Färbung..... | 29 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.1.5.2 | Oil Red O-Färbung | 29 |
| 3.1.5.3 | Alizarin Rot-Färbung..... | 30 |
| 3.1.5.4 | Phalloidin-Färbung..... | 30 |
| 3.1.5.5 | Immunzytochemie..... | 30 |
| 3.1.6 | Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten MSC | 32 |
| 3.2 | Tierexperimentelle Methoden | 32 |
| 3.2.1 | 5/6 Nephrektomie | 32 |
| 3.2.2 | Adenin-Nephropathie | 34 |
| 3.2.3 | Akute anti-Thy1.1-Nephritis | 35 |
| 3.2.4 | MSC-Applikation | 36 |
| 3.2.4.1 | i.v.-Injektion in Ratten mit 5/6 Nephrektomie..... | 36 |
| 3.2.4.2 | i.a.-Injektion in Ratten mit anti-Thy1.1-Nephritis | 36 |
| 3.2.5 | Finaleingriff | 37 |
| 3.2.6 | Gewebeaufarbeitung | 37 |
| 3.2.6.1 | Einbettung der Gewebe und Anfertigung von Schnitten | 37 |
| 3.2.6.2 | Herstellung von Proteinlysaten aus Nierenkortices..... | 38 |
| 3.3 | Proteinbiochemische Methoden | 38 |
| 3.3.1 | Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BC Assay..... | 38 |
| 3.3.2 | Sircol Assay..... | 39 |
| 3.3.3 | Seneszenz Assay | 39 |
| 3.3.4 | TGF- β ELISA..... | 39 |
| 3.3.5 | Zytokin-Array | 40 |
| 3.3.6 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 40 |
| 3.3.7 | Westernblot | 41 |
| 3.3.8 | Albumin ELISA | 42 |
| 3.3.9 | 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA..... | 42 |
| 3.3.10 | Parathormon ELISA | 42 |
| 3.4 | Molekularbiologische Methoden | 42 |
| 3.4.1 | RNA-Präparation aus kultivierten MSC | 42 |
| 3.4.2 | Synthese komplementärer DNA (<i>complementary DNA, cDNA</i>)..... | 43 |
| 3.4.3 | Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (<i>Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR</i>) | 43 |
| 3.5 | Histologische Methoden | 45 |
| 3.5.1 | Histologische Färbungen | 45 |
| 3.5.1.1 | PAS (<i>Periodic acid-Schiff</i>)-Färbung..... | 45 |
| 3.5.1.2 | Immunhistochemie und Immunfluoreszenz..... | 46 |
| 3.5.2 | <i>In vivo</i> "Tracking" von MSC..... | 48 |
| 3.5.2.1 | „ <i>human placental alkaline phosphatase</i> “-transgene MSC..... | 48 |
| 3.5.2.2 | PKH26-Fluoreszenz..... | 49 |
| 3.6 | Statistik..... | 50 |
| 4. | Ergebnisse | 51 |
| 4.1 | Applikation gesunder MSC als Therapie der renalen Fibrose..... | 51 |
| 4.1.1 | Isolierte Knochenmarkszellen zeigen MSC-Markerprofil und -Differenzierungskapazität | 52 |
| 4.1.2 | Krankheitsverlauf und MSC-Behandlung | 54 |

| | | |
|----------------------|--|------------|
| 4.1.3 | Analyse der Tiere (funktionell und histologisch) zum Tötungszeitpunkt..... | 56 |
| 4.2 | Einfluss von Urämie auf Knochenmarks-MSC: | |
| | Tiermodelle und Klassifizierung der MSC-Spender | 61 |
| 4.2.1 | Adenin-Nephropathie in Ratten..... | 61 |
| 4.2.2 | Einteilung der MSC-Spender anhand der Nierenfunktion..... | 64 |
| 4.3 | Charakterisierung gesunder und urämischer MSC sowie gesunder hPLAP- | |
| | transgener MSC in vitro | 65 |
| 4.3.1 | Oberflächenmarkerprofil, Zellmorphologie und Aktin Expression gesunder und urämischer MSC..... | 65 |
| 4.3.2 | Proliferationskapazität gesunder und urämischer MSC..... | 67 |
| 4.3.3 | Seneszenz-Marker: Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase..... | 68 |
| 4.3.4 | Adipogenese in gesunden und urämischen MSC..... | 70 |
| 4.3.5 | Sekretionsprofile von gesunden und urämischen MSC..... | 74 |
| 4.3.6 | Eigenschaften hPLAP-transgener MSC <i>in vitro</i> | 79 |
| 4.4 | In vivo Funktionalität von urämischen MSC im Rattenmodell der akuten anti- | |
| | Thy1.1-Nephritis | 80 |
| 4.4.1 | Behandlung der linken Nieren mit MSC..... | 81 |
| 4.4.2 | Nierenfunktion und -histologie an Tag 4 und 6 der anti-Thy1.1-Nephritis..... | 84 |
| 4.4.3 | Anti-Thy1.1-Nephritis in hPLAP-transgenen Ratten..... | 90 |
| 4.5 | Einfluss der Urämie auf residente Nierenprogenitorzellen | 91 |
| 4.5.1 | Periglomeruläre Zellen am Vas afferens als mögliche intrarenale Progenitoren.. | 92 |
| 4.5.2 | CD24-positive Zellen in fibrotischen Nieren..... | 93 |
| 5. | Diskussion | 96 |
| 6. | Zusammenfassung | 110 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 111 |
| 8. | Anhang | 118 |
| | Zusätzliche Tabellen..... | 118 |
| | Abkürzungsverzeichnis..... | 123 |
| | Abbildungsverzeichnis..... | 127 |
| | Tabellenverzeichnis..... | 129 |
| Danksagung | | 130 |
| Lebenslauf | | 131 |
| Publikationen | | 132 |
| Erklärung | | 133 |

1. Einleitung

1.1 Die Funktion der Niere und die Folgen chronischer Niereninsuffizienz

Die Nieren übernehmen bei Säugetieren exkretorische, osmoregulatorische und auch endokrine Funktionen. Diese werden durch einen komplexen Organaufbau aus über 30 verschiedenen Zelltypen effizient bewerkstelligt¹. Die funktionellen Einheiten der paarigen Säugernieren, die sog. Nephrone, gliedern sich in ein Nierenkörperchen (auch Malpighi-Körperchen oder Glomerulus) in der Nierenrinde und ein anschließendes Tubulussystem, lokalisiert in Nierenrinde und –mark .

Im Glomerulus findet eine stetige Filtration des Blutes statt (beim Mensch liegt die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei ca. 125 ml / Min / 1,73 m² Körperoberfläche²). Der dabei entstehende Primärharn enthält noch alle kleinmolekularen Bestandteile des Blutplasmas. Während der Passage des proximalen Tubulus, der Henle'schen Schleife, des distalen Tubulus und des Sammelrohres wird das Ultrafiltrat durch aktive und passive Rückresorption von Salzen, Aminosäuren, Wasser etc. aufkonzentriert. Gleichzeitig steigt durch aktive Sekretionsprozesse die Menge von auszuscheidenden, unbrauchbaren oder toxischen Stoffwechselendprodukten im Endharn. Ein Gegenstromaustauschsystem entlang eines osmotischen Gradienten mit zunehmender Hypertonie von Nierenmark papillenwärts ermöglicht diese konzentrierte Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen bei minimalem Wasser- und Salzverlust. Desweiteren produzieren die Nieren Erythropoetin sowie Calcitriol und sind an der Regulation des Blutdrucks beteiligt^{3,4}.

Die vielen Aufgaben der Niere bedingen gleichzeitig eine starke Auswirkung auf den Organismus bei Schädigung und Funktionsverlust des Organs. Akutes Nierenversagen (engl. *acute kidney injury* (AKI)) mit abrupter Verschlechterung der Nierenfunktion kann durch eine Vielzahl verschiedener Auslöser induziert werden, z.B. Infektionen, immunologische Nierenerkrankungen, hypoxische Zustände bei schlechter Durchblutung, obstruktive Nephropathie oder Verabreichung nephrotoxischer Substanzen wie Röntgenkontrastmittel (*KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury*)^{5,6}. Diese Schäden betreffen oft einzelne Abschnitte des Nephrons, bzw. spezifische renale Zelltypen, wie beispielsweise Tubulusepithelzellen, und abhängig vom Auslöser kann das Gewebe oft relativ gut ausheilen⁷⁻⁹. Zudem können die Nieren den Verlust einzelner Nephrone gut kompensieren¹⁰, selbst eine einzelne der paarigen Nieren kann ausreichende Funktion leisten, wie bei der Lebendnierenspende und Nierentransplantation.

Einleitung

Persistierende oder wiederholte Schädigungsreize hingegen können zur chronischen Nierenerkrankung führen (engl. *chronic kidney disease* (CKD), definiert u.a. mit $GFR < 60 \text{ ml / Min / } 1,73 \text{ m}^2$ für mindestens 3 Monate (*KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease*¹¹)^{7,9}). Das Risiko für CKD steigt mit höherem Lebensalter und Übergewicht, ebenso durch systemische Vorerkrankungen wie z.B. Bluthochdruck, Diabetes, Glomerulonephritiden und kardiovaskuläre Pathologien². Nahezu alle fortschreitenden chronischen Nierenerkrankungen bilden eine renale Fibrose aus^{12,13}. Unter „Fibrose“ ist eine Vernarbung des Gewebes zu verstehen, die durch Akkumulation von Bindegewebe, d.h. überschüssiger extrazellulärer Matrix, und den Verlust funktionalen Gewebes gekennzeichnet ist^{14,15} (siehe Abbildung 1.1). Dieser Prozess entsteht durch andauernde Stimulation des ursprünglich protektiven und regenerativen Prozesses der Wundheilung.

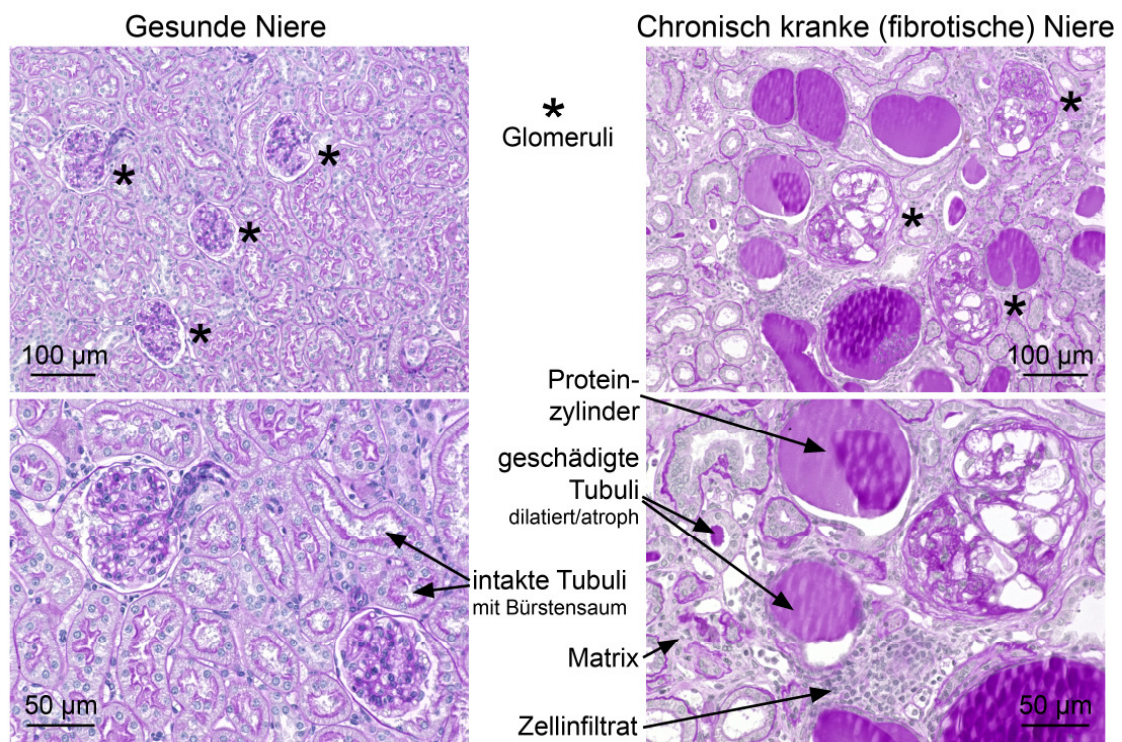


Abbildung 1.1 Histologische Veränderungen in fibrotischen Nieren.

Vergleichend dargestellt sind PAS-gefärbte histologische Kortex-Ansichten einer gesunden und einer fibrotischen Rattenniere. Die gesunde Niere zeigt normale Glomeruli mit Kapillarknäuel und Bowman'scher Kapsel sowie ein funktionales Tubulointerstitium, bei dem nur vereinzelte interstitielle Zellen vorkommen und das Tubulusepithel einen intakten Bürstensaum aufweist. Die kranke Niere zeigt vergrößerte sklerosierte Glomeruli. Im Interstitium sind Zellen und Matrix akkumuliert. Zahlreiche Tubuli sind erweitert, das Epithel abgeflacht und oftmals sind Proteinzyylinder in den Tubuli zu erkennen.

Einleitung

Klinisch problematisch ist, dass die pathologische Fibrogenese –sobald einmal initiiert– bislang kaum zu stoppen oder gar reversibel ist. Die fortschreitende Niereninsuffizienz führt zur Ausbildung weiterer Sekundärerkrankungen, wie beispielsweise Bluthochdruck und akzelerierter Gefäßverkalkung. Durch die stetige Abnahme der GFR bis hin zum terminalen Stadium der Niereninsuffizienz (engl. *end-stage renal disease* (ESRD)) mit Eintritt der Dialysepflicht (definiert als $GFR < 10 \text{ ml / Min / } 1,73 \text{ m}^2$)^{5,14}. Renale Fibrose läuft unter Einbeziehung nahezu aller renalen Zelltypen ab und kann alle Kompartimente der Niere betreffen: die Glomeruli (als „Glomerulosklerose“), das Tubulointerstitium (als „tubulointerstitielle Fibrose“) und die Blutgefäße (als „Arteriosklerose“) ^{10,16}. Der gesamte Entstehungsprozess der Fibrose und besonders der Ursprung der interstitiellen Matrix-produzierenden Myofibroblasten, die in fibrotischem Gewebe zahlreich zu finden sind, sind unzureichend verstanden ^{17,18}. Dies erschwert die Suche nach möglichen kausalen Behandlungsmethoden. Bislang ist die chronische Nierenersatztherapie (Dialyse und Nierentransplantation) die einzige Option bei terminalem Nierenversagen. Bei insgesamt 86 000 Dialysepflichtigen, von denen ca. 8000 bereits auf eine Spenderniere warten, werden neue Therapiemöglichkeiten dringend benötigt (Deutsche Gesellschaft für Nephrologie www.dgfn.eu ¹⁹). Neben pharmazeutisch hergestellten Medikamenten werden auch Zell-basierte Therapieansätze, z.B. der Einsatz adulter Stammzellen, zur Behandlung renaler Erkrankungen beforscht und diskutiert.

1.2 Adulte Stammzellen

Als sog. „multipotente adulte Stammzellen“ werden jene undifferenzierten Zellen eines Organismus bezeichnet, welche in ausgereiften Geweben oder Organen vorkommen und die Fähigkeit besitzen sich in eine Vielzahl von Abkömmlingen / Tochterzellen zu differenzieren sich aber gleichzeitig selbst unbegrenzt erneuern zu können ohne dabei dieses Differenzierungspotenzial zu verlieren ^{20,21}. Dies wird ermöglicht durch den Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung, der es erlaubt, einerseits Tochterzellen mit unveränderten Stammzeleigenschaften zu generieren, andererseits Tochterzellen mit größerer Ausdifferenzierung (Progenitorzelle) hervorzubringen. Zwei wichtige Gruppen von adulten Stammzellen sind zum einen die hämatopoetischen Stammzellen (HSC für engl. *hematopoietic stem cell*), die Blut- und Immunzellen bilden, zum anderen die mesenchymalen Stammzellen (MSC für engl. *mesenchymal stem cell* oder auch *mesenchymal stromal cell*), die u.a. im Knochenmarkstroma zu finden sind. Mesenchymale

Einleitung

Stammzellen können sich in alle mesenchymalen Zellarten, beispielsweise in Knochen, Knorpel, Sehnen und Fettzellen, differenzieren²²⁻²⁴. Die Anzahl solcher Zellen im Gewebe ist sehr gering, nur eine von 10 000 Knochenmarkszellen ist eine HSC und die Frequenz der MSC liegt im Knochenmark bei ca. 2-5 pro 10⁶ mononukleären Zellen, wobei die Zahlen im Alter abnehmen²⁵. Für eine detaillierte Charakterisierung der Zellen sowie zu potentiellen klinischen Einsätzen sind sowohl standardisierte Isolationsschritte zur Gewinnung der Stammzellen aus Gewebe als auch eine sichere und effektive *ex vivo* Vermehrung von großer Bedeutung^{26,27}. Hierbei ist kritisch zu beachten, dass die Stammzellen stark von ihrer Umgebung beeinflusst werden und ihre Eigenschaften verändern können sobald sie aus ihrer natürlichen Nische entfernt werden^{28,29}.

1.2.1 Mesenchymale Stammzellen / mesenchymale Stromazellen

Bei den mesenchymalen Stammzellen (MSC) handelt es sich um eine heterogene Population von Stromazellen³⁰. Sie konnten bereits aus einer Vielzahl von Organen isoliert werden, z.B. aus Knochenmark, quergestreifter Muskulatur, Fettgewebe, der Nabelschnur, Zahnmark, Leber, Lunge, Haut, Plazenta oder Fruchtwasser^{26,31-33}. Diese weite Verbreitung hängt vermutlich mit ihrer perivaskulären Lokalisation zusammen, die gleichzeitig eine Korrelation der MSC-Frequenz mit der Gefäßdichte erklärt³³⁻³⁶. Mit ihrer hohen Plastizität können MSC Bindegewebe, Knochen, Knorpel und Fett bilden³⁷. Zudem wurden bereits *in vitro* und *in vivo* Transdifferenzierungen in Neuroektoderm und Epithel³¹ sowie Beiträge zu endodermalen Linien beschrieben^{21,22} (siehe Abbildung 1.2.1).

Bei der Vielfältigkeit bezüglich Herkunft und Differenzierung fehlt bislang noch ein spezifischer Marker zur Identifikation „der“ mesenchymalen Stammzelle. Potentielle beschriebene Kandidaten, z.B. CD271 oder W8-B2 / MSCA-1, variieren sowohl zwischen den Spezies als auch zwischen den Herkunftsgeweben²⁸. Daher wurden durch die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) Standardkriterien zur Identifikation von MSC vorgeschlagen²³, u.a. Differenzierungspotenzial unter verschiedenen Wachstumsbedingungen und Plastikadhärenz. Einen weiteren Selektionsfaktor stellt das Oberflächenantigen-Expressionsmuster dar. Die humanen Zellen müssen positiv getestet werden für CD44 (ein Adhäsionsprotein), CD73 (*Ecto 5' Nucleotidase*), CD90 (Thy1) und CD105 (Endoglin). Die Kulturen dürfen keine Marker der hämatopoetischen Linie tragen (< 2%), z.B. CD45 (Leukozyten), CD34 (hämatopoetische Progenitoren, Endothelzellen), CD14 oder CD11b (Monozyten), CD79α oder CD19 (B-Zellen), sowie HLA-DR (MHC-II).

Trotz Ermangelung eines eindeutigen Markers überwiegen die Vorteile der MSC als mögliches biologisches Therapeutikum in klinischen Einsätzen: Viele mögliche

Einleitung

Isolationsquellen, gute Expansionsmöglichkeiten *in vitro*, hohe Plastizität und parasekretorische sowie immunmodulatorische Eigenschaften, welche auch einen allogenen Einsatz erlauben^{21,22,26,38}. Die Zellen haben ein ausgeprägtes *homing*-Verhalten durch Expression vieler Chemokinrezeptoren und migrieren zu Entzündungsherden beispielsweise mittels der chemotaktischen Achsen SDF-1 / CXCR4 und CD44 / Hyaluronsäure³⁹. Mit den Isolationsmöglichkeiten aus adultem Gewebe entfallen zudem zahlreiche ethische Bedenken^{26,32}.

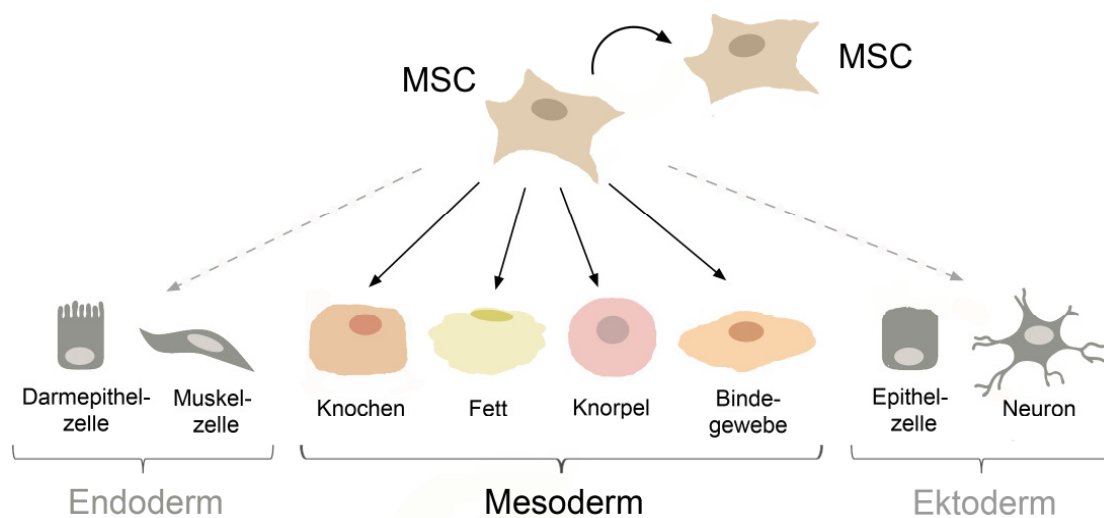


Abbildung 1.2.1: Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark.

Nach Uccelli et al 2008²⁴.

MSC können sich durch asymmetrische Teilung im Knochenmark selbst erneuern und gleichzeitig in Zelltypen der mesodermalen Linie differenzieren (Pfeile). Ebenfalls wurden bereits Transdifferenzierungen in Zelltypen des Ektoderms (z.B. Epithel) und Endoderms (z.B. Darm) gezeigt (gestrichelte Pfeile). Ungeklärt ist, ob letztere Differenzierungskapazität tatsächlich einen relevanten Beitrag zur Entwicklung oder Regeneration von Geweben beiträgt.

1.3 Stamm- und Progenitorzellen als Therapie der akuten und chronischen Niereninsuffizienz

Aufgrund ihrer o.g. Charakteristika wurden MSC in einigen experimentellen Nager-Modellen des akuten Nierenversagens (ANV; englisch AKI für "acute kidney injury") getestet und konnten vielfach einen positiven Effekt in Form von verbesserter Nierenfunktion und -histologie bewirken³⁹⁻⁴³. Die renoprotektiven Effekte wurden dabei vermutlich eher durch

Einleitung

homing der MSC zum geschädigten Gewebe und dortiger parakriner Sekretion anti-inflammatorischer, anti-apoptotischer sowie pro-angiogener und mitogener Faktoren vermittelt als durch Differenzierungsprozesse (siehe Abbildung 1.3).

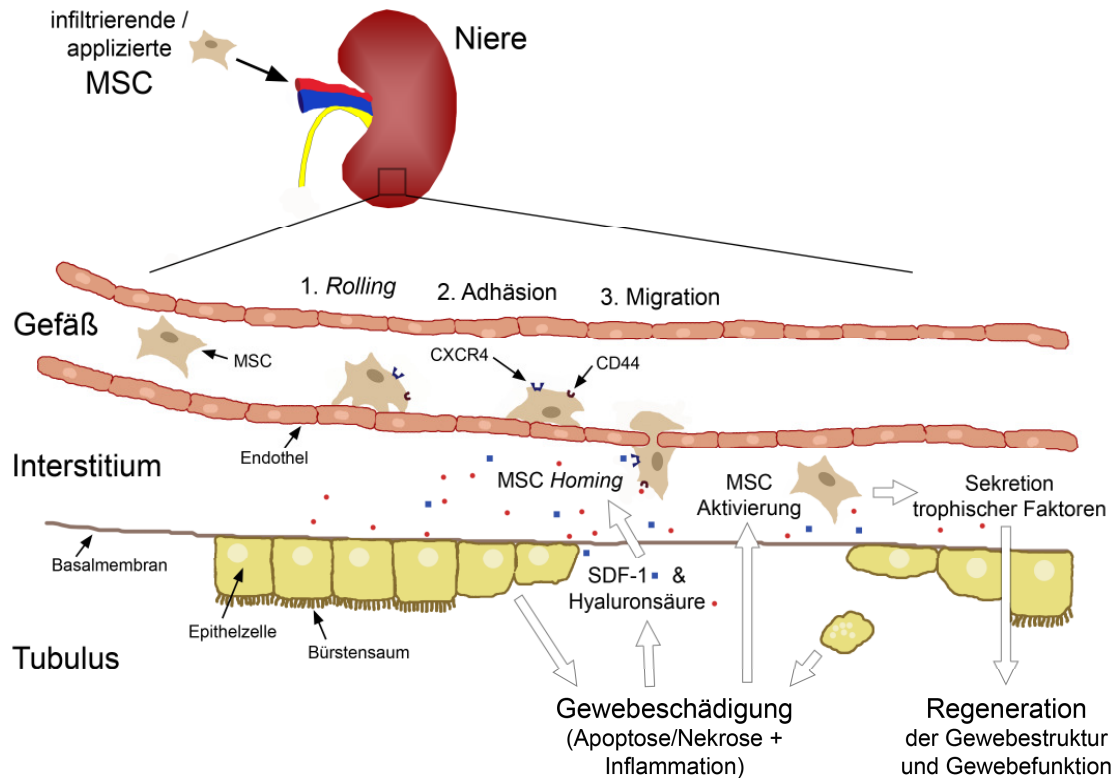


Abbildung 1.3: Mögliche Effekte nach MSC-Applikation bei akutem Nierenversagen.
Nach Wise & Ricardo 2012³⁹.

Eine akute Nierenschädigung führt zu vermehrter renaler Expression von SDF-1 und Hyaluronsäure, welche die MSC über CXCR4 und CD44 an deren Oberfläche chemotaktisch anlocken. Intravenös applizierte MSC binden an das Endothel und migrieren ins entzündete Gewebe ähnlich wie infiltrierende Immunzellen. Die MSC werden durch die lokale Entzündung stimuliert, produzieren und sezernieren eine Vielzahl von Molekülen mit anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen, mitogenen und pro-angiogenen Funktionen, welche die Regeneration der Niere unterstützen.

Aufgrund der positiven präklinischen Tests laufen inzwischen erste klinische Studien zum Einsatz von MSC bei ANV⁴⁴ (www.clinicaltrials.gov: NCT00733876, „Phase I Clinical Trial, Dose-escalating Intra-aortic Infusion of Allogeneic, Bone Marrow-derived Multipotent Stromal Cells to Prevent and Treat Post-operative Acute Kidney Injury in Patients Who Require On-pump Cardiac Surgery“ von 2008 bis 2013 in Murray und Salt Lake City, USA⁴⁵ und NCT01275612 „Ex-Vivo Expanded Mesenchymal Stem Cells To Repair The Kidney And Improve Function In Cisplatin-Induced Acute Renal Failure In Patients With Solid Organ Cancers“ von 2010 bis 2014 in Bergamo, Italien⁴⁶).

Einleitung

Die Möglichkeit der Ausweitung des MSC-Einsatzes auf Modelle zur chronischen Niereninsuffizienz ist wünschenswert und wird momentan ebenfalls intensiv untersucht. Die Herausforderung hierbei ist, dass sich in fortgeschrittenen Stadien chronischer Nierenerkrankungen bereits radikale Gewebeveränderungen wie Atrophie und Dilatation von Tubuli, Verlust von Glomeruli und Blutgefäßen sowie verstärkte Ablagerung von extrazellulärer Matrix manifestiert haben^{10,16,47-49}.

Das Potenzial von Stammzellen bei fibrotischen Erkrankungen wird kontrovers diskutiert, da sowohl positive anti-fibrotische Wirkungen als auch pro-fibrotische Effekte beobachtet wurden. MSC-Applikationen konnten in verschiedenen renalen Fibrosemodellen, z.B. der unilateralen Ureterligatur (UUO) oder der 5/6 Nephrektomie, die Fibrose reduzieren⁵⁰⁻⁵⁸. Auch endotheliale Progenitoren hatten renoprotektive Effekte, indem sie die interstitielle Fibrose in Mäusen reduzierten⁵⁹ und die Entzündungsreaktion minderten⁶⁰. Diese ersten Ergebnisse sind jedoch keinesfalls zu verallgemeinern, da sie zum einen stark in Krankheitsmodell, Zelldosis, Isolations- und Applikationsmethode, Therapiezeitpunkt und *Follow-up*-Zeitspanne variieren, zum anderen sehr unterschiedliche Bewertungsparameter erheben. So detektierten beispielsweise Asanuma et al. weniger α -SMA (engl. für *α -smooth muscle actin*), weniger FSP (engl. für *fibroblast specific protein*)-positive Zellakkumulation, weniger Gesamtkollagen und tubulointerstitielle Fibrose im Modell der UUO⁵⁰, injizierten die MSC jedoch noch vor Induktion der Krankheit –ein Design, welches sich kaum auf die Klinik übertragen lässt. Andere berichteten zwar von einer Reduktion der renalen Fibrose nach MSC-Gabe, diese zeigte aber funktionell keine Wirkung und konnte weder das Nierenversagen vermeiden noch die Mortalität von Mäusen senken^{61,62}. Bereits 2006 zeigten Kirpatovskii und Kollegen, dass MSC zwar in einem chronischen Nierenschädigungsmodell in Ratten die akute Niereninsuffizienz für wenige Tage nach Applikation verbesserten, eine anhaltende Langzeitwirkung jedoch ausblieb⁶³. Eine positive Langzeitwirkung durch wiederholte MSC-Applikationen gelang nur vereinzelt^{51,54}. Andere Forschergruppen zeigten sogar negative Effekte einer MSC-Therapie, verursacht durch Differenzierung der applizierten Zellen in pro-fibrotische Matrix-produzierende Myofibroblasten⁶⁴. Auf die Möglichkeit, dass MSC selbst einen Fibroblasten-Phänotyp annehmen könnten oder residente Fibroblasten stimulieren und so die Fibrogenese fördern, wurde auch schon in anderen Organen hingewiesen⁶⁵⁻⁶⁸. Desweiteren wurde über ein "Maldifferenzierung" genanntes Phänomen von nicht-maligner Differenzierung in (im entsprechenden Kontext) unerwünschte, z.B. osteogene⁶⁹ und adipogene⁴⁷ Zellen berichtet. Diese Veröffentlichungen stellen in gewisser Weise die Sicherheit der MSC beim Einsatz in chronischen Erkrankungen in Frage und werfen weiterhin die Frage auf, weshalb MSC bei akutem Nierenversagen eindeutiger positive Resultate erbringen als bei chronischen Nierenerkrankungen. Erste Erklärungsansätze bieten Daten zu endothelialen Progenitoren (EPC für engl. *endothelial*

progenitor cell), für die gezeigt wurde, dass Anzahl und Funktion in Dialyse-Patienten stark reduziert sind⁷⁰⁻⁷⁴. Es ist nicht auszuschließen, dass das veränderte Milieu bei CKD auch Einfluss auf MSC-Funktionen hat, da die Akkumulation urämischer Toxine, Vitamin D- und Erythropoetin-Defizienz, hoher Blutdruck und Azidose die physiologische Nische beeinträchtigen können. Erste Publikationen zu Auswirkungen von CKD auf MSC in Nagern scheinen zu bestätigen, dass MSC aus CKD-Tieren *in vitro* tatsächlich veränderte Phänotypen zeigen⁷⁵ und dies auch ihr therapeutisches Potenzial verändern könnte⁷⁶.

1.4 Ziel der Arbeit

Insgesamt befasst sich diese Promotionsarbeit mit zwei Schwerpunkten: Dem Einsatz von MSC als potentielle Therapie der renalen Fibrose und umgekehrt den Effekten chronischer Nierenerkrankungen auf die MSC.

Im ersten Teil sollte untersucht werden, ob MSC aus dem Knochenmark in Form von syngenen Stammzelltransplantaten als Therapeutikum in der renalen Fibrose einen positiven Effekt haben. Dazu wurde das in der Abteilung etablierte Krankheitsmodell der 5/6 Nephrektomie (5/6 Nx) in Ratten gewählt. Um einen therapeutischen Effekt der MSC zu erreichen und die Nierenfunktion in diesem Modell der chronischen Niereninsuffizienz zu verbessern, wurde die Therapie bereits während eines frühen Zeitpunktes der Erkrankung gestartet und die Applikation der Zellen mehrfach wiederholt (wöchentlicher Rhythmus). Die Evaluation umfasste eine Bewertung der Nierenfunktion und -histologie.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Frage warum MSC bei chronischen Nierenerkrankungen oftmals keine signifikanten Verbesserungen bewirken können (sowohl laut Literatur als auch in unseren eigenen Experimenten, u.a. im ersten Teil dieser Arbeit). Beeinflussen chronisch urämische Bedingungen das therapeutische Potenzial der MSC?

Zur Klärung dieser Frage wurden Knochenmarks-MSC aus gesunden und kranken Ratten (chronische Niereninsuffizienz durch 5/6 Nx oder Adenin-Nephropathie) isoliert und *in vitro* bezüglich ihrer Oberflächenmarker, Proliferations- und Differenzierungskapazität sowie ihrer Sekretionseigenschaften analysiert. Auch *in vivo* wurde ihr regeneratives Potenzial überprüft. Die Funktionalität urämischer MSC gegenüber den Zellen gesunder Spendertiere wurde in einem (gut etablierten) Tiermodell der akuten mesangioproliferativen Glomerulonephritis (anti-Thy1.1-Nephritis) getestet, bei dem unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte, dass gesunde MSC die Nierenhistologie und -funktion deutlich verbessern können⁴².

2. Material

2.1 Tiere und Zellen

- Ratten (alle männlich):
 - Inzuchtstamm Fisher 344 Wildtyp (F344 wt) von Charles River sowie aus eigener Zucht im Institut für Versuchstierkunde am Universitätsklinikum der RWTH Aachen
 1. zur Isolation primärer MSC aus dem Knochenmark
 2. zur Induktion einer renalen Fibrose mittels 5/6 Nephrektomie und Analyse der Nieren nach MSC-Therapie
 3. zur Induktion einer akuten anti-Thy1.1-Nephritis zur Testung des therapeutischen Potenzials gesunder und urämischer MSC *in vivo*
 - hPLAP transgene Fisher 344 Ratten (F344-Tg(R26-hPLAP)⁷⁷, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. van Goor, Universität Groningen) aus eigener Zucht im Institut für Versuchstierkunde am Universitätsklinikum der RWTH Aachen
 1. zur Isolation primärer MSC aus dem Knochenmark
 2. zur Induktion einer akuten anti-Thy1.1-Nephritis zur Testung des Einflusses des Transgens auf den Krankheitsverlauf
- Zellen:
 - primäre Knochenmarks-MSK aus wt- und hPLAP-transgenen Fisher 344 Ratten
 - Zelllinie renaler Rattenfibroblasten: NRK49-F (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, D)

2.2 Geräte

- | | |
|--|---|
| • 7300 Real Time PCR System | Applied Biosystems (Foster City, USA) |
| • Brutschrank Hera cell | Heraeus (Hanau, D) |
| • Blutdruckmessgerät (CODA System) | Kent Scientific Corporation (Torrington, USA) |
| • Cytospin | Shandon Southern Instruments (Cambridge, UK) |
| • ELISA-Reader | Tecan (Mainz, D) |
| • <i>Fluorescence-Plate-Reader</i> Fluorstar Optima | BMG Labtech (Offenburg, D) |

Material

- Kamera (Mikroskop Zellkultur) E620 Olympus (Hamburg, D)
- Kauter ERBOTOM ACC450 Erbe (Tübingen, D)
- Kryotom (Leica CM 3050S) Leica (Wetzlar, D)
- Kühlplatte COP30 Medite (Burgdorf, D)
- Magnetrührer MR2002, M3001 Biorad (München, D)
- Mikrowelle Bosch (Stuttgart, D)
- Mikroskope:
 - Olympus BX41 Olympus (Hamburg, D)
 - Olympus CK40 Olympus (Hamburg, D)
 - Keyence BZ 9000E Keyence (Neu-Isenburg, D)
- Mikrotome RM2245 Leica (Nussloch, D)
- Multifuge 3L-R Heraeus (Hanau, D)
- Multikanalpipetten Eppendorf (Hamburg, D)
- multi-Parameter *Cell Counter*
CASY Cell Counter and Analyzer
Model TT Schärfe Systems (Reutlingen, D)
- Neubauer Zählkammer Brand (Wertheim, D)
- OptiMax X-ray Film Processor Protec (Oberstenfeld, D)
- pH-Meter PHM 210 Radiometer Kopenhagen (Willich-Schiefbahn, D)
- Pipetboy acu Integra Biosciences (Fernwald, D)
- Pipetten, verschiedene Eppendorf (Hamburg, D)
- Pipetten, verschiedene Gilson (Middleton, USA)
- Power Pac 200, 3000 Biorad (München, D)
- Mikrochirurgisches Präparierbesteck,
u.a. chirurgische Schere, Aesculap (Tuttlingen, D),
anatomische und chirurgische Pinzette, Fine Science Tools GmbH (Heidelberg, D),
Ibis-Pinzetten, Uhrmacherpinzetten, Dumont&Fils Electron Microscopy Science (München, D)
mit und ohne Plateau, Karl Storz GmbH&Co KG (Tuttlingen, D)
Aneurysma-Gefäßclips etc.
- Rollen-Mischgerät RS-TR05 Phoenix Instrument (Garbsen, D)
- Schüttelwasserbad GFL (Burgwedel, D)
- Spectrophotometer Ultrospec 3000 Pharmacia Biotec (Piscataway, USA)
- Sterilbank Hera safe Heraeus (Hanau, D)
- Taumel-Wipptisch (WT12) Biometra (Göttingen, D)
- Thermocycler Landgraf (Langenhagen, D)
- Autoklav (Dampfsterilisator) Thermo Scientific (Braunschweig, D)
- Vortex-Genie Scientific Industries (New York, USA)

Material

- Waagen:
 - PBC, bis 1 kg Kern (Balingen, D)
 - ST77E, bis 220 g Strohlein (Mittbach, D)
- Western Blot Kammer Biorad (München, D)
- Zentrifugen 5417R, 5415D Eppendorf (Hamburg, D)

2.3 Verbrauchsmaterialien

- *Chamber slides* (steril) Nalge Nunc International, (Naperville, USA)
- Deckgläschen (verschiedene) Roth (Karlsruhe, D)
- Fertige NuPAGE 4-12% Bis-Tris, NP0321BOX Invitrogen (Karlsruhe, D)
- Filterpapier Macherey-Nagel (Düren, D)
- Gelastyp® Sanofi Aventis (Frankfurt am Main, D)
- Hyperfilm™ ECL GE Healthcare (München, D)
- Kanülen (Microlance™ (verschiedene)) BD (Heidelberg, D)
- Multi-Well-Platten (6, 12, 24, 96 well) Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
- Nahtmaterial (verschiedene), Kürschnernadeln + Mersilene Ethicon® Johnson&Johnson (Norderstedt, D)
- Nitrocellulosemembran Schleicher & Schuell (Dassel, D)
- Objektträger Superfrost® Plus Thermo Scientific (Braunschweig, D)
- Parafilm Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
- Petrischalen (steril) TPP Techno Plastic Products (Trasadingen, CH)
- Pipettenspitzen Eppendorf (Hamburg, D)
- Reaktionsgefäße (1,5; 2ml) Eppendorf (Hamburg, D)
- Serologische Pipette, 2-25ml Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
- Spritzen (verschiedene) Terumo Europe (Leuven, B)
- Tabotamp® Ethicon® Johnson&Johnson (Norderstedt, D)
- Zellkulturflaschen (25; 75; 150 cm²) Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
- Zellschaber mit Gelenk Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
- Zentrifugenröhrchen (15; 50 ml) TPP Techno Plastic Products (Trasadingen, CH)

2.4 Chemikalien

- 2-Propanol Merck (Darmstadt, D)
- 3,3'-Diaminobenzidin (DAB), D5637 Sigma (Steinheim, D)
- 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Roche (Mannheim, D)
- *5-Brom-4-chlor-3-indolyl phosphate dipotassium salt* (BCIP), B6274 Sigma Aldrich (Steinheim, D)
- 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (x-Gal) Sigma (Steinheim, D)
- Aceton VWR International (Fontenay-Sous-Bois, F)
- ABC Kit Vectastain PK6100 Vector Laboratories (Burlingame)
- β -Mercaptoethanol Sigma (Steinheim, D)
- Bovines Serum Albumin Serva (Heidelberg, D)
- Bromphenolblau, B-6131 Sigma (Steinheim, D)
- *CASY ton* (isotonisch / isoosmotisch) Roche (Mannheim, D)
- Chloroform VWR International (Fontenay-Sous-Bois, F)
- Zitronensäure (C₆H₈O₇) Merck (Darmstadt, D)
- *dNTP-Set 100mM Solutions* Roth (Karlsruhe, D)
- *chemiluminescence reagent ECL* Pierce, Thermo Scientific (Rockford, USA)
- EDTA Merck (Darmstadt, D)
- EGTA Merck (Darmstadt, D)
- Ethanol, 100% Hauseigene Apotheke
- Ethanol, absolut Merck (Darmstadt, D)
- Eosin, E4382 Sigma Aldrich (Steinheim, D)
- Essigsäure AppliChem (Darmstadt, D)
- Fertiggele NuPAGE 4-12% Invitrogen (Karlsruhe, D)
- *First Strand Buffer* (5x) Invitrogen (Karlsruhe, D)
- Glycerin (C₃H₈O₃) Merck (Darmstadt, D)
- Glycin (C₂H₅NO₂) Merck (Darmstadt, D)
- *HaltTM Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail, EDTA-free* Thermo Scientific (Rockford, USA)
- Hämatoxinilin, MHS16 Sigma (Steinheim, D)
- HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure Carl Roth (Karlsruhe, D)
- Immu-Mount Thermo Scientific (Rockford, USA)
- Isofluran Forene® 100% (V/V) Abbott (Wiesbaden, D)
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) Merck (Darmstadt, D)

Material

- Kaliumferrizyanid, P-8131 Sigma (Steinheim, D)
- Kaliumferrozyanid, P-9387 Sigma (Steinheim, D)
- Ketamin 10% Ceva Tiergesundheit GMBH (Düsseldorf, D)
- Methanol VWR International (Fontenay-Sous-Bois, F)
- N,N-Dimethylformamid (C₃H₇NO) Merck (Darmstadt, D)
- Methylgrün, 67060 Fluka (Sigma Aldrich) (Steinheim, D)
- Magnesiumchlorid (MgCl₂) Merck (Darmstadt, D)
- *MES SDS Runningbuffer* (20x) Novex Life Technologies (Carlsbad, USA)
- M-MLV RT Invitrogen (Karlsruhe, D)
- Natriumacetat (C₂H₃NaO₂) Merck (Darmstadt, D)
- Natriumchlorid (NaCl) VWR (Leuven, B)
- di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) Merck (Darmstadt, D)
- Nickelchlorid (NiCl₂) Carl Roth (Karlsruhe, D)
- Oil Red O, O 0625 Sigma (Steinheim, D)
- Paraformaldehyd Sigma (Steinheim, D)
- Perjodsäure, 77312 Fluka (Sigma Aldrich) (Steinheim, D)
- *Phalloidin-tetramethylrhodamine B isothiocyanate* (Phalloidin-TRITC), P1951 Sigma Aldrich (Steinheim, D)
- *Primer-Random* Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
- *Protease Inhibitor Cocktail Tablets "cOmplete", EDTA-free* Roche (Grenzach-Wyhlen, D)
- Protein Standard Novex® Sharp, LC5800 Invitrogen (Karlsruhe, D)
- *RNAlater® Solution* Life Technologies (Darmstadt, D)
- *RNAasin Ribonuclease Inhibitor* Promega (Mannheim, D)
- Roti-Histokitt Carl Roth (Karlsruhe, D)
- Salzsäure (HCl), 1N Merck (Darmstadt, D)
- Schiffs Reagenz Merck (Darmstadt, D)
- SDS (*Dodecylsulfate-Na-Salt Pellets*) Serva (Heidelberg, D)
- Buprenorphinhydrochlorid (Temgesic®) Reckitt Benckiser Healthcare (Mannheim, D)
- Trypanblau Gibco (Karlsruhe, D)
- Tissue Tek® Sakura Finetek Europe B.V. (Alphen aan den Rijn, NL)
- Tris MP Biomedicals (Illkirch-Graffenstaden, F)
- Triton® X-100, T9284 Sigma (Steinheim, D)
- Tween® 20, P137-9 Sigma Aldrich (Steinheim, D)

Material

- Xylazin 2% Medistat (Ascheberg, D)
- Xylol Fischar (Saarbrücken, D)

2.5 Puffer, Lösungen und Medien

2.5.1 Puffer

- BCIP-Puffer
 - 0,1 M Tris-HCl
 - 0,1 M NaCl
 - 5mM MgCl₂
 - pH-Wert auf 9,5 einstellen
- Laufpuffer für SDS-PAGE
 - 30 ml MES SDS Running Buffer (20x)
 - 570 ml Aqua dest.
- PBS (*phosphate buffered saline*) (4x Stock) für Immunhistochemie / Immunfluoreszenz
 - 23,68 g Na₂HPO₄
 - 6,88 g KH₂PO₄
 - 115,2 g NaCl
 - 4 L Aqua dest.
 - pH-Wert mit NaOH auf 7,2 einstellen
- Probenpuffer für SDS-PAGE (reduzierend, 4x)
 - 1 ml β-Mercaptoethanol
 - 40 µl 0,5 M EDTA-Lösung
 - 200 µl 1%iges Bromphenolblau
 - 2 ml 10%iges SDS
 - 2,4 ml 0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (= „Stacking buffer“, 4x)
 - 2,4 ml Aqua dest.

Material

- Protein-Lyse-Puffer
 - 6 g HEPES, pH 7,5
 - 4,38 g NaCl
 - 0,152 g MgCl₂
 - 0,190 g EGTA
 - 50 ml 10%iges Glyzerin
 - 5 ml 1%iges Triton X-100
 - 500 ml Aqua dest.
 - pH-Wert auf 7,0 einstellen.

- *Stripping buffer* für Westernblot
 - 1,5 g Glycin
 - 0,1 g SDS
 - 1 ml Tween-20
 - 199 ml Aqua dest.
 - pH-Wert mit HCl auf 2,2 einstellen.

- Transferpuffer für Westernblot
 - 3,03 g Tris
 - 14,4 g Glycin
 - 200 ml Methanol
 - 800 ml Aqua dest.

- Tris Puffer (10x Stock), pH 7,6
 - 61 g Tris
 - 116,9 g NaCl
 - 500 ml Aqua dest.
 - pH-Wert mit HCl auf 7,6 einstellen.

- TTBS (*Tris buffered saline*)
 - 60 ml 5 M NaCl
 - 20 ml 1 M Tris, pH 8
 - 1 ml Tween-20
 - 2 L Aqua dest.

- Zitrat/Natriumphosphat-Puffer
 - 2,1 g C₆H₈O₇
 - 3,6 g Na₂HPO₄
 - pH-Wert auf 6 einstellen.

Material

2.5.2 Lösungen

- DAB-Stocklösung für Immunhistochemie
 - 5 g DAB
 - 132 ml Tris-Puffer (1x, pH 7,6)
- Eosin-Arbeitslösung zur Gegenfärbung von Histologien und Zellen
 - 10 g Eosin
 - 1 L Aqua dest
- Methacarn zur Gewebefixierung
 - 600 ml Methanol
 - 300 ml Chloroform
 - 100 ml 100%ige Essigsäure
- Methylgrün-Arbeitslösung für histologische Färbungen
 - 20 g Methylgrün
 - 735 ml 0,1 M Essigsäure
 - 265 ml 0,1 M Na-Acetat
- Nickelchlorid-Arbeitslösung für Immunhistochemie
 - 2 g NiCl₂
 - 25 ml Aqua dest.
- Oil Red O-Färbelösung
 - 2,25 g Oil Red O
 - 75 ml Isopropanol
 - 50 ml Aqua dest.
- X-Gal-Färbelösung
 - 500 µl 100 mM K₃Fe(CN)₆
 - 500 µl 100 mM K₄Fe(CN)₆
 - 4 ml 100 mM Zitrat/Natriumphosphat-Puffer
 - 300 µl 5 M NaCl
 - 20 µl 1 M MgCl₂
 - 500 µl 2%ige x-Gal-Lösung (in N,N-Dimethylformamid)
 - 4,18 ml Aqua dest.

Material

2.5.3 Zellkultur

- *Cell Dissociation Buffer*, steril Gibco (Karlsruhe, D)
- HEPES, steril, CC-5022 Lonza (Walkersville, USA)
- PBS, steril, 10010 Gibco (Karlsruhe, D)
- TNS, steril, CC-5002 Lonza (Walkersville, USA)
- Trypsin/EDTA, steril, CC-5012 Lonza (Walkersville, USA)
- Trypsin/EDTA, steril, 25200 Gibco (Karlsruhe, D)

- MSC Vollmedium

| | Volumen | Endkonzentration | |
|----------------------------------|---------|------------------|----------------------|
| DMEM- <i>low glucose</i> , 31885 | 500 ml | | Gibco (Karlsruhe, D) |
| FKS, 10099-141 | 50 ml | 10% | Gibco (Karlsruhe, D) |
| L-Glutamin, 25030-081 | 5 ml | 2 mM | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Penicillin, 15140 | 2,5 ml | 100 U/ml | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Streptomycin, 15140 | 2,5 ml | 100 µg/ml | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Amphotericin B | 5 ml | 2.5 µg/ml | PAA (Pasching, AU) |

- Adipogenes Differenzierungsmedium

| | Volumen | Endkonzentration | |
|------------------------------------|---|------------------|----------------------|
| DMEM- <i>low glucose</i> , 31885 | 500 ml | | Gibco (Karlsruhe, D) |
| FKS, 10099-141 | 50 ml | 10% | Gibco (Karlsruhe, D) |
| L-Glutamin, 25030-081 | 5 ml | 2 mM | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Penicillin, 15140 | 2,5 ml | 100 U/ml | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Streptomycin, 15140 | 2,5 ml | 100 µg/ml | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Amphotericin B | 5 ml | 2.5 µg/ml | PAA (Pasching, AU) |
| Dexamethason, D2915 | 1 mM Stock: 6,04 g in 1 ml DMEM | 1 µM | Sigma (Steinheim, D) |
| Indomethacin, I7378 | 100 mM Stock: 71,56 mg in 2 ml DMSO | 0,2 mM | Sigma (Steinheim, D) |
| Insulin, I5500 | Stock: 1 mg in 1 ml DMEM | 0,01 mg | Sigma (Steinheim, D) |
| 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin, I5879 | Stock: 11,11 mg in 10 ml DMEM | 0,05 mM | Sigma (Steinheim, D) |

Material

- Adipogenes Erhaltungsmedium

| | Volumen | Endkonzentration | |
|----------------------------------|--------------------------|------------------|----------------------|
| DMEM- <i>low glucose</i> , 31885 | 500 ml | | Gibco (Karlsruhe, D) |
| FKS, 10099-141 | 50 ml | 10% | Gibco (Karlsruhe, D) |
| L-Glutamin, 25030-081 | 5 ml | 2 mM | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Penicillin, 15140 | 2,5 ml | 100 U/ml | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Streptomycin, 15140 | 2,5 ml | 100 µg/ml | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Amphotericin B | 5 ml | 2.5 µg/ml | PAA (Pasching, AU) |
| Insulin, I5500 | Stock: 1 mg in 1 ml DMEM | 0,01 mg | Sigma (Steinheim, D) |

- Osteogenes Differenzierungsmedium

| | Menge | Endkonzentration | |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------|----------------------|
| DMEM- <i>low glucose</i> , 31885 | 500 ml | | Gibco (Karlsruhe, D) |
| FKS, 10099-141 | 50 ml | 10% | Gibco (Karlsruhe, D) |
| L-Glutamin, 25030-081 | 5 ml | 2 mM | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Penicillin, 15140 | 2,5 ml | 100 U/ml | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Streptomycin, 15140 | 2,5 ml | 100 µg/ml | Gibco (Karlsruhe, D) |
| Amphotericin B | 5 ml | 2.5 µg/ml | PAA (Pasching, AU) |
| Dexamethason, D2915 | 1 mM Stock: 6,04 g in 1 ml DMEM | 100 nM | Sigma (Steinheim, D) |
| Natrium-β-Glycerophosphat, G6251 | 1 M Stock: 320mg/ml | 10 mM | Sigma (Steinheim, D) |
| L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, A8960 | 5 mM Stock: 12,81 mg in 10 ml DMEM | 0,05 mM | Sigma (Steinheim, D) |

- NRK-Vollmedium

| | Volumen | Endkonzentration | |
|----------------------------------|---------|------------------|----------------------|
| DMEM- <i>low glucose</i> , 31885 | 500 ml | | Gibco (Karlsruhe, D) |
| FKS, 10099-141 | 25 ml | 5% | Gibco (Karlsruhe, D) |

2.6 Antikörper

2.6.1 Immunzytochemie

Primärantikörper

- biotinyliertes Ratte-anti-Maus CD31 IgG (Klon MEC 13.3), 553371 BD Biosciences (Heidelberg, D)
- Human-anti-Maus CD34 IgG (Klon ICO115), SC-7324 Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
- Maus-anti-Ratte CD44 IgG (Klon OX-50), MCA643 AbD Serotec (Puchheim, D)
- Ziege-anti-Maus CD45 IgG (polyklonal), SC-1121 Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
- Maus-anti-Ratte CD73 IgG (Klon 5F/B9), 551123 BD Biosciences (Heidelberg, D)
- Maus-anti-Ratte CD90 IgG (Klon OX-7) Mediagnost (Reutlingen, D)

Sekundärantikörper

- biotinyliertes Pferd-anti-Maus IgG, BA-2001 Vector Laboratories (Burlingame, USA)
- biotinyliertes Kaninchen-anti-Ziege IgG, BA-5000 Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.6.2 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Primärantikörper

- Maus-anti-Human α -SMA IgG (Klon 1A4), MO85101-2 Dako (Hamburg, D)
- Ziege-anti-Human CD24 IgG (polyklonal), SC-7034 Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
- Maus-anti-Human CD68 IgG (Klon ED1), MCA341R Dako (Hamburg, D)
- Kaninchen-anti-Humane plazentale alkaline Phosphatase IgG (polyklonal), AHP537 AbD Serotec (Puchheim, D)
- Ziege-anti-Human Kollagen I IgG (polyklonal), 1310-01 Southern Biotec/Biozol (Eiching, D)
- Ziege-anti-Human Kollagen IV IgG (polyklonal), 1340-01 Southern Biotec/Biozol (Eiching, D)

Material

Sekundärantikörper

- biotinyliertes Pferd-anti-Maus IgG, BA-2001 Vector Laboratories (Burlingame, USA)
- biotinyliertes Kaninchen-anti-Ziege IgG, BA-5000 Vector Laboratories (Burlingame, USA)
- biotinyliertes Ziege-anti-Kaninchen IgG, BA-1000 Vector Laboratories (Burlingame, USA)
- Cy2-markiertes Kaninchen-anti-Maus IgG Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. (Newmarket, UK)
- Alexa546-markiertes Esel-anti-Ziege IgG, A11056 Invitrogen (Karlsruhe, D)

2.6.3 Westernblot

Primärantikörper

- Maus-anti-Aktin IgG (monoclonal), SC-8432 Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
- Maus-anti-GAPDH IgG (monoclonal), SC-32233 Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)

Sekundärantikörper

- HP-konjugiertes Pferd-anti-Maus IgG, PI-2000 Vector Laboratories (Burlingame, USA)

2.7 Primer und Sonden

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma *Life Technologies* (Darmstadt, D) bezogen.

| Gen | <i>forward Primer</i> | <i>reverse Primer</i> | TaqMan Sonde |
|---------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|
| Adiponektin | 5'-GGGATTACTGCAACCGAAGG-3' | 5'-CCATCCAACCTGCACAAGTTT-3' | --- |
| Cbfa1 | 5'-TGCAACAAGACCCTGCCC-3' | 5'-ACGGTCCCATCGGGTACC-3' | --- |
| Kollagen I α I | 5'-GAAGGCAACAGTCGATTCACC-3' | 5'-GACTGTCTTGCCCCAAGTTCC-3' | --- |
| Kollagen III α I | 5'-GAAGGCAACAGTCGATTCACC-3' | 5'-TCCCGAGTCGCAGACACATA-3' | 5'-TGACATGGTTCTGGCTTC CAGACATCTCTAG-3' |
| Gapdh | 5'-ACAAGATGGTGAAGGTCGGTG-3' | 5'-AGAAGGCAGCCCTGGTAACC-3' | 5'-CGGATTTGGCCGTAT CGGACGC-3' |

Material

| Gen | <i>forward Primer</i> | <i>reverse Primer</i> | TaqMan Sonde |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---|
| Lipoprotein lipase | 5'-GTACAGTCTTGGAGCCCATGC-3' | 5'-GCCAGTAATTCTATTGACCTTCTTGTT-3' | --- |
| Osteocalcin (BGLAP) | 5'-TGAGCTCAACCCCAATTGTG-3' | 5'-GCGCTTGTAGGCGTCTG-3' | --- |
| Osteopontin | 5'-CGGCCTTGCCTCCTGTCT-3' | 5'-AATGCGCCTTCTCCTCTGAG-3' | --- |
| PDGF-A | 5'-TTCTTGATCTGGCCCCCAT-3' | 5'-TTGACGCTGCTGGTGTTACAG-3' | 5'-CAGTGCAGCGCTTCACCTCCACA-3' |
| PDGF-B | 5'-GCAAGACGCGTACAGAGGTG-3' | 5'-GAAGTTGGCATTGGTGCGA-3' | 5'-TCCAGATCTCGCGGAACCTCATCG-3' |
| PDGF-C | 5'-CAGCAAGTTGCAGCTCTCCA-3' | 5'-GACAACCTCTCTCATGCCGGG-3' | 5'-CGACAAGGAGCAGAA CGGAGTGCAA-3' |
| PDGF-D | 5'-ATCGGGACACTTTTGCGACT-3' | 5'-GTGCTGTACCCGAATGTT-3' | 5'-TTGCGCAATGCCAACCTCAGGAG-3' |
| PDGFR- α | 5'-GCCACGAAAGAGGTCAAGGA-3' | 5'-GCCTGATCTGGACGAAGCC-3' | 5'-TGAAGACAGTCACCATTTC TGTTACAGAGAA-3' |
| PDGFR- β | 5'-AATGACCACGGCGATGAGA-3' | 5'-TCTCCAGTGTTCAGCAGC-3' | 5'-CATCAACGTTACTGTGATC GAAAATGGCTATG-3' |
| PPAR- γ | 5'-CATACATAAAGTCCTTCCCGCTG-3' | 5'-TTGTCTGTTGTCTTCTCCTGTCAAGA-3' | --- |

2.8 Assays & Kits

- *1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA Kit, AC-62F1* Immunodiagnostic systems (Frankfurt am Main, D)
- *96-Well Cellular Senescence-Assay Kit, CBA-231* Cell Biolabs (San Diego, USA)
- *BCA Protein Assay Kit, 23225* Pierce, Thermo Scientific (Rockford, USA)
- *Invitrap® Spin Cell RNA Mini Kit, 1061100300* Stratec (Berlin, D)
- *Nephrot r Albumin direct Competitive ELISA, NR002* Exocell (Philadelphia, USA)
- *Quantikine Mouse/Rat/Porcine/Canine TGF-beta 1 ELISA Kit, MB100B* R&D Systems (Minneapolis, USA)
- *PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit, PKH26GL* Sigma-Aldrich (Saint Louis, USA)

Material

- *Proteome Profiler™ Rat Cytokine Array Kit*, ARY008 R&D Systems (Minneapolis, USA)
- *Rat Intact PTH ELISA Kit*, 60-2500 Immotopics (San Clemente, USA)
- *Sircol™ Soluble Collagen Assay* S1000 Biocolor life science assays (Carrickfergus, UK)

2.9 Software

- 7300 Systems SDS v1.4 (zur RT-qPCR) Applied Biosystems (Foster City, USA)
- Adobe Photoshop PS2 (zur Bildbearbeitung) Adobe Systems GmbH (München, D)
- Graph Pad Prism (zur Diagrammerstellung) GraphPad Software, Inc. (La Jolla, USA)
- Image J (zur quantitativen Bildauswertung) *public domain open source software*, entwickelt von Wayne Rasband am Research Services Branch, National Institute of Mental Health (Bethesda, USA)
- Keyence BZ II Viewer (Bildaufnahmesoftware am Mikroskop) Keyence (Neu-Isenburg, D)
- Keyence BZ II Analyzer (zur Bildbearbeitung) Keyence (Neu-Isenburg, D)
- Magellan Version 6 (für ELISA-Reader) Tecan (Mainz, D)
- Office 2007 (Excel, Word, PowerPoint) Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim, D)
- AnalySIS Pro (Bildaufnahmesoftware am Mikroskop) Olympus (Hamburg, D)
- Optima Software Version 2.20 (für *Fluorescence-Plate-Reader*) BMG Labtech (Offenburg, D)
- Statistiksoftware IBM SPSS Statistics PASW18 (*Predictive Analysis SoftWare*) (für statistische Analysen) IBM Deutschland GmbH (Ehningen, D)

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Isolation und Kultur mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark von Ratten

Mesenchymale Stammzellen (MSC) wurden aus dem Mark der langen Röhrenknochen des Hinterlaufs (Femur und Tibia) isoliert und in 75 cm² Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Brutschrank kultiviert.

Als Zellsender dienten männliche Fisher 344 (F344) Ratten, mit einem Gewicht zwischen 180 und 210 g. Die Ratten wurden, nach entsprechender Quarantäne im Falle eines Importes, inhalativ durch eine Überdosis Isofluran und anschließenden Genickbruch getötet und danach in Hospisept desinfiziert. Die Hinterläufe wurden vom Körper abgetrennt und die Femura sowie die Tibiae freipräpariert. Die vier Röhrenknochen wurden zuerst in Ethanol desinfiziert, dann in PBS gewaschen und anschließend in MSC-Vollmedium (DMEM-*low glucose* mit L-Glutamin ergänzt mit 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B) gegeben. Die Knochen wurden unter sterilen Bedingungen an den Metaphysen knappkantig mit einer medizinischen Zange eröffnet und der Markraum mit MSC-Vollmedium ausgespült. Das eluierte Mark wurde aufgefangen und mehrmals langsam durch eine 21G Nadel aufgenommen bzw. entleert, bis alle größeren Zellaggregate mechanisch, soweit mit bloßem Auge sichtbar, vereinzelt waren. Es erfolgte eine Zentrifugation der Suspension bei 1200 rpm und 4 °C für 5 min. Anschließend wurde das Zellpellet in 12 ml frischem MSC-Vollmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät (= Passage 0). Nach 24 Std. konnten tote, nicht adhärenente sowie schwimmende hämatopoetische Zellen durch Wechsel des Mediums aus der Primärkultur entfernt werden. Die adhärenenten Zellen wurden mit PBS gewaschen und in MSC-Vollmedium weiter kultiviert. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage erneuert.

Sobald die MSC eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten, wurden sie im Verhältnis 1:3 passagiert. Dafür wurde nach einem Waschschrift in 4 ml HEPES-Puffer 2 ml Trypsin/EDTA (0,05/0,02%ig in PBS) auf die adhärenenten Zellen gegeben. Nach 2-5 minütiger Inkubation im Brutschrank (37 °C; 5% CO₂) konnte die Trypsinaktivität mit 4 ml TNS (engl. *trypsin neutralizing solution*) neutralisiert und die Zellen durch vorsichtiges Anspülen mit einer Pipette abgelöst werden. Die MSC-Suspension wurde zentrifugiert (1200 rpm, 4 °C, 5 min), das Pellet in frischem Vollmedium sorgfältig resuspendiert und in drei neuen Zellkulturflaschen herangezogen (= Passage 1). Ein 100 µl Aliquot der Suspension wurde

Methoden

1:100 in *CASY ton* verdünnt und die Zellzahl sowie die mittlere Zellgröße mithilfe eines Multiparameter Zellzählers bestimmt.

3.1.2 Adipogene und osteogene Differenzierung von primären MSC

Um die Differenzierungskapazität von MSC aus verschiedenen Spendertieren (gesund und urämisch) zu testen, wurden die Zellen in verschiedenen Medien kultiviert, deren Zusätze adipogene bzw. osteogene Differenzierung induzieren.

3.1.2.1 Induktion adipogener Differenzierung

MSC wurden in Passage 3 expandiert bis sie eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten. Um eine Fettdifferenzierung anzuregen, wurden die Zellen anschließend für 4 Tage in adipogenem Differenzierungsmedium (DMEM-*high glucose* mit L-Glutamin ergänzt mit 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B, 1 µM Dexamethason, 0,2 mM Indomethacin, 0,02 µg/ml Insulin, 0,05 mM 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin) kultiviert, welches anschließend für 3 Tage durch adipogenes Erhaltungsmedium (DMEM-*high glucose* mit L-Glutamin ergänzt mit 10% FKS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B, 0,02 µg/ml Insulin) ersetzt wurde. Dieser Medienwechsel wurde dreimal wiederholt, so dass die Zellen innerhalb von 21 Tagen dreimal mit adipogenem Induktionsmedium stimuliert wurden. Im Anschluss erfolgte der Nachweis der Lipidvakuolisierung mittels Oil Red O-Färbung (siehe Abschnitt 3.1.5.2).

3.1.2.2 Induktion osteogener Differenzierung

MSC wurden in Passage 3 kultiviert bis sie eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten. Zur Induktion einer osteogenen Differenzierung wurden die Zellen anschließend 21 Tage mit osteogenem Induktionsmedium (MSC-Vollmedium mit 100 nM Dexamethason, 10 mM Natrium-β-Glycerophosphat, 0,05 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat) versorgt. Mittels Alizarin Rot Färbung wurden Kalziumablagerungen in differenzierten Zellen nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.1.5.3).

3.1.3 Verdopplungszeit der Zellpopulation

In Passage 2 wurde die Proliferationskapazität der MSC analysiert.

Dazu wurden MSC in 12-Well-Platten in einer Dichte von 40.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach 24, 48, 72 und 96 Std wurden die MSC in jeweils 3 Wells separat abtrypsinisiert, zentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach einer weiteren 1:100 Verdünnung in *CASY ton* erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels automatischem Zellzähler. Aus den Dreifachansätzen wurde für jeden der vier Zeitpunkte eine durchschnittliche Zellzahl ermittelt. Mithilfe der Gleichung:

$$z(t) = z(0) \cdot e^{x \cdot t}$$

[mit $z(t)$ = gemessene Zellzahl zum Zeitpunkt t ; $z(0)$ = errechnete Zellzahl zum Zeitpunkt 0; x = Wachstumsrate (entspricht der Anzahl der Verdopplungen pro Zeiteinheit)]

und der Plattform www.doubling-time.com konnte somit für jede MSC-Präparation diejenige Zeitspanne berechnet werden, die für eine Verdopplung der Population benötigt wurde ⁷⁸.

3.1.4 Stimulation von Fibroblasten mit konditioniertem MSC-Medium

Um zu untersuchen, ob und inwieweit verschiedene MSC die Matrixproduktion von Fibroblasten beeinflussen können, wurde die Ratten-Fibroblasten-Zelllinie NRK49-F mit konditionierten MSC-Überständen verschiedener Spendertiere stimuliert.

Konfluente NRK49-F-Zellen der Passage 9 (NRK-Vollmedium: DMEM-*low glucose*, 5% FKS) wurden trypsinisiert und in einer Dichte von ca. 40% in 6-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Std wurde das Vollmedium durch Hungermedium (RPMI + 100 IU/ml Penicillin, 100 ug/ml Streptomycin) ersetzt und die Zellen für weitere 72 Std kultiviert. Anschließend erfolgte eine Stimulation von je zwei Wells mit konditionierten MSC-Überständen. Die Überstände waren von konfluenten MSC-Kulturen unter definierten Bedingungen geerntet und bei -20 °C aufbewahrt worden. Es wurden folgende Ansätze vorbereitet:

1. Medium von gesunden MSC, 3 Spender
2. Medium von CKDmod-RK MSC, 3 Spender („RK“ für engl. *remnant kidney*, "mod" für engl. *moderate*: Serum-Harnstoff bei Kill: 13,3; 12,6 und 13,9 mmol/L)
3. Medium von CKDsev-RK MSC, 3 Spender ("sev" für engl. *severe*: Serum-Harnstoff bei Kill: 43,8; 43,4 und 18 mmol/L)

Nach 24-stündiger Stimulation wurden die NRK-Zellen geerntet, ihre RNA präpariert und die mRNA-Expression von Kollagen I und III mittels RT-qPCR (siehe Abschnitt 3.4.3) bestimmt.

3.1.5 Zellfärbungen

3.1.5.1 Enzymatische Seneszenz-Färbung

Die sog. Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase (engl. *senescence-associated- β -galactosidase*; Sa- β -gal) kann zum Nachweis von seneszenten Zellen genutzt werden⁷⁹. Tatsächlich handelt es sich jedoch nicht um ein spezielles Protein, sondern um die endogene lysosomale β -Galaktosidase, welche in seneszenten Zellen akkumuliert und einfach mittels enzymatischer Reaktion nachgewiesen werden kann⁸⁰. Sie setzt bei einem sauren pH-Wert (ca. 6) das Substrat x-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) um und eines der entstehenden Produkte fällt als blaues 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo aus.

MSC wurden in Passage 2 und 3 auf Kammerdeckgläsern oder Deckgläsern kultiviert bis sie eine Konfluenz von ca. 80% erreicht hatten. Dann wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und 10 Min in 0,5%igem Glutaraldehyd fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Zellen bei 37 °C für 6 Std mit einer frisch angesetzten Färbelösung bestehend aus 0,1% x-Gal-Lösung (in N,N-Dimethylformamid), 40 mM Zitrat / Natriumphosphat-Puffer pH 6, 5 mM Kaliumferrozyanid, 5 mM Kaliumferrizyanid, 150 mM NaCl und 2 mM MgCl₂ inkubiert. Anschließend wurden die MSC in PBS gewaschen und mit Eosin gegengefärbt. Nach der Entwässerung der gefärbten Zellen in aufsteigender Ethanolreihe und Xylol wurden die Proben mit Histokitt eingedeckt.

3.1.5.2 Oil Red O-Färbung

Bei Oil Red O handelt es sich um einen Azofarbstoff, welcher Triacylglyceride rötlich anfärbt. Die Oil Red O-Färbung diente in der vorliegenden Arbeit dem Nachweis von Lipiden bei induzierter und spontaner adipogener Fettdifferenzierung von MSC.

Dazu wurden diese in Passage 2 und 3 auf Kammerdeckgläsern oder Deckgläsern mit normalem MSC-Medium oder adipogenem Induktionsmedium kultiviert (siehe auch Abschnitt 3.1.2.1). Anschließend wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen und 10 Min in 4%igem Formalin fixiert. Darauf folgte ein Waschschrift in A. dest. und ein 5-sekündiges Spülen in 60%igem Isopropanol. Anschließend wurden die Zellen ca. 20 Min in einer Oil Red O-Lösung (2,25 g Oil Red O, 75 ml Isopropanol, 50 ml A. dest.) gefärbt. Nach kurzer Differenzierung in 60%igem Isopropanol wurden die Zellen 5 Min in Leitungswasser gespült, mit Hämatoxylin gegengefärbt und mit Immu-Mount eingedeckt.

Methoden

3.1.5.3 Alizarin Rot-Färbung

Alizarin bildet mit zweiwertigen Kationen, z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} usw., farbige Chelatverbindungen. Die Alizarin Rot-Färbung wurde zur Detektion von Kalzium bei osteogener Differenzierung von MSC eingesetzt. Die Zellen produzieren im Laufe der Knochendifferenzierung extrazelluläre Matrixproteine, in die Kalziumphosphat eingelagert wird.

Dazu wurden MSC zunächst auf Deckgläsern in osteogenem Induktionsmedium kultiviert (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und sofort mit eiskaltem 70%igem Ethanol für 1 Std fixiert. Nach drei Waschschritten in A. dest. wurden die Zellen für 10 Min in einer Alizarin-Färbelösung (40 mM Alizarin Rot in A. dest., pH 4,1) geschwenkt. Nach erneutem Waschen in PBS und A. dest. wurden die Zellen frisch fotografiert und anschließend mit Immu-Mount eingedeckt.

3.1.5.4 Phalloidin-Färbung

Phalloidin ist ein Phallotoxin und kann aufgrund seiner hohen Affinität zu F-Aktin zur Abbildung des Aktin-Zytoskeletts eingesetzt werden, wenn es mit einem Farbstoff gekoppelt ist. In dieser Arbeit wurde so die Morphologie gesunder und urämischer MSC dargestellt.

Nach einem PBS-Waschschritt der auf Deckgläsern ausgesäten und kultivierten MSC erfolgte die Fixierung mit 70%igem Ethanol. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gespült und für 30 Min mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin (Phalloidin-TRITC 1:100 in 1% BSA/PBS) inkubiert. Danach wurden die Zellkerne für 10 Min mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; 1 µg/ml in PBS) gegengefärbt, die MSC zweimal mit PBS gewaschen und mit Immu-Mount eingedeckt.

3.1.5.5 Immunzytochemie

Um zu überprüfen, ob die isolierten Knochenmarkszellen das typische MSC-Marker-Profil aufwiesen, wurde die Expression verschiedener Oberflächenantigene mittels Immunzytochemie nachgewiesen.

Dafür wurden MSC auf Kammerdeckgläsern kultiviert, bei ca. 80% Konfluenz zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit Aceton für 10 Min fixiert und getrocknet. Alternativ wurden Cytospins mit je ca. 50.000 MSC / Objektträger angefertigt, 10 Min mit Aceton fixiert und getrocknet.

Die fixierten und getrockneten Zellen wurden mit PBS gewaschen und es erfolgte ein Blockierungsschritt der endogenen Peroxidasen in 3%iger H_2O_2 Lösung für 10 Min. Nach

Methoden

zwei weiteren Waschschritten in PBS wurden die Zellen mit den jeweiligen Primärantikörpern in entsprechender ausgetesteter Verdünnung (siehe Tabelle 3.1.5.5) in 1% BSA/PBS für 1 Std bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Negativkontrollen wurden stattdessen mit unspezifischem IgG der gleichen Wirtsspezies in gleicher Konzentration behandelt. Danach wurden die Zellen zweimal 5 Min in PBS gespült und anschließend mit dem jeweiligen biotinylierten Sekundärantikörper (verdünnt 1:300 in 1% BSA/PBS) für 30 Min inkubiert. Darauffolgend wurde ein Avidin/Biotin-Komplex (engl. *avidin-biotin complex*, ABC), welcher Avidin und biotinylierte Meerrettichperoxidase beinhaltet, aufgetragen und die Objektträger in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Min inkubiert. Avidin hat eine hohe Affinität zu Biotin, für welches es vier Bindungsstellen aufweist. Auf diese Weise binden an den biotinylierten Sekundärantikörper größere Avidin-Biotin-Komplexe mit mehreren Peroxidasemolekülen, was zu einer Signalverstärkung an einzelnen Epitopen führt. Nach zwei PBS-Waschschritten wurden die Zellen in eine 3,3'-Diaminobenzidin(DAB)-Arbeitslösung (bestehend aus 175 ml Tris pH 7,6; 1 ml 8%igem Nickelchlorid; 0,1 ml 30%igem H₂O₂, 5 ml DAB) getaucht und bis zur gewünschten Farbtintensität bei 37 °C inkubiert (maximal 10 Min). Dabei setzt die Peroxidase das H₂O₂-Substrat um und freiwerdende Protonen oxidieren das Chromogen DAB zu einem braunen Endprodukt, welches im Bereich der Epitope mit gebundenem Antikörper präzipitiert. Die Reaktion wurde in H₂O abgestoppt und die Zellen anschließend mit Methylgrün gegengefärbt. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (1 x 70%iger Ethanol, 2 x 95%iger Ethanol, 3 x 100%iger Ethanol, 3 x Xylol) wurden die Zellen mit Histokitt eingedeckt.

Tabelle 3.1.5.5: Verwendete Antikörper gegen CD-Antigene für Immunzytochemie an MSC.

| Antigen | Primärantikörper | Verdünnung in BSA/PBS | Sekundärantikörper alle 1:300 in BSA/PBS |
|---------|--|--------------------------|---|
| CD31 | monoklonal, biotinyliert, Ratte-anti-Maus | 1:100 | - |
| CD34 | monoklonal, Maus-anti-Human | 1:100 | Pferd-anti-Maus (biotinyliert) |
| CD44 | monoklonal, Maus-anti-Ratte | 1:500 | Pferd-anti-Maus (biotinyliert) |
| CD45 | polyklonal, Ziege-anti-Maus | 1:200 | Kaninchen-anti-Ziege (biotinyliert) |
| CD73 | monoklonal, Maus-anti-Ratte | 1:200 | Pferd-anti-Maus (biotinyliert) |
| CD90 | monoklonal, Maus-anti-Ratte | 1:100 | Pferd-anti-Maus (biotinyliert) |

3.1.6 Herstellung von Proteinlysaten aus kultivierten MSC

Um die Proteinexpression von MSC zu analysieren, wurden Proteinproben aus kultivierten Zellen asserviert. Dazu wurde von ca. 90% konfluenten MSC-Kulturen das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche mit 700 µl Lysepuffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% Glycerin, 1% Triton X-100), dem ein Protease- / Phosphatase-Inhibitor Cocktail im Verhältnis 1:100 zugesetzt wurde (7 µl Inhibitor + 693 µl Puffer), lysiert und die Zelltrümmer mittels Gummischaber vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Um größere Zelltrümmer zu zerkleinern, wurde das Lysat anschließend dreimal für 10 Sek im Ultraschallbad behandelt und danach 15 Min im Überkopfschüttler inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 14 000 rpm für 15 Min, der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Messung der Proteinkonzentration (siehe Abschnitt 3.3.1) bei –80 °C gelagert.

3.2 Tierexperimentelle Methoden

In allen Versuchen wurden Ratten des Stammes Fisher 344 (F344) eingesetzt. Die Tiere wurden im Institut für Versuchstierkunde der RWTH Aachen unter standardisierten Bedingungen (12 Std Hell-Dunkel-Zyklus, 22 ± 1 °C Raumtemperatur, 50 ± 10% Luftfeuchtigkeit, freier Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter) gehalten und einem regelmäßigen Gesundheits-Monitoring unterzogen. Alle Protokolle entsprachen den Empfehlungen der GV-SOLAS und den Vorgaben des LANUV NRW.

3.2.1 5/6 Nephrektomie

Im Modell der 5/6 Nephrektomie („5/6 Nx“, oder engl. *remnant kidney* „RK“) wird die Nierenmasse operativ sehr stark reduziert, was eine Hyperfiltration bei den verbleibenden Glomeruli bedingt. Die Tiere entwickeln eine progrediente Niereninsuffizienz mit intraglomerulärer und systemischer Hypertonie, Proteinurie, Glomerulosklerose sowie tubulointerstitieller Fibrose (siehe Abbildung 3.2.1).

Um die Tiere zu entlasten, wurde die Reduktion der Nierenmasse auf zwei Eingriffe im Abstand von 7 Tagen verteilt. Diese Operationen wurden gemeinsam mit Frau PD Dr. med Uta Kunter durchgeführt. In der ersten Operation wurden männliche F344 Ratten mit einem

Methoden

Gewicht von 150-180 g narkotisiert (durch i.p. Injektion von 10%igem Ketamin und 2%igem Xylazin im Verhältnis 5:1, ca. 1 ml/kg KG = (90 mg/kg KG + 10 mg/kg KG)). Die rechte Flanke wurde rasiert und desinfiziert. Über einen kleinen Flankenschnitt wurde die rechte Niere dargestellt und die Arteria und Vena renalis sowie der Ureter mit einem Faden *en-bloc* ligiert (Faden 5-0 geflochten). Die Nierenkapsel wurde eröffnet und die Niere herausgeschnitten. Die Nierenkapsel, die Nebenniere sowie der durch die Ligatur verschlossene Ureter wurden belassen. Anschließend wurde die Wunde in einer zweischichtigen Naht verschlossen (Faden 2-0 geflochten). Als Analgetikum wurde Temgesic (0,1 mg/kg KG) alle 12 Std für 3 Tage post-OP s.c. injiziert.

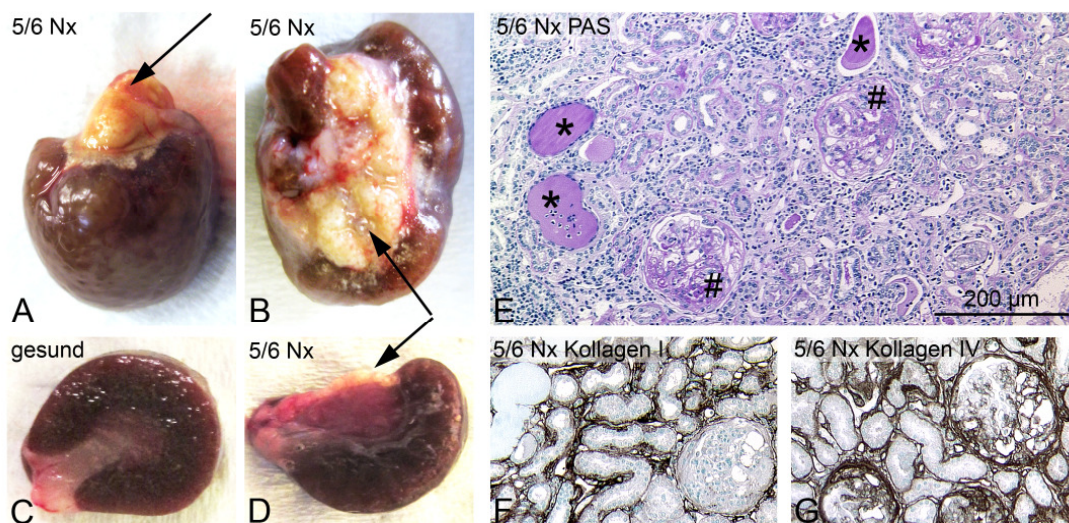


Abbildung 3.2.1: Nieren 5/6 nephrektomierter F344 Ratten ca. 20 Wochen post-OP.

Fotos A und B zeigen Übersichtsfotos von Nieren 5/6 nephrektomierter Ratten. Die Gewebereiche, deren Versorgung durch Kautern der Arterien unterbrochen wurde, sind nur noch als verkalkte Überreste zu erkennen (Pfeile). Gleichzeitig wird deutlich, dass bei diesem Eingriff die Nierenmasse nicht immer auf ein exakt gleiches Maß reduziert werden kann. Fotos C und D zeigen Querschnitte von gesunder und 5/6 Niere im Vergleich. Der 5/6 Querschnitt demonstriert, dass das Nierenkortexgewebe hier auf die Hälfte reduziert ist (also insgesamt eine "3/4" Nephrektomie). In Teil E ist eine histologische Übersicht einer 5/6 Niere in PAS-Färbung zu sehen. Zeichen eines chronischen Nierenschadens sind sklerotische Glomeruli (#), dilatierte und nekrotische Tubuli mit Proteineinlagerung (*) und eine massive Infiltration von Immunzellen. Matrixdeposition, z.B. in Form von Kollagen I im Tubulointerstitium (F) und Kollagen IV in Glomeruli und im Tubulointerstitium (G) ermöglichen eine Quantifizierung der renalen Fibrose.

Nach 7 Tagen erfolgte bei den Tieren ein zweiter Eingriff unter Vollnarkose (s.o.). Der Rasur und Desinfektion des Bauches folgte eine Längslaparotomie und Darstellung der linken Niere. Die erste Gefäßabzweigung der linken Nierenarterie (Arteria renalis sinistra) wurde

Methoden

freipräpariert und die ventralen Äste kurzzeitig atraumatisch mit einer Pinzette abgedrückt, um deren Versorgungsbereich (idealerweise jeweils ca. 1/3 der Niere) zu visualisieren. Bei dem erwarteten Ergebnis wurden die beiden ausgewählten Arterienäste vorsichtig von der Nierenvene abpräpariert und thermisch gekautert. Anschließend erfolgte wieder ein zweischichtiger Wundverschluss und eine Analgesie mit 0,1 mg/kg KG Temgesic s.c. alle 12 Std für 3 Tage post-OP.

Alle zwei Wochen wurden zur Überprüfung der Nierenfunktion Serum- und Urinproben gewonnen. Die Blutabnahme erfolgte an einer Vene des erwärmten Schwanzes. Die Urine wurden über einen Zeitraum von mindestens 16 Std (über Nacht) in Stoffwechsellkäfigen gesammelt. Außerdem wurde ebenfalls alle zwei Wochen eine indirekte arterielle (unblutige) Blutdruckmessung durchgeführt. Dazu wurden die Tiere nach einer Gewöhnungsphase in einer Zwangsröhre in eine Umgebungstemperatur von ca. 30 °C gebracht. Die Messung (insgesamt 6 Parameter: Systolischer-, diastolischer- und mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, Blutvolumen, Blutfluss) erfolgte mithilfe eines Computer-gesteuerten nicht-invasiven Systems über Druckmanschetten am Schwanz.

3.2.2 Adenin-Nephropathie

Die sog. Adenin-Nephropathie wird durch ausschließliches Füttern einer Spezialnahrung mit 0,75% Adenin-Zusatz über zwei bis vier Wochen induziert. Hierbei wird das Enzym Adenin-Phosphoribosyltransferase, welches in allen Säugetierzellen exprimiert wird und die Synthese von AMP aus Adenin und Phosphoribosylpyrophosphat über den sog. *Purin-Salvage Pathway* katalysiert, durch Substratsättigung gehemmt. Überschüssiges Adenin wird stattdessen durch Xanthindehydrogenase zu 2,8-Dihydroxyadenin oxidiert, das aufgrund seiner geringen Löslichkeit präzipitiert⁸¹⁻⁸³. Histologisch zeigen sich Ablagerungen von 2,8-Dihydroxyadenin-Kristallkörpern in Tubuli und Interstitium des Nierenkortex. Dies führt zum Influx inflammatorischer Zellen, Tubulusobstruktionen und interstitieller Fibrose sowie deutlicher Abnahme der Nierenfunktion mit erhöhter Retention harnpflichtiger Substanzen⁸⁴.

Männliche F344 Ratten mit einem Startgewicht von ca. 200 g wurden nach Beginn der Diät einmal wöchentlich gewogen. Zur Überprüfung der Nierenfunktion wurde Blut aus der erwärmten Schwanzvene entnommen und Urin für ca. 16 Std in metabolischen Käfigen gesammelt. Die Diät wurde für zwei bis vier Wochen gefüttert. Nach 4 Wochen wurden die Tiere getötet (d.h. Tiere erhielten entweder 2 Wochen Diät + 2 Wochen Normalfutter oder 3 Wochen Diät + 1 Woche Normalfutter oder 4 Wochen Diät).

3.2.3 Akute anti-Thy1.1-Nephritis

Das Ratten-Modell der akuten anti-Thy1.1-Nephritis kann als ein Modell für die humane mesangioproliferative IgA-Nephropathie (häufigste Glomerulonephritis-Form der westlichen Welt^{85,86}) angesehen werden, da es Immunglobulin-induziert eine Proliferation des glomerulären Mesangiums anregt. Der Verlauf ist in Abbildung 3.2.3 schematisch dargestellt. Die Induktion der anti-Thy1.1-Nephritis erfolgt durch eine einmalige Injektion von 1 mg/kg KG monoklonalen IgGs (Klon OX-7) gegen das Thy1.1 Antigen auf Mesangialzellen^{42,87}.

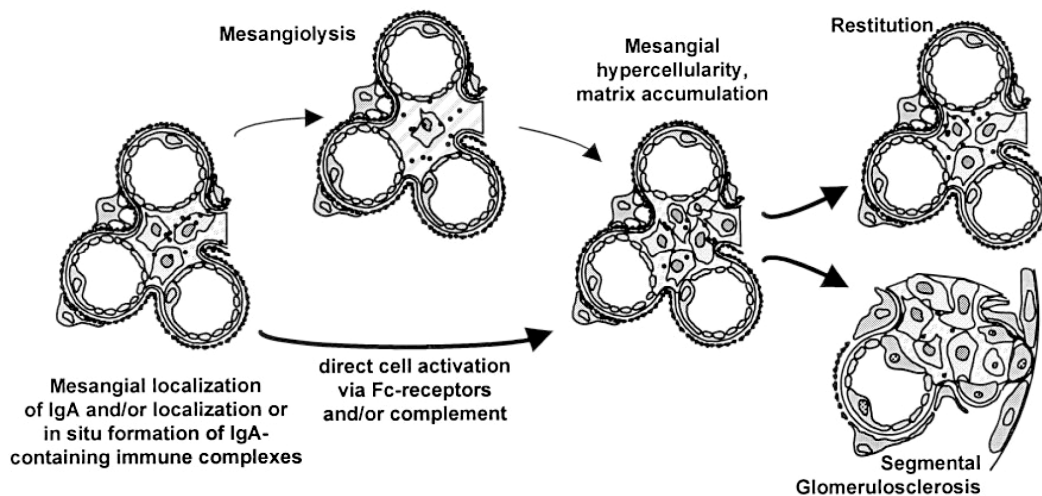


Abbildung 3.2.3: Verlauf der anti-Thy1.1-Nephritis als Tiermodell der humanen IgA Nephritis.

Aus Floege & Feehally⁸⁸.

Immunglobuline (IgA₁ oder im Tiermodell der intravenös applizierte Antikörper) bindet an das intraglomeruläre Mesangium, aktiviert den klassischen Weg des Komplement-Systems und führt so zur Lyse der Mesangialzellen. Die Regeneration des geschädigten Mesangiums führt zu einer Hyperzellulärität des Mesangiums und vermehrter Matrixakkumulation. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass eine Ablagerung des IgA am Mesangium direkt zur Aktivierung der Zellen führt.

Einerseits können Form und Funktion der Glomeruli durch die mesangiale Regeneration wieder hergestellt werden, andererseits kann eine unkontrollierte oder dauerhafte Zellaktivierung die betroffenen Glomeruli weiter schädigen und zur Glomerulosklerose führen^{88,89}.

Der intravenös applizierte Antikörper bindet an die glomeruläre Basalmembran und das intraglomeruläre Mesangium und aktiviert so den klassischen Weg des Komplement-Systems. Bereits eine Stunde nach der Injektion beginnt die Lyse der Mesangialzellen und nach 24 Std hat sich ein Großteil des Mesangiums aufgelöst, wobei gleichzeitig die Zahl infiltrierender Immunzellen zunimmt. Durch die Zerstörung des Stützgerüsts des glomerulären Kapillarknäuels kommt es zur Schädigung des Endothels, zur Bildung von

Methoden

Mikroaneurysmen und zu einer kurzzeitigen massiven Proteinurie⁹⁰. Zwei Tage nach Antikörpergabe beginnt sowohl eine Regeneration des Endothels als auch eine extrakapilläre Proliferation, die nach 2-3 Wochen zu einer Hyperzellularität des Mesangiums mit transientser Halbmondbildung führt. Nach 4-6 Wochen kommt es zu einer Ausheilung der Erkrankung, wobei die Tiere während des Verlaufes zu jedem Zeitpunkt eine ausreichend gute Nierenfunktion haben. Nach ca. 10 Wochen zeigt die Histologie dann keine Auffälligkeiten mehr.

Die männlichen F344 Ratten für diesen Versuch hatten ein Startgewicht von ca. 160 g. Der monoklonale anti-Thy1.1-Antikörper (Klon OX-7, Maus-anti-Ratte) wurde in einer Dosis von 1 mg/kg KG appliziert. Dabei wurde die Konzentration des Antikörpers in PBS so gewählt, dass das Injektionsvolumen dem doppelten Körpergewicht in μl entspricht (z.B. erhielt eine Ratte mit 200 g Körpergewicht 400 μl i.v.). Die Injektion in die Schwanzvene erfolgte an wachen Tieren, welche sich in einer Zwangsröhre befanden.

3.2.4 MSC-Applikation

3.2.4.1 i.v.-Injektion in Ratten mit 5/6 Nephrektomie

Den 5/6 nephrektomierten Ratten wurde intravenös MSC-Suspension oder DMEM (Suspensionsmedium als Kontrolle) appliziert. Jedes Tier erhielt wöchentlich eine 500 μl Injektion in die Schwanzvene. Dafür wurde eine Zellsuspension mit $2 \cdot 10^6$ MSC / ml vorbereitet, so dass jedes Tier mit den 500 μl Injektionsvolumen eine Zelldosis von $1 \cdot 10^6$ MSC erhielt.

3.2.4.2 i.a.-Injektion in Ratten mit anti-Thy1.1-Nephritis

Für die Behandlung der Ratten mit anti-Thy1.1-Nephritis wurden gesunde und urämische MSC verwendet. Am Tag der Applikation (Tag 2 nach Krankheitsinduktion und Höhepunkt der Mesangiolyse) wurden die MSC trypsiniert, mit PKH26 markiert (Abschnitt 3.5.1.2) und in einer Konzentration von 250.000 markierten MSC in 400 μl *Cell Dissociation Buffer* vorbereitet.

Die intraarterielle MSC-Applikation erfolgte in einem operativen Eingriff, der gemeinsam mit Frau PD Dr. med. Uta Kunter durchgeführt wurde. Zwei Tage nach Induktion der anti-Thy1.1-Nephritis wurden die Ratten narkotisiert (durch i.p. Injektion von 10%igem Ketamin und 2%igem Xylazin im Verhältnis 5:1, ca. 1 ml/kg KG (= 90 mg/kg KG + 10 mg/kg KG)). Der Bauch wurde rasiert und desinfiziert. Über einen medianen Bauchschnitt wurden die Aorta sowie die linke Niere und die rechte und linke Arteria und Vena renalis

Methoden

dargestellt. Nach einigen Präparationsschnitten wurde die Aorta vorsichtig an zwei Stellen abgeklemmt: 1. unterhalb des Abgangs der linken Nierenarterie (caudal) und oberhalb der linken Nierenarterie (cranial, aber noch unterhalb des Abgangs der rechten Nierenarterie). Währenddessen wurde die MSC-Suspension immer wieder gemischt und schließlich 400 µl aufgezogen und von caudal nach cranial in die Aorta injiziert. Da in dem abgeklemmten Bereich nur die linke Nierenarterie offen blieb, gelangten die MSC (zunächst) nur in die linke Niere. Nach vollständiger Injektion des gesamten Volumens wurde das Injektionsloch in der Aorta sorgfältig mit Fibrinkleber verschlossen und die Klemmen von der Aorta entfernt (zunächst die caudale, anschließend sehr vorsichtig die craniale, da hier bei unzureichendem Gefäßverschuß starke Blutungen auftreten konnten).

Anschließend erfolgte ein zweischichtiger Wundverschluss und eine Analgesie mit 0,1 mg/kg KG Temgesic s.c. alle 12 Std für 3 Tage post-OP.

3.2.5 Finaleingriff

Am Ende der Beobachtungszeit wurden die Tiere durch Inhalation von Isofluran betäubt, das Abdomen eröffnet und das Herz zur Blutentnahme punktiert.

Bei den Tieren mit 5/6 Nephrektomie wurde die verbliebene Niere entnommen. Um zu überprüfen in welchen Organen die systemisch applizierten MSC noch zu finden sind (*stem cell engraftment*), wurden außerdem das Herz, die Aorta, die Leber, die Lunge und die Milz asserviert. Die Tiere der Kontrollgruppen (nur mit DMEM Applikation) dienten zudem als Knochenmarkspender zur Isolation urämischer MSC.

Bei den Ratten mit anti-Thy1.1-Nephritis oder Adenin-Nephropathie wurden jeweils beide Nieren entnommen.

Von den Organen wurden Proben zur histologischen Untersuchung asserviert (Gefriereinbettung in „Tissue-Tek“, Fixierung in Methacarn (in einigen Fällen auch in 40%igem Ethanol) zur Paraffineinbettung). Aus den Nierenkortexen wurden zudem Proben zur RNA-Gewinnung, Herstellung von Proteinlysaten und elektronenmikroskopischen Aufnahmen gewonnen.

3.2.6 Gewebeaufarbeitung

3.2.6.1 Einbettung der Gewebe und Anfertigung von Schnitten

Die Gewebestücke wurden entweder direkt nach der Entnahme gefriereingebettet und bis zur Nutzung bei –80 °C gelagert oder in Methacarn für mindestens 24 Std fixiert. Die fixierten

Methoden

Proben wurden anschließend im Einbettautomaten in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und am folgenden Tag in Paraffin eingebettet.

Von den Paraffin-eingebetteten Proben wurden von Frau Esther Stüttgen an einem Mikrotom 1 µm dünne Schnitte für histologische Untersuchungen angefertigt. Dazu wurden die Proben vor dem Schneiden gekühlt (−15 °C), die gehobelten Schnitte auf einem Wasserbad bei 37 °C gestreckt und je ein Schnitt auf einen Objektträger aufgebracht. Die Paraffinschnitte wurden über Nacht bei 50 °C getrocknet.

Gewebeschnitte von gefriereingebettetem Gewebe wurden zur Quantifizierung der PKH-Fluoreszenz von *in vivo* injizierten markierten MSC benötigt (siehe Abschnitt 3.5.1.2). Auch die Gefrierschnitte wurden von Frau Esther Stüttgen angefertigt. Die 5 µm dünnen Schnitte wurden unmittelbar vor der Mikroskopie an einem Kryotom angefertigt, für ca. 30 Min bei RT getrocknet und anschließend frisch gefärbt und mikroskopiert.

3.2.6.2 Herstellung von Proteinlysaten aus Nierenkortices

Zunächst wurden tiefgefrorene Gewebestücke von Nierenkortices in Puffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10% Glycerin, 1% Triton X-100 und frisch zugesetzt 1% Protease-/Phosphatase-Inhibitor Cocktail) in einer Endkonzentration von 0,05 mg Gewebe / µl Puffer homogenisiert. Die Homogenate wurden zusätzlich dreimal für 10 Sek im Ultraschallbad inkubiert, um noch mehr Proteine zu lösen. Anschließend wurden die Homogenate bei 5000 rpm für 10 Min zentrifugiert, die Überstände gesammelt und die Proteinkonzentrationen bestimmt (Siehe Abschnitt 3.3.1).

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 **Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BC Assay**

Die Konzentration des löslichen Gesamtproteins in Lysaten aus Gewebe- und Zellkulturproben wurde in Doppelansätzen mittels BC (*Bicinchoninic acid*) Assay bestimmt. Diese colorimetrische Proteinquantifizierung basiert auf zwei Schritten: Zuerst werden durch die Peptidbindungen in Proteinen Cu²⁺-Ionen in einer Substratlösung zu Cu⁺ reduziert, wobei die Menge des entstehenden Cu⁺ proportional zur Proteinmenge ist. Cu⁺ bildet mit Bicinchoninat einen violetten Komplex, dessen Absorption bei 562 nm messbar ist.

Methoden

Pro Probe wurden dabei 10 µl Homogenat eingesetzt. Der Assay wurde entsprechend der Hersteller-Anleitung durchgeführt und die Absorption bei 562 nm gemessen.

3.3.2 Sircol Assay

Zur Quantifizierung des Kollagengehalts im Nierenkortex wurde ein Sircol-Assay benutzt, welcher auf einer rötlichen Färbung der Kollagene durch Sirius Rot und Pikrinsäure basiert. In Doppelansätzen wurden jeweils 50 µl der Nierenkortexlysate (siehe 3.2.6.2) eingesetzt und der Assay entsprechend der Arbeitsanleitung durchgeführt. Die Konzentration des gesamten löslichen Kollagens wurde im ELISA *Reader* bei 540 nm gemessen.

3.3.3 Seneszenz Assay

Mithilfe des *SA-β-Gal Activity Assay Kits* wurde die Enzymaktivität der Seneszenz-assoziierten-β-Galaktosidase in Proteinlysaten gesunder und urämischer MSC fluorometrisch quantifiziert.

Dafür wurden subkonfluente (80-90%) Zellen mit dem Kit zugehörigem *cell lysis buffer* mit Proteinase-Inhibitor (eine Tablette EDTA-freier *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail* pro 10 ml Puffer) entsprechend den Anweisungen im Kit geerntet.

Der Assay wurde weiter mit je 50 µl Lysat nach Herstelleranleitung durchgeführt (Doppelbestimmung). Zum Schluss wurden die Proben in eine schwarze 96-*Well*-Platte überführt, die Reaktion gestoppt und im *Fluorescence-Plate-Reader* bei einer Anregung von 360 nm und einer Emission von 465 nm gemessen.

Die Ergebnisse wurden normiert auf den Gesamtproteingehalt jeder Probe, welcher mittels BCA bestimmt wurde (Abschnitt 3.3.1).

3.3.4 TGF-β ELISA

Die Produktion von TGF-β durch gesunde und urämische MSC wurde mittels ELISA quantifiziert. Da dieser Assay nur immunreaktives TGF-β1 detektieren konnte, wurden entsprechend der Angaben des Herstellers je 100 µl Zellkulturüberstand mit 20 µl 1 M HCl versetzt, um latentes TGF-β zu aktivieren. Nach der Neutralisation mit 1,2 M NaOH/0,5 M Hepes wurde pro Probe ein Volumen von 50 µl eingesetzt (Doppelbestimmung), der Assay weiter nach Anleitung durchgeführt und zum Ende die Absorption im ELISA *Reader* bei 450 nm gemessen.

3.3.5 Zytokin-Array

Relative Level verschiedener sekretierter Zytokine in den verschiedenen MSC-Subgruppen wurden in den Zellkulturüberständen konfluenter MSC in Passage 2 mit einem Zytokin-Array (*Rat Cytokine Array Panel A Array Kit*) gemessen.

Pro Probe wurde je 1 ml zentrifugiertes konditioniertes Medium eingesetzt und der Array entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Ähnlich dem Westernblot-Verfahren (3.3.7) wurden die Membran-Spots mithilfe des *chemiluminescence reagent ECL Kits* nach Herstelleranleitung sichtbar gemacht. Hierbei katalysiert die Meerrettich-Peroxidase, welche an dem Sekundär-Antikörper lokalisiert ist, die Umsetzung des Substrats der ECL-Lösung, wobei Chemilumineszenz entsteht, die wiederum auf Röntgenfilmen detektiert werden kann. Die Array-Membranen wurden luftblasenfrei zwischen Tageslichtprojektorfolien gelegt. In einer Dunkelkammer wurden Röntgenfilme der Membran ausgesetzt (Expositionszeit bis max. 10 Min) und anschließend entwickelt.

Die Array-Spots (Duplikate) auf den Röntgenfilmen (siehe Abbildung 3.3.5) wurden mit *ImageJ* analysiert und normiert auf die internen Kontroll-Spots.

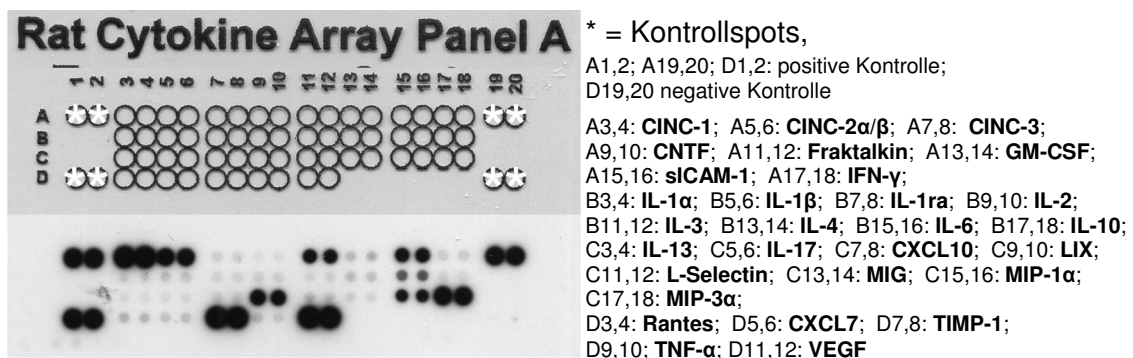


Abbildung 3.3.5: Beispiel für einen Zytokin-Array mit konditioniertem Medium gesunder MSC

3.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Quantifizierung der Aktin-Expression von MSC wurden Zelllysate in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel mittels Elektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

Pro Probe wurden 4 μ g Gesamtprotein eingesetzt und mit Proteinpuffer (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 10% Glycerin, 1% Triton X-100) auf ein Volumen von 15 μ l aufgefüllt. Die Proben wurden mit 5 μ l reduzierendem Probenpuffer (4x) versetzt, für 5 Min in kochendem Wasser auf einer Heizplatte erhitzt, dann auf Eis abgekühlt und kurz anzentrifugiert. Anschließend erfolgte die Auftragung in die Probenaschen eines 4-12%igen

Methoden

Bis-Tris-Gels. Zuvor wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt, welche dann mit Laufpuffer (30 ml *MES SDS Running buffer* (20x) + 570 ml H₂O) gefüllt wurde. Als Längenstandard dienten zwei Marker: 2 µl *LabAid Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (10-260 kDa, sichtbar auf Gel und Membran) und 2 µl *Magic MarkTM XP Western Protein Standard* (20-220 kDa, sichtbar auf Röntgenfilm). Die Elektrophorese fand bei 150 V für ca. 75 Min statt.

3.3.7 Westernblot

Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der nach Größe aufgetrennten Proben auf eine Nitrozellulosemembran.

Zunächst wurde das Gel für ca. 10 Min in kaltem Transferpuffer gespült und dann zusammen mit der Nitrozellulosemembran in die Blotkammer eingebaut. Der Proteintransfer erfolgte in eiskaltem Transferpuffer für ca. 1 Std bei 100 V.

Anschließend wurde die Membran 6 x 5 Min in TTBS gewaschen und 1 Std mit 2%igem BSA geblockt, um später unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Dem erneuten Waschen (6 x 5 min in TTBS) des Blots folgte eine Inkubation mit einem monoklonalen Maus-anti-Aktin-Antikörper ((C-2) 1:1000 in TTBS) über Nacht bei 4 °C. Dieser Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuren 350-375 des C-Terminus von humanem Aktin. Am folgenden Tag wurde der Blot nach mehreren Waschschritten für 1 Std mit dem sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten Pferd-anti-Maus-Antikörper (1:10000 in TTBS) bei 4 °C inkubiert.

Ähnlich dem Zytokin-Array-Verfahren (3.3.5) wurden die Banden mittels des *chemiluminescence reagent ECL Kits* entsprechend der Herstelleranleitung sichtbar gemacht. Die Membran wurde luftblasenfrei zwischen Tageslichtprojektorfolien gelegt. In einer Dunkelkammer wurden Röntgenfilme der Membran ausgesetzt (Expositionszeit bis max. 5 Min) und anschließend entwickelt.

Um eine Quantifizierung der Aktin-Banden (42 kDa) zu ermöglichen, wurde GAPDH (36-40 kDa) als Ladekontrolle gewählt. Die Membranen wurden gestrippt indem sie für 30 Min bei 56 °C in *Stripping* Puffer mit niedrigem pH (2,2) und denaturierendem β-Mercaptoethanol inkubiert wurden. Danach wurden sie gründlich in TTBS gewaschen und erneut mit 2%igem BSA geblockt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit einem monoklonalen Maus-anti-GAPDH Antikörper (1:1000 in TTBS) bei 4 °C und am folgenden Tag wurden die GAPDH-Banden analog zu den Aktinbanden visualisiert. Die Banden wurden mit *ImageJ* quantifiziert und gesunde MSC gleich „1“ gesetzt.

3.3.8 Albumin ELISA

Um Albumin im Urin von Ratten mit akuter anti-Thy1.1-Nephritis zu quantifizieren, wurde ein kompetitiver *Nephrot ELISA* genutzt. Der Assay wurde entsprechend der Anweisung des Herstellers mit jeweils 10 µl Rattenurin (anti-Thy1.1-Nephritis Tag 6; in Doppelansätzen) durchgeführt und die Konzentration am *ELISA Reader* bei 450 nm gemessen.

3.3.9 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA

Eine Quantifizierung der 1,25-Dihydroxy Vitamin D (1,25D)-Spiegel im Serum von CKD-Ratten fand mittels *1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA* statt. Dabei wurden die Serumproben entsprechend des Herstellerprotokolls durch Immunextraktion aufgereinigt und die 1,25D-Konzentration nachfolgend per Enzymimmunassay bestimmt. Es wurden je 100 µl Probe für das Immunextraktionsverfahren eingesetzt (Doppelbestimmung) und die 1,25D-Konzentration der aufgereinigten Probe im *ELISA Reader* bei 450 nm gemessen.

3.3.10 Parathormon ELISA

In CKD-Ratten mit Adenin-Nephropathie wurden die Parathormon-Serumspiegel mithilfe des *Rat Intact PTH ELISA Kits* bestimmt. Der Assay wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und die Absorption im *ELISA Reader* bei 450 nm innerhalb von 10 Min gemessen.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Präparation aus kultivierten MSC

Zur Analyse der mRNA-Expression von Zellen wurden ca. 90% konfluente MSC-Kulturen geerntet. Dafür wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche mit 650 µl Lyse-Puffer (aus dem *InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit*) lysiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Isolation und Aufreinigung der RNA wurde mithilfe des *InviTrap® Spin Cell RNA Mini Kit* nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde die enthaltene DNA über *DNA binding Spin Filter* entfernt. Schließlich wurde die RNA in 40 µl A. inject. eluiert und an einem

Methoden

1 µl Aliquot die Konzentration sowie Reinheit photometrisch bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm gemessen.

3.4.2 Synthese komplementärer DNA (*complementary DNA, cDNA*)

Mittels der Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion wurde die RNA-Expression bestimmter Gene in gesunden und urämischen MSC quantifiziert. Die für diese PCR benötigte Matrize wurde durch eine reverse Transkription von RNA zu cDNA durch eine M-MLV (*moloney-monkey leukemia virus*)-Reverse Transkriptase erstellt.

Insgesamt wurde pro Ansatz 1 µg RNA in 20 µl A. inject. aufgenommen. Zur Denaturierung und weiteren Vermeidung von Sekundärstrukturen wurde die RNA zuerst für 10 Min bei 75 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Auf Eis wurde dann folgender Reaktionsansatz pipettiert:

| | |
|---------------------------|--------|
| First Strand Buffer (5x) | 6 µl |
| dNTP-Mix | 1,5 µl |
| Primer-Random (250 ng/µl) | 1 µl |
| M-MLV-RT | 1 µl |
| RNAsin | 0,7 µl |
| RNA <i>template</i> | 20 µl |

Anschließend wurden die 30,2 µl Reaktionsansätze für 10 Min bei 25 °C inkubiert (Primer-Anlagerung). Nach einer weiteren 60-minütigen Inkubation bei 42 °C (Elongation) wurde die cDNA bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C gelagert.

3.4.3 Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion

(*Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR*)

Die Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion wurde genutzt, um die relative RNA-Expression verschiedener Gene in MSC zu analysieren. Wie bei der klassischen PCR wird hierbei durch wiederholte PCR-Zyklen ein DNA-Abschnitt vervielfältigt, gleichzeitig jedoch eine Quantifizierung des neu entstehenden DNA-Materials in Echtzeit ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden 2 Fluoreszenz-basierte Verfahren genutzt, um die DNA-Amplifikation zu messen: 1. SYBR Green I und 2. TaqMan(FAM-TAMRA)-Sonden. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green erlaubt eine Quantifizierung der DNA, da es in doppelsträngige DNA interkaliert, und dementsprechend das Fluoreszenzsignal umso höher

Methoden

ist je mehr DNA vervielfältigt wird. Die zweite Methode basiert auf dem Prinzip des sog. *Fluoreszenz Resonance Energy Transfers (FRET)*, bei dem –in diesem Fall– die Energie eines angeregten Fluorophormoleküls (Donor, FAM, 6-Carboxyfluorescein) auf einen Quencher (Akzeptor, TAMRA, Rhodamin) übertragen wird. Die eingesetzten Sonden hybridisieren mit der Matrize und tragen am 3'-Ende den Quencher und am 5'-Ende den Donor, welcher durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase während der Synthese des komplementären Stranges zuerst abgespalten wird. Da die FRET-Effizienz mit der Entfernung der Fluorophore zueinander abnimmt, steigt das messbare Fluoreszenz-Signal des Donors sobald dieser abgespalten wird, d.h. je mehr komplementäre DNA synthetisiert wird.

Für die PCR mit SYBR Green wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

| | |
|--------------------------------|-----------|
| Reaktionspuffer (10x) | 2,5 µl |
| MgCl ₂ (50 mM) | 1,75 µl |
| <i>Forward</i> Primer (1 pmol) | 1,25 µl |
| <i>Reverse</i> Primer (1 pmol) | 1,25 µl |
| dNTPs (5 mM) | 1 µl |
| SYBR Green I | 0,75 µl |
| cDNA <i>template</i> | 0,75 µl |
| Taq-Polymerase (0,025 U/µl) | 0,125 µl |
| A. inject. | 15,625 µl |

Für die PCR mit TaqMan-Sonden wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Reaktionspuffer (10x) | 2,5 µl |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2,5 µl |
| <i>Forward</i> Primer (10 pmol) | 2,25 µl |
| <i>Reverse</i> Primer (10 pmol) | 2,25 µl |
| dNTPs (5 mM) | 1 µl |
| Sonde (200 nM) | 2,5 µl |
| cDNA <i>template</i> | 0,75 µl |
| Taq-Polymerase (0,025 U/µl) | 0,125 µl |
| A. inject. | 11,125 µl |

Für beide Ansätze lief die anschließende PCR nach folgendem Schema ab:

| | | |
|---------------------------------------|--------|-------------|
| 50 °C | 2 Min | } 40 Zyklen |
| 95 °C (Polymerase-Aktivierung) | 10 Min | |
| 95 °C (Denaturierung) | 15 Sek | |
| 60 °C (Hybridisierung und Elongation) | 1 Min | |

Methoden

Es wurden für alle Proben jeweils Doppelansätze gemessen. Als interne Kontrolle wurde die Expression von GAPDH bestimmt (*House Keeping Gene*).

Die Taqman-Platten wurden von Frau Gertrud Minartz, Frau Esther Stüttgen und Frau PD Dr. Claudia Renate van Roeyen pipettiert.

Zur Auswertung der Messergebnisse wurde jeweils ein Mittelwert der Ct (*cycle threshold*)-Werte jeder Probe von Zielgen und GAPDH errechnet. Der Ct-Wert entspricht jenem PCR-Zyklus, an dem erstmals ein deutliches Fluoreszenz-Signal gemessen werden konnte.

Für die relative Quantifizierung der RNA Expression wurde dann die Differenz von Ct_{Zielgen} und Ct_{GAPDH} gebildet („ ΔCt “) und anschließend die Differenz von $\Delta Ct_{\text{GruppeX}}$, z.B. urämische MSC, und $\Delta Ct_{\text{Kontrollgruppe}}$, hier stets gesunde MSC, („ $\Delta\Delta Ct$ “) bestimmt. Durch Umrechnung ($\text{Expression} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) wurde die relative Expressionsveränderung gegenüber der Kontrollgruppe (gesunde MSC) gemessen.

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Histologische Färbungen

Paraffin-eingebettete Methacarn-fixierte Gewebeschnitte wurden für eine histologische oder immunhistologische Färbung in einer absteigenden Alkoholreihe nach folgendem Schema entparaffiniert und rehydriert:

- 3 x 5 min Xylol
- 3 x 2 min 100%iger Ethanol
- 2 x 2 min 95%iger Ethanol
- 1 x 2 min 70%iger Ethanol.

3.5.1.1 PAS (Periodic acid-Schiff)-Färbung

Entparaffinierte Schnitte wurden für 5 Min in A. dest. gewaschen und danach für 30 Min in 2%iger Perjodsäure bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte in A. dest. und eine Inkubation in Schiffsreagenz für 60 Min bei RT. Dann wurden die Schnitte unter fließendem warmem Wasser für 5 Min gespült und für 4 Min mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach einem erneuten Waschschrte in A. dest. erfolgte das Bläuen in Tris-Puffer (pH 8,3)

Methoden

durch mehrmaliges Dippen. Nach einem letzten Waschen der Schnitte in A. dest. und der Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe wurden die Gewebe mit Histokitt eingedeckt.

In den PAS-gefärbten Schnitten wurden die zellulären Mitosen in allen Glomeruli (ca. 100-150 angeschnittene Glomeruli pro Tier) ausgezählt. Die Mesangiolyse wurde anhand eines semiquantitativen Scores (Abbildung 3.5.1.1) bestimmt, bei dem 0 für gesund/keine Mesangiolyse, 1 für segmentale Mesangiolyse, 2 für globale Mesangiolyse und 3 für Mikroaneurysma steht.

Die Auswertungen erfolgten stets an zuvor geblindeten Schnitten.

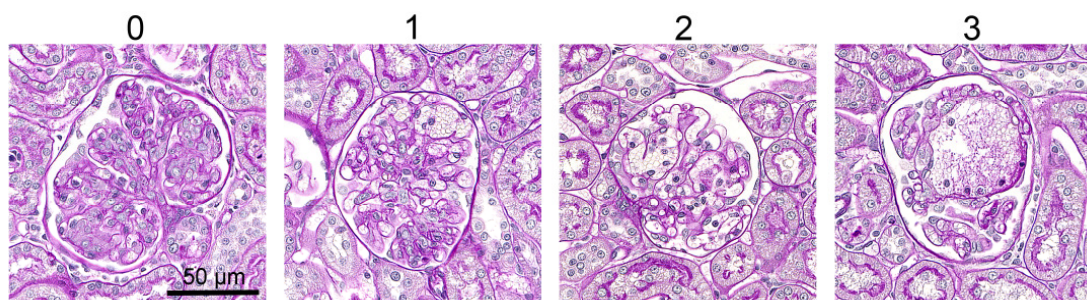


Abbildung 3.5.1.1: Angewendeter Mesangiolyse Score.

0 = gesund/keine Mesangiolyse, 1 = segmentale Mesangiolyse, 2 = globale Mesangiolyse und 3 = Mikroaneurysma.

3.5.1.2 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Um die Expression und Lokalisation bestimmter Proteine in verschiedenen Krankheitsmodellen der Niere nachzuweisen und zu quantifizieren, wurden verschiedene Fibrose- (α -SMA, Kollagen I und Kollagen IV) und Immunmarker (CD68) immunhistochemisch oder immunfluoreszent in Methacarn-fixierten, Paraffin-eingebetteten Schnitten nachgewiesen. Im letzten Versuchsteil dieser Arbeit (4.5) erfolgte zudem eine immunhistochemische Detektion des Oberflächenantigens CD24 zur Identifikation einer periglomerulären Zellpopulation.

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurden 1 μ m Schnitte entparaffiniert, rehydriert und mit PBS gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt der endogenen Peroxidasen in 3%iger H_2O_2 Lösung für 10 Min. Danach wurden die Schnitte erneut 2 x in PBS gewaschen und anschließend mit den jeweiligen Primärantikörpern in entsprechend ausgetesteter Verdünnung (siehe Tabelle 3.5.1.2) in 1% BSA/PBS für 1 Std bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Negativkontrollen wurden stattdessen mit unspezifischem IgG der gleichen Wirtsspezies in gleicher Konzentration behandelt. Im Anschluss wurden die

Methoden

Schnitte 2 x 5 Min in PBS gespült und dann mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3.5.1.2) für 30 Min inkubiert. Anschließend wurde ein Avidin/Biotin-Komplex („*avidin-biotin complex*“, ABC) aufgetragen und die Objektträger in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für 30 Min inkubiert. Nach zwei PBS-Waschschritten wurden die Zellen in eine Diaminobenzidin (DAB)-Arbeitslösung (bestehend aus 175 ml Tris pH 7,6; 1 ml 8%igem Nickelchlorid; 0,1 ml 30%igem H₂O₂) getaucht und bis zur gewünschten Farbintensität bei 37 °C inkubiert (maximal 10 Min). Die Reaktion wurde in H₂O gestoppt und die Zellen anschließend mit Methylgrün gegengefärbt. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (1 x 70%iger Ethanol, 2 x 95%iger Ethanol, 3 x 100%iger Ethanol, 3 x Xylol) wurden die Gewebe mit Histokitt eingedeckt.

Einige der Histologien wurden von Herrn Simon Otten und Frau Monika Mallau gefärbt.

Bei der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden 1 µm Schnitte entparaffiniert, rehydriert und mit PBS gewaschen. Es folgte ein Blockierungsschritt mit Seren der Wirtsspezies der Sekundär-Antikörper (hier Kaninchen- und Eselserum 1:10.000 in 1% BSA/PBS). Nach 30 Min wurde das Serum abgeklopft und die Schnitte mit dem anti-CD24-Primärantikörper in entsprechend ausgetesteter Verdünnung (siehe Tabelle 3.5.1.2) in 1% BSA/PBS für 1 Std bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 2 x 5 Min in PBS gespült und dann mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 3.5.1.2) für 30 Min inkubiert (ab hier alle weiteren Schritte bei Dunkelheit). Nach zwei PBS-Waschschritten wurde die Prozedur mit einem weiteren anti-α-SMA-Primärantikörper sowie entsprechendem Sekundärantikörper wiederholt. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI für 10 Min bei Raumtemperatur (1:10 000 in PBS). Nach einem letzten Waschschrift in PBS wurden die Gewebe mit Immu-Mount eingedeckt und bis zur Mikroskopie dunkel gelagert.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden computermorphometrisch mit der Software *ImageJ* ausgewertet. Dabei wurden aufgenommene Fotos in 8-bit Schwarz-Weiss-Bilder umgewandelt. Für jede Färbung wurde manuell eine bestimmte Farbintensität als Schwellenwert (*Threshold*) bestimmt, ab der ein Pixel als positiv angefärbt bewertet wird. Es wurde in allen Auswertungen nur die positiv gefärbte Fläche in Prozent (entspricht Pixelanzahl oberhalb des Schwellenwertes / Gesamtanzahl Pixel des Fotos) quantifiziert, verschiedene Färbeintensitäten oberhalb des Schwellenwertes wurden nicht weiter berücksichtigt.

Bei Auswertungen der Glomeruli wurden diese dabei als *Region of Interest* (ROI) festgelegt (entspricht Pixelanzahl oberhalb des Schwellenwertes im Glom / Gesamtanzahl Pixel des Gloms). In den 5/6 nephrektomierten Ratten wurden alle Glomeruli eines Schnittes zur

Methoden

Auswertung herangezogen, bei den Ratten mit anti-Thy1.1-Nephritis jeweils 50 Glomeruli / Schnitt.

Alle Auswertungen erfolgten an zuvor geblindeten Schnitten.

Tabelle 3.5.1.2: Verwendete Antikörper für immunhistochemische Analysen.

| Antigen | Primärantikörper | Verdünnung in BSA/PBS | Sekundärantikörper alle 1:300 in BSA/PBS |
|--|--|-----------------------|--|
| α -SMA | monoklonal (Klon 1A4), Maus-anti-Human | 1:500 | Pferd-anti-Maus (biotinyliert) oder Kaninchen-anti-Maus (Cy2-markiert) |
| CD24 | polyklonal, Ziege-anti-Human | 1:200 | Kaninchen-anti-Ziege (biotinyliert) oder Esel-anti-Ziege (Alexa546-markiert) |
| CD68 | monoklonal (Klon ED1), Maus-anti-Human | 1:500 | Pferd-anti-Maus (biotinyliert) |
| Humane plazentare alkaline Phosphatase | polyklonal, Kaninchen-anti-Human | 1:100 | Ziege-anti-Kaninchen (biotinyliert) |
| Kollagen I | polyklonal, Ziege-anti-Human | 1:100 | Kaninchen-anti-Ziege (biotinyliert) |
| Kollagen IV | polyklonal, Ziege-anti-Human | 1:200 | Kaninchen-anti-Ziege (biotinyliert) |

3.5.2 *In vivo* "Tracking" von MSC

3.5.2.1 „*human placental alkaline phosphatase*“-transgene MSC

In einigen Experimenten wurden gesunde männliche R26-hPLAP Ratten (F344 Hintergrund) als Zellspender verwendet, die ubiquitär und stabil humane plazentare alkaline Phosphatase (hPLAP) unter Kontrolle des R26-Promotors (ein 0.8 kb-Stück der ROSA26 Promotor-Sequenz) exprimieren^{77,91,92}.

Durch das Transgen konnten hPLAP-transgene MSC in wildtyp Empfängern sowohl enzymatisch als auch immunhistochemisch nachgewiesen werden, was eine weitere Alternative zum Zell-Tracking mit PKH-Fluoreszenz (Abschnitt 3.5.1.2) darstellte.

Für den enzymatischen Nachweis wurden Nierenschnitte mit dem hPLAP-Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) inkubiert. Die Umsetzung des Substrates führte zur Präzipitation eines blauen Indigofarbstoffes. In dieser Arbeit wurden dafür die Nierengewebe für 48 Std in 40%igem Ethanol fixiert und anschließend in Paraffin

Methoden

eingebettet. Für die Färbung wurden Paraffinschnitte entparaffiniert und rehydriert (3 x 5 Min Xylol, 3 x 2 Min 100%iger Ethanol, 2 x 2 Min 95%iger Ethanol, 1 x 2 Min 70%iger Ethanol), in PBS gewaschen und für 30 Min in Tris-HCl bei 65 °C inkubiert, was die endogenen hitzeinstabilen Phosphatasen inaktivierte. Danach wurden die Schnitte für 60 Min mit dem BCIP-Substrat in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (0,17 mg/ml) inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff mit A.dest. und eine Gegenfärbung mit Eosin. Die Schnitte wurden mit Immu-Mount eingedeckt.

Die gleiche Färbung wurde an Blutausstrichen, Schwanzbiopsien und kultivierten MSC Zellkultur-Proben aller Tiere der hPLAP-transgenen Linie zur Genotypisierung genutzt.

Immunhistochemisch konnte hPLAP in Methacarn-fixierten Gewebeschnitten mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-human alkaline Phosphatase-Antikörper (Tabelle 3.5.1.2.1) nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.5.2.2).

3.5.2.2 PKH26-Fluoreszenz

Vor der Injektion wurden MSC mit dem orange fluoreszierenden Farbstoff PKH26 (max. Emission 567 nm) markiert, der durch lange aliphatische Reste stabil in die Zellmembran integriert.

Die Zellfärbung fand entsprechend des Hersteller-Protokolls des „*PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling*“ statt.

Zur Überprüfung der Zellviabilität wurden Reste der MSC-Suspensionen, welche nach dem Eingriff noch übrig waren, rekultiviert (Abbildung 3.5.2.2).

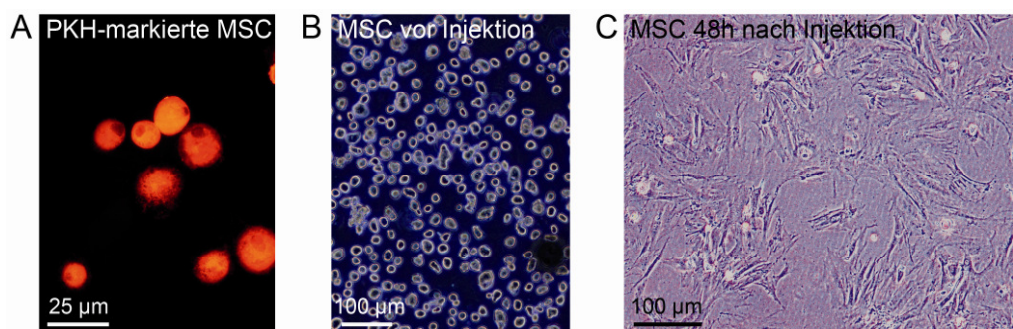


Abbildung 3.5.2.2: PKH26-gelabelte MSC vor und 48 Std nach Injektion.

A zeigt eine Aufnahme der PKH26-gelabelten MSC, welche am Fluoreszenzmikroskop bei 550 nm Anregung und 570 nm Emission nachgewiesen werden konnten. **B** zeigt ein Foto der Zellsuspension (hier zusätzlich mit Trypanblau gefärbt) unmittelbar vor der intraarteriellen Injektion. Die Suspension markierter MSC bestand aus 250.000 lebenden Einzelzellen / 400 µl *Cell Dissociation Buffer*. Nach der OP rekultivierte restliche Zellen wuchsen erneut in Kultur an (**C**).

Methoden

Analog zu den computermorphometrischen Analysen der immunhistochemischen Färbungen wurde später in Gefrierschnitten die PKH-Fluoreszenz quantifiziert.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde mit dem Programm SPSS (Version PASW18) durchgeführt. Für Vergleiche von zwei Behandlungsgruppen (in Ergebnisteilen 4.1 und 4.3.6) wurde der student's t-Test angewendet. Für Vergleiche von mehr als zwei Gruppen (Ergebnisabschnitte 4.3, 4.4, 4.5) wurde nach Prüfung der Normalverteilung eine ANOVA durchgeführt mit anschließendem Tukey- oder LSD-Posthoc. In Versuchsteil 4.4 wurden die rechten und linken Nieren der Ratten mit anti-Thy1.1-Nephritis über gepaarte t-Tests verglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Applikation gesunder MSC als Therapie der renalen Fibrose

Bei 20 F344 Ratten wurde eine 5/6 Nephrektomie vorgenommen, bei der eine chronische Niereninsuffizienz durch starke Reduktion der funktionalen Nierenmasse induziert wurde. Dazu wurde eine rechtsseitige Uninephrektomie in Vollnarkose durchgeführt (Tag -7) und eine Woche später (Tag 0) in einem zweiten Eingriff zwei von drei Ästen der Arteria renalis sinistra ligiert. Zwei Ratten blieben als gesunde Kontrolltiere ohne Eingriff.

Die Nierenfunktion wurde 6 Wochen nach dem Eingriff anhand von Serum- und Urinparametern überprüft und die Tiere in zwei gleichwertige Behandlungsgruppen randomisiert: Gruppe 1 bekam wöchentlich $1 \cdot 10^6$ MSC in 500 μ l DMEM i.v., Gruppe 2 wöchentlich 500 μ l DMEM (Suspensionsmedium als Kontrolle). Hierdurch sollte überprüft werden, ob eine systemische MSC-Applikation den Verlauf des Krankheitsmodells verändern, eventuell sogar der Fibrosierung und damit dem Funktionsverlust der Niere entgegenwirken kann. Die MSC für die Zell-basierte Therapie der 5/6 nephrektomierten Ratten wurden aus dem Knochenmark gesunder F344 Ratten isoliert und in Kultur expandiert. Es handelte sich also um "syngene" Stammzelltransplantate zwischen ingezüchteten Ratten.

Der gesamte Versuchsplan ist in Abbildung 4.1 zusammenfassend dargestellt:

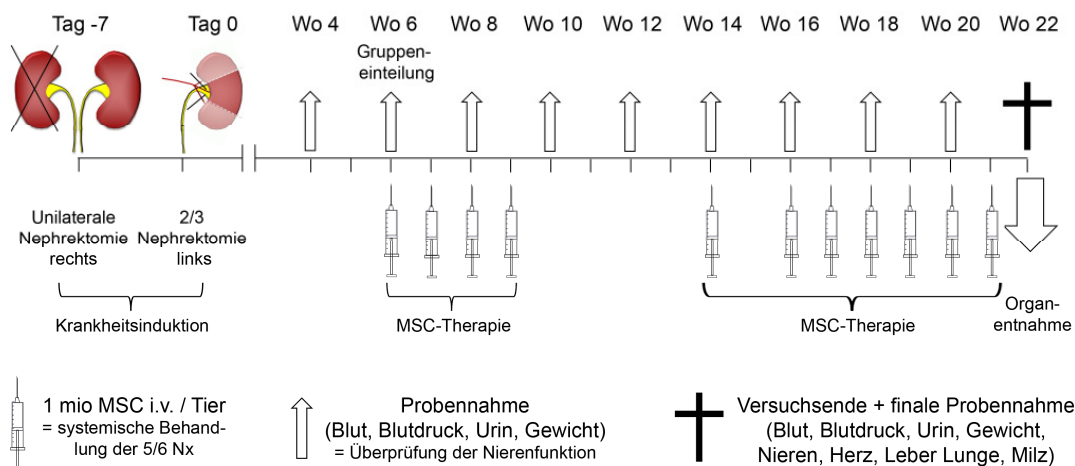


Abbildung 4.1: Versuchsübersicht zu wiederholter intravenöser MSC-Applikation in 5/6 nephrektomierten Ratten.

Die Nierenfunktion der 5/6 nephrektomierten Ratten wurde regelmäßig im Abstand von zwei Wochen überprüft. Therapiert wurden die Tiere von Woche 6 bis 9 und in einem zweiten Block in Woche 14 und 16 bis 21. Damit erhielten die Tiere bis zum Versuchsende in Woche 22 insgesamt jeweils 11 Behandlungen mit je $1 \cdot 10^6$ MSC (oder Kontrollmedium) i.v..

4.1.1 Isolierte Knochenmarkszellen zeigen MSC-Markerprofil und -Differenzierungskapazität

Die isolierten Knochenmarkszellen wurden in MSC-Vollmedium für max. 4 Passagen kultiviert. Um die Zellen zu charakterisieren und zu belegen, dass es sich um primäre Kulturen mesenchymaler Stammzellen handelt, wurden sowohl die Zellmorphologie als auch die Expression mehrerer Oberflächenantigene geprüft. Abbildung 4.1.1.1 zeigt, dass frisch isolierte Zellen Plastik-adhärenz waren, nach einigen Tagen in Kultur fest am Substrat anwuchsen und vereinzelt Ausläufer bildeten. In höheren Passagen erschienen die Kulturen homogen, die Zellen waren morphologisch großflächiger und flacher, zudem zeigten sie die typische MSC-Spindelform.

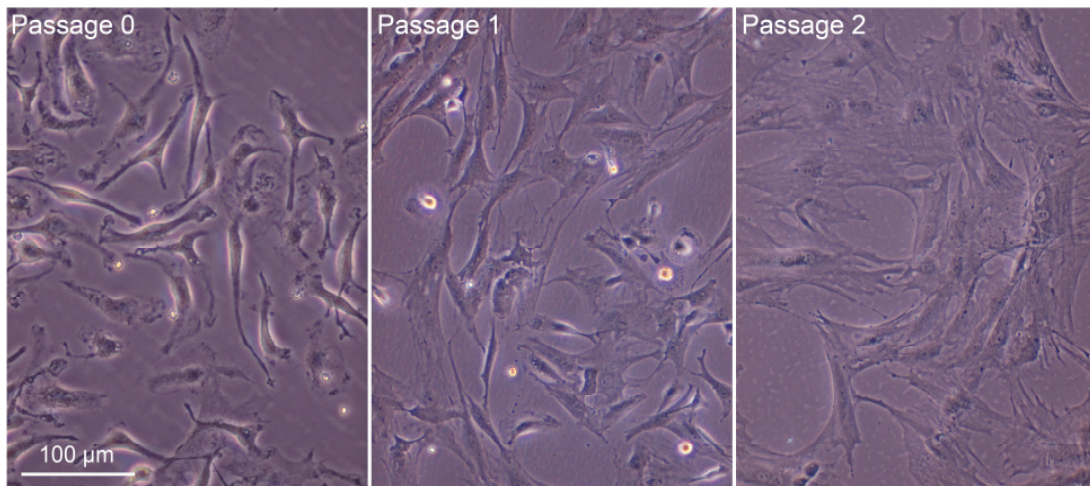


Abbildung 4.1.1.1: Primäre MSC-Kulturen in Passagen 0 bis 2.

Die zunehmende Zellgröße wurde mittels Zellzähler quantifiziert und bestätigt: Der Durchmesser von MSC aus Passage 0 war mit $15 \pm 0,9 \mu\text{m}$ signifikant geringer als in Passage 2 mit $18,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$ (gemessen $n = 9$, $p < 0,00001$).

Die Expression verschiedener Zelloberflächen CD-Antigene wurde mittels immunzytochemischer Färbungen geprüft. Da bislang kein spezifischer Marker für MSC beschrieben wurde, können diese Zellen nur anhand einer Markerkombination charakterisiert werden²³. Die primären MSC-Kulturen zeigten zu über 95% positive Färbung für CD44, CD73 und CD90. Sie exprimierten weder den Endothelmarker CD31 noch die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 (Abbildung 4.1.1.2).

Ergebnisse

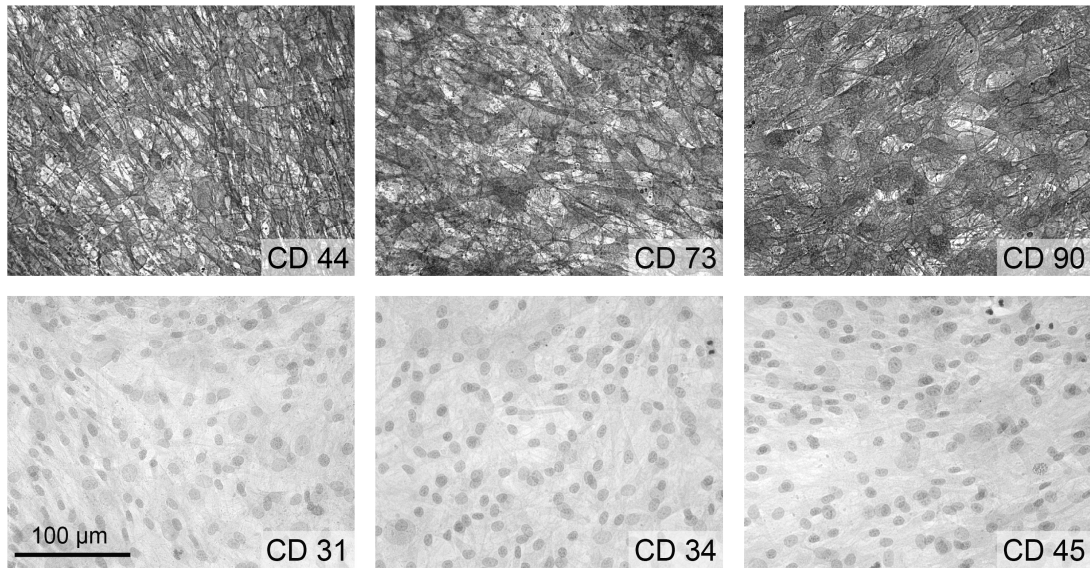


Abbildung 4.1.1.2: Antigenprofil primärer MSC-Kulturen.

Primäre MSC der zweiten Passage exprimierten die Antigene CD44, CD73 und CD90. Die Kulturen waren negativ für den Endothelmarker CD31 und die Marker CD34 und CD45 der hämatopoetischen Zelllinien.

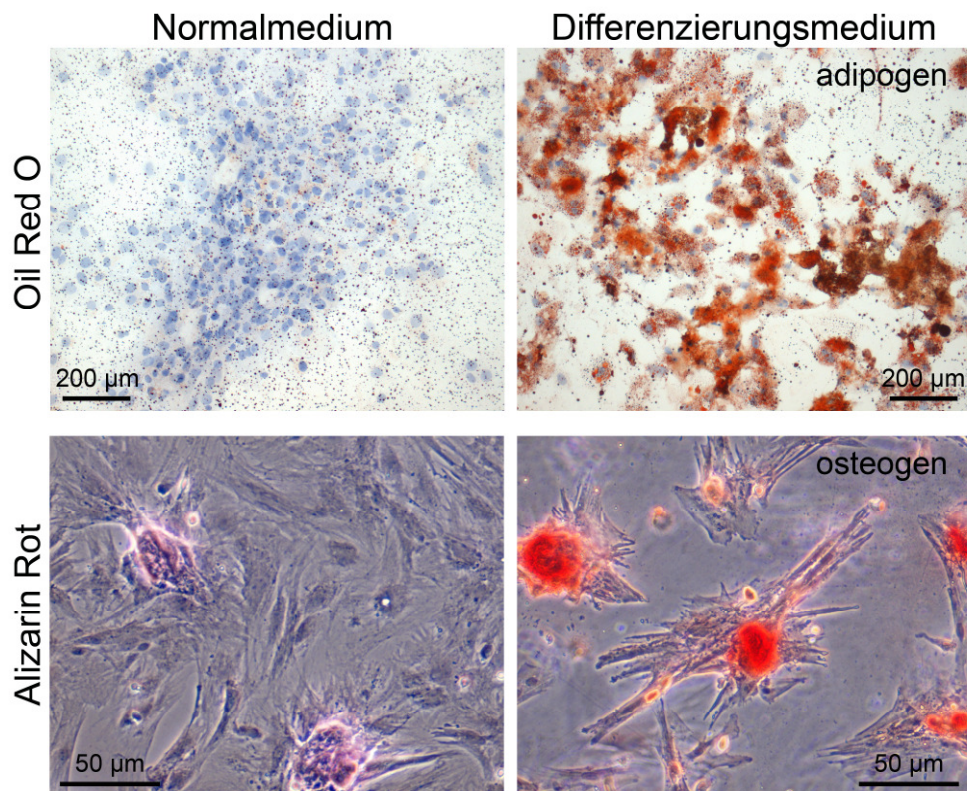


Abbildung 4.1.1.3: Induzierte Differenzierung von primären MSC-Kulturen.

Bei primären MSC der dritten Passage konnte sowohl adipogene als auch osteogene Differenzierung induziert werden. Der Lipidnachweis mittels Oil Red O färbte nur die adipogen differenzierten MSC rot, Kontrollzellen in Vollmedium zeigten keine Fettvakuolen. Alizarin-Rot färbte ebenfalls nur die differenzierten MSC an, bei den Kontrollzellen konnte keine Kalziumdeposition nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Als weiteres MSC-Merkmal wurde die Differenzierungskapazität der primären MSC getestet. Nach 3-wöchiger Kultur im adipogenen Induktionsmedium konnte mittels Oil Red O-Färbung eine deutliche Lipidvakuolisierung / Fettdifferenzierung nachgewiesen werden (Abbildung 4.1.1.3).

Ebenfalls zeigten die MSC eine osteogene Differenzierungskapazität. Nach Kultur im osteogenen Induktionsmedium konnten mithilfe einer Alizarinrot-Färbung Kalziumdepositionen rot angefärbt werden. In Zellen (der gleichen Spendertiere), welche als Kontrolle parallel in MSC-Vollmedium kultiviert wurden, konnten weder vermehrte Lipidvesikel noch Kalziumablagerungen nachgewiesen werden.

Damit erfüllten die verwendeten primären Zelllinien aus Knochenmarkspräparationen die drei internationalen MSC-Kriterien: Plastikadhärenz, Antigenexpressionsmuster sowie Differenzierungskapazität.

4.1.2 Krankheitsverlauf und MSC-Behandlung

Die 5/6 nephrektomierten Ratten wurden 6 Wochen nach der OP auf zwei Versuchsgruppen randomisiert. In Tabelle 4.1.2 ist dargestellt, dass sich die beiden Gruppen vor Therapiestart weder im Körpergewicht noch in ihrer Nierenfunktion, gemessen an den Retentionswerten Harnstoff und Kreatinin sowie der Proteinurie, signifikant unterschieden.

Tabelle 4.1.2: Körpergewicht und Nierenfunktion der Ratten mit 5/6 Nephrektomie unmittelbar vor Startpunkt der Stammzell-Therapie.

| Woche 6 (Zeitpunkt Gruppeneinteilung) | Gruppe 1: 5/6 Nx, <u>vor</u> MSC- Injektionen (n = 10) | Gruppe 2: 5/6 Nx, <u>vor</u> Medium- Injektionen (n = 9) | <i>student's t-test</i> p-Wert |
|--|---|---|-----------------------------------|
| Gewicht [g] | 246 ± 9 | 252 ± 11 | 0,198 |
| Proteinurie [mg/24Std] | 5,9 ± 2,8 | 4,9 ± 3,9 | 0,530 |
| S-Harnstoff [mmol/L] | 10,9 ± 1,9 | 10,5 ± 1,6 | 0,648 |
| S-Kreatinin [µmol/L] | 50,6 ± 3,6 | 50,0 ± 2,9 | 0,695 |
| Kreatinin-Clearance [L/24Std] | 1,22 ± 0,33 | 1,17 ± 0,17 | 0,724 |

Ab Woche 6 post-OP wurden die Tiere (Gruppe 1) einmal wöchentlich mit MSC in einer Dosis von $1 \cdot 10^6$ MSC / 500 µl DMEM behandelt. Die Tiere der Kontrollgruppe (Gruppe 2) erhielten an den gleichen Zeitpunkten je 500 µl DMEM i.v. in die Schwanzvene. Diese Therapie wurde bis Woche 9 nach OP durchgeführt (insgesamt also 4 Injektionen), danach

Ergebnisse

folgte eine Therapiepause von 4 Wochen. Anschließend wurde die Behandlung mit 7 weiteren wöchentlichen Behandlungen fortgeführt, so dass jede Ratte der MSC-Gruppe insgesamt eine Dosis von $11 \cdot 10^6$ MSC i.v. in einem Zeitraum von 15 Wochen erhalten hat. Die letzte Behandlung erfolgte eine Woche vor Versuchsende und Biopsientnahme.

Alle zwei Wochen wurden Blut- und Urinproben der Tiere analysiert. In Abbildung 4.1.2.1 sind die Messwerte von Proteinurie und Serum Kreatinin für den gesamten Versuchsverlauf für die beiden Behandlungsgruppen (MSC und Medium) dargestellt. In beiden Versuchsgruppen stieg die Proteinurie während des Versuchs signifikant an (paariger t-Test Woche 4 vs. Woche 22: $p = 0,007$ (MSC) bzw. $0,013$ (Medium)), was den progredienten Funktionsverlust der Niere durch die radikale Entfernung funktionalen Gewebes und die daraus resultierende Hyperfiltration widerspiegelte. Dennoch war die Progression der Niereninsuffizienz sehr variabel und daher die Varianz zum Zeitpunkt des Versuchsendes sehr groß (die Proteinurie schwankte in der MSC-Gruppe zwischen 29 und 201 mg/24 Std und in der Medium-Gruppe zwischen 25 und 306 mg/24 Std). Obwohl die MSC-behandelte Gruppe zu jedem Messzeitpunkt tendenziell eine niedrigere Proteinurie aufwies als die Medium-Gruppe, waren diese Unterschiede zu keinem Zeitpunkt signifikant. Genauso zeigte sich auch beim S-Kreatinin zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen MSC- und Medium-Gruppe. In beiden Gruppen sanken die Kreatinin-Werte im Serum zwischen Woche 4 und 10 post-OP (von 52 ± 4 auf 46 ± 2 $\mu\text{mol/L}$ (MSC) bzw. von 57 ± 3 auf 46 ± 5 $\mu\text{mol/L}$ (Medium)) und stiegen dann bis zum Versuchsende wieder stetig an, in der MSC-Gruppe auf 62 ± 11 $\mu\text{mol/L}$ bzw. in der Medium-Gruppe auf 60 ± 6 $\mu\text{mol/L}$.

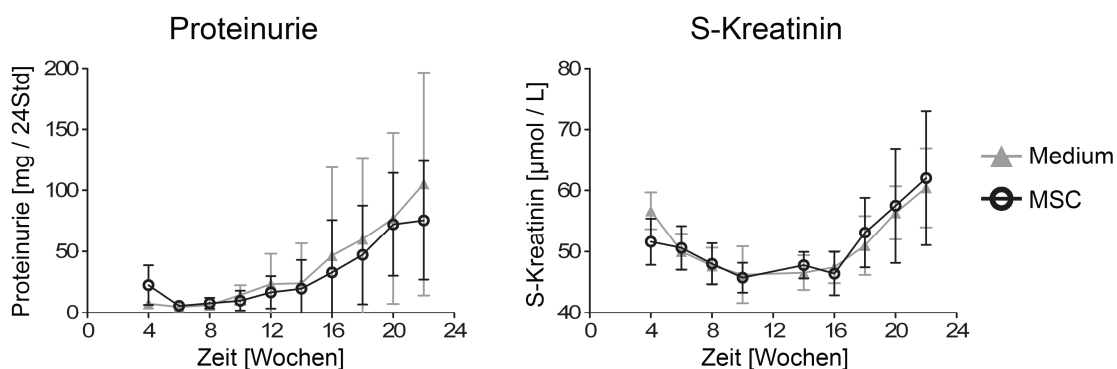


Abbildung 4.1.2.1: Verläufe von Proteinurie und S-Kreatinin in 5/6 nephrektomierten Ratten mit MSC- oder Medium-Behandlung.

Zum Zeitpunkt $t = 0$ erfolgte der zweite Eingriff der 5/6Nx, an Woche 4 post-OP wurden erstmals Blut- und Urinproben genommen, danach alle zwei Wochen erneut die Nierenfunktion überprüft. In Woche 22 post-OP wurden die Tiere (MSC-Gruppe ($n = 10$), Medium-Gruppe ($n = 9$)) getötet und finale Nierenbiopsien entnommen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen beider Behandlungsgruppen.

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob die kultivierten MSC während der Suspensionsherstellung oder einer Inkubation auf Eis (bis zum Injektionszeitpunkt) beschädigt wurden und so therapeutisches Potenzial einbüßen konnten, wurden Suspensionsreste nach den ersten beiden Injektionszeitpunkten (Woche 6 und 7 post-OP) wieder rekultiviert. Nach 24 Std in Kultur in MSC-Vollmedium war ein Großteil der Zellen bereits wieder angewachsen und zeigte die typische MSC-Morphologie (siehe Abbildung 4.1.2.2).

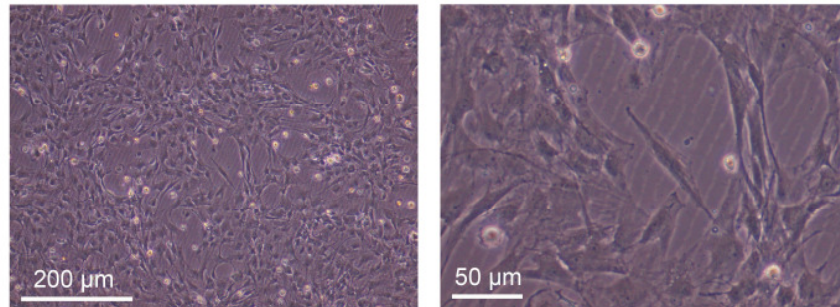


Abbildung 4.1.2.2: Rekultivierte MSC nach Präparation für i.v. Injektion in 5/6 nephrektomierten Ratten.

Suspensionsreste wurden nach Beendigung der i.v. Injektion rekultiviert, um die Zellvitalität zu überprüfen. Nach 24 Std Kultur in MSC-Vollmedium ist der Großteil der Zellen wieder adhärent und zeigt die typische MSC-Morphologie.

Eine Auszählung lebender und toter Zellen (angewachsen bzw. im Medium schwimmend) bestätigte, dass in beiden Fällen der Anteil von toten Zellen um ein vielfaches geringer war als die Anzahl überlebender MSC (nach 1. Behandlungszeitpunkt $2,56 \cdot 10^5$ tote MSC und $1,02 \cdot 10^6$ lebende/gesunde MSC (ca. 4-faches der abgestorbenen Zellen); nach 2. Behandlungszeitpunkt: $2,94 \cdot 10^5$ tote MSC und $1,93 \cdot 10^6$ lebende/gesunde MSC (ca. 6,5-faches der abgestorbenen Zellen)). Somit konnte angenommen werden, dass auch zum Injektionszeitpunkt der Großteil der injizierten MSC noch vital war.

4.1.3 Analyse der Tiere (funktionell und histologisch) zum Tötungszeitpunkt

Nach insgesamt 11 wöchentlichen Behandlungen mit $1 \cdot 10^6$ MSC i.v. (oder Kontrollmedium) wurden die Tiere in Woche 22 nach der 5/6 Nephrektomie getötet. Die beiden Behandlungsgruppen unterschieden sich weder im Körpergewicht (MSC: 317 ± 22 g vs. Medium: 320 ± 24 g, $p = 0,789$) noch bei ihrem Blutdruck (systolisch: MSC: 145 ± 17 mmHg vs. Medium: 151 ± 11 mmHg, $p = 0,389$) (siehe Abbildung 4.1.3.1 und Tabelle Z1 im Anhang).

Ergebnisse

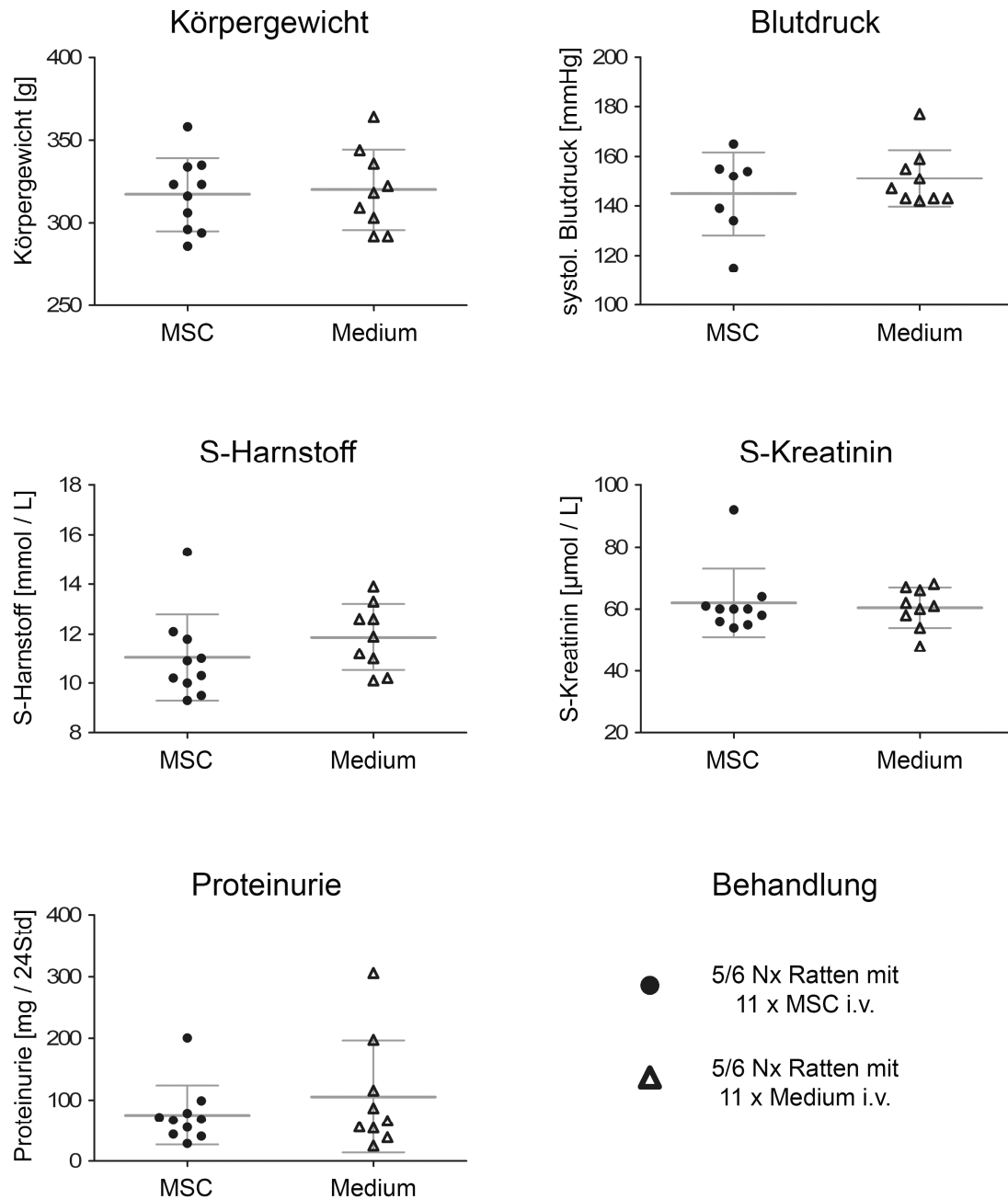


Abbildung 4.1.3.1: Körpergewicht, Blutdruck und funktionelle Nierenparameter der 5/6 nephrektomierten Ratten nach 11 Behandlungen mit MSC oder Kontrollmedium.

Die beiden Behandlungsgruppen (MSC (n = 10) vs. Medium (n = 9)) unterschieden sich weder in ihrem Körpergewicht ($p = 0,789$) noch in ihren systolischen Blutdruckwerten ($p = 0,389$), in S-Harnstoff ($p = 0,268$), S-Kreatinin ($p = 0,715$) oder ihrer Proteinurie ($p = 0,378$). Dargestellt sind die einzelnen Versuchstiere sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen für beide Gruppen.

Ergebnisse

Auch die Nierenfunktion war in beiden Gruppen annähernd gleich. Die Werte für Harnstoff und Kreatinin waren in beiden Gruppen zwar mäßig erhöht im Vergleich zu gesunden Tieren (Harnstoff: MSC: 11 ± 2 mmol/L vs. Medium: 12 ± 1 mmol/L vs. Gesund: 6 ± 1 mmol/L; Kreatinin: MSC: 62 ± 11 μ mol/L vs. Medium: 60 ± 6 μ mol/L vs. Gesund 32 ± 12 μ mol/L), dennoch wirkte die Behandlung mit MSC keinen signifikanten Unterschied bei den Retentionsparametern verglichen mit der Applikation von Kontrollmedium. Gleiches ergab die Messung der Proteinurie: mit 76 ± 48 mg/24Std (MSC) und 105 ± 91 mg/24Std (Medium) zeigten beide 5/6-Gruppen eine deutliche Proteinurie verglichen mit gesunden Ratten gleichen Alters (6 ± 2 mg/24Std, $n = 5$). Obwohl hier die MSC-behandelte Gruppe durchschnittlich eine niedrigere Proteinurie aufwies als die Medium-Gruppe, ist diese Tendenz aufgrund der hohen Varianz nicht signifikant ($p = 0,378$). Eine Messung des Vitamin D3 im Serum ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,571$) zwischen MSC-Behandlung (139 ± 64 pmol/L) und Medium-Injektion (166 ± 95 pmol/L) (Medium).

Abbildung 4.1.3.2 (und Tabelle Z1 im Anhang) zeigt die Evaluation immunhistochemischer Färbungen bezüglich der Fibrose-Marker Kollagen und α -smooth muscle actin (α -SMA). Verschiedene Kollagene repräsentieren dabei Teile der extrazellulären Matrix, die während der Fibrosierung der Niere abgelagert wird, und α -SMA ist ein Marker für aktivierte Myofibroblasten, die vermutlich an der Entstehung der Fibrose beteiligt sind¹². Hier zeigte sich kein Unterschied zwischen der MSC- und der Medium-Gruppe bzgl. der Anteile der Kollagen IV positiv gefärbten Fläche in Glomeruli (MSC: $15,61 \pm 4,78\%$ vs. Medium: $19,50 \pm 13,61\%$, $p = 0,407$). In den Fotos der Abbildung 4.1.3.2 ist zu erkennen, dass die Schädigung der einzelnen Glomeruli in einer 5/6 Niere stark schwankte, in beiden Gruppen waren Glomeruli, die gesund schienen, direkt neben stark sklerotischen Glomeruli lokalisiert, welche viel Kollagen IV enthielten. Die Sklerosierung eines Glomerulus war oftmals nur segmental begrenzt.

Für Kollagen I und α -SMA wurden die positiven Flächenanteile im Tubulointerstitium der Nierencortices ausgewertet und verglichen. Auch hier zeigte sich in keiner der beiden Färbungen ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Kollagen I: MSC: $3,30 \pm 2,74\%$ vs. Medium: $3,62 \pm 1,65\%$, $p = 0,763$; α -SMA: MSC: $0,64 \pm 0,15\%$ vs. Medium: $0,67 \pm 0,18\%$, $p = 0,679$). Die tubulointerstitielle Fibrose ist ebenfalls fokal und nur in wenigen Bereichen stärker ausgeprägt. Insgesamt bestätigten die Histologien, dass die Fibrose nach 22 Wochen nur mäßig vorangeschritten war. Besonders der Fibrose-Marker α -SMA war nur sehr schwach exprimiert. Die Färbung zeigte im Interstitium nur in wenigen Bereichen positive Areale um Tubuli und Glomeruli, obwohl die deutliche Färbung der glatten Muskelzellen um Arterien/Arteriolen spezifisch schien (Abbildung 4.1.3.2).

Ergebnisse

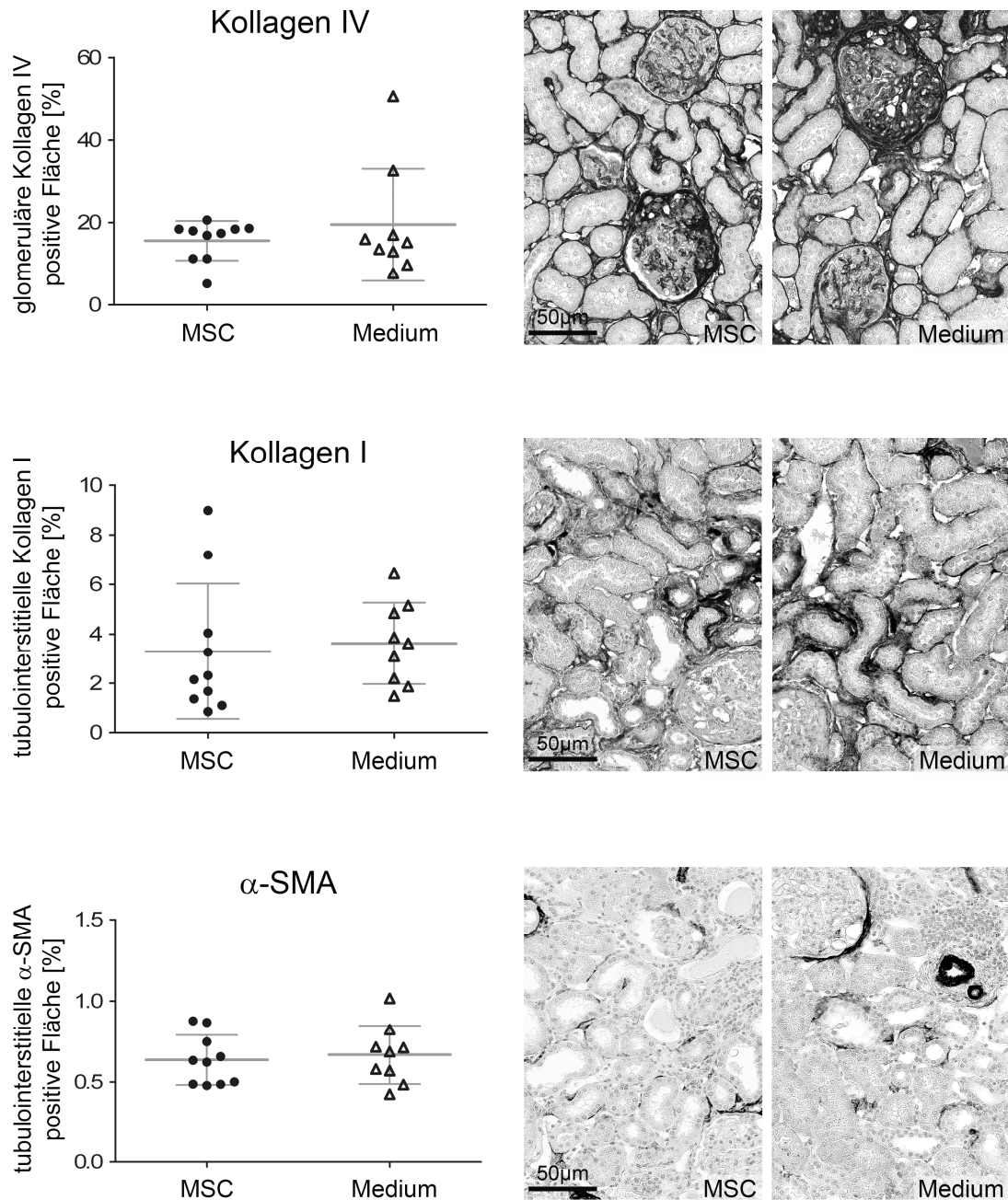


Abbildung 4.1.3.2: Immunhistochemische Auswertungen der 5/6 nephrektomierten Ratten nach 11 Behandlungen mit MSC oder Kontrollmedium.

Zwischen der MSC (n = 10) und der Medium-Gruppe (n = 9) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Expression der Fibrose-Marker Kollagen IV (glomeruläre Fläche, $p = 0,407$), Kollagen I (tubulointerstitielle Fläche, $p = 0,763$) oder α -SMA (tubulointerstitielle Fläche, $p = 0,679$). Alle Marker zeigten, dass die Fibrose nur lokal und mäßig ausgeprägt ist. Dargestellt sind die einzelnen Versuchstiere sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen für beide Gruppen.

Ergebnisse

Zusätzlich zu den Histologien wurde die Kollagenexpression noch mittels Sircol-Assay quantifiziert, der auf einer Kollagenfärbung durch Sirius-Rot-Färbung basiert (Abbildung 4.1.3.3). Erneut lag kein Unterschied zwischen MSC- und Medium-Behandlung vor ($23,31 \pm 4,88 \mu\text{g}$ lösliches Kollagen / mg Nierenkortex vs. $24,55 \pm 3,35 \mu\text{g}$ lösliches Kollagen / mg Nierenkortex, $p = 0,531$).

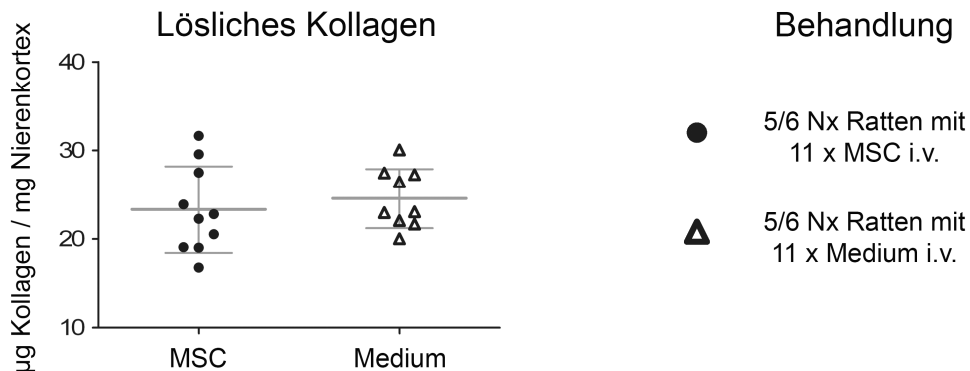


Abbildung 4.1.3.3: Quantifizierung des Kollagens in 5/6 nephrektomierten Ratten nach 11 Behandlungen mit MSC oder Kontrollmedium.

Ein Sircol-Assay zur Quantifizierung des löslichen Gesamtkollagens der Nierenkortex ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen MSC ($n = 10$) und Medium-Gruppe ($n = 9$) ($p = 0,531$). Dargestellt sind die einzelnen Versuchstiere sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen für beide Gruppen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die wiederholte wöchentliche MSC-Behandlung –mit Therapiebeginn in einem frühen Stadium der Nierenerkrankung– zu keiner signifikanten Änderung der Nierenfunktion oder Nierenhistologie im Vergleich zur Kontrollgruppe geführt hat. Obwohl die MSC-Gruppe bei einigen funktionellen Nierenparametern (niedrigerer Blutdruck, niedrigerer S-Harnstoff und niedrigere Proteinurie) und allen ausgewerteten Fibrose-Markern (weniger glomeruläres Kollagen IV, weniger interstitielles Kollagen I, weniger interstitielles α -SMA, weniger Gesamtkollagen) tendenziell „bessere“ Ergebnisse lieferte, erreichte keiner der Unterschiede ein Signifikanzniveau. Zum einen wurde dies bedingt durch starke Varianzen innerhalb der Gruppen, welche wiederum auf die sehr unterschiedliche Progredienz der Erkrankung im Modell der 5/6 Nephrektomie zurückzuführen waren. Zum anderen sollte auch berücksichtigt werden, dass trotz langer Versuchsdauer die Tiere nur eine mässige renale Fibrose und leichtgradigere Niereninsuffizienz entwickelt hatten, so dass eine deutliche antifibrotische Auswirkung der MSC-Behandlung nur schwer messbar war.

4.2 Einfluss von Urämie auf Knochenmarks-MSC:

Tier-Modelle und Klassifizierung der MSC-Spender

Da im Modell der 5/6 Nephrektomie eine systemische Applikation gesunder syngener Stammzelltransplantate keine signifikante Besserung des Nierenschadens bewirken konnte (Abschnitt 4.1), wurde in dieser Arbeit im Weiteren untersucht, ob sich die urämischen Bedingungen bei chronischer Niereninsuffizienz auf Stammzellen des Knochenmarks auswirken. Dazu wurden MSC aus dem Knochenmark nierenkranker Ratten isoliert und mit gesunden MSC bezüglich Markerexpression, Differenzierungs- und Proliferationskapazität und Sekretionsprofil *in vitro* (Abschnitt 4.3) sowie hinsichtlich ihres therapeutischen Potenzials bei akutem Nierenversagen *in vivo* (Abschnitt 4.4) verglichen.

Neben der 5/6 Nephrektomie wurde in dieser Arbeit ein weiteres Tier-Modell zur Induktion eines chronischen Nierenversagens bei Ratten eingesetzt: Die Adenin-induzierte Nephropathie. Diese wird im folgenden Absatz 4.2.1 charakterisiert.

4.2.1 Adenin-Nephropathie in Ratten

Beim Modell der Adenin-induzierten Nephropathie wird den Versuchsratten über das Futter eine hohe Menge Adenin verabreicht (0,75%). Dieses präzipitiert in Form von 2,8-Dihydroxyadenin-Kristallen im Primärharn innerhalb der Nierentubuli, was die Schädigung der Niere verursacht^{83,84}.

In dieser Arbeit wurde zunächst getestet, ob jenes Modell im Ratten-Stamm F344 eine Niereninsuffizienz induzieren kann. Dazu wurden F344 Ratten mit einer Adenin-angereicherten Diät für zwei, drei und 4 Wochen gefüttert. Alle Tiere wurden nach 4 Wochen getötet und analysiert. In Abbildung 4.2.1 A und B sind die zugehörigen Serumwerte für Harnstoff und Kreatinin dargestellt. Beide Retentionsparameter zeigten bereits eine Woche nach Diätstart einen signifikanten Konzentrationsanstieg im Serum (Harnstoff: Der Ausgangswert von $5,6 \pm 0,4$ mmol/L steigt in Woche 1 auf $36,2 \pm 5,4$ mmol/L ($p < 0,00001$); Kreatinin: Der Ausgangswert von 31 ± 3 μ mol/L steigt in Woche 1 auf 172 ± 28 μ mol/L ($p < 0,00001$)). Bei Tieren, welche 4 Wochen die Diät erhielten (in Abbildung 4.2.1 A und B in schwarz dargestellt), stiegen die Werte nochmals weiter an bis auf 45 ± 5 mmol/L Harnstoff und 273 ± 33 μ mol/L Kreatinin.

Wenn die Diät nach zwei oder drei Wochen beendet wurde (in Abbildung 4.2.1 A und B in hellgrau bzw. dunkelgrau dargestellt), sanken die Retentionswerte wieder ab,

Ergebnisse

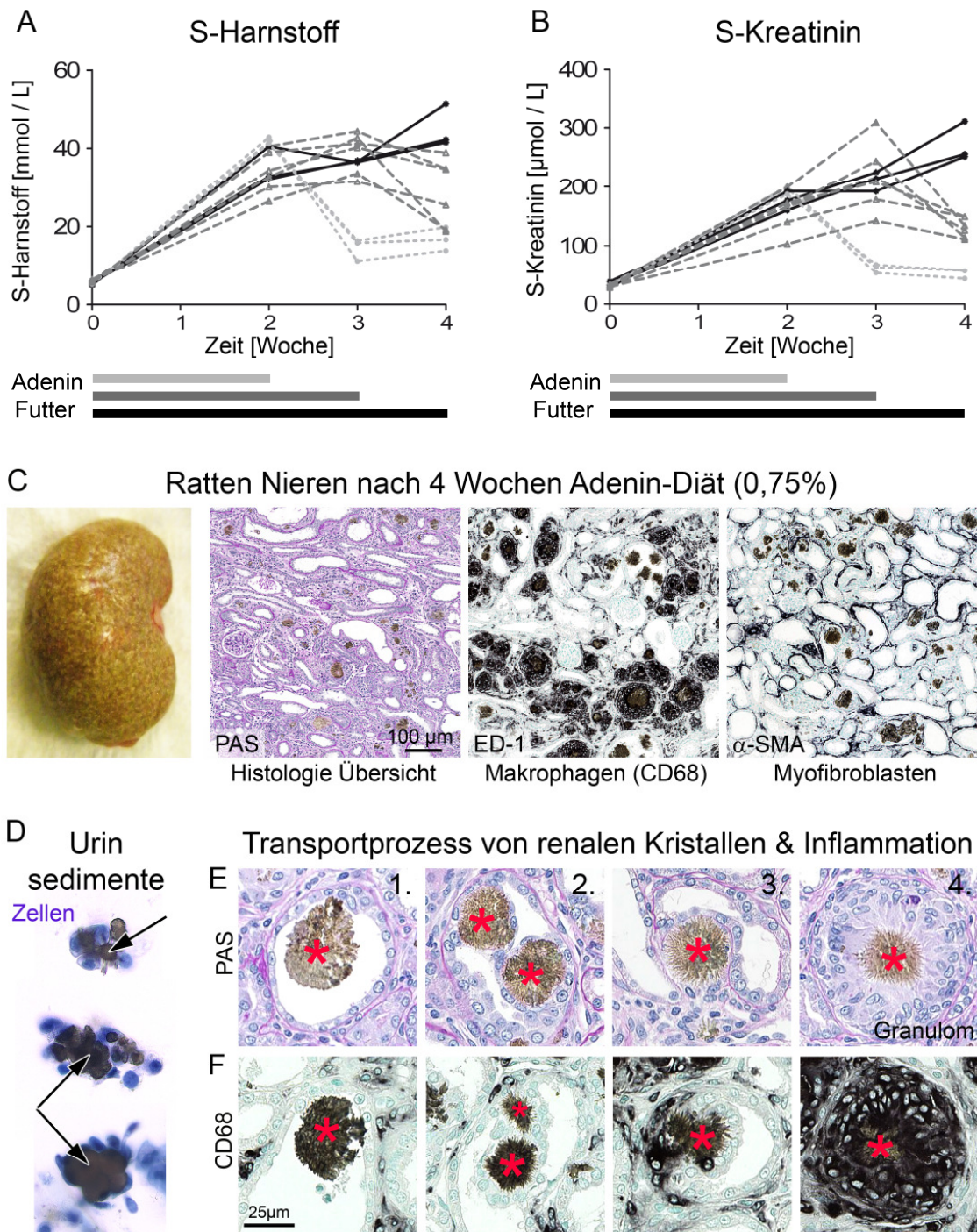


Abbildung 4.2.1: Nierenfunktion und Nierenhistologie von Ratten mit Adenin-induzierter Nephropathie.

A+B) Verläufe von Serum Harnstoff und -Kreatinin während der Diät mit 0,75% Adenin-Zusatz. C) Niere und Histologie nach 4 Wochen Adenin-Diät. Während Glomeruli nicht betroffen waren, zeigte sich im Tubulointerstitium eine deutliche Schädigung in Form von Tubulusdilatation und -atrophie, CD68-positiven Immunzellinfiltraten und vermehrten α -SMA-positiven Myofibroblasten. D) Urinsedimente mit 2,8-Dihydroxadenin-Kristallen (Pfeil) überwachsen mit Zellen. E+F) Möglicher Translokationsprozess von intratubulär entstandenen Kristallen (*) ins Interstitium und anschließende (granulomatöse) Immunreaktion.

Ergebnisse

wobei die Nierenfunktion sich umso schneller regenerierte je kürzer die vorherige Zeitspanne der Diät war. So sanken die Serumwerte von Harnstoff und Kreatinin bei Umstellung auf Normalfutter nach nur 2 Wochen Adenin innerhalb einer Woche um 65% bzw. 68% (Harnstoff: von 41 ± 1 mmol/L in Woche 2 auf 14 ± 3 mmol/L in Woche 3; Kreatinin: von 195 ± 7 μ mol/L auf 61 ± 7 μ mol/L). Wurde erst nach drei Wochen Adenin-Diät wieder Normalfutter gegeben, sanken die Werte innerhalb der ersten Woche „nur“ um 13% bzw. 44% (Harnstoff: von 42 ± 2 mmol/L in Woche 3 auf 36 ± 2 mmol/L in Woche 4; Kreatinin: von 244 ± 56 μ mol/L auf 136 ± 12 μ mol/L).

Die Messwerte für Vitamin D3 waren nach 4 Wochen Adenin-Diät trotz hoher Standardabweichung signifikant niedriger als bei gesunden Tieren (ELISA: Adenin (n = 4): 58 ± 16 pmol/L vs. Gesund (n = 3): 223 ± 132 pmol/L, p = 0,0499). Gleichzeitig wurden erhöhte Parathormon-Spiegel gemessen (ELISA: Adenin (n = 4): 3173 ± 1037 pg/ml vs. Gesund (n = 4): 769 ± 699 pg/ml, p = 0,0085).

Abbildung 4.2.1 C zeigt inwiefern die Nierenhistologie sich durch die 2,8-Dihydroxyadenin-Kristalle veränderte. Bereits makroskopisch zeigten die Nieren Veränderungen, sie waren vergrößert, sehr hell und erschienen schlecht durchblutet, gleichzeitig war die Oberfläche unregelmäßig und zeigte ein „körniges“ Aussehen. In der PAS-Übersicht des Nierenkortex war neben den braun angefärbten Kristallen in Tubuli und Interstitium die deutliche interstitielle Nierenschädigung in Form von dilatierten Tubuli und Tubulusatrophie sowie vermehrten Zellinfiltraten zu erkennen (Glomeruli erscheinen nicht betroffen). Eine CD68-Färbung zur Identifikation von Makrophagen verdeutlichte das Ausmaß der Entzündungsreaktion: Im gesamten Interstitium des Nierenkortex waren Makrophagen lokalisiert, die sich besonders um große Kristalle zu Granulomen formatierten. Die Fotoreihe in Abbildung 4.2.1 E visualisiert den Prozess, durch welchen die Kristalle vermutlich die Nieren schädigen: Intratubulär entstandene Kristalle binden an Tubuluszellen und werden von diesen kontinuierlich "überwachsen" bzw. eingeschlossen. Die ursprüngliche tubuläre Basalmembran wird aufgelöst, wodurch der Kristall ins Interstitium gelangt, in Kontakt mit infiltrierenden und residenten Makrophagen/dendritischen Zellen kommt und teilweise eine granulomatöse Reaktion hervorruft. Diese Makrophagen sind vermutlich beteiligt am Abbau der Kristalle.

Nicht alle Kristalle wurden jedoch auf diese Weise in der Niere zurückgehalten, in den Urinsedimenten der Ratten konnten Kristalle mikroskopisch nachgewiesen werden, die teilweise auch mit Zellen "überwachsen" waren (siehe Abbildung 4.2.1 D). Außerdem konnten bereits nach 4 Wochen Adenin-Diät deutliche α -SMA-positive Areale im Interstitium angefärbt werden. Auch in diesem Modell entstand also interstitielle Fibrose (Abbildung 4.2.1 C).

4.2.2 Einteilung der MSC-Spender anhand der Nierenfunktion

Die Tier-Modelle zur Induktion einer chronischen Niereninsuffizienz zeigen oftmals eine starke Varianz bei der Progression, wie auch in dieser Arbeit bereits im Abschnitt 4.1 für den Verlauf der 5/6 Nephrektomie gezeigt. Für eine bessere Beurteilung der MSC-Funktionalität in Abhängigkeit von der Nierenfunktion des jeweiligen Donors, wurden die MSC-Spender anhand ihrer Nierenfunktion in zwei Klassen eingeteilt (Abbildung 4.2.2):

1. Spender mit schwerer Niereninsuffizienz: **CKDsev** (für engl. *severe chronic kidney disease*). Diese wurde definiert durch einen S-Harnstoff > 20 mmol/L und eine Kreatinin-Clearance < 1 L/24 Std. Beide in dieser Arbeit verwendeten Tier-Modelle (5/6 Nephrektomie (auch engl. *remnant kidney*, **RK**) und Adenin-Nephropathie, **AD**) führten schlußendlich zu diesem Stadium des Nierenversagens. Im weiteren Verlauf der Arbeit werden sie als **CKDsev-RK** (also Ratten mit 5/6 Nephrektomie) und **CKDsev-AD** (Ratten mit Adenin-Nephropathie) bezeichnet.
2. Spender mit beginnender Niereninsuffizienz: **CKDmod** (für engl. *moderate chronic kidney disease*). Diese Klasse wurde definiert durch einen S-Harnstoff < 20 mmol/L und eine Kreatinin-Clearance > 1 L/24 Std. In dieser Arbeit wurden nur Tiere mit 5/6 Nephrektomie dieser Gruppe zugeordnet: **CKDmod-RK**.

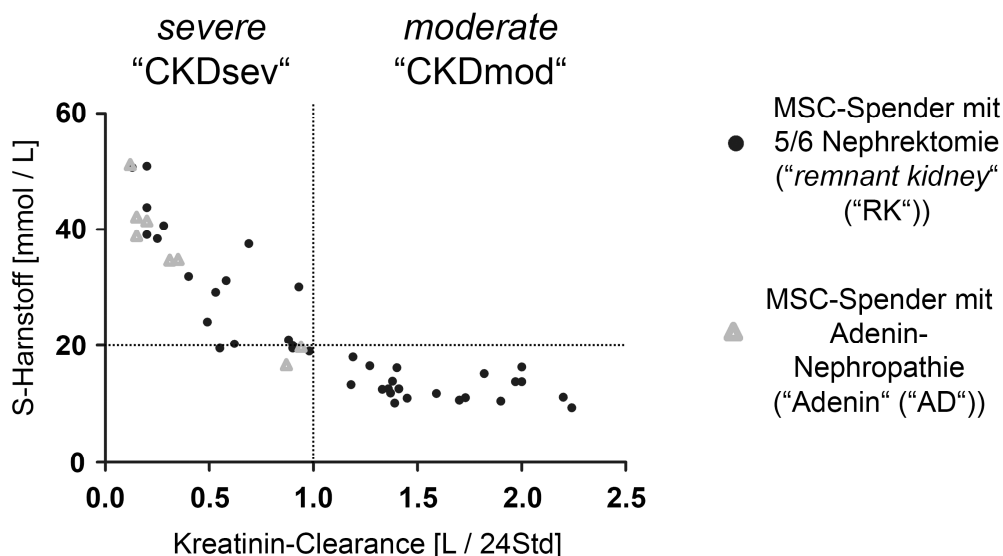


Abbildung 4.2.2: Klassifizierung der MSC-Spender anhand ihrer Nierenfunktion.

Es wurden MSC isoliert aus dem Knochenmark von Tieren mit 5/6 Nephrektomie „RK“ und Adenin-Nephropathie „AD“. Ab einem S-Harnstoff > 20 mmol/L und einer Kreatinin-Clearance < 1 L/24 Std wurden diese als CKDsev (*severe chronic kidney disease*) eingestuft. Die zweite Klasse CKDmod (*moderate chronic kidney disease*) wurde definiert als S-Harnstoff Level < 20 mmol/L und Kreatinin-Clearance > 1 L/24 Std.

Ergebnisse

Eine detaillierte Auflistung aller in dieser Arbeit verwendeten nierenkranken MSC-Spendertiere ist im Anhang zu finden (Tabelle Z2).

4.3 Charakterisierung gesunder und urämischer MSC sowie gesunder hPLAP-transgener MSC *in vitro*

In den folgenden *in vitro*-Versuchen wurden unterschiedliche MSC-„Subgruppen“ verglichen:

- MSC gesunder junger Fischer 344 Ratten („Gesund“),
- MSC gesunder „alter“ Ratten (d.h. im gleichen Alter wie die ältesten 5/6Nx-Tiere, zwischen 40 und 50 Wochen) („Alterskontrolle“),
- MSC 5/6 nephrektomierter Fischer 344 Ratten („CKDmod-RK“ bzw. „CKDsev-RK“),
- MSC von Ratten mit Adenin-Nephropathie („CKDsev-AD“).

In den späteren *in vivo* Versuchen (siehe Abschnitt 4.4) sollten zudem hPLAP-transgene MSC eingesetzt werden, um ein Tracking der Zellen zu ermöglichen. Zum Ausschluss eines funktionalen Unterschiedes zwischen gesunden Wildtypen und gesunden hPLAP-transgenen MSC, wurde auch diese Gruppe separat *in vitro* analysiert („Transgen“).

4.3.1 Oberflächenmarkerprofil, Zellmorphologie und Aktin Expression gesunder und urämischer MSC

Von allen MSC-Gruppen wurden Cytospins angefertigt und immunzytochemisch gefärbt. Da es bislang noch keinen spezifischen Marker für MSC gibt, wurde die Expression von insgesamt 6 CD-Antigenen getestet.

Entsprechend den Kriterien zur MSC-Definition waren alle MSC-Typen (Gesund, Alterskontrolle, CKDmod-RK, CKDsev-RK, CKDsev-AD) positiv für CD44, CD73 und CD90. Die Färbungen zum Ausschluss hämatopoetischer (CD34 und CD45) und endothelialer Zelltypen (CD31) waren in allen Proben negativ (Abbildung 4.3.1.1).

Ergebnisse

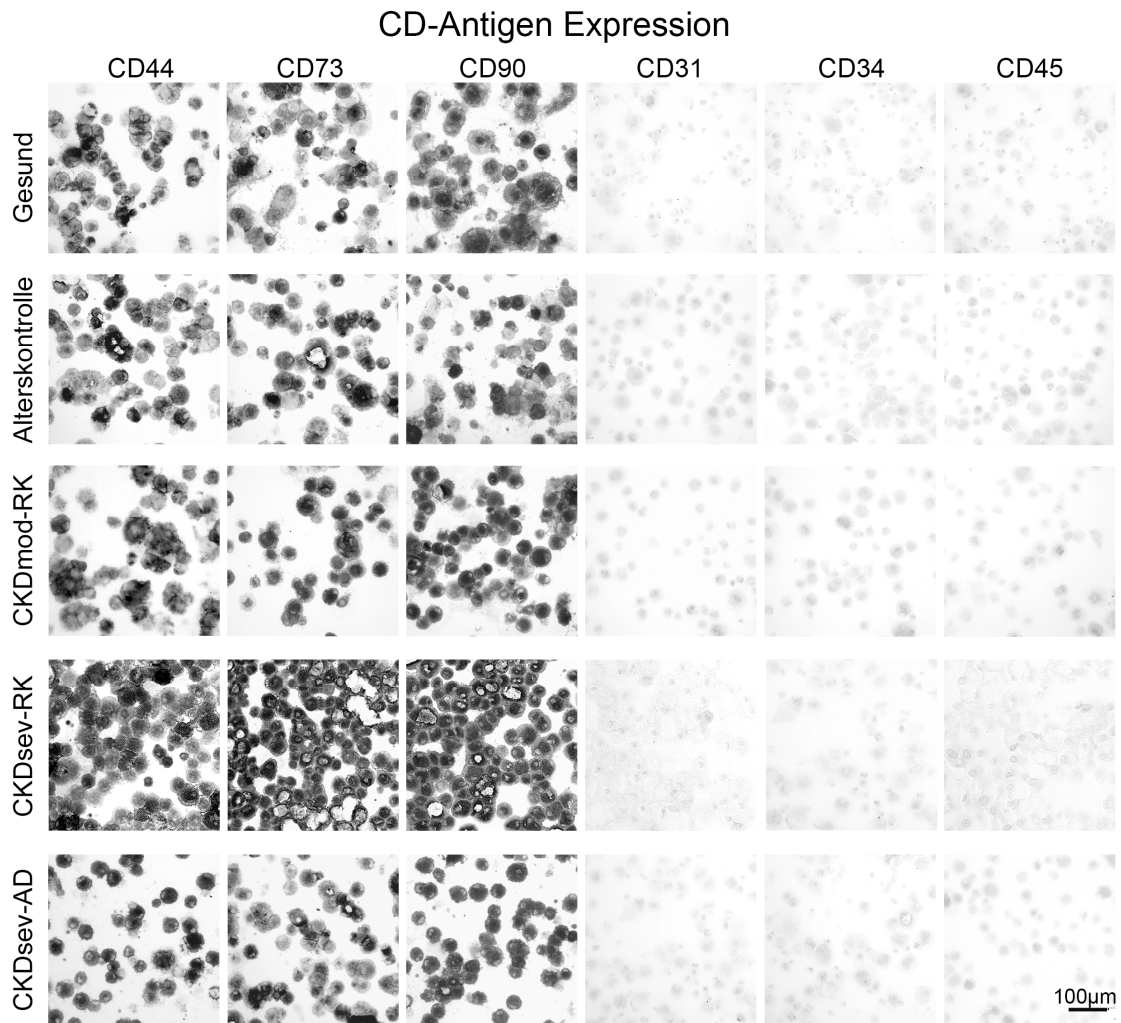


Abbildung 4.3.1.1: CD-Antigen-Expression gesunder und urämischer MSC.
Abgebildet sind immunzytochemisch gefärbte Cytospins. Alle in dieser Arbeit analysierten MSC-Gruppen (Gesund, Alterskontrolle, CKDmod-RK, CKDsev-RK, CKDsev-AD) waren entsprechend der MSC-Definition positiv für CD44, CD73 und CD90 und negativ für CD31, CD34 und CD45.

Obwohl sich die mittleren Zelldurchmesser der verschiedenen MSC (in Suspension gemessen am automatisierten Zellzähler) nicht signifikant unterschieden, waren die urämischen MSC in Kultur deutlich großflächiger (Abbildung 4.3.1.2 A).

Neben dieser flächigen Ausbreitung *in vitro* gilt auch eine Zunahme von Aktin-Stressfasern als morphologisches Merkmal alternder und seneszenten MSC⁹³. Daher wurde in dieser Arbeit die Aktin-Expression in gesunden und urämischen MSC analysiert. Eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts mittels fluoreszent-markiertem Phalloidin machte die stark ausgebildeten Aktinfasern der MSC sichtbar, welche bei urämischen MSC aufgrund ihrer verbreiterten Fläche deutlich zu überwiegen schienen. Eine Quantifizierung des zellulären Gesamt-Aktins per Westernblot (siehe Abbildung 4.3.1.2. B) bestätigte, dass die CKDmod-RK MSC und

Ergebnisse

CKDsev-AD MSC signifikant mehr Aktin exprimieren als gesunde junge und alte MSC (Gesund: $1 \pm 0,28$; Alterskontrolle: $1,05 \pm 0,23$; CKDmod-RK: $2,31 \pm 0,48$; CKDsev-RK: $1,26 \pm 0,72$; CKDsev-AD: $3,02 \pm 1,39$; ANOVA $p < 0,0001$).

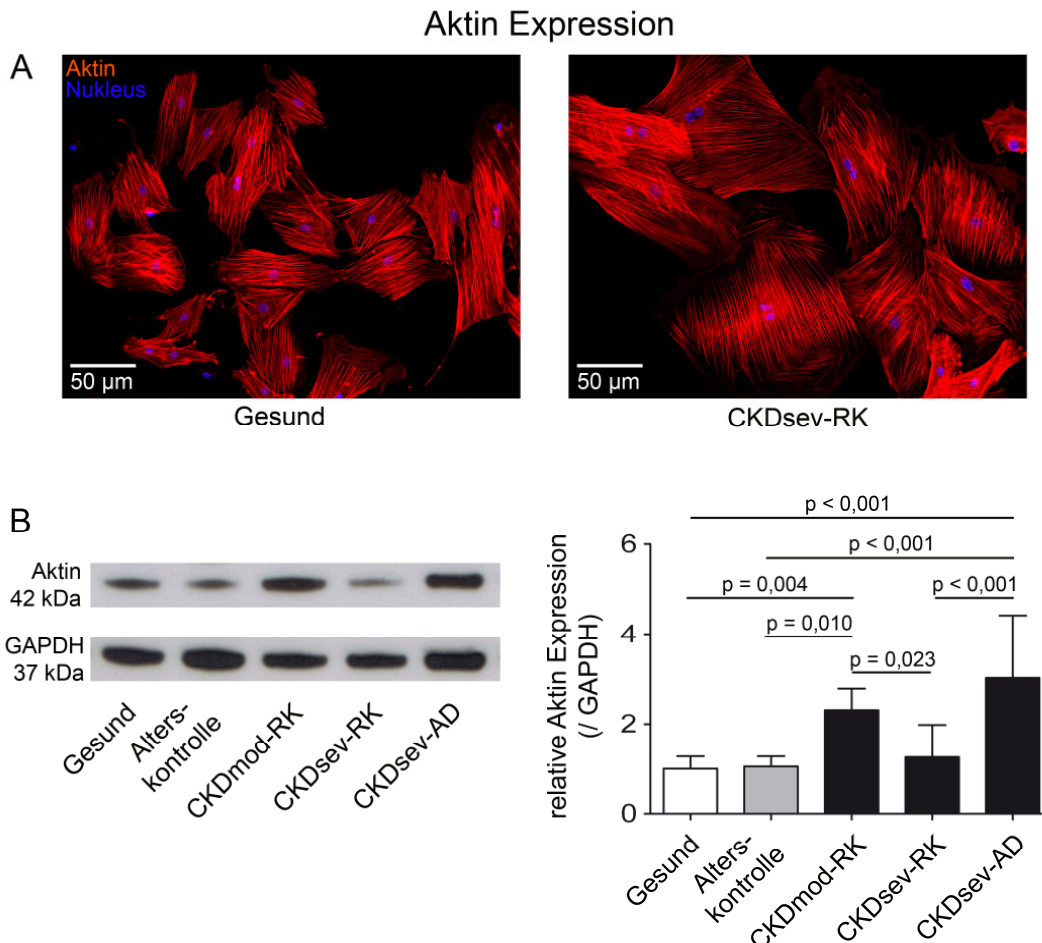


Abbildung 4.3.1.2: Aktin-Zytoskelett und Zellmorphologie gesunder und urämischer MSC.

A) Fluoreszenzaufnahmen gesunder und urämischer MSC nach Färbung des zellulären Aktins mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin (und DAPI-Kernfärbung; TRITC max. Anregung bei 550 nm und max. Emission bei 573 nm, DAPI max. Anregung bei 359 nm und Emission bei 463 nm). **B)** Repräsentativer Westernblot gegen Gesamt-Aktin in MSC-Lysaten (Passage 2) und Quantifizierung (Gesund: $n = 7$ vs. Alterskontrolle $n = 5$ vs. CKDmod-RK $n = 6$ vs. CKDsev-RK $n = 6$ vs. CKDsev-AD $n = 6$; ANOVA $p < 0,0001$ mit LSD posthoc). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Gruppe.

4.3.2 Proliferationskapazität gesunder und urämischer MSC

Die Proliferationskapazität der MSC-Subgruppen wurde in der zweiten Passage bestimmt durch die Berechnung jener Zeit, welche eine Zellpopulation benötigte um sich zu

Ergebnisse

verdoppeln (Gesund (n = 5): 43 ± 8 Std): 140 ± 70 Std vs. CKDsev-RK (n = 4): 113 ± 23 Std. Gesunde MSC verdoppelten sich signifikant schneller als urämische CKDmod-RK MSC und CKDsev-AD MSC ($p = 0,002$ bzw. $0,036$, siehe Abbildung 4.3.2). Auch die MSC alter Ratten (Alterskontrolle) proliferierten schneller als urämische CKDmod-RK MSC ($p = 0,006$). Die Proliferationskapazität gesunder MSC junger und alter Spendertiere unterschied sich hingegen nicht ($p = 0,887$).

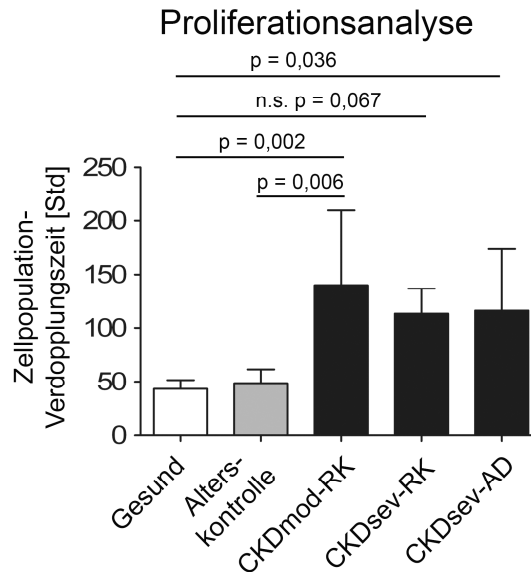


Abbildung 4.3.2: Verdopplung der Zellpopulation bei gesunden und urämischen MSC. Vergleich der Zellpopulationsverdopplungszeiten (Gesund (n = 5) vs. Alterskontrolle (n = 4) vs. CKDmod-RK (n = 15) vs. CKDsev-RK (n = 4) vs. CKDsev-AD (n = 6); ANOVA: $p = 0,008$ mit LSD Posthoc). Gesunde MSC hatten eine signifikant höhere Proliferationskapazität als CKDmod-RK MSC oder CKDsev-AD MSC. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Gruppe.

4.3.3 Seneszenz-Marker: Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase

Nachdem die urämischen MSC eine teils signifikant erniedrigte Proliferationskapazität aufwiesen, wurde zusätzlich überprüft, ob in diesen Zellen als weiteres Seneszenzmerkmal vermehrt die sog. Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase (Sa- β -Gal) aktiv war. Diese konnte mittels enzymatischer Färbung in kultivierten Zellen nachgewiesen werden. In Abbildung 4.3.3.1 C-G sind repräsentative Fotos aller MSC-Subgruppen in Passage 2 sowie die Quantifizierung der Sa- β -Gal positiven Zellen dargestellt (4.3.3.1 A: Gesund (n = 7) vs. Alterskontrolle (n = 4) vs. CKDmod-RK (n = 7) vs. CKDsev-RK (n = 8) vs. CKDsev-AD (n = 7), ANOVA: $p = 0,002$). In CKDsev-RK MSC war der Anteil von Sa- β -Gal positiven Zellen mit $49 \pm 29\%$ signifikant höher als in gesunden jungen (Gesund: $6 \pm 4\%$, $p = 0,002$).

Ergebnisse

und gesunden alten (Alterskontrolle: $12 \pm 8\%$, $p = 0,030$) oder auch CKDsev-AD MSC ($13 \pm 8\%$, $p = 0,010$).

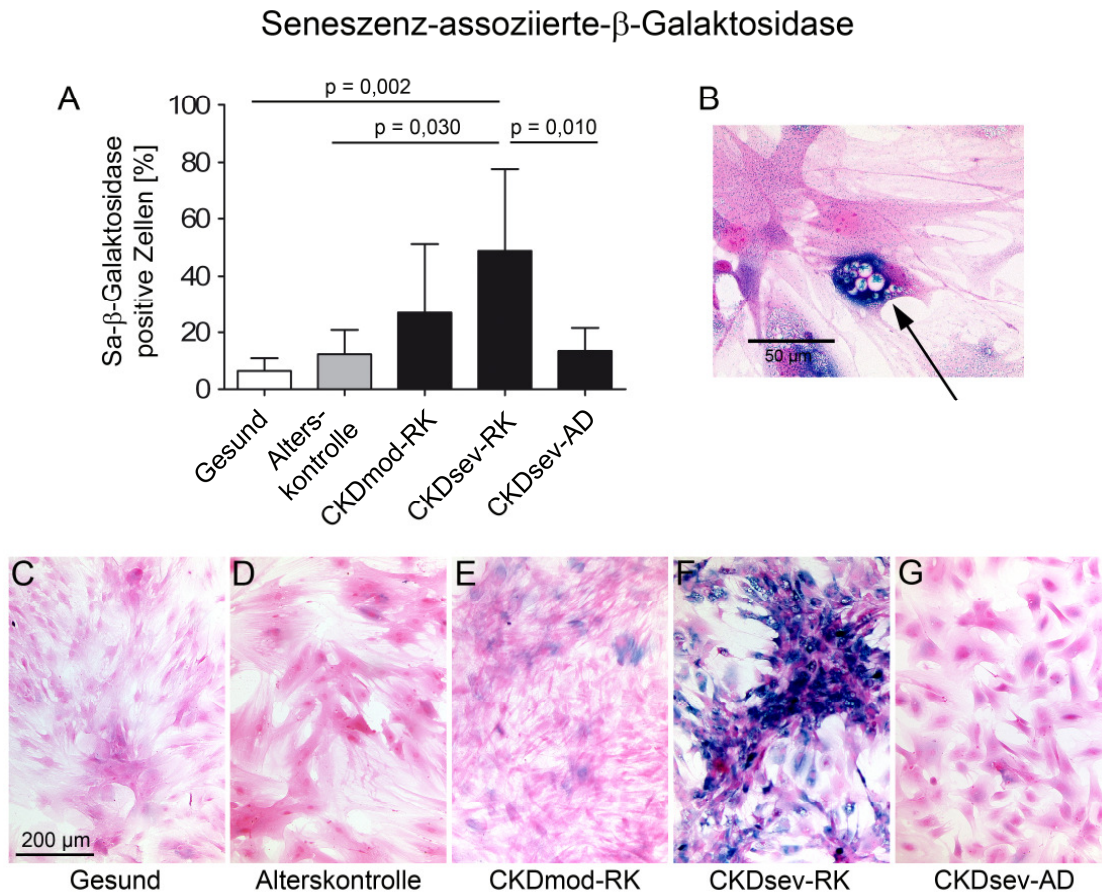


Abbildung 4.3.3.1: Quantifizierung von Seneszenz-assoziiertes- β -Galaktosidase in gesunden und urämischen MSC.

A) Vergleich der Anteile Sa- β -Gal positiver Zellen in verschiedenen MSC-Subgruppen in Passage 2 (Gesund ($n = 7$) vs. Alterskontrolle ($n = 4$) vs. CKDmod-RK ($n = 7$) vs. CKDsev-RK ($n = 8$) vs. CKDsev-AD ($n = 7$); ANOVA: $p = 0,002$ mit Tukey posthoc). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Gruppe. **B)** Stark blau gefärbte MSC wiesen oftmals eine Vakuolisierung auf (Pfeil). **C-G)** Repräsentative Fotos der enzymatischen Sa- β -Gal-Färbung, welche in Teilabbildung A quantifiziert wurde. Intensive Blaufärbung könnte sowohl auf erhöhte Sa- β -Gal-Aktivität als auch auf erhöhte Level der Proteinexpression zurückgeführt werden.

Es fiel auf, dass in den stark Sa- β -Gal positiven, also blau gefärbten, MSC oft mehrere große Vakuolen zu sehen waren. Diese konnten später durch Oil Red O-Färbung als Lipidvakuolen identifiziert werden, welche während einer spontanen Fettdifferenzierung der CKDsev-RK MSC entstanden (siehe Abschnitt 4.3.4).

Ergebnisse

Zusätzlich wurde in Proteinlysaten der verschiedenen MSC die Aktivität des Enzyms quantifiziert (siehe Abbildung 4.3.3.2), da eine intensive Blaufärbung bei der enzymatischen Färbung in Abbildung 4.3.3.1 sowohl auf erhöhter Proteinexpression der Galaktosidase als auch auf erhöhter Enzymaktivität hätte beruhen können. Im Aktivitätsassay bestätigte sich, dass in CKDsev-RK MSC die Sa- β -Gal-Aktivität signifikant höher ist ($p = 0,011$) verglichen mit gesunden MSC (Gesund ($n = 6$): $1 \pm 0,2$ RFU/ μ g Protein vs. CKDmod-RK ($n = 6$): $1,3 \pm 0,4$ RFU/ μ g Protein vs. CKDsev-RK ($n = 5$): $2,3 \pm 1$ RFU/ μ g Protein; ANOVA: $p = 0,011$). Gleichzeitig ist die Aktivität in CKDsev-RK MSC ebenfalls signifikant höher als in CKDmod-RK MSC ($p = 0,040$).

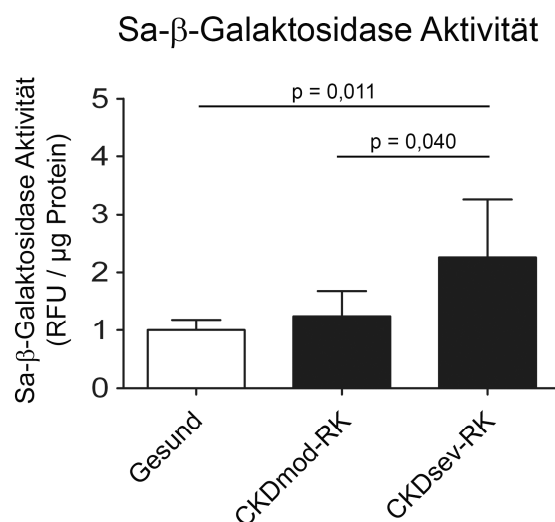


Abbildung 4.3.3.2: Aktivität der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidase in gesunden und urämischen MSC.

Quantifizierung der Sa- β -Gal-Aktivität in Proteinlysaten der verschiedenen MSC in Passage 2 (Gesund ($n = 6$) vs. CKDmod-RK ($n = 6$) vs. CKDsev-RK ($n = 5$); ANOVA: $p = 0,011$ mit Tukey Posthoc). Die Sa- β -Gal-Aktivität in CKDsev-RK MSC war signifikant höher als in gesunden MSC und CKDmod-RK MSC. In der Enzymaktivität von gesunden und CKDmod-RK MSC war kein Unterschied messbar ($p = 0,768$). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für jede Gruppe.

4.3.4 Adipogenese in gesunden und urämischen MSC

Neben der Proliferationskapazität wurde auch die Differenzierungskapazität der urämischen MSC in der dritten Passage getestet. Zum Nachweis einer Fettdifferenzierung wurden sowohl native als auch adipogen differenzierte Zellen mit Oil Red O angefärbt (siehe Abbildung 4.3.4.1).

Dabei zeigte sich, dass sowohl in gesunden als auch in MSC aus *remnant kidney* Ratten (CKDmod-RK MSC und CKDsev-RK MSC) eine adipogene Differenzierung mittels

Ergebnisse

Induktionsmedium möglich war (Abbildung 4.3.4.1 D bis F). Die Färbung an nativen Zellen zeigte desweiteren, dass CKDsev-RK MSC außerdem auch ohne zusätzlichen adipogenen Differenzierungsanreiz spontan Lipidvakuolen akkumulierten (Abbildung 4.3.4.1 C), während gesunde MSC keine und CKDmod-RK MSC nur wenig Fett enthielten. Verglichen mit der induzierten Fettdifferenzierung sind die spontan gebildeten Vakuolen eher klein und feindispers. In Kombination mit der Färbung für Sa- β -Galaktosidase fiel auf, dass tendenziell die Zellen mit häufiger Ausbildung von Fettvakuolen ebenfalls positiv für den Seneszenznachweis waren (siehe ko-Lokalisation in Abbildung 4.3.3.1 B).

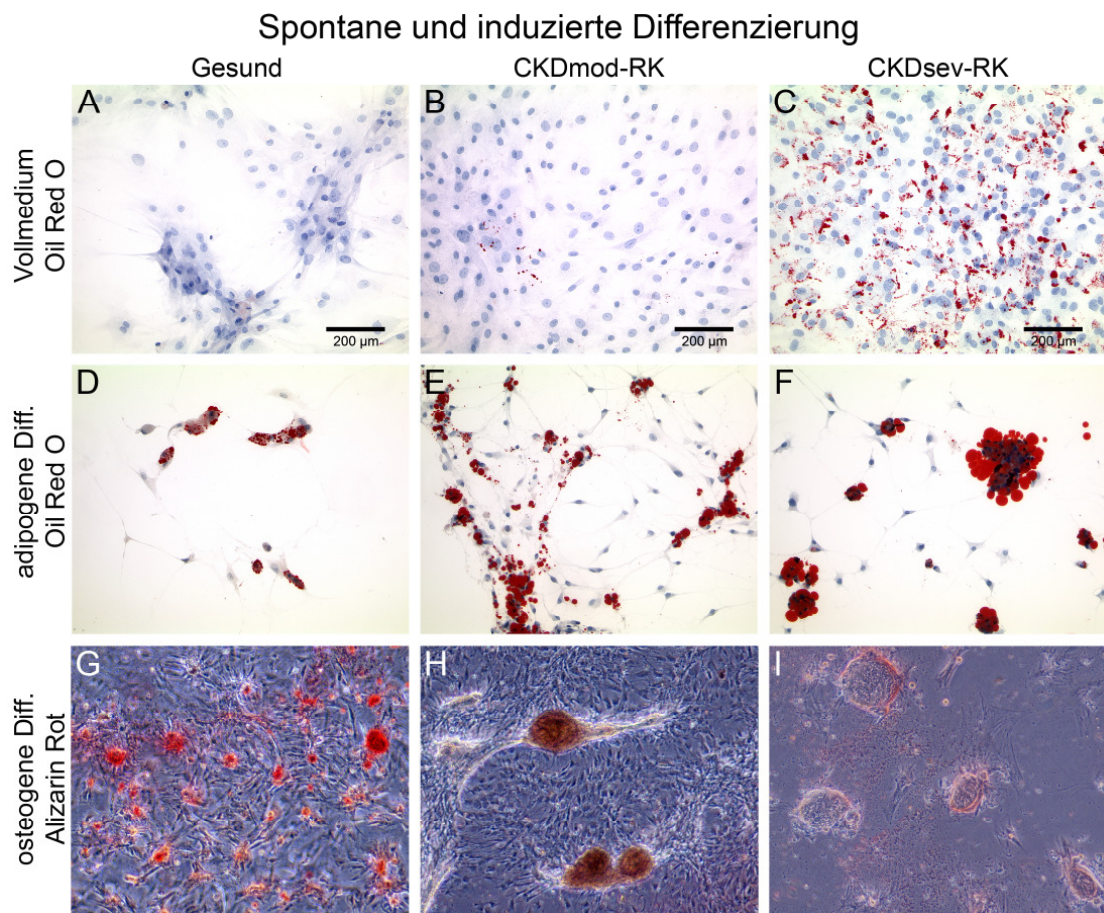


Abbildung 4.3.4.1: Spontane und induzierte adipogene Differenzierung in gesunden und urämischen MSC.

Bilder A bis C zeigen eine Oil Red O Färbung zum Nachweis spontaner Fettdifferenzierung der in Vollmedium kultivierten gesunden und urämischen MSC. Auch eine induzierte adipogene Differenzierung wurde mittels Oil Red O bestätigt (D bis F). Durch Kultur im osteogenen Differenzierungsmedium und anschließenden Kalziumnachweis durch Alizarin Rot Färbung konnte in gesunden und urämischen MSC eine prinzipielle osteogene Differenzierungskapazität bestätigt werden (G bis I).

Ergebnisse

Auch die osteogene Differenzierung wurde mittels speziellem Induktionsmedium ausgelöst. Sowohl gesunde als auch urämische MSC zeigten nach 21 Tagen Kultur im osteogenen Differenzierungsmedium Alizarin Rot gefärbte Kalziumablagerungen. Trotz der spontanen Fettdifferenzierung der CKDsev-RK MSC war also noch eine Differenzierungskapazität in Richtung Knochen vorhanden.

Zur Verifizierung der Färbeergebnisse der spontanen adipogenen Differenzierung wurde auch die mRNA Expression verschiedener differenzierungsrelevanter Gene analysiert.

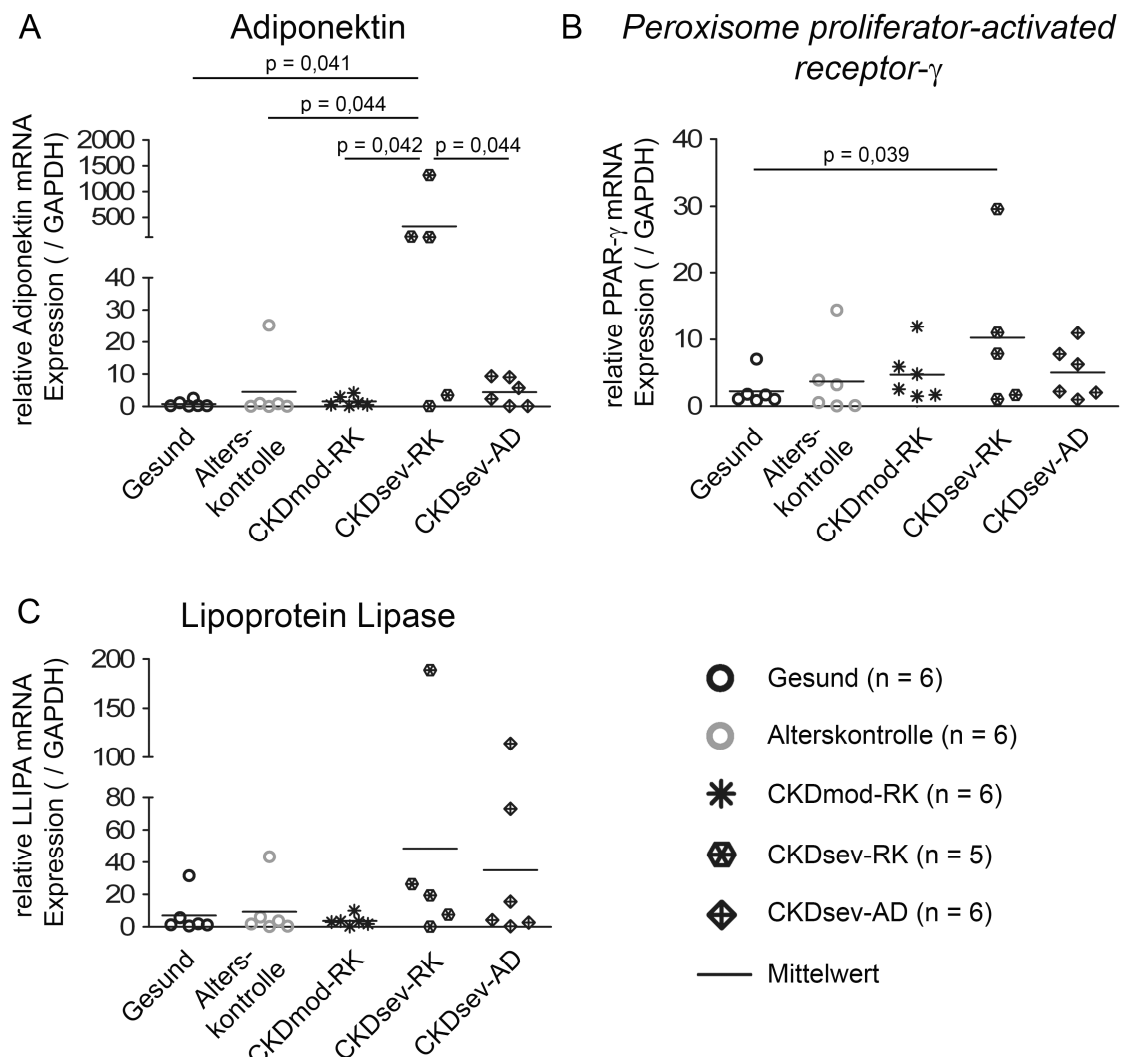


Abbildung 4.3.4.2: mRNA Expression verschiedener Adipogenese-Marker bei spontaner Differenzierung von gesunden und urämischen MSC.

mRNA Expression von Adiponektin (A), des *Peroxisome proliferator-activated receptors- γ* (PPAR- γ) (B) und der Lipoprotein Lipase (C) für die verschiedenen MSC Subgruppen (Gesund (n = 6) vs. Alterskontrolle (n = 6) vs. CKDmod-RK (n = 6) vs. CKDsev-RK (n = 5) vs. CKDsev-AD (n = 6)). Dargestellt sind die einzelnen MSC-Proben in Passage 3 sowie die Mittelwerte aller Gruppen.

Ergebnisse

Abbildung 4.3.4.2 zeigt die Expression von Adiponektin, des *Peroxisome proliferator-activated receptors-γ* (PPAR-γ) und der Lipoproteinlipase für die verschiedenen MSC Subgruppen (Gesund (n = 6) vs. Alterskontrolle (n = 6) vs. CKDmod-RK (n = 6) vs. CKDsev-RK (n = 5) vs. CKDsev-AD (n = 6)). Alle drei Moleküle sind Marker der adipogenen Differenzierung^{94,95}. CKDsev-RK MSC exprimieren signifikant mehr Adiponektin mRNA als gesunde-, alte-, CKDmod-RK- oder CKDsev-AD MSC (p = 0,041; 0,044; 0,042 bzw. 0,044). Ebenfalls ist ihr mRNA Anteil für PPARγ signifikant höher als in gesunden MSC (p = 0,039). Bei der Lipoproteinlipase konnte in den Vergleichen der Expressionslevel aufgrund hoher Standardabweichungen kein Signifikanzniveau erreicht werden, dennoch ist die Expression in CKDsev MSC (RK sowie AD) tendenziell höher als in gesunden MSC (Gesund: 7 ± 12 vs. CKDsev-RK: 48 ± 79 vs. CKDsev-AD: 35 ± 48; p = 0,101 bzw. 0,238).

Es wurde zusätzlich überprüft, ob MSC auch spontan in die osteogene Linie differenzieren. Hierzu wurden die mRNA-Level der osteogenen Marker⁹⁶⁻⁹⁸ *Core-binding factor subunit α1* (Cbfα1 auch Runx2), Osteopontin und Osteocalcin quantifiziert (Tabelle 4.3.4 und Tabelle Z3 im Anhang).

Tabelle 4.3.4: Spontane osteogene Differenzierung gesunder und urämischer MSC.

mRNA Expression von Cbfα1 (*core-binding factor subunit α1*), Osteopontin und Osteocalcin für die verschiedenen MSC Subgruppen (Gesund (n = 6) vs. Alterskontrolle (n = 6) vs. CKDmod-RK (n = 6) vs. CKDsev-RK (n = 5) vs. CKDsev-AD (n = 6)). Verglichen mit gesunden MSC exprimieren CKDmod-RK MSC und CKDsev-RK MSC signifikant mehr Cbfα1 mRNA (ANOVA aller Gruppen: p = 0,011; LSD Posthoc: p = 0,046 (Gesund vs. CKDmod-RK) bzw. p = 0,015 (Gesund vs. CKDsev-RK)). Während bei Osteopontin keine signifikanten Unterschiede auftraten (ANOVA: p = 0,246), exprimieren CKDmod-RK MSC signifikant mehr Osteocalcin mRNA als gesunde MSC (ANOVA: p = 0,006; LSD Posthoc: p = 0,002).

= signifikant gegenüber Gesund

Eine ausführliche Statistik befindet sich in Tabelle Z3 im Anhang.

| | Gesund (n = 6) | Alterskontrolle (n = 6) | CKDmod-RK (n = 6) | CKDsev-RK (n = 5) | CKDsev-AD (n = 6) |
|-------------|-------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Cbfα1 | 1 ± 0.34 | 1.43 ± 0.93 | 2.09 ± 0.99 # | 2.47 ± 1.36 # | 0.70 ± 0.28 |
| Osteopontin | 1 ± 0.75 | 0.57 ± 0.52 | 2.47 ± 1.69 | 1.82 ± 2.10 | 1.27 ± 0.90 |
| Osteocalcin | 1 ± 0.54 | 1.24 ± 1.09 | 7.33 ± 3.75 # | 5.34 ± 6.68 | 0.72 ± 0.57 |

Während für Osteopontin keine signifikanten Unterschiede zwischen den MSC Gruppen messbar waren (Gesund (n = 6) vs. Alterskontrolle (n = 6) vs. CKDmod-RK (n = 6) vs. CKDsev-RK (n = 5) vs. CKDsev-AD (n = 6); ANOVA p = 0,246), exprimierten

Ergebnisse

CKDmod-RK MSC signifikant mehr Cbfa1 und Osteocalcin als gesunde MSC ($p = 0,046$ (Cbfa1) bzw. $p = 0,002$ (Osteocalcin)). Auch CKDsev-RK MSC Kulturen enthielten durchschnittlich signifikant höhere Cbfa1-mRNA Level als gesunde MSC ($p = 0,015$).

4.3.5 Sekretionsprofile von gesunden und urämischen MSC

Da MSC vor allem aufgrund ihrer parakrinen Eigenschaften interessant für therapeutische Einsätze sind^{21,26}, wurden die Sekretionsprofile von gesunden und urämischen MSC *in vitro* verglichen.

Die Quantifizierung von TGF- β (engl. *tumor necrosis factor- β*) in Zellkulturüberständen mittels ELISA, abgebildet in Diagramm 4.3.5.1, ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen gesunden (3288 ± 2395 pg/ml, $n = 6$) und CKDmod-RK MSC (1744 ± 828 pg/ml, $n = 8$) oder CKDsev-RK MSC (2997 ± 1972 pg/ml, $n = 3$), ANOVA: $p = 0,250$.

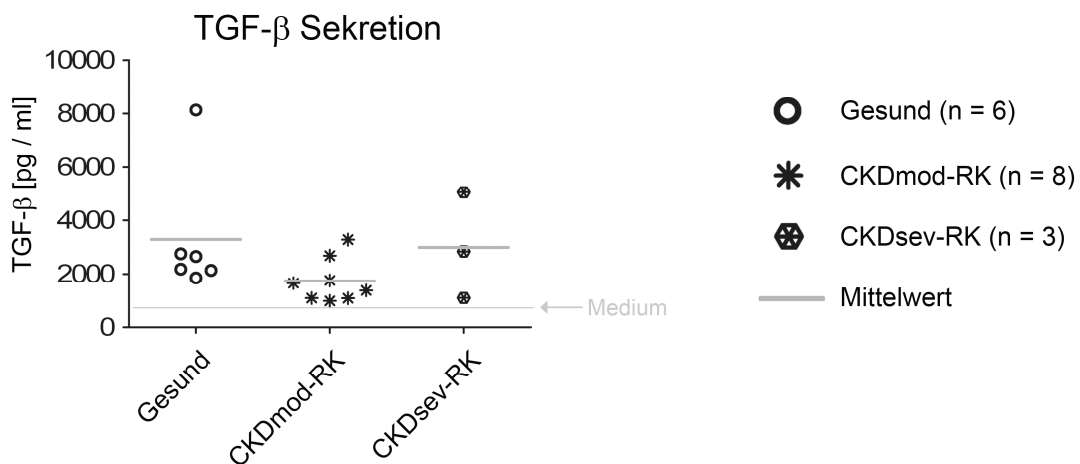


Abbildung 4.3.5.1: TGF- β Sekretion gesunder und urämischer MSC.

Die Konzentration von TGF- β in Zellkulturüberständen von gesunden (3288 ± 2395 pg/ml), CKDmod-RK- (1744 ± 828 pg/ml) oder CKDsev-RK MSC (2997 ± 1972 pg/ml) unterschied sich nicht (ANOVA: $p = 0,250$). Dargestellt sind die einzelnen MSC-Proben in Passage 2 sowie die Mittelwerte aller Gruppen. Zudem ist die gemessene Konzentration im reinen Vollmedium angezeigt.

Als nächstes wurden die mRNA Expressionen der Mitglieder des PDGF-Systems (engl. *platelet derived growth factor*) analysiert. In Abbildung 4.3.5.2 sind die Expressionslevel der vier Liganden PDGF-A, -B, -C, -D sowie deren Rezeptoren PDGFR- α und - β für die verschiedenen MSC Gruppen dargestellt (Gesund ($n = 9$) vs. CKDmod-RK ($n = 17$) vs. CKDsev-RK ($n = 13$) vs. CKDsev-AD ($n = 8$)).

Expression von PDGFs und PDGF Rezeptoren

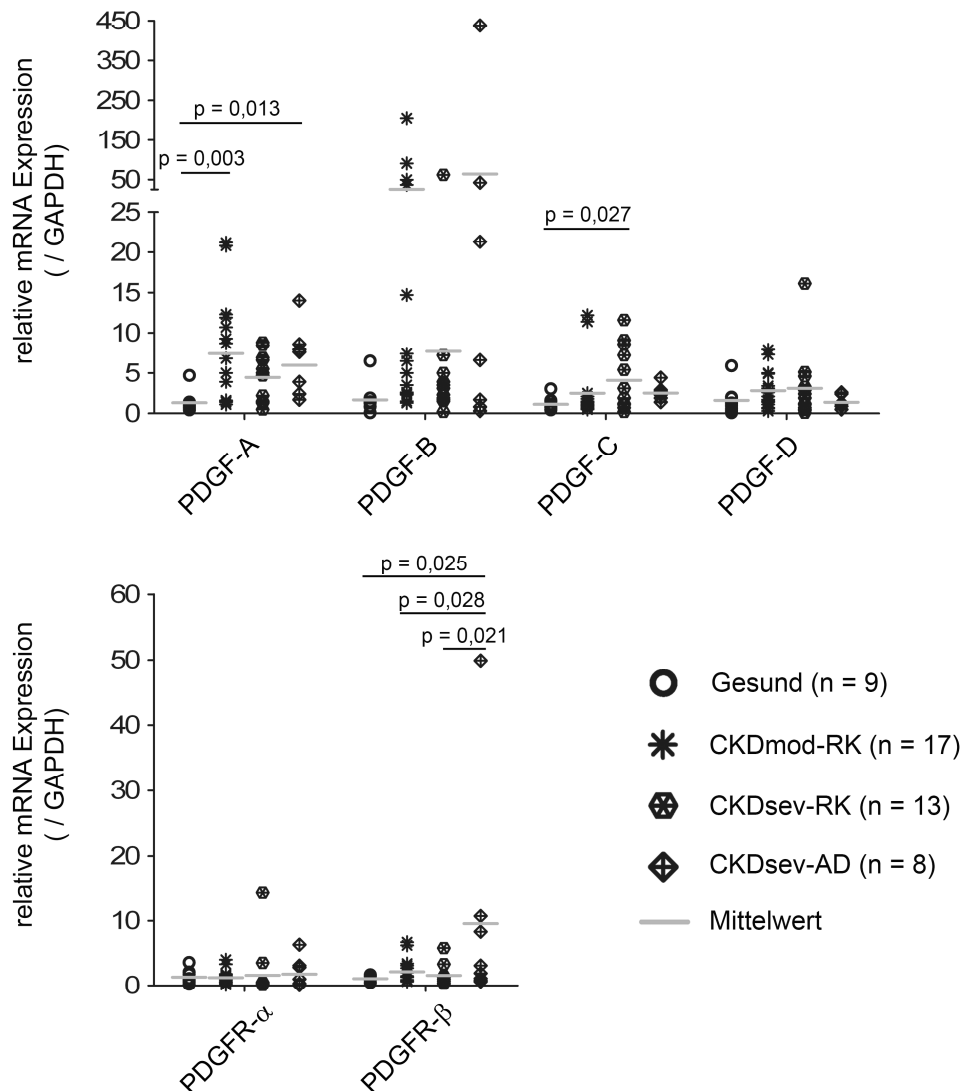


Abbildung 4.3.5.2: mRNA Expression von PDGF-Liganden und –Rezeptoren in gesunden und urämischen MSC.

Vergleich der Expression von PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D, PDGFR-α und PDGFR-β in den verschiedenen MSC Gruppen (Gesund (n = 9) vs. CKDmod-RK (n = 17) vs. CKDsev-RK (n = 13) vs. CKDsev-AD (n = 8)). CKDmod-RK MSC exprimieren mehr PDGF-A als gesunde MSC, während CKDsev-RK MSC mehr PDGF-C exprimieren als gesunde MSC. CKDsev-AD MSC wiesen höhere mRNA Level von PDGF-A und PDGFR-β auf verglichen mit gesunden MSC. Dargestellt sind die einzelnen MSC-Proben in Passage 2 sowie die Mittelwerte aller Gruppen.

Auf mRNA Ebene war PDGF-A in CKDmod-RK und CKDsev-AD MSC signifikant hochreguliert gegenüber gesunden MSC (ANOVA: $p = 0,017$ mit LSD Posthoc: $p = 0,003$ bzw. $0,013$). Obwohl PDGF-B auch in allen getesteten urämischen MSC durchschnittlich deutlich stärker exprimiert war als in gesunden MSC erreichten diese Unterschiede aufgrund hoher Standardabweichungen kein Signifikanzniveau (ANOVA: $p = 0,324$). In CKDsev-RK

Ergebnisse

MSC konnte signifikant mehr PDGF-C mRNA gemessen werden als in gesunden MSC ($p = 0,027$), wohingegen keine Unterschiede in der PDGF-D Expression zwischen den MSC Subgruppen vorlagen (ANOVA: $p = 0,393$). Auch die relative mRNA Expression der zwei PDGF-Rezeptoren α und β wurden mittels *TaqMan* Analysen quantifiziert. Während keine Unterschiede in der PDGFR- α Expression detektierbar waren, exprimierten CKDsev-AD MSC signifikant mehr PDGFR- β mRNA als gesunde-, CKDmod-RK- oder CKDsev-RK MSC ($p = 0,025$; $0,028$ bzw. $0,021$ im LSD Posthoc).

Generell war die Expression der Liganden und Rezeptoren des PDGF-Systems in urämischen MSC erhöht.

Über Spot-Arrays konnte ein breites Spektrum der Sekretionsprofile der unterschiedlichen MSC hinsichtlich verschiedener Zytokine verglichen werden. In Tabelle 4.3.5 sind die verschiedenen Gruppen (Gesund ($n = 5$) vs. CKDmod-RK ($n = 8$) vs. CKDsev-RK ($n = 4$) vs. CKDsev-AD ($n = 7$) einander gegenübergestellt (eine noch ausführlichere Analyse befindet sich im Anhang in Tabelle Z4).

Keine der MSC Gruppen sezernierte CNTF (engl. *ciliary neurotrophic factor*), GM-CSF (engl. *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*), IFN- γ (Interferon- γ), L-Selektin oder MIG (engl. *monokine induced by γ -Interferon*, auch CXCL9 (C-X-C Motiv Ligand 9)). Ebenfalls waren in keinem der konditionierten Medien die Interleukine IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-13 oder IL-17 zu detektieren. Alle MSC Gruppen produzierten in Passage 2 hohe Mengen an CINC-1 (engl. *cytokine induced neutrophil chemoattractant-1*), LIX (engl. *lipopolysaccharide induced CXC chemokine*, auch CXCL5 (C-X-C Motiv Ligand 5)), MIP-3 α (engl. *macrophage inflammatory protein-3 α*), TIMP-1 (engl. *tissue inhibitor of metalloproteinases-1*) und VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) und geringere Mengen sICAM-1 (engl. *soluble intercellular adhesion molecule-1*). In den Überständen gesunder und CKD-RK MSC waren zudem geringe Konzentrationen Fraktalkin (auch CX3CR1 (C-XXX-C Motiv Chemokin-Rezeptor 1)), IL-1-ra (Interleukin1-Rezeptor-Antagonist), IL-6, CXCL7 (C-X-C Motiv Ligand 7), CXCL10 (C-X-C Motiv Ligand 10), RANTES (engl. *regulated on activation normal T cell expressed and secreted*) und TNF- α (engl. *tumor necrosis factor- α*) detektierbar. Statistisch signifikante Unterschiede konnten mittels Varianzanalyse für CINC-2 α/β (engl. *cytokine induced neutrophil chemoattractant-2 α/β* ; ANOVA: $p = 0,031$), CINC-3 (engl. *cytokine induced neutrophil chemoattractant-3*; ANOVA: $p = 0,032$) und MIP-1 α (engl. *macrophage inflammatory protein-1 α* ; ANOVA: $p = 0,030$) belegt werden.

Ergebnisse

Gesunde MSC sezernierten signifikant mehr CINC-2 α / β und CINC-3 als CKDsev-AD MSC ($p = 0,039$ bzw. $0,030$, Tukey Posthoc). Zudem enthielten konditionierte Medien gesunder MSC durchschnittlich signifikant mehr MIP-1 α als Medium von CKDsev-RK MSC.

Tabelle 4.3.5: Cytokin-Array von Zellkulturüberständen gesunder und urämischer MSC.

Dargestellt sind die Konzentrationen der Zytokine in Zellkulturüberständen verschiedener MSC-Präparationen. Die Quantifizierung erfolgte durch Bestimmung der angefärbten Fläche und Farbintensität (Pixel), normiert wurden die Werte auf Array-interne Kontrollen.

Die Level von CINC-2 α / β (ANOVA: $p = 0,031$), CINC-3 (ANOVA: $p = 0,032$) und MIP-1 α (ANOVA: $p = 0,030$) zeigen signifikante Konzentrationsunterschiede in den konditionierten Medien verschiedener MSC.

= signifikanter Unterschied gegenüber „Gesund“. (ausführliche Tabelle Z4 im Anhang).

| | Gesund (n = 5) | CKDmod-RK (n = 8) | CKDsev-RK (n = 4) | CKDsev-AD (n = 7) |
|---|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| CINC-1 <i>cytokine induced neutrophil chemoattractant-1</i> | 124 \pm 50 | 108 \pm 24 | 77 \pm 40 | 111 \pm 45 |
| CINC-2α/β <i>cytokine induced neutrophil chemoattractant-2α/β</i> | 106 \pm 78 | 89 \pm 42 | 46 \pm 67 | 11 \pm 28 # |
| CINC-3 <i>cytokine induced neutrophil chemoattractant-3</i> | 66 \pm 81 | 26 \pm 23 | -2 \pm 21 | -3 \pm 2 # |
| Fraktalkin = CX3CR1 (C-XXX-C Motiv Chemokin-Rezeptor 1) | 12 \pm 33 | 21 \pm 25 | 12 \pm 52 | -2 \pm 3 |
| sICAM-1 <i>soluble intercellular adhesion molecule-1</i> | 36 \pm 25 | 33 \pm 14 | 33 \pm 45 | 12 \pm 9 |
| IL-1-ra Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist | 32 \pm 34 | 27 \pm 23 | 27 \pm 44 | -3 \pm 1 |
| IL-6 Interleukin-6 | 47 \pm 43 | 25 \pm 26 | 23 \pm 44 | 1 \pm 2 |
| CXCL10 C-X-C Motiv Ligand 10 | 17 \pm 12 | 16 \pm 10 | 28 \pm 41 | 1 \pm 2 |
| LIX <i>lipopolysaccharide induced CXC chemokine</i> | 120 \pm 99 | 97 \pm 47 | 55 \pm 62 | 38 \pm 48 |
| MIP-1α <i>macrophage inflammatory protein-1α</i> | 77 \pm 58 | 44 \pm 38 | -9 \pm 18 # | 24 \pm 28 |
| MIP-3α <i>macrophage inflammatory protein-3α</i> | 104 \pm 75 | 93 \pm 31 | 49 \pm 58 | 85 \pm 44 |
| RANTES <i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i> | 31 \pm 25 | 54 \pm 57 | 15 \pm 37 | 0 \pm 4 |
| CXCL7 C-X-C Motiv Ligand 7 | 17 \pm 21 | 14 \pm 12 | 5 \pm 20 | -3 \pm 1 |
| TIMP-1 <i>tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> | 150 \pm 87 | 116 \pm 36 | 103 \pm 2 | 137 \pm 43 |
| TNF-α <i>tumor necrosis factor-α</i> | 14 \pm 10 | 10 \pm 5 | 8 \pm 20 | -1 \pm 3 |
| VEGF <i>vascular endothelial growth factor</i> | 150 \pm 90 | 113 \pm 36 | 88 \pm 26 | 101 \pm 45 |

Ergebnisse

Verglichen mit Kulturbedingungen im NRK-Vollmedium oder MSC-Vollmedium waren die Zellen schmaler und prägten deutlicher eine Spindelform aus. Während die Fibroblasten im konditionierten Medium gesunder MSC noch ähnlich dicht wuchsen wie im NRK- oder MSC-Vollmedium, war die Zelldichte bei CKDmod-RK- oder CKDsev-RK MSC Medium deutlich vermindert. Abbildung 4.3.5.3 B zeigt die mRNA Expression der Fibrosemarker Kollagen I und III durch NRK-Zellen nach Stimulation mit Medium gesunder und urämischer MSC. Für beide Kollagene ist die mRNA Expression nach Stimulation mit Medium von CKDsev-RK MSC am höchsten und erreicht bei Kollagen I ein Signifikanzniveau (Gesund vs. CKDsev-RK: $p = 0,034$).

Tendenziell stimulieren also CKDsev-RK MSC Fibroblasten eher zur Matrixsynthese als gesunde Zellen. Mit Zunahme der Matrixproduktion verringert sich der proliferative Phänotyp der Fibroblasten.

4.3.6 Eigenschaften hPLAP-transgener MSC *in vitro*

Da in den *in vivo* Experimenten hPLAP-transgene MSC zum Zwecke des Zell-Trackings eingesetzt werden sollten, wurde im Vorfeld getestet, ob sich *in vitro* Unterschiede zwischen gesunden und transgenen MSC zeigen, welche die *in vivo* Ergebnisse beeinflussen könnten. In Abbildung 4.3.6 sind die Ergebnisse der *in vitro* Charakterisierung hPLAP-transgener MSC dargestellt.

Auch transgene MSC exprimieren die CD-Antigene CD44, CD73 und CD90 und sind entsprechend der MSC-Kriterien defizient für CD31, CD34 und CD45 (Abbildung 4.3.6 A). Obwohl die Proliferation leicht erniedrigt war verglichen mit gesunden wildtyp MSC ist der Trend nicht signifikant (Zellpopulationsverdopplungszeit Gesund (wildtyp, $n = 5$): 43 ± 8 Std vs. Transgen ($n = 6$): 59 ± 33 Std, $p = 0,333$; Abbildung 4.3.6 B).

Desweiteren unterschieden sich gesunde wildtyp- und gesunde transgene MSC weder in der Produktion von TGF- β (Gesund: 3287 ± 2395 pg/ml vs. Transgen: 2899 ± 2592 pg/ml, $p = 0,814$, Abbildung 4.3.6 C), noch in der Produktion zahlreicher Zytokine (Array: CINC-1, CINC-2 α/β , CINC-3, CNTF, Fractalkine, GM-CSF, sICAM-1, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, CXCL10, LIX, L-Selectin, CXCL7, MIP-1 α , MIP-3 α , Rantes, CXCL7, TIMP-1, TNF- α , VEGF; alle n.s., siehe Tabelle Z4 im Anhang). MSC aus dem Knochenmark hPLAP-transgener Ratten waren (weitestgehend) negativ für Sa- β -Galaktosidase (Abbildung 4.3.6 D).

Alle *in vitro* Tests konnten keine Unterschiede zwischen gesunden wildtyp und hPLAP-transgenen MSC festmachen.

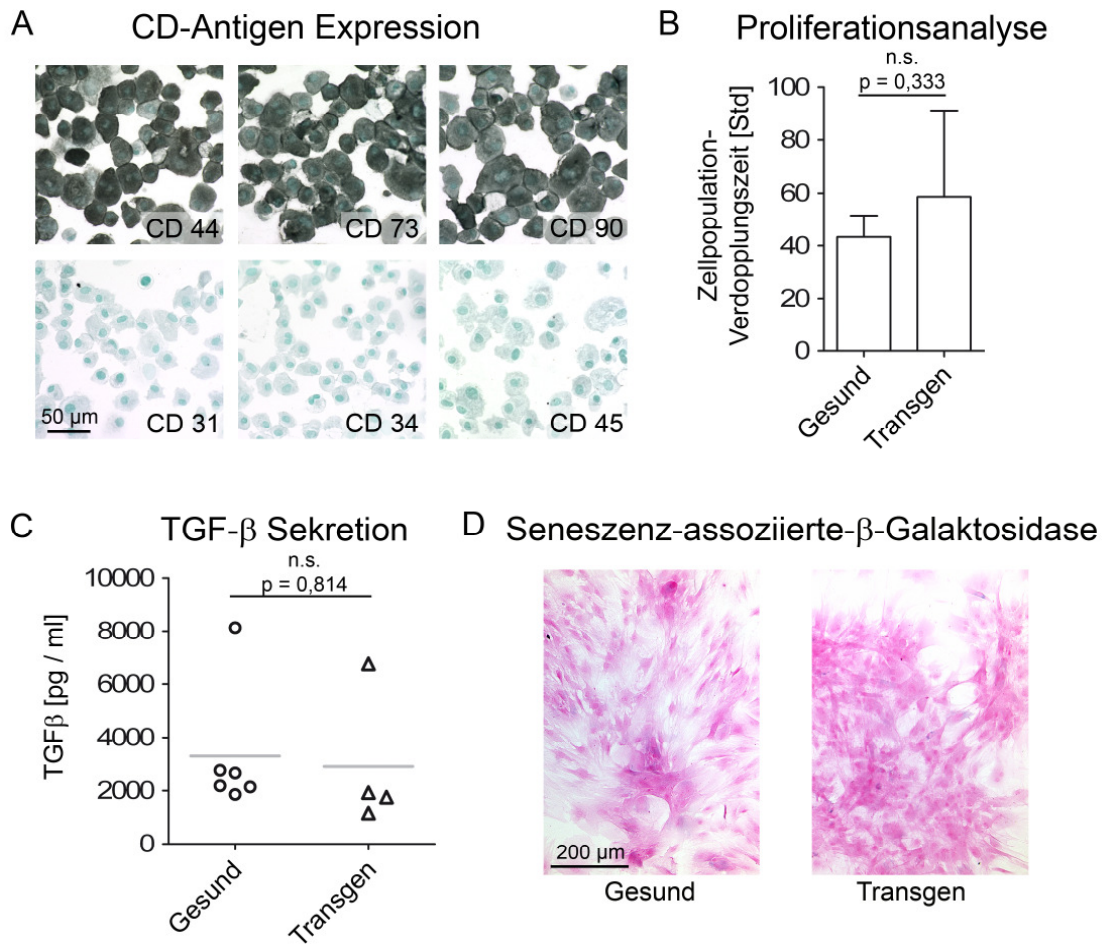


Abbildung 4.3.6: Charakterisierung hPLAP transgener MSC *in vitro*.

A) MSC hPLAP-transgener Ratten exprimierten ein typisches MSC-Marker-Profil, welches durch Immunzytochemie analysiert wurde. Transgene MSC unterschieden sich nicht von gesunden MSC bezüglich Proliferation ($p = 0,333$ (B)), TGF- β Sekretion ($p = 0,814$ (C)) oder Sa- β -Galaktosidase-Aktivität (D).

4.4 *In vivo* Funktionalität von urämischen MSC im Rattenmodell der akuten anti-Thy1.1-Nephritis

Unsere Arbeitsgruppe konnte in der Vergangenheit bereits zeigen, dass gesunde MSC in einem akuten Modell der mesangioproliferativen Nephritis die Regeneration geschädigter Glomeruli beschleunigen⁴². Daher wurde dieses Tiermodell in der vorliegenden Arbeit genutzt, um das regenerative Potenzial urämischer MSC im Vergleich zu gesunden MSC *in vivo* zu testen. Hierzu wurde durch eine einmalige Injektion eines Antikörpers gegen das Thy1-Antigen (CD90) auf Mesangialzellen eine akute Nephritis (anti-Thy1.1-Nephritis) induziert. An Tag 2 der Erkrankung wurden die linken Nieren der Tiere mit einer Dosis von

Ergebnisse

250.000 MSC i.a. behandelt. Analysiert wurden Nierenfunktion und -histologie an Tag 4 (also 2 Tage nach Therapie) und Tag 6 (also Tag 4 nach Therapie). An Tag 4 wurden vier Gruppen miteinander verglichen: gesunde wildtyp und gesunde hPLAP-transgene MSC sowie CKDmod-RK MSC. Tiere mit Injektionen von DMEM dienten wiederum als Kontrollgruppe. An Tag 6 wurde die Wirkung von insgesamt 5 Gruppen (4 MSC Gruppen) verglichen: Erneut DMEM, gesunde wildtyp MSC, gesunde hPLAP-transgene und CKDmod-RK MSC. Dazu wurde eine Gruppe mit CKDsev-AD MSC ergänzt. Das Versuchsdesign ist nochmals in Abbildung 4.4 dargestellt.

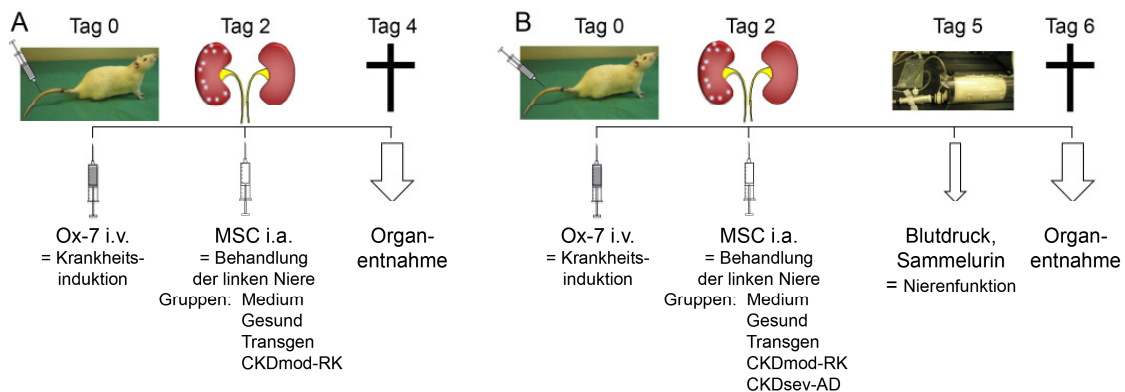


Abbildung 4.4: Versuchsdesign zur Testung des therapeutischen Effektes urämischer MSC in der anti-Thy1.1-Nephritis.

4.4.1 Behandlung der linken Nieren mit MSC

Mit der Injektion von MSC in die ausgeklemmte Aorta gelangten die Zellen über die linke Nierenarterie in den Gefäßbaum der linken Niere. Aufgrund der feinen Gefäßstrukturen im Kapillarknäuel der Glomeruli sollten sich die Zellen dort nach unseren Vorerfahrungen anreichern. Auch Entzündungs- und Signalmolekül-bedingtes *homing* der MSC sollte deren Lokalisation in geschädigten Glomeruli begünstigen^{22,32,39}.

In jenen Nieren mit Applikation transgener MSC, welche die humane plazentare alkaline Phosphatase exprimieren, konnte in den jeweiligen Histologien sowohl immunhistochemisch als auch enzymatisch das Transgen nachgewiesen werden (Abbildung 4.4.1.1). Dies war der erste Nachweis, dass die MSC im Glomerulus, und damit an ihrem Bestimmungsort, angekommen sind.

In vivo Zell-Tracking mittels hPLAP Transgen

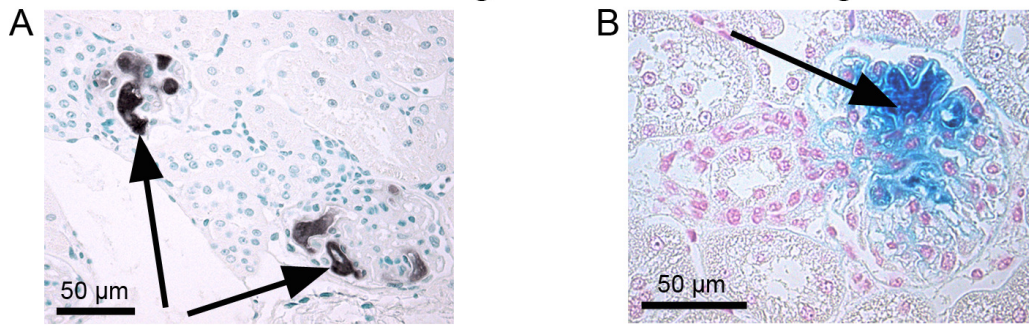


Abbildung 4.4.1.1: *Tracking* i.a. injizierter hPLAP-transgener MSC in anti-Thy1.1-Nieren.

A) Immunhistochemie zum Nachweis der humanen placentaren alkalinen Phosphatase (hPLAP) an der MSC-Oberfläche. B) Detektion von hPLAP durch enzymatische Färbung. Das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) wird von hPLAP umgesetzt und als entstehendes Produkt fällt ein blauer Indigofarbstoff aus.

Zur weiteren Absicherung wurden alle MSC Gruppen vor der Injektion mit dem fluoreszierenden Farbstoff PKH26 markiert, welcher in die Zellmembran integrierte. Dies ermöglichte eine direkte Detektion aller MSC in den Nieren und einen Vergleich des *engraftments* zwischen den MSC Gruppen. An Tag 4 wurden die Gruppen „Gesund“ (n = 7), „Transgen“ (n = 8) und „CKDmod-RK“ (n = 6) verglichen, an Tag 6 die Gruppen „Gesund“ (n = 7), „Transgen“ (n = 7), „CKDmod-RK“ (n = 5) und „CKDsev-AD“ (n = 8).

In Abbildung 4.4.1.2 A sind repräsentative Fotos der mit MSC behandelten Nieren abgebildet. Die PKH-Fluoreszenz der MSC konnte nur in den linken (behandelten) Nieren nachgewiesen werden, die rechten Nieren blieben negativ. Die MSC waren nur in Glomeruli lokalisiert und sehr vereinzelt in zuführenden Gefäßen. Im Glomerulus war eine Zuschreibung der Fluoreszenz zu einzelnen Zellen nicht mehr möglich, daher wurde stattdessen zum einen die Gesamtzahl der Glomeruli gezählt, welche überhaupt PKH-fluoreszente MSC enthielten (Abbildung 4.4.1.2 B), zum anderen die PKH-positive Fläche der Glomeruli computermorphometrisch quantifiziert (Abbildung 4.4.1.2 C). In der Anzahl PKH-positiver Glomeruli konnte weder an Tag 4 (Gesund vs. Transgen vs. CKDmod-RK: ANOVA: $p = 0,239$) noch an Tag 6 (Gesund vs. Transgen vs. CKDmod-RK vs. CKDsev-AD: ANOVA: $p = 0,376$) ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Gleiches galt für die glomeruläre PKH-positive Fläche an Tag 4 und 6 (ANOVA: $p = 0,287$ bzw. $0,996$).

Ergebnisse

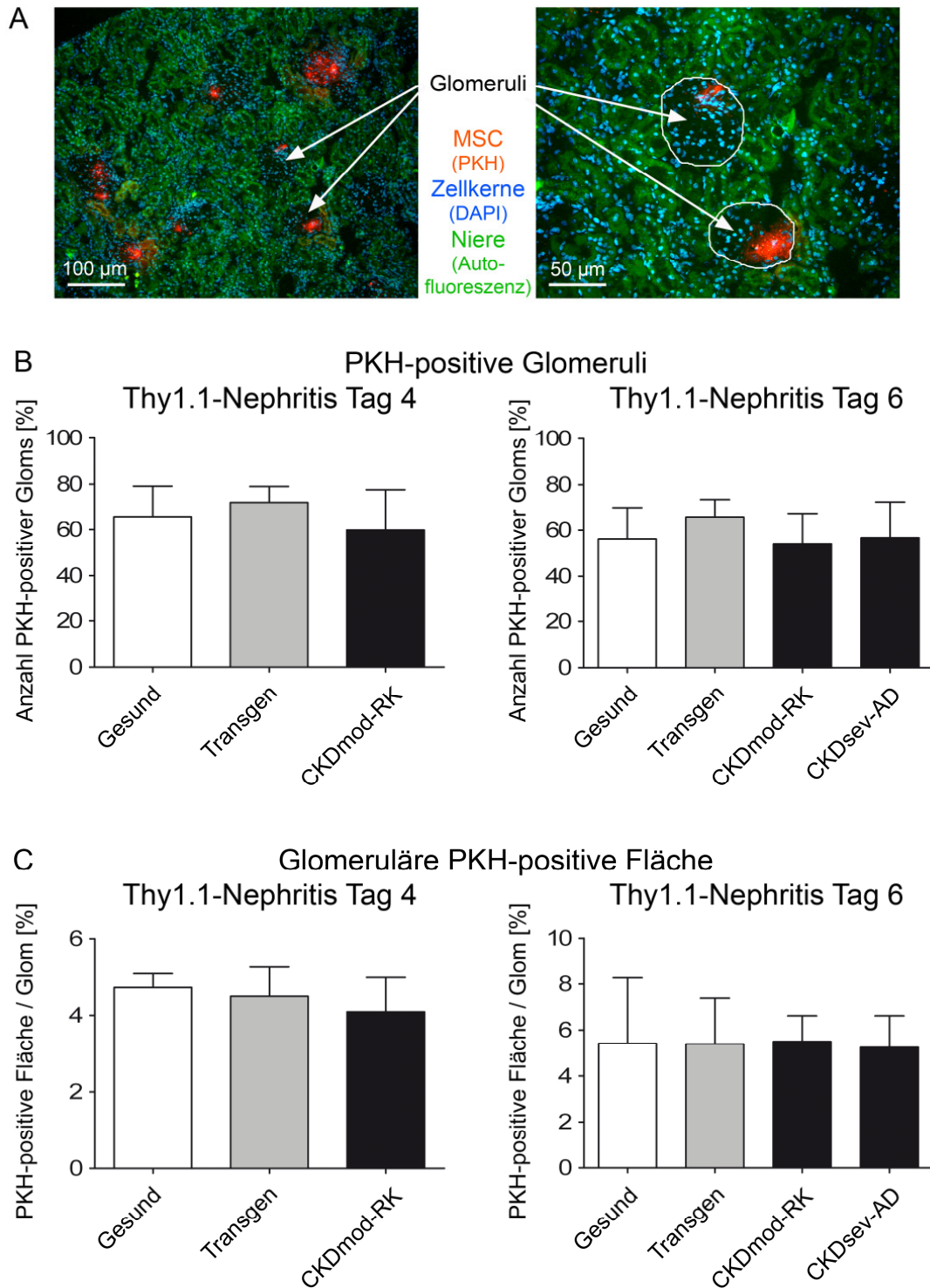


Abbildung 4.4.1.2: Quantifizierung der PKH-Fluoreszenz in MSC-behandelten Nieren. Fotos in A zeigen PKH-positive MSC in linken behandelten Nieren. Eine Quantifizierung der Anzahl PKH-positiver Glomeruli (B) ergab keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (ANOVA: $p = 0,239$ (Tag 4) bzw. $0,376$ (Tag 6)). Auch in der glomerulären PKH-positiven Fläche (C) unterschieden sich die MSC-Behandlungsgruppen nicht (ANOVA: $p = 0,287$ (Tag 4) bzw. $0,996$ (Tag 6)). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichungen für jede Gruppe.

Ergebnisse

Somit war zum einen gezeigt, dass tatsächlich nur die linken Nieren eine direkte lokale MSC-Behandlung erhielten, was in jedem Tier einen Vergleich der linken „behandelten“ Niere gegenüber der rechten „unbehandelten“ (allenfalls ohne nachweisbare Wirkung indirekt behandelten) Nieren erlaubt. Zum anderen konnte so sichergestellt werden, dass eine Differenz im Therapieerfolg zwischen den MSC Gruppen nicht auf eine ungleiche Behandlung *per se*, d.h. durch eine unterschiedliche MSC-Dosis am Zielort, zustande kam. Auffällig ist, dass in allen Gruppen sowohl die Anzahl positiver Glomeruli als auch die PHK-positive Fläche an Tag 6 bereits geringer ist als an Tag 4. Dies könnte zum einen auf einen Verlust des lipophilen PKH-Farbstoffes glomerulärer MSC zurückzuführen sein, zum anderen auf tatsächlich niedrigere MSC-Zahlen. Letzteres könnte wiederum durch abwandern oder Zelltod der injizierten Zellen verursacht worden sein. Es ist anzumerken, dass der Nachweis von PKH26 nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden kann.

4.4.2 Nierenfunktion und –histologie an Tag 4 und 6 der anti-Thy1.1-Nephritis

2 Tage nach Beginn der MSC Therapie wurden Nierenfunktion und Nierenhistologie der Ratten mit anti-Thy1.1-Nephritis analysiert. Der Zeitpunkt der Applikation an Tag 2 stellte den Höhepunkt der Mesangiolyse im Tiermodell dar und die Evaluierung an Tag 4 die beginnende Regeneration der Glomeruli.

An Tag 4 lagen keine Unterschiede in der Nierenfunktion zwischen den Behandlungsgruppen vor (Tabelle 4.4.2.1; Medium vs. Gesund vs. Transgen vs. CKDmod-RK: Serum Harnstoff ANOVA: $p = 0,178$; Serum Kreatinin ANOVA: $p = 0,051$). Aufgrund leichter Differenzen im Ausgangsgewicht sind die Tiere nach Applikation transgener hPLAP-MSK auch an Tag 4 der anti-Thy1.1-Nephritis schwerer als Tiere mit Medium oder wildtyp-MSK Injektion (ANOVA: $p = 0,001$; Tukey Posthoc: Medium vs. Transgen $p = 0,009$; Gesund vs. Transgen $p = 0,001$).

Tabelle 4.4.2.1: Nierenfunktion an Tag 4 der anti-Thy1.1-Nephritis (2 Tage nach MSC Therapie).

= signifikant gegenüber Medium-Behandlung.

* = signifikant gegenüber „Gesund“. ANOVA mit Tukey Posthoc.

| | Medium (n = 10) | Gesund (n = 7) | Transgen (n = 8) | CKDmod-RK (n = 6) |
|----------------------|--------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| Gewicht [g] | 174 ± 28 | 162 ± 15 | 206 ± 8 # * | 175 ± 13 |
| S-Harnstoff [mmol/L] | 7.5 ± 1.7 | 8.1 ± 1.5 | 7 ± 0.7 | 8.8 ± 1.9 |
| S-Kreatinin [µmol/L] | 52.2 ± 4.4 | 50 ± 6.6 | 51.1 ± 5.4 | 59.3 ± 8.9 |

Ergebnisse

Für die Analyse der Histologien wurde in jedem Tier die linke behandelte Niere mit der rechten unbehandelten verglichen. Dies bot die Möglichkeit einer direkten Beurteilung des Behandlungserfolges, da der Befund in jedem Tier einmal unbehandelt und einmal behandelt vorlag. Schwankungen in der Ausprägung der Krankheit durch verschieden starke Immunreaktionen hatten dadurch weniger Einfluss.

Die Ergebnisse für die Analysen des Tages 4 sind in Abbildungen 4.4.2.1 und 4.4.2.2 dargestellt (eine zusätzliche tabellarische Ansicht und eine komplette statistische Evaluation sind im Anhang in Tabellen Z5 und Z6 zu finden).

An Tag 4 war die Anzahl intraglomerulärer Mitosen nach Behandlung mit gesunden wildtyp MSC und transgenen MSC signifikant erhöht (Gesund: links vs. rechts $p < 0,001$; Transgen: links vs. rechts $p = 0,002$). Eine Behandlung mit Medium oder CKDmod-RK MSC erwirkte keinen Unterschied gegenüber den rechten unbehandelten Nieren. Ebenso wie die glomerulären Mitosen, wurde auch die Mesangiolyse in PAS-gefärbten Schnitten beurteilt. Die Bewertung erfolgte mittels eines semiquantitativen Scoring-Systems. Bedingt durch die erhöhte Proliferationsrate war in der Transgen-Gruppe auch die Mesangiolyse signifikant reduziert (links vs. rechts $p = 0,022$; Abbildung 4.4.2.1 C).

Ebenfalls wurde die Infiltration durch Auszählung intraglomerulärer Monozyten bzw. Makrophagen in ED1-Färbungen quantifiziert (Abbildung 4.4.2.1 F). Die mit gesunden MSC behandelten Nieren enthielten signifikant mehr Monozyten als rechte unbehandelte Nieren (links vs. rechts $p = 0,018$; Abbildung 4.4.2.1 E).

Da α -SMA von aktivierten proliferierenden Mesangialzellen produziert wird, wurde es zur Quantifizierung des regenerierenden Mesangiums herangezogen (siehe Foto in Abbildung 4.4.2.2 B). Hier gab es bei keiner der Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede in der glomerulären α -SMA-Expression, in den mit gesunden MSC behandelten Nieren zeigte sich jedoch mit 21% mehr α -SMA ein geringer Trend zu mehr Mesangioproliferation verglichen mit rechten unbehandelten Nieren (Abbildung 4.4.2.2 A). Auch die Expression von Kollagen I wurde computermorphometrisch quantifiziert. Eine Behandlung mit Medium, gesunden wildtyp MSC oder gesunden transgenen MSC bewirkte keine Änderung des glomerulären Kollagen I-Gehaltes. Glomeruli jener Nieren mit CKDmod-RK MSC Behandlung enthielten signifikant weniger Kollagen I als unbehandelte rechte Kontrollnieren ($p = 0,033$).

Ergebnisse

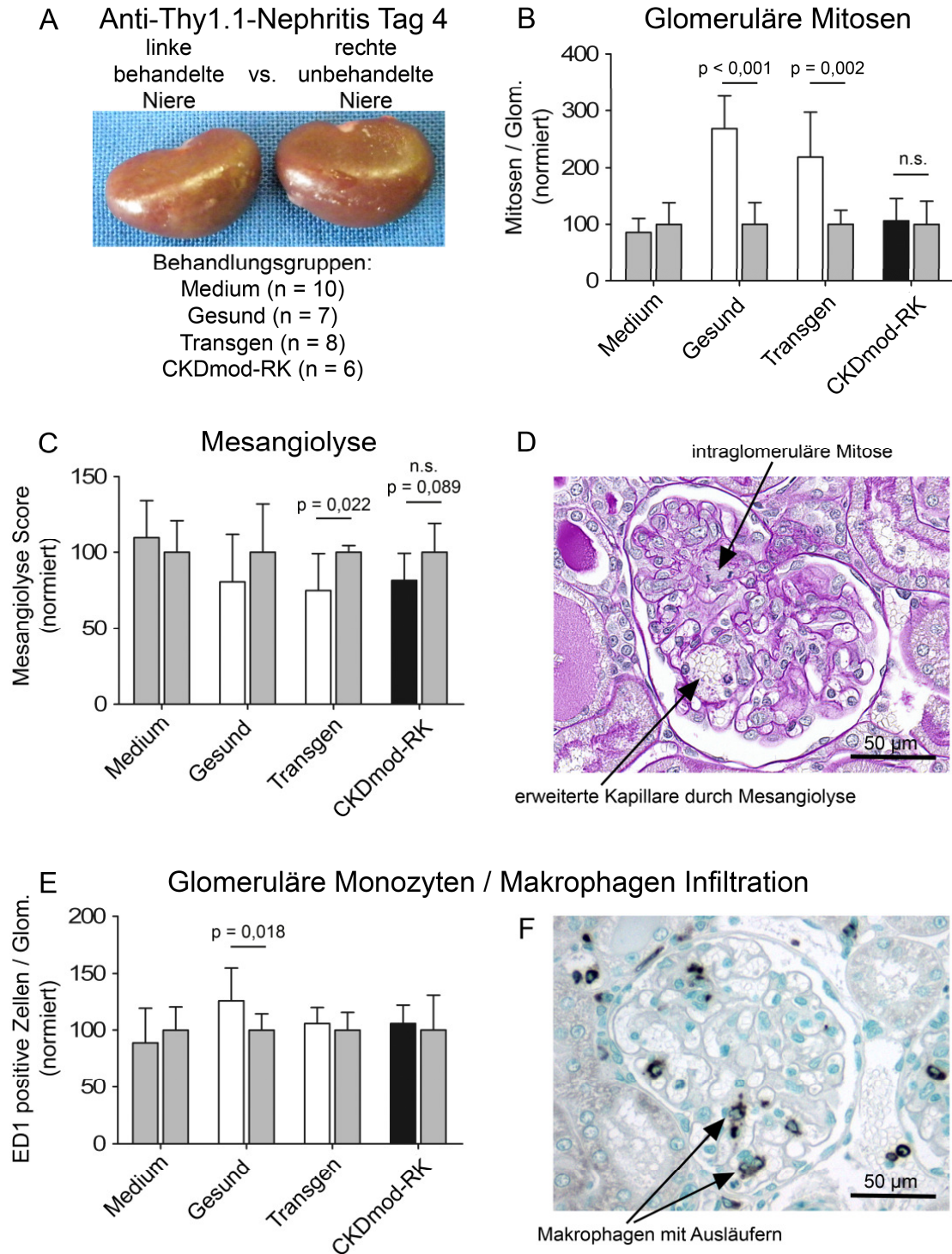


Abbildung 4.4.2.1 Glomeruläre Proliferation, Mesangiolyse und Infiltration Tag 4 der anti-Thy1.1-Nephritis (2 Tage nach MSC Therapie).

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der linken und rechten Nieren aller fünf Behandlungsgruppen sowie je ein repräsentatives Foto der ausgewerteten Färbung. Details im Fließtext.

Ergebnisse

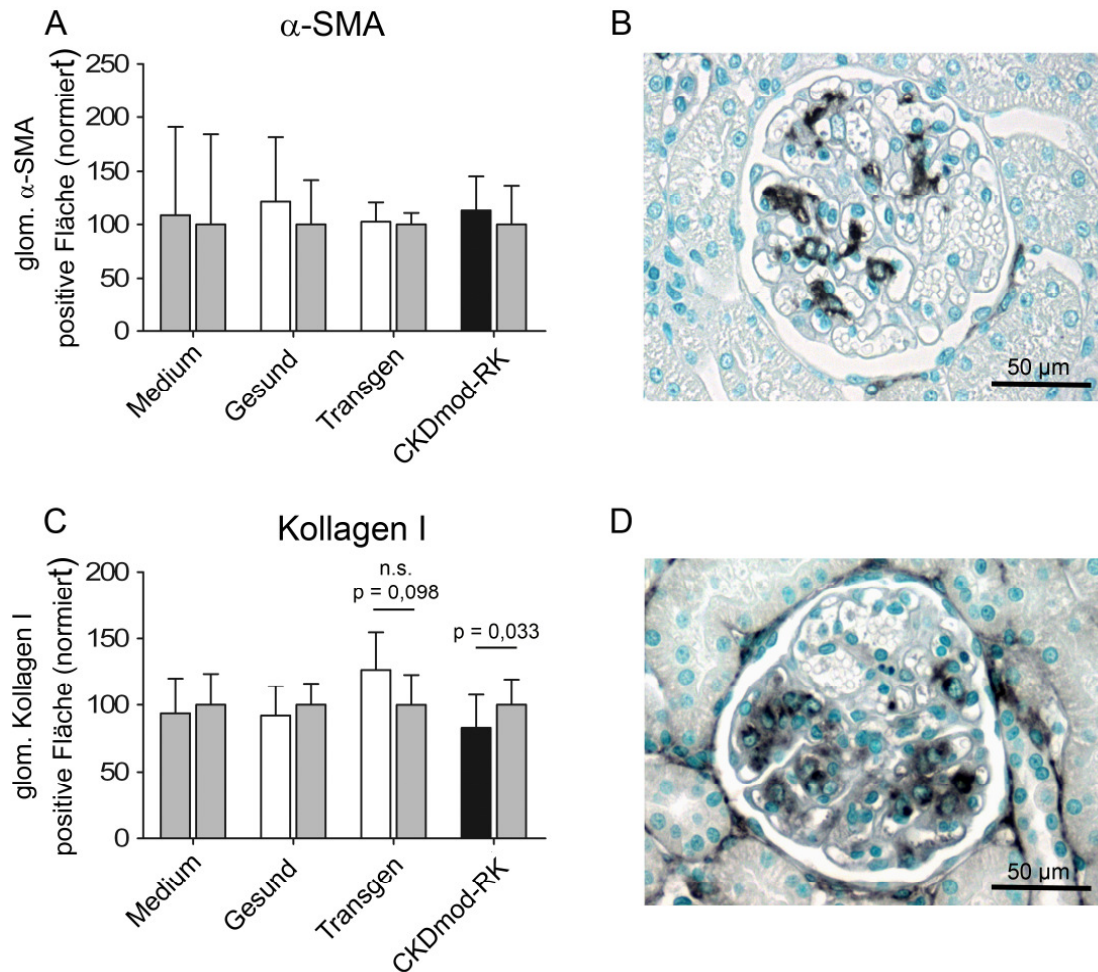


Abbildung 4.4.2.2: Glomeruläre Akkumulation von α -SMA und Kollagen I an Tag 4 der anti-Thy1.1-Nephritis (2 Tage nach MSC-Injektion).

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der linken und rechten Nieren aller fünf Behandlungsgruppen sowie je ein repräsentatives Foto der ausgewerteten Färbung. Details im Fließtext.

An Tag 6 der anti-Thy1.1-Nephritis wurden ebenfalls funktionelle Nierenparameter und die Nierenhistologie analysiert. Da sich die Tiere 4 Tage nach der intraarteriellen MSC-Applikation etwas erholen konnten, wurden für diesen Zeitpunkt zusätzlich Blutdruck und Sammelurin gemessen und zur Bewertung herangezogen. In Tabelle 4.4.2.2 sind Körpergewichte und Nierenfunktion aller Tiere der Gruppen aufgelistet.

Die Tiere mit gesunden MSC hatten durchschnittlich ein geringeres Gewicht als die Tiere der übrigen Behandlungsgruppen (Medium vs. Gesund vs. Transgen vs. CKDmod-RK vs. CKDsev-AD; ANOVA $p < 0,001$ mit Tukey Posthoc: alle vs. Gesund jeweils $p < 0,001$). Die Gruppen unterschieden sich weder bezüglich ihres Blutdrucks (ANOVA: $p = 0,793$), noch bezüglich ihrer S-Kreatinin Werte (ANOVA: 0,092). Tiere mit gesunden MSC i.a. (Gesund, Transgen) hatten signifikant erhöhte Werte für S-Harnstoff (ANOVA: $p < 0,001$). Gleichzeitig

Ergebnisse

bewirkte eine Injektion von gesunden transgenen MSC eine deutliche Reduktion der Proteinurie, die ca. 75% geringer ausfiel als in Medium-behandelten Ratten (ANOVA $p = 0,004$, Tukey Posthoc Transgen vs. Medium $p = 0,065$) und signifikant geringer war als nach Behandlung mit CKDsev-AD MSC ($p = 0,002$).

Tabelle 4.4.2.2: Nierenfunktion an Tag 6 der anti-Thy1.1-Nephritis (4 Tage nach MSC-Injektion).

= signifikant gegenüber Medium-Behandlung.

* = signifikant gegenüber „Gesund“. ANOVA mit Tukey Posthoc.

| | Medium (n = 9) | Gesund (n = 7) | Transgen (n = 7) | CKDmod-RK (n = 6) | CKDsev-AD (n = 8) |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Gewicht [g] | 199 ± 5 * | 159 ± 17 # | 205 ± 5 * | 202 ± 6 * | 195 ± 7 * |
| Systol. Blutdruck [mmHg] | 128 ± 9 | 128 ± 15 | 127 ± 21 | 130 ± 22 | 137 ± 10 |
| S-Harnstoff [mmol/L] | 6.0 ± 1.0 * | 13.5 ± 5.7 # | 11.0 ± 0.9 # | 7.9 ± 1.0 * | 8.9 ± 1.5 * |
| S-Kreatinin [µmol/L] | 39.9 ± 5.9 | 43.7 ± 5.2 | 43.6 ± 3.7 | 41.3 ± 4.7 | 47 ± 4.9 * |
| Proteinurie [mg/24Std] | 40 ± 25 | 24 ± 26 | 9 ± 6 * | 34 ± 16 | 52 ± 21 |
| Urin Albumin [mg/dL] | 21 ± 13 | 22 ± 11 | 9 ± 6 | 42 ± 24 | 29 ± 13 |

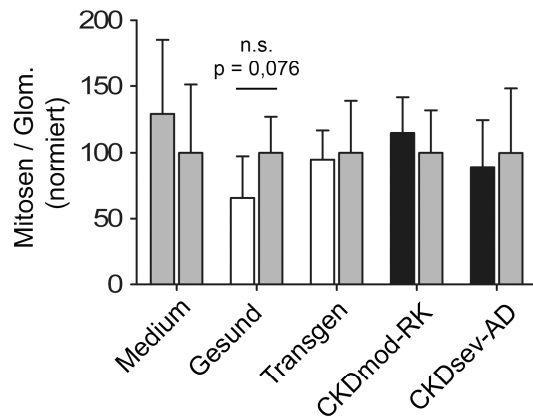
In Abbildung 4.4.2.3 sind die Ergebnisse der histologischen Auswertung dargestellt (siehe auch tabellarische Gegenüberstellung in Tabellen Z7 und Z8 im Anhang). Während an Tag 6 keine Unterschiede mehr in der Anzahl glomerulärer Mitosen verzeichnet werden konnten, war die Mesangiolyse in Nieren mit gesunden MSC (Gesund links vs. rechts ($p = 0,023$) und Transgen links vs. rechts ($p < 0,001$)) signifikant reduziert (Abbildung 4.4.2.3 C). Dies passte zu der erhöhten Proliferation, welche an Tag 4 registriert worden war (Abbildung 4.4.2.1). Weder die Behandlung mit Kontrollmedium, noch die Applikation urämischer CKDmod-RK- oder CKDsev-AD MSC konnten zu einer Verminderung der Mesangiolyse, d.h. zu einer Erhöhung der glomerulären Regeneration, beitragen. An Tag 6 der Erkrankung war kein Unterschied im Influx von Makrophagen messbar, noch unterschied sich das Ausmaß der glomerulären α -SMA positiven Fläche zwischen den Gruppen. Die Kollagen I Ablagerungen betreffend ergab sich nur ein signifikanter Unterschied in der Medium-Kontrollgruppe: In behandelten linken Nieren war die glomeruläre Kollagen I positive Fläche niedriger als in rechten unbehandelten Nieren ($p = 0,014$).

A Anti-Thy1.1-Nephritis Tag 6

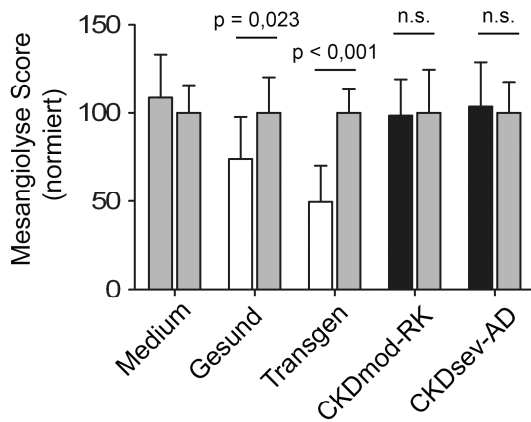
linke behandelte Niere vs. rechte unbehandelte Niere

Behandlungsgruppen:
 Medium (n = 9)
 Gesund (n = 7)
 Transgen (n = 7)
 CKDmod-RK (n = 6)
 CKDsev-AD (n = 8)

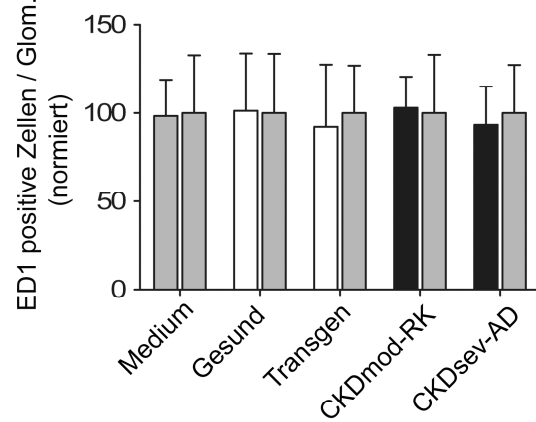
B Glomeruläre Mitosen



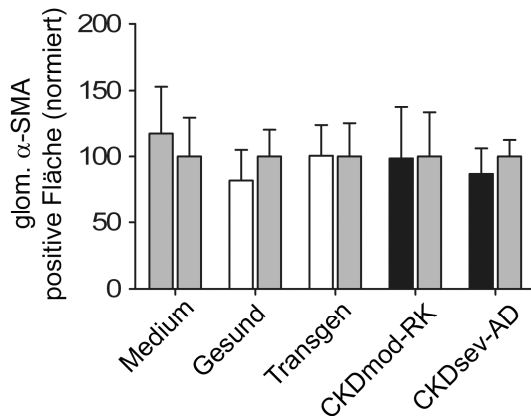
C Mesangiolyse



D Monozyten / Makrophagen



E α-SMA



F Kollagen I

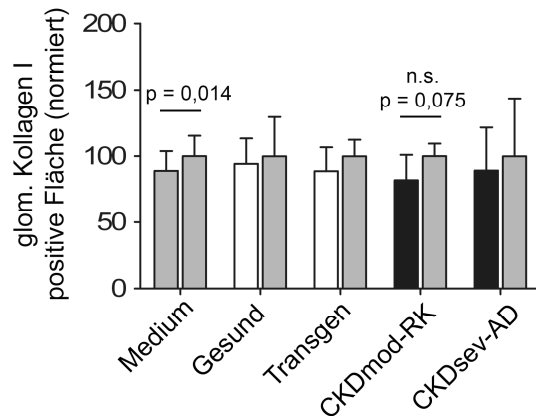


Abbildung 4.4.2.3: Glomeruläre Proliferation, Mesangiolyse, Infiltration und Akkumulation von α-SMA und Kollagen I an Tag 6 der anti-Thy1.1-Nephritis (4 Tage nach MSC Therapie).

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der linken und rechten Nieren aller fünf Behandlungsgruppen. Details im Fließtext.

Ergebnisse

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass gesunde MSC (wildtyp oder transgen) im *in vivo* Test eine beschleunigte Regeneration des glomerulären Mesangiums bewirken. Eine signifikant erhöhte Zellproliferation in behandelten Nieren an Tag 4 führte konsequent an Tag 6 zu signifikant reduzierter Mesangiolyse. Urämische MSC hingegen (isoliert aus Ratten mit 5/6 Nephrektomie oder Adenin-Nephropathie) konnten genau wie Kontrollmedium keine Veränderung im Modell der akuten anti-Thy1.1-Nephritis bewirken.

4.4.3 Anti-Thy1.1-Nephritis in hPLAP-transgenen Ratten

In der *in vivo* Testung des MSC-Potenzials zeigten die gesunden transgenen MSC die protektivsten Effekte, d.h. signifikant erhöhte glomeruläre Proliferation an Tag 4, welche eine signifikant verminderte Mesangiolyse an Tag 6 bedingte und letztendlich auch funktionell zu den niedrigsten Proteinuriewerten führte (Abschnitt 4.4.2). Obwohl die hPLAP-transgenen MSC *in vitro* keine Unterschiede zu gesunden wildtyp MSC zeigten (Abschnitt 4.3.6), wurde nun nachträglich *in vivo* geprüft, ob das hPLAP-Transgen einen Effekt auf den Verlauf der anti-Thy1.1-Nephritis hat. Dazu wurde die Thy1.1-Nephritis in hPLAP-transgenen Ratten sowie deren wildtyp Geschwistertieren induziert und die Nierenfunktion und -histologie an Tag 6 der Erkrankung verglichen (Abbildung 4.4.3 und Tabelle Z9 im Anhang).

Es konnten keine Unterschiede im Körpergewicht oder in den Retentionswerten von S-Harnstoff (wildtyp: 13 ± 3 vs. transgen: 12 ± 0 mmol/L, $p = 0,327$) oder S-Kreatinin (wildtyp: 38 ± 5 vs. transgen: 36 ± 3 μ mol/L, $p = 0,407$) detektiert werden. Bei der Messung der Proteinurie ergaben sich signifikant höhere Werte in hPLAP-transgenen Ratten (132 ± 25 (wildtyp) vs. 173 ± 23 mg/24Std (transgen); $p = 0,041$). Diese spiegelten sich jedoch nicht im Mesangiolyse-Score wieder, welcher mit $1,12 \pm 0,19$ (wildtyp) und $1,11 \pm 0,11$ (transgen) erneut in beiden Gruppen einen nahezu gleichen Schaden zeigte ($p = 0,961$).

Dieser Versuch konnte daher erfolgreich widerlegen, dass das hPLAP-Transgen den Verlauf der anti-Thy1.1-Nephritis positiv beeinflusst.

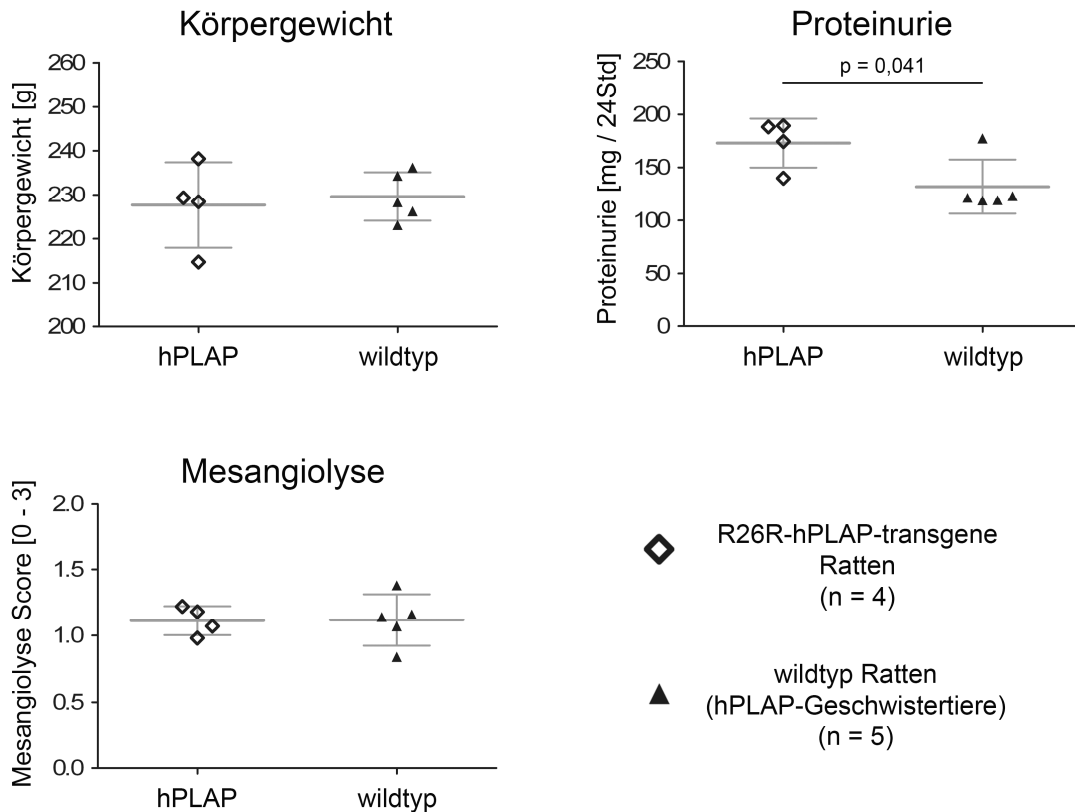


Abbildung 4.4.3: Anti-Thy1.1-Nephritis in hPLAP-transgenen Ratten.

Nach Induktion einer anti-Thy1.1-Nephritis unterschieden sich hPLAP-transgene Ratten an Tag 6 weder in Körpergewicht noch bezüglich der Ausprägung der Mesangiolyse von ihren wildtyp Geschwistern. Dennoch wurde in den transgenen Tieren durchschnittlich eine höhere Proteinurie gemessen als in wildtyp Tieren ($p = 0,041$). Dargestellt sind die einzelnen Tiere sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen beider Gruppen.

4.5 Einfluss der Urämie auf residente Nierenprogenitorzellen

Die bisherigen Experimente untersuchten den Einfluss der chronischen Niereninsuffizienz auf MSC aus dem Knochenmark, da der mögliche therapeutische Einsatz dieser Zellen zur autologen Applikation in CKD-Patienten kontrovers diskutiert wird. Die bisherigen Resultate aus den Kapiteln 4.2 und 4.3 belegen jedoch, dass sich urämische Bedingungen auch auf diese Knochenmarkszellen auswirken und deren therapeutisches Potenzial im *in vivo* Test mindern. Da die entstehende Urämie bei chronisch geschädigten Nieren den gesamten Körper betrifft, wurde an dieser Stelle geprüft, ob CKD auch intrarenale Progenitoren beeinflusst.

4.5.1 Periglomeruläre Zellen am Vas afferens als mögliche intrarenale Progenitoren

Präliminäre Experimente unserer Arbeitsgruppe gaben Hinweise auf einen bislang nicht untersuchten Pool von Zellen am vaskulären Pol der Glomeruli, welcher vermutlich Progenitoreigenschaften hat (unpublizierte Daten). Diese Zellen bilden eine Untergruppe der perivaskulären Renin-produzierenden Zellen und sind in unmittelbarer Nähe zum Glomerulus um die afferente Arteriole lokalisiert (Abbildung 4.5.1 A). Sie exprimieren CD24, ein Zelladhäsionsmolekül, welches bereits als Marker für andere renale Progenitoren sowie Krebs-Stammzellen beschrieben wurde^{99,100}, und genauso wie andere perivaskuläre Zellen auch α -SMA (Abbildung 4.5.1 B).

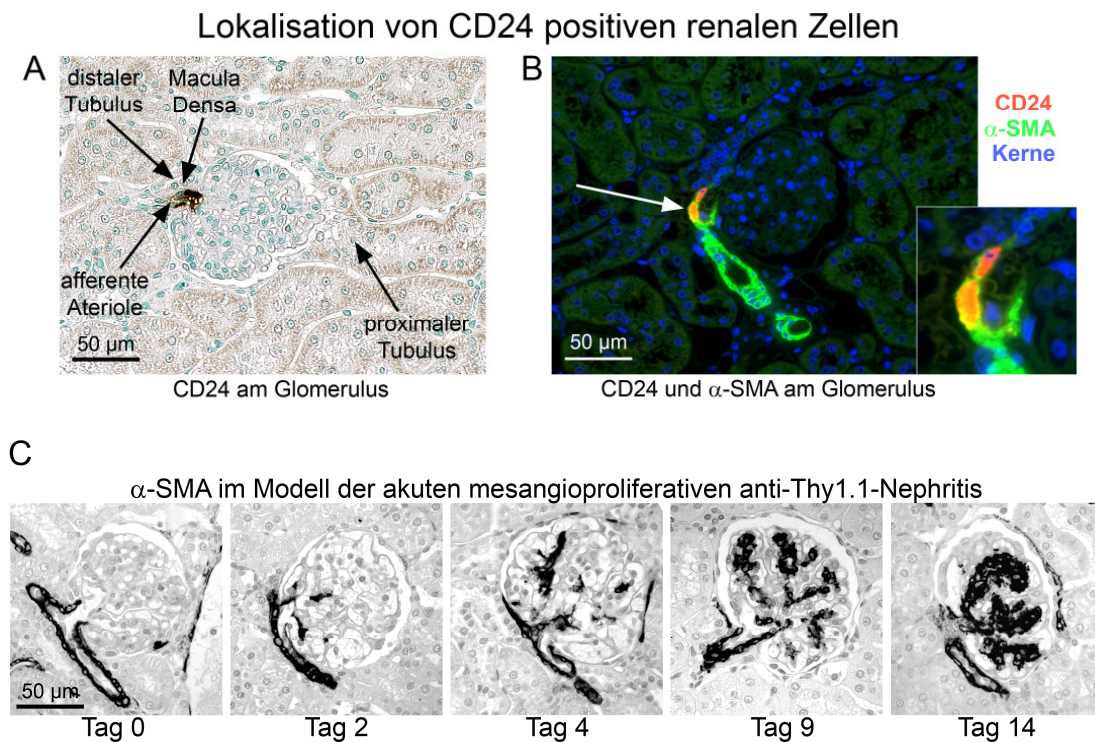


Abbildung 4.5.1: Identifikation einer potentiellen periglomerulären Progenitorzell-Population.

Abbildung A zeigt eine immunhistochemische Färbung gegen CD24. CD24 positive Zellen sind am Vas afferens der Glomeruli im Bereich des juxtaglomerulären Apparates lokalisiert. Ebenso wie die übrigen Muskelzellen der afferenten Arteriole exprimieren auch die CD24-Zellen α -SMA (Immunfluoreszenzfärbung in B und zugehörige Vergrößerung; Alexa-Fluor546 für CD24 max. Anregung bei 562 nm und max. Emission bei 573 nm, Cy2 für α -SMA max. Anregung 489 nm und max Emission bei 503 nm). C) Im Verlauf der akuten anti-Thy1.1-Nephritis regeneriert das Mesangium und aktivierte Mesangialzellen exprimieren α -SMA, während in gesunden Glomeruli (Tag 0) die Expression dieses Proteins auf Muskelzellen der Wand der Arteriolen (und Arterien) begrenzt ist. Die Regeneration des Mesangiums geschieht möglicherweise über die CD24 positiven Zellen, die scheinbar proliferieren und in den Glomerulus einwandern (unpublizierte Daten unserer Arbeitsgruppe).

Ergebnisse

Im Modell der mesangioproliferativen anti-Thy1.1-Nephritis beginnt sich das lysierte Mesangium nach wenigen Tagen zu regenerieren, was durch immunhistochemische Färbung von α -SMA abgebildet werden kann (Abbildung 4.5.1 C). Bereits ab Tag 2 der Erkrankung vermehrt sich α -SMA vom vaskulären Pol ausgehend in Richtung Kapillarknäuel. Unsere Versuche ergaben, dass die CD24-positiven Zellen möglicherweise für die Regeneration des intraglomerulären Mesangiums verantwortlich sind (unpublizierte Daten).

4.5.2 CD24-positive Zellen in fibrotischen Nieren

Die in Abschnitt 4.5.1 vorgestellten CD24-positiven Zellen am Vas afferens wurden im Folgenden in Histologien von Ratten mit 5/6 Nephrektomie und Adenin-Nephropathie quantifiziert (Abbildung 4.5.2.1). Die Glomeruli, welche eine positive CD24-Färbung zeigten, wurden in allen Schnitten gezählt (Gesund (n = 8) vs. CKDmod-RK (n = 7) vs. CKDsev-RK (n = 5) vs. CKDsev-AD (n = 8), ANOVA $p < 0,001$).

Gesunde Tiere hatten mit knapp 17% signifikant mehr CD24-positive Glomeruli als CKDmod-RK Ratten (7%, Tukey Posthoc: $p < 0,001$), CKDsev-RK Ratten (1%, $p < 0,001$) oder CKDsev-AD Ratten (10%, $p = 0,003$). Die sklerotischen Glomeruli in CKDsev-RK Nieren wiesen oftmals keine CD24-Färbung auf, obwohl das afferente Gefäß angeschnitten war (Abbildung 4.5.2.1, Pfeil). Somit enthielten die sehr kranken Tiere der CKDsev-RK Gruppe auch signifikant weniger CD24-positive Glomeruli als CKDmod-RK Tiere ($p = 0,036$) oder Ratten mit Adenin-Nephropathie ($p = 0,001$).

Glomeruli mit CD24 positiver Arteriole

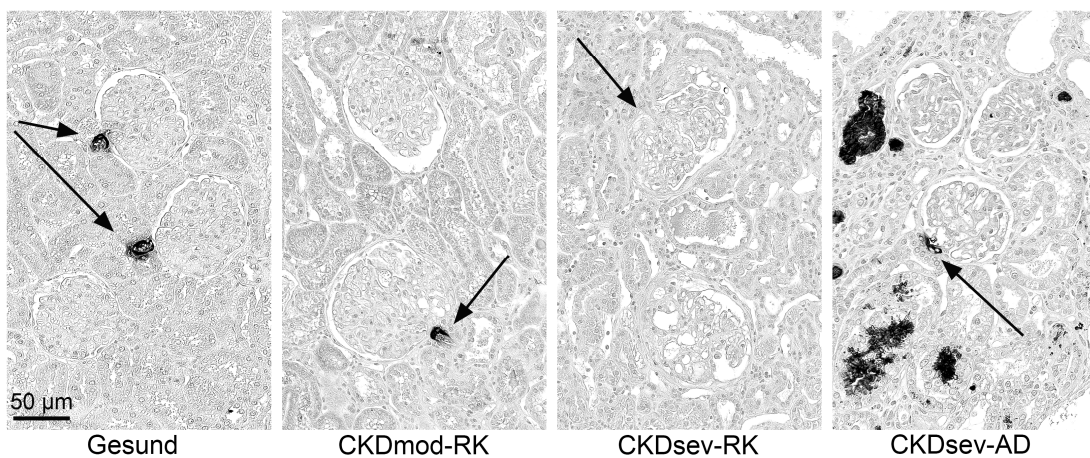
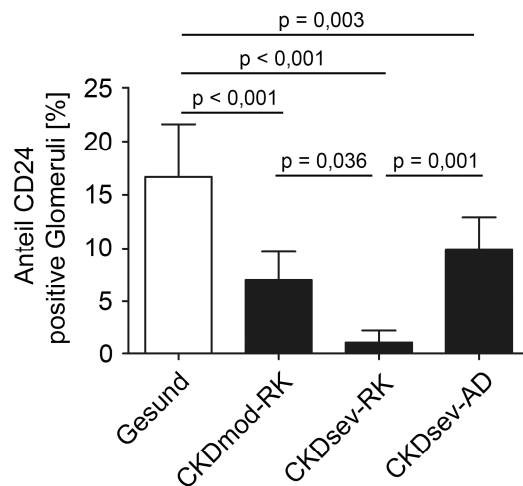


Abbildung 4.5.2.1: Quantifizierung der CD24-positiven Glomeruli in Ratten mit CKD. Vergleich der Anteile CD24-positiv gefärbter Glomeruli in Nieren gesunder Ratten (n = 8) mit CKDmod-RK- (n = 7), CKDsev-RK- (n = 5) und CKDsev-AD Ratten (n = 8) (ANOVA p < 0,001 mit Tukey Posthoc). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Gruppen. Die Fotos zeigen repräsentative immunhistochemische Färbungen gegen CD24. Das Bild der CKDsev-AD Gruppe zeigt ebenfalls die Kristalle in Tubuli und Interstitium schwarz angefärbt.

Eine Korrelation der Anzahl CD24-positiver Glomeruli mit den Serumretentionsparametern Harnstoff und Kreatinin ergab einen statistischen Zusammenhang (Abbildung 4.5.2.2). Je geringer die Nierenfunktion, d.h. je höher die Harnstoff- und Kreatininwerte, desto weniger CD24-Expression. In beiden Fällen war der Zusammenhang umgekehrt exponentiell: Bei Harnstoff kann der Zusammenhang annähernd mit der Gleichung $y = -7,933\ln(x) + 29,255$ beschrieben werden (Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,761$) und bei Kreatinin mit $y = -6,425\ln(x) + 35,59$ (Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,613$).

Korrelation Nierenfunktion und CD24 Expression

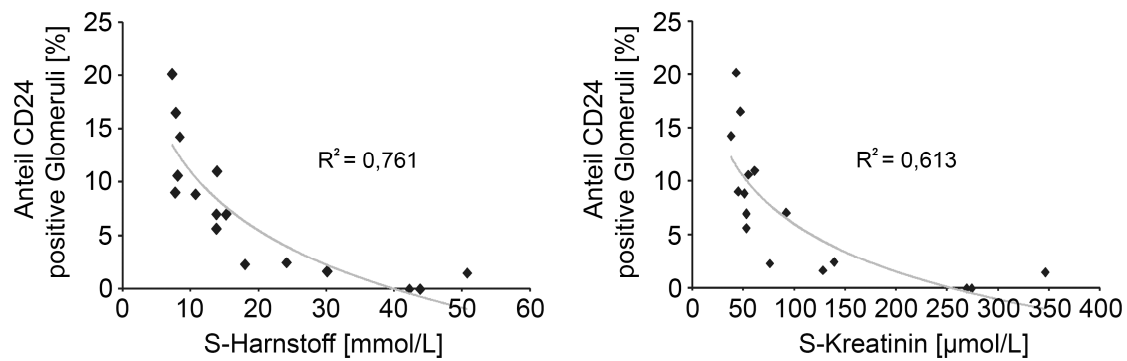


Abbildung 4.5.2.2: Korrelation von S-Harnstoff und S-Kreatinin mit der periglomerulären Expression von CD24.

Die Nierenfunktion korreliert negativ mit der CD24 Expression. Für Serum Harnstoff kann der Zusammenhang annähernd durch die Gleichung $y = -7,933\ln(x) + 29,255$ beschrieben werden (Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,761$) für Kreatinin näherungsweise mit $y = -6,425\ln(x) + 35,59$ (Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,613$).

Zusammenfassend ist dieser Zusammenhang ein Hinweis, dass auch intrarenale Progenitoren, hier am Beispiel einer neu identifizierten CD24-positiven periglomerulären Zellpopulation, durch die zunehmende Retention harnpflichtiger Substanzen (beginnende Urämie) Veränderungen erfahren.

5. Diskussion

Chronische Nierenerkrankungen (CKD) sind ein weltweites Problem und betreffen schätzungsweise 10-16% der Bevölkerung¹¹. CKD führt zu gesteigerter Morbidität und frühzeitiger Mortalität und kann die Lebensqualität betroffener Patienten drastisch vermindern. Im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz ermöglicht die Dialyse zwar das Überleben über eine gewisse Zeitspanne, kann jedoch langfristig eine neue Spenderniere nicht ersetzen. Die zunehmende Organknappheit verschärft das Problem zusätzlich. Bisher verfügbare Medikamente „behandeln“ oftmals nur Symptome der Patienten, was weder die Progression der chronischen Nierenerkrankung / Nierenfibrose stoppt noch die sekundär induzierten Leiden, wie z.B. Herz-Kreislauf-Erkrankungen, komplett verhindert. Nicht zu unterschätzen sind auch die hohen Kosten, welche durch die jahrelange Behandlung chronisch nierenkranker Patienten entstehen und die mit steigenden Patientenzahlen das Gesundheitssystem immer stärker belasten. In den USA wurden allein 2008 pro Patient 77 506 US\$ (Hämodialyse), 57 639 US\$ (Peritonealdialyse) und 26 668 US\$ (Transplantation) gezahlt².

Trotz intensiver Forschung hat es aber in den letzten Jahren/Jahrzehnten in der Nephrologie nur wenige wirklich neue therapeutische Ansätze gegeben, die erfolgreich ihren Weg in die Klinik gefunden haben, z.B. Eculizumab bei atypischem hämolytisch-urämischem Syndrom¹⁰¹, Rituximab bei ANCA(*Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)-assoziierter Vaskulitis¹⁰² und die ABO-inkompatible Nierentransplantation¹⁰³. Es besteht weiterhin ein hoher Forschungs- und Entwicklungsbedarf insbesondere zur Therapie chronisch progredienter Nierenerkrankungen, z.B. renaler Fibrose.

Sind mesenchymale Stammzellen (aus dem Knochenmark) zur Therapie von CKD und renaler Fibrose geeignet?

Da erste präklinische Tests zum Einsatz mesenchymaler Stammzellen (MSC) bei akutem Nierenversagen vielversprechende Resultate erbrachten³⁹⁻⁴³, wurde ebenfalls ein Potenzial als Therapeutikum in chronischen Erkrankungen vermutet. Tatsächlich aber sind Auswirkungen einer Stamm- oder Progenitorzelltherapie bei Fibrose weitgehend ungewiss und bisherige Publikationen an Nagern lieferten widersprüchliche Resultate. Diese Ergebnisse schwankten in mehreren Organen und Spezies (Maus, Ratte, Katze) von positiven anti-fibrotischen Wirkungen, beispielsweise Reduktion von Nekrose, Inflammation und extrazellulärer Matrix in Niere^{50-61,104,105}, Leber¹⁰⁶⁻¹⁰⁸, Herz^{109,110} oder Lunge¹¹¹, über ausbleibende signifikante Beeinflussung des Krankheitsverlaufes^{62,112-115} bis hin zu pro-fibrotischen (unerwünschten) funktionellen und histologischen Effekten, z.B. Proliferation

Diskussion

von Myofibroblasten oder MSC-Maldifferenzierung^{47,67,68}. Es scheint, dass der Zeitpunkt des Therapiestarts, die Therapiedauer, die Applikationsmethode und die Quelle der isolierten MSC von größter Bedeutung für den Behandlungserfolg von CKD (oder auch anderen chronischen fibrotischen Erkrankungen) sind.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher in einem Tiermodell zur chronischen Niereninsuffizienz das therapeutische Potenzial von Knochenmarks-MSK überprüft. Ratten, bei denen eine starke Reduktion der funktionalen Nierenmasse mittels 5/6 Nephrektomie vorgenommen wurde, erhielten syngene MSC-Transplantate. Die Behandlung umfasste insgesamt eine Dosis von $11 \cdot 10^6$ MSC i.v. über eine Zeitspanne von 16 Wochen. Mit der Bestimmung der Nierenfunktion anhand von Blut- und Urinwerten sowie der histologischen Untersuchung des Nierengewebes sollten Änderungen des Krankheitsverlaufes –pro- oder anti-fibrotisch– durch die systemische Behandlung erkannt werden.

Dieser Versuchsansatz konnte insgesamt keine signifikante Besserung der chronischen Niereninsuffizienz erreichen. Alle bewerteten funktionellen und histologischen Parameter: Gewicht, Blutdruck, Serumkonzentrationen von Harnstoff, Kreatinin und Vitamin D, Proteinurie, Gesamtkollagengehalt und Expression von α -SMA sowie Kollagen I und IV zeigten keine Unterschiede zwischen MSC-behandelten Ratten und Kontrolltieren (Abschnitt 4.1.3). Dennoch ließ die MSC-Gruppe bei einigen Parametern (niedrigerer Blutdruck, niedrigerer Serum-Harnstoff und niedrigere Proteinurie, weniger Fibrose) eine Tendenz zu therapeutischen Effekten erkennen. Die Bewertung der Therapie-Effizienz wurde besonders durch eine starke Varianz in der Progression der Erkrankung erschwert (Abschnitt 4.1.2). Eine Ursache für die Variabilität der Progredienz des Nierenschadens im Modell der 5/6 Nephrektomie liegt in der Operationstechnik und den anatomischen Gegebenheiten. Der Versorgungsbereich der drei Äste der Nierenarterie variiert erheblich, dementsprechend ergeben sich Schwankungen in der Menge des betroffenen Gewebes nach Gefäßligatur (von einer "3/4" bis hin zu einer "7/8" Nephrektomie, siehe auch Abbildung 3.2.1 im Methodenabschnitt). Zudem könnte sich, wie bei vielen Krankheitsmodellen an Nagern, der genetische Hintergrund auf das Modell auswirken¹¹⁶, so zeigten bereits 2010 Kókény und Kollegen, dass es sogar einen Fibrose-resistenten Ratten-Stamm gibt¹¹⁷. Trotz eindeutiger Veränderung der Nierenfunktion 5/6 nephrektomierter Ratten verglichen mit gleichaltrigen gesunden Tieren (z.B. bezüglich Proteinurie mit 76 ± 48 mg/24 Std (5/6 Nx mit MSC) und 105 ± 91 mg/24 Std (5/6 Nx mit Medium) gegenüber 6 ± 2 mg/24 Std (Gesund)) konnte in den meisten Ratten nur eine mäßig ausgeprägte Fibrose in den Histologien nachgewiesen werden. Ob eine schwache Ausprägung der Fibrogenese in diesen Tieren möglicherweise auch einen anti-fibrotischen Effekt der applizierten Zellen verschleiert, bleibt aber Spekulation.

Diskussion

Auch wenn die MSC-Behandlung hier keine signifikante anti-fibrotische Wirkung zeigte, so ist in jedem Fall positiv zu bewerten, dass weder pro-fibrotische Folgen noch Maldifferenzierung oder gar maligne Effekte nach der Therapie beobachtet wurden. Kritisch zu sehen ist hingegen, dass das Resultat dieses ersten Versuchsteiles (dass auch eine wiederholte systemische Transplantation syngener Knochenmarks-MSK die CKD-Progression nicht erkennbar aufhielt geschweige denn heilte) vorerst keine Empfehlung für den Einsatz von MSC bei CKD geben kann.

In dem hier vorgestellten Versuch wurde nur ein mögliches Versuchsdesign getestet. Unter Berücksichtigung der bisherigen Literatur zielte der hier dargestellte Versuch auf eine möglichst starke therapeutische Wirkung der Zellen, indem 1. die Therapie in einem frühen Stadium der Erkrankung noch vor einer Manifestierung einer renalen Fibrose begann, 2. die Gesamt-MSK-Dosis mit $11 \cdot 10^6$ hoch angesetzt wurde und 3. durch eine wöchentliche Wiederholung der MSC-Gabe sichergestellt wurde, dass der Effekt der MSC-Therapie nicht durch ein verkürztes Überleben der Zellen *post injectionem* reduziert oder durch eine rasche, unerwünschte Modulation des sekretorischen Phänotyps durch die Urämie abgeschwächt wurde.

Publizierte Kinetiken intravenös injizierter MSC in Mäusen zeigten, dass 24 Std nach systemischer Applikation die Zellen in Lunge, Leber, Nieren, Haut und Darm zu finden sind. Noch 15 Min nach Injektion waren zwar 80% der Zellen in der Lunge zu finden, nach 4 Tagen mit exponentieller Abnahme jedoch nur noch ca. 0,01%¹¹⁸. Durch verschiedene chemotaktische Achsen werden MSC zu geschädigtem Gewebe gelockt^{32,39}, wodurch in unserem Versuch der renalen Schädigung die Zellen in den Nieren akkumulieren sollten. Außerdem wurden Zellen nach der Injektion rekultiviert, um zu überprüfen, ob die MSC während der Präparation der Injektionssuspension oder der Verwahrung bis zum Injektionszeitpunkt avital wurden (Abschnitt 4.1.2). Ein Großteil der Zellen war nach 24 Std in Re-Kultur noch vital und sollte daher auch in den 5/6 nephrektomierten Ratten zunächst vital gewesen sein. Die wiederholten wöchentlichen Injektionen von immer wieder frisch isolierten Zellen junger Spendertiere (welche die Kriterien zur MSC-Definition erfüllten), können den Argumenten von zu schwach ausgeprägten *homing* Effekten oder nur kurzem Verbleib / Überleben der Zellen in der Niere entgegengesetzt werden.

Eine direkte lokale MSC-Applikation in die restliche Nierenmasse (ähnlich der intraarteriellen MSC-Injektion bei der anti-Thy1.1-Nephritis in Versuchsteil 4.4) hätte zwar den Vorteil einer hohen Zellzahl direkt am geschädigten Gewebe, birgt aber mit einem zusätzlichen operativen Eingriff weitere Risiken und würde eine zusätzliche Belastung für das Tier bzw. den Patienten darstellen. Eine wiederholte Applikation wäre dabei kaum möglich,

Diskussion

desweiteren zeigten Experimente unserer Arbeitsgruppe, dass Zellinjektionen in fibrotische Nieren vermutlich aufgrund der veränderten und reduzierten Gefäßstrukturen zu Obstruktionen führen können (unpublizierte Daten).

Die Vermutung einer anti-fibrotischen MSC-Wirkung basiert größtenteils auf deren beschriebenen anti-inflammatorischen Eigenschaften^{111,119}. Eine Immunsuppression wird dabei durch parakrine Sekretion der MSC und durch Zell-Zell-Kontakt vermittelt. Die MSC selbst entgehen Abstoßungsreaktionen, da sie weder MHC-II noch ko-stimulierende Moleküle wie CD80, CD86 oder CD40L exprimieren³². Eine Sekretion angiogener Zytokine sowie die Hemmung von Apoptose bei gleichzeitiger mitogener Stimulation von renalen Epithelzellen stärkt zudem die Regeneration des Nierengewebes. Über all diese Eigenschaften werden bereits die therapeutischen MSC-Effekte bei akuter Niereninsuffizienz erklärt und letzten Endes sind es die gleichen fünf Aspekte (Angiogenese, Proliferation, Apoptose, Inflammation, Fibrose)¹²⁰, die theoretisch auch bei CKD durch Sekretion regulatorischer Moleküle beeinflusst werden könnten. Vor allem die Möglichkeit der Immunmodulation durch MSC machte diese Zellen auch für den Einsatz bei der Nierentransplantation zur Minderung von Abstoßungsreaktionen und ischämischen Schäden interessant^{121,122}.

Die Befunde, welche eine MSC-Wirkung auf Sekretion zurückführen, eröffnen gleichzeitig neue Möglichkeiten Zell-freier Therapien. Eine Gabe von konditioniertem Zellmedium^{123,124}, welches MSC-produzierte Signalmoleküle enthält, oder Mikrovesikeln, die eine Zell-Kommunikation vermitteln^{125,126}, könnten sich anbieten. Diese Methode würde das oben erwähnte Risiko einer unerwünschten Maldifferenzierung von Stammzellen, wie sie kürzlich in einem Patienten mit Lupus Nephritis beschrieben wurde¹²⁷, vermeiden. Nachteile wiederum könnten zum einen die kürzere Wirkung des Mediums bzw. der Vesikel sein, denn transplantierte Zellen bieten zumindest theoretisch den Vorteil, dass sie über längere Zeiträume Moleküle sezernieren und ihr Sekretionsprofil ihrer Umgebung anpassen. Aus einem *cross-talk* von MSC und ihrer Nische (lokales Mikromilieu, beeinflusst durch Interaktionen mit benachbarten Zellen, die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix und mechanische Reize¹²⁸) resultiert der von ihnen produzierte „Zytokin-Cocktail“. Erst durch einen induzierenden Stimulus verändert sich das Expressionsprofil, z.B. regen apoptotische Tubulusepithelzellen die Produktion anti-apoptotischer Moleküle in MSC an¹²⁹. *In vitro* asserviertes Medium enthält dementsprechend oft andere Moleküle oder andere Konzentrationen von Molekülen als die Zellen möglicherweise an den Entzündungsherden produzieren würden. Protektive Effekte der MSC, welche durch direkte Zell-Zell-Kontakte vermittelt werden, würden ebenfalls ausbleiben. In Versuchen von Gheisari und Kollegen konnte weder konditioniertes Medium von humanen Nabelschnur-Stammzellen noch von

Diskussion

murinen Knochenmarks-MSC einem Cisplatin-induzierten Nierenschaden entgegenwirken¹³⁰. Auch unsere Arbeitsgruppe konnte mit wiederholter Gabe von konditioniertem MSC-Medium keinen therapeutischen Effekt in 5/6 nephrektomierten Ratten erzielen (unpublizierte Daten).

Letzten Endes ist fraglich, ob selbst ein ideales Versuchsdesign in präklinischen Tests die klinische Problematik zu lösen vermag. Bei den betroffenen Patienten wird nicht selten die CKD erst in einem späteren Stadium diagnostiziert, was eine frühzeitige Therapie –noch vor Nierenfibrosierung– unmöglich macht. Auch die Progredienz der CKD ist bei Patienten höchst variabel und wird durch etliche Aspekte, z.B. CKD-Auslöser, Begleiterkrankungen, Lebensstil etc., beeinflusst.

Eine Zellbehandlung, deren Effekt nur bei häufiger Wiederholung einsetzt, ist schwer umzusetzen, erhöhen sich letztendlich mit jeder Applikation das Risiko von Nebenwirkungen sowie die Kosten für eine sichere Zellisolation, -expansion und ggf. auch -konservierung. Kulturbedingungen mit xenogenen Faktoren, z.B. Serum, sollten vermieden werden^{131,132}. Selbst die Zelldichte beim Passagieren von Stammzellen hat deutliche Konsequenzen für Proliferation und Differenzierung¹³³. Bei der Gabe lebender Zellen ist nicht zu vergessen, dass eine Kontrolle des biologischen Materials nur begrenzt möglich ist und die Gefahr von maligner Zellproliferation (der MSC selbst¹³⁴ oder MSC stimulierter Zellen des Empfängers¹³⁵) oder Maldifferenzierung vermutlich nicht vollkommen reduziert werden kann. Nötig ist ein Sicherheits-Monitoring über lange Zeiträume¹³¹.

Reine MSC-Kulturen trotz Mangel an spezifischen MSC-Markern herzustellen ist eine große Herausforderung, jedoch für die Sicherheit der Zell-Transplantation essentiell. Retrospektive Analysen von MSC-Kulturen, die aus Knochenmark von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen isoliert worden waren, zeigten beispielsweise häufig Verunreinigungen mit Osteoklasten¹³⁶. Solche Kontaminationen mindern die MSC-Ausbeute aus dem Aspirat und erhöhen das Risiko eines ungewollten Nebeneffektes verursacht durch Behandlung mit „nicht-MSC-artigen“ Zellen, deren Verhalten nach Transplantation unerforscht ist. Andererseits sehen einige Publikationen genau in jener Heterogenität der MSC-Populationen und -kulturen einen Benefit³³. Eine Umsetzung der idealen Vorstellung einer autologen MSC-Therapie in CKD-Patienten wird damit erschwert. Die Zellen jedes Patienten sind unterschiedlich „vorbelastet“ und nicht standardisierbar. Es besteht auch die Möglichkeit einer Beeinflussung der Zellen durch medikamentöse Behandlung des Patienten.

Erste publizierte Daten sowie der zweite Teil der hier vorliegenden Arbeit zeigen, dass CKD die MSC modifiziert^{75,137}. Somit liegt im vielfach genannten Vorteil der MSC als Therapeutikum, welches sich seiner Umgebung anpasst und einen variablen Einsatz in der

regenerativen Medizin erlaubt, gleichzeitig ein erhöhtes Risiko. Bislang unzureichend analysierte Modifikationen der MSC, sowohl der residenten Zellen als auch transplanteder Populationen, durch ein urämisches Milieu könnten unerwünschte Phänomene, wie z.B. Maldifferenzierung, erklären. Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten u.a. zeigen, dass perivaskuläre MSC sehr wahrscheinlich im urämischen Milieu von CKD-Patienten aktiv zur Gefäßverkalkung beitragen^{96,137,138}.

Reduziert der Einfluss der Urämie auf Knochenmarks-MSC deren Potenzial für autologe Therapien bei CKD-Patienten?

Die o.g. Vor- und Nachteile der MSC-Applikation bei chronischen Nierenerkrankungen werden in dieser Arbeit um einen weiteren Aspekt ergänzt, der mitunter die Varianz der bisherigen Ergebnisse zu MSC als CKD-Therapeutikum erklären könnte: CKD verändert Stadien-abhängig den Phänotyp von Knochenmarks-MSC und mindert vermutlich so deren therapeutisches Potenzial.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Knochenmarks-MSC aus zwei unterschiedlichen CKD-Modellen mit gesunden MSC gesunder Ratten verglichen. Beim bereits im ersten Versuchsteil eingesetzten Modell der 5/6 Nephrektomie entwickelten die Ratten eine progrediente Niereninsuffizienz mit intraglomerulärer und systemischer Hypertonie, Proteinurie, Glomerulosklerose sowie tubulointerstitieller Fibrose (Abschnitt 4.1). Auch bei der Adenin-induzierten Nephropathie entstanden chronische Entzündungsreaktionen und interstitielle Fibrose (4.2.1). Ein sekundärer Hyperparathyreoidismus (mittels ELISA wurden signifikant erhöhte PTH-Level im Serum nachgewiesen) trägt hier zusätzlich zur kardialen Schädigung bei.

Entsprechend zeigte sich in beiden Krankheitsmodellen bei den Versuchstieren eine deutliche Abnahme der Nierenfunktion. Da die Progression der CKD jedoch –ebenso wie bei Patienten– stark variierte, wurden die Ratten anhand ihrer Nierenfunktion zum Tötungszeitpunkt (welcher dem Zeitpunkt der MSC-Isolation entsprach) in zwei Gruppen unterteilt: 1. Spender mit schwerer Niereninsuffizienz: CKDsev (für engl. *severe chronic kidney disease*) und 2. Spender mit beginnender Niereninsuffizienz: CKDmod (für engl. *moderate chronic kidney disease*).

Dies erlaubte eine Beurteilung der MSC-Funktion in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium. Dass es sich bei allen Knochenmarks-Präparationen um MSC handelte, war Voraussetzung für einen Vergleich der Zellen und wurde mit der Überprüfung der Oberflächenantigen-Expression sowie Induktion von adipogener und osteogener Differenzierung *in vitro* bestätigt (Abschnitte 4.3.1 und 4.3.4).

Diskussion

In vitro exprimierten die urämischen MSC aus Ratten mit 5/6 Nx oder Adenin-Nephropathie mehr Aktin-Stressfasern (quantifiziert mittels Westernblot, Abschnitt 4.3.1), adhärten großflächiger, zeigten eine deutlich reduzierte Proliferationskapazität (quantifiziert durch Zellpopulationsanalysen, Abschnitt 4.3.2) und spontane adipogene Differenzierung (nachgewiesen mittels RT-qPCR und Oil Red O-Färbung, Abschnitt 4.3.4) sowie Akkumulation aktiver Sa- β -Galaktosidase (nachgewiesen mittels enzymatischer Färbung und Enzym-Aktivitäts-Assay, Abschnitt 4.3.3). All diese Veränderungen sind Kennzeichen zellulärer Seneszenz.

Den Begriff „zelluläre Seneszenz“ definierten bereits 1961 Hayflick & Moorhead als einen „essentiellen irreversiblen Arrest der Zellteilung“¹³⁹. Seneszente Zellen bleiben zwar metabolisch aktiv, können sich aber nicht mehr, bzw. nur noch sehr begrenzt, teilen. Dies ist ein wichtiger biologischer Prozess zur Vermeidung unkontrollierter maligner Vermehrung geschädigter Zellen^{140,141}. Im Gegensatz zum Ruhezustand (*quiescence state*) von Stammzellen, ist der Zellzyklus-Arrest bei der Seneszenz irreversibel. Physiologisch gealterte / seneszente MSC werden nicht zwangsläufig apoptotisch, verbleiben aber dauerhaft in der G1-Phase des Zellzyklus und zeigen dabei phänotypische sowie epigenetische Veränderungen. Entsprechend der oben genannten Definition haben seneszente MSC eine stark eingeschränkte Proliferationskapazität mit Abnahme der Teilungsgeschwindigkeit und Reduktion der CFU (von engl. *colony forming unit*)-Größe und -Anzahl^{93,142}. Seneszente Zellen sind oft besonders groß, weisen verstärkt zelluläre Ausläufer / Podien auf und enthalten mehr Aktin-Stressfasern⁹³. Gleichzeitig ist die Dynamik des Zytoskeletts eingeschränkt, was die MSC-Reaktion auf externe Stimuli reduziert¹⁴³. Auch die Differenzierungskapazität verändert sich, alte MSC verlieren ihr osteogenes Potenzial und entwickeln sich in Richtung adipogener Linie. Diese Umstellung wird auch „*adipogenic switch*“ genannt und gilt als einer der möglichen Gründe für altersbedingten Knochenschwund / Osteoporose⁹³. Zu den Änderungen im Sekretionsverhalten seneszenten MSC gehören erniedrigte TGF- β - und BMP2/4-Level, was zum „*adipogenic switch*“ beitragen dürfte. Eine Zunahme der Seneszenz-assoziierten- β -Galaktosidase gilt ebenfalls als Seneszenzmarker^{144,145}. *In vitro*-Kultur von primären Zellen führt früher oder später zu Seneszenz, weshalb die Anzahl an Zellteilungen und damit die mögliche Dauer der Kultur/Anzahl der Passagen begrenzt ist^{139,146}. Auch für MSC ist beschrieben, dass sie in hohen Passagen diese *in vitro*-Seneszenz zeigen und in Kultur keine aktive Telomerase mehr besitzen^{144,147}. Die Arbeitsgruppe um Wagner und Kollegen zeigte zudem, dass humane MSC in Kultur DNA-Methylierungen erfahren, welche Genexpressionen ändern und mit dem seneszenten Phänotyp assoziiert sind^{145,148-150}.

Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass MSC aus urämischen Tieren *in vitro* bereits in der zweiten Passage viele der beschriebenen Seneszenz-Marker aufweisen. Eine Theorie besagt, dass extrinsische Faktoren (d.h. Veränderungen der Nische) zu einer MSC-Seneszenz führen könnten, wie es vermutlich auch bei Isolation und Langzeit-Kultur von MSC außerhalb ihrer physiologischen Nische geschieht⁹³. Möglicherweise führt so auch die Urämie bei CKD-Ratten bei diesen Zellen zum Teilungsarrest. Eine Induktion spontaner adipogener Differenzierung (als Seneszenz-Merkmal) durch urämische Bedingungen könnte zudem retrospektiv die adipogene Mالدifferenzierung im chronischen Modell der anti-Thy1.1-Nephritis erklären, welche unsere Arbeitsgruppe bereits 2007 beschrieb⁴⁷.

Einige der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro*-Analysen zeigten, dass die CKD-bedingte Seneszenz abhängig vom CKD-Stadium zu sein scheint. So exprimierten CKDmod-MSC noch mehr Aktin-Stressfasern und mehr osteogene Marker wie Cbfa1 und Osteocalcin, wohingegen CKDsev-MSC bereits spontane Fettdifferenzierung zeigten (Abschnitte 4.3.1 und 4.3.4). Die Anzahl Sa-β-Gal-positiver Zellen und auch die Enzymaktivität nahmen mit dem Krankheitsgrad zu (Abschnitt 4.3.3). CKDsev-MSC stimulierten eine stärkere Matrixproduktion von Fibroblasten als CKDmod-MSC (Abschnitt 4.3.5).

Interessant ist, dass der urämische MSC-Phänotyp unter (nicht-urämischen) Kulturbedingungen nicht reversibel war. Man könnte spekulieren, ob es auch bei MSC ein sog. „*uremic memory*“ gibt. Dieser Begriff wurde in der Literatur geprägt, da Patienten mit einer kurzen Episode akuter Niereninsuffizienz (ANV), selbst wenn diese komplett ausgeheilt zu sein scheint, langfristig ein sehr stark erhöhtes Risiko für CKD aufweisen. Offensichtlich hinterlässt also auch eine zeitlich begrenzte AKI signifikante Spuren im betroffenen Körper^{151,152}.

Im Hinblick auf eine autologe Zelltherapie ist von Bedeutung, ob bereits ein zeitlich begrenztes ANV ausreicht, um dauerhafte Schäden an MSC zu verursachen und ob diese Veränderungen unausweichlich sind. Denkbar wären Toleranzgrenzen bis zu einem bestimmten zeitlichen oder Konzentrations-abhängigen Limit ("*point-of-no-return*"), bis zu dem durch eine Verbesserung der Nierenfunktion eine Regeneration der Vorläuferzellen möglich ist.

Wie bereits erwähnt sind für den therapeutischen Einsatz der MSC die sekretorischen Eigenschaften besonders wichtig. In dieser Arbeit wurde daher die Produktion verschiedener Zytokine auf Protein- und / oder mRNA-Ebene analysiert (Abschnitt 4.3.5). Während keine signifikanten Unterschiede in der TGF-β-Produktion gemessen wurden (ELISA), war die mRNA-Expression von PDGF-A, -B, -C und PDGFR-β in urämischen MSC hochreguliert

Diskussion

gegenüber gesunden MSC (RT-qPCR). Auswirkungen könnte dies zum einen auf die Zielzellen haben, da PDGFs potente Mitogene darstellen und verschiedene renale Zelltypen und besonders pro-fibrotische Myofibroblasten stimulieren^{12,153}. Zum anderen ist das PDGF-Signal für die MSC selbst von Bedeutung und reguliert ihre Proliferation und Differenzierung¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. Selektive Blockade oder Depletion von PDGF-Rezeptoren in humanen MSC führte zu einer Erhöhung der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Nanog und zu einem höheren Stammzellpotenzial¹⁵⁷. Die hier detektierte vermehrte Expression von PDGF-Liganden und Rezeptoren in urämischen MSC könnte demnach möglicherweise deren spontane Differenzierung unterstützen.

Gesunde MSC sekretierten signifikant höhere Konzentrationen der pro-inflammatorischen Chemokine CINC-2 α/β , CINC-3 sowie MIP-1 α als urämische MSC (Ergebnisse der Zytokin Arrays). Eine direkte Aussage bezüglich *in vivo* Funktion ist davon allerdings aufgrund der Anpassungsfähigkeit der MSC auf ihre Umgebung schlecht abzuleiten. Es stellt sich hier aber ein weiterer Unterschied zwischen den MSC-Subgruppen dar, der nur auf die Krankheit des Spendertieres zurückführbar ist, da die Kulturbedingungen in allen MSC-Gruppen gleich waren. Alle MSC produzierten *in vitro* weitere pro-inflammatorische chemotaktische Zytokine wie Rantes und LIX, aber gleichzeitig auch anti-inflammatorische Faktoren wie IL-1-ra und IL-6. Da der Array nur relative Vergleiche ermöglicht, bleibt unklar inwiefern diese Konzentrationen physiologisch relevant sind im Falle der Zell-Transplantation. Die Produktion pro-inflammatorischer Moleküle durch MSC in Kultur könnte ein weiteres Zeichen von replikativer *in vitro* Seneszenz sein¹³¹.

Vor allem hohe Varianzen der Zytokin-Produktion in den einzelnen Gruppen bedingten ausbleibende weitere signifikante Unterschiede zwischen den MSC-Gruppen. Gleichzeitig zeigt dies aber wie unterschiedlich die MSC-Populationen der Spendertiere jeder Gruppe tatsächlich sind –trotz standardisierter Isolationsprotokolle und Kulturbedingungen. Obwohl damit in dieser Arbeit insgesamt nur wenige signifikante Unterschiede im Sekretionsprofil gesunder und urämischer MSC belegt werden konnten, zeigte ein funktionaler *in vitro* Test an Fibroblasten, dass eher urämische MSC die Matrixsynthese anregen und so zur Fibrose beitragen könnten. Faktoren mit direkter anti-fibrotischer Wirkung, wie beispielsweise IFN- γ oder TNF- α , wurden von allen MSC-Subgruppen *in vitro* gar nicht oder nur in sehr geringem Ausmaße sekretiert und waren im Array nicht detektierbar.

Um einen bedeutenden Unterschied zwischen gesunden und urämischen MSC herauszuarbeiten, der tatsächlich Differenzen in ihrer physiologischen Funktionalität belegt, wurden die Zellen *in vivo* getestet. Dazu setzten wir ein immunologisches Modell der akuten Glomerulonephritis ein, die anti-Thy1.1-Nephritis. Publikationen unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass gesunde Knochenmarks-MSK hier die Heilung der Glomeruli

Diskussion

beschleunigen⁴². Analog zum damaligen Versuchsdesign wurden jetzt gesunde (wildtyp oder hPLAP-transgen) oder urämische MSC an Tag 2 der Erkrankung appliziert, was dem Höhepunkt der Mesangiolyse entspricht. An Tag 4 bzw. Tag 6 wurden die Nierenfunktion und -histologie verglichen (Abschnitt 4.4.2). Anders als bei der 5/6 Nephrektomie wurden die Zellen hier direkt intraarteriell appliziert und nur eine der beiden Nieren zu einem Zeitpunkt behandelt. Dies ermöglichte eine direkte Messung des Behandlungserfolges, da in jedem Tier die direkt behandelte (linke) und allenfalls indirekt behandelte (rechte) Niere verglichen werden konnten. Mit einer intraarteriellen Applikation kann zudem gezielt das beschädigte Gewebe behandelt und die lokale MSC-Konzentration erhöht werden. Gleichzeitig wird in der anti-Thy1.1-Nephritis das Stützgerüst des Glomerulus durch die Lyse des Mesangiums zerstört, was die Akkumulation der Zellen in erweiterten Gefäßen vermutlich positiv beeinflusst.

Obwohl gesunde wildtyp MSC und gesunde hPLAP-transgene MSC *in vivo* zunächst separat analysiert wurden, konnten die Behandlungen als gleichwertig angesehen werden. Keine der *in vitro* Analysen hatte einen Unterschied zwischen gesunden wildtyp und hPLAP-transgenen MSC bezüglich Proliferations- und Differenzierungskapazität, Sa- β -Galaktosidase oder Sekretionsprofil ergeben (Abschnitt 4.3.6). Auch der Verlauf der anti-Thy1.1-Nephritis hatte keinen Unterschied zwischen hPLAP-transgenen Tieren im Vergleich mit gesunden Ratten gezeigt (Abschnitt 4.4.3). Somit konnte ein Einfluss des Transgens auf die Nephritis weitestgehend ausgeschlossen werden.

Während an Tag 4 der anti-Thy1.1-Nephritis keine Unterschiede in der Nierenfunktion zwischen den Behandlungsgruppen (gesunde MSC, urämische MSC, Kontrollmedium) vorlagen, hatten die Tiere mit gesunden MSC-Transplantaten an Tag 6 signifikant geringere Proteinurie, jedoch gleichzeitig leicht erhöhte S-Harnstoff-Konzentrationen.

Da gesunde MSC an Tag 4 die glomeruläre Proliferationsrate signifikant erhöht hatten, war bei dieser Behandlung das Mesangium an Tag 6 bereits besser rekonstruiert und der Mesangiolyse-Score dementsprechend signifikant erniedrigt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen früherer Experimente unserer Arbeitsgruppe⁴². Weder das Kontroll-Medium noch die urämischen MSC aus 5/6 nephrektomierten- oder Adenin-Ratten konnten die glomeruläre Heilung beschleunigen. Ein Unterschied der Behandlung aufgrund von unterschiedlich starkem *Zell-engraftment* wurde durch die Quantifizierung der PKH-Fluoreszenz in den Glomeruli ausgeschlossen. Hier waren alle Gruppen sowohl in der Anzahl PKH-positiver Glomeruli als auch in der PKH-positiven Fläche / Glomerulus annähernd gleich. Obwohl die *in vitro* Stimulation von Fibroblasten mit konditioniertem Medium von CKD-MSK zu erhöhter Matrixsynthese geführt hatte, zeigte sich *in vivo* kein

Diskussion

Unterschied im glomerulären Gehalt von Kollagen I und damit immerhin kein pro-fibrotischer Effekt der urämischen MSC.

Ein Unterschied in der Anzahl infiltrierender Monozyten / Makrophagen konnte an Tag 6 nicht detektiert werden, was ebenfalls das Ergebnis der Publikation von 2006 reproduziert ⁴². Ein Widerspruch liegt in dem ausbleibenden Unterschied der α -SMA-positiven Fläche, da diese parallel mit einer gesteigerten mesangialen Regeneration (nach Behandlung mit gesunden MSC) ansteigen müsste ¹⁵⁸. In den hier gezeigten Analysen war jedoch kein Unterschied messbar, trotz signifikanter Unterschiede in der Mesangiolyse. Die Besserung der Nierenfunktion gemessen an der signifikant geringeren Proteinurie bestätigte aber den Erfolg der Behandlung mit gesunden MSC.

Dieses *in vivo* Experiment unterstützt die vorangegangenen *in vitro* Befunde zu urämischen MSC aus Abschnitt 4.3. MSC aus dem Knochenmark von Ratten mit 5/6 Nephrektomie oder Adenin-induzierter Nephropathie konnten in einem Modell einer akuten Glomerulonephritis keine therapeutischen Effekte erzielen, anders als gesunde MSC. Dabei reichte es bereits aus, wenn sich die Zellspender „nur“ in einem milden Stadium der chronischen Nierenerkrankung befanden (CKDmod). Die *in vitro* gefundenen Seneszenz-ähnlichen Marker könnten dazu einen Erklärungsansatz bieten. Seneszenz muss zwar nicht zwingend die Sekretionsaktivität mindern, dennoch blieb bei der anti-Thy1.1-Nephritis mit urämischen MSC der (wahrscheinlich parakrin-vermittelte) Regenerationseffekt aus. Möglich wäre auch, dass die urämischen MSC zwar noch aktiv sezernieren können, aber nicht mehr ausreichend bzw. anders auf die externen Stimuli in ihrer neuen, immunologisch entzündeten Umgebung reagieren. Bestätigt wird dieser Befund durch eine Publikation von van Koppen und Kollegen aus dem Jahr 2012. Hier wurde gezeigt, dass eine Transplantation von Knochenmark gesunder Ratten eine CKD besser therapiert als Knochenmark aus CKD-Ratten ⁷⁶.

Welche Faktoren / urämische Toxine die Veränderungen genau bewirken könnten ist unbekannt. Bei chronischen Nierenerkrankungen sind sehr viele physiologische Parameter verändert, bislang sind über 100 sog. „urämische Toxine“ identifiziert ^{159 160}. Vermutlich ist es die komplexe Vergiftung des Körpers mit all ihren „Nebeneffekten“ (z.B. Azidose, Arteriosklerose, Anämie, Blutungen, Insulin-Resistenz, Hormon-Störungen, Hautveränderungen, Immundefekte) ¹⁶¹, welche die Veränderungen der Zellen bedingt. Da Urin *per se* zytotoxisch auf MSC wirkt ¹⁶², ist es nicht überraschend, wenn die bei CKD im Körper akkumulierenden Urämietoxine ebenfalls Einfluss auf die MSC nehmen würden. Insgesamt werden Alterungsprozesse von Stammzellen u.a. über deren Nischen reguliert ¹⁶³ und diese könnten vermutlich bei CKD / Urämie Veränderungen erfahren.

Ausgehend von diesen Befunden sollte auch die anti-fibrotische Wirkung von MSC bei renaler Fibrose reevaluiert werden. Berichte über anti-inflammatorische und anti-fibrotische Wirkungen von MSC bei unilateralen Nierenschädigungs-Modellen, wie beispielsweise UUO^{50,164}, berücksichtigen nicht das Fehlen des urämischen Zustandes aufgrund der kontralateralen Niere. Denn diese eine gesunde Niere ist zur vollständigen Entgiftung des Körpers ausreichend. MSC können in unilateralen Modellen entsprechend unbeeinträchtigt von urämischen Substanzen wirken. Für eine Translation in die Klinik sind diese Ergebnisse dahingehend wenig hilfreich, da CKD-Patienten in höheren Stadien definitionsgemäß erhöhte Retentionswerte aufweisen.

Variiert der Einfluss der CKD / Urämie auf MSC abhängig von deren Ursprungsgewebe oder –organ? Beeinflusst CKD auch renale Progenitoren?

Mesenchymale Stammzellen sind eine heterogene Zellgruppe. Neben dem Knochenmarksstroma wurden sie bereits in vielen soliden Organen als perivaskuläre Zellen identifiziert und auch isoliert³⁶. Diese Zellpopulationen erfüllen zwar *in vitro* die minimalen MSC-Kriterien (Plastik-Adhärenz, Oberflächen-Marker-Expression, Differenzierungspotenzial für mesenchymale Linien²³), variieren jedoch in ihren übrigen Eigenschaften. Zum Zweck heterologer oder autologer Transplantationen sind Knochenmark und Fettgewebe relativ gut zugängliche Gewebe für eine Zellisolation. Daher wurde auch in dieser Arbeit das Knochenmark als Isolationsgewebe für die MSC gewählt.

Aber auch MSC aus den beiden Ressourcen Knochenmark und Fettgewebe zeigten bereits in mehreren Veröffentlichungen signifikante Unterschiede. Dmitrieva und Kollegen beschrieben, dass humane Knochenmarks-MSCs signifikant höhere Konzentrationen von VEGF, SDF-1, MCP-1 und TGF- β produzieren als MSCs aus subkutanem Fettgewebe der gleichen Erwachsenen²⁷. Beide Zellpopulationen hatten vergleichbare Proliferationsraten und zeigten nach einiger Zeit eine *in vitro* Seneszenz, wobei in Knochenmarks-MSCs bereits früher (Passage 3-4) erste Anzeichen erkennbar waren als in Fett-MSCs (Passage 6-8)²⁷. Der Anteil seneszenten Zellen in MSC-Isolationen aus Fettgewebe steigt mit der Passage, d.h. parallel mit der Kulturdauer¹⁶⁵, was für therapeutische Einsätze und dafür nötige *in vitro* Expansion unbedingt beachtet werden sollte. Auch MSCs aus der Nabelschnur, dem Fruchtwasser und Knochenmark zeigten Differenzen in Genexpression und Sekretionsprofilen, weshalb sie sich eventuell für unterschiedliche medizinische Einsätze eignen¹⁶⁶.

Unterschiedliche Eigenschaften der Zellen mit unterschiedlicher Herkunft sind wahrscheinlich auf deren biologische Funktion im jeweiligen Gewebe zurückzuführen. Die Frage an dieser

Diskussion

Stelle ist, ob sich solch verschiedene Grundeigenschaften ausgehend vom Herkunftsgewebe auch auf die Sensitivität für CKD auswirken. Eine Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um Roemeling-van Rhijn aus dem Jahr 2012 zeigte, dass MSC aus Fettgewebe von CKD-Patienten keine signifikanten Unterschiede zu gesunden MSC aufweisen (verglichen wurden Marker-Expression, Proliferations- und Differenzierungskapazität und Expression ausgewählter Entzündungs-relevanter Moleküle)¹⁶⁷. Basierend auf den Daten derartiger Berichte wurde inzwischen sogar die erste klinische Studie zu MSC in CKD angemeldet (www.clinicaltrials.gov: NCT01876017, „*Safety and Efficacy of Mesenchymal Stem Cell in Patients With Chronic Renal Failure*“) ¹⁶⁸.

Wenn der Einfluss der CKD auf Zellen zwischen verschiedenen Organen oder Gewebetypen variiert, sind im Sinne einer gezielten Organregeneration besonders die Auswirkungen auf Nieren-residente Zellen interessant. Das bereits erwähnte „*uremic memory*“ weist darauf hin, dass selbst kurze Phasen einer akuten Niereninsuffizienz langfristige Schäden an Nierenzellen verursachen und das Risiko für CKD erhöhen ¹⁵². Bei Patienten mit CKD besteht umgekehrt eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für ein akutes Nierenversagen ^{2,11}.

Neben der Option einer Therapie durch externe Stammzellapplikationen, mit der sich diese Arbeit bis hierhin beschäftigt hat, könnte auch die Förderung der natürlichen Regeneration durch Stimulation residenter Progenitoren in Betracht gezogen werden. In verschiedenen Segmenten des Nephrons, z.B. der Bowman'schen Kapsel ⁹ oder der renalen Papille ¹⁶⁹, und auch der Nierenkapsel ¹⁷⁰ werden bereits Zellen mit Progenitor-Charakter vermutet ¹⁰⁰. Eine oder mehrere weitere potenzielle Populationen renaler Progenitoren befinden sich möglicherweise am vaskulären Pol der Glomeruli als Bestandteil des juxtaglomerulären Apparates. Hier wurden bereits verschiedene Zelltypen mit verschiedenen Funktionen an der afferenten Arteriole beschrieben ¹⁷¹. Den Renin-produzierenden Zellen an der afferenten Arteriole wurden schon Progenitoreigenschaften zugeschrieben ^{172,173} ebenso wie den extraglomerulären Mesangialzellen ^{174,175}.

Inzwischen hat unsere Arbeitsgruppe eine Subgruppe von Renin-produzierenden Zellen identifiziert, die vermutlich ebenfalls an der Regeneration des glomerulären Mesangiums beteiligt ist (unpublizierte Daten). Diese perivaskulären Zellen direkt am Glomerulus können über ihre Expression des Adhäsionsmoleküls CD24 identifiziert werden (Abschnitt 4.5.1). Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese CD24-positive Zellpopulation bei zwei CKD-Modellen (5/6 Nephrektomie und Adenin-induzierte Nephropathie) signifikant reduziert ist (Abschnitt 4.5.2). Es bestand ein proportionaler Zusammenhang zwischen der CD24-positiven Fläche und der Nierenfunktion (gemessen an Retentionswerten von Serum-

Diskussion

Harnstoff und Serum-Kreatinin). Dieses Ergebnis erklärt zwar noch nicht, ob nur das Expressionsmuster verändert wird oder sich die tatsächliche Zellzahl verringert, dennoch repräsentieren beide Fälle eine Veränderung dieser renalen Zellpopulation durch CKD.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit, dass mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark und auch potentielle intrarenale Progenitorzellen durch chronische Nierenerkrankungen beeinflusst werden. Eine Therapie von CKD-Ratten mit syngenen gesunden MSC konnte keine Verbesserung der Nierenfunktion bewirken, ebenso wenig konnten MSC aus CKD-Ratten einen akuten Nierenschaden therapieren. *In vitro* Analysen der Knochenmarks-MSK aus CKD-Tieren zeigten Seneszenz-ähnliche phänotypische Veränderungen, die einen ausbleibenden regenerativen Effekt erklären können.

Bezogen auf den klinischen Einsatz von MSC wirft diese Arbeit zwei wichtige Fragen auf: 1. Wie sicher und effektiv sind Behandlungen von CKD-Patienten mit autologen Knochenmarks-MSK? 2. Was passiert mit gesunden MSC nach Transplantation in urämische Patienten?

6. Zusammenfassung

Weltweit leiden ca. 10-16% der Bevölkerung an einer chronischen Nierenerkrankung (CKD), bei der sich bis zum Terminalstadium eine irreversible renale Fibrose ausbildet. Trotz intensiver Forschung gibt es neben der Dialyse und der Nierentransplantation bislang keine effizienten Therapiemöglichkeiten. Einen neuen Ansatz könnten sog. MSC („mesenchymale Stammzellen“) bieten. Allerdings wird das Potential dieser Zellen bei fibrotischen Erkrankungen stark diskutiert, da in verschiedenen Organen und Spezies sowohl positive anti-fibrotische Wirkungen als auch pro-fibrotische funktionelle und histologische Effekte beschrieben wurden.

Basierend auf diesen Daten wurde nun in dieser Arbeit getestet, ob MSC aus dem Knochenmark von Ratten in Form von syngenen Stammzelltransplantaten als Therapeutikum in der renalen Fibrose einen positiven Effekt haben. Dabei zeigte sich, dass auch wiederholte intravenöse Zell-Applikationen keine Besserung der Nierenfunktion oder – histologie erwirken konnten.

Aus diesem Grund geht der zweite Teil der Arbeit der Frage nach, ob und inwiefern CKD einen Einfluss auf MSC nimmt. Dazu wurden MSC aus dem Knochenmark von Ratten mit CKD (induziert durch zwei verschiedene Krankheitsmodelle: 5/6 Nephrektomie und Adenin-induzierte Nephropathie) isoliert und charakterisiert. *In vitro* zeigten diese urämischen MSC im Vergleich zu gesunden MSC Veränderungen in ihrer Proliferations- und Differenzierungskapazität sowie ihren Sekretionseigenschaften. Viele dieser Anzeichen (verminderte Proliferation, spontane adipogene Differenzierung, Akkumulation von Aktin-Stressfasern und Seneszenz-assoziiertes- β -Galaktosidase) ähneln Merkmalen von zellulärer Seneszenz. Um zu überprüfen, ob diese Seneszenz-ähnlichen phänotypischen Änderungen die Funktionalität der Stammzellen tatsächlich beeinflussen, wurde deren regeneratives Potenzial *in vivo* getestet. In einem gut etablierten Tiermodell der akuten mesangioproliferativen Glomerulonephritis (anti-Thy1.1-Nephritis) konnte eine lokale Behandlung mit urämischen MSC keinen Effekt erzielen, wohingegen gesunde MSC die glomeruläre Heilung beschleunigten.

Eine weitere histologische Analyse ergab zudem, dass CKD ebenfalls eine intrarenale Zellpopulation, welche möglicherweise Progenitoreigenschaften besitzt, modifiziert.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass chronische Nierenerkrankungen mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark und auch intrarenale Zellen in Ratten beeinflussen. Urämische MSC zeigten Seneszenz-ähnliche phänotypische Veränderungen, die eine ausbleibende regenerative Funktionalität erklären können. Dies unterstreicht die Notwendigkeit weiterer präklinischer Untersuchungen bezüglich der Sicherheit und Effizienz von MSC für autologe Zelltherapien in CKD-Patienten.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Humphreys, B. D. & Dirocco, D. P. Lineage-tracing methods and the kidney. *Kidney Int* (2013).
- 2 Levey, A. S. & Coresh, J. Chronic kidney disease. *Lancet* **379**, 165-180 (2012).
- 3 Eckert, R., Randall, D., Burggren, W. & French, K. *Tierphysiologie*. 4. Auflage (Georg Thieme Verlag, 2002).
- 4 Silbernagel, S. & Despopoulos, A. *Taschenatlas der Physiologie*. 6. Auflage (Georg Thieme Verlag, 2003).
- 5 KDIGO. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group: KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int. Suppl.* **2**, 1–138 (2012).
- 6 Thurman, J. M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol* **123**, 7-13 (2007).
- 7 Wynn, T. A. Fibrosis under arrest. *Nat Med* **16**, 523-525 (2010).
- 8 Mene, P., Polci, R. & Festuccia, F. Mechanisms of repair after kidney injury. *J Nephrol* **16**, 186-195 (2003).
- 9 Romagnani, P. & Kalluri, R. Possible mechanisms of kidney repair. *Fibrogenesis Tissue Repair* **2**, 3 (2009).
- 10 Boor, P. Neue Ansätze bei progressiven Nierenerkrankungen. *Pathologe* **33 Suppl 2**, 296-301 (2012).
- 11 KDIGO. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group: KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int. Suppl.* **3**, 1-150 (2012).
- 12 Boor, P., Ostendorf, T. & Floege, J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* **6**, 643-656 (2010).
- 13 Liu, Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* **69**, 213-217 (2006).
- 14 Hewitson, T. D. Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F1239-1244 (2009).
- 15 Wynn, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**, 199-210 (2008).
- 16 Eitner, F. & Floege, J. Novel insights into renal fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**, 227-232 (2003).
- 17 Conway, B. & Hughes, J. Cellular orchestrators of renal fibrosis. *Qjm* **105**, 611-615 (2012).
- 18 LeBleu, V. S. *et al.* Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* **19**, 1047-1053 (2013).
- 19 *Information der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN)*,
<<http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/daten-und-fakten-zur-nephrologie.html>>,
aufgerufen am 3.11.2013.
- 20 Scholer, H. R. Das Potenzial von Stammzellen: eine Bestandsaufnahme. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* **47**, 565-577 (2004).
- 21 Nombela-Arrieta, C., Ritz, J. & Silberstein, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **12**, 126-131, doi:10.1038/nrm3049 (2011).
- 22 Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* **8**, 726-736 (2008).
- 23 Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317 (2006).
- 24 Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* **7**, 259-264 (2001).
- 25 Niemeyer, P. *et al.* Adulte mesenchymale Stammzellen zur Regeneration muskuloskeletaler Gewebe. *MMW Fortschr Med* **146**, 107-113 (2004).
- 26 Humphreys, B. D. & Bonventre, J. V. in *Regenerative Nephrology* (ed M. S. Goligorsky) 153-166 (Elsevier, 2010).
- 27 Dmitrieva, R. I. *et al.* Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle* **11**, 377-383 (2012).
- 28 Boxall, S. A. & Jones, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int* **2012**, 975871 (2012).

Literatur

- 29 Mendez-Ferrer, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834 (2010).
- 30 Phinney, D. G. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem* **113**, 2806-2812 (2012).
- 31 Phinney, D. G. & Prockop, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* **25**, 2896-2902 (2007).
- 32 Salem, H. K. & Thiemermann, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* **28**, 585-596 (2009).
- 33 Murphy, M. B., Moncivais, K. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* **45**, e54 (2013).
- 34 Chen, W. C. *et al.* Cellular kinetics of perivascular MSC precursors. *Stem Cells Int* **2013**, 983059 (2013).
- 35 da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C. & Nardi, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **119**, 2204-2213 (2006).
- 36 Crisan, M. *et al.* A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301-313 (2008).
- 37 Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).
- 38 Le Blanc, K. & Pittenger, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* **7**, 36-45 (2005).
- 39 Wise, A. F. & Ricardo, S. D. Mesenchymal stem cells in kidney inflammation and repair. *Nephrology (Carlton)* **17**, 1-10 (2012).
- 40 Togel, F. *et al.* Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* **289**, F31-42 (2005).
- 41 Lange, C. *et al.* Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int* **68**, 1613-1617 (2005).
- 42 Kunter, U. *et al.* Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **17**, 2202-2212 (2006).
- 43 Bussolati, B. & Camussi, G. Stem cells in acute kidney injury. *Contrib Nephrol* **156**, 250-258 (2007).
- 44 Westenfelder, C. & Togel, F. Protective actions of administered mesenchymal stem cells in acute kidney injury: relevance to clinical trials. *Kidney Int Suppl* **1**, 103-106 (2011).
- 45 *Phase I Clinical Trial: Dose Escalating Intra aortic Infusion of Allogeneic, Bone Marrow derived Multipotent Stromal Cells to Prevent and Treat Post operative Acute Kidney Injury in Patients Who Require On pump Cardiac Surgery*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00733876?term=NCT00733876&rank=1>, aufgerufen am 3.11.2013.
- 46 *Ex Vivo Expanded Mesenchymal Stem Cells To Repair The Kidney And Improve Function In Cisplatin Induced Acute Renal Failure In Patients With Solid Organ Cancers*, <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01275612?term=NCT01275612&rank=1>, aufgerufen am 3.11.2013.
- 47 Kunter, U. *et al.* Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol* **18**, 1754-1764 (2007).
- 48 Iwano, M. & Neilson, E. G. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **13**, 279-284 (2004).
- 49 Zeisberg, M., Strutz, F. & Muller, G. A. Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **10**, 315-320 (2001).
- 50 Asanuma, H. *et al.* Arterially delivered mesenchymal stem cells prevent obstruction-induced renal fibrosis. *J Surg Res* **168**, e51-59 (2011).
- 51 Lee, S. R. *et al.* Repeated administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improved the protective effects on a remnant kidney model. *Ren Fail* **32**, 840-848 (2010).
- 52 Choi, S. *et al.* The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure. *Stem Cells Dev* **18**, 521-529 (2009).
- 53 Cavaglieri, R. C., Martini, D., Sogayar, M. C. & Noronha, I. L. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *Transplant Proc* **41**, 947-951 (2009).

Literatur

- 54 Semedo, P. *et al.* Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells* **27**, 3063-3073 (2009).
- 55 Ezquer, F. *et al.* Endovenous administration of bone-marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells prevents renal failure in diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant* **15**, 1354-1365 (2009).
- 56 Eirin, A. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem Cells* **30**, 1030-1041 (2012).
- 57 Villanueva, S. *et al.* Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. *Clin Sci (Lond)* **121**, 489-499 (2011).
- 58 Villanueva, S. *et al.* Human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue reduce functional and tissue damage in a rat model of chronic renal failure. *Clin Sci (Lond)* **125**, 199-210 (2013).
- 59 Ma, Y. Y., Sun, D., Li, J. & Yin, Z. C. Transplantation of endothelial progenitor cells alleviates renal interstitial fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. *Life Sci* **86**, 798-807 (2010).
- 60 Sangidorj, O. *et al.* Bone marrow-derived endothelial progenitor cells confer renal protection in a murine chronic renal failure model. *Am J Physiol Renal Physiol* **299**, F325-335 (2010).
- 61 Ninichuk, V. *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells reduce interstitial fibrosis but do not delay progression of chronic kidney disease in collagen4A3-deficient mice. *Kidney Int* **70**, 121-129 (2006).
- 62 Magnasco, A. *et al.* Mesenchymal stem cells protective effect in adriamycin model of nephropathy. *Cell Transplant* **17**, 1157-1167 (2008).
- 63 Kirpatovskii, V. I. *et al.* Functional aftereffects of intraparenchymatous injection of human fetal stem and progenitor cells to rats with chronic and acute renal failure. *Bull Exp Biol Med* **141**, 500-506 (2006).
- 64 Broekema, M. *et al.* Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats. *J Am Soc Nephrol* **18**, 165-175 (2007).
- 65 Lee, C. H., Shah, B., Moiola, E. K. & Mao, J. J. CTGF directs fibroblast differentiation from human mesenchymal stem/stromal cells and defines connective tissue healing in a rodent injury model. *J Clin Invest* **120**, 3340-3349 (2010).
- 66 di Bonzo, L. V. *et al.* Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* **57**, 223-231 (2008).
- 67 Baertschiger, R. M. *et al.* Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One* **4**, e6657 (2009).
- 68 Salazar, K. D., Lankford, S. M. & Brody, A. R. Mesenchymal stem cells produce Wnt isoforms and TGF-beta1 that mediate proliferation and procollagen expression by lung fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**, L1002-1011 (2009).
- 69 Breitbach, M. *et al.* Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* **110**, 1362-1369 (2007).
- 70 Jourde-Chiche, N. *et al.* Levels of circulating endothelial progenitor cells are related to uremic toxins and vascular injury in hemodialysis patients. *J Thromb Haemost* **7**, 1576-1584 (2009).
- 71 Jie, K. E. *et al.* Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 1875-1882 (2010).
- 72 Schlieper, G. *et al.* Predictors of low circulating endothelial progenitor cell numbers in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 2611-2618 (2008).
- 73 de Groot, K. *et al.* Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. *Kidney Int* **66**, 641-646 (2004).
- 74 Westerweel, P. E. *et al.* End-stage renal disease causes an imbalance between endothelial and smooth muscle progenitor cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F1132-1140 (2007).
- 75 Noh, H. *et al.* Uremia induces functional incompetence of bone marrow-derived stromal cells. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 218-225 (2012).
- 76 van Koppen, A. *et al.* Healthy bone marrow cells reduce progression of kidney failure better than CKD bone marrow cells in rats with established chronic kidney disease. *Cell Transplant* **21**, 2299-2312 (2012).
- 77 Kisseberth, W. C., Brettingen, N. T., Lohse, J. K. & Sandgren, E. P. Ubiquitous expression of marker transgenes in mice and rats. *Dev Biol* **214**, 128-138 (1999).

Literatur

- 78 Roth, V. <http://www.doubling-time.com/compute.php>. (2006).
- 79 Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9363-9367 (1995).
- 80 Lee, B. Y. *et al.* Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* **5**, 187-195 (2006).
- 81 Engle, S. J. *et al.* Adenine phosphoribosyltransferase-deficient mice develop 2,8-dihydroxyadenine nephrolithiasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5307-5312 (1996).
- 82 Evan, A. P. *et al.* Sequential analysis of kidney stone formation in the Aprt knockout mouse. *Kidney Int* **60**, 910-923 (2001).
- 83 Bollee, G. *et al.* Phenotype and genotype characterization of adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *J Am Soc Nephrol* **21**, 679-688 (2010).
- 84 Okabe, C. *et al.* NF-kappaB activation mediates crystal translocation and interstitial inflammation in adenine overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* **305**, F155-163 (2013).
- 85 Thaiss, F. & Stahl, R. A. K. IgA-Nephropathie -Klinik, Pathogenese und Therapie der häufigsten Glomerulonephritis. *Dt Arztebl* **97**, A 2708-2711 (2000).
- 86 Floege, J. & Bienert, A. Glomerulonephritis. *Dtsch Med Wochenschr* **138**, 1515-1524; quiz 1525-1518 (2013).
- 87 Ostendorf, T. *et al.* The effects of platelet-derived growth factor antagonism in experimental glomerulonephritis are independent of the transforming growth factor-beta system. *J Am Soc Nephrol* **13**, 658-667 (2002).
- 88 Floege, J. & Feehally, J. IgA nephropathy: recent developments. *J Am Soc Nephrol* **11**, 2395-2403 (2000).
- 89 Kriz, W. *et al.* Pathways to recovery and loss of nephrons in anti-Thy-1 nephritis. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1904-1926 (2003).
- 90 Bagchus, W. M., Hoedemaeker, P. J., Rozing, J. & Bakker, W. W. Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy 1.1 antibodies. A sequential histological and ultrastructural study in the rat. *Lab Invest* **55**, 680-687 (1986).
- 91 Unger, N. J., Odorfer, K. I., Weber, K., Sandgren, E. P. & Erben, R. G. Utility of human placental alkaline phosphatase as a genetic marker for cell tracking in bone and cartilage. *Histochem Cell Biol* **127**, 669-674 (2007).
- 92 Odorfer, K. I., Unger, N. J., Weber, K., Sandgren, E. P. & Erben, R. G. Marker tolerant, immunocompetent animals as a new tool for regenerative medicine and long-term cell tracking. *BMC Biotechnol* **7**, 30 (2007).
- 93 Sethe, S., Scutt, A. & Stolzing, A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* **5**, 91-116 (2006).
- 94 Nagasaki, H. *et al.* Low-serum culture system improves the adipogenic ability of visceral adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Biol Int* **35**, 559-568 (2011).
- 95 Hemmingsen, M. *et al.* The role of paracrine and autocrine signaling in the early phase of adipogenic differentiation of adipose-derived stem cells. *PLoS One* **8**, e63638 (2013).
- 96 Kramann, R. *et al.* Exposure to uremic serum induces a procalcific phenotype in human mesenchymal stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, e45-54 (2011).
- 97 Kollmer, M., Buhrman, J. S., Zhang, Y. & Gemeinhart, R. A. Markers Are Shared Between Adipogenic and Osteogenic Differentiated Mesenchymal Stem Cells. *J Dev Biol Tissue Eng* **5**, 18-25 (2013).
- 98 Lin, G. L. & Hankenson, K. D. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* **112**, 3491-3501 (2011).
- 99 Jaggupilli, A. & Elkord, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol* **2012**, 708036 (2012).
- 100 Little, M. H. & Bertram, J. F. Is there such a thing as a renal stem cell? *J Am Soc Nephrol* **20**, 2112-2117 (2009).
- 101 Gruppo, R. A. & Rother, R. P. Eculizumab for congenital atypical hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* **360**, 544-546, doi:10.1056/NEJMc0809959, 360/5/544 [pii] (2009).
- 102 Pallan, L., Savage, C. O. & Harper, L. ANCA-associated vasculitis: from bench research to novel treatments. *Nat Rev Nephrol* **5**, 278-286 (2009).
- 103 Hugo, C., Schott, G., Eckardt, K. U. & Wullich, B. [ABO-incompatible renal transplantation--why and how?]. *Urologe A* **47**, 1074, 1076-1078, doi:10.1007/s00120-008-1815-1 (2008).
- 104 Park, H. C. *et al.* Postobstructive regeneration of kidney is derailed when surge in renal stem cells during course of unilateral ureteral obstruction is halted. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**, F357-364 (2010).

Literatur

- 105 Alexandre, C. S. *et al.* Lineage-negative bone marrow cells protect against chronic renal
failure. *Stem Cells* **27**, 682-692 (2009).
- 106 Pulavendran, S., Vignesh, J. & Rose, C. Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity
of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced
liver injury in mice. *Int Immunopharmacol* **10**, 513-519 (2010).
- 107 Abdel Aziz, M. T. *et al.* Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells
on experimental liver fibrosis. *Clin Biochem* **40**, 893-899 (2007).
- 108 Rabani, V. *et al.* Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced
liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol Int* **34**, 601-605
(2010).
- 109 Li, L. *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation attenuates cardiac fibrosis associated with
isoproterenol-induced global heart failure. *Transpl Int* **21**, 1181-1189 (2008).
- 110 Mias, C. *et al.* Mesenchymal stem cells promote matrix metalloproteinase secretion by cardiac
fibroblasts and reduce cardiac ventricular fibrosis after myocardial infarction. *Stem Cells* **27**,
2734-2743 (2009).
- 111 Moodley, Y. *et al.* Anti-inflammatory effects of adult stem cells in sustained lung injury: a
comparative study. *PLoS One* **8**, e69299 (2013).
- 112 Carvalho, A. B. *et al.* Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce
fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells* **26**, 1307-
1314 (2008).
- 113 Stokman, G. *et al.* Enhanced mobilization of bone marrow cells does not ameliorate renal
fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* **23**, 483-491 (2008).
- 114 Caldas, H. C. *et al.* Effect of whole bone marrow cell infusion in the progression of
experimental chronic renal failure. *Transplant Proc* **40**, 853-855 (2008).
- 115 Quimby, J. M., Webb, T. L., Habenicht, L. M. & Dow, S. W. Safety and efficacy of intravenous
infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney
disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Res Ther* **4**, 48 (2013).
- 116 Ma, L. J. & Fogo, A. B. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of
genetic background. *Kidney Int* **64**, 350-355 (2003).
- 117 Kokeny, G., Nemeth, Z., Godo, M. & Hamar, P. The Rowett rat strain is resistant to renal
fibrosis. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 1458-1462 (2010).
- 118 Deak, E., Seifried, E. & Henschler, R. Homing pathways of mesenchymal stromal cells
(MSCs) and their role in clinical applications. *Int Rev Immunol* **29**, 514-529 (2010).
- 119 Horton, J. A. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by
suppressing chronic inflammation. *Stem Cells* **31**, 2231-2241 (2013).
- 120 de Vries, D. K., Schaapherder, A. F. & Reinders, M. E. Mesenchymal stromal cells in renal
ischemia/reperfusion injury. *Front Immunol* **3**, 162 (2012).
- 121 Reinders, M. E. *et al.* Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the
treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem
Cells Transl Med* **2**, 107-111 (2013).
- 122 Reinders, M. E., de Fijter, J. W. & Rabelink, T. J. Mesenchymal stromal cells to prevent
fibrosis in kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* (2013).
- 123 van Koppen, A. *et al.* Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium
rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. *PLoS One* **7**, e38746
(2012).
- 124 Chang, J. W. *et al.* Conditioned mesenchymal stem cells attenuate progression of chronic
kidney disease through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition and immune
modulation. *J Cell Mol Med* **16**, 2935-2949 (2012).
- 125 He, J. *et al.* Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the
mouse remnant kidney model. *Nephrology (Carlton)* **17**, 493-500 (2012).
- 126 Gatti, S. *et al.* Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect
against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial
Transplant* **26**, 1474-1483 (2011).
- 127 Thirabanjasak, D., Tantiwongse, K. & Thorner, P. S. Angiomyeloproliferative Lesions
Following Autologous Stem Cell Therapy. *J Am Soc Nephrol* **21**, 1218-1222 (2010).
- 128 Schneider, R. K. Mesenchymale Stromazellen und ihre Nische. *Pathologe* **34 Suppl 2**, 264-
268 (2013).
- 129 Lindoso, R. S. *et al.* Paracrine interaction between bone marrow-derived stem cells and renal
epithelial cells. *Cell Physiol Biochem* **28**, 267-278 (2011).

Literatur

- 130 Gheisari, Y. *et al.* Stem cell-conditioned medium does not protect against kidney failure. *Cell Biol Int* **35**, 209-213 (2011).
- 131 Lepperdinger, G., Brunauer, R., Jamnig, A., Laschober, G. & Kassem, M. Controversial issue: is it safe to employ mesenchymal stem cells in cell-based therapies? *Exp Gerontol* **43**, 1018-1023 (2008).
- 132 Bieback, K. *et al.* Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy* **14**, 570-583 (2012).
- 133 Zimmermann, J. A. & Knothe Tate, M. L. Structure-function relationships in the stem cell's mechanical world A: seeding protocols as a means to control shape and fate of live stem cells. *Mol Cell Biomech* **8**, 275-296 (2011).
- 134 Tolar, J. *et al.* Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **25**, 371-379 (2007).
- 135 Casiraghi, F., Remuzzi, G., Abbate, M. & Perico, N. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy and risk of malignancies. *Stem Cell Rev* **9**, 65-79 (2012).
- 136 Allers, C., Lasala, G. P. & Minguell, J. J. Presence of osteoclast precursor cells during ex vivo expansion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for autologous use in cell therapy. *Cytotherapy* (2013).
- 137 Kramann, R. *et al.* Uraemia disrupts the vascular niche in a 3D co-culture system of human mesenchymal stem cells and endothelial cells. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 2693-2702 (2012).
- 138 Kramann, R. *et al.* Osteogenesis of heterotopically transplanted mesenchymal stromal cells in rat models of chronic kidney disease. *J Bone Miner Res* (2013).
- 139 Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621 (1961).
- 140 Pelicci, P. G. Do tumor-suppressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence? *J Clin Invest* **113**, 4-7 (2004).
- 141 Mathon, N. F. & Lloyd, A. C. Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 203-213 (2001).
- 142 Stolzing, A. & Scutt, A. Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell* **5**, 213-224 (2006).
- 143 Kasper, G. *et al.* Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton. *Stem Cells* **27**, 1288-1297 (2009).
- 144 Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C. & Kassem, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* **33**, 919-926 (2003).
- 145 Wagner, W. *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* **3**, e2213 (2008).
- 146 Wagner, W., Ho, A. D. & Zenke, M. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part B Rev* **16**, 445-453 (2010).
- 147 Bellantuono, I., Aldahmash, A. & Kassem, M. Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochim Biophys Acta* **1792**, 364-370 (2009).
- 148 Schellenberg, A. *et al.* Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *Aging (Albany NY)* **3**, 873-888 (2011).
- 149 Schallmoser, K. *et al.* Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica* **95**, 867-874 (2010).
- 150 Wagner, W. *et al.* Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One* **4**, e5846 (2009).
- 151 Lo, L. J. *et al.* Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int* **76**, 893-899 (2009).
- 152 Golestaneh, L., Melamed, M. L. & Hostetter, T. H. Uremic memory: the role of acute kidney injury in long-term outcomes. *Kidney Int* **76**, 813-814 (2009).
- 153 van Roeyen, C. R., Ostendorf, T. & Floege, J. The platelet-derived growth factor system in renal disease: an emerging role of endogenous inhibitors. *Eur J Cell Biol* **91**, 542-551 (2011).
- 154 Caplan, A. I. & Correa, D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. *J Orthop Res* **29**, 1795-1803 (2011).
- 155 Tokunaga, A. *et al.* PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. *J Bone Miner Res* **23**, 1519-1528 (2008).
- 156 Olson, L. E. & Soriano, P. PDGFRbeta signaling regulates mural cell plasticity and inhibits fat development. *Dev Cell* **20**, 815-826 (2011).

Literatur

- 157 Ball, S. G., Shuttleworth, A. & Kielty, C. M. Inhibition of platelet-derived growth factor receptor signaling regulates Oct4 and Nanog expression, cell shape, and mesenchymal stem cell potency. *Stem Cells* **30**, 548-560 (2012).
- 158 Johnson, R. J. *et al.* The activated mesangial cell: a glomerular "myofibroblast"? *J Am Soc Nephrol* **2**, S190-197 (1992).
- 159 Durantou, F. *et al.* Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* **23**, 1258-1270 (2012).
- 160 Vanholder, R. *et al.* Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* **63**, 1934-1943 (2003).
- 161 Hörl, W. H. Urämie -was ist das? *NEPHRO-NEWS: Forum für Nephrologie und Hypertensiologie* **12**, 2-8 (2010).
- 162 Adamowicz, J., Kloskowski, T., Tworkiewicz, J., Pokrywczyńska, M. & Drewa, T. Urine is a highly cytotoxic agent: does it influence stem cell therapies in urology? *Transplant Proc* **44**, 1439-1441 (2012).
- 163 Wagner, W., Horn, P., Bork, S. & Ho, A. D. Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche. *Exp Gerontol* **43**, 974-980 (2008).
- 164 Liu, Y. L. *et al.* Immunosuppression effects of bone marrow mesenchymal stem cells on renal interstitial injury in rats with unilateral ureteral obstruction. *Cell Immunol* **276**, 144-152 (2012).
- 165 Gruber, H. E. *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells: serial passaging, doubling time and cell senescence. *Biotech Histochem* **87**, 303-311 (2012).
- 166 Wegmeyer, H. *et al.* Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin. *Stem Cells Dev* **22**, 2606-2618 (2013).
- 167 Roemeling-van Rhijn, M. *et al.* Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue are not affected by renal disease. *Kidney Int* **82**, 748-758 (2012).
- 168 *Safety and Efficacy of Mesenchymal Stem Cell in Patients With Chronic Renal Failure*, <<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01876017>>, aufgerufen am 3.11.2013.
- 169 Oliver, J. A., Maarouf, O., Cheema, F. H., Martens, T. P. & Al-Awqati, Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* **114**, 795-804 (2004).
- 170 Park, H. C. *et al.* Renal capsule as a stem cell niche. *Am J Physiol Renal Physiol* **298**, F1254-1262 (2010).
- 171 Rosivall, L. & Peti-Peterdi, J. Heterogeneity of the afferent arteriole--correlations between morphology and function. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 2703-2707 (2006).
- 172 Sequeira Lopez, M. L., Pentz, E. S., Nomasa, T., Smithies, O. & Gomez, R. A. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell* **6**, 719-728 (2004).
- 173 Brunskill, E. W. *et al.* Genes that confer the identity of the renin cell. *J Am Soc Nephrol* **22**, 2213-2225 (2011).
- 174 Hugo, C., Shankland, S. J., Bowen-Pope, D. F., Couser, W. G. & Johnson, R. J. Extraglomerular origin of the mesangial cell after injury. A new role of the juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest* **100**, 786-794 (1997).
- 175 Daniel, C. *et al.* Transgelin is a marker of repopulating mesangial cells after injury and promotes their proliferation and migration. *Lab Invest* **92**, 812-826 (2012).

8. Anhang

Zusätzliche Tabellen

Tabelle Z1 (zu Abschnitt 4.1.3):

Fibroseexperiment: Parameter zum Zeitpunkt der Tötung

| Woche 22 (Tötungszeitpunkt) | gesunde gleichaltrige Ratten (n = 5) | 5/6 Nx, MSC- Injektionen (n = 10) | 5/6 Nx, Medium- Injektionen (n = 9) | <i>student's t-test</i> p-Wert |
|--|---|--|--|-----------------------------------|
| Gewicht [g] | 385 ± 48 | 317 ± 22 | 320 ± 24 | 0,789 |
| Proteinurie [mg/24Std] | 6 ± 2 | 76 ± 48 | 105 ± 91 | 0,378 |
| S-Harnstoff [mmol/L] | 6 ± 1 | 11 ± 2 | 12 ± 1 | 0,268 |
| S-Vitamin D3 [pmol/L] | 223 ± 132 | 139 ± 64 | 166 ± 95 | 0,571 |
| S-Kreatinin [µmol/L] | 32 ± 12 | 62 ± 11 | 60 ± 6 | 0,715 |
| Kreatinin-Clearance [L/24Std] | 3,42 ± 1,27 | 1,52 ± 0,30 | 1,48 ± 0,29 | 0,781 |
| Systol. Blutdruck [mmHg] | 123 | 145 ± 17 | 151 ± 11 | 0,389 |
| α-SMA [%] (Immunhistologie, kortikale Fläche) | | 0,64 ± 0,15 | 0,67 ± 0,18 | 0,679 |
| Kollagen I [%] (Immunhistologie, kortikale Fläche) | | 3,30 ± 2,74 | 3,62 ± 1,65 | 0,763 |
| Kollagen IV [%] (Immunhistologie, glomeruläre Fläche) | | 15,61 ± 4,78 | 19,50 ± 13,61 | 0,407 |
| Lösliches Kollagen (Sircol) [µg/mg Nierenkortex] | | 23,31 ± 4,88 | 24,55 ± 3,35 | 0,531 |

Tabelle Z2 (zu Abschnitt 4.2.2):

Verwendete alte und urämische MSC-Spender.

| Modell, Zeitpunkt | Gruppe | Körpergewicht [g] | S-Harnstoff [mmol/L] | Kreatinin- Clearance [L/24h] | Proteinurie [mg/24h] |
|----------------------|-----------|----------------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDmod-RK | 295 | 19,5 | 0,9 | 292 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDmod-RK | 324 | 11,1 | 1,7 | 64 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDmod-RK | 296 | 16,2 | 1,4 | 131 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDmod-RK | 296 | 19,5 | 0,6 | 145 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDmod-RK | 295 | 11,8 | 1,6 | 69 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDmod-RK | 280 | 19 | 1,0 | 275 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDmod-RK | 300 | 16,5 | 1,3 | 164 |
| 5/6 Nx, Wo 18 | CKDmod-RK | 290 | 10,7 | 1,7 | 103 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDmod-RK | 322 | 11,9 | 1,4 | 57 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDmod-RK | 303 | 13,3 | 1,2 | 306 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDmod-RK | 344 | 11,2 | 2,2 | 25 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDmod-RK | 292 | 12,6 | 1,4 | 87 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDmod-RK | 309 | 12,6 | 1,4 | 67 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDmod-RK | 364 | 10,2 | 1,4 | 55 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDmod-RK | 336 | 13,9 | 1,4 | 116 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDmod-RK | 292 | 11 | 1,5 | 198 |
| 5/6 Nx, Wo 24 | CKDmod-RK | 338 | 16,3 | 2,0 | 11,2 |
| 5/6 Nx, Wo 24 | CKDmod-RK | 356 | 13,8 | 2,0 | 80,8 |
| 5/6 Nx, Wo 24 | CKDmod-RK | 293 | 15,2 | 1,8 | 76 |

Anhang

| Modell, Zeitpunkt | Gruppe | Körpergewicht [g] | S-Harnstoff [mmol/L] | Kreatinin- Clearance [L/24h] | Proteinurie [mg/24h] |
|----------------------|-----------------|----------------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| 5/6 Nx, Wo 24 | CKDmod-RK | 323 | 13,8 | 2,0 | 81,1 |
| 5/6 Nx, Wo 30 | CKDmod-RK | 315 | 18,1 | 1,1 | 238,9 |
| 5/6 Nx, Wo 33 | CKDmod-RK | 345 | 18 | 1,2 | 348 |
| 5/6 Nx, Wo 44 | CKDmod-RK | 355 | 12,5 | 1,3 | 174,9 |
| 5/6 Nx, Wo 44 | CKDmod-RK | 376 | 9,4 | 2,2 | 27 |
| 5/6 Nx, Wo 44 | CKDmod-RK | 371 | 10,5 | 1,9 | 231,9 |
| 5/6 Nx, Wo 10 | CKDsev-RK | 251 | 31,9 | 0,4 | 267 |
| 5/6 Nx, Wo 10 | CKDsev-RK | 272 | 31,2 | 0,6 | 261 |
| 5/6 Nx, Wo 10 | CKDsev-RK | 236 | 37,5 | 0,7 | 206 |
| 5/6 Nx, Wo 14 | CKDsev-RK | 274 | 40,7 | 0,3 | 394 |
| 5/6 Nx, Wo 14 | CKDsev-RK | 304 | 29,2 | 0,5 | 277 |
| 5/6 Nx, Wo 14 | CKDsev-RK | 272 | 38,4 | 0,3 | 286 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDsev-RK | 290 | 30,1 | 0,9 | 380 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDsev-RK | 279 | 20,3 | 0,6 | 300 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDsev-RK | 305 | 21 | 0,9 | 320 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDsev-RK | 296 | 20,1 | 0,9 | 325 |
| 5/6 Nx, Wo 15 | CKDsev-RK | 258 | 42,2 | < 0,25 | > 340 |
| 5/6 Nx, Wo 18 | CKDsev-RK | 257 | 24,1 | 0,5 | 364 |
| 5/6 Nx, Wo 18 | CKDsev-RK | 228 | 50,7 | 0,1 | 342 |
| 5/6 Nx, Wo 18 | CKDsev-RK | 241 | 43,8 | 0,2 | 500 |
| 5/6 Nx, Wo 22 | CKDsev-RK | 288 | 41,3 | 0,28 | 395 |
| 5/6 Nx, Wo 26 | CKDsev-RK | 235 | 122,1 | 0,1 | 335 |
| 5/6 Nx, Wo 27 | CKDsev-RK | 301 | 39,1 | 0,2 | 495 |
| 5/6 Nx, Wo 29 | CKDsev-RK | 281 | 50,9 | 0,2 | 468 |
| 5/6 Nx, Wo 30 | CKDsev-RK | 320 | 43,4 | 1,9 | 147 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 171 | 19,8 | 0,94 | 3,14 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 182 | 16,7 | 0,87 | 3,51 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 143 | 34,7 | 0,31 | 5,13 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 166 | 34,8 | 0,35 | 8,82 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 133 | 38,9 | 0,15 | 3,90 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 149 | 51,2 | 0,12 | 11,48 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 144 | 42,2 | 0,15 | 10,92 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 139 | 41,5 | 0,20 | 15,30 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 181 | 31,4 | 0,282 | 13,827 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 193 | 42,6 | 0,209 | 12,062 |
| Adenin, Wo 4 | CKDsev-AD | 174 | 33,6 | 0,296 | 11,923 |
| älter als Wo 40 | Alterskontrolle | | | | |
| älter als Wo 40 | Alterskontrolle | 348 | 7,60 | 1,6 | 8,9 |
| älter als Wo 40 | Alterskontrolle | 421 | 6 | 3,5 | 5,3 |
| älter als Wo 40 | Alterskontrolle | 365 | 5,6 | 3,9 | 5,9 |
| älter als Wo 40 | Alterskontrolle | 374 | 6 | 3,2 | 4,3 |

Tabelle Z3 (zu Abschnitt 4.3.4):**Statistik zu spontaner osteogener MSC Differenzierung.**

- **Cbfa1** (ANOVA: $p = 0,011$), LSD posthoc mit Signifikanzniveau 0,05

| | Gesund | Alterskontrolle | CKDmod-RK | CKDsev-RK | CKDsev-AD |
|-----------------|--------|-----------------|--------------|--------------|--------------|
| Gesund | x | 0,613 | 0,046 | 0,015 | 0,392 |
| Alterskontrolle | | x | 0,125 | 0,044 | 0,179 |
| CKDmod-RK | | | x | 0,551 | 0,007 |
| CKDsev-RK | | | | x | 0,002 |
| CKDsev-AD | | | | | x |

- **Osteopontin** (ANOVA: $p = 0,246$), keine Vergleichsanalyse zwischen den Gruppen

- **Osteocalcin** (ANOVA: $p = 0,006$), LSD posthoc mit Signifikanzniveau 0,05

| | Gesund | Alterskontrolle | CKDmod-RK | CKDsev-RK | CKDsev-AD |
|-----------------|--------|-----------------|--------------|-----------|--------------|
| Gesund | x | 0,953 | 0,002 | 0,137 | 0,769 |
| Alterskontrolle | | x | 0,003 | 0,152 | 0,724 |
| CKDmod-RK | | | x | 0,105 | 0,001 |
| CKDsev-RK | | | | x | 0,081 |
| CKDsev-AD | | | | | x |

Tabelle Z4 (zu Abschnitt 4.3.5):**Komplette Auswertung der Zytokin-Arrays.**

Zahlen repräsentieren normierte relative Expression (= positive Fläche und Intensität in Pixeln)

| | | Gesund (n = 5) | CKDmod-RK (n = 8) | CKDsev-RK (n = 4) | CKDsev-AD (n = 7) | hPLAP (n = 4) |
|--------|--------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| A1,2 | Positiv | 103 ± 6 | 100 ± 2 | 101 ± 0 | 100 ± 8 | 102 ± 2 |
| A3,4 | CINC-1 | 124 ± 50 | 108 ± 24 | 77 ± 40 | 111 ± 45 | 123 ± 36 |
| A5,6 | CINC-2α/β | 106 ± 78 | 89 ± 42 | 46 ± 67 | 11 ± 28 | 81 ± 56 |
| A7,8 | CINC-3 | 66 ± 81 | 26 ± 23 | -2 ± 21 | -3 ± 2 | 5 ± 10 |
| A9,10 | CNTF | -5 ± 17 | 0 ± 3 | -10 ± 16 | -4 ± 2 | -1 ± 5 |
| A11,12 | Fractalkine | 12 ± 33 | 21 ± 25 | 12 ± 52 | -2 ± 3 | 4 ± 8 |
| A13,14 | GM-CSF | -3 ± 16 | 0 ± 3 | -8 ± 19 | -1 ± 2 | 0 ± 5 |
| A15,16 | sICAM-1 | 36 ± 25 | 33 ± 14 | 33 ± 45 | 12 ± 9 | 15 ± 17 |
| A17,18 | IFN-γ | -6 ± 16 | 0 ± 3 | -6 ± 16 | 0 ± 1 | -2 ± 7 |
| A19,20 | positiv | 109 ± 20 | 100 ± 5 | 100 ± 1 | 111 ± 12 | 99 ± 2 |
| B3,4 | IL-1α | 0 ± 15 | 5 ± 3 | 1 ± 5 | -1 ± 1 | 5 ± 7 |
| B5,6 | IL-1β | 3 ± 14 | 7 ± 5 | -4 ± 18 | -4 ± 1 | 2 ± 8 |
| B7,8 | IL-1-ra | 32 ± 34 | 27 ± 23 | 27 ± 44 | -3 ± 1 | 7 ± 11 |
| B9,10 | IL-2 | 5 ± 9 | 7 ± 5 | -2 ± 20 | -3 ± 2 | 6 ± 7 |
| B11,12 | IL-3 | -4 ± 17 | 1 ± 4 | -9 ± 16 | -2 ± 2 | 0 ± 7 |
| B13,14 | IL-4 | -3 ± 16 | 1 ± 3 | -8 ± 15 | -1 ± 2 | 0 ± 6 |
| B15,16 | IL-6 | 47 ± 43 | 25 ± 26 | 23 ± 44 | 1 ± 2 | 18 ± 27 |
| B17,18 | IL-10 | -1 ± 14 | 3 ± 4 | -8 ± 18 | 1 ± 2 | 0 ± 8 |
| C3,4 | IL-13 | -6 ± 17 | 3 ± 4 | -8 ± 18 | -3 ± 1 | 0 ± 6 |
| C5,6 | IL-17 | -5 ± 16 | 2 ± 3 | -8 ± 15 | -4 ± 1 | 0 ± 6 |
| C7,8 | CXCL10 | 17 ± 12 | 16 ± 10 | 28 ± 41 | 1 ± 2 | 11 ± 11 |
| C9,10 | LIX | 120 ± 99 | 97 ± 47 | 55 ± 62 | 38 ± 48 | 106 ± 73 |
| C11,12 | L-Selectin | 7 ± 13 | 7 ± 4 | -4 ± 19 | 0 ± 3 | 8 ± 8 |
| C13,14 | CXCL9 | -2 ± 15 | 1 ± 4 | -11 ± 16 | -2 ± 2 | 1 ± 7 |
| C15,16 | MIP-1α | 77 ± 58 | 44 ± 38 | -9 ± 18 | 24 ± 28 | 40 ± 7 |
| C17,18 | MIP-3α | 104 ± 75 | 93 ± 31 | 49 ± 58 | 85 ± 44 | 90 ± 49 |
| D1,2 | positiv | 88 ± 26 | 100 ± 3 | 99 ± 1 | 89 ± 17 | 99 ± 4 |
| D3,4 | RANTES | 31 ± 25 | 54 ± 57 | 15 ± 37 | 0 ± 4 | 15 ± 22 |
| D5,6 | CXCL7 | 17 ± 21 | 14 ± 12 | 5 ± 20 | -3 ± 1 | 3 ± 7 |

Anhang

| | | Gesund (n = 5) | CKDmod-RK (n = 8) | CKDsev-RK (n = 4) | CKDsev-AD (n = 7) | hPLAP (n = 4) |
|--------|----------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------|
| D7,8 | TIMP-1 | 150 ± 87 | 116 ± 36 | 103 ± 2 | 137 ± 43 | 135 ± 52 |
| D9,10 | TNF-α | 14 ± 10 | 10 ± 5 | 8 ± 20 | -1 ± 3 | 10 ± 12 |
| D11,12 | VEGF | 150 ± 90 | 113 ± 36 | 88 ± 26 | 101 ± 45 | 132 ± 57 |
| D19,20 | negativ | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |

Tabelle Z5 (zu Abschnitt 4.4.2):

**Akute anti-Thy1.1-Nephritis Tag 4 mit Medium- oder MSC-Behandlung der linken Nieren.
Gelistet sind Mittelwerte ± Standardabweichung.**

| | Medium (n = 10) | Gesund (n = 7) | Transgen (n = 8) | CKDmod-RK (n = 6) |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| Gewicht [g] | 174 ± 28 | 162 ± 15 | 206 ± 8 # | 175 ± 13 |
| S-Harnstoff [mmol/L] | 7.5 ± 1.7 | 8.1 ± 1.5 | 7 ± 0.7 | 8.8 ± 1.9 |
| S-Kreatinin [μmol/L] | 52.2 ± 4.4 | 50 ± 6.6 | 51.1 ± 5.4 | 59.3 ± 8.9 * |
| Mesangiolyse | | | | |
| links | 110 ± 24 | 81 ± 32 | 75 ± 24 | 82 ± 18 |
| rechts | 100 ± 21 | 100 ± 32 | 100 ± 4 | 100 ± 19 |
| Mitosen | | | | |
| links | 86 ± 24 | 268 ± 57 | 219 ± 74 | 106 ± 39 |
| rechts | 100 ± 38 | 100 ± 38 | 100 ± 24 | 100 ± 40 |
| ED-1 Zellen | | | | |
| links | 89 ± 30 | 126 ± 29 | 106 ± 14 | 106 ± 16 |
| rechts | 100 ± 20 | 100 ± 14 | 100 ± 15 | 100 ± 30 |
| α-SMA | | | | |
| links | 109 ± 82 | 121 ± 60 | 103 ± 18 | 113 ± 32 |
| rechts | 100 ± 84 | 100 ± 42 | 100 ± 11 | 100 ± 37 |
| Kollagen I | | | | |
| links | 94 ± 26 | 92 ± 22 | 127 ± 28 | 83 ± 25 |
| rechts | 100 ± 24 | 100 ± 16 | 100 ± 23 | 100 ± 19 |

Tabelle Z6 (zu Abschnitt 4.4.2):

Statistik zur histologischen Auswertung der anti-Thy1.1-Nephritis an Tag 4.

Vergleich von linken behandelten vs. rechten unbehandelten Nieren. Angegeben sind p-Werte von gepaarten t-Tests.

| | Medium (n = 10) | Gesund (n = 7) | Transgen (n = 8) | CKDmod-RK (n = 6) |
|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------|----------------------|
| Mesangiolyse | 0,312 | 0,277 | 0,022 | 0,089 |
| Mitosen | 0,341 | 0,0002 | 0,002 | 0,757 |
| ED-1 Zellen | 0,278 | 0,018 | 0,346 | 0,716 |
| α-SMA | 0,636 | 0,346 | 0,640 | 0,625 |
| Kollagen I | 0,496 | 0,329 | 0,098 | 0,033 |

Tabelle Z7 (zu Abschnitt 4.4.2):

Akute anti-Thy1.1-Nephritis an Tag 6 mit Medium- oder MSC-Behandlung der linken Nieren.
Gelistet sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen.

| | Medium (n = 9) | Gesund (n = 7) | Transgen (n = 7) | CKDmod-RK (n = 6) | CKDsev-AD (n = 8) |
|--|-------------------|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Gewicht [g] | 199 \pm 5 | 159 \pm 17 | 205 \pm 5 | 202 \pm 6 | 195 \pm 7 |
| Systol. Blutdruck [mmHg] | 128 \pm 9 | 128 \pm 15 | 127 \pm 21 | 130 \pm 22 | 137 \pm 10 |
| S-Harnstoff [mmol/L] | 6.0 \pm 1.0 | 13.5 \pm 5.7 * | 11.0 \pm 0.9 * | 7.9 \pm 1.0 * | 8.9 \pm 1.5 * |
| S-Kreatinin [μmol/L] | 39.9 \pm 5.9 | 43.7 \pm 5.2 | 43.6 \pm 3.7 | 41.3 \pm 4.7 | 47 \pm 4.9 * |
| Proteinurie [mg/24Std] | 40 \pm 25 | 24 \pm 26 | 9 \pm 6 * | 34 \pm 16 | 52 \pm 21 |
| Urin Albumin [mg/dL] | 21 \pm 13 | 22 \pm 11 | 9 \pm 6 | 42 \pm 24 | 29 \pm 13 |
| Mesangiolyse | | | | | |
| links | 109 \pm 25 | 74 \pm 24 | 49 \pm 21 | 98 \pm 21 | 103 \pm 25 |
| rechts | 100 \pm 16 | 100 \pm 20 | 100 \pm 13 | 100 \pm 25 | 100 \pm 18 |
| Mitosen | | | | | |
| links | 129 \pm 56 | 66 \pm 32 | 95 \pm 22 | 115 \pm 27 | 89 \pm 36 |
| rechts | 100 \pm 51 | 100 \pm 27 | 100 \pm 39 | 100 \pm 32 | 100 \pm 48 |
| ED-1 Zellen | | | | | |
| links | 98 \pm 21 | 101 \pm 33 | 92 \pm 35 | 103 \pm 18 | 93 \pm 22 |
| rechts | 100 \pm 33 | 100 \pm 34 | 100 \pm 27 | 100 \pm 33 | 100 \pm 27 |
| α-SMA | | | | | |
| links | 117 \pm 36 | 82 \pm 23 | 101 \pm 23 | 99 \pm 39 | 87 \pm 19 |
| rechts | 100 \pm 29 | 100 \pm 20 | 100 \pm 25 | 100 \pm 33 | 100 \pm 12 |
| Kollagen I | | | | | |
| links | 89 \pm 15 | 94 \pm 19 | 89 \pm 18 | 82 \pm 19 | 89 \pm 32 |
| rechts | 100 \pm 15 | 100 \pm 30 | 100 \pm 12 | 100 \pm 10 | 100 \pm 44 |

Tabelle Z8 (zu Abschnitt 4.4.2):

Statistik zur histologischen Auswertung der anti-Thy1.1-Nephritis an Tag 6.

Vergleich von linken behandelten vs. rechten unbehandelten Nieren. Angegeben sind p-Werte von gepaarten t-Tests.

| | DMEM | Gesunde MSC | hPLAP MSC | CKDmod-RK MSC | CKDsev-AD MSC |
|--------------------------------|--------------|----------------|---------------|------------------|------------------|
| Mesangiolyse | 0,432 | 0,023 | 0,0002 | 0,906 | 0,711 |
| Mitosen | 0,167 | 0,076 | 0,760 | 0,100 | 0,478 |
| ED-1 Zellen | 0,884 | 0,914 | 0,461 | 0,861 | 0,184 |
| α-SMA | 0,201 | 0,230 | 0,960 | 0,936 | 0,080 |
| Kollagen I | 0,014 | 0,479 | 0,180 | 0,075 | 0,247 |

Tabelle Z9 (zu Abschnitt 4.4.3):

Akute anti-Thy1.1-Nephritis in hPLAP-transgenen Ratten an Tag 6.

| Tag 6 | wildtyp (n = 5) | hPLAP-transgen (n = 4) | <i>student's t-test</i> p-Wert |
|--|--------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Gewicht [g] | 230 \pm 6 | 228 \pm 10 | 0,710 |
| Proteinurie [mg/24Std] | 132 \pm 25 | 173 \pm 23 | 0,041 |
| S-Harnstoff [mmol/L] | 13 \pm 3 | 12 \pm 0 | 0,327 |
| S-Kreatinin [μmol/L] | 38 \pm 5 | 36 \pm 3 | 0,407 |
| Kreatinin-Clearance [L/24Std] | 1,79 \pm 0,28 | 2,06 \pm 0,57 | 0,376 |
| Mesangiolyse-Score (PAS) | 1,12 \pm 0,19 | 1,11 \pm 0,11 | 0,961 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| °C | Grad Celsius |
| 1,25D | 1,25-dihydroxy Vitamin D ₃ |
| 5/6 Nx | 5/6 Nephrektomie |
| α-SMA | <i>α-smooth muscle actin</i> |
| A. dest. | destilliertes Wasser |
| A. inject. | Injektionswasser |
| ABC | Avidin/Biotin-Komplex von engl. <i>avidin-biotin complex</i> |
| AKI | akute Niereninsuffizienz von engl. <i>acute kidney injury</i> |
| AMP | Adenosinmonophosphat |
| BCA | Bicinchoninsäure Assay von engl. <i>bicinchoninic acid assay</i> |
| BCIP | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat |
| BGLAP | <i>bone γ-carboxylglutamic acid-containing protein</i> |
| BMP | <i>bone morphogenetic protein</i> |
| BSA | Rinderserumalbumin von engl. <i>bovine serum albumine</i> |
| Bzw. | beziehungsweise |
| Ca ²⁺ | Kalziumion |
| Cbfa1 | <i>core-binding factor subunit α1</i> |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | komplementäre DNA von engl. <i>complementary DNA</i> |
| CINC | <i>cytokine induced neutrophil chemoattractant</i> |
| CKD | chronische Niereninsuffizienz von engl. <i>chronic kidney disease</i> |
| CKDmod | beginnende Niereninsuffizienz engl. <i>moderate chronic kidney disease</i> |
| CKDsev | schwere Niereninsuffizienz engl. <i>severe chronic kidney disease</i> |
| cm | Zentimeter |
| CNTF | <i>ciliary neurotrophic factor</i> |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| Ct | <i>cycle threshold</i> |
| Cu ²⁺ | Kupferion |
| CXCL | C-X-C Motiv Ligand |
| CXCR | C-X-C Motiv Rezeptor |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-Phenylindol |
| d.h. | das heißt |
| DMEM | <i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i> |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure von engl. <i>desoxyribonuclein acid</i> |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamin-Tetraessigsäure |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |

Anhang

| | |
|-------------------------------|---|
| EGTA | Ethylenglycol-bis(Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure |
| ELISA | <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| EPC | Endotheliale Progenitorzelle von engl. <i>endothelial progenitor cell</i> |
| F344 | Fisher 344 (Rattenstamm) |
| Fe ²⁺ | Eisenion |
| FGF | <i>fibroblast growth factor</i> |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| FRET | Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer |
| g | Gramm |
| GAPDH | Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase |
| GFR | glomeruläre Filtrationsrate |
| ggf. | gegebenenfalls |
| GM-CSF | <i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> |
| GV-SOLAS | Gesellschaft für Versuchstierkunde / Society of Laboratory Animals |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HA | Hyaluronsäure, engl. <i>hyaluronic acid</i> |
| HCL | Salzsäure |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (Puffer) |
| HGF | <i>hepatocyte growth factor</i> |
| HLA-DR | Humanes Leukozyten Antigen, Typ DR (Klasse II) |
| hPLAP | humane plazentare alkalische Phosphatase |
| HSC | hämatopoetische Stammzelle von engl. <i>hematopoietic stem cell</i> |
| i.a. | intraarteriell |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| IFN-γ | Interferon-γ |
| IgA | Immunglobulin A |
| IGF | <i>insulin-like growth factor</i> |
| iNOS | <i>inducible nitric oxide synthase isoform</i> |
| ISCT | <i>International Society for Cellular Therapy</i> |
| IL | Interleukin |
| kDa | Kilodalton |
| kg | Kilogramm |
| KG | Körpergewicht |
| LANUV NRW | Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen |
| LIX | <i>lipopolysaccharide induced CXC chemokine</i> |
| Mg | Milligramm |
| Mg ²⁺ | Magnesiumion |
| MgCl ₂ | Magnesiumchlorid |

Anhang

| | |
|------------------|--|
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex von engl. <i>Major histocompatibility complex</i> |
| MIG | <i>monokine induced by γ-Interferon</i> |
| Min | Minute |
| Mio | Million |
| MIP | <i>macrophage inflammatory protein</i> |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| mRNA | Boten-RNA von engl. <i>messenger-RNA</i> |
| MSC | Mesenchymale Stammzelle von engl. <i>mesenchymal stem cell</i> |
| M-MLV RT | <i>Moloney murine leukemia virus reverse</i> Transkriptase |
| n.s. | nicht signifikant |
| NaCl | Natriumchlorid |
| nM | nanomolar |
| nm | Nanometer |
| NRK | <i>normal rat kidney</i> (Zelllinie) |
| O ₂ | Sauerstoffmolekül |
| o.g. | oben genannt |
| OP | Operation |
| PAS | Perjodsäure-Schiff von engl. <i>periodic acid-Schiff</i> |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung von engl. <i>phosphate-buffered saline</i> |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion von engl. <i>polymerase chain reaction</i> |
| PDGF | <i>platelet derived growth factor</i> |
| PDGFR | <i>platelet derived growth factor receptor</i> |
| PPAR γ | <i>peroxisome proliferation activated receptor γ</i> |
| PTH | Parathormon |
| RANTES | <i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i> |
| RFU | <i>relative fluorescence unit</i> |
| RK | restliche Nierenmasse von engl. <i>remnant kidney</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure von engl. <i>ribonuclein acid</i> |
| RPM | Umdrehungen pro Minute von engl. <i>rotations per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RT-qPCR | <i>reverse transcriptase quantitative polymerase chain reaction</i> |
| Runx2 | <i>Runt-related transcription factor 2</i> |
| s.c. | subkutan von engl. <i>subcutaneous</i> |
| s.o. | siehe oben |
| SA- β -Gal | Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase |
| SDF-1 | <i>stromal cell-derived factor 1</i> |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| SDS-PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Natriumlaurylsulfatgel |
| sICAM-1 | <i>soluble intercellular adhesion molecule-1</i> |

Anhang

| | |
|--------------|--|
| Std | Stunde |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TIMP-1 | <i>tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> |
| TNF α | Tumor necrosis factor alpha |
| TNS | Trypsin-neutralisierende Lösung von engl. <i>trypsin neutralizing solution</i> |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propanediol |
| TRITC | Tetramethylrhodamine-5-(6)-Isothiocyanat |
| TTBS | Tris-gepufferte Salzlösung |
| UUO | unilaterale Ureterobstruktion |
| V | Volt |
| VCAM-1 | <i>vascular cell adhesion molecule 1</i> |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VLA-4 | Integrin $\alpha 4\beta 1$, auch engl. <i>very late antigen-4</i> |
| W8-B2/MSCA-1 | <i>mesenchymal stromal cell antigen-1</i> |
| x-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-Galactopyranosid |
| z.B. | zum Beispiel |

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

- Abbildung 1.1** **Histologische Veränderungen in fibrotischen Nieren.**
- Abbildung 1.2.1** **Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark.**
- Abbildung 1.3** **Mögliche Effekte nach MSC-Applikation bei akuter Nierenschädigung.**

Methoden

- Abbildung 3.2.1** **Nieren 5/6 nephrektomierter Fischer 344 Ratten ca. 20 Wochen post-OP.**
- Abbildung 3.2.3** **Verlauf der anti-Thy1.1-Nephritis als Tiermodell der humanen IgA Nephritis.**
- Abbildung 3.3.5** **Beispiel für einen Zytokin-Array mit konditioniertem Medium gesunder MSC**
- Abbildung 3.5.1.1** **Angewendeter Mesangiolyse Score.**
- Abbildung 3.5.2.2** **PKH26-gelabelte MSC vor und 48 Std nach Injektion.**

Ergebnisse

- Abbildung 4.1** **Versuchsübersicht zu wiederholter intravenöser MSC-Applikation in 5/6 nephrektomierten Ratten.**
- Abbildung 4.1.1.1** **Primäre MSC-Kulturen in Passagen 0 bis 2.**
- Abbildung 4.1.1.2** **Antigenprofil primärer MSC-Kulturen.**
- Abbildung 4.1.1.3** **Induzierte Differenzierung von primären MSC-Kulturen.**
- Abbildung 4.1.2.1** **Verläufe von Proteinurie und S-Kreatinin in 5/6 nephrektomierten Ratten mit MSC- oder Medium-Behandlung.**
- Abbildung 4.1.2.2** **Rekultivierte MSC nach Präparation für i.v. Injektion in 5/6-nephrektomierten Ratten.**
- Abbildung 4.1.3.1** **Körpergewicht, Blutdruck und funktionelle Nierenparameter der 5/6 nephrektomierten Ratten nach 11 Behandlungen mit MSC oder Kontrollmedium.**
- Abbildung 4.1.3.2** **Immunhistochemische Auswertungen der 5/6 nephrektomierten Ratten nach 11 Behandlungen mit MSC oder Kontrollmedium.**
- Abbildung 4.1.3.3** **Quantifizierung des Kollagens in 5/6 nephrektomierten Ratten nach 11 Behandlungen mit MSC oder Kontrollmedium.**
- Abbildung 4.2.1** **Nierenfunktion und Nierenhistologie von Ratten mit Adenin-induzierter Nephropathie.**
- Abbildung 4.2.2** **Klassifizierung der MSC-Spender anhand ihrer Nierenfunktion.**

- Abbildung 4.3.1.1 CD-Antigen-Expression gesunder und urämischer MSC.
- Abbildung 4.3.1.2 Aktin-Zytoskelett und Zellmorphologie gesunder und urämischer MSC.
- Abbildung 4.3.2 Verdopplung der Zellpopulation bei gesunden und urämischen MSC.
- Abbildung 4.3.3.1 Quantifizierung von Seneszenz-assoziiertes- β -Galaktosidase in gesunden und urämischen MSC.
- Abbildung 4.3.3.2 Aktivität der Seneszenz-assoziiertes- β -Galaktosidase in gesunden und urämischen MSC.
- Abbildung 4.3.4.1 Spontane und induzierte adipogene Differenzierung in gesunden und urämischen MSC.
- Abbildung 4.3.4.2 mRNA Expression verschiedener Adipogenese-Marker bei spontaner Differenzierung von gesunden und urämischen MSC.
- Abbildung 4.3.5.1 TGF- β Sekretion gesunder und urämischer MSC.
- Abbildung 4.3.5.2 mRNA Expression von PDGF-Liganden und -Rezeptoren in gesunden und urämischen MSC.
- Abbildung 4.3.5.3 Stimulation von Fibroblasten durch konditioniertes Medium gesunder und urämischer MSC.
- Abbildung 4.3.6 Charakterisierung hPLAP transgener MSC *in vitro*.
- Abbildung 4.4 Versuchsdesign zur Testung des therapeutischen Effektes urämischer MSC in der anti-Thy1.1-Nephritis.
- Abbildung 4.4.1.1 Tracking i.a. injizierter hPLAP-transgener MSC in anti-Thy1.1-Nieren.
- Abbildung 4.4.1.2 Quantifizierung der PKH-Fluoreszenz in MSC-behandelten Nieren.
- Abbildung 4.4.2.1 Glomeruläre Proliferation, Mesangiolyse und Infiltration Tag 4 der anti-Thy1.1-Nephritis (2 Tage nach MSC Therapie)
- Abbildung 4.4.2.2 Glomeruläre Akkumulation von α -SMA und Kollagen I an Tag 4 der anti-Thy1.1-Nephritis (2 Tage nach MSC Therapie)
- Abbildung 4.4.2.3 Glomeruläre Proliferation, Mesangiolyse, Infiltration und Akkumulation von α -SMA und Kollagen I an Tag 6 der anti-Thy1.1-Nephritis (4 Tage nach MSC Therapie).
- Abbildung 4.4.3 Anti-Thy1.1-Nephritis in hPLAP-transgenen Ratten.
- Abbildung 4.5.1 Identifikation eines potentiellen periglomerulären Progenitorzell-Population.
- Abbildung 4.5.2.1 Quantifizierung der CD24-positiven Glomeruli in Ratten mit CKD.
- Abbildung 4.5.2.2 Korrelation von S-Harnstoff und S-Kreatinin mit der periglomerulären Expression von CD24.

Tabellenverzeichnis

Methoden

| | |
|-------------------------------|--|
| <u>Tabelle 3.1.5.5</u> | <u>Verwendete Antikörper gegen CD-Antigene für Immunzytochemie an MSC</u> |
| <u>Tabelle 3.5.1.2</u> | <u>Verwendete Antikörper für immunhistochemische Analysen</u> |

Ergebnisse

| | |
|-------------------------------|---|
| <u>Tabelle 4.1.2</u> | <u>Körpergewicht und Nierenfunktion der Ratten mit 5/6 Nephrektomie unmittelbar vor Startpunkt der Stammzell-Therapie.</u> |
| <u>Tabelle 4.3.4</u> | <u>Spontane osteogene Differenzierung gesunder und urämischer MSC.</u> |
| <u>Tabelle 4.3.5</u> | <u>Cytokin-Array von Zellkulturüberständen gesunder und urämischer MSC.</u> |
| <u>Tabelle 4.4.2.1</u> | <u>Nierenfunktion an Tag 4 der anti-Thy1.1-Nephritis (2 Tage nach MSC Therapie).</u> |
| <u>Tabelle 4.4.2.2</u> | <u>Nierenfunktion an Tag 6 der anti-Thy1.1-Nephritis (4 Tage nach MSC Therapie).</u> |

Anhang

| | |
|--------------------------|--|
| <u>Tabelle Z1</u> | <u>Experiment Fibrose 5 Parameter Killzeitpunkt.</u> |
| <u>Tabelle Z2</u> | <u>Verwendete alte und urämische MSC-Spender.</u> |
| <u>Tabelle Z3</u> | <u>Statistik zu spontaner osteogener MSC Differenzierung.</u> |
| <u>Tabelle Z4</u> | <u>Komplette Auswertung der Zytokin-Arrays.</u> |
| <u>Tabelle Z5</u> | <u>Akute anti-Thy1.1-Nephritis Tag 4 mit Medium- oder MSC-Behandlung der linken Nieren.</u> |
| <u>Tabelle Z6</u> | <u>Statistik zur Histologischen Auswertung der anti-Thy1.1-Nephritis Tag 4.</u> |
| <u>Tabelle Z7</u> | <u>Akute anti-Thy1.1-Nephritis Tag 6 mit Medium- oder MSC-Behandlung der linken Nieren.</u> |
| <u>Tabelle Z8</u> | <u>Statistik zur Histologischen Auswertung der anti-Thy1.1-Nephritis Tag 6.</u> |
| <u>Tabelle Z9</u> | <u>Akute anti-Thy1.1-Nephritis in hPLAP-transgenen Ratten Tag 6.</u> |

Danksagung

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

Als erstes bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau PD Dr. Uta Kunter dafür, dass sie mir die Chance gegeben hat, mit ihr an einem spannenden und aktuellen Thema Forschung betreiben zu dürfen. Ihre fachliche Kompetenz, ihre Hilfsbereitschaft, der Forscherdrang und die Förderung eigener Ideen ergaben eine hervorragende Betreuung, durch die ich in den vergangenen Jahren wirklich viel lernen konnte.

Herrn Prof. Dr. Martin Zenke
danke ich vielmals für sein Interesse und die engagierte Betreuung dieser Arbeit.

Ein enorm großes Dankeschön geht an alle Ehemaligen und das jetzige Teammitglied unserer MSC-Arbeitsgruppe. Ohne die großartige Unterstützung von Monika, Simon, Esther, Ania und Rafael wäre diese Arbeit vielleicht niemals fertig geworden.

Bedanken möchte ich mich auch bei Peter Boor für seine Ratschläge, die Beantwortung aller Emails und nicht zuletzt für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jürgen Flöge für die Möglichkeit meine Arbeit in seiner Klinik durchführen zu können sowie dem gesamten Laborteam der Med II für die großzügige Hilfsbereitschaft, hitzige Diskussionen und die Vermittlung eines breiten methodischen Wissensspektrums. Hier bedanke ich mich vor allem bei Claudia vR und Gerti, die mit Rat und Tat bei den molekularbiologischen Arbeiten zur Seite standen.

Während meiner Zeit als Doktorandin durfte ich ein angenehmes und freundschaftliches Arbeitsklima genießen. Ein herzliches Dankeschön geht insbesondere an Stephanie, Sonja, Ina, Nadine, Esther & Christina, mit denen ich nicht nur die Erinnerung an Abenteuer im Labor teile sondern mit denen ich auch spaßige Zeiten außerhalb der grünen Hölle erleben dürfte.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir den Mut und die Kraft geben, unbekannte Wege zu beschreiten. Vor allem meiner Schwester Kristina, da sie mich nicht vergessen lässt, dass es auch andere Sichtweisen und wichtige Dinge gibt.

Last but not least
gilt mein größter Dank meinen Eltern Ulrich & Martina,
die mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und in allen Lebenslagen für mich da sind.

Danke!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Barbara Mara Klinkhammer
Geburtsdatum: 01.05.1985
Geburtsort: Aachen

Schulbildung

08.1995 bis 06.2004 Städtisches Gymnasium Herzogenrath
mit Abschluss Abitur (Latinum eingeschlossen)

Hochschulstudium

10.2004 bis 11.2009 Studium der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
mit Abschluss Diplom (Note: sehr gut (1,1))
Schwerpunkte: Tierphysiologie, Zellbiologie, Immunologie,
Zoologie/Neurobiologie.
11.2008 bis 11.2009 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in der
Abteilung Systemische Biologie, Dortmund
Thema: „Apoptose in humanen Hepatozyten: Messungen mit FRET-
und akustischer Mikroskopie“

Promotionsstudium

seit 04.2013 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der AG „Nephropathologie“ (PD Dr.
med. Peter Boor) im Universitätsklinikum der RWTH Aachen im
„Institut für Pathologie“
seit 01.2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin / Biologische Doktorandin in der AG
„Mesenchymale Stammzellen“ (PD Dr. med. Uta Kunter) im
Universitätsklinikum der RWTH Aachen in der „Klinik für Nieren- und
Hochdruckkrankheiten, rheumatologische und immunologische
Erkrankungen“
Thema: „Zell-basierte Ansätze zur Therapie der renalen Fibrose“
innerhalb des SFB/TRR57 „Organ Fibrosis: From Mechanisms of
Injury to Modulation of Disease“

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)
Englisch (fließend in Wort und Schrift)
Spanisch (gute Kenntnisse (B1+))
Französisch (Grundkenntnisse)
Schwedisch (Grundkenntnisse)

Publikationen

Originalarbeiten:

- **Klinkhammer BM**, Kramann R, Mallau M, Makowska A, van Roeyen CR, Rong S, Buecher EB, Boor P, Kovacova K, Zok S, Denecke B, Stuetgen E, Otten S, Floege J, Kunter U, 2014, PLoS One. 9(3):e92115. „Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential”
- Gaisa NT, Reinartz A, Schneider U, Klaus C, Heidenreich A, Jakse G, Kaemmerer E, **Klinkhammer BM**, Knuechel R, Gassler N, 2013, Histol. Histopathol. 28(3):353-64. „Levels of acyl-coenzyme A synthetase 5 in urothelial cells and corresponding neoplasias reflect cellular differentiation”
- Kramann R, Kunter U, Brandenburg V, Leisten I, Ehling J, **Klinkhammer BM**, Bovi M, Knüchel R, Floege J, Schneider R, 2013, J Bone Miner Res., J Bone Miner Res. 2013 Dec;28(12):2523-34. „Osteogenesis of heterotopically transplanted mesenchymal stromal cells in rat models of chronic kidney disease”
- Nagayama Y, Braun GS, Jakobs CM, van Roeyen CR, **Klinkhammer BM**, Boor P, Villa L, Görtz D, Müller-Newen G, Ostendorf T, Floege J, Am J Physiol Renal Physiol. 2014 Aug 1;307(3):F346-55. „Gp130 dependent signalling in the podocyte”

Posterpräsentationen eingereichter Abstracts (nur Erstautorenschaften aufgeführt):

- Klinkhammer et al., „CKD reduziert die Funktionalität mesenchymaler Stammzellen (MSC) in Ratten.“ Kongress für Nephrologie 2011, 3. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, Deutschland (und Empfang eines Reisestipendiums der DGfN);
- Klinkhammer et al., „CKD impairs functionality of mesenchymal stem cells *in vitro* and *in vivo*.“ Kidney Week 2011: 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology, Philadelphia, PA;
- Klinkhammer et al., „CKD impairs functionality of mesenchymal stem cells *in vitro* and *in vivo*.“ 49th ERA-EDTA Congress, 2012, Paris, Frankreich

Erklärung

Erklärung

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel erstellt habe. Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Barbara Mara Klinkhammer