

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln  
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

# **Auswirkungen von Hypoxie und Restriktion der Aminosäurezufuhr auf ein Zellkulturmodell der akuten Nierenzellschädigung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Madlen Kaldirim  
aus Köln

promoviert am 22. Februar 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2023

Dekan:                   Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachter:        Universitätsprofessor Dr. med. R.-U. Müller  
2. Gutachter:        Privatdozent Dr. rer. nat. J. Zange

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Erstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. Michael Ignarski

Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller

Dr. Francesca Fabretti

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Besprechung und Anleitung durch Herrn Dr. Ignarski, Herrn Professor Dr. Müller und Frau Dr. Fabretti von mir selbst ausgeführt worden. Anleitung zur korrekten Durchführung habe ich von den medizinisch-technischen Assistenten Frau Martyna Brütting, Frau Serena Greco-Torres, sowie Frau Stefanie Keller erhalten.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse der LDH-Messungen wurden ohne meine Mitarbeit im Zentrallabor der Universitätsklinik gemessen. Sequenzierungen wurden durch das Institut CCG durchgeführt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 13.11.2022



Unterschrift:

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Menschen bedanken, durch die die Erarbeitung meiner Doktorarbeitshypothese möglich wurde und der Grundstein für meine Kenntnisse zur Laborarbeit und zur wissenschaftlichen Praxis gelegt wurde.

Ich bedanke mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Thomas Benzing und Herrn Prof. Dr. Bernhard Schermer für die Aufnahme in ihr Labor und dafür, mir die Möglichkeit gegeben zu haben, mein Projekt in ihrem Labor zu erarbeiten. Ihre Begeisterung und Faszination für neue Erkenntnisse waren für mich stets ein Antrieb es Ihnen gleich zu tun.

Ich bedanke mich im Besonderen bei meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Roman-Ulrich Müller, dass er mich in seine Projekte sowie in sein Team integriert hat und meine Betreuung über diese Zeit übernommen hat. Durch seinen Enthusiasmus und seine fundierte Beratung begeisterte er mich schnell für das Phänomen der Präkonditionierung. Er hat mir die Gewissheit gegeben, einen Ansprechpartner mit Erfahrung und Visionen im Rücken zu haben, mit dem nichts unmöglich scheint.

Ich bedanke mich ganz besonders bei meinem Betreuer Dr. Michael Ignarski für seine tägliche unermüdliche Betreuung und seinen stets ehrlichen Rat. Ich habe ihn als Vorbild mit kritischem und klarsichtigem Blick erlebt, ungetrübt von dem Schleier sekundärer Interessen. Ich hoffe, dass ich mir diese Haltung ebenfalls bewahren kann.

Ich bedanke mich bei Dr. Francesca Fabretti, die sich für mich Zeit genommen hat, um mich in Techniken auszubilden und bezüglich meiner Projekte zu betreuen. Ihre Tür stand mir immer offen.

Ich bedanke mich bei den medizinisch-technischen Assistenten Martyna Brütting, Serena Greco-Torres, Ruth Herzog sowie Stefanie Keller für ihre Anleitung und Betreuung im praktischen Umgang im Labor. Ihre Hilfsbereitschaft hat mich im Alltag permanent begleitet und unterstützt.

Ich bedanke mich bei den zahlreichen Kollegen, die zu Freunden und Betreuern wurden. Mit eurer Unterstützung, den kleinen täglichen Expertenmeinungen und der Begeisterung für Grundlagenforschung haben sie dafür gesorgt, dass diese anstrengende Zeit keine Arbeit im eigentlichen Sinne war, sondern als Leidenschaft gelebt werden konnte.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester für ihre allgegenwärtige Unterstützung bedanken. Von Ihnen habe ich gelernt, was es heißt Opfer zu erbringen.



Für meine Eltern Vahi und Suzan Kaldirim und  
meine Schwester Stella Kaldirim

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>10</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>12</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
2.1. Die Niere und die Entstehung von Endharn	13
2.2. Das akute Nierenversagen	15
2.3. Das Prinzip der Präkonditionierung	16
2.3.1. Hypoxische Präkonditionierung	16
2.3.2. Diätetische Präkonditionierung	17
2.4. Die Proteine PPAN und MEX3C	18
2.5. Modellierung der akuten Nierenschädigung und Präkonditionierung in der Zellkultur	20
2.6. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	22
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
3.1. Material	23
3.1.1. Chemikalien	23
3.1.2. Restriktionsenzyme	27
3.1.3. Plasmide	27
3.1.4. Puffer und Lösungen	28
3.1.5. Bakterien	29
3.1.6. siRNA	29
3.1.7. Zelllinien	30
3.1.8. Verbrauchsmaterialien	30
3.1.9. Geräte	32
3.1.10. PCR-Primer	33
3.1.11. qPCR-Primer	34
3.1.12. Primärantikörper	34
3.1.13. Sekundärantikörper	35
3.1.14. Software	36
3.1.15. Nutzung von externen Instituten	37
3.2. Methoden	38

<b>3.2.1.</b>	<b>Kultivierung von Zellen</b>	<b>38</b>
3.2.1.1.	Zellen einfrieren und auftauen	38
3.2.1.2.	Zellzählungen	38
3.2.1.3.	Zelldifferenzierung	38
3.2.1.4.	Renale Primärzellen (PUCs)	38
<b>3.2.2.</b>	<b>Modelle der Zellkultur</b>	<b>39</b>
3.2.2.1.	Cisplatin-Schädigungsmodell	39
3.2.2.2.	Schädigungsmodell mittels Hypoxie und Nährstoffentzug an Leberzellen	39
3.2.2.3.	Messung des Zellüberlebens	39
3.2.2.4.	Präkonditionierung durch Hypoxie	39
3.2.2.5.	Präkonditionierung durch Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren (RPMI-Medium)	40
3.2.2.6.	Präkonditionierung durch Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren (DMEM ohne schwefelhaltige Aminosäuren)	40
3.2.2.7.	Knock-down von Proteinen mit siRNA	40
<b>3.2.3.</b>	<b>Generierung der Plasmide AAV-CAGGS-eGFP-PPAN und pcDNA6-3xFLAG-PPAN</b>	<b>40</b>
3.2.3.1.	Nukleinsäureamplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion	40
3.2.3.2.	Gel-Elektrophorese mit Agarose-Gelen	41
3.2.3.3.	DNA-Aufreinigung aus Agarose	42
3.2.3.4.	Restriktionsenzymverdau und Ligation	42
3.2.3.5.	Transformation von chemokompetenten Bakterien	45
3.2.3.6.	Sequenzierungen	46
<b>3.2.4.</b>	<b>Transiente Transfektionen</b>	<b>47</b>
3.2.4.1.	CaPO <sub>4</sub> -Transfektion	47
3.2.4.2.	Transfektion mit Lipofectamine 2000 DNA Transfection Reagent	47
3.2.4.3.	Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX für siRNA	48
<b>3.2.5.</b>	<b>Generierung einer transgenen Zelllinie unter Verwendung von Zinkfinger-Nukleasen (TALEN)</b>	<b>48</b>
<b>3.2.6.</b>	<b>Quantifizierung zellulärer RNA-Menge</b>	<b>49</b>
3.2.6.1.	RNA-Extraktion	49
3.2.6.2.	Reverse Transkription	49
3.2.6.3.	Extraktion genomischer DNA	50
3.2.6.4.	qPCR	50
<b>3.2.7.</b>	<b>Nachweis von Proteinen aus Zelllysaten</b>	<b>51</b>
3.2.7.1.	Western Blot	51
<b>3.2.8.</b>	<b>Immunfluoreszenzfärbungen</b>	<b>52</b>
<b>3.2.9.</b>	<b>Statistische Analysen</b>	<b>53</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
<b>4.1.</b>	<b>Auswahl einer immortalisierten Nierenzelllinie für das Zellkulturmodell</b>	<b>54</b>

<b>4.2.</b>	<b>Modelle der akuten Nierenschädigung in der Zellkultur</b>	<b>57</b>
4.2.1.	Etablierung des Cisplatin-Schädigungsmodells	57
4.2.2.	Cisplatin bewirkt Apoptose und Proliferationshemmung in HKC-8-Zellen	60
<b>4.3.</b>	<b>Hypoxische Präkonditionierung</b>	<b>62</b>
4.3.1.	Testung hypoxischer Präkonditionierung im Cisplatin-Schädigungsmodell	62
<b>4.4.</b>	<b>Einfluss der Proteine PPAN und MEX3C auf das Cisplatin-Schädigungsmodell und auf die Hypoxieantwort</b>	<b>67</b>
4.4.1.	PPAN-Lokalisation unter Kontroll- und Stressbedingungen	67
4.4.2.	Einfluss der Proteine PPAN und MEX3C auf die Hypoxieantwort und auf Schäden durch Cisplatin in HKC-8-Zellen	71
<b>4.5.</b>	<b>Präkonditionierung durch Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren</b>	<b>75</b>
4.5.1.	Übertragung diätetischer Präkonditionierung ins Zellkulturmodell	75
4.5.2.	Reproduktion eines publizierten Zellkulturmodells zur Modellierung diätetischer Präkonditionierung	78
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>80</b>
5.1.	HKC-8-Zellen repräsentieren differenzierte proximale Tubuluszellen der Niere	80
5.2.	Umsetzung eines Cisplatin-Schädigungsmodells in der Zellkultur	81
5.3.	Hypoxieantwort im Cisplatin-Schädigungsmodell	83
5.4.	PPAN und MEX3C in der Hypoxieantwort und Lokalisation des Proteins PPAN in der Zelle	85
5.5.	Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren im Cisplatin-Schädigungsmodell	87
5.6.	Reproduktion eines publizierten Zellkulturmodells zur Modellierung diätetischer Präkonditionierung	88
5.7.	Fazit und Ausblick	89
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>99</b>
7.1.	Abbildungsverzeichnis	99
7.2.	Tabellenverzeichnis	101

<b>7.3.</b>	<b>Abbildungen im Anhang</b>	<b>102</b>
7.3.1.	Originale Western Blots zu Abbildung 13	102
7.3.2.	Originale Western Blots zu Abbildung 14	104
7.3.3.	Originale Western Blots zu Abbildung 29	105
<b>8.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN</b>	<b>109</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTB	β-Aktin
AIF	Apoptosis-inducing factor
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
Arl13b	ADP-ribosylation factor-like protein 13B
BCL-2	B-cell lymphoma 2 Proteine
BSA	Bovines Serumalbumin
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CEP164	Centrosomal protein of 164 kDa
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
eGFP	enhanced green fluorescent protein
EPO	Erythropoietin
FBS	fötales Kälberserum
FIH	factor inhibiting HIF
FOXO	Forkhead box O
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HO-1	Hämoxygenase
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HSP70	heat shock protein 70
IFT88	Intraflagellar transport protein 88 homolog
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
JAK2	Janus Kinase 2
KIM1	Kidney injury molecule 1
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEX3C	Mex-3 RNA Binding Family Member C
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NRF-2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
Pard3	Partitioning defective 3 homolog

Pard3	Partitioning defective 3 homolog
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PFA	Paraformaldehyd
PHD	HIF-Prolyl-Hydroxylasen
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PPAN	Peter Pan Homolog
PUC	Renale Primärzellen
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RBP	RNA-bindendes Protein
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
siRNA	Small interfering RNA
SIRT1	Sirtuin 1
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VHL	von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Protein
XTT	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid

# 1. Zusammenfassung

## **Auswirkungen von Hypoxie und Restriktion der Aminosäurezufuhr auf ein Zellkulturmodell der akuten Nierenzellschädigung**

Von Madlen Kaldirim

Aus der Klinik II für Innere Medizin, Nephrologie,  
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Thomas Benzing

Für das akute Nierenversagen, eine zumeist ischämische Erkrankung der Niere mit weittragenden Konsequenzen für Morbidität und Letalität, existiert das Prinzip, dass eine Vorbehandlung mit schädlichen Reizen schwacher Ausprägung (Präkonditionierung) vor ischämischen Schäden schützen kann. Um die Mechanismen der Präkonditionierung durch Kenntnis ihrer Schlüsselfaktoren für eine Therapie zugänglich zu machen, wurde ein Zellkulturmodell mit humanen proximalen Tubuluszellen aufgebaut. Zur Modellierung der Schädigung wurde Cisplatin als Agens mit antiproliferativer und apoptotischer Wirkung ausgewählt. Um einen Präkonditionierungseffekt hervorzurufen, wurde hypoxische Präkonditionierung durch Inkubation in Hypoxie und diätetische Präkonditionierung durch Zellkulturmedien ohne schwefelhaltige Aminosäuren modelliert.

In der Durchführung dieses Vorhabens konnte durch die Anwendung von Cisplatin eine Reduktion des Überlebens der behandelten Zellen erreicht werden. Eine Verbesserung des Überlebens der Zellen durch hypoxische Vorbehandlungen oder Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren konnte nicht nachgewiesen werden. Eine genauere Untersuchung der RNA-bindenden Proteine PPAN und MEX3C zeigte bei Knock-down der Proteine keinen Einfluss auf das Schädigungsmodell. Studien zur Lokalisation des Proteins PPAN in der Zelle unter Stresseinwirkung konnten durch Versuche am überexprimierten, markierten PPAN nicht eindeutig bestimmt werden. Weitere Untersuchungen am endogenen Protein werden benötigt.

Ursache für den ausbleibenden Präkonditionierungseffekt bei Cisplatinschädigung könnte zum einen eine zu geringe Spezifität der Messmethode des Zellüberlebens oder der veränderte Metabolismus einer immortalisierten, proliferierenden Zelllinie sein.

Zur Optimierung des Modells könnte durch den Wechsel zu einer spezifischeren Messmethode der Schädigung die Auswirkung der Präkonditionierung erfasst werden oder durch den Einsatz von differenzierten Zellen eine Annäherung an den Metabolismus im Nierengewebe erreicht werden.

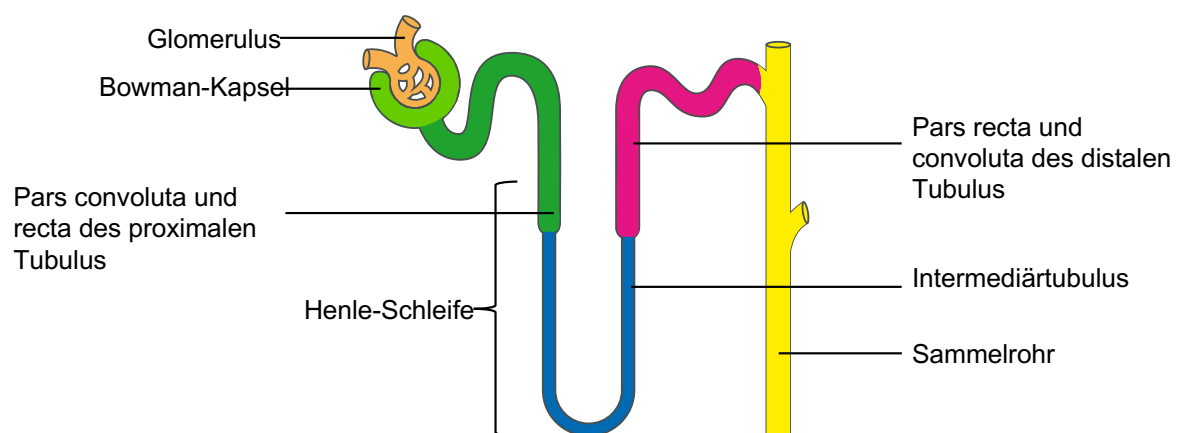


## 2. Einleitung

### 2.1. Die Niere und die Entstehung von Endharn

Die Niere erfüllt im humanen Organismus multiple Funktionen, welche die Regulation des Volumen- und Elektrolythaushalts, des Blutdrucks, des Säure-Basenhaushalts, die Ausscheidung von Abfallstoffen und endokrine Funktionen betreffen. Durch die Regulierung der Harnmenge und Harnkonzentration ist es möglich, Imbalancen bezüglich des Volumens und der Salzkonzentrationen des Blutes auszugleichen.

Urin entsteht in Nephronen, der Untereinheit der Niere, die sich aus einem Glomerulum und einem angeschlossenen Tubulussystem zusammensetzt (Abbildung 1).

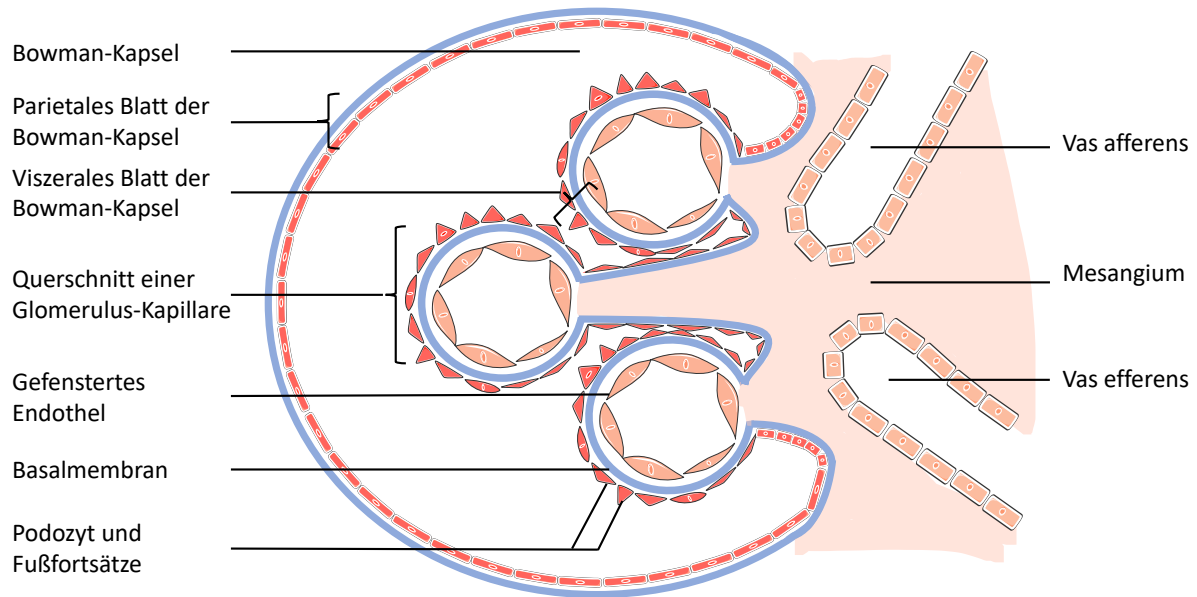


**Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Nephrons.**

Die Niere setzt sich zusammen aus ca. 1 Million Nephronen, die sich aus Nierenkörperchen und dem angeschlossenen Tubulussystem zusammensetzen. Nachdem der Primärharn aus den Glomeruluskapillaren (orange) in die Bowman-Kapsel (hellgrün) ausgepresst wird, wird der Primärharn in das Tubulussystem geleitet. Dieses besteht aus dem proximalen Tubulus (dunkelgrün), dem Intermediärtubulus (blau), dem distalen Tubulus (pink) und dem Sammelrohr (gelb). Die Pars recta des proximalen Tubulus, der Intermediärtubulus und die Pars recta des distalen Tubulus werden gemeinsam auch als Henle-Schleife zusammengefasst. Durch spezifische Transportmechanismen in den verschiedenen Tubulusabschnitten kommt es zur Rückresorption von Wasser, Salzen und anderen wertvollen Molekülen aus dem Primärharn und zur Konzentrierung des Endharns. Der entstandene Harn gelangt nachfolgend über das Nierenbecken in die ableitenden Harnwege.

Quelle: Abbildung modifiziert nach Smart Servier Medical Art: Nephron (3)<sup>2</sup> CC BY 3.0

Eine menschliche Niere besteht aus ca. 1 Million Nephronen<sup>3</sup>. Im Glomerulus, einem Kapillarknäuel, entsteht durch die Filtration des Blutes Primärharn<sup>4</sup>. Das Kapillarknäuel wird von der Bowman-Kapsel umschlossen, in die der Primärharn abfließt und Eingang zum proximalen Tubulus findet<sup>4</sup>. Der eigentliche Filter setzt sich zusammen aus dem fenestrierten Endothel der Glomeruluskapillaren, der Basalmembran und dem viszeralen Blatt der Bowman-Kapsel bestehend aus Podozyten, die entlang ihrer Fußfortsätze die sogenannte Schlitzmembran bilden (Abbildung 2)<sup>4</sup>.



**Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Nierenkörperchens.**

Ein Nierenkörperchen besteht aus dem Glomerulus und der anliegenden Bowman-Kapsel. Das Vas afferens und efferens sind die zu- und abführenden Blutgefäße des Kapillarknäuels. Die Kapillaren des Glomerulus sind innen von gefensterter Endothel ausgekleidet und umschlossen von dem viszeralen Blatt der Bowman-Kapsel. Dieses setzt sich aus einer Basalmembran und Podozyten inklusive ihrer Fußfortsätze zusammen, die wiederum eine Schlitzmembran ausbilden. Primärharn wird aus dem Glomerulus in die Bowman-Kapsel filtriert und gelangt anschließend ins Tubulussystem.

Quelle: Abbildung erstellt mit Hilfe von Smart Servier Medical Art: Endothelium<sup>5</sup> und Smooth muscle cell<sup>6</sup> CC BY 3.0

Der gesunde Filter hält durch seine größen- und ladungsselektiven Eigenschaften nahezu alle Plasmaproteine des Blutes zurück<sup>4</sup>. Die Konzentrierung des Primärharns zum Endharn erfolgt durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge durch das angeschlossene Tubulussystem, das von spezialisierten Epithelzellen ausgekleidet ist<sup>3</sup>. Die einzelnen Abschnitte des Tubulussystems sind durch ihre Ausstattung an Transportern zur Resorption von bestimmten Stoffen spezialisiert. Transporter wie die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der basolateralen Membran des Tubulusepithels können unter Energieaufwendung Moleküle gegen einen Gradienten transportieren und auch sekundär aktiven Co-Transportern und Carriern einen Gradienten zum Antrieb anbieten<sup>3,4</sup>. Im proximalen Tubulus werden bereits 80-90% des Primärharns resorbiert. In der nachfolgenden Henle-Schleife steht im absteigenden Teil die passive Rückresorption von Wasser im Vordergrund, die durch die hohe Osmolarität im Interstitium ermöglicht wird<sup>4</sup>. Durch das Gegenstromprinzip kann im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife bei hoher Salzkonzentration des Urins ein passiver Ausstrom der Elektrolyte ins Interstitium erfolgen<sup>4</sup>. Weitere Salzresorption (ca 5% des NaCl) erfolgt im Anschluss durch  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  Symporter im wasserundurchlässigen distalen Tubulus<sup>4</sup>. Der letzte Tubulusabschnitt vor Eintritt in die inaktiven ableitenden Harnwege ist das Sammelrohr<sup>4</sup>. Hier ist die Feinregulierung der Urinkonzentration durch Resorption von Wasser und zu einem geringeren Teil durch Na-Rückresorption möglich<sup>4</sup>.

Die Resorptionsvorgänge sind energieaufwendig und werden zum größten Teil über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase gesichert<sup>3,4</sup>. Auch wenn 20% des Herzzeitvolumens über die Nieren geleitet wird, ist die Durchblutung des Nierenmarks restriktiv, sodass die hohe Osmolarität im Bereich des Nierenmarks nicht ausgewaschen wird und zur Harnkonzentrierung genutzt werden kann<sup>4</sup>. Physiologisch kommt es dadurch zur relativen Hypoxie mit Werten um 10mmHg<sup>7,8</sup>. Hieraus begründet sich die schlechte Toleranz der Niere gegenüber einer Minderperfusion. Aber auch toxische medikamentöse Effekte vervielfachen sich durch sehr hohe Wirkstoffspiegel dieser Substanzen in der Niere im Rahmen der Harnkonzentrierung.

Durch die genannten Umstände ist die Niere besonders anfällig für Schädigungen durch Ischämien und Toxine, die zum Krankheitsbild des akuten Nierenversagens führen können.

## **2.2. Das akute Nierenversagen**

Das akute Nierenversagen beschreibt einen Funktionsverlust der Niere und wird klinisch nach den KDIGO-Leitlinien 2012 definiert als Kreatinin-Anstieg im Blut auf das mindestens 1,5-fache, eine Erhöhung um  $\geq 0,3\text{mg/dl}$  oder die Reduktion der Urinmenge auf  $< 0,5\text{ml/kg/h}$  für mindestens 6-12h<sup>9</sup>. Die Nierenschädigung wird nach der KDIGO-Leitlinie je nach Ausmaß des Kreatinin-Anstiegs und der Dauer der Anurie in 3 verschiedene Schweregrade eingeteilt<sup>9</sup>.

Als Ursache des weitgefassten Krankheitsbegriffs kommt ein Fächer an Pathologien in Frage. Klassischerweise werden die Ursachen hinsichtlich der Pathophysiologie in 3 Kategorien eingeteilt: prärenal, intrarenal und postrenal. Ein prärenales Nierenversagen wird hauptsächlich durch eine Minderperfusion der Niere beispielsweise durch Volumenmangel oder Hypotonie ausgelöst<sup>4</sup>, ist funktioneller Natur und durch Volumenausgleich rasch reversibel. Ein postrenales Nierenversagen entsteht durch eine Obstruktion der ableitenden Harnwege, die zum Harnstau führt und Funktionseinschränkungen bedingt<sup>4</sup>. Das intrarenale Nierenversagen ist Ausdruck einer nicht mehr prompt reversiblen Schädigung von Nierenzellen und zeigt sich in Folge einer andauernden Minderperfusion als akute Tubulusnekrose, welche jedoch auch durch andere Ursachen wie verschiedene Toxine ausgelöst werden kann<sup>4</sup>. Der proximale Tubulus ist u.a. aufgrund seines hohen Energiebedarfs besonders sensibel gegenüber der Ischämie und trägt die größte Schädigung davon<sup>10-12</sup>. Pathophysiologisch wird die Schädigung über die Abnahme der ATP-Konzentration, den Beginn einer inflammatorischen Reaktion und die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies – v.a. im Rahmen der Reperfusion - eingeleitet und setzt sich durch Veränderungen im Zytoskelett und die Einleitung der Apoptose und Nekrose fort<sup>13,14</sup>.

Die hohe Relevanz des Krankheitsbildes wird durch seine hohe Inzidenz bedingt. Circa 10-15% der hospitalisierten Patienten und 50% der Patienten auf Intensivstationen entwickeln ein akutes Nierenversagen<sup>15-17</sup>. Das Auftreten eines akuten Nierenversagens erhöht die

Wahrscheinlichkeit eine chronische Nierenerkrankung zu entwickeln und erhöht akut die Mortalität eines intensivmedizinisch behandelten Patienten um das 3- bis 5-fache<sup>15,18</sup>. Dadurch ergibt sich die Notwendigkeit, neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, um die Prognose des akuten Nierenversagens zu verbessern. Bisher vorhandene Empfehlungen in der Prävention und Behandlung des akuten Nierenversagens bestehen lediglich aus supportiven Maßnahmen, wie der Vermeidung zusätzlicher toxischer Reize und der Sicherstellung eines ausgeglichenen Volumenstatus. Therapieversuche mit N-Acetylcystein oder Bikarbonat blieben bisher erfolglos<sup>15,19</sup>. Weitere Therapieversuche mit Antioxidanzien, Angiotensin II, Adenosinantagonisten, Immunregulatoren und genetischen Modulatoren setzen an den bekannten Ansatzpunkten der Pathophysiologie des akuten Nierenversagens an. Klinisch ist bislang jedoch kein therapeutischer oder präventiver Ansatz etabliert, sodass weitere Untersuchungen dringend notwendig sind<sup>20</sup>.

### **2.3. Das Prinzip der Prækonditionierung**

Die Prækonditionierung nutzt das Prinzip der Hormesis, bei der eine Vorbehandlung eines Organismus mit einem schädlichen Reiz in geringer Reizstärke die schädliche Wirkung eines nachfolgenden toxischen Reizes in hoher Reizstärke verringert. Die hypoxische und diätetische Prækonditionierung sind zwei prominente Formen der Prækonditionierung. Der Reiz, der zur Vorbehandlung gewählt wird, muss in seiner Qualität nicht dem endgültigen schädigenden Einfluss gleichen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Diät als auch Hypoxie in Mäusen das Ausmaß einer Cisplatin-induzierten Nierenschädigung verringern kann<sup>21</sup>. Vielmehr wird angenommen, dass Prækonditionierungsstrategien evolutionär konservierte und sehr basale zelluläre Resilienzmechanismen aktivieren.

Die klinische Nutzung des Prækonditionierungseffekts im Menschen durch Modulierung beteiligter Signalwege ist seit Jahrzehnten Ziel der Forschung in diesem Feld. Eine Translation in die klinische Routine war jedoch bislang trotz vielversprechender erster Ergebnisse noch nicht möglich<sup>22-25</sup>.

#### **2.3.1. Hypoxische Prækonditionierung**

Erstmalig beschrieb Murry 1986 eine Organoprotektion des Herzens bei Ischämie durch eine vorausgehende schwächere Ischämie<sup>26</sup>. Das Prinzip ließ sich auch auf die Niere übertragen<sup>21,27-29</sup> und konnte auch bei organfernen Ischämien Effekte am Zielorgan auslösen<sup>30-32</sup>. Die Träger des Effekts wurden bereits in mehreren Signalwegen erforscht und sind in Ansätzen bekannt. Als zentraler Startpunkt der Signalwege gilt das Protein Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), der wichtigste Transkriptionsfaktor bei Hypoxie<sup>28,33</sup>. HIF-1 $\alpha$  ist die prädominante Isoform in den vulnerablen proximalen Tubuluszellen<sup>34</sup>. Das Protein wird unter hypoxischen Bedingungen stabilisiert und erhöht die Transkription seiner Zielgene<sup>35</sup>. Unter

normoxischen Bedingungen wird HIF-1 $\alpha$  durch die sauerstoffabhängigen HIF-Prolyl-Hydroxylasen (PHD) hydroxyliert und kann nachfolgend von dem von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressor-Protein (VHL) gebunden und im VHL-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex degradiert werden<sup>35</sup>. Unter hypoxischen Bedingungen bleiben die PHD-Enzyme weitestgehend inaktiv, sodass HIF-1 $\alpha$  akkumuliert und im Zellkern nach Zusammenlagerung mit dem HIF- $\beta$ -Protein als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann<sup>36,37</sup>.

Bereits identifizierte Zielgene von HIF-1 $\alpha$  sind assoziiert mit kurz- und langfristigen Mechanismen, welche die Perfusion und Sauerstoffversorgung im Gewebe verbessern, zellulären Stress abfangen und den Stoffwechsel anpassen. Im Speziellen ist die Angiogenese mit Beteiligung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Angiopoietin, die Erythropoese durch die Regulierung von Erythropoietin (EPO), die Verschiebung des Glukosemetabolismus hin zur anaeroben Energiegewinnung über Induktion beteiligter Enzyme der Glykolyse und über Glukose-Transporter, antioxidative Mechanismen über die Hämoxxygenase (HO-1), der Metabolismus der Mitochondrien über die B-cell lymphoma 2 Proteine (BCL-2), Reparaturmechanismen über das Hitzeschockprotein 70 (HSP70), der Stickoxid-Metabolismus und Signalwege mit Regulation von Zellwachstum, Entzündung, Apoptose und Differenzierung (MAPK-Signalweg, JAK2/STAT-Signalweg, PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und SIRT1-Signalweg) reguliert<sup>28,36,38-43</sup>.

### **2.3.2. Diätetische Präkonditionierung**

Eine weitere erfolgreiche Strategie zur Präkonditionierung vor einem ischämischen Schaden ist die Einhaltung einer Diät. Schon 1935 stellte McCay eine Verlängerung der Lebensspanne nach Kalorienrestriktion bei Ratten fest<sup>44,45</sup>. Dieser Effekt der Kalorienrestriktion konnte von Hefen bis hin zu Säugetieren festgestellt werden<sup>45-48</sup>. Durch Kalorienrestriktion zeigte sich eine Verzögerung des Alterns, wobei oxidativer Stress als Hauptursache des Alterns galt<sup>49,50</sup>. Es zeigte sich zudem, dass nicht nur die Lebensspanne sondern insgesamt eine erhöhte Stressresistenz durch eine Diät erreicht werden konnte<sup>50</sup>.

Grundlage dieses Effektes bilden zum einen antioxidative Mechanismen. So konnten initiale Erhöhungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beobachtet werden, die langfristig durch Regulationsmechanismen zu einer geringeren Schädigung durch ROS führten<sup>45,51-53</sup>. Eine externe Zufuhr von Antioxidantien bedingt eine Vergrößerung des oxidativen Schadens<sup>45,54,55</sup>. Eine Beteiligung des Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF-2) sowie Regulierungen von Heat-shock Proteinen, Superoxiddismutasen, Glutathion-Reduktasen, Katalasen,  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetasen und Häm-Oxygenasen<sup>45,50,56-60</sup> weisen auf eine erhöhte endogene Bereitstellung antioxidativer Abwehrmechanismen hin.

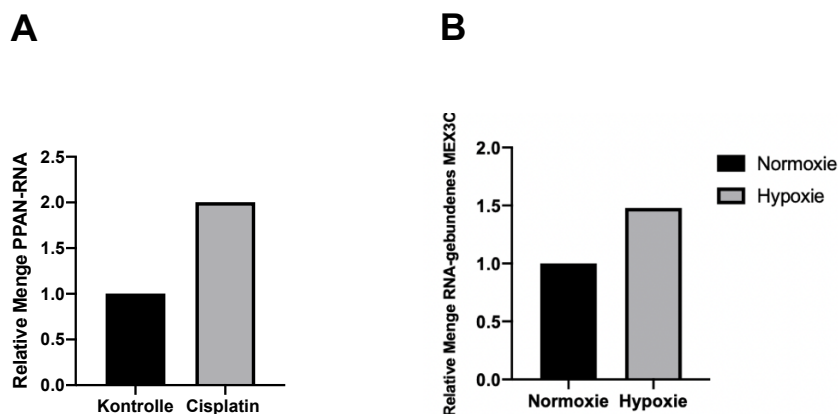
Ein weiterer wichtiger Aspekt der Wirkungsweise der Kalorienrestriktion betrifft Akteure des Energiemetabolismus über die Energiesensoren AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), Insulinsignalwege/Insulin-like growth factor (IGF-1) und mammalian target of rapamycin

(mTOR) mit Beeinflussung des Forkhead box O- Signalwegs (FOXO-Signalweg), die zu geringerem oxidativen Stress führen<sup>40,45,50,56,61-66</sup>.

Neben der Präkonditionierung durch reine Kalorienrestriktion existieren auch Formen der Präkonditionierung, welche durch eine spezielle Zusammensetzung der Nahrung ohne eine Reduktion der Kalorienmenge eine Stressresistenz auslösen. In diesem Zusammenhang existieren verschiedene erfolgreiche Protokolle der Proteinrestriktion, die einen schützenden Effekt vor schädlichen Einwirkungen vermitteln können<sup>40</sup>. So konnte beispielsweise für eine spezielle Diät durch die Restriktion der Aminosäure Methionin in Nagetieren, Fruchtfliegen, Nematoden, Hefen und Rhesusaffen eine Verlängerung der Lebensspanne festgestellt werden<sup>53,67-69</sup>. In dieser Form der diätetischen Präkonditionierung gibt es einige Überlappungen zu den beteiligten Signalwegen der Präkonditionierung durch Kalorienrestriktion<sup>70</sup> aber auch eigenständige Signalwege<sup>67</sup>. In diesem Zusammenhang identifizierten Hine et al., dass durch durch Cystein- und Methioninzugabe die erhöhte Stressresistenz nach Kalorienrestriktion und Proteinrestriktion aufgehoben werden kann<sup>71</sup>. Er beobachtete nach Präkonditionierung eine Aktivierung des Stoffwechselweges der Transsulfurierung durch Induktion der Enzyme zur Transsulfurierung zwischen L-Homocystein und L-Cystein mit konsekutiv erhöhter Schwefelwasserstoffproduktion (H<sub>2</sub>S). H<sub>2</sub>S als neuer identifizierter Mediator war bereits bei alleiniger Zugabe ohne Einhaltung eines Entzuges schwefelhaltiger Aminosäuren in der Lage, das Gewebe vor Ischämie-Reperfusionsschaden zu schützen und kommt somit als neuer potenzieller Knotenpunkt in der diätetischen Präkonditionierung in Betracht<sup>71</sup>. Dieser Effekt konnte im Tiermodell wie auch in der Zellkultur an immortalisierten murinen Leberzellen (Hepa 1-6) gezeigt werden<sup>71</sup>.

#### **2.4. Die Proteine PPAN und MEX3C**

Wie in den letzten Abschnitten bereits beschrieben sind die molekularen Mechanismen der hypoxischen und diätetischen Präkonditionierung nur zum Teil bekannt. Ein vollständiges und zusammenhängendes Verständnis und eine genaue Offenlegung der entscheidenden Signalwege ist bisher nicht gelungen. Um weitere Erkenntnisse über die Funktionsweise der Präkonditionierung zu schaffen, wurden die RNA-bindenden Proteine (RBPs) PPAN und MEX3C ausgewählt, die durch ihre Interaktion mit RNA ein hohes Potenzial haben, an Regulationsprozessen beteiligt zu sein. In einer laborinternen Messung konnte an *C. elegans* eine Verkürzung der Lebensspanne durch das Supprimieren des zum humanen PPAN homologen Proteins Brix domain containing Protein beobachtet werden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass das Protein PPAN essenziell für das Überleben ist. Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe in Zellkultur unter hypoxischen Bedingungen oder in Mäusen nach Cisplatin-induzierter Nierenschädigung konnten keine signifikante Regulation der Proteine zeigen (Abbildung 3). Es zeigten sich Hinweise auf eine Zunahme der Proteine unter Hypoxie oder Nierenschädigung (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Regulation der Proteine MEX3C und PPAN durch Cisplatin oder Hypoxie.**

(A) Vergleich relativer Mengen an PPAN-RNA in murinen Nieren mit und ohne Cisplatinexposition. Bestimmung erfolgte 3 Tage nach Cisplatingabe mittels Sequenzierung der RNA aus dem Organ. Die Abbildung wurde aus publizierten Daten aus Späth et al. generiert<sup>21</sup>. Die gezeigten Unterschiede sind nicht signifikant. (B) Vergleich relativer Mengen des Proteins MEX3C in murinen IMCD-Zellen, die unter Hypoxie oder Normoxie gebunden an RNA vorliegen. Hierfür wurden die Zellen nach Hypoxie/Normoxie-Exposition UV-Strahlung ausgesetzt und hiermit die RNA mit gebundenen Proteinen verbunden. Gebundene Proteine wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert. Die Abbildung wurde aus publizierten Daten aus Ignarski et al. generiert<sup>72</sup>. Die gezeigten Unterschiede sind nicht signifikant.

Bekannt ist bisher, dass PPAN im Nukleolus und in Mitochondrien lokalisiert ist<sup>73</sup> und neben der Beteiligung am Reifungsprozess von rRNA<sup>74</sup> auch anti-apoptische Funktionen über p53 und unabhängig von p53 in Mitochondrien<sup>75</sup> vermittelt. Bei erhöhtem nukleolärem Stress ist PPAN zudem an der Regulation der Autophagie beteiligt<sup>76</sup>. Der Knock-down von PPAN führt zu gestörter Zellteilung mit Stopp im Zellzyklus oder Bildung von binukleären Zellen und Phosphorylierung von H2A.X als Hinweis auf DNA-Schäden<sup>77</sup>. Dieser Einfluss auf Apoptose und Regulierung des Zellzyklus könnte auch bedeutenden Einfluss auf das Ausmaß der Schädigung nach akuter Nierenschädigung haben. Eine Erarbeitung der Rolle des Proteins PPAN bei akuter Nierenschädigung und Präkonditionierung erscheint daher sinnvoll.

MEX3C ist ein Protein, das über seine E3-Ubiquitinligase-Aktivität mRNA-Stabilität sekundär beeinflussen kann<sup>78,79</sup>. Bereits beschriebene, beeinflusste Systeme beinhalten neben antiviraler Antwort und Karzinogenese<sup>80-86</sup> auch Transformation des Nierenepithels in mesenchymale Zellen bei diabetischer Nephropathie<sup>87,88</sup> und Beteiligung in kardialer Ischämieantwort<sup>89,90</sup>, Körpermasse und Energiestoffwechsel<sup>89-92</sup>. All diese Punkte sind von großer Relevanz hinsichtlich akuter Nierenschädigung, sodass eine weitere Untersuchung der Rolle des Proteins MEX3C in der Präkonditionierung und Nierenschädigung erfolgen sollte.

## 2.5. Modellierung der akuten Nierenschädigung und Präkonditionierung in der Zellkultur

Um die genauen molekularen Mechanismen des akuten Nierenversagens offen darlegen zu können, wurde ein Zellkulturmodell gesucht, an dem Untersuchungen in kurzer Zeit mit hohem Durchsatz möglich sind. Proximale Tubuluszellen gelten als vulnerabler Punkt der Niere, die bei akuter Nierenschädigung stark betroffen sind<sup>10</sup>. Dieser Abschnitt hat aufgrund der Beteiligung an der Endharnproduktion durch Resorptions- und Sekretionsvorgänge einen hohen Energieverbrauch. Die physiologisch hypoxische Umgebung für Tubuluszellen<sup>93</sup> wird bei Ischämie in ihrem Sauerstoffmangel aggraviert. Gleichzeitig verfügt der proximale Tubulus nur über niedrige Kapazitäten durch anaerobe Glykolyse den eigenen Energiebedarf zu decken, sodass es bei Hypoxie schnell zum Energiemangel kommt<sup>28,94</sup>. Zellen aus dem proximalen Tubulus bieten sich daher als repräsentatives Modell zur Erforschung der molekularen Mechanismen bei akuter Nierenschädigung an. Hierfür existieren verschiedene immortalisierte Zelllinien aus humanen Nieren. Eine hiervon ist die 1997 erstmalig beschriebene HKC-8-Zelllinie, die das Profil einer proximalen Tubuluszelle aufweist. Sie wurde aus gesundem Kortex einer Niere nach einer Nephrektomie (human) bei Tumorerkrankung isoliert und mit dem SV-40 Virus immortalisiert<sup>95</sup>. Die Zelllinie wächst als adhärenzte, einzelne Zellschicht und exprimiert Enzyme des Bürstensaumes wie beispielsweise Natrium/Glukose-Cotransporter und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen<sup>95</sup>. Die Zelllinie gilt als vergleichbar zu bereits existierenden immortalisierten Zelllinien wie LLC-RK1, OK und HK-2<sup>95</sup> und bietet den Vorteil einer intermediären Wachstumskinetik, die Arbeiten an der Zelllinie im Vergleich zum langsamen Wachstum der humanen HK-2-Zelllinie deutlich vereinfacht.

Als Schädigungsmodell zur Untersuchung von akuten Nierenschädigungen kommt häufig Cisplatin als toxische Substanz zum Einsatz. Cisplatin wird in der Medizin durch seine proapoptotische Wirkung gegen verschiedene Tumore eingesetzt. Neben Zellen aus gesundem Gewebe mit hoher Teilungsrate werden auch Nieren durch die systemische Cisplatintherapie geschädigt. Proximale Tubuluszellen gelten als besonders anfällig, da sie an der basolateralen Membran über den CTR1-Transporter (high affinity copper uptake protein 1) und den OCT2-Transporter (organic cation transporter) verfügen<sup>96</sup>. Diese führen durch die Aufnahme der Substanz zu einer vergleichsweise hohen Konzentration und folglich bedeutenden Toxizität des Cisplatins in den Tubuluszellen<sup>96</sup>. Bei Patienten, die mit Dosen von  $50\text{-}75\text{mg}/\text{m}^2$  behandelt wurden, entwickelte ein Drittel der Patienten eine akute Nierenschädigung<sup>96-98</sup>.

Die Wirkungen von Cisplatin erstrecken sich hauptsächlich über Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion durch Schädigung der DNA und durch oxidativen Stress<sup>99</sup>. Die DNA-Schäden entstehen durch die Reaktion von Cisplatin mit den Purinbasen, wodurch über p53 die Zellteilung gestoppt und die Apoptose eingeleitet wird<sup>96,99</sup>. Apoptose wird zum einen über



intrinsische Wege in Mitochondrien durch erhöhten zellulären Stress ausgelöst: Es kommt zur Erhöhung des mitochondrialen Bax-Proteins, welches durch das Freisetzen von Cytochrom-c durch die geschädigte Mitochondrienmembran Caspasen als Effektoren der Apoptose aktiviert<sup>96</sup>. In der Literatur führte eine Bax-Depletion zur Verhinderung von AKI nach Cisplatinexposition<sup>96,100</sup>. Über extrinsische Wege wird die Apoptose über den Fas-Liganden oder den Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) und nachfolgend erneut über Caspasen eingeleitet<sup>96</sup>. ROS erhöhen zusätzlich zu den genannten Mechanismen den zellulären Stress und fallen zusätzlich aus dem Grund vermehrt an, da Cisplatin mit Glutathion reagiert und damit ein wichtiges Antioxidans der Zelle vermindert wird. Weiterhin wird ein erhöhter Stress im endoplasmatischen Retikulum beschrieben<sup>101</sup> und eine Modulation der MAPK- und des Caspase-unabhängigen Apoptosis-inducing factor (AIF), denen aber ein geringerer Stellenwert zugeschrieben wird<sup>96,99,102,103</sup>.

Die Eignung eines Schädigungsmodells durch toxische Wirkungen des Cisplatins zur Erforschung der ischämischen Nierenschädigung lässt sich dabei wie folgt erklären: In der Pathophysiologie des akuten Nierenversagens wird ähnlich wie nach Cisplatinexposition die Induktion von oxidativem Stress, ATP-Mangel, nachfolgender Apoptose und Nekrose beobachtet<sup>13,104</sup>. Systemische Prozesse wie inflammatorische Reaktionen und Veränderungen in der Hämodynamik<sup>13</sup> können durch das Chemotherapeutikum in einem Zellkulturmodell nicht abgebildet werden. Es ist aber davon auszugehen, dass die gemeinsame Endstrecke der Prozesse nach Cisplatin-schaden und nach akuter Nierenschädigung in die Apoptose und Nekrose führen und daher eine Modellierung einer akuten Nierenschädigung durch Cisplatin möglich ist.

Neben Schädigungsmodellen zur Modellierung einer akuten Nierenschädigung sind auch Modelle zur Präkonditionierung publiziert. In Tiermodellen sind verschiedene Modelle mit intermittierender oder anhaltender hypoxischer Reizung über Minuten bis Wochen beschrieben<sup>105-109</sup>. Zur Modellierung der diätetischen Präkonditionierung wurde ein Ansatz von Hine et al. aus dem Jahr 2015<sup>71</sup> verfolgt. Hier wurde die Aktivierung der Transsulfurierung zwischen L-Homocystein und L-Cystein mit folglich erhöhter endogener H<sub>2</sub>S Produktion als Wirkprinzip erfolgreicher Präkonditionierung herausgearbeitet<sup>71</sup>. Konkret wurde in dem Tiermodell von Hine et al.<sup>71</sup> ein Protokoll zur Kalorien- und Proteinrestriktion verwendet, deren Präkonditionierungseffekte nach Substitution schwefelhaltiger Aminosäuren aufgehoben werden konnten. Andere erfolgreiche Protokolle zur diätetischen Präkonditionierung durch Kalorienrestriktion in der Literatur erstrecken sich von einer Dauer von einem Tag Fasten bis hin zu lebenslänglicher Kalorienrestriktion<sup>110-112</sup>. Neben der Kalorienrestriktion existieren auch erfolgreiche Präkonditionierungsprotokolle im Tiermodell, in denen spezifisch die Restriktion der schwefelhaltigen Aminosäure Methionin schützende Effekte hervorruft<sup>67-69</sup>.

Übertragen in die Zellkultur konnten Präkonditionierungseffekte bei Modellierung einer hypoxischen Vorbehandlung durch 12 h Hypoxie bei 1% O<sub>2</sub> und nachfolgender Minderung der Schädigung durch Cisplatin erreicht werden<sup>28</sup>. Modelle zur diätetischen Präkonditionierung in der Zellkultur sind deutlich seltener als in Tiermodellen. Hine et al. gelang es, in Leberzellen durch Inkubation in Zellkulturmedium ohne Cystein und Methionin über Nacht eine Präkonditionierung gegenüber einer Schädigung durch Nährstoffentzug und Hypoxie hervorzurufen<sup>71</sup>.

## **2.6. Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Obwohl das Konzept der Präkonditionierung durch verschiedene Stressoren seit längerer Zeit bekannt ist und einige Ansätze zu den beteiligten Signalwegen bestehen, ist es leider noch nicht möglich, Angriffspunkte der Präkonditionierungsmechanismen gezielt anzusteuern und beispielsweise medikamentös zur Organprotektion zu nutzen. Dies wäre jedoch für eine erfolgreiche Translation in die Klinik ein entscheidender Schritt.

Das Forschungsziel der vorliegenden Arbeit besteht deshalb darin, ein Zellkulturmodell zur Präkonditionierung von proximalen Tubuluszellen der Niere vor einer akuten Nierenschädigung zu etablieren, um nachfolgend die molekularen Mechanismen des Effekts herauszuarbeiten und in der Zukunft weitere Ansatzpunkte für neue Therapiemodalitäten anzubieten.

Die Präkonditionierung soll in dieser Arbeit zum einen durch Hypoxie und zum anderen durch die Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren vermittelt werden. Der Schaden soll mittels Cisplatin gesetzt werden. Speziell soll dabei der Einfluss der RBPs PPAN und MEX3C auf ihren Einfluss auf das Überleben in diesem Modell untersucht werden. Durch ihre Bindungseigenschaften an RNA und ihre in der Literatur bekannten Assoziationen mit Apoptose, Autophagie, Ischämieantwort und Energiestoffwechsel besitzen die Proteine ein hohes Potenzial in Präkonditionierungsprozessen bedeutend beteiligt zu sein.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien

Produkt	Hersteller	Katalognummer
0,4mM p-Cumarsäure	Sigma	C-9008
1,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Wasserstoffperoxid 30% ROTIPURAN®	Roth	8070.2
10% Ammoniumpersulfat	AppliChem	A0834,1000
100mM Dithiothreitol (DTT)	PanReac AppliChem	A1101
10x Y+/Tango™ buffer	Fermentas	#BY5
1kb DNA ladder	Thermo Scientific	#SM0311
2-Propanol	Roth	6752.4
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Roth	6979.3
50bp DNA ladder	New England Biolabs	#N3236L
5x Sequenzing Buffer	Applied Biosystems	4336697
6x DNA Loading Dye	Thermo Scientific	#R0611
Agarose	Sigma	A9539
Amphotericin B	Sigma	A2942
Ampicillin	Roth	K029.2
Ampuwa®	FRESENIUS KABI	06178443 (PZN)
Bacto™ Yeast Extract	BD Biosciences	212750
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems	4337455
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma	A9418
Bromphenolblau	AppliChem	A2331,0005
CASYton	OLS	5651808
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O)	Roth	HN04.2
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega	G8080

Cisplatin Accord® 1mg/ml	Accord Healthcare AG	368668
Collagen I	Thermo Fisher	A1064401
D-Glucose	Sigma	G7021
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Scientific	R0182
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O)	Merck	6580
Dialysiertes FBS	Sigma	F0392-100ML
Direct-zol™ RNA MiniPrep	Zymo Research	R2052
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem	A1101,0025
DMEM no glutamine, no methionine, no cystine	Gibco	21013024
DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma	D6421
DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem	A3672,0100
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco	31966
Eisessig	Roth	7332.1
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth	2218.2
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	26140079
GC-Enhancer	New England Biolabs	0021604
GeneJET Gel Extraction kit	Thermo Scientific	K0691
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific	K0502
GlutaMAX™ (100X)	Gibco	35050-038
Glycerol	ChemSolute	2039.1000
Glycin	Roth	3908.3
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	GERBU	1009
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368813
IGEPAL® CA-630	Sigma	I8896
Isotonische Kochsalzlösung 100ml	FRESENIUS KABI	00808771 (PZN)

Kaliumacetat	Fluka	60033
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	1.04936.0500
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth	3904.1
Kaliumhydrogenphosphat	Roth	6875.1
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth	6751
Keratinocyte SFM (Serum free medium)	Gibco	17005042
LB Agar (Lennox)	Roth	X965.1
LB-Medium	Roth	X964.2
Lipofectamine RNAiMAX Reagent	Invitrogen	13778150
Lipofectamine™ 2000 Transfection reagent	Invitrogen	1668019
Luminol 97%	Sigma	123072
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth	2189.2
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O)	Roth	2189.2
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O)	Sigma	M-2773
Methanol	Roth	4627.5
Na <sub>2</sub> EDTA	Roth	X986.1
Natriumacetat (NaOAc)	Sigma	W302406
Natriumchlorid (NaCl)	CHEMSOLUTE	1367.5000
Natriumdeoxycholat	AppliChem	A1531
Natriumhydroxid-Plättchen (NaOH)	AppliChem	A3910
NEB Buffer 3.1	New England Biolabs	#B7203S
Normal Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch	017-000-121
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey Nagel	740410.10
OptiMEM	Gibco	31985-047

PageRuler Plus™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	#26619
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma	P6148
Penicillin/Streptomycin	Thermo Scientific	15140122
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	4367659
Prolong Diamond + DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Thermo Fisher	P36971
Protease Inhibitor Cocktail III	Merck	539134-1ML
Puromycin	Invivogen	ant-pr-1
Q5-High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs	M0491L
Q5-Reaction Buffer	New England Biolabs	B9027S
Rapamycin	Sigma	R8781
RNase freies Wasser	Invitrogen	10977-049
Roti®-Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Roth	A156.1
Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)	Roth	T802.1
RPMI-1640 Medium	Sigma	R7513
Rubidiumchlorid	Sigma	215260
SDS (Natriumlaurylsulfat)	plusone	17-1313-01
T4 DNA Ligase	Thermo Scientific	EL0011
T4 DNA Ligase Buffer (10x)	Thermo Scientific	B69
TEMED ≥99% (Tetramethylethylendiamin)	Roth	2367.3
TRI Reagent®	Sigma	T9424
Tris-Hcl	Roth	9090.3
Triton X-100	AppliChem	A4975
Tris	Sigma	T1503
Trypsin 0,05%	Gibco	25300-054
Tryptone	MP Biomedicals	1010817
Tween20 (Polysorbat20)	Caelo	3472

Ultra Pure Glycerol (für kompetente Bakterien)	invitrogen	15514-011
Zellproliferations- Testkit XTT	AppliChem	A8088,1000

Tabelle 1: Chemikalien

### 3.1.2. Restriktionsenzyme

<u>Enzym</u>	<u>Restriktionsstelle</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Katalognummer</u>
Bpil	5' ...GAAGACXX[... 3' 3' ...CTTCTGXXX[... 5'	Fermentas	#ER1011
Mlu I	5'...A[CGCGT... 3' 3' ...TGCGC]A ... 5'	New England Biolabs	R0198L
Not I	5' ...GC[GGCCGC... 3' 3' ...CGCCGG]CG... 5'	New England Biolabs	#R3189L

Tabelle 2: Restriktionsenzyme

### 3.1.3. Plasmide

<b>Plasmide</b>	<b>Herkunft</b>
pcDNA6-3XFLAG-Podocin Modifikationen: <ul style="list-style-type: none"> <li>In MluI/NotI site Podocin eingebracht</li> </ul>	Addgene, im Nephrolab modifiziert
AAV-CAGGS-eGFP Modifikationen: <ul style="list-style-type: none"> <li>BglII site (877) entfernt: agatct -&gt; agttct</li> <li>Stopcodon nach GFP zu Glycin geändert: caagtaaacgct (MluI site) -&gt; caagggaacggct (GFP-Fusionsprotein)</li> <li>NotI site (5895) entfernt: gCggccgc -&gt; gGggccgc</li> <li>In MluI/NotI site Podocin eingebracht</li> </ul>	Addgene #22212, geschenkt von Rudolph Jaenisch <sup>113</sup>
hAAVS1 1L TALEN	Addgene
hAAVS1 1R TALEN	Addgene
pcDNA6-3xFLAG-PPAN	Nephrolab
AAV-CAGGS-eGFP-PPAN	Nephrolab

Tabelle 3: Plasmide

### 3.1.4. Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben wurde ddH<sub>2</sub>O verwendet

Puffer/Lösung	Inhalt
1X TAE Puffer	40mM Tris; 20mM Essigsäure; 2mM Na <sub>2</sub> EDTA; 3µM Ethidiumbromid; ddH <sub>2</sub> O
25X TAE Puffer	1M Tris; 0,5M Essigsäure; 50mM Na <sub>2</sub> EDTA 2xH <sub>2</sub> O
2X HEBS	50mM HEPES; 280mM NaCl; 10mM KCl; 1,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7xH <sub>2</sub> O, 12mM Glucose  Mit NaOH auf pH7,09 bringen
2X Lämmli-Puffer	100mM Tris HCl (pH 6,8); 4%SDS; 2,74M Glycerol; 3mM Bromphenolblau  Für 2X Lämmli mit DTT: 1 Teil 1M DTT zu 9 Teilen 2X Lämmli geben
Puffer A für Polyacrylamid-Gele	360mM Tris HCl; 1,14M Tris/Trizma Base; 13,9mM SDS  Auf pH 8,8 einstellen
Puffer B für Polyacrylamid-Gele	16mM Tris; 484mM Tris HCl; 13,9mM SDS
ECL, Lösung A	100mM Tris pH8,5; 2,5mM Luminol; 0,4mM p-Cumarsäure
ECL, Lösung B	100mM Tris pH 8,5; 1,5% Wasserstoffperoxid 30% ROTIPURAN®
iClip Lysis Buffer	50mM Tris HCl (pH7,4); 100mM NaCl; 1% NP-40 (Igepal CA 630); 0,1% SDS; 0,5% Natriumdeoxycholat; 1:200 Protease Inhibitor Cocktail III (frisch hinzugeben)
SDS-PAGE Laufpuffer	3,47mM SDS; 191,82mM Glycin; 24,76mM Trizma Base
PBS	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBS <sup>+</sup>	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1mM CaCl <sub>2</sub> und 0,5mM MgCl <sub>2</sub>
PBST	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1mM CaCl <sub>2</sub> ; 0,5mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1% Triton



Petrischalen mit Agar	32g Agar (Lennox) in 1000ml H <sub>2</sub> O Auflösen und nach dem Autoklavieren in Petrischalen gießen
PFA	20g PFA und 250ml ddH <sub>2</sub> O bei 60°C auflösen 250ml Lösung (pH7,4) aus 47,5ml 0,2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O; 202,5ml 0,2M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2xH <sub>2</sub> O und 250ml ddH <sub>2</sub> O hinzugeben
Psi broth	0,5% Bacto yeast extract; 2% Bacto Tryptone; 20,3 mM Magnesiumsulfatheptahydrat Mit KOH auf pH 7,6 bringen
SOC-Medium	2% Bacto Tryptone; 0,5% Bacto Yeast Extract; 8,5mM NaCl; 2,5mM KCl pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und Lösung autoklavieren und: 10mM MgCl <sub>2</sub> ; 20mM Glucose hinzufügen
Tfbl	30mM Kaliumacetat; 100mM Rubidiumchlorid; 13,2mM CaCl <sub>2</sub> ; 50mM MgCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O; 2,05M Glycerol Mit 1:10 verdünnter Essigsäure auf einen pH von 5,8 bringen
TfbII	10mM Rubidiumchlorid; 100mM CaCl <sub>2</sub> ; 10mM MOPS; 0,41M Glycerol Mit NaOH auf pH 6,5 bringen
Transferpuffer	3,47mM SDS for molecular biology; 24,76mM Trizma Base; 187,82mM Glycin
Waschpuffer	30mM Tris; 300mM NaCl; 0,3%Tween20 (Polysorbat20) Auf pH7,5 einstellen

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

### 3.1.5. Bakterien

Bakterien	Herkunft
E. coli DH10	Invitrogen

Tabelle 5: Bakterien

### 3.1.6. siRNA

siRNA	Sequenzen	Hersteller
siCtrl	UGGUUUACAUGUCGACUAA UGGUUUACAUGUUGUGUGA UGGUUUACAUGUUUCUGA	Dharmacon

	UGUUUACAUGUUUCCUA	
siMEX3C	GGAGUGAUCCUUCUGGUA GAAACUAUAUAGAGCUAA CUAAUGGUACCAAUAGUUA GCGCAAGAAUGAUAUCCAA	Dharmacon
siPPAN	AGUACUCGCUGGUGCGUGA GGAAAUGGAUCGAGGCAGG GUAAGAAGAACUCGCUGAA AAAGUGAUGUCCACAGUU	Dharmacon

Tabelle 6: siRNA

### 3.1.7. Zelllinien

Zelllinien	Herkunft	Zellkulturmedium
HKC-8	Lorraine Racusen, John Hopkins University, Baltimore, Maryland	DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham +10%FBS
HEK293T	ATCC	DMEM, high glucose +10%FBS
Primary urinary cells	Malte Bartram, Nephrolab, CECAD Cologne; Ethikantrag Nr. 12-204	DMEM/Nutrient Mixture F-12 Ham with 15mM HEPES and sodium bicarbonate, no L-glutamine +10%FBS +1x Glutamax +100U/ml Penicillin +100µg/ml Streptomycin +500ng/ml Amphotericin B
HK2	ATCC	Keratinocyte SFM (Serum free medium)
Hepa 1-6	Rugarli Lab, CECAD Cologne	DMEM, high glucose +10%FBS

Tabelle 7: Zelllinien

### 3.1.8. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Katalognummer
12well Zellkulturplatte	Corning Incorporated	3513
6well Zellkulturplatte	Corning Incorporated	3516
8er Deckelkette, flach	Sarstedt	65.989.002
96 well Zellkulturplatte	Greiner bio-one	655 180
Adhäsive qPCR Folie	SARSTEDT	95.1999

Biosphere® Filter Tips 100-1000ul	SARSTEDT	70.762.211
Biosphere® Filter Tips 2-200ul	SARSTEDT	70.760.211
Blottingpaper Typ BF4	VWR	515-1632
CASYcups	OLS	5651794
CELLSTAR® TUBES 15ml	greiner bio one	188 271
CELLSTAR® TUBES 50ml	greiner bio one	227 261
Corning® Costar® Stripette® 10ml	Corning Incorporated	4101
Corning® Costar® Stripette® 25ml	Corning Incorporated	4251
Corning® Costar® Stripette® 5ml	Corning Incorporated	4051
Deckgläschen rund	Menzel	CB00180RAC
Immobilon-P Membran, PVDF	Carl Roth	T831.1
Leere Gel-Kassetten	ThermoFisher	NC2010
Mikro-Schraubröhre 1,5ml	Sarstedt	72.692.005
Mikrotiterplatte mit 96 Wells	Applied Biosystems	4346907
Multiply®-µStrip 0,2ml Kette	Sarstedt	72.985.002
Objektträger	Engelbrecht	11102
Pipettenspitzen 10/20ul	TipOne®	S1110-3700
Pipettenspitzen 1000ul	TipOne®	S1111-6701
Pipettenspitzen 200ul	TipOne®	S1111-1700
Reaktionsgefäß 1,5ml	SARSTEDT	72.690.001
Reaktionsgefäß 2,0ml	SARSTEDT	72.691
SafeSeal Reaktionsgefäß 1,5ml	Sarstedt	72.706
Sterican® 20G Kanüle	Braun	4657519

Sterile Pipettenspitzen 10/20ul	TipOne®	S1110-3810
Sterile Pipettenspitzen 1000ul	TipOne®	S1111-6811
Sterile Pipettenspitzen 200ul	TipOne®	S1111-1816
Trennkämme 12-Well	Life technologies	NC3012
Zellkulturschalen	LMS	430167
Zellschaber	Corning incorporated	3008

*Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien*

### 3.1.9. Geräte

Gerät	Hersteller	Modell/Bestellnummer
Autoklave	Systec	VX-150
Brutschrank	Heraeus	50042307
CASY Cell Counter	INNOVATIS	TT-2GA-1327
Chemolumineszenz-Imager	peqlab	Fusion-SL 3500_WL
CoolCell®	Biocision	LX
Elektronisches Vorschaltgerät	LEJ	Ebq 50 ac
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axiovert 200, ApoTome 1, HXP-120 Beleuchtungseinheit
Gelkammer	Thermo Scientific	Owl™ EasyCast™ B3
Gelkammer (für SDS- PAGE)	Invitrogen	XCell SureLock Mini-Cell
Inkubationsschüttler (Bakterien)	Infors HT	Multitron Pro
Inkubator	Binder	9140-0038
Juli	Nanoentek Inc.	JLB041008011
Kreisschüttler	IKA	KS 260 basic
Mikroskop	Leica	DM IL LED

NanoDrop® Spectrophotometer	1000	Peqlab	ND-1000
Netzgerät		Consort	E835
P10 Pipette		Gilson	F144802
P100 Pipette		Gilson	F123615
P1000 Pipette		Gilson	F123602
P2 pipette		Gilson	F144801
pH-Meter		Mettler Toledo	Fiveeasy
Pipetboy acu 2		Integra	155 023
Rollenmischer		Stuart	SRT6
Sicherheitswerkbank		Scanlaf	Mars
Sonicator Bioruptor Pico®		Diagenode	B01060010
Spektrophotometer		PerkinElmer	EnSpire™ Multimode Plate Reader
Thermoblock		Eppendorf	Thermomixer comfort
Thermocycler		Bio-Rad	S1000™ Thermal Cycler
Thermocycler		Bio-Rad	DNA Engine PTC-200
Thermocycler		Applied Biosystems	7900 HT
Transferkammer		VWR	700-1220DE
Vortexer		Heidolph	Reax top
Waage		OHAUS	A S-313
Wasserbad		GFL	Typ 1004
Zentrifuge		Heraeus	Multifuge 4KR
Zentrifuge		Eppendorf	Centrifuge 5810R
Zentrifuge		Eppendorf	Centrifuge 5417R

Tabelle 9: Geräte

### 3.1.10. PCR-Primer

Zielgen/Bezeichnung	Sequenz	Hersteller
AAVS-Locus 1	GTG AGT TTG CCA AGC AGT CA	IDT

AAVS-Locus 2	TAT CCG CTC ACA ATT CCA CA	IDT
AAVS-Locus 3	CGG AAC TCT GCC CTC TAA CG	IDT
PPAN Dovetail Rückwärts-Primer :	CGAAGACGCGGCCGCTCAG GCCACTCTCTTCCCTGGGC	IDT
PPAN Dovetail Vorwärts-Primer ohne ATG:	CGAAGACTACGCGTGGACAG TCAGGGAGGTCCCGGC	IDT

Tabelle 10: PCR-Primer

### 3.1.11. qPCR-Primer

Gen	Sequenz (vorwärts und rückwärts Primer)	Hersteller
hACTB	GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG	IDT
hHPRT	TGA CAC TGG CAA AAC AAT GCA GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT	IDT
hKIM1	GAA CCA GTA GCC ACT TCA CCA CTG TCA CGG TGT CAT TCC CA	IDT
hMEX3C	GCA CGA CTG TGT GAT TTG CT ACT GGA CAT GAT GGC GTT CT	IDT
hPPAN	CCA CCC CTC CTG GTA CTC AA CAG GAA CAA CTT TGA TGT AGT GGC	IDT

Tabelle 11: qPCR-Primer

### 3.1.12. Primärantikörper

Antikörper	Spezifität	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalog nr.
Anti-acetyliertes-Tubulin	human	Maus	Für IF: 1:1000	SIGMA	T6793
Anti-Arl13b	human	Kaninchen	Für IF: 1:500	Proteintech	17711-1-AP
Anti-Cleaved-caspase -3	Human	Kaninchen	Für WB: 1:1000	Cell Signaling	9661

Anti-FLAG	tag	Maus	Für IF: 1:1000	Sigma Aldrich	F3165
Anti-HIF-1 $\alpha$	Human	Kaninchen	Für WB: 1:1000	Cayman Chemical	1000642 1
Anti-Ki67	Human	Kaninchen	Für IF: 1:1000	Abcam	ab16667
Anti-pan 14-3-3 (K-19)	human	Kaninchen	Für WB: 1:1000	Santa Cruz	sc-629
Anti-Pan-Actin	Human, Maus, Ratte, Affe	Kaninchen	Für WB: 1:1000	Cell Signaling	#8456
Anti-PARD3	Maus, human	Kaninchen	Für IF: 1:500	Millipore	07-330
Anti-Pericentrin	Maus, human	Kaninchen	Für IF: 1:500	Abcam	ab4448
Anti-phospho-S6 Ribosomal Protein	human	Kaninchen	Für WB: 1:2000	Cell Signaling	4858
Anti-PPAN	human	Maus	Für IF: 1:50	Santa Cruz	sc-398273
Anti-PPAN	human	Kaninchen	Für IF: 1:50	ThermoFisher Scientific	PA5-48648
Anti- $\beta$ -catenin	human	Maus	Für IF: 1:500	BD Transduction Laboratories	610154
Anti-S6 Ribosomal Protein	human	Kaninchen	Für WB: 1:1000	Cell Signaling	2217

Tabelle 12: Primärantikörper

### 3.1.13. Sekundärantikörper

Antikörper	Spezifität	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalognr.
Anti-Kaninchen-	Kaninchen	Ziege	Für WB: 1: 30 000	Jackson ImmunoResearch	111-035-003

Meerrettich- peroxidase					
Anti- Kaninchen- Alexa488 (Fluorochrom)	Kaninchen	Affe	Für IF: 1:500	Jackson ImmunoResearch	711-545- 152
Anti- Kaninchen- Cy3 (Fluorochrom)	Kaninchen	Affe	Für IF: 1:500	Jackson ImmunoResearch	711-165- 152
Anti-Maus- Meerrettich- peroxidase	Maus	Ziege	Für WB: 1: 30 000	Jackson ImmunoResearch	115-035- 003
Anti-Maus- Alexa488 (Fluorochrom)	Maus	Affe	Für IF: 1:500	Jackson ImmunoResearch	715-545- 150
Anti-Maus- Cy3 (Fluorochrom)	Maus	Affe	Für IF: 1:500	Jackson ImmunoResearch	715-165- 150
Anti-Ratte- Meerrettich- peroxidase	Ratte	Ziege	Für WB: 1: 30 000	Jackson ImmunoResearch	112-035- 167

*Tabelle 13: Sekundärantikörper*

### 3.1.14. Software

Software	Hersteller
Fiji 2.0.0	Open source Projekt <sup>114</sup>
GraphPad Prism 5 & 8	GraphPad
Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint) Version 16.51	Microsoft
SDS 2.4	Applied Biosystems
Zen (blue edition)	Zeiss

*Tabelle 14: Software*



### 3.1.15. Nutzung von externen Instituten

Leistung	Institut
LDH-Messungen	Zentrallabor Uniklinik Köln
Sequenzierungen	CCG Cologne

*Tabelle 15: Nutzung von externen Instituten*

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Kultivierung von Zellen**

Die Zellen werden in Inkubatoren bei 37°C bei Raumluft mit 5% CO<sub>2</sub>-Zusatz gehalten. Das Passagieren erfolgt unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank mit Abzug und wird bei einer Konfluenz von circa 70-80% durchgeführt. Dafür wird das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellkulturschale mit PBS-Puffer gespült und die Flüssigkeit erneut abgesaugt, 1ml 0,05% Trypsin auf den Zellrasen verteilt und nach Ablösung durch Zugabe von neuem Medium mit FBS abgestoppt. Die gelösten Zellen werden nachfolgend auf die gewünschten Schalen verteilt.

#### **3.2.1.1. Zellen einfrieren und auftauen**

Es werden abgelöste Zellen bei 150x g 5 min zentrifugiert, das entstandene Pellet wird in 0,5ml Zellkulturmedium resuspendiert, mit 0,5ml Lösung bestehend aus 80% FBS und 20% DMSO vermischt und anschließend im CoolCell® LX bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wird die getaute, flüssige Suspension in Medium verdünnt und auf eine Zellkulturschale verteilt.

#### **3.2.1.2. Zellzählungen**

Zur Vorbereitung werden die Zellen mittels 1ml 0,05% Trypsin von der Kulturschale abgelöst. Der enzymatische Verdau wird mit Zellkulturmedium abgestoppt. Ein Teil der Zellen wird nun in ein CASYcup mit 10ml CASYton gegeben. Die verwendete Verdünnung wird im CASY Cell Counter programmiert. Nachfolgend wird die Zellzahl nach Gebrauchsanweisung durch den CASY® Cell Counter gemessen. Die Konzentration der Zellen wird nach der Messung durch das Gerät ausgegeben.

#### **3.2.1.3. Zelldifferenzierung**

Zur Differenzierung werden HKC-8 Zellen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und anschließend nach Medienwechsel mit Entzug von fetalem Kälberserum zur Zelldifferenzierung und Zilienausbildung 5 Tage angeregt<sup>115</sup>.

#### **3.2.1.4. Renale Primärzellen (PUCs)**

PUCs sind Zellen, die aus humanem Urin von Individuen isoliert wurden. Die Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen von Individuen ohne bekannte Nierenerkrankungen. Die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Malte Bartram zur Verfügung gestellt und nach bereits veröffentlichtem Protokoll isoliert<sup>116</sup>. Die Zellen werden nach Auftauen ein bis zwei Passagen lang kultiviert und danach sofort für die gewünschten Experimente benutzt. Die Gewinnung der PUCs ist durch die Ethikkommission der Uniklinik Köln bewilligt (Aktenzeichen 12-204).

### 3.2.2. Modelle der Zellkultur

#### 3.2.2.1. Cisplatin-Schädigungsmodell

Für das Zellkulturmodell wurde Cisplatin als Agens zum Auslösen einer Schädigung der Nierenzellen ausgewählt. Dafür werden 10.000 Zellen pro Well auf Zellkulturplatten mit 96 Wells übertragen. Die Zellen werden mit 50µM und 100µM Cisplatinverdünnungen im Zellkulturmedium für 24h behandelt. Das Überleben wird durch die Erfassung der metabolisch aktiven Zellen festgestellt (s.u. 3.2.2.3.)

#### 3.2.2.2. Schädigungsmodell mittels Hypoxie und Nährstoffentzug an Leberzellen

Das Konzept der Zellschädigung durch Hypoxie und Nährstoffentzug wurde aus Hine et al.<sup>71</sup> in den Versuchsablauf integriert. Fehlende Detailangaben zum konkreten Versuchsdurchlauf, wie die genaue Zellzahl/well, wurden ergänzt. Zur Durchführung werden 15.000 Leberzellen (Hepa 1-6) pro Well verteilt und nach Durchführung des gewünschten Präkonditionierungsprotokolls am Folgetag mittels Austausch des Zellkulturmediums gegen 0,9% Kochsalzlösung und zusätzlicher Inkubation einer Gruppe bei 1% O<sub>2</sub> für 3-4h geschädigt. Der NaCl-Überstand wird danach zur LDH-Messung verwendet. Nach der initialen Schädigung folgt ein Intervall von 2-3 h in gewöhnlichem Zellkulturmedium in Normoxie. Hiernach wird das Überleben der Zellen gemessen (s. 3.2.2.3.).

#### 3.2.2.3. Messung des Zellüberlebens

Das Zellüberleben wird durch die Verstoffwechslung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (XTT) oder Resazurin gemessen.

##### Messung des Zellüberlebens mit XTT

In die Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte wird 25µl pro Well der vorbereiteten XTT-Lösung (*Zellproliferations-Testkit XTT*) hinzugefügt. Die Absorption wird nach 3-5h bei 450-500nm gemessen und durch folgende Formel ermittelt:  $Absorption = -\log(I/I_0)$

(I=Lichtintensität nach Absorption, I<sub>0</sub>= Lichtintensität ohne Probe)

##### Messung des Zellüberlebens mit Resazurin

In die Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte wird 20µl *CellTiter Blue* (Resazurin) hinzugefügt. 1 und 2h später wird die Fluoreszenz nach Exzitation bei 550nm bei 600nm gemessen.

#### 3.2.2.4. Präkonditionierung durch Hypoxie

Nierenzellen werden 11h nach dem Aussäen (10.000 Zellen/Well einer 96-Well-Platte) in einen Inkubator mit hypoxischen Bedingungen (O<sub>2</sub>-Konzentration 1%, CO<sub>2</sub> 5%, N<sub>2</sub> 94%) gestellt. Nach 7h im Inkubator folgt ein Intervall von 6h in Normoxie bevor das Schädigungsmodell angewandt wird.

### **3.2.2.5. Präkonditionierung durch Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren (RPMI-Medium)**

HKC-8 Zellen werden für 24 h in einem Medium ohne schwefelhaltige Aminosäuren und einem FBS-Anteil von 0,01% kultiviert (RPMI-Medium). Bei verändertem Proliferationsniveau zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nach Inkubation im RPMI-Medium wird eine Erholungszeit eingehalten, bis die Proliferation der Versuchsgruppe wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe ansteigt (max.10% Unterschied). In HKC-8 Zellen beträgt die Zeit zwischen 6 und 7 Tagen. Danach werden beide Gruppen in Zellkulturplatten mit 96 Wells passagiert (10.000 Zellen/Well).

### **3.2.2.6. Präkonditionierung durch Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren (DMEM ohne schwefelhaltige Aminosäuren)**

Basierend auf dem Modell von Hine et al.<sup>71</sup> werden 15.000 Leberzellen (Hepa 1-6) pro Well am ersten Tag in eine 96-Well Zellkulturplatte passagiert. Nach Anwachsen beginnt am zweiten Tag der Medienwechsel für 17 h auf Zellkulturmedium ohne schwefelhaltige Aminosäuren (DMEM no glutamine, no methionine, no cystine mit 10% dialyzed FBS + 1x Glutamax).

### **3.2.2.7. Knock-down von Proteinen mit siRNA**

Zur Supprimierung der gewünschten Proteine wird die gewünschte siRNA durch transiente Transfektion mittels *Lipofectamine RNAiMAX* (s.3.2.4.3.) in die Zellen eingebracht. Der Knock-down wurde zum Teil auch in Kombination mit hypoxischer Präkonditionierung durchgeführt. Für den Versuchsaufbau bedeutet das, dass 1 Tag vor der hypoxischen Vorbehandlung eine transiente Transfektion durchgeführt wurde.

### **3.2.3. Generierung der Plasmide AAV-CAGGS-eGFP-PPAN und pcDNA6-3xFLAG-PPAN**

Der nachfolgende Abschnitt beschreibt das Klonieren von DNA. Dafür wird ein gewünschter DNA-Abschnitt ausgewählt und durch das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. In weiteren Schritten wird dieser Abschnitt in ein Plasmid mit Promotoren und Antibiotika-Resistenzen eingesetzt. Die entstandenen Plasmide werden in Bakterien transformiert und von diesen repliziert. Die aufgereinigten Plasmide können in transfizierbare Zellen eingebracht und exprimiert werden.

#### **3.2.3.1. Nukleinsäureamplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion**

Für die Reaktion werden alle Reagenzien aus dem Protokoll für die Polymerase-Kettenreaktion (Tabelle 16) pipettiert. Als letztes wird die Polymerase pipettiert. Die Primer wurden mit Restriktionsstellen an ihrem 5'-Ende konzipiert (MluI/NotI), die ebenfalls an der gewünschten Insertionsstelle im Ziel-Plasmid vorhanden sind.

Q5-Puffer	10µl
GC-Enhancer	10µl
dNTPs 25µM	0,4µl
Vorwärts- und Rückwärtsprimer 10µM	Je 2,5µl
H <sub>2</sub> O	22,6µl
cDNA mit gewünschtem Fragment	Ca. 100ng
Q5-Polymerase	1µl

Tabella 16: Q5-PCR

Die Reaktion erfolgt in einem Thermocycler: Die DNA wird bei 98°C geschmolzen. Je nach Primer wird im nächsten Schritt die Temperatur zur spezifischen Bindung des Primers abgesenkt. Anschließend wird die Temperatur auf 72°C angehoben, sodass die thermostabile Q5-Polymerase den Komplementärstrang polymerisieren kann. Diese Zyklen werden wiederholt, sodass sich im günstigsten Fall bei jedem Durchgang die Menge des amplifizierten Materials verdoppelt.

1.	98°C	30s	} Schritt 2.-4. 25-35 x wiederholen
2.	98°C	5-10s	
3.	50-72°C	10-30s	
4.	72°C	20-30s/kb	
5.	72°C	2min	

Tabella 17: PCR-Zyklen für PCR mit Q5-Polymerase

Für die gewünschten Plasmide wird das Gen *PPAN* mit den Primern „PPAN Dovetail Rückwärts-Primer“ und „PPAN Dovetail Vorwärts-Primer ohne ATG“ aus humaner cDNA amplifiziert. Die Temperatur in Schritt 3 wird für *PPAN* bei 72°C gewählt und Schritt 2-4 wird 35x durchgeführt.

### 3.2.3.2. Gel-Elektrophorese mit Agarose-Gelen

TAE Puffer
Agarose
6x DNA Loading Dye

Tabella 18: Gelelektrophorese

Um die Länge des amplifizierten DNA-Fragments erkennen zu können, wird das Reaktionsgemisch in Agarose-Gelen aufgetrennt. Dafür wird 1%-Agarose in 1x TAE-Puffer aufgelöst und in Gelkammern gegossen und mit Gelkämmen versehen. Ein Marker mit DNA-

Fragmenten definierter Größen wird neben den Proben aufgeladen. Die Proben werden mit 6x *DNA Loading Dye* zum Beschweren versetzt und danach durch Elektrophorese nach der Länge im Agarose-Gel bei ca. 80-200V aufgetrennt. Durch das interkalierende Ethidiumbromid im TAE-Puffer fluoreszieren die DNA Fragmente nach Anregung mit UV-Licht.

### 3.2.3.3. DNA-Aufreinigung aus Agarose

Falls die DNA im Agarose-Gel weiterverwendet werden soll, kann es mit Hilfe des *GeneJet Gel Extraction Kit* auf der Basis einer Ethanolfällung extrahiert werden. Dafür wurde die Anleitung des Herstellers eingehalten (Thermo Scientific).

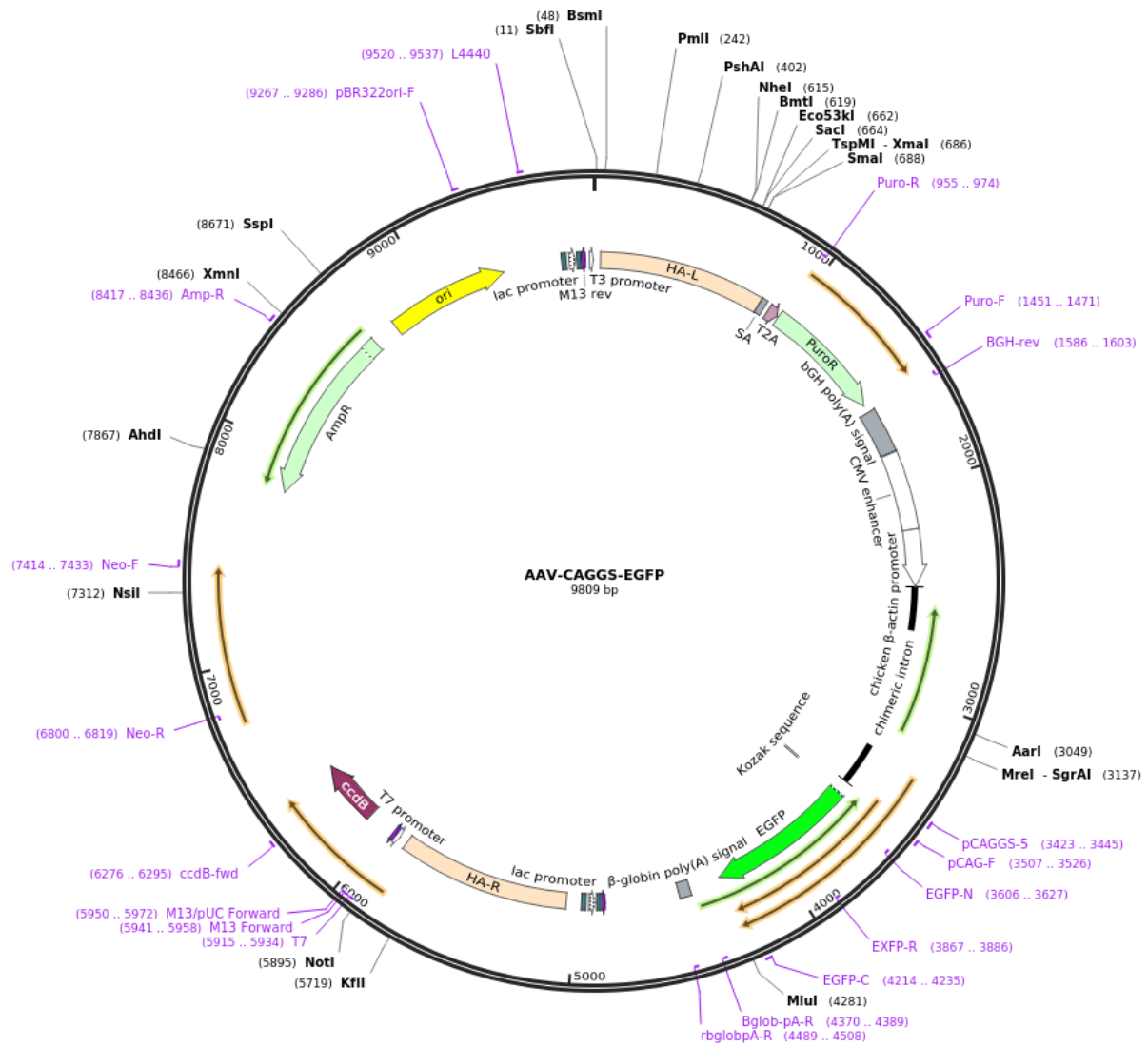
### 3.2.3.4. Restriktionsenzymverdau und Ligation

Im nächsten Schritt wird durch den Restriktionsenzymverdau der Ziel-Vektor an den Restriktionsstellen aufgeschlossen. Die komplementären Sequenzen am Ziel-Vektor sowie am amplifizierten DNA-Fragment werden durch eine Ligase zu einem kohärenten Strang verbunden, sodass ein neues Plasmid entsteht.

10x NEB Buffer 3.1	1,5µl
Mlu I/Not I	jeweils 5U
DNA	1µg
H <sub>2</sub> O	Bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 15µl

*Tabelle 19: MluI- und NotI-Verdau*

Für die Generierung des Plasmids AAV-CAGGS-eGFP-PPAN wurde das Plasmid AAV-CAGGS-eGFP-Podocin nach dem Protokoll in Tabelle 19 mit MluI/NotI bei 37°C für 90 min verdaut. In Abbildung 4 ist die Plasmidkarte des Vektors AAV-CAGGS-eGFP dargestellt, aus der AAV-CAGGS-eGFP durch Einbringung der Podocin-Sequenz generiert worden war.



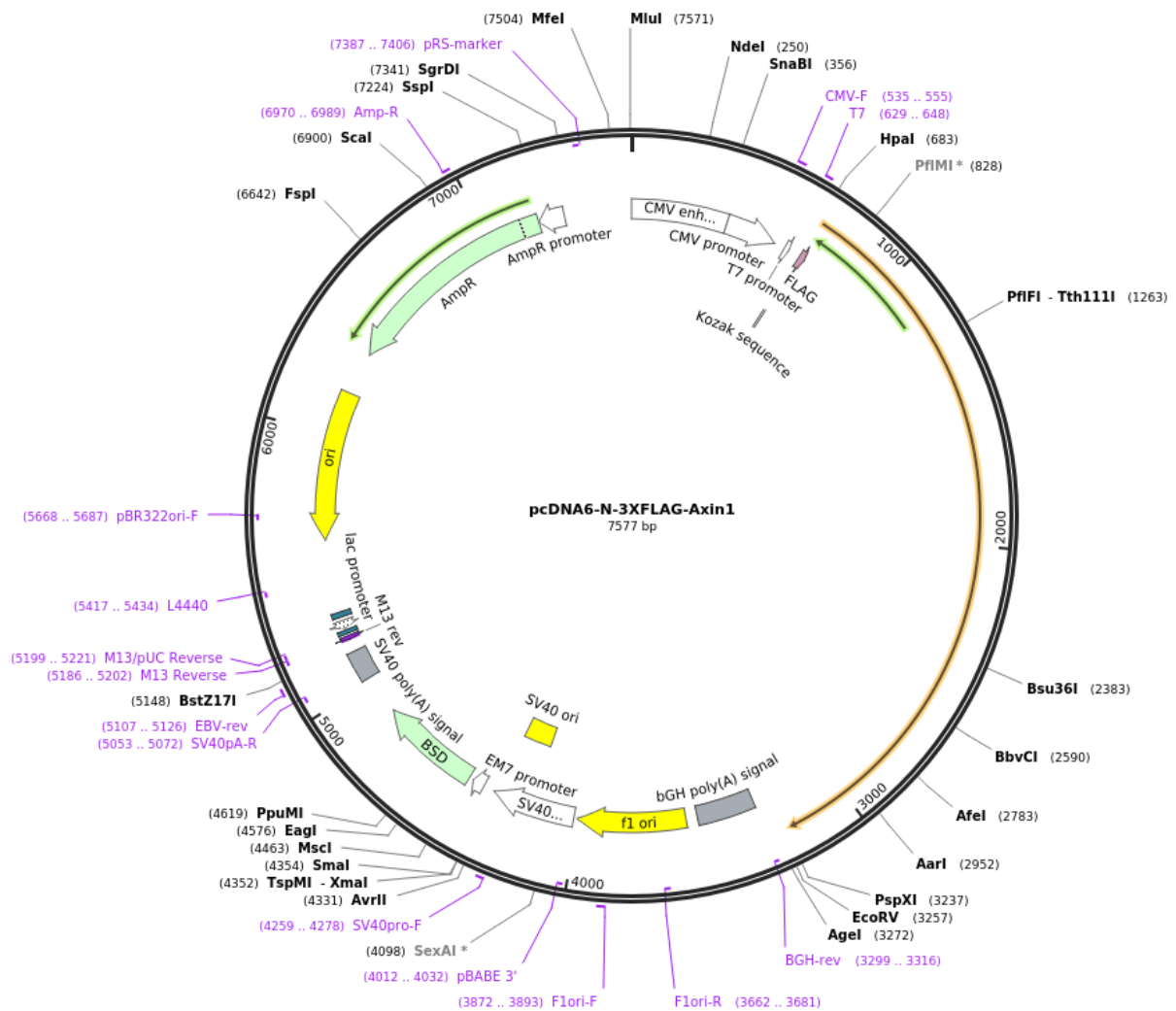
**Abbildung 4: Plasmidkarte des Vektors AAV-CAGGS-EGFP.**

Das Plasmid AAV-CAGGS-EGFP enthält einen CAG Promotor aus einem CMV-enhancer, einem chicken  $\beta$ -actin Promoter und einem bovine growth hormone (bGH) mit einem zusätzlichen Polyadenylierungssignal des bGH sowie eine Ampicillin-Resistenzkassette im Vektor. Das Insert (Transgen) kann in 2 Homologie-Sequenzen des humanen AAVS1-locus eingebettet werden. In diesem Abschnitt befindet sich eine Puromycin-Resistenzkassette. Bei Einbringung einer proteinkodierenden Sequenz entsteht ein Fusionsprotein mit N-terminalem eGFP.

Quelle: Abbildung nach addgene.com: „AAV-CAGGS-eGFP“<sup>41</sup>

Das Plasmid AAV-CAGGS-EGFP enthält einen CAG-Promotor aus einem CMV-enhancer, einem chicken  $\beta$ -actin Promoter und einem bovine growth hormone (bGH) mit einem zusätzlichen Polyadenylierungssignal des bGH sowie eine Ampicillin-Resistenzkassette im Vektor. Das Insert (Transgen) kann in 2 Homologie-Sequenzen des humanen AAVS1-locus eingebettet werden. In diesem Abschnitt befindet sich eine Puromycin-Resistenzkassette. Bei Einbringung einer proteinkodierenden Sequenz entsteht ein Fusionsprotein mit N-terminalem eGFP.

Für die Generierung des Plasmids pcDNA6-3xFLAG-PPAN wurde das Plasmid pcDNA6-3xFLAG-Podocin ebenfalls mit den Reagenzien aus Tabelle 19 bei 37°C für 90 min verdaut. Bei Einbringung eines Protein-kodierenden DNA-Abschnitts mit Hilfe von MluI/NotI-Verdau entsteht ein Fusionsprotein mit N-terminalem 3xFLAG. In Abbildung 5 ist beispielhaft ein kommerziell erhältlicher pcDNA6-Vektor mit Axin1-Insertion dargestellt.



**Abbildung 5: Plasmidkarte des Vektors pcDNA6-3xFLAG-Axin1.**

Beispielhafte Darstellung eines pcDNA6-Vektors. Der pcDNA6\_3XFLAG-Vektor ist mit einem SV40 Promotor, CMV Promotor und mit einer Ampicillin-Resistenzkassette ausgestattet. Das FLAG-Tag ist N-terminal vor der proteinkodierenden, insertierten Sequenz, sodass ein Fusionsprotein entsteht.

Quelle: Abbildung nach [addgene.org](http://addgene.org): „pcDNA6-3xFLAG-Axin1“<sup>117,118</sup>

Der Restriktionsverdau des amplifizierten PPAN-Fragments erfolgt durch das Restriktionsenzym BpI, da die Enzyme MluI und NotI Schnittstellen mitten im PPAN-Fragment finden würden und das Restriktionsenzym BpI bei entsprechendem Primerdesign komplementäre Überhänge an den Restriktionsstellen von MluI/NotI hinterlassen kann.



DNA	1µg
100mM DTT	0,3µl
10X Y+/Tango™ buffer	3µl
Bpil 10U/µl	1,5µl
H <sub>2</sub> O	Ad 30µl

*Tabelle 20: Bpil-Verdau*

Für den Bpil-Verdau werden die oben genannten Reagenzien (Tabelle 20 mit der amplifizierten *PPAN*-DNA pipettiert, im Vortexer vermischt, 3-5 s zentrifugiert und anschließend bei 37°C für 60 min inkubiert. Danach folgt eine Inaktivierung der Reaktion bei 65°C für 20 min.

Für die Ligation wird das Reaktionsgemisch auf Eis angesetzt (Tabelle 21) und die Ligase als letztes hinzugefügt. Bei „sticky ends“ werden 10 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht benötigt. Die Inaktivierung erfolgt bei 65°C für 10 min.

Für die Generierung des Plasmids AAV-CAGGS-eGFP-PPAN wurde hier die Vektor-DNA AAV-CAGGS-eGFP-Podocin mit dem amplifizierten *PPAN*-Gen in einen Ligationsansatz gegeben (Tabelle 21). Für die Generierung des Plasmids pcDNA6-3xFLAG-PPAN wurde der Vektor aus dem Verdau des pcDNA6-3XFLAG-Podocin mit dem amplifizierten *PPAN*-Fragment ebenfalls in einen separaten Ligationsansatz gegeben (Tabelle 21).

T4 DNA-Ligase Buffer (10x)	2µl
Vektor DNA	50ng
DNA-Einsatz	Ca. 50ng
Nuklease-freies Wasser	Auf 20µl
T4 DNA-Ligase	1µl

*Tabelle 21: Ligationsansatz*

### 3.2.3.5. Transformation von chemokompetenten Bakterien

In der folgenden Methode geht es um die Vervielfachung des neu produzierten Plasmids durch Bakterien, die die Plasmide aufnehmen und im Rahmen des exponentiellen Bakterienwachstums replizieren. Dafür werden E.coli DH10 Bakterien benutzt.

Für die Chemokompetenz werden die E.coli Bakterien im Psi broth-Medium bei 37°C in 500ml bei 120rpm kultiviert, bis sie eine optische Dichte von 0,6-0,8 erreicht haben (entspricht ca 10<sup>8</sup> Zellen/ml). Nach Abkühlung auf Eis für 15-30 min werden die Bakterien bei 4000rpm 15 min bei 4°C pelletiert und in 200ml 4°C Tfbf resuspendiert. Nach Transfer in ein 250ml aufnehmendes Reaktionsgefäß und weiteren 15 min Inkubation auf Eis werden die Bakterien erneut bei 4000rpm und 4°C für 15 min pelletiert. Das Pellet wird in 10-20ml Tfbf resuspendiert, à 100µl aliquotiert und nach eintauchen in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Bakterien und SOC-Medium werden auf Eis aufgetaut. Dann können 25µl der Bakterien in ein 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben werden. Aus der vorherigen Ligation (siehe 3.2.3.4.) werden 5µl mit dem gewünschten Plasmid hinzugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation auf dem Eis wird im 42°C Wasserbad für 45 Sekunden ein Hitzeschock durchgeführt. Für 2 min wird das Reaktionsgefäß erneut auf Eis abgekühlt. Anschließend werden 175µl des nährstoffreichen SOC-Mediums zu den Bakterien gegeben und 30 min lang in einem Thermoblock bei 37°C mit 800-1200rpm geschüttelt. Zur Selektion der Bakterien mit dem Plasmid werden 50-100µl der Bakterien auf einer vorbereiteten Agar-Platte (Raumtemperatur) ausgestrichen und getrocknet. Das Agar enthält bei Ampicillin-Resistenz-Kassette im pcDNA6-Vektor sowie im AAV-CAGGS-Vektor Ampicillin in einer Konzentration von 100µg/ml im Agar. Über Nacht erfolgt nun eine Inkubation bei 37°C, wonach transformierte Kolonien sichtbar werden. Diese werden zur Vermehrung mit einer Pipettenspitze angestochen und in 3 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubiert. In das Medium wird entsprechend der Resistenzkassette im Vektor Ampicillin zur Selektion hinzugefügt. Die Plasmide werden mit Hilfe des *GeneJet Plasmid MiniPrep Kits* (Thermo Scientific) membranbasiert durch Aufreinigung an einer Silikasäule isoliert.

Die Plasmid-Konzentrationen werden durch die Verwendung des NanoDrop spektrophotometrisch ermittelt. Es werden die Absorptionen bei 260nm und 280nm Wellenlänge gemessen. Ein Quotient aus den Absorptionen bei 260nm und 280nm bei ca. 1,8 zeigt einen hohen DNA-Anteil an. Die absolute Konzentration wird nachfolgend aus der Absorption bei 260nm aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz  $E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$  ausgerechnet ( $E_{\lambda}$  = Extinktion,  $c$  = Konzentration,  $\epsilon_{\lambda}$  = Extinktionskoeffizient,  $d$  = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers).

### **3.2.3.6. Sequenzierungen**

Die Sequenzierungen erfolgen auf der Grundlage der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Hierfür wird die gewünschte DNA nach folgendem Protokoll (Tabelle 22) pipettiert und nach dem Protokoll in Tabelle 23 im Thermocycler inkubiert. Nachfolgend erfolgt die eigentliche Sequenzierung durch das Cologne Center for Genomics (CCG).

BigDye®Terminator v3.1	0,25µl
5x BigDye® sequencing buffer	2,25µl
Primer (1µM)	2µl
DNA-Probe	200ng
ddH <sub>2</sub> O	Auf 10µl

Tabelle 22: BigDye-Pipettierschema

1. Schritt: 96°C für 1 min
  2. Schritt: 96°C für 10 s
  3. Schritt: 55°C für 5 s
  4. Schritt: 60°C für 4 min
- } Schritt 2.-4. 39x wiederholen

Tabelle 23: BigDye-PCR-Protokoll

### 3.2.4. Transiente Transfektionen

#### 3.2.4.1. CaPO<sub>4</sub>-Transfektion

CaCl <sub>2</sub> 0,25M	500µl
2xHEBS	500µl
DNA (Plasmid)	Circa 5-10µg

Tabelle 24: CaPO<sub>4</sub>-Transfektionslösung

Für die Transfektion einer 10cm Zellkulturschale mit 10ml Medium werden 1ml Reaktionslösung gebraucht. Die Zellen sollten dafür möglichst vereinzelt, in der Zellkulturschale verteilt, wachsen. Die Kalziumchloridlösung wird mit der DNA in ein 1,5ml Reaktionsgefäß pipettiert und unter Durchmischung auf dem Vortexmischer tröpfchenweise mit dem HEBS-Puffer vermischt. Die Lösung wird gleichmäßig auf den Zellen in der Zellkulturschale verteilt und nach 6-8h durch neues Medium ausgetauscht.

#### 3.2.4.2. Transfektion mit Lipofectamine 2000 DNA Transfection Reagent

Opti-MEM	2x 150µl
Lipofectamine 2000 Transfection reagent	10µl
DNA (Plasmid)	2ng

Tabelle 25: Transfektion mit Lipofectamine 2000 DNA Transfection Reagent

Die Zellen sollen dafür mit einer Konfluenz von circa. 70-90% vorbereitet werden. Für ein Well einer 6-Well Zellkulturplatte werden in 2 separaten 1,5ml Reaktionsgefäßen in je 150µl Opti-

MEM Medium zum einen 10 $\mu$ l des *Lipofectamine 2000 Transfection reagent* und zum anderen 2ng des gewünschten Plasmids hinzugegeben. Beide Lösungen werden durch 10x Pipettieren vorbereitet und anschließend erneut durch 10x Pipettieren miteinander vermischt. Nach 5 min Inkubationszeit wird die Lösung vorsichtig auf die Zellen getropft. Ein Medienwechsel ist nicht nötig und die Inkubationszeit beträgt ein bis drei Tage.

### 3.2.4.3. Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX für siRNA

Opti-MEM	2x 200 $\mu$ l
Lipofectamine RNAiMAX	7 $\mu$ l
20 $\mu$ M-Stammlösung siRNA	2,4 $\mu$ l

Tabelle 26: Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX für siRNA

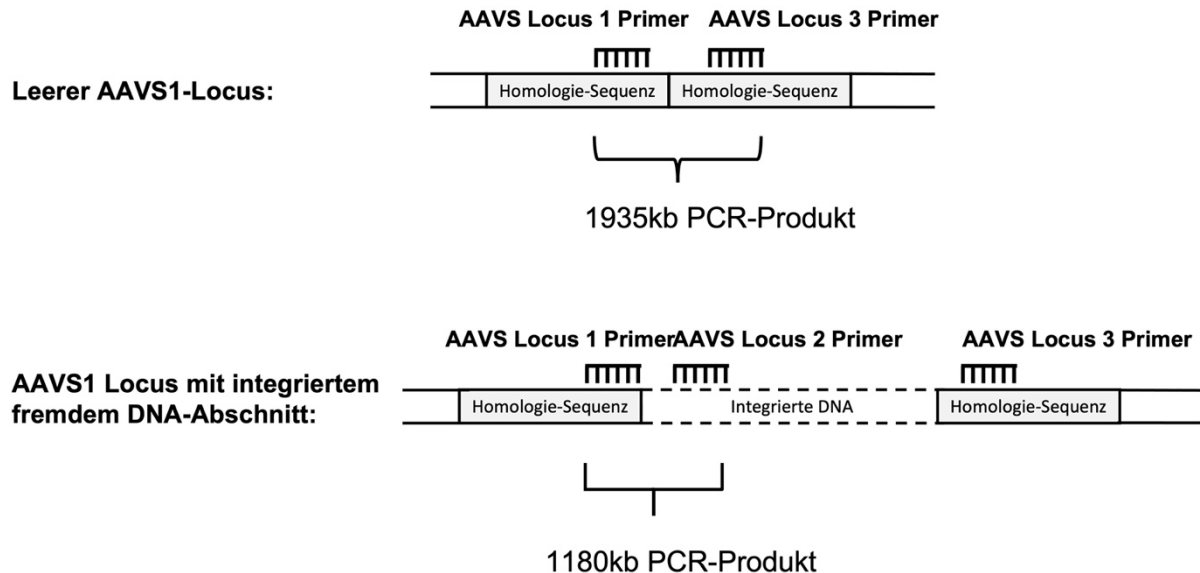
Um siRNA für einen Knock-down in die gewünschten Zellen einzubringen, sollen die Zellen bei einer Konfluenz von circa 60% vorliegen. In 2 Reaktionsgefäßen werden zum einen 7 $\mu$ l des *Lipofectamine RNAiMAX* mit 200 $\mu$ l *Opti-MEM* Medium und zum anderen 200 $\mu$ l *Opti-MEM* Medium mit 2,4 $\mu$ l einer 20 $\mu$ M-Stammlösung siRNA zuerst separat vermischt und anschließend zusammen in ein Gefäß pipettiert. Nach 20 min Inkubation wird die Lösung sehr vorsichtig auf die Zellen getropft. Nach 1-3 Tagen ist die höchste Effizienz zu erreichen.

### 3.2.5. Generierung einer transgenen Zelllinie unter Verwendung von Zinkfinger-Nukleasen (TALEN)

Mit Hilfe der stabilen Integration ist es möglich eine Sequenz in das Genom der gewünschten Zelle einzubringen und fortlaufend exprimieren zu lassen. Die Integration erfolgt bei humanen Zellen in den *AAVS1*-locus. Dafür werden Plasmide für die Expression von 2 Nucleasen (TALEN=Transcription activator-like effector nucleases) gebraucht, die an kodierter Stelle im Genom einen Doppelstrangbruch induzieren<sup>119</sup>. An dieser Stelle wird nachfolgend die kodierende Sequenz für ein N-terminales eGFP-Fusionsprotein mit PPAN aus einem weiteren Plasmid mittels homology directed repair (HDR) eingefügt<sup>113,120</sup>.

Um eine Integration in einer gewünschten Zelle durch diese Methode zu erreichen, wurde mit Hilfe von transienter Transfektion (siehe 3.2.4.1. und 3.2.4.2.) in einer Kammer der 6-Well Zellkulturplatte 1 $\mu$ g des AAV-CAGGS-eGFP-PPAN Plasmids und je 0,25 $\mu$ g der für den linken und rechten Arm der TALEN kodierenden Plasmide transfiziert. Auf Basis der vorhandenen Puromycinresistenzkassette in der zu integrierenden DNA wird durch Zugabe von Puromycin zum Nährmedium in einer Konzentration von 2 $\mu$ g Puromycin/ml Medium bei HEK293T-Zellen und HKC-8 Zellen eine Selektion der erfolgreichen Integrationen durchgeführt.

Während die Detektion von GFP-Signal unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ein Hinweis für die gelungene Transfektion ist, ist die Integrations-PCR ein Nachweis darüber, ob der AAVS1-locus leer ist oder eine Integration vorliegt (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der Integrations-PCR.**

Bei leerem AAVS1-Lokus definieren die Primer AAVS Locus 1 und AAVS Locus 3 auf den Homologie-Sequenzen ein 1935bp langes PCR-Produkt. Die Primer AAVS Locus 1 und AAVS Locus 2 definieren ein 1180bp Produkt, das bei Integration entsteht. AAVS Locus 2 setzt dabei im integrierten DNA-Abschnitt an. Wenn nach einer Integrations-PCR an einer Zelllinie beide PCR-Produkte nachgewiesen werden können, ist von einer Heterozygotie bezüglich der Integration auszugehen.

### 3.2.6. Quantifizierung zellulärer RNA-Menge

Zur Quantifizierung von RNA in Zellen wurde eine quantitative PCR nach reverser Transkription von RNA in cDNA durchgeführt.

#### 3.2.6.1. RNA-Extraktion

Zur Isolierung der RNA aus mit einem Schaber geernteten Zellen aus einem Well einer 6-Well-Zellkulturplatte wurde das *Direct-zol™ RNA MiniPrep-kit* (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet. Nach der Eluierung der RNA mit Wasser wird die RNA im NanoDrop quantifiziert. Durch Gelelektrophorese wird die Qualität der RNA geprüft, indem das Vorhandensein und die Bandenstärke der 18S und 28S rRNA-Banden visuell geprüft und damit die Degradation der RNA beurteilt wird. Es werden nur Proben weiterverwendet, die keine Anzeichen sichtbarer Degradation tragen.

#### 3.2.6.2. Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte durch die Methode der RT-PCR mit zufälligen Hexamerkombinationen als Primer und einer Reversen Transcriptase mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) und maximal 1µg RNA pro Ansatz nach Herstellerprotokoll.

### 3.2.6.3. Extraktion genomischer DNA

Für die qPCR ist auch genomische DNA notwendig, um an ihr die Spezifität der qPCR-Primer für die gewünschte DNA zu testen. Für die Extraktion der gesamten DNA einer Zelle ist es nötig das Zellmaterial im 1:1 Verhältnis mit einer Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamyl Alkohol (25:24:1) zu vermischen. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei Raumtemperatur bei 16000G wird die wässrige Phase in ein anderes Reaktionsgefäß übertragen. Für die Präzipitation mit Ethanol wird 1/10 des Volumens in Form von NaOAc pH 5,2 und ein 2,5-faches an Volumen 100% Ethanols hinzugefügt. Zur Ausfällung werden 1 h bei -80°C oder eine Nacht bei -20°C benötigt. Im nächsten Schritt wird das Reaktionsgefäß bei 16000G bei 4°C 30min lang zentrifugiert, sodass die ausgefallene DNA pelletiert wird. Das Pellet wird nach Abnahme des Überstands mit 70% Ethanol gewaschen und danach erneut bei 16000G 2 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet muss bei Raumluft getrocknet werden, um das restliche Ethanol zu entfernen. Gelöst wird die DNA anschließend mit Wasser.

### 3.2.6.4. qPCR

Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird die umgeschriebene cDNA mit zusätzlicher Zugabe vom interkalierendem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green amplifiziert. Die verwendeten Primer werden dabei so ausgewählt, dass sie spezifisch einen Teil des gewünschten Bereiches amplifizieren und bei Anwendung von SYBR® Green maximal 300 Basenpaare betragen<sup>121</sup>. Es wird dabei bevorzugt ein Abschnitt genommen, der zwei aneinander grenzende Exons umgibt, um die Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden<sup>121</sup>. Ob eine Amplifikation genomischer DNA durch das gewählte Primerpärchen eintritt, wird auf genomischer DNA getestet.

Um die Effizienz der PCR zu berechnen, werden verschiedene Konzentrationen der cDNA amplifiziert (50ng-0,5ng-0,05ng). Die Effizienz sollte im Idealfall bei 100% liegen, was einer Verdopplung der DNA pro PCR-Zyklus gleichkäme. Eine Schwankung der Effizienz zwischen 90-110% wird akzeptiert. In der Dissoziationskurve des PCR-Produkts sollte nur ein Produkt bei der erwarteten Schmelztemperatur detektiert werden, um die Spezifität der ausgewählten Primer zu belegen<sup>121</sup>. Der Ansatz für die qPCR wird aus dem *Power SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), den ausgewählten Primern (100 µM im Verhältnis 1:1 Vorwärts- und Rückwärtsprimer) und 1µl cDNA in gewünschter Konzentration hergestellt. Es wird ein Reaktionsvolumen von 25µl/pro Well der 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die qPCR wird bei jedem Durchlauf auch mit Primern für β-Aktin (ACTB) und Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) durchgeführt, da die Expression dieser Gene als vergleichsweise stabil gilt<sup>122</sup>. Die Expressionslevels der zu untersuchenden Gene werden nachfolgend auf die Expression der Referenzgene normalisiert und der Mengenunterschied in

den Untersuchungsproben von dem Zyklus der Detektionsgrenze abgeleitet. Dafür wird die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode verwendet<sup>121</sup>.

### 3.2.7. Nachweis von Proteinen aus Zelllysaten

#### 3.2.7.1. Western Blot

Zellernte und Aufbereitung der Proben:

PBS	1ml
iClip Lysis Buffer	500µl
2x Lämmli-Puffer+DTT	Ca. 500µl

*Tabelle 27: Reagenzien zur Zellaufbereitung für Western Blot*

Zur Herstellung von Zelllysaten werden die Zellen aus einem nahezu konfluenten Well einer 6-Well-Zellkulturplatte mit PBS-Puffer abgewaschen, mit einem Schaber von der Zellkulturschale gelöst, in 1ml PBS-Puffer (4°C) resuspendiert und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß 5 min bei 20817G zentrifugiert. Nach Absaugung des PBS-Überstandes wird 500µl iClip Lysis Buffer dazugegeben und das Pellet resuspendiert. Wenn das gesuchte Protein in intrazellulären Kompartimenten wie dem Zellkern lokalisiert ist kann eine Homogenisierung mittels Ultraschall zwischengeschaltet werden. Dieser Schritt besteht aus 5 Zyklen à 30 s mit anschließenden 30 sekundigen Ruhephasen im Sonicator Bioruptor Pico®. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 20817G, die die Zelltrümmer aus der Suspension pelletieren soll, wird der Überstand mit 2x Lämmli-Puffer+DTT zu gleichen Teilen vermischt und 5 min bei 95°C erhitzt.

Gel-Elektrophorese:

Für eine Gel-Kassette wird zuerst für das Trenngel eine Mischung aus 50% Puffer A, dem gewünschten Anteil Acrylamid, 1%APS und 0,15% TEMED und ddH<sub>2</sub>O (siehe Tabelle 28) in die leere Gel-Kassette gegeben und während des Polymerisierens von 2-Propanol bedeckt.

Puffer A	10ml
Acrylamid	je nach Proteingröße zwischen 8 und 15%
APS	200µl
TEMED	30µl
ddH <sub>2</sub> O	auf 20,23ml

*Tabelle 28: Trenngel*

Wenn das Gel fest ist, wird das 2-Propanol entfernt und das Sammelgel aus 50% Puffer B, 5% Rotiphorese Gel, 1%APS und 0,15% TEMED und ddH<sub>2</sub>O (siehe Tabelle 29) im selben

Verfahren auf das Trenngel in der Kassette gegossen und durch einen Kamm mit Aussparungen versehen.

Puffer B	2,5ml
Acrylamid	0,6ml
APS	50 $\mu$ l
TEMED	7,5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	auf 5,06ml

*Tabelle 29: Sammelgel*

Die Proteine werden im feinporigen Polyacrylamid-Gel ihrer Größe nach aufgetrennt, indem elektrische Spannung (80V für 20 min + 200V für 50 min) angelegt wird. In jeder Gelkassette wird in einem Well eine Mischung farbig markierter Proteine mit bekannten Längen ebenfalls aufgetragen (*PageRuler Plus™ Prestained Protein Ladder*).

#### Blotting und Visualisierung durch Antikörperbindung:

Um die gewünschten Proteine nun mit einem spezifischen Antikörper detektieren zu können, werden die Proteine aus dem Gel auf eine Membran (PVDF) übertragen. Dafür wird auf die mit Methanol aktivierte Membran das Gel mit den aufgetrennten Proteinen gelegt und zwischen 2 Filterpapieren in der Transferkammer zusammengepresst. Angefeuchtet mit Transferpuffer wird durch elektrische Spannung der Übertritt der negativ geladenen Proteine auf die Membran gewährleistet (12V 60 min). Die unspezifischen Proteinbindungsstellen der PVDF-Membran werden mit 5% BSA-Lösung in Waschpuffer blockiert (1 h bei RT). Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je 3 min, kann der Primärantikörper im Waschpuffer auf die Membran gegeben werden und auf einem Rollenmischer 1 h bei RT oder bei 4° über Nacht inkubiert werden. Nach erneutem viermaligem Waschen à 5 min im Waschpuffer wird der sekundäre Antikörper, dessen Fab-Fragment gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, im Waschpuffer zur Membran gegeben. Der Sekundärantikörper wird für 1h bei RT inkubiert. Nachfolgend wird die Membran mit ECL-Lösung bedeckt und die Fluoreszenz im **Chemolumineszenz-Imager** gemessen.

#### **3.2.8. Immunfluoreszenzfärbungen**

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Zellen werden die Zellen auf Deckgläschen passagiert, die vorher mit Kollagen beschichtet werden. Dafür müssen die in der 12-oder 24-Well-Zellkulturplatte steril verteilten Deckgläschen mit Collagen I (verdünnt auf 50 $\mu$ g/ml in 20mM Essigsäure) bedeckt, für mindestens 30 min bei 37°C inkubiert und nach Absaugung der Kollagenlösung getrocknet werden. Wenn die Zellen die gewünschte Konfluenz erreicht haben, wird das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS vorsichtig gespült.



Anschließend wird eine 4% PFA-Lösung für 10-15 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Proben mit PBS<sup>+</sup>-Puffer werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen mit 5%igem Esel-Serum in PBST-Puffer für 1h bei RT geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Proben mit PBST-Puffer wird der primäre Antikörper in entsprechender Verdünnung für 1-2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf die Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Proben à 5-15min mit PBS<sup>+</sup>-Puffer, wird die Lösung auf den Deckgläschen gegen eine Verdünnung mit dem sekundären Antikörper ausgetauscht und erneut 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend werden durch drei Waschschrte à 5-15min mit PBS<sup>+</sup>-Puffer ungebundene Antikörper entfernt. Das Deckgläschen wird in destilliertes Wasser getaucht und mit 8-10µl Eindeckmedium mit DAPI (ProLong™ Diamond) auf einem Objektträger fixiert. Nach Trocknung über Nacht kann das Präparat unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden. Hierfür werden die Objekte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 mit ApoTome 1 mit einer Vergrößerung von 63X, 40X und 20X mikroskopiert. Zur Anregung der Fluorophore wird der jeweilige Kanal (DAPI, GFP und Cy3) im Gerät je nach Fluorophor am Sekundärantikörper ausgewählt und die Belichtungszeit für die einzelnen Antikörper und Proben gleich gehalten. Die Verarbeitung der Bilder erfolgte mit Hilfe des Programms Zen (blue edition).

### **3.2.9. Statistische Analysen**

Statistische Auswertungen der Messergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Prism generiert. Zur statistischen Analyse von Unterschieden in Mittelwerten in Bezug zu einem Faktor wurde bei 2 Vergleichsgruppen der *t-test*, bei 2 Vergleichsgruppen die mehrfach unter verschiedenen Konditionen verglichen werden sollten der *multiple t-test* und ab 3 Vergleichsgruppen der *One-way ANOVA* verwendet. Wenn der Mittelwert in Bezug auf 2 unabhängige Faktoren gleichzeitig untersucht werden sollte, dann wurde der *two-way ANOVA* verwendet. Wenn in den ANOVA-Analysen eine statistisch signifikante Abweichung eines Mittelwerts ermittelt wurde, war es notwendig mit Hilfe des *Tukey's multiple comparison test* zu analysieren, welcher Mittelwert im Einzelnen von welchem abweicht.

## 4. Ergebnisse

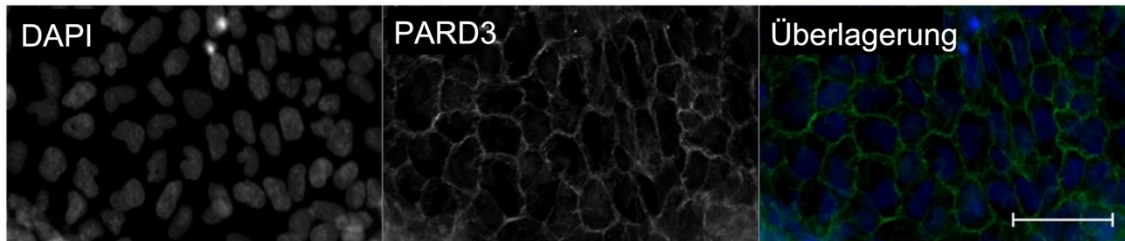
Ziel dieser Arbeit war es ein Zellkulturmodell aufzustellen, an dem molekulare Mechanismen der Präkonditionierung weiter erforscht werden können. Das Modell sollte ein Schädigungsmodell beinhalten, welches die zellulären Mechanismen bei akuter Nierenschädigung imitiert und ein vorgeschaltetes Protokoll zur Präkonditionierung durch Hypoxie oder Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren enthält. Dafür wurde zuerst eine repräsentative Zelllinie für die Niere ausgewählt und ein Schädigungsmodell mit Cisplatin erarbeitet, da Cisplatin häufig akutes Nierenversagen im Menschen herbeiführt<sup>123</sup> und in Zellkultur gut untersuchbar ist. Für die Präkonditionierung wurden verschiedene Zeitintervalle der Hypoxie oder spezielle Zellkulturmedien getestet. Nachfolgend wurde die Bedeutsamkeit der RBPs PPAN und MEX3C für das Zellüberleben nach Cisplatinerschädigung und für die Präkonditionierung weiter beleuchtet. Durch ihre RNA-Bindungseigenschaft und Regulation im Zusammenhang mit Apoptose, Autophagie, Ischämie und Energiestoffwechsel erscheint es besonders sinnvoll, die Proteine auf Regulation im Hinblick auf akute Nierenzellschädigung und Präkonditionierung im Zellkulturmodell zu untersuchen.

### 4.1. Auswahl einer immortalisierten Nierenzelllinie für das Zellkulturmodell

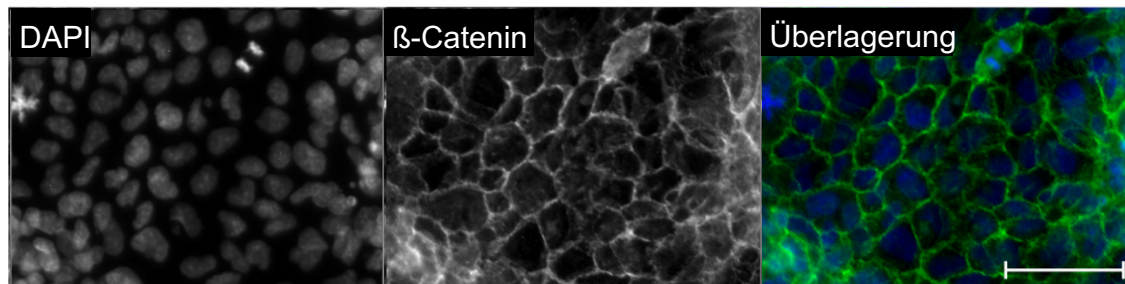
Für das Zellkulturmodell einer Nierenschädigung wurde die Zelllinie HKC-8 aus dem proximalen Tubulus von humanen Nieren ausgewählt<sup>95</sup>. Zur Komplettierung der bisherigen bekannten Charakterisierung wurden Eigenschaften der Zelllinie in ausdifferenziertem Zustand untersucht<sup>95</sup>.

Partitioning defective 3 homolog (PARD3) ist in Epithelien grundlegend an der Zellpolarität und an der Bildung von Tight Junctions beteiligt<sup>124</sup>. In der Immunfluoreszenzfärbung konnte PARD3 in differenzierten HKC-8-Zellen in der gesamten Zellmembran angefärbt werden (Abbildung 7A).  $\beta$ -Catenin ist ein Bestandteil von Zonulae Adhaerens, der in HKC-8-Zellen bereits an der Zellmembran nachgewiesen wurde<sup>125</sup> und erfolgreich reproduziert werden konnte (Abbildung 7B).

**A**



**B**



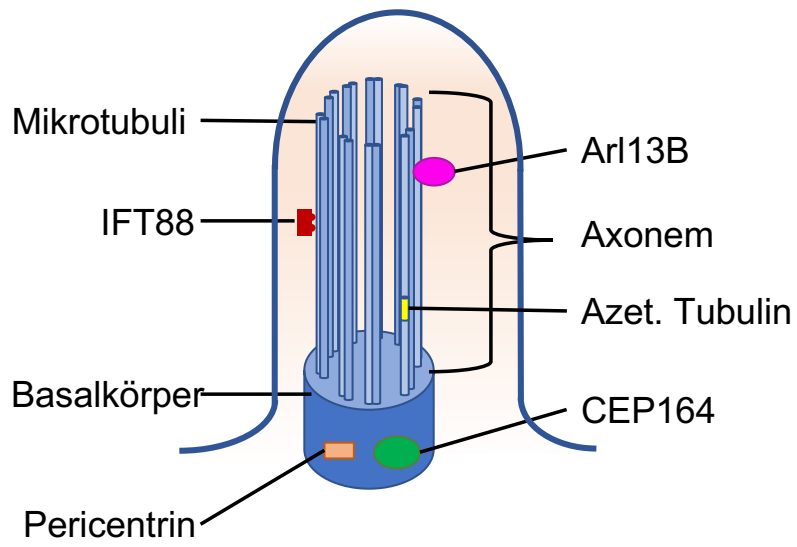
**Abbildung 7: HKC-8-Zellen bilden Marker für Zell-Zellkontakte aus.**

(A) Immunfluoreszenzfärbung mit einem Primärantikörper gegen PARD3 und Alexa488-Anti-Kaninchen als Sekundärantikörper auf ausdifferenzierten HKC-8-Zellen. N=1 biologische Replikate. (B) Immunfluoreszenzfärbung mit einem Primärantikörper gegen  $\beta$ -Catenin und Alexa488-Anti-Maus als Sekundärantikörper auf ausdifferenzierten HKC-8-Zellen. N=1 biologische Replikate. Die Maßstabsleisten entsprechen 50 $\mu$ m.

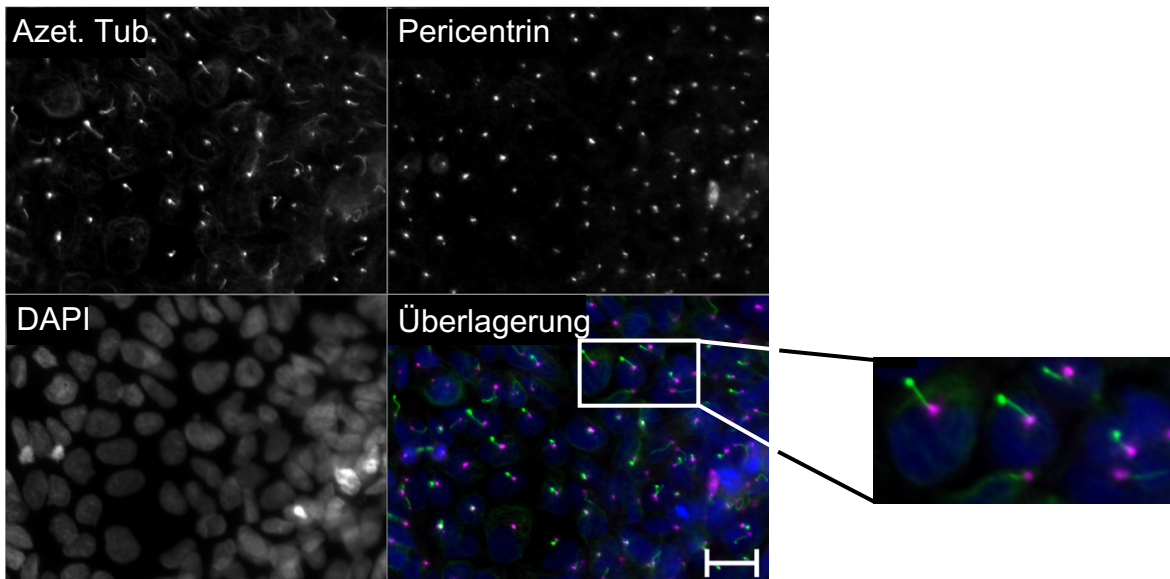
Primärzilien fungieren als Sensor extrazellulärer Bedingungen und können nach Reizung essenzielle Signalwege zur Steuerung von Entwicklung, Polarisierung und Funktion der entsprechenden Organe initiieren<sup>126</sup>. Ein einzelnes Primärzilium wird dabei jeweils von nahezu jeder Zelle, auch von proximalen Tubuluszellen<sup>127</sup>, exprimiert und bei Mitose abgebaut<sup>128</sup>.

Spezifische Zilienmarker (Pericentrin, azetyliertes Tubulin und ADP-ribosylation factor-like protein 13B (ARL13b)) wurden in ausdifferenzierten HKC-8 Zellen angefärbt. Acetyliertes Tubulin ist unter anderem Bestandteil von Mikrotubuli im Axonem von Primärzilien<sup>115,129</sup> (Abbildung 8A), Pericentrin befindet sich im Basalkörper des Primärziliums<sup>130</sup> und ARL13b ist eine GTPase, die in Zilien am Axonem lokalisiert ist und auch Transportfunktionen für Proteine in die Zilie hat<sup>131</sup>. In Abbildung 8B und 8C wird sichtbar, dass die Proteine ARL13b und azetyliertes Tubulin aneinandergereiht als dünne Linien sichtbar werden und Pericentrin am Ende eines jeden Axonems lokalisiert ist.

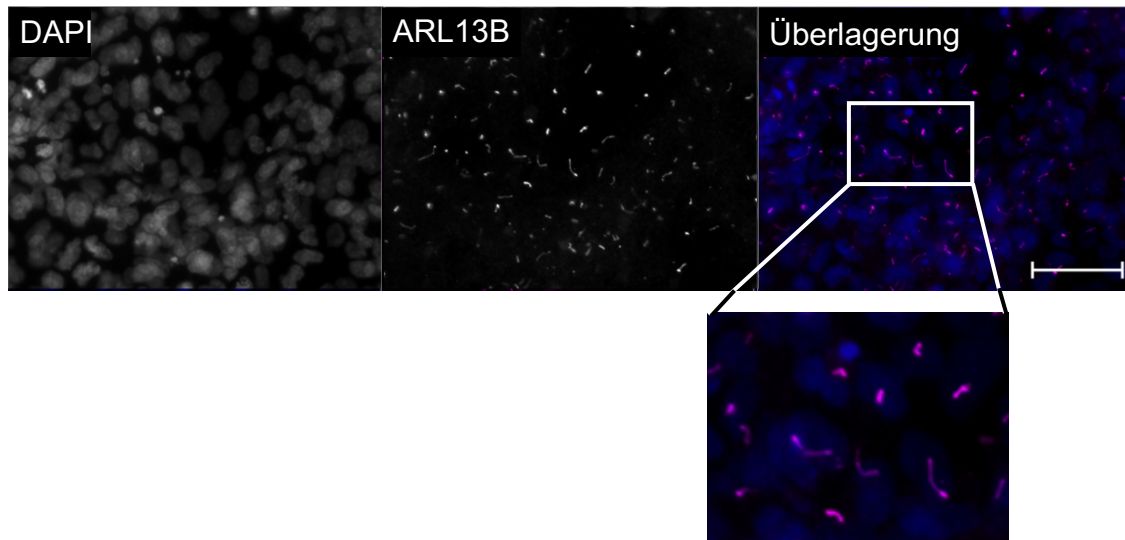
**A**



**B**



C



**Abbildung 8: HKC-8-Zellen bilden Zilien aus.**

(A) Schematische Darstellung eines Primärziliums und einiger assoziierter Proteine. Das Primärzilium ist eine Ausstülpung der Zellmembran gestützt durch ein Cytoskelett, das aus einem Axonem aus 9 Mikrotubuli-Paaren verbunden mit einem Basalkörper besteht<sup>126</sup>. Die Proteine Pericentrin und Centrosomal protein of 164 kDa (CEP164) sind im Aufbau der Basis des Ziliums beteiligt, während Tubulin das Grundgerüst der Mikrotubuli bildet<sup>115,130,131</sup>. ADP-ribosylation factor-like protein 13B (Arl13b) und Intraflagellar transport protein 88 homolog (IFT88) sind Proteine, welche für die Transportvorgänge entlang des Cytoskeletts bedeutsam sind<sup>131,132</sup>. (B) Immunfluoreszenzfärbung ausdifferenzierter HKC-8-Zellen mit Primärantikörpern gegen azetyliertes Tubulin und Pericentrin und mit den Sekundärantikörpern Alexa488-Anti-Maus und Cy3-Anti-Kaninchen. N=3 biologische Replikate. Die Maßstabsleiste entspricht 20µm. (C) Immunfluoreszenzfärbung von ausdifferenzierten HKC-8-Zellen mit Antikörper gegen ARL13b und Cy3-Anti-Kaninchen als Sekundärantikörper. N=1 biologische Replikate. Die Maßstabsleiste entspricht 50µm.

Allerdings konnten auf denselben Zellen zwei weitere bekannte ziliäre Proteine (Intraflagellar transport protein 88 homolog (IFT88) und Centrosomal protein of 164 kDa (CEP164)) nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die HKC-8 Zellen Differenzierungsmerkmale exprimieren.

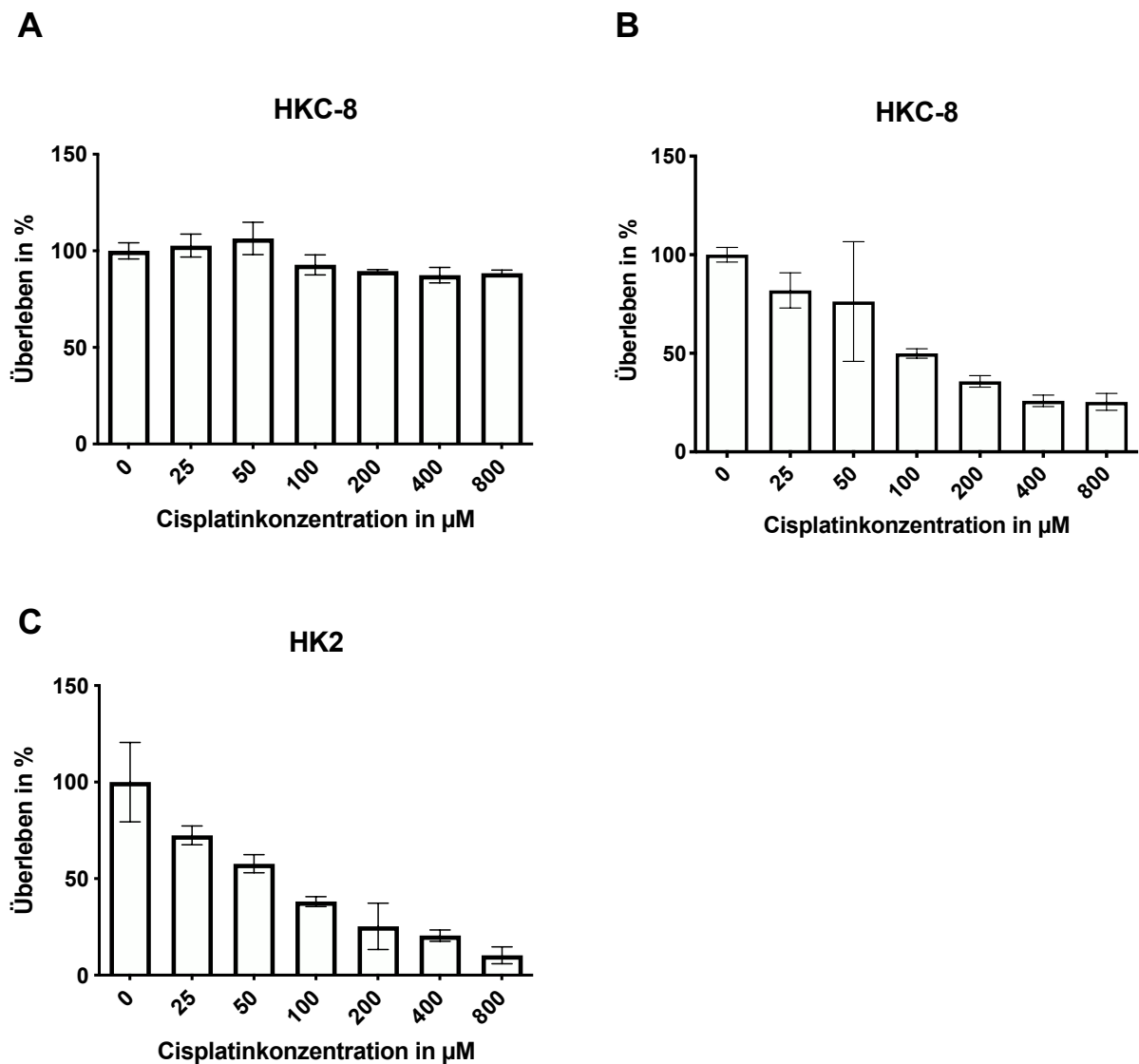
## 4.2. Modelle der akuten Nierenschädigung in der Zellkultur

### 4.2.1. Etablierung des Cisplatin-Schädigungsmodells

Mit den humanen HKC-8-Zellen wurde ein Zellkulturmodell der akuten Nierenschädigung aufgebaut. Hierfür wurde das Modell der Cisplatin-induzierten Nierenschädigung, dass sowohl in Nagetieren<sup>133,134</sup>, wie auch in Zellkultur<sup>135</sup> durchgeführt wird, als Vorlage verwendet und die genauen Konditionen für die Zellkultur erarbeitet. Das Überleben wurde anhand der Metabolisierung des Indikators (XTT oder Resazurin) gemessen.

Zur Sondierung der notwendigen Zeitspanne für die Behandlung mit Cisplatin erfolgte zuerst ein Versuch mit 8h Behandlungsdauer (Abbildung 9A). Da hierbei kein Unterschied im Zellüberleben zwischen den einzelnen Konzentrationen zu erkennen war, wurde mit einer

Expositionsdauer von 24h fortgefahren. Hier zeigte sich ein reproduzierbarer Dosis-Wirkungseffekt (Abbildung 9B). Eine Verlängerung der Anwendung auf 48h konnte den Anteil lebendiger Zellen nicht stärker reduzieren (nicht gezeigt). Der Vergleich zwischen der etablierten HK2-Zelllinie und der HKC-8-Zelllinie zeigte nach einmaliger Versuchsdurchführung eine ähnliche Dosis-Wirkungsbeziehung nach 24h Cisplatinexposition (Abbildung 9C).



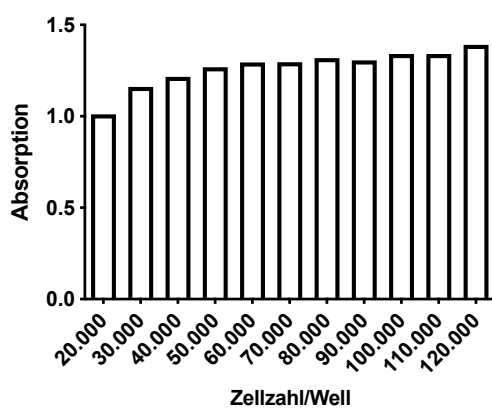
**Abbildung 9: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Cisplatin und den Zelllinien HKC-8 und HK2.**

(A) Messung des Zellüberlebens von HKC-8-Zellen nach 8 h Cisplatinexposition (XTT). N=1 biologische Replikate. Standardabweichung von N=4 technischen Replikaten angezeigt. (B) Messung des Zellüberlebens von HKC-8-Zellen nach 24h Cisplatinexposition (XTT). Abbildung repräsentativ für N=3 biologische Replikate. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von N=5 technischen Replikaten bei einem repräsentativen Versuch an. (C) Messung des Zellüberlebens von HK2-Zellen nach 24 h Cisplatinexposition (XTT). N=1 biologische Replikate. Die Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung von N=5 technischen Replikaten an.

Als nächstes wurde die Cisplatinkonzentration ausgewählt, die notwendig ist, um das Überleben um circa 50% zu reduzieren (LD50). Ausgehend von den Ergebnissen in Abbildung 9 wurden für das Schädigungsmodell die Konzentrationen 50µM und 100µM Cisplatin ausgewählt.

Während der Durchführung der oben genannten Versuche fielen ab Konzentrationen von 400µM Cisplatin optische Veränderungen der Zellkerne auf. Sie waren stärker kontrastiert und verkleinert, ähnlich wie die Veränderungen, die bei Kernpyknose auftreten. Bei diesen Cisplatinkonzentrationen war auch die Ablösung der Zellen durch Trypsin kaum mehr möglich.

Um durch das Zellkulturmodell eine möglichst hohe Annäherung an den Schädigungsmechanismus in akuten Nierenschädigungen zu erreichen, wurde angestrebt, dass sich die HKC-8-Zellen zum Zeitpunkt der Schädigung in einem differenzierten Zustand befinden. Differenzierung wird durch eine volle Konfluenz und Serumentzug erreicht (siehe Protokoll 3.2.1.3.) und führt zu einer hohen Zelldichte. Laut Herstellerangaben besteht bei Verwendung der Reagenzien XTT oder Resazurin bei hohen Zellzahlen keine Linearität mehr zum Überleben. Daher konnte die Messung der Schädigung mit XTT oder Resazurin auf konfluenten Zellen mit konsekutiv höheren Zellzahlen als in den Experimenten zu Abbildung 9 nicht durchgeführt werden. Eine einmalige Prüfung der Herstellerangabe zeigte bei hohen Zellzahlen ( $\geq 50.000/\text{Well}$ ) wie erwartet eine Sättigung der XTT-Metabolisierung (Abbildung 10). Daher wurde mit einer Zellzahl von 10.000/Well fortgefahren.



**Abbildung 10: Messung des Zellüberlebens mit XTT bei hohen Zellzahlen.**

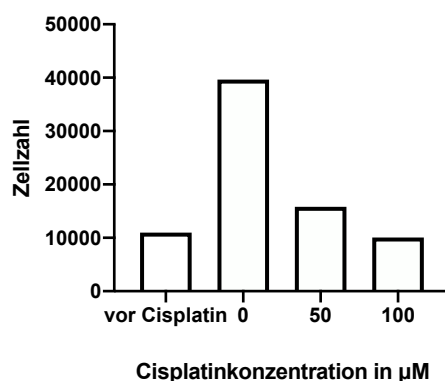
Messung des Zellüberlebens (XTT) bei hohen Zellzahlen (HKC-8). Angegebene Zellzahlen beziehen sich auf den Zeitpunkt des Passagierens. N=1 biologische Replikate.

Zusammengefasst wurden folgende ermittelte Konditionen für das Schädigungsmodell ausgewählt: 10.000 Zellen/Well werden für 24h mit 50µM oder 100µM Cisplatin inkubiert und das Überleben im Anschluss gemessen. Das Protokoll zur Ausdifferenzierung durch Konfluenz und Serumentzug wurde nicht durchgeführt, da bei hoher Zellzahl/Well bei der gewählten Messmethode keine Linearität mehr vorliegt.

#### 4.2.2. Cisplatin bewirkt Apoptose und Proliferationshemmung in HKC-8-Zellen

Cisplatin kann im beschriebenen Modell den Zelltod induzieren, könnte den Effekt auf die Anzahl überlebender Zellen aber auch durch eine Proliferationshemmung erwirken. Aus diesem Grund wurden sowohl zelluläre Proliferation als auch Apoptose nach Cisplatin-Behandlung zusätzlich separat untersucht.

Für die Feststellung der Proliferationshemmung wurden zum einen die Zellzahlen vor und nach Cisplatineinwirkung bestimmt. Dabei ist in Abbildung 11 zu sehen, dass die Zellzahlen vor Versuchsstart und nach Behandlung mit 50 $\mu$ M und 100 $\mu$ M Cisplatin annähernd gleichblieben. In der Kontrollgruppe ohne Cisplatineinwirkung vervierfachte sich die Zellzahl innerhalb der Versuchsdauer von 24h. Die Ausführung, bei der zum Zeitpunkt des Experimentstarts mit 10.000 Zellen/Well im 96well begonnen wurde, liegt in N=1 Versuchsdurchführungen vor. Eine weitere Versuchsdurchführung mit höherer Zellzahl zu Beginn des Experimentes zeigt ähnliche Relationen der Zellzahlen zueinander unter den verschiedenen Konditionen (Daten nicht gezeigt).

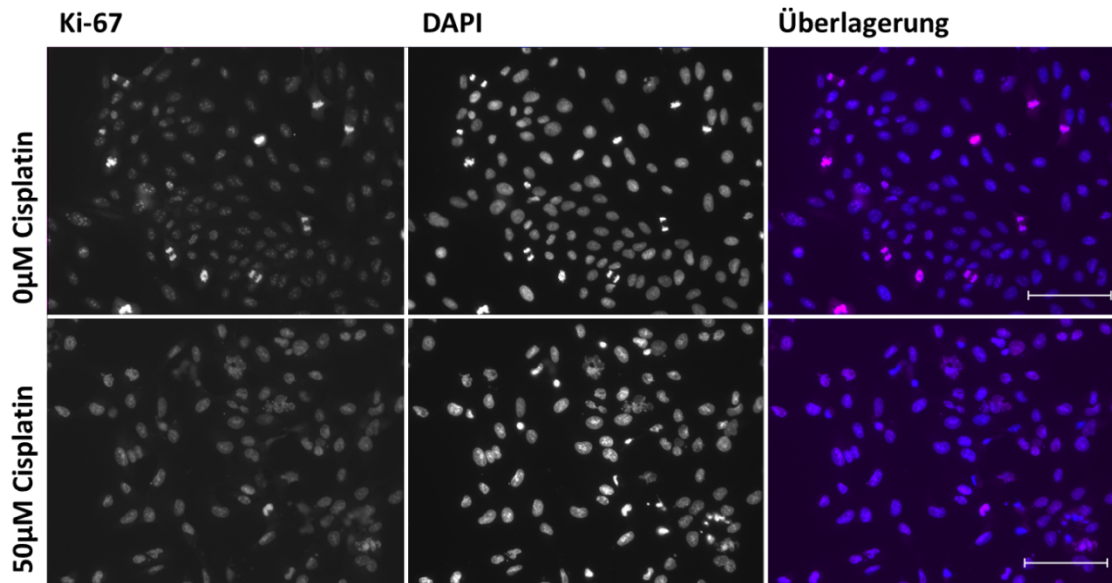


**Abbildung 11: Zellzahlen vor und nach Cisplatinexposition.**

*HKC-8-Zellen wurden zum Zeitpunkt des Experimentstarts und nach 24h Cisplatinexposition in den aufgetragenen Konzentrationen gezählt. N=1 biologische Replikate.*

Zur weiteren Untersuchung der Proliferationshemmung wurde der Proliferationsmarker Ki-67<sup>136</sup> in einer Immunfluoreszenzfärbung in den HKC-8-Zellen untersucht. Dieser Marker war bei Cisplatinexposition (50 $\mu$ M) im Vergleich zur Kontrolle deutlich vermindert (Abbildung 12). Während es bei der Kontrollgruppe einige Ki67-positive-Zellen gab, die sich bei genauerem betrachten der DAPI-Färbungen in der Mitose befanden, waren bereits bei 50 $\mu$ M Cisplatin kaum mehr Ki-67-positive Zellen zu finden. In einer Quantifizierung der Ki-67-positiven-Zellen von über 1000 Zellen ergab sich ein Prozentsatz von 3,21% ki67-positiven Zellen unter Kontrollbedingungen und 0,25% nach Cisplatinbehandlung (Daten nicht gezeigt).

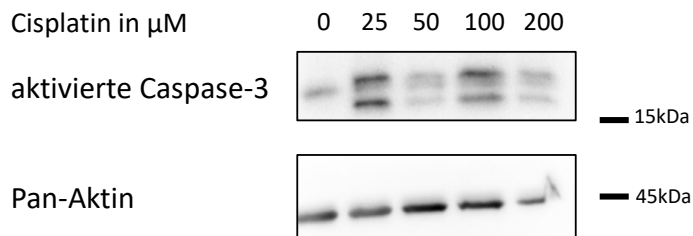




**Abbildung 12: Cisplatin verringert Expression des Proliferationsmarkers Ki-67.**  
 Immunfluoreszenzfärbung von HKC-8-Zellen mit Ki-67-Antikörpern und Cy3-Anti-Kaninchen als Sekundärantikörper nach 24 h Cisplatinwirkung. Die Maßstabsleiste entspricht 100 μm. Belichtungszeiten im Cy3-Kanal sind gleich lang. N=2 biologische Replikate

Zum Nachweis von Apoptose wurde aktivierte Caspase-3 als Effektorcaspase<sup>137,138</sup> im Signalweg der Apoptose nach Cisplatinbehandlung durch Western Blots detektiert. Dabei konnte man beobachten (Abbildung 13), dass alle verwendeten Cisplatinkonzentrationen in HKC-8-Zellen zu einem positiven Nachweis der Apoptosemarker führten. Die Proben, die Zellen mit Cisplatinexposition enthalten, weisen im Western Blot zwei neue Banden auf, welche die aktivierte Caspase-3 bei 17kDa und 19kDa abbilden<sup>139</sup>. Die Bande, die auch in Proben mit und ohne Cisplatinexposition nachweisbar ist sowie größere detektierte Banden (s. 7.3.1.), können hier nicht näher zugeordnet werden, sind laut Datenblatt des Antikörpers jedoch vorbekannt.

Eine konzentrationsabhängige Steigerung der Caspase-3-Menge ließ sich nicht ableiten.



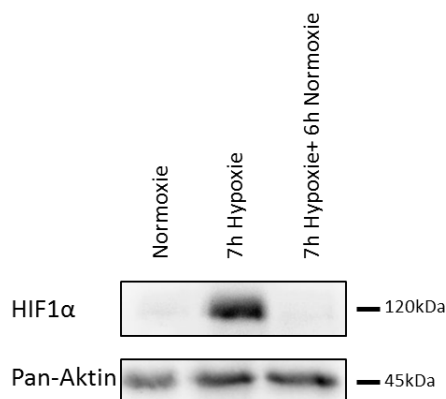
**Abbildung 13: Aktivierte Caspase-3 durch Cisplatin.**  
 Western Blot von HKC-8-Zellen nach 24h Cisplatinexposition mit angegebenen Konzentrationen. Antikörpern gegen aktivierte Caspase-3 und Pan-Aktin zur Ladungskontrolle. Die Abbildung ist repräsentativ für N=3 biologische Replikate. Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Original Western Blots im Anhang (s. 7.3.1.).

Zusammengefasst induziert Cisplatin in HKC-8-Zellen eine Aktivierung der Caspase-3, wobei eine Quantifizierung der Zellschädigung bei steigenden Cisplatinkonzentrationen im Western Blot nicht gelingt.

### 4.3. Hypoxische Präkonditionierung

#### 4.3.1. Testung hypoxischer Präkonditionierung im Cisplatin-Schädigungsmodell

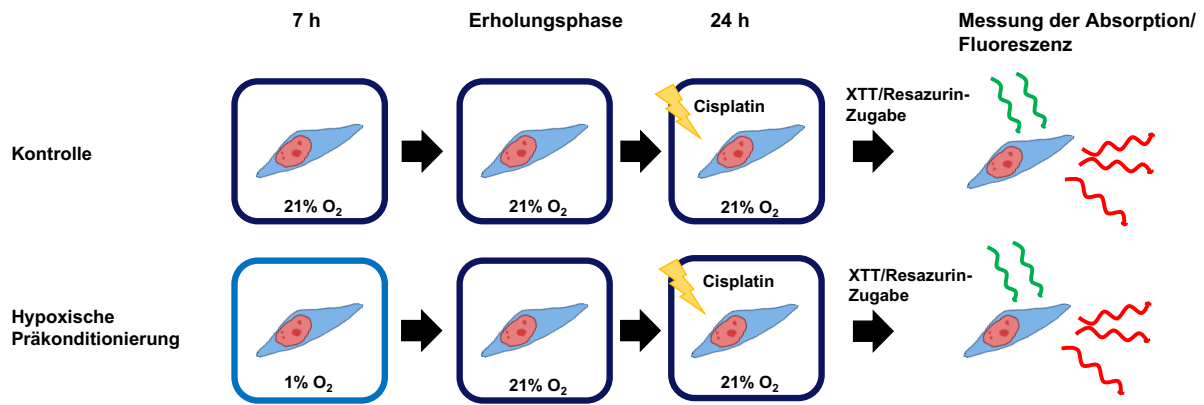
Hypoxische Präkonditionierung beschreibt einen zeitlich vorausgehenden Reiz durch Hypoxie in subletalem Ausmaß, der in folgenden, stark ausgeprägten Ischämien den Schaden reduzieren kann. Zur Übertragung der Protokolle aus Tiermodellen in die Zellkultur wurden verschiedene Zeitintervalle in Hypoxie getestet, die im nachfolgenden Cisplatin-Schädigungsmodell das Zellüberleben erhöhen sollten. In einem ersten Schritt wurde festgestellt, dass eine Inkubation in einem Inkubator bei 1%O<sub>2</sub> ausreichend ist, um hypoxische Bedingungen für die HKC-8-Zellen zu schaffen. Das ist an der Stabilisierung von HIF1α als Marker der Hypoxieantwort erkennbar (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Stabilisierung von HIF1α in Hypoxie.**

Western Blot von HKC-8-Zellysaten mit Antikörpern gegen HIF1α und Pan-Aktin zur Ladungskontrolle. Die Zellen wurden entweder in Normoxie, 7h in Hypoxie oder 7h in Hypoxie gefolgt von 6h in Normoxie kultiviert. Die Abbildung ist repräsentativ für N=3 biologische Replikate. Molekulargewicht ist in kDa angegeben. Original Western Blots im Anhang (s. 7.3.2.).

Um die notwendige Zeit in Hypoxie und die nachfolgende Regenerationszeit zu ermitteln, die das Überleben bei nachfolgendem Cisplatin Schaden steigern kann, wurden im Folgenden einige Protokolle ausgetestet.



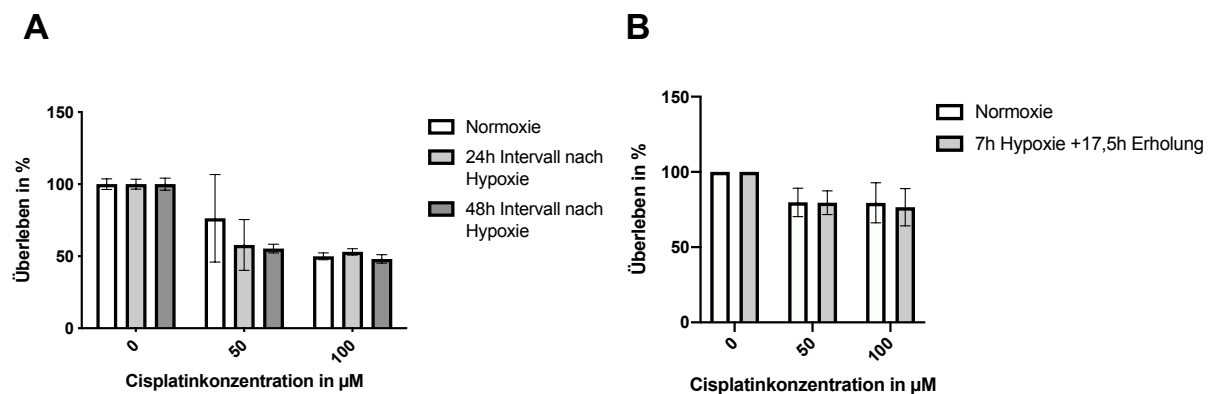
**Legende:**

 Bestrahlung zur Exzitation  
  Emittierte Strahlung  
  Cisplatinexposition

**Abbildung 15: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur hypoxischen Präkonditionierung.**

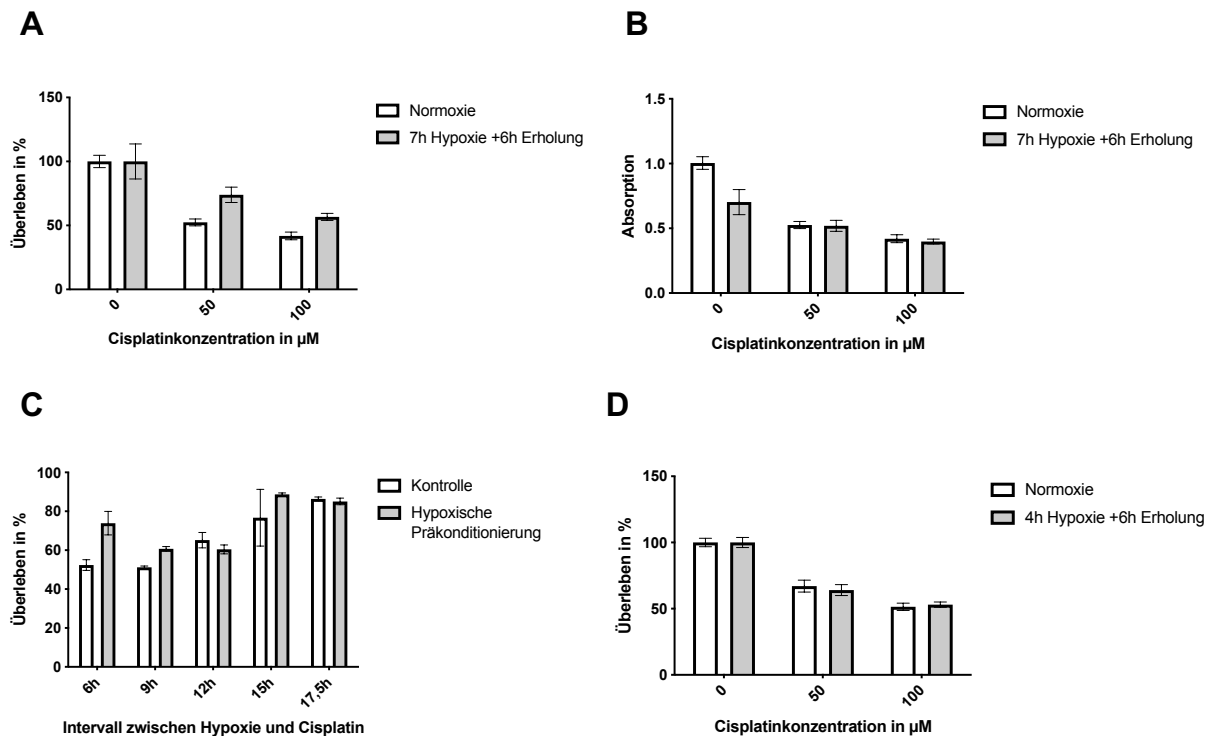
Begonnen wird mit 10.000 HKC-8-Zellen/Well im 96-well. Die Zellen werden 7h in Hypoxie vorbehandelt. Die anschließende Erholungsphase wird in den Folgeexperimenten bestimmt. Nachfolgend werden die Zellen für 24h einer Schädigung durch Cisplatin zugeführt. Das Überleben wird nach XTT/Resazurin-Zugabe gemessen. Die Kontrollgruppe verbleibt vor Cisplatinexposition ausschließlich in Normoxie.

Nach einem hypoxischen Reiz von 16 h wurde entweder ein Intervall von 1 oder 2 Tagen vor Cisplatinexposition getestet, um den Adaptationsvorgängen auf molekularer Ebene nach der Hypoxie Zeit einzuräumen. Hierbei zeigten sich bei einmaliger Versuchsdurchführung keine Hinweise auf Unterschiede im Zellüberleben zwischen den präkonditionierten Zellen und den Kontrollen (Abbildung 16A). Als nächster Schritt wurde zur Präkonditionierung ein Protokoll mit 7h Hypoxie und 17,5h Intervall bis zur Cisplatinexposition getestet, das bereits bei Nematoden zur nachweislichen Erhöhung der Stressresistenz geführt hatte (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe). Auch hier zeichnete sich kein Unterschied zwischen präkonditionierten und unbehandelten Zellen ab (Abb. 16B), sodass auch dieses Protokoll nach n=1 Durchläufen nicht weiterverfolgt wurde.



**Abbildung 16: Etablierung der Hypoxiedauer und Regenerationszeit.**

(A) Nach 16h Hypoxie und 1 oder 2 Tagen Regeneration wurden die HKC-8-Zellen 24h mit Cisplatin behandelt. Anschließend wurde das Zellüberleben gemessen (XTT). Die Messwerte wurden auf die Kontrollgruppe in Normoxie normalisiert. N=1 biologische Replikate. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von N=5 technischen Replikaten an. (B) Nach 7h Hypoxie und 17,5h Regeneration wurden die HKC-8-Zellen 24h mit Cisplatin behandelt. Anschließend wurde das Zellüberleben gemessen (XTT). Die Messwerte wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert. N=2 biologische Replikate. Multiple t-test detektierten keinen signifikanten Unterschied der Vergleichsgruppen aus Abbildung 16B. Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung an.



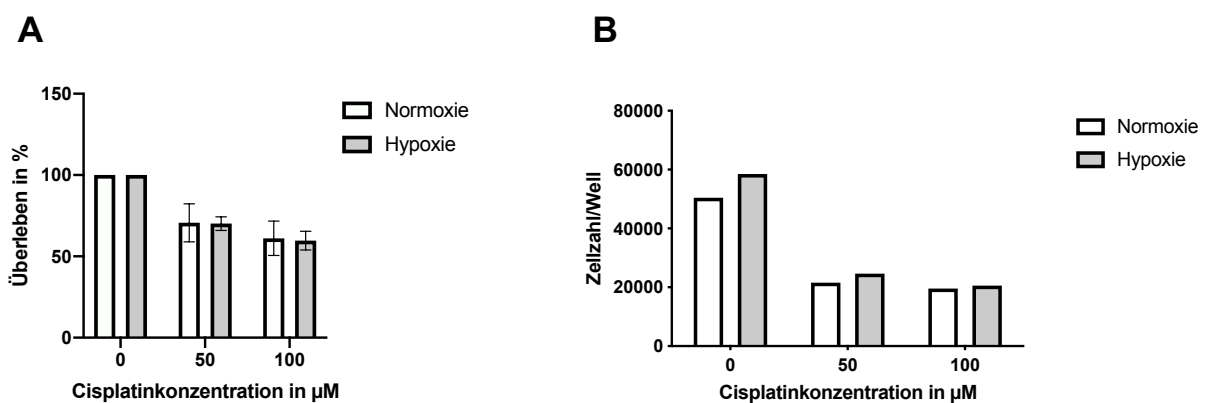
**Abbildung 17: Optimierung der Dauer des hypoxischen Reizes und des Intervalls bis zur Schädigung.**

(A) Hypoxische Präkonditionierung von HKC-8-Zellen durch 7h Inkubation in Hypoxie und 6h in Normoxie. Anschließende Cisplatinexposition über 24 h und Messung des Zellüberlebens mit XTT. Die Messwerte sind auf die Kontrollgruppe normalisiert. Start mit 10.000 Zellen/Well (96-well). N=1 biologische Replikate. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von N=4 technischen Replikaten an. (B) Absolute Messwerte (Absorption im Photometer) zum Versuch, der in Abbildung 17A dargestellt ist. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von N=4 technischen Replikaten an. (C) Zeitreihe von HKC-8-Zellen, die nach 7h Hypoxie ein Intervall von 6h, 9h, 12h 15h oder 17,5h bis zur Cisplatinexposition durchlaufen haben. Dargestellt ist das Zellüberleben nach 24h Inkubation mit Cisplatin in einer Konzentration von 50μM. Die angegebenen Werte sind auf die jeweilige Kontrollgruppe normalisiert. Start mit 10.000 Zellen/Well (96-well). N=1 biologische Replikate. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von N=4 technischen Replikaten an. (D) Hypoxische Präkonditionierung von HKC-8-Zellen mit 4h Hypoxie und 6h Intervall in Normoxie. Anschließende Cisplatinexposition über 24 h und Messung des Zellüberlebens mit XTT. Die Messwerte sind auf die Kontrollgruppe normalisiert. Start mit 10.000 Zellen/Well (96-well). N=1 biologische Replikate. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von N=4 technischen Replikaten an.

In einem nächsten Schritt wurden Regenerationszeiten von 6h bis 17,5h in einer Zeitreihe ausgetestet, wobei die Hypoxiezeit von 7h nicht verändert wurde. Bei Vergleich des prozentualen Anteils überlebender HKC-8-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Gruppe konnte bei 6h Regenerationszeit zwischen Hypoxie und Beginn der Schadenseinwirkung ein Vorteil für die präkonditionierten Zellen in N=1 Versuchsdurchführungen festgestellt werden (Abbildung 17A). Bei Betrachtung der absoluten Messwerte, die nicht auf die Gruppen ohne Cisplatin normalisiert wurden, ergab sich jedoch kein Unterschied im Zellüberleben zwischen präkonditionierten Zellen und der Kontrolle (Abbildung 17B). Dabei fällt auf, dass die Menge an metabolisiertem XTT in den Gruppen ohne Cisplatinexposition in Hypoxie und Normoxie sehr unterschiedlich ausfällt. Anteilig an dem Messwert der Kontrollgruppe ohne Cisplatin kommt somit für die hypoxische Gruppe ein höheres relatives Überleben (Abbildung 17A) zustande. Titrationsversuche des Versuchsablaufs aus Abbildung 17A erbrachten weder in der Verlängerung des Intervalls zwischen Hypoxie und Cisplatinzusatz (Abbildung 17C) noch

durch Verkürzung der Hypoxiedauer auf 4h (Abbildung 17D) einen Vorteil für die hypoxisch präkonditionierte Gruppe.

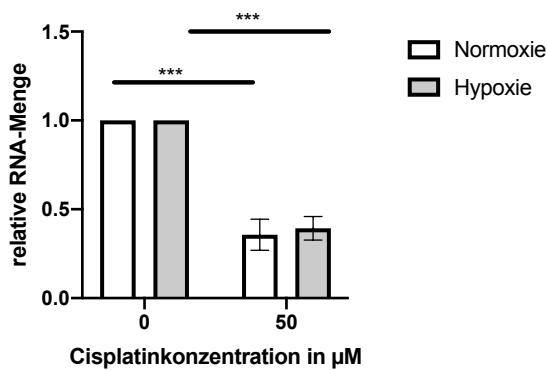
Nachdem in Abbildung 17A nach Präkonditionierung ein Unterschied detektiert wurde, konnte in der mehrfachen Reproduktion kein Effekt mehr gesehen werden (Abbildung 18A). Während der Messungen zu Abbildung 18A wurde die Messung des Überlebens von XTT auf Resazurin gewechselt, welches wie XTT unter Verbrauch zellulärer Dehydrogenasen und Coenzyme wie NADH metabolisiert wird. Trotz Wechsel zu einer anderen Messmethode gelang es nicht, einen Präkonditionierungseffekt zu detektieren. Die Zellzahlen in beiden Versuchsgruppen weisen keine starken Abweichungen voneinander auf (Abbildung 18B).



**Abbildung 18: Cisplatin-Schädigungsmodell mit hypoxischer Präkonditionierung in HKC-8-Zellen.**

(A) Nach Präkonditionierung mit 7h Hypoxie und 6h Normoxie wurden die Kontrollgruppe und die präkonditionierte Gruppe 24 h mit Cisplatin behandelt und das Zellüberleben mit XTT oder Resazurin gemessen. Start mit 10.000 Zellen/Well (96-well). N=3 biologische Replikate. Die Messwerte wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert. In multiplen t-tests ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte innerhalb der Konditionen. (B) Zellzählungen N=1 aus einem Durchlauf aus Abb. 18A. Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung an.

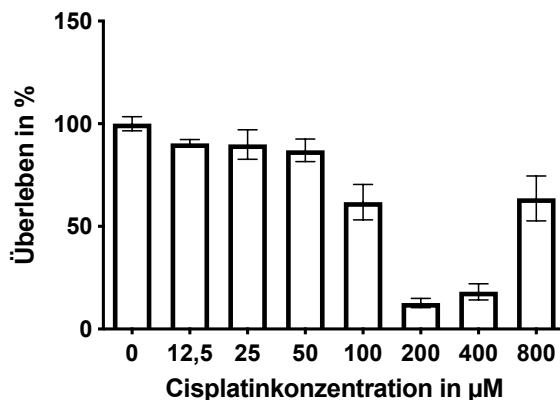
Neben der Aussage über das Zellüberleben können auch andere Marker die Schädigung von Nierenzellen anzeigen. Um einen Präkonditionierungseffekt nachzuweisen, wurde zusätzlich zur Messung des Überlebens die mRNA-Menge des Kidney injury molecule 1 (KIM1) quantifiziert. KIM1 ist ein Transmembranprotein, das bei Schädigung in proximalen Tubuluszellen erhöht exprimiert wird<sup>140</sup> und durch die gespaltene Ektodomäne auch im Urin erhöht gemessen werden kann<sup>140,141</sup>. Die gemessene KIM1-RNA-Menge betrug weniger als 50% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 19). Somit konnten nach Wechsel der Messgröße auf die Quantifizierung der KIM1-RNA keine Effekte der hypoxischen Präkonditionierung in Form einer Änderung der relativen Expression von KIM1 festgestellt werden.



**Abbildung 19: KIM1-mRNA in HKC-8-Zellen ist nach Cisplatinexposition verringert.**

Relative RNA-Menge von KIM1 nach 24 h Cisplatinexposition und hypoxischer Präkonditionierung mit 7h Hypoxie und 6h Normoxie in der hypoxischen Gruppe. Das Experiment liegt in N=3 biologischen Replikaten vor. Der Vergleich erfolgte nach Abzug der PCR-Zyklusdifferenzen des Kontrollgens  $\beta$ -Aktin, wobei Unterschiede bis zu 1,73 Zyklen in den verschiedenen Gruppen vorlagen. Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung an. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des Two-way ANOVA Tests und Tukey's multiple comparisons-Test durchgeführt. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

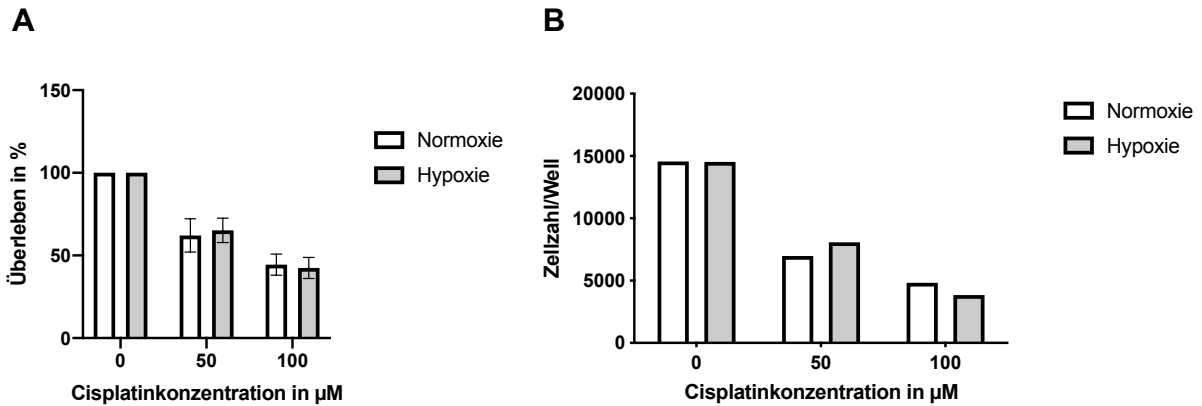
Um eine mögliche Verschleierung des Präkonditionierungseffekts durch Nutzung einer künstlich immortalisierten Zelllinie zu vermeiden, wurde das Modell auch an primären Nierenzellkulturen getestet. Nach Erprobung einer Verdünnungsreihe wurden die Konzentrationen 50µM und 100µM für das Cisplatin-Schädigungsmodell ausgewählt (Abbildung 20). In dieser Verdünnungsreihe fielen unerwartet hohe Messwerte bei der Messung des Zellüberlebens bei 800µM Cisplatin auf.



**Abbildung 20: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Cisplatin und renalen Primärzellen.**

Messung des Zellüberlebens mit Resazurin nach 24h Cisplatinbehandlung auf renalen Primärzellen, N=1 biologische Replikate. Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung bei N=4 technischen Replikaten an.

Die anschließende Ausführung des Cisplatin-Schädigungsmodells mit hypoxischer Präkonditionierung auf Primärzellen erbrachte keinen Unterschied im Zellüberleben zwischen präkonditionierten Zellen und der Kontrollgruppe (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Cisplatin-Schädigungsmodell mit renalen Primärzellen.**

(A) Primäre Nierenzellen wurden nach hypoxischer Präkonditionierung (7h Hypoxie gefolgt von 6h Normoxie) 24h mit Cisplatin behandelt. Das Überleben wurde mit Resazurin gemessen. Die Messwerte wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert. Start mit 10.000 Zellen/Well (96-well). Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus N=4 biologischen Replikaten. Statistische Analysen wurden mit Hilfe multipler t-Tests durchgeführt. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte. Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung an. (B) Zellzahlen zu einem Durchlauf aus Abb. 21A.

Durch die genannten Protokolle ist es somit nicht gelungen, ein Modell zur hypoxischen Präkonditionierung zu entwerfen, welches die Schäden durch das gewählte Cisplatin-Schädigungsmodell vermindern kann. Im Folgenden wird das Protokoll aus 7h Hypoxie und 6h Normoxie trotz ausbleibendem Nachweis eines Effekts in den entsprechenden Fragestellungen weiterverwendet werden. Auch wenn die Frage der Protektion durch hypoxische Präkonditionierung durch dieses Modell nicht beantwortet werden kann, sind durch dieses Protokoll weiterhin Untersuchungen hinsichtlich der Hypoxieantwort im Cisplatin-Schädigungsmodell möglich.

#### 4.4. Einfluss der Proteine PPAN und MEX3C auf das Cisplatin-Schädigungsmodell und auf die Hypoxieantwort

##### 4.4.1. PPAN-Lokalisation unter Kontroll- und Stressbedingungen

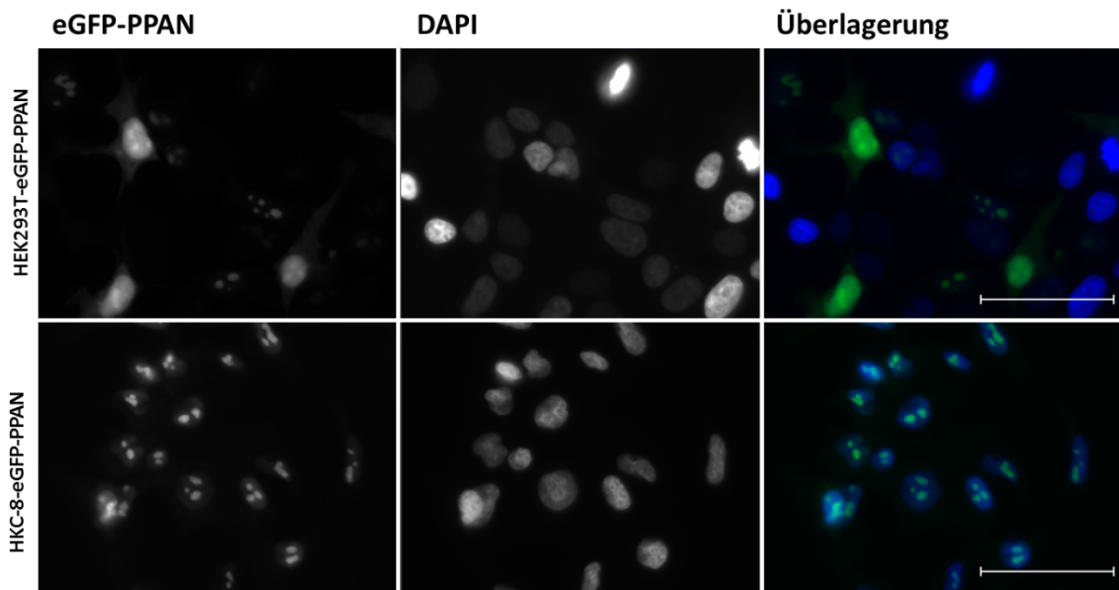
Durch RNA-bindende Eigenschaften weisen die Proteine PPAN und MEX3C ein hohes Potenzial auf, in Regulationsmechanismen der Präkonditionierung einer Zelle bedeutend beteiligt zu sein. Daher wurde der Einfluss der Proteine auf die zelluläre Stress- und Hypoxieantwort untersucht.

Die Lokalisationsstudien an MEX3C am GFP-gekoppelten überexprimierten Protein konnten nicht durchgeführt werden, da kein Plasmid mit dem Fusionsprotein hergestellt werden konnte. Bei hohem GC-Gehalt in der DNA gelang es nicht, die MEX3C-cDNA zu amplifizieren.

Um die Lokalisation von PPAN zu untersuchen, wurden stabile Zelllinien in HKC-8-Zellen und HEK293T-Zellen mit TALEN-vermittelter Integration eines PPAN-Transgens hergestellt.



PPAN-cDNA wurde im AAV-CAGGS-Plasmid N-Terminal mit eGFP gekoppelt. Die Integrations-PCR war für beide Zelllinien positiv und die Sequenzierung des eGFP-PPAN-Fusionsproteins war bei der HKC-8-Linie erfolgreich. Abbildung 22 zeigt die Lokalisation des eGFP-PPAN Fusionsproteins in HKC-8 Zellen und in HEK293T-Zellen. Während in der HKC-8-eGFP-PPAN-Zelllinie die Lokalisation fast ausschließlich im Nukleolus zu finden war, konnte man in den HEK293T-eGFP-PPAN-Zellen ebenfalls eine Akkumulation des eGFP-PPAN Fusionsproteins im Nukleolus aber auch deutlich im Nukleus erkennen.

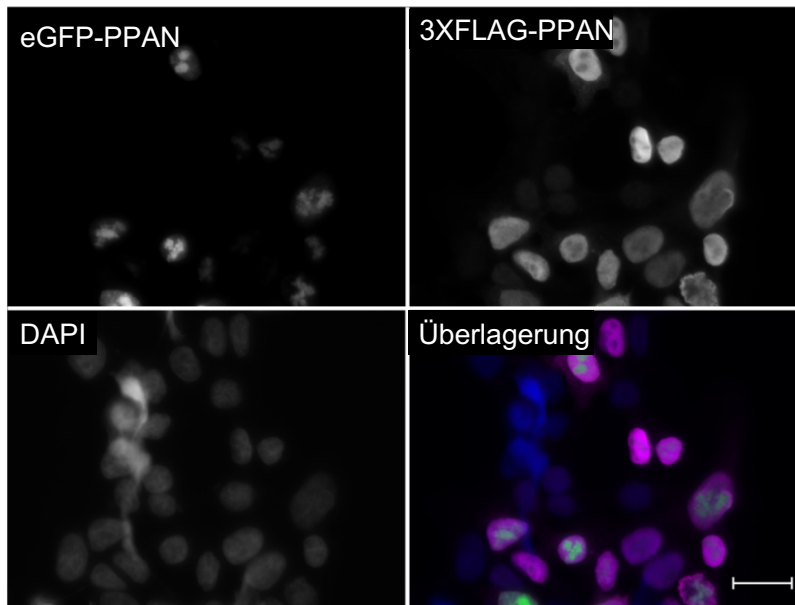


**Abbildung 22: PPAN-Lokalisation in transgenen humanen Zelllinien.**

Fluoreszenzmikroskopische Bilder von fixierten HKC-8-eGFP-PPAN und HEK293T-eGFP-PPAN mit DAPI. Maßstabsleiste entspricht 50µm. N=3 Aufnahmen der HKC-8-Zelllinie, N=1 Aufnahmen der HEK293T-Zelllinie.

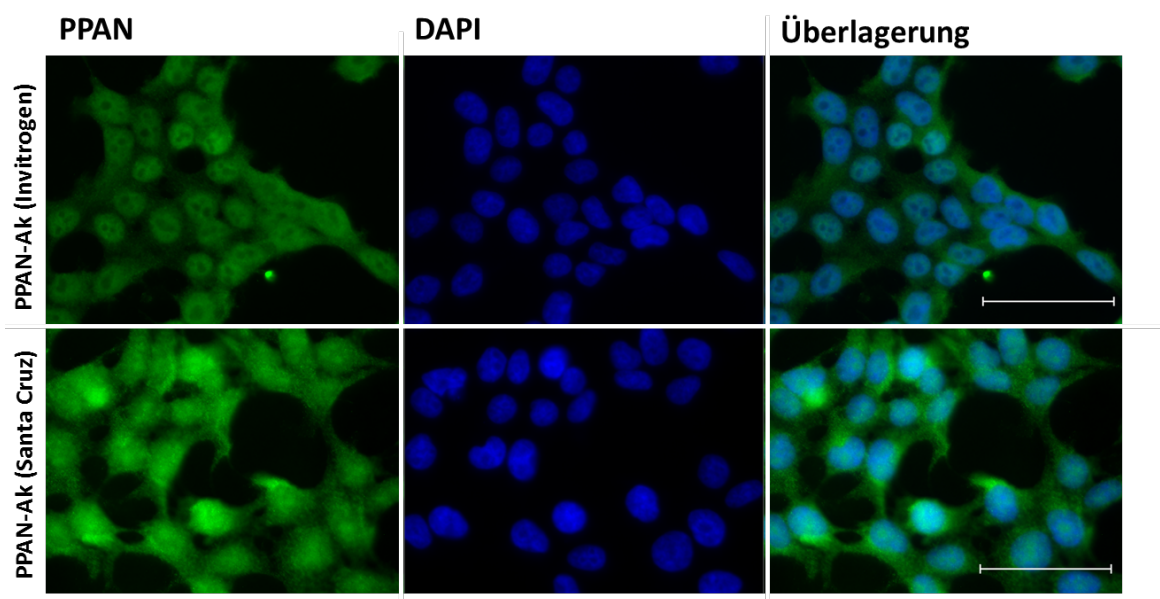
In einem weiteren Ansatz wurde die PPAN-DNA in den pcDNA6-Vektor eingebracht, der N-Terminal ein 3-faches FLAG-Tag mit PPAN verbindet. Zellen, die mit diesem Vektor transfiziert wurden, zeigten 3XFLAG-PPAN nur im Nukleus unter Aussparung der Nukleoli (Abbildung 23). Beide Vektoren wurden, wie in Abbildung 23 dargestellt, gleichzeitig in Zellen überexprimiert. Hier konnte eGFP-PPAN und 3xFLAG-PPAN an unterschiedlichen Lokalisationsorten detektiert werden.





**Abbildung 23: PPAN-Fusionsproteine weisen je nach Tag und Vektor einen anderen Lokalisationsort auf.** Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-FLAG-Antikörper und Cy3-Anti-Maus als Sekundäntikörper auf transient transfizierten HEK293T-Zellen mit Überexpression des pcDNA6-3xFLAG-PPAN- und AAV-CAGGS-eGFP-PPAN-Plasmids. Aufnahmen liegen in N=3 für GFP-PPAN und N=2 für 3xFLAG-PPAN vor.

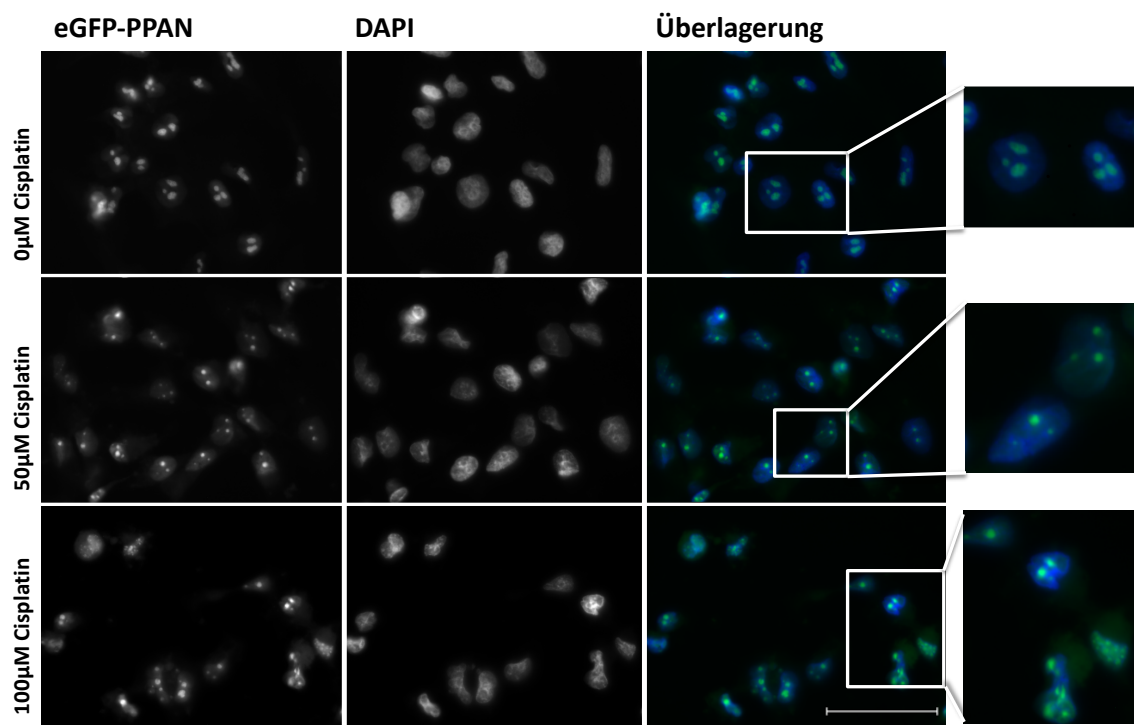
Um den Lokalisationsort des endogenen PPANs zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit 2 kommerziell erhältlichen PPAN-Antikörpern durchgeführt. Während der polyklonale Antikörper (Invitrogen) hauptsächlich den Nukleus unter Aussparung der Nukleoli und zu geringem Anteil das Zytoplasma anfärbte, detektierte der monoklonale Antikörper (SantaCruz) Strukturen im ganzen Zellkern und auch zu geringerem Anteil im Zytoplasma (Abbildung 24). Beide Antikörper sind gegen den nahezu identischen Abschnitt des Proteins gerichtet (Aminosäure 422-445 in Abb. 24 unten und 422-450 in Abb. 24 oben).

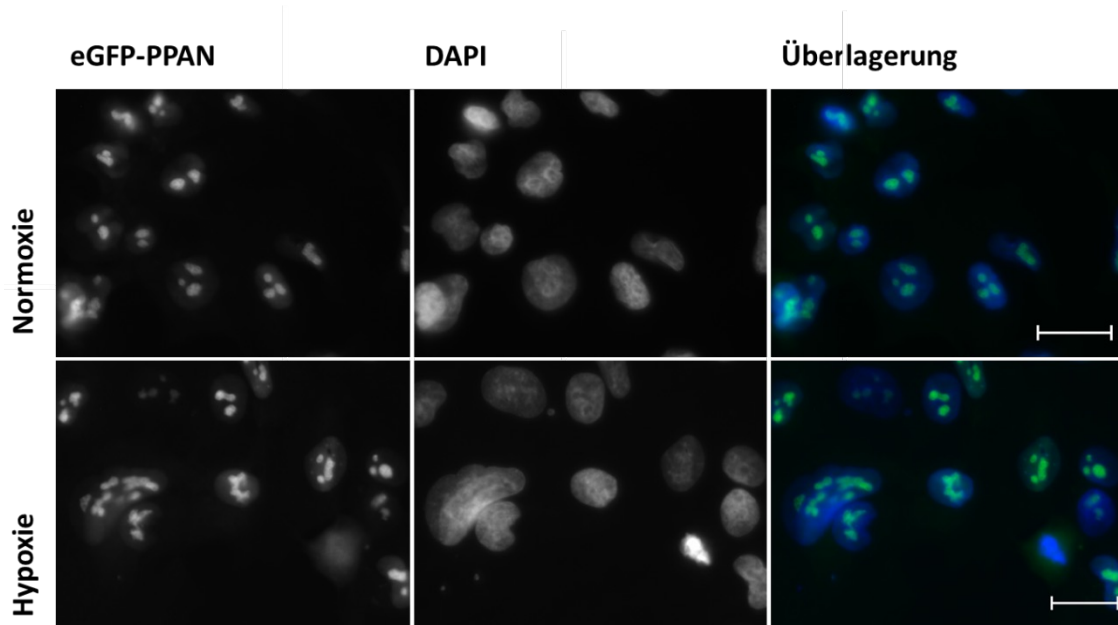


**Abbildung 24: Lokalisation von endogenem PPAN.** Immunfluoreszenzfärbungen mit polyklonalem PPAN-Antikörper (Invitrogen) und Cy3-Anti-Kaninchen als Sekundäntikörper (N=1 auf HEK293T und N=1 auf HKC-8-eGFP-PPAN) und monoklonalem PPAN-Antikörper (SantaCruz) und Alexa488-Anti-Maus als Sekundäntikörper auf HEK293T-Zellen (N=1). Die Maßstabsleisten entsprechen 50µm.

Um die Auswirkung von Stressreizen auf die Lokalisation von PPAN festzustellen, wurden exemplarisch die Stressoren Hypoxie und Cisplatin aus dem Cisplatin-Schädigungsmodell an den Zellen mit stabiler *PPAN*-Integration und Expression ausgetestet. In Abbildung 25 wird ersichtlich, dass weder 4h Hypoxie noch 50 $\mu$ M oder 100 $\mu$ M Cisplatin eine Änderung der Lokalisation des Proteins PPAN herbeiführen. Außerdem kann man in Abbildung 25A erkennen, dass eine Änderung der Morphologie der Nukleoli nach Cisplatinwirkung zu kleineren, kondensierten und runderen Nukleoli (Mikronukleoli)<sup>142</sup> stattgefunden hat.

**A**



**B**

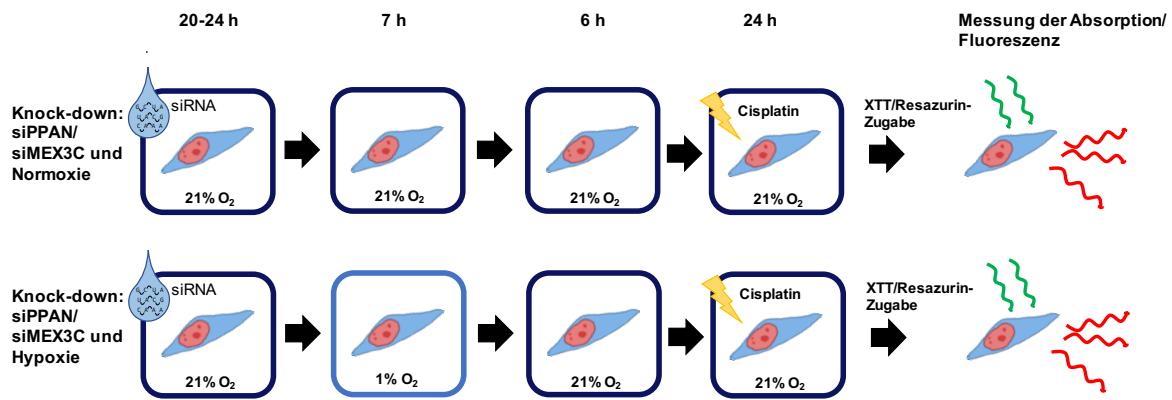
**Abbildung 25: PPAN-Lokalisation unter Stresseinwirkung durch Hypoxie und Cisplatin.**

(A) Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HKC-8-eGFP-PPAN-Zellen nach 24 h Cisplatinbehandlung. Die Maßstabsleiste entspricht 50µm. N=3 biologische Replikate (B) Fluoreszenzmikroskopische Bilder von HKC-8-eGFP-PPAN-Zellen nach 4 h Hypoxie oder Normoxie. N=3 biologische Replikate. Die Maßstabsleiste entspricht 50µm.

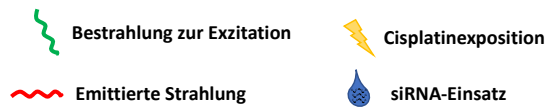
Zusammenfassend ergaben sich zum Teil widersprüchliche Ergebnisse über den genauen Lokalisationsort von PPAN. Das Protein war immer im Zellkern zu finden, in einigen Versuchen zeigten sich die Nukleoli besonders betont und in anderen Versuchen wurden sie vom PPAN ausgespart. Eine zusätzliche Lokalisation im Zytoplasma in geringer Menge wurde ebenfalls mehrfach beobachtet. Eine Lokalisationsänderung des Proteins unter Hypoxie- oder Cisplatineinwirkung konnte nicht beobachtet werden.

#### **4.4.2. Einfluss der Proteine PPAN und MEX3C auf die Hypoxieantwort und auf Schäden durch Cisplatin in HKC-8-Zellen**

Auch wenn die hypoxische Präkonditionierung im etablierten Zellkulturmodell keinen Effekt hervorgebracht hat, so kann durch einen Knock-down des Zielproteins untersucht werden, ob die Reduktion des Zielproteins ein verändertes Zellüberleben nach Hypoxie und nach Stress durch Cisplatin verursacht. Dafür wurde in den HKC-8-Zellen ein Knock-down des Proteins PPAN oder MEX3C vor Beginn des hypoxischen Reizes durchgeführt. Schematisch ist der Versuchsablauf in Abbildung 26 dargestellt.



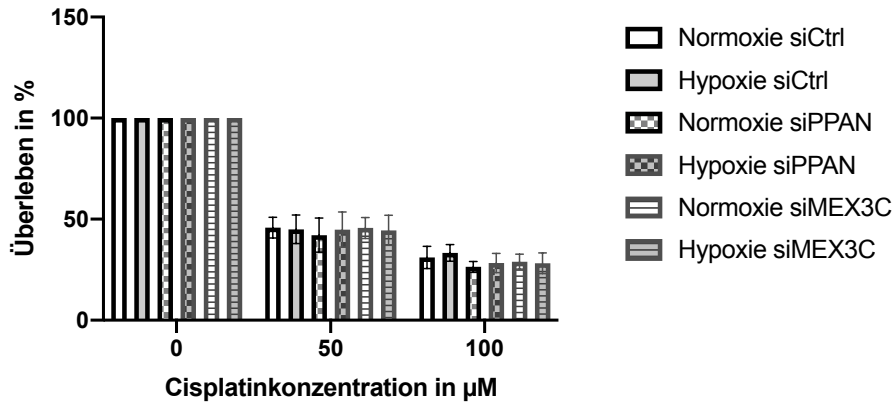
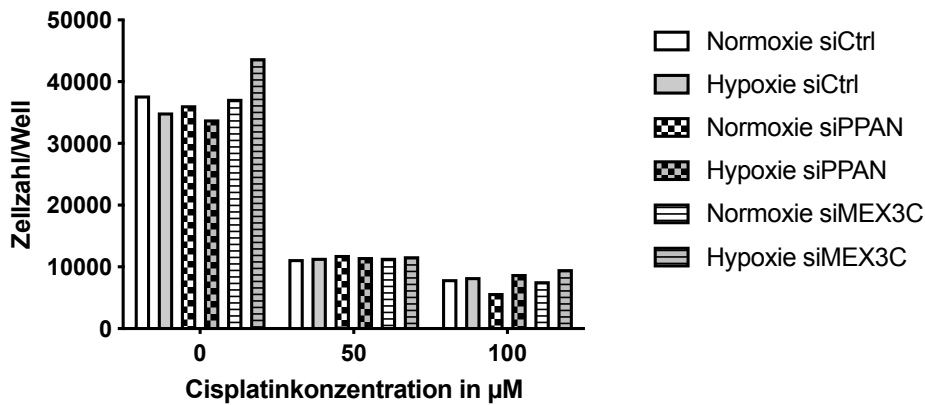
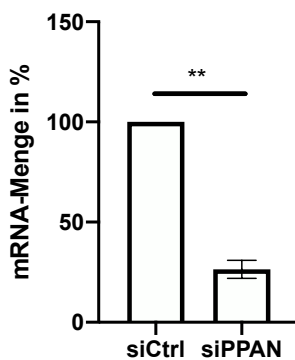
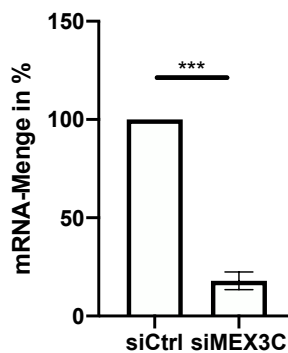
**Legende:**



**Abbildung 26: Schematischer Versuchsablauf: Knock-down PPAN oder MEX3C vor Cisplatin-Schädigungsmodell und hypoxischer Vorbehandlung.**

Nach Knock-down der Proteine PPAN oder MEX3C treten 10.000 HKC-8-Zellen/Well (96 well) nachfolgend für 7h in das Hypoxie-Intervall ein und werden nach 6h bei Normoxie einer Cisplatinexposition (50 und 100 $\mu$ M) ausgesetzt. Die Vergleichsgruppen werden mit Kontroll-siRNA transfiziert und/oder verbleiben dauerhaft in Normoxie, sodass sich 3 Kontrollgruppen ergeben (siCtrl und Normoxie; siPPAN/siMEX3C und Normoxie oder siCtrl und Hypoxie). 24h nach Cisplatinexposition erfolgt die Messung des Überlebens nach Resazurin-Zugabe.

In Abbildung 27A wurde das relative Zellüberleben dieser verschiedenen Gruppen nach Hypoxie und Cisplatinexposition verglichen. Es wird ersichtlich, dass im relativen Vergleich weder durch Knock-down eines Proteins noch durch zusätzliche Hypoxie eine signifikante Änderung des Zellüberlebens zu messen war. Die Zellzahlen unterscheiden sich in den verschiedenen Versuchsgruppen unter 50 $\mu$ M oder 100 $\mu$ M Cisplatinexposition ebenfalls nicht wesentlich (Abbildung 27B). Die Effizienz der Knock-downs wurden nach Beendigung der Versuche durch qPCR bestätigt. Die gemessene PPAN mRNA wurde durchschnittlich um circa 74% supprimiert, die mRNA vom MEX3C um ca. 82% (Abbildung 27C).

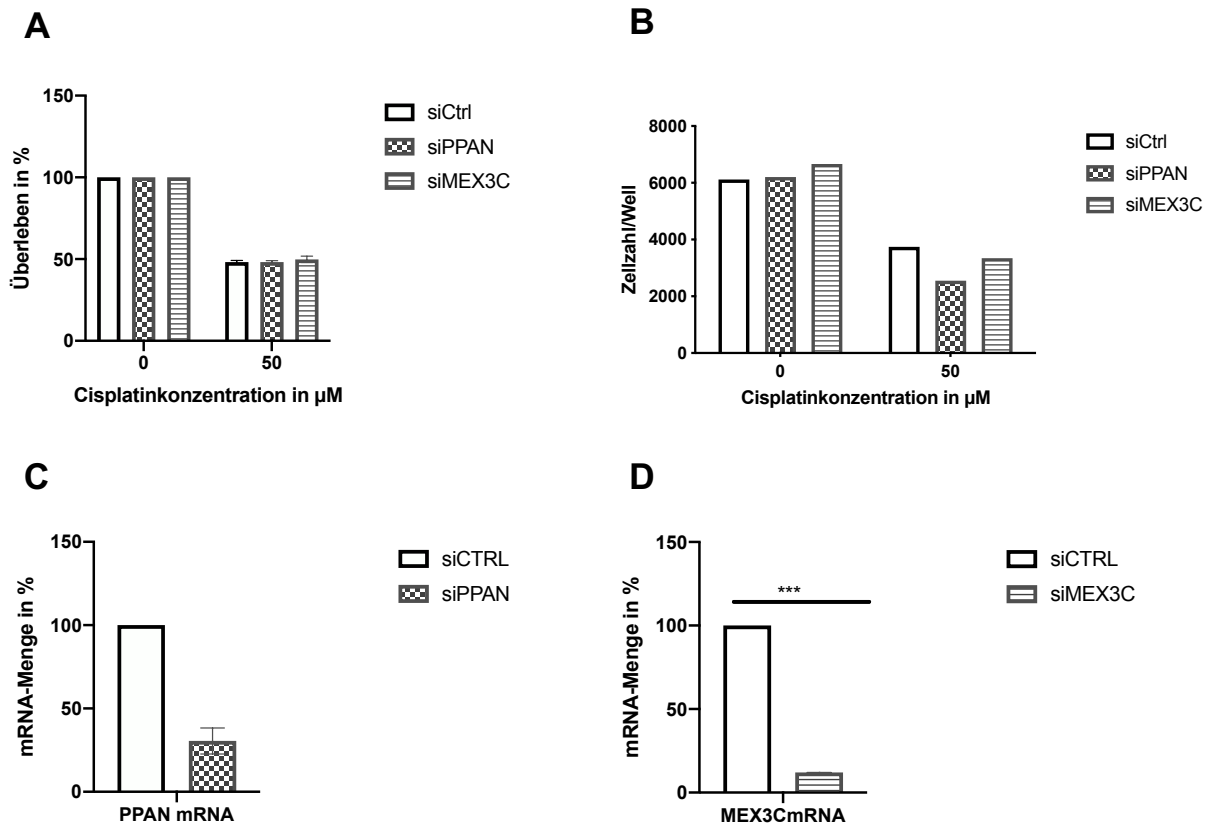
**A****B****C****D**

**Abbildung 27: Knock-down der Proteine PPAN oder MEX3C im Cisplatin-Schädigungsmodell mit hypoxischer Vorbehandlung in HKC-8-Zellen.**

(A) Versuchsablauf nach Abbildung 26. Nach Knock-down der Proteine PPAN oder MEX3C wurden die Zellen hypoxisch vorbehandelt. Nach anschließender Schädigung durch Cisplatin wurde das Überleben der Zellen mit Resazurin gemessen. Die Messwerte wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert. Start mit 10.000 Zellen/Well (96-well). Angezeigt sind Mittelwerte aus N=3 biologischen Replikaten. Statistische Analysen mit Hilfe des One-way ANOVA-Tests ermittelten keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte innerhalb der Konditionen. (B) Zellzählungen zu einem Durchlauf aus Abbildung 27A (C) und (D) Effizienz der Knock-downs zu Abbildung 27A. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus N=3 biologischen Replikaten. Endogene Kontrollen: HPRT und ACTB. Statistische Analysen wurden mittels t-test durchgeführt (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung an.

Da während der Experimente mit Einsatz von siRNA, deren Ergebnisse in Abbildung 27 dargestellt sind, gehäuft Unterschiede in den Zellzahlen in den verschiedenen Gruppen bei 0 $\mu$ M Cisplatin zu messen waren, wurde der Einfluss der Proteine auf die Proliferation untersucht. Alle verwendeten siRNAs und die Reaktions- und Trägerlösungen zur Transfektion wurden auf den Zellen 7,5h inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen in geringer Anzahl auf große Zellkulturplatten verteilt, sodass die Zellen vereinzelt vorlagen. Drei Tage später wurde die Anzahl der Zellen, die aus einer vereinzelter Zelle hervorgegangen waren und als Zellhaufen vorlagen, ausgezählt (Daten nicht gezeigt). Es ergaben sich keine Unterschiede. Die Beobachtung, dass die HKC-8-Zellen unter dem Einfluss der siRNA unterschiedlich schnell proliferieren, ließ sich hierbei somit nicht bestätigen.

Die Durchführung des Knock-downs der Proteine MEX3C oder PPAN vor dem Cisplatinschaden wurde auch auf renalen Primärzellen durchgeführt, um auch hier die veränderten Eigenschaften der immortalisierten Zelllinie ausklammern zu können. Dabei wurde eine zusätzliche hypoxische Präkonditionierung vor der Cisplatineinwirkung als weitere Vergleichskondition ausgelassen, da in den oben genannten Experimenten mit HKC-8-Zellen und renalen Primärzellen durch hypoxische Bedingungen kein Hinweis auf eine Änderung im Zellüberleben verzeichnet wurde und weil primäre Zellen eine knappe und wertvolle Ressource darstellen. In Abbildung 28 lässt sich in N=2 Versuchen bei den Messungen des Zellüberlebens nach Schadenseinwirkung durch Cisplatin kein Unterschied durch den Knock-down von PPAN oder MEX3C feststellen.



**Abbildung 28: Knock-down von PPAN oder MEX3C ändert nicht die Resistenz in renalen Primärzellen gegenüber einer Schädigung durch Cisplatin.**

(A) Messungen des Zellüberlebens (Resazurin) von renalen Primärzellen nach Knock-down der Proteine PPAN oder MEX3C und darauffolgender 24 h Cisplatinbehandlung. Cisplatinexposition auf 10.000 Zellen/Well (96-well). Die Abbildung zeigt eine Mittelung aus N=2 biologischen Replikaten. (B) Zellzählungen zu einem Durchlauf aus Abbildung 28A. Statistische Analysen mit Hilfe des one way ANOVA konnten keine Unterschiede zwischen den Mittelwerten einer Kondition ermitteln. (C) und (D) Effizienz der Knock-downs zu Abbildung 28A. Das Diagramm zeigt Mittelwerte aus N=2 biologischen Replikaten. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des t-Tests durchgeführt. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung an.

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich in den durchgeführten Versuchen keine Hinweise dafür ergaben, dass PPAN oder MEX3C einen Einfluss auf die zelluläre Stressantwort nach Cisplatin-schädigung nehmen. Eine zusätzliche hypoxische Vorbehandlung in Kombination mit einem Knock-down der Proteine PPAN und MEX3C förderte weder eine höhere Sensibilität gegenüber einer nachfolgenden Cisplatin-schädigung noch eine verbesserte Resistenz.

#### 4.5. Präkonditionierung durch Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren

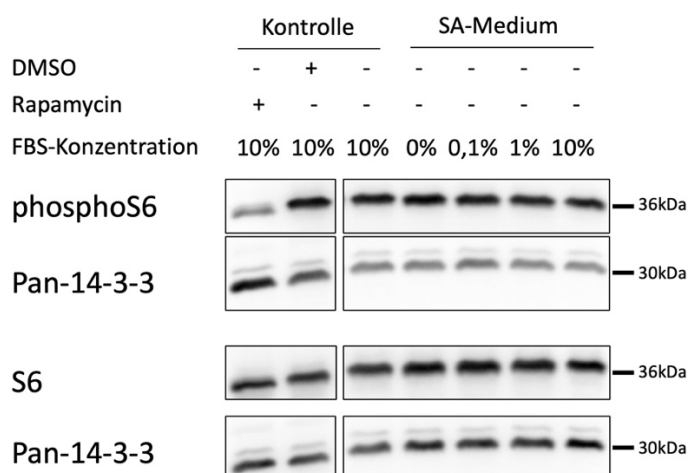
##### 4.5.1. Übertragung diätetischer Präkonditionierung ins Zellkulturmodell

Neben dem Prinzip der hypoxischen Präkonditionierung wurde nachfolgend auch der Ansatz einer diätetischen Präkonditionierung in ein Zellkulturmodell übertragen. Aus der Publikation von Hine et al. aus dem Jahr 2015<sup>71</sup> wurde die Idee einer Präkonditionierung durch Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren in der Zellkultur übernommen. Dafür wurde Zellkulturmedium (RPMI-1640) mit FBS in Konzentrationen zwischen 10% und 0% ausgetestet und die



niedrigste mögliche FBS-Konzentration ausgewählt, um schwefelhaltige Verbindungen aus dem FBS möglichst zu vermeiden. Die Entscheidung über die maximal mögliche Reduktion des FBS-Anteils wurde zum einen auf der Beobachtung gestützt, ob die verschiedenen FBS-Konzentrationen bei der Anwendung über mehrere Tage letal sind. Auch bei einer FBS-Konzentration von nur 0,1% wurden auch nach mehreren Tagen keine toten Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Eine Beeinflussung der Aktivität von mTOR, einem Schlüsselement in der Wahrnehmung des Nährstoffangebots und der Regulation von Zellwachstum und -proliferation<sup>143</sup>, ist durch das reduzierte Nährstoffangebot im Zellkulturmedium (Kontrolle (DMEM) 4,5g Glucose/l und RPMI 2g Glucose/l) denkbar. Daher wurde der Phosphorylierungsstatus des ribosomalen S6-Proteins kontrolliert, welcher durch mTOR phosphoryliert wird. Während Rapamycin, ein mTOR-Inhibitor, die Phosphorylierung des S6-Proteins durch mTor vermindern konnte, wurde durch eine 24-stündige Kultivierung im schwefelarmen Medium (SA-Medium) mit allen getesteten FBS-Konzentrationen keine Änderung des Phosphorylierungsstatus des S6-Proteins beobachtet (Abbildung 29).



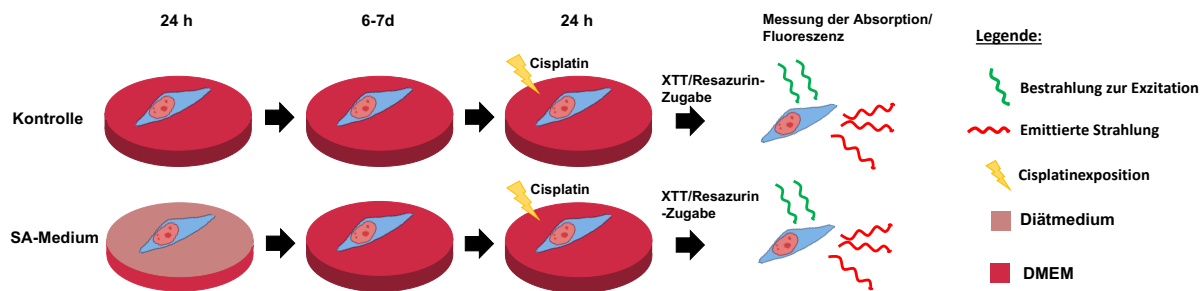
**Abbildung 29: Schwefelarmes RPMI-Medium ändert nicht die mTor Aktivität.**

Western Blot von HKC-8-Zelllysaten nach 24h Behandlung mit RPMI-Medium und verschiedenen FBS-Konzentrationen oder DMEM als Kontrollmedium. Es wurden Antikörper gegen S6, phosphoryliertes S6 und Pan-14-3-3 zur Ladungskontrolle verwendet. Rapamycin fungiert als Positivkontrolle der mTor-Inhibition und DMSO als Kontrolle der Trägerlösung. PhosphoS6 oder S6 wurde jeweils mit der Ladungskontrolle Pan14-3-3 auf jeweils einem Blot bestimmt. Die ersten beiden Proben wurden auf einem separaten Blot analysiert. Der vorliegende Western Blot ist repräsentativ für N=3 biologische Replikate. Originale Western Blots im Anhang (s. 7.3.3.)

In den Folgeexperimenten wurde zugunsten der Vermeidung schwefelhaltiger Moleküle RPMI-Medium mit 0,1%FBS zur Restriktion der schwefelhaltigen Aminosäuren verwendet. Als dieses zur Präkonditionierung verwendet wurde, stellten sich sehr hohe Zellzahlunterschiede in den verschiedenen Versuchsgruppen nach der Behandlung heraus. Die Proliferationsgeschwindigkeit der präkonditionierten Zellen war deutlich verlangsamt und die Konfluenz der Kontrollgruppe und der präkonditionierten Gruppe war anschließend zum Zeitpunkt der Cisplatinbehandlung stark unterschiedlich. Da die Konfluenz zum Zeitpunkt der

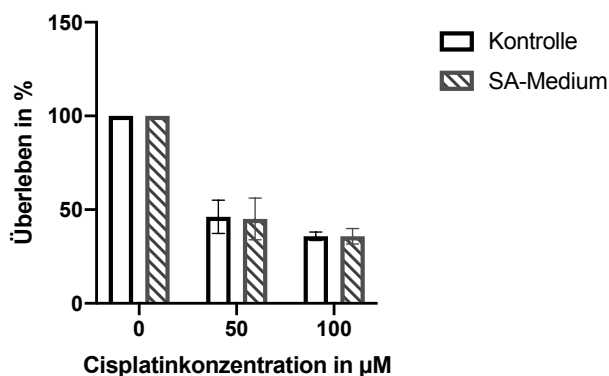


Cisplatinexposition und das Proliferationsniveau der Zellen die Vulnerabilität gegenüber dem Cisplatin beeinflussen, mussten diese Störfaktoren eliminiert werden. Dazu wurde 24h nach der Inkubation mit dem SA-Medium ein Intervall bis zur Wiedererlangung des ursprünglichen Proliferationsniveaus eingesetzt. Dieses Intervall betrug 6-7 Tage. Schematisch ist der beschriebene Versuchsablauf in Abbildung 30 dargestellt.



**Abbildung 30: Schematische Darstellung: Präkonditionierung durch schwefelarmes RPMI-Medium im Cisplatin-Schädigungsmodell.**

HKC-8 Zellen werden 24h in Zellkulturmedium ohne Methionin und Cystein inkubiert. Nach Angleichung der Proliferation nach 6-7 Tagen erfolgt auf 10.000 Zellen/Well (96-well) eine 24-stündige Cisplatinexposition und anschließende Messung des Überlebens nach Resazurinzugabe.



**Abbildung 31: Auswirkung der Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren auf Cisplatinschaden.**

Versuchsablauf siehe Abbildung 30. Messung des Zellüberlebens mit Resazurin auf HKC-8-Zellen nach 24h Cisplatinexposition. Die Versuchsgruppe erhielt vorher 24h schwefelarmes RPMI-1640-Medium mit 0,1% FBS. Nach 6-7 Tagen Pause und Angleichung des Proliferationsniveaus aneinander wurde Cisplatin auf den Zellen angewandt (10.000 Zellen/Well (96 well)). Die Messwerte wurden auf die Kontrollgruppe normalisiert. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus N=3 biologische Replikate.

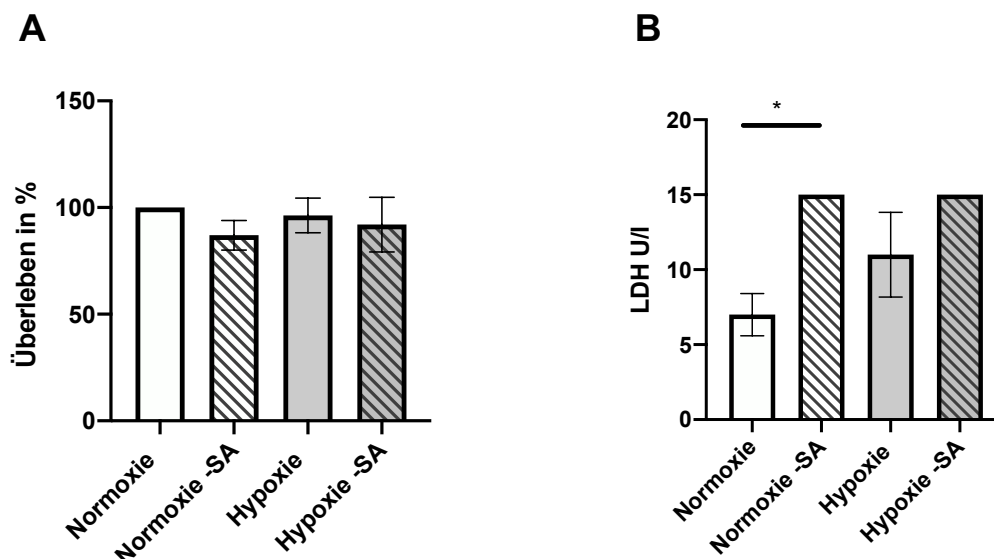
Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung an. Statistische Analysen wurden mit Hilfe multipler t-Tests durchgeführt und konnten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen zeigen.

In Abbildung 31 ist erkennbar, dass die Zellen, welche einer Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren unterzogen wurden, keinen Vorteil im Überleben der Zellen nach Cisplatineinwirkung aufwiesen. Daher konnte dieses Protokoll nicht für die Modellierung und

Untersuchung der molekularen Mechanismen der diätetischen Präkonditionierung weiterverfolgt werden.

#### 4.5.2. Reproduktion eines publizierten Zellkulturmodells zur Modellierung diätetischer Präkonditionierung

Nachdem die Grundidee der Protektion gegenüber Cisplatinschäden durch Entzug schwefelhaltiger Aminosäuren nicht umgesetzt werden konnte, wurde ein bereits etabliertes erfolgreiches Protokoll zur Modellierung diätetischer Präkonditionierung mittels Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren in der Zellkultur aus Hine et al. reproduziert<sup>71</sup>. In diesem Modell führt Präkonditionierung mittels Einsatz von Zellkulturmedium ohne schwefelhaltige Aminosäuren zu einer erhöhten Resistenz gegenüber einer Schädigung durch Hypoxie und Austausch von Medium gegen Kochsalzlösung. Das Schädigungsmodell ist angelehnt an Bedingungen der Ischämie, bei der Nährstoffentzug und Hypoxie bedeutende Träger der Schädigung sind. Wie im originalen Protokoll wurde zur möglichst genauen Reproduktion die selbe Zelllinie verwendet (murine Leberzellen, Hepa 1-6). Die Messung des Zellüberlebens durch XTT wurde in der vorliegenden Reproduktion mit Resazurin durchgeführt. Freigesetzte zytoplasmatische Laktatdehydrogenase als Marker der Membranschädigung<sup>144</sup> wurde im Überstand gemessen. Exakte Protokollangaben über Zelldichte und Inkubationszeiten waren nicht angegeben.



**Abbildung 32: Reproduktion eines publizierten Schädigungsmodells.**

(A) Messung des Zellüberlebens mit Resazurin auf murinen Hepa 1-6-Zellen. Diese wurden mit Inkubation in DMEM-Medium ohne schwefelhaltige Aminosäuren und 10% dialysiertem FBS (-SA Medium) 18 h präkonditioniert und anschließend zur Schädigung für 3-4 h in NaCl inkubiert. Die Inkubation in NaCl wurde in der normoxischen Gruppe im gewöhnlichen Inkubator durchgeführt und in der hypoxischen Gruppe im Inkubator mit 1% O<sub>2</sub>. Nach 2-3 h Regenerationszeit im gewöhnlichen Medium wurde das Überleben durch Resazurinzusatz bestimmt. Initial wurden 35.000-40.000 Zellen/Well in der Kontrollgruppe und 70.000 Zellen in der Versuchsgruppe pro Well (96 well) verteilt. Der Versuch liegt in N=3 biologischen Replikaten vor. (B) LDH-Messungen aus den NaCl-Überständen zu Abbildung 32A. Das gezeigte Diagramm ist repräsentativ für N=4 biologische Replikate. Fehlerbalken zeigen eine Standardabweichung an. Statistische Analysen wurden mit Hilfe des One-way ANOVA-Tests und Tukey's multiple comparisons-Test durchgeführt. \*p<0,05, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

Die in Abbildung 32A dargestellten Daten der Reproduktion zeigen eine höhere Sensibilität der vorbehandelten Zellen gegenüber dem Schädigungsreiz in hypoxischer wie auch normoxischer Umgebung. Der Marker LDH war in den Gruppen mit Präkonditionierung erhöht (Abbildung 32B). Der protektive Effekt, den Hine et al. gezeigt hatten<sup>71</sup>, konnte somit nicht reproduziert werden.

## 5. Diskussion

Präkonditionierung kann zu einer Reduktion einer nachfolgenden ischämischen Schädigung führen. Die Identifizierung der detaillierten Regulierungsmechanismen durch Etablierung eines Zellkulturmodells und die Nutzung dieser Kenntnisse zum Schutz oder zur Therapie von ischämischen Nierenschädigungen war das höhere Ziel der vorliegenden Arbeit. Dieses Ziel konnte in Anbetracht der vorliegenden Ergebnisse letztlich nicht erreicht werden. Nichtsdestotrotz liefert die vorliegende Arbeit wertvolle Einblicke und eine Basis für zukünftige Versuche auf diesem Gebiet.

Im folgenden Abschnitt diskutiere ich diese Ergebnisse, evaluiere Teilaspekte dieses Modells und bringe sie in den Zusammenhang mit bereits etablierten Modellen in der Literatur.

### 5.1. HKC-8-Zellen repräsentieren differenzierte proximale Tubuluszellen der Niere

Für das Modell wurden proximale Tubuluszellen ausgewählt, da diese in der Pathophysiologie des akuten Nierenversagens die Achillesferse der Niere darstellen<sup>10</sup>. Die eingeschränkte Fähigkeit der proximalen Tubuluszellen den Energiebezug aus dem oxidativen Stoffwechsel bei hypoxischen Bedingungen zum glykolytischen Stoffwechsel zu wandeln, macht sie besonders vulnerabel<sup>10-12</sup>. Die ausgewählten HKC-8-Zellen wurden in der Literatur als immortalisierte Zellen aus proximalen Tubuluszellen der Niere beschrieben. Die Expression multipler Enzyme am Bürstensaum des proximalen Tubulus wurde in der Literatur bereits nachgewiesen und mit vorhandenen immortalisierten proximalen Tubuluszellen verglichen<sup>95</sup>. In der Prüfung der Eignung dieser Zelllinie für das Schädigungsmodell wurden weitere Hinweise für die Differenzierung<sup>145</sup> der Zelllinie durch den Nachweis ziliärer Proteine und Zell-Zell-Kontakte gesammelt (Abbildung 7 und 8). Der Nachweis der ziliären Proteine IFT88 und CEP164 gelang nicht. Nach aktueller Datenlage in der Literatur ist eine Zilienformation ohne diese Proteine jedoch nicht möglich<sup>131,132</sup>. Alternative Antikörper zwecks Nachweises dieser Proteine wurden nicht verwendet. Eine abschließende Aussage darüber, ob in den Zilien der HKC-8-Zellen die Proteine IFT88 und CEP164 fehlen, lässt sich daher nicht treffen.

In der Zusammenschau lieferten die Ergebnisse einen weiteren Nachweis der epithelialen Natur der HKC-8 Zelllinie sowie ihrer Fähigkeit zur effizienten Ziliogenese nach Differenzierung. Um den Einfluss der Unterschiede zwischen einer immortalisierten Zelle und einer natürlichen Zelle in späteren Analysen zu berücksichtigen, ist es jedoch hilfreich, Testläufe auch an renalen Primärzellen durchzuführen und die Übertragbarkeit der Ergebnisse zu zeigen. Diese wurden durch Dr. med. M. Bartram zur Verfügung gestellt und zuvor aus dem Urin von humanen Probanden kultiviert<sup>116</sup>. Zhou et al zeigen, dass nach dem beschriebenen Protokoll durch die kultivierten Zellen keine Marker des Urothels exprimiert werden, jedoch

Marker die auf eine renal-epitheliale Herkunft hindeuten, auf RNA- und auf Proteinebene nachweisbar sind<sup>146</sup>.

## 5.2. Umsetzung eines Cisplatin-Schädigungsmodells in der Zellkultur

Zur Modellierung einer Nierenzellschädigung wurde eine Exposition mit Cisplatin ausgewählt, welche in vivo eine toxisch bedingte Nierenschädigung erwirkt.

Im Kontext mit erfolgreichen Modellen in der Literatur liegt das titrierte Protokoll mit einer Konzentration von 50-100  $\mu\text{M}$  Cisplatin im Bereich der publizierten Konzentrationen (8-200 $\mu\text{M}$ )<sup>28,147,148</sup>. Die ausgewählte Dauer der Cisplatinexposition von 24h im Cisplatin-Schädigungsmodell ist ebenfalls vergleichbar mit publizierten Zeitspannen von 5-24h in der Zellkultur<sup>28,147,149</sup> und wenigen Tagen in Tiermodellen<sup>21,150</sup>. Somit liegen die ermittelten Konditionen im Rahmen der publizierten Schädigungsmodelle und führen im vorliegenden Modell zur Abnahme des Überlebens.

In den durchgeführten Verdünnungsreihen wurde nebenbefundlich bei Konzentrationen um 800 $\mu\text{M}$  Cisplatin ein paradoxer, starker Anstieg des gemessenen Zellüberlebens beobachtet (Abbildung 20). Das könnte daran liegen, dass bei 800 $\mu\text{M}$  Cisplatin bereits Nekrose eintritt<sup>148</sup> und freigesetzte zellulären Reduktasen, Dehydrogenasen und Coenzyme die Verstoffwechslung des Indikators in initial hoher Geschwindigkeit ablaufen lassen. In der Literatur wird dieses Phänomen nicht beschrieben. Es ist jedoch bekannt, dass der Stoffwechsel des Indikators von der Aufnahme des Resazurins über die Zellmembran abhängig ist und beispielsweise bei dicht gewachsenen Zellen mit verringerter Kontaktfläche zum Zellkulturmedium verlangsamt ist<sup>151</sup>.

Bei der Interpretation der Versuchsergebnisse ist zu beachten, dass die verwendeten Zellen zum Zeitpunkt der Versuche nicht im differenzierten Zustand vorlagen. Mit der Differenzierung der Zellen geht eine hohe Zelldichte einher. Laut Herstellerangaben liegt bei der Messung des Zellüberlebens mit Hilfe von XTT oder Resazurin keine Linearität mehr vor. Dies bestätigte sich in der eigenen Kontrolle (Abbildung 10). Es ist daher möglich, dass die Unterschiede in der metabolischen Aktivität zwischen differenzierten und undifferenzierten Zellen die gemessenen Ergebnisse relevant beeinträchtigen können.

Bei der Bewertung der Messmethode zur Erfassung des Zellüberlebens muss vermerkt werden, dass neben Apoptose in Form von einem reduzierten Signal lebensfähiger Zellen auch die metabolische Aktivität aller Zellen und daher auch der durch Proliferation entstandenen, neuen Zellen erfasst wird. Marker der Proliferationshemmung und Apoptose nach Cisplatinexposition konnten in der vorliegenden Arbeit qualitativ nachgewiesen werden (Abbildung 12 und 13). Daher kann nicht differenziert werden, ob eine Reduktion der Viabilität in der Behandlungsgruppe durch den Stopp der Replikation oder die Apoptose zustande kommt. Dieser Umstand eröffnet eine Optimierungsmöglichkeit des Schädigungsmodells

durch einen Wechsel der Messmethode zu einer spezifischeren Quantifizierung der Schädigung.

Andere Methoden zur Quantifizierung des Anteils überlebender Zellen, wie beispielsweise ATP-Messungen oder Messungen von Proteasenfunktionen, unterscheiden sich in den genannten Kritikpunkten nicht von dem Resazurin oder dem XTT. Eine Methode, die differenziert die Apoptose misst, könnte spezifischer die Veränderungen in diesem Signalweg beleuchten. Weidemann et al.<sup>28</sup> nutzten hierfür die Messung der Caspase-3 Aktivität, der gemeinsamen Endstrecke der intrinsischen sowie extrinsischen Kaskaden der Apoptose<sup>28</sup>. Versuche, die Zellschädigung durch eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Caspase-3 Aktivität nachzuweisen, verblieben jedoch erfolglos (Abbildung 13). Auch eine Erhöhung des Schädigungsmarkers KIM1<sup>140,141</sup>, einem Transmembranprotein des proximalen Tubulus, das bei akuter Nierenschädigung erhöht exprimiert wird<sup>152,153</sup>, konnte auf RNA-Ebene nicht nachgewiesen werden (Abbildung 19). In Tiermodellen nach Cisplatin induzierter Nierenschädigung zeigte sich KIM-1 jedoch auf RNA-Ebene erhöht<sup>154</sup>. Wiraja et al. gelang es auch in Organoiden eine erhöhte KIM-1-Expression auf RNA-Ebene nach toxischer Schädigung mittels Cisplatin nachzuweisen<sup>155</sup>. In der Literatur konnte in den immortalisierten Zelllinien HK-2 und in IMTECs (immortalized proximal tubular cells) keine Erhöhung der KIM-1 mRNA nach toxischer Schädigung mittels Cisplatin festgestellt werden<sup>156-158</sup>. Es ist daher möglich, dass dieses Problem durch die Verwendung einer immortalisierten Zelllinie aufgekommen ist. Eine zusätzliche Messung auf Proteinebene sowie ein Vergleich zu KIM-1 mRNA aus renalen Primärzellen könnte die Beobachtung weiter beleuchten.

Weitere Messmethoden mit Potenzial zur spezifischeren Apoptosedetektion, die als alternative Messmethode in Betracht kommen, sind beispielsweise die Bestimmung der Cytochrom-C-Freisetzung in das Zytosol über Immunfluoreszenzfärbungen oder der Abbau des antiapoptotischen Bcl-2 mittels Western Blot. Es könnten ebenfalls, wie es bereits Weidemann verwendet hat, fluorometrische Tests der Caspase-3-Aktivität durchgeführt werden<sup>28</sup>.

Bezüglich der Wahl der Zelllinie muss betont werden, dass sie genetisch verändert ist und Resistenzmechanismen nicht ausgeschlossen werden können. Als Beispiel für die veränderte metabolische Situation zeigten Wu et al. in HK-2 Zellen eine besondere Unempfindlichkeit gegenüber den zytotoxischen Wirkungen von Cisplatin<sup>149</sup>. Da in der vorliegenden Arbeit die Protokolle auch an primären Zellen getestet wurden, können zumindest Effekte durch Mutationen der immortalisierten Zellen ausgeklammert werden. Es muss trotzdem angemerkt werden, dass die primären Zellen sensibler gegenüber der Cisplatinexposition reagierten (Abbildung 20) als die HKC-8-Zelllinie.

### 5.3. Hypoxieantwort im Cisplatin-Schädigungsmodell

1986 gelang es Murry durch kurze ischämische Reize im Myokard von Hunden nach mehrfachem Abklemmen der Koronararterien die Ausdehnung des nachfolgend induzierten Herzinfarkts zu verringern<sup>26</sup>. Seither werden verschiedene Formen der ischämischen Präkonditionierung und ihre zugrundeliegenden Mechanismen erforscht. Obwohl eine Ischämie neben einer Hypoxie auch einen Nährstoffentzug und eine Akkumulation von Abfallstoffen verursacht, konnte nachgewiesen werden, dass die Hypoxie allein bereits ausreichend ist um einen Präkonditionierungseffekt zu erreichen<sup>106</sup>. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass der Anstieg der HIF-1 $\alpha$ -Konzentration als Vermittler der Hypoxie vor dem Zeitpunkt der Schädigung eingetreten sein muss, um einen Schutz hervorzurufen<sup>159</sup>. Bei Abwesenheit von HIF-1 $\alpha$  entfallen Präkonditionierungseffekte<sup>28,160</sup>. Interaktionen zwischen HIF-1 $\alpha$  und antioxidativen Proteinen (Hitzeschockproteine (HSP 70, HSP 60), Häm-Oxygenase (HO-1)), Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind (Bcl-2-Proteine), Signalkaskaden der Angiogenese (VEGF, PDGF, Angiopoetin) und Signalwegen, die an Proliferation, Glukosestoffwechsel, Entzündung, Apoptose und Differenzierung beteiligt sind, sind bereits identifiziert (MAPK-Signalweg, JAK2/STAT-Signalweg, PI3K/Akt/mTOR-Signalweg und SIRT1-Signalweg)<sup>28,36,38-41,43,109</sup>. Die Aktivierung von HIF-1 $\alpha$  nach der Schädigung führt zu keinem schützenden Effekt<sup>35</sup>. Entgegengesetzt zu der HIF-1 $\alpha$ -vermittelten Präkonditionierung führt eine chronische HIF-Aktivierung zu Fibrose, Mikrozysten, Dedifferenzierung und erhöhter Proliferationsrate<sup>161,162</sup>. Folglich ist für eine erfolgreiche Präkonditionierung eine kurz andauernde Hypoxie vor dem schädigenden Ereignis notwendig. Diese Bedingung wird durch das aufgestellte Protokoll zur Präkonditionierung erfüllt.

In der Bewertung der Intensität der angewandten Hypoxie (1% O<sub>2</sub> (6,75mmHg)) lässt sich festhalten, dass der Sauerstoffpartialdruck am Boden einer Zellkulturschale durch die Diffusionsstrecke von der Oberfläche des Zellkulturmediums bis zum Boden der Zellkulturschale noch niedriger als in der Umgebungsluft ist<sup>163</sup>. Bei hohem Sauerstoffverbrauch konnten in der Zellkultur perizellulär sogar Werte unter 1mmHg gemessen werden<sup>164</sup>. Ein absoluter Wert für den Sauerstoffpartialdruck, der für eine Hypoxieantwort unterschritten werden muss, ist nicht bekannt. Nach aktueller Literaturlage ist die relative Hypoxie entscheidend für die Hypoxieantwort. Die HIF-1 $\alpha$ -Expression wird auf ein andauerndes Sauerstoffangebot eingestellt und kann auf relative Hypoxie reagieren<sup>165</sup>. Eine Adaptation an das neue Hypoxielevel tritt vermutlich in 36h ein<sup>166</sup>. Ausgehend von diesen Informationen sollte das praktizierte Protokoll eine Hypoxieantwort induzieren können.

Für die Hypoxieantwort ist jedoch nicht nur die Frage entscheidend, ob HIF-1 $\alpha$  stabilisiert wird. Je nach Ausprägung der Hypoxie werden zuerst HIF-Prolyl-Hydroxlasen (PHD) inhibiert und bei stärker ausgeprägten Hypoxien wird Asparagin durch factor inhibiting HIF (FIH) hydroxyliert<sup>167</sup>. Die Inhibition des FIH durch schwere Hypoxie führt zur Regulation von anderen

Zielgenen als durch die alleinige Stabilisierung nach PHD-Inhibition bei milderer Hypoxie<sup>35</sup>. So könnte es je nach Ausmaß der Hypoxie zur Aktivierung unterschiedlicher Hydroxylasen<sup>168</sup> und anderer Signalwege kommen. Ein Unterschied in der Inhibierung der Hydroxylasen könnte hier einen Einfluss auf die Tragweite der Hypoxieantwort nehmen.

Die ausgewählte Dauer der hypoxischen Vorbehandlung im Rahmen erfolgreicher Präkonditionierungsmodelle befindet sich ebenfalls in vivo und in vitro zwischen wenigen Minuten bis Wochen<sup>28,106-109</sup>. In einem Inkubator kann das Erreichen der gewünschten Hypoxie im Zellmedium Minuten bis wenige Stunden erfordern<sup>163</sup>. Daher wurde eine mehrstündige Inkubation in Hypoxie ausgewählt (7h), die nachweislich HIF-1 $\alpha$  stabilisieren (Abbildung 14) und somit eine Hypoxieantwort induzieren konnte.

Die Effekte durch Hypoxie sind zudem multipel und können unmittelbar oder zeitversetzt zu verschiedenen Veränderungen führen. Daher ist das Zeitintervall zwischen Präkonditionierung und Schädigung relevant für das Ausmaß der Protektion durch Präkonditionierung<sup>27</sup>. Die Angiogenese ist ein Beispiel für einen späten und länger anhaltenden Effekt durch neue Gefäße und verbesserte Durchblutung<sup>36,169</sup>. Das angestrebte Zellkulturmodell sollte vordringlich frühe metabolische Veränderungen und Proteinverschiebungen einfangen. Das Intervall zwischen Präkonditionierung bis zur Schädigung beträgt in publizierten und erfolgreichen Protokollen 30min bis zu 24h<sup>29,31,170</sup>. Das Abklingen der Veränderungen durch HIF tritt nach circa 5 Tagen ein<sup>166</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit getesteten Intervalle von 0h bis zu 48h nach hypoxischem Reiz bis zur Cisplatinschädigung befinden sich innerhalb der Spannbreite erfolgreicher Modelle in der Literatur. Initial detektierte Präkonditionierungseffekte kamen nur bei Betrachtung der normalisierten Daten auf die Kontrollgruppe zustande, wohingegen in den Rohdaten kein Unterschied gesehen werden konnte (Abbildung 17). Das könnte daran liegen, dass es in der Kontrollgruppe unter Hypoxie zu einer leicht geringeren Proliferation gekommen ist und gemessen an dieser Kontrollgruppe anteilig mehr Zellüberleben zu detektieren war. Reduziertes Proliferationsverhalten und eine Umstellung des Metabolismus der Zellen auf einen geringeren Energieverbrauch könnten in vivo gegenüber einer Cisplatinexposition schützend wirken. Diese Beobachtung war in den Folgeversuchen jedoch nicht reproduzierbar, sodass sich kein stabiler Effekt bestätigen ließ. Die Testung hypoxischer Präkonditionierung vor dem Cisplatin-Schädigungsmodell erbrachte auch in primären Zellen keine signifikanten Unterschiede, sodass spezielle Eigenschaften von immortalisierten Zellen als Fehlerquelle nicht in Betracht gezogen wurden.

Zusammenfassend konnte durch die Übertragung der hypoxischen Präkonditionierung in die Zellkultur trotz Einhaltung bekannter Grundvoraussetzungen in diesen Versuchen keine reproduzierbare Verbesserung des Zellüberlebens festgestellt werden.



## 5.4. PPAN und MEX3C in der Hypoxieantwort und Lokalisation des Proteins PPAN in der Zelle

PPAN ist ein RNA-bindendes Protein, dass durch seine Funktionen in der Regulationen der Apoptose, des Zellzyklus, der Mitochondrien und im Reifungsprozess der rRNA<sup>73-75,171</sup> ein hohes Potenzial aufzeigt in Präkonditionierungsmechanismen eine bedeutende Rolle zu besitzen. In laborinternen Vorversuchen konnte durch einen Knock-down des homologen Proteins Brix domain containing Protein eine Verkürzung der Lebensspanne von *C. elegans* beobachtet werden.

Die Auswahl des Proteins MEX3C basierte zum einen auf der RNA-Bindungseigenschaft und zum anderen auf der bekannte Ubiquitin-Ligase-Aktivität<sup>78,84</sup> sowie auf der Beteiligung in der Hypoxie- und Ischämieantwort<sup>89,90</sup>.

Nach Knock-down der Proteine im Zellkulturmodell vor Hypoxie- und Cisplatinexposition konnte weder in den immortalisierten HKC-8-Zellen noch in den primären Zellen eine Beeinflussung des Zellüberlebens gesehen werden (Abbildung 27 und 28). Trotzdem ist eine bedeutende Rolle der Proteine in der Hypoxie sowie in der Präkonditionierung nicht auszuschließen.

Bei der Diskussion der technischen Ausführung kann angeführt werden, dass eine Verminderung der Proteinmenge durch den Knock-down durch fehlende spezifische Antikörper für das endogene Protein nicht bestimmt werden konnte. Daher besteht die Möglichkeit, dass zum Zeitpunkt der hypoxischen Präkonditionierung noch keine relevante Verminderung des Proteins eingetreten war. In der Literatur ist beschrieben, dass 48h nach Knock-down eine Reduktion um 50% des Proteins eingetreten war, wenn die Effizienz des Knock-downs bei ca. 74% auf RNA-Ebene lag<sup>75,77,171</sup>. Es ist möglich, dass der restliche Proteinbestand weiterhin seine Funktion erfüllen kann und keine Folgen des relativen Mangels auftreten. Zur Optimierung des Versuchs könnte nach Etablierung der Protein-Quantifizierung der Effekt des Knock-downs auf Proteinebene untermauert werden.

In einem weiteren Schritt wurde die Lokalisation des Proteins unter Kontrollbedingungen und Stressbedingungen erfasst, da auch eine Lokalisationsänderung einen Hinweis auf die Funktion geben kann. Dabei verdeutlichte sich eine Diskrepanz der Lokalisationsorte: Das GFP-PPAN aus dem AAV-Plasmid befand sich vor allem in den Nukleoli und in 293T Zellen zusätzlich geringfügig in den Nuklei, während 3X-FLAG-PPAN aus dem pcDNA6-Plasmid vor allem in den Nuklei unter Aussparung der Nukleoli detektiert wurde (Abbildung 23). In der Literatur wird endogenes PPAN in den Nukleoli und in Mitochondrien lokalisiert und dort auch spezifischen Funktionen zugeordnet<sup>73,75,77,171</sup>. Bei genauer Betrachtung der Eigenschaften der Fusionsproteine kann festgehalten werden, dass beide Vektoren die gleiche mutationsfreie kodierende Sequenz für die Isoform 1 des PPAN enthielten und das *Tag* in beiden Fällen am N-Terminus des PPAN-Proteins gekoppelt war. In Lokalisationsstudien an *PPAN-*

Genfragmenten konnte festgestellt werden, dass der Abschnitt für die nukleäre Lokalisation am ehesten im N-Terminus liegt und ein Importsignal in den Nucleolus am ehesten im C-Terminus zu finden ist<sup>75</sup>. In Synopsis mit publizierten Lokalisationen des endogenen PPAN-Proteins könnte angenommen werden, dass das eGFP-PPAN aus dem AAV-Plasmid den tatsächlichen Aufenthaltsort repräsentiert. Folglich müsste es im pcDNA6-Plasmid zur Störung des nukleolären Lokalisationssignals im C-Terminus in der Sekundärstruktur kommen. Zwar ist das FLAG-Tag kleiner als das GFP-Tag und sollte daher räumlich gesehen einen kleineren Störfaktor darstellen, eine beeinträchtigende Wirkung des FLAG-Tags auf den Lokalisationsort ist jedoch trotzdem grundsätzlich möglich. Die Wahl der Vektoren dürfte auf der Ebene der posttranslationalen Prozessierung keinen Einfluss mehr auf den Aufenthaltsort des produzierten Proteins haben. Eine Kontrolle der publizierten Lokalisationsorte durch Detektion des endogenen PPANs mit Hilfe eines Antikörpers wäre notwendig, um die tatsächliche Lokalisation zu kontrollieren. In der Testung der kommerziell verfügbaren PPAN-Antikörper färbten diese erneut unterschiedliche Zellkompartimente an (Nukleus ohne Nukleoli oder gesamter Nukleus mit schwachem Signal im Zytoplasma) (Abbildung 24). Bei den widersprüchlichen Ergebnissen wäre es daher notwendig, die kommerziellen Antikörper auf ihre Spezifität auf PPAN hin zu testen und nachfolgend die Unterschiede der Lokalisation je nach Vektor zu erklären.

Unter Stress konnte in dieser Arbeit keine Veränderung der Lokalisation beobachtet werden (Abbildung 25). Pfister et al. beschreiben unter Stress eine Lokalisationsänderung in das Zytoplasma und hier eine Verminderung des PPAN durch Abbau des Proteins<sup>75</sup>. Hier wurde der Stress jedoch mit Staurosporin ausgelöst, welches Apoptose induziert. Es ist anzunehmen, dass das Cisplatin im verwendeten Protokoll ausreichenden Stress auslöst, da die Induktion von Cleaved-Caspase-3 nach Cisplatinexposition bereits nachgewiesen wurde. Zudem ist der Stress morphologisch in Form von kondensierten, in der Anzahl vermehrt vorliegenden Nukleoli<sup>142,172</sup> sichtbar. Dieser Phänotyp wurde in der Literatur bereits als Mikronukleoli unter der Einwirkung von Zytostatika beschrieben<sup>142</sup>. Hypoxie allein hatte den Lokalisationsort des PPANs ebenfalls nicht verändert. Hier konnte durch wenige Stunden Hypoxie keine nachweisbare Schädigung im Sinne einer Reduktion des Zellüberlebens bei der Durchführung dieser Arbeit sowie von Weidemann et al.<sup>28</sup> beobachtet werden, sodass unklar bleibt ob der Reiz stark genug war, um eine Lokalisationsänderung hervorzurufen. Zur weiteren Beleuchtung wären Versuche am endogenen Protein mit weiteren bekannten Stressoren in diesem Zusammenhang sinnvoll.

Lokalisationsstudien konnten am Protein MEX3C nicht durchgeführt werden, da die Klonierung der DNA a.e. bei hohem GC-Gehalt nicht gelang und ein Plasmid zur Generierung eines MEX3C-Fusionsproteins nicht hergestellt werden konnte.

## 5.5. Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren im Cisplatin-Schädigungsmodell

Eine Lebensverlängerung und eine erhöhte Stressresistenz durch eine Kalorienrestriktion wurde bereits vor Dekaden in Ratten beobachtet und wird seither auf die Wirkmechanismen hin untersucht<sup>44,173</sup>. Ähnliche Effekte lassen sich ebenfalls durch eine allgemein reduzierte Aufnahme von Proteinen oder durch die Restriktion einzelner Aminosäuren wie dem Methionin erreichen<sup>40,173-175</sup>. Auf molekularer Ebene überschneiden sich die Signalwege der Kalorienrestriktion und Proteinrestriktion. In der Kalorienrestriktion sind antioxidative Mechanismen, Modulationen des Energiestoffwechsels über mTOR und AMPK sowie der Insulinsignalweg bedeutsam<sup>40,62-65,110</sup>. Aber auch Aminosäurerestriktionen wie der Methionin-Entzug beeinflussen den Insulin-Signalweg, führen zu erhöhten antioxidativen Kapazitäten gegenüber Acetaminophen<sup>69</sup> oder aktivieren im Falle von Leucin mTOR<sup>176</sup>. Dies ist bedeutsam, da nachweislich eine alleinige mTOR-Inhibition bereits zu einer Erhöhung der Lebensspanne in verschiedenen Spezies führen kann<sup>176-178</sup>.

Bei der Suche nach den beteiligten Signalwegen bei Restriktionen schwefelhaltiger Aminosäuren konnte keine Veränderung in der mTOR-Aktivität festgestellt werden (Abbildung 29). Dabei hätte mTOR durch die Bedeutung in der Erfassung des Nährstoffangebots, der Regulierungen von Zellüberleben, Wachstum und Proliferation die Vulnerabilität gegenüber einer Cisplatin-schädigung beeinflussen können<sup>56,179</sup>. Effekte über einen reduzierten Energiestatus über die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) können durch die bekannte mTOR-Steuerung der AMPK ebenfalls zurückgestellt werden<sup>179</sup>. Eine Vermittlung der Präkonditionierungseffekte durch alternative Signalwege ist möglich und von Hine et al. beschrieben<sup>71</sup>. Hier wird von einer gesteigerten Aktivität des Stoffwechselweges der Transsulfurierung ausgegangen, welcher die Bildung des Nebenproduktes H<sub>2</sub>S hervorruft, dem die schützende Wirkung zugeschrieben wird. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, ob auch in diesem Fall die Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren auch eine endogene H<sub>2</sub>S-Produktion verstärkt hat.

Der in dieser Arbeit verwendete Entzug schwefelhaltiger Aminosäuren zur Modellierung diätetischer Präkonditionierung erbrachte kein erhöhtes Zellüberleben nach einer nachfolgenden Cisplatin-schädigung. Bewertet man die gewählte Dauer der Aminosäurerestriktion, lässt sich feststellen, dass diese zwischen erfolgreichen lebenslänglichen Protokollen in Tiermodellen<sup>67-69</sup> und kurzen Protokolle über 1-3 Tage Fasten<sup>110</sup> liegt. In vitro zeigten Hine et al. Effekte bereits bei Restriktionen über Nacht<sup>71</sup>. Daher ist ein Misserfolg der Präkonditionierung nicht primär durch eine inadäquate Exposition zu erklären.

Der nächste Diskussionspunkt thematisiert die Dauer des Intervalls zwischen dem Reiz und der Cisplatinexposition. Durch das modifizierte schwefelarme Zellkulturmedium (SA-Medium)

kam es zu verlangsamtem Proliferationsverhalten in der Versuchsgruppe, welches die Messungen des Zellüberlebens beeinflusste. Daher musste nach der Restriktion ein Intervall eingebaut werden, bis beide Zellgruppen wieder ein ähnliches Proliferationsniveau erreichten, welches 6-7 Tage in Anspruch nahm. Es ist daher möglich, dass die Zeitspanne der Schutzvermittlung durch die Präkonditionierung nach 6-7 Tagen nicht mehr nachzuweisen ist. Eine Lösung dieser Problematik wäre zum einen durch Durchführung der Versuche an differenzierten Zellen oder durch eine Wahl einer spezifischeren Messmethode der Apoptose, welche die Proliferation nicht erfasst, denkbar.

### **5.6. Reproduktion eines publizierten Zellkulturmodells zur Modellierung diätetischer Präkonditionierung**

Nachdem durch Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren keine Veränderung im Zellüberleben nach Schädigung durch Cisplatin beobachtet werden konnte, erfolgte die Reproduktion eines erfolgreichen Versuchs zur Modellierung diätetischer Präkonditionierung im Zellkulturmodell von Hine et al.<sup>71</sup>. Hier wurden in der präkonditionierten Gruppe höhere Überlebensraten und niedrigere LDH-Werte im extrazellulären Überstand gezeigt, die in der Reproduktion nicht bestätigt werden konnten. In der Ursachenforschung für das negative Ergebnis kommen zum einen Ungenauigkeiten durch fehlende Informationen zum genauen Versuchsablauf in Betracht, die beispielsweise die Zelldichte der getesteten Zellen sowie genaue Zeitangaben betreffen. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine abweichende Zelldichte scheint unwahrscheinlich, da in beiden Kontrollgruppen vergleichbare Zellzahlen verwendet werden und durch die Messmethode die mögliche Anzahl an Zellen pro Well technisch limitiert ist. Es besteht zudem ein Wechsel der Messmethode zur Quantifizierung des Zellüberlebens zu Resazurin an Stelle von XTT. Bekannte Unterschiede der beiden Stoffe beziehen sich auf die Permeabilität durch Zellmembranen. XTT ist nicht membrangängig, bleibt im Nährmedium und wird durch membranständige Dehydrogenasen oder auch durch NAD(P)H aus mitochondrialen Stoffwechselforgängen reduziert<sup>180</sup>. Resazurin ist zellpermeabel und wird durch Dehydrogenasen, mitochondriale Reduktasen, NAD(P)H, aber auch durch zytoplasmatische Reduktasen reduziert<sup>181</sup>. Dabei ist der gemessene Farbumschlag beider Reaktionen proportional zur Zahl lebender Zellen<sup>180,181</sup>. Kritisch betrachtet sollten sich durch diesen Wechsel keine grundlegenden Veränderungen in der Auswertung ergeben können. Hine beschreibt zudem keine vorangehende Vorbehandlung der Zellen im Sinne einer Differenzierung. Schlussendlich verbleibt bei Verwendung der selben Zelllinie noch die Möglichkeit, dass unterschiedliche Passagen der Zelllinie zu eingeschränkter Vergleichbarkeit führen.

## 5.7. Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Übertragung der Präkonditionierung in ein Zellkulturmodell angestrebt. Die Schädigung wurde durch eine Cisplatinexposition vermittelt, die Präkonditionierung durch Hypoxie oder durch Zellkulturmedium ohne schwefelhaltige Aminosäuren. Da durch die verwendeten Protokolle kein Effekt durch die Präkonditionierung gesehen werden konnte, erfolgte die Diskussion der Teilaspekte des Zellkulturmodells.

In der vorliegenden Arbeit konnte ausgearbeitet werden, dass HKC-8-Zellen Zilien tragende, differenzierte Zellen sind und als Modell proximaler Nierentubuluszellen in Frage kommen. Auch wenn durch ein Zellkulturmodell ein komplexer Organismus mit Regelkreisen zwischen dem Immunsystem oder Veränderungen in der Blutzufuhr nicht vollends repräsentiert werden kann, verschafft es eine schnelle und einfachere Möglichkeit, in molekularbiologische Prozesse Einblick zu erhalten. Die verwendete immortalisierte Zelllinie könnte jedoch Mutationen beherbergen, die den Metabolismus in Bezug auf die untersuchten Signalwege relevant verändert haben könnten. Dies könnte im Laufe des Passagierens auch durch Generation von Subpopulationen auftreten. Ein weiterer Kritikpunkt kommt im bearbeiteten Modell dadurch zustande, dass undifferenzierte Zellen vorlagen, was einen Ansatzpunkt für künftige verbesserte Modelle darstellt. Da die Verwendung von primären Zellen ebenfalls keinen Präkonditionierungseffekt aufzeigte, kann eine ausbleibende Detektion eines Effekts nicht gänzlich an den besonderen Eigenschaften immortalisierter Zellen liegen.

Die Modellierung des akuten Nierenversagens mittels Cisplatin führt zur Apoptose und zur Hemmung der Proliferation, wobei die Proliferation in immortalisierten, proliferierenden Zellen ungleich relevanter ist als in einem differenzierten Organ. Zur Umgehung dieser Problematik wäre eine Testung anderer Stressoren, wie beispielsweise  $H_2O_2$ , möglich.

Ein besonders wichtiger Teilaspekt zur Verbesserung des Modells ist die Etablierung einer spezifischen Messmethode zur Messung der Schädigung. Wie bereits vorgeschlagen, könnte durch die Bestimmung der Cytochrom-C-Freisetzung ins Zytosol, den Abbau des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins oder durch fluorometrische Tests der Caspase-3-Aktivität die Apoptose spezifischer gemessen werden. Dadurch würde das Proliferationssignal der gesunden Zellen nicht gemessen werden und kleinere Effekte in der Schädigung könnten besser aufgedeckt werden.

Um die Zellen zu präkonditionieren könnten Optimierungen in den Protokollen getestet werden. Weitere Protokolle, die möglicherweise Effekte hervorbringen könnten wären beispielsweise intermittierende Hypoxien<sup>27,29,107</sup> oder die Testung weiterer Zeitintervalle nach Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren.

In der Literatur gibt es multiple Hinweise dafür, dass die verschiedenen Reize, welche eine Präkonditionierung erreichen können, sich in ihren Signalwegen überschneiden und gegenseitig modulieren können<sup>182</sup>. Es ist bekannt, dass mTOR auch HIF reguliert<sup>35,45</sup> oder eine Hypoxie zur Enthemmung der Cystathione-gamma-lyase führt und somit zu erhöhten H<sub>2</sub>S-Spiegeln führen kann<sup>166</sup>. Hine hatte H<sub>2</sub>S als zentralen Mediator für die Präkonditionierung durch den Entzug schwefelhaltiger Aminosäuren identifiziert<sup>71</sup>. In der Literatur konnte bereits mehrfach ein positiver Effekt für Präkonditionierung durch H<sub>2</sub>S gezeigt werden<sup>183-185</sup>. Aus diesem Argument heraus könnte H<sub>2</sub>S ebenfalls in diesem Modell auf seine Wirkung im Zellkulturmodell getestet werden. Zusammenfassend können verschiedene Reize so am Ende zum selben Präkonditionierungseffekt führen<sup>21</sup> und Kandidat für ein erfolgreiches Präkonditionierungsmodell sein.

Zur Untersuchung der Proteine PPAN und MEX3C und ihrer Rolle als mögliche Regulatoren der Hypoxieantwort konnte die hypoxische Präkonditionierung und das Cisplatin-Schädigungsmodell an Zellen nach erfolgreichem Knock-down beider Proteine getestet werden. Hierdurch konnte jedoch keine Beeinflussung des Überlebens erreicht werden. Knock-out-Zelllinien könnten dafür sorgen, dass keine Rest-Proteinbestände vorliegen würden und die Bedeutung der Proteinminderung nicht verschleiern. Durch die Generation einer HKC-8-Zelllinie mit stabiler Integration des GFP-markierten PPAN-Gens konnten zudem Lokalisationsstudien durchgeführt werden. Diese sollten jedoch am endogenen Protein wiederholt werden, um die widersprüchlichen Aussagen in dieser Arbeit beantworten zu können. Lokalisationsstudien am Protein MEX3C fehlen bei technischen Schwierigkeiten in der Amplifikation der MEX3C-DNA, die zur Generierung einer stabilen Zelllinie notwendig ist.

Trotz der Hürden, die bei der Konzeption eines Zellkulturmodells der Präkonditionierung vor Nierenzellschädigung entstanden sind, wäre die Bearbeitung und Lösung der beschriebenen Problematiken sinnvoll. In diesem Fall wäre die Untersuchung der molekularen Vorgänge bei Präkonditionierung möglich, die zur Klärung der genauen Mechanismen des Präkonditionierungseffekts notwendig ist. Trotz laufender Forschung an Tiermodellen mit Vorteilen in Bezug auf systemische Prozesse würde durch ein Zellkulturmodell ein höherer Durchsatz an Versuchen an einzelnen Faktoren möglich sein. Durch die geschaffene Grundlage könnten nachfolgend Hypothesen mit hohem Potenzial in Tiermodellen fokussiert analysiert werden. Das Ziel der Entschlüsselung des Präkonditionierungseffektes bleibt die Übertragung des Wissens in die humane Medizin und die Prävention antizipierbarer Schäden durch das Eingreifen in den humanen Metabolismus.

## 6. Literaturverzeichnis

1. AAV-CAGGS-eGFP (Plasmid #22212). 2022. addgene-plasmid-22212-sequence-10179-map.png (accessed 17.09.2022).
2. Art SSM. Nephron (3). [https://smart.servier.com/wp-content/uploads/2016/10/Urinary\\_system.ppt](https://smart.servier.com/wp-content/uploads/2016/10/Urinary_system.ppt) (accessed 01.08.2022).
3. Fahlke C, Linke W, Raßler B, Wiesner R. Taschenatlas Physiologie. 2 ed. München: Elsevier GmbH; 2015.
4. Arasteh K, Baenkler H-W, Bieber C, et al. Duale Reihe Innere Medizin. 3 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2013.
5. Art SSM. Endothelium. [https://smart.servier.com/wp-content/uploads/2016/10/Arteries\\_physiology.ppt](https://smart.servier.com/wp-content/uploads/2016/10/Arteries_physiology.ppt) (accessed 01.09.2022).
6. Art SSM. Smooth muscle cells. [https://smart.servier.com/wp-content/uploads/2016/10/Arteries\\_physiology.ppt](https://smart.servier.com/wp-content/uploads/2016/10/Arteries_physiology.ppt) (accessed 01.09.2022).
7. Wang B, Li ZL, Zhang YL, Wen Y, Gao YM, Liu BC. Hypoxia and chronic kidney disease. *EBioMedicine* 2022; **77**: 103942.
8. Zhang W, Edwards A. Oxygen transport across vasa recta in the renal medulla. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; **283**(3): H1042-55.
9. Doi K, Nishida O, Shigematsu T, et al. The Japanese Clinical Practice Guideline for acute kidney injury 2016. *J Intensive Care* 2018; **6**: 48.
10. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest* 2011; **121**(11): 4210-21.
11. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol* 1998; **275**(5): F623-31.
12. Bagnasco S, Good D, Balaban R, Burg M. Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *Am J Physiol* 1985; **248**(4 Pt 2): F522-6.
13. Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury. *Compr Physiol* 2012; **2**(2): 1303-53.
14. Ashworth SL, Molitoris BA. Pathophysiology and functional significance of apical membrane disruption during ischemia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; **8**(4): 449-58.
15. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *Lancet* 2019; **394**(10212): 1949-64.
16. Al-Jaghbeer M, Dealmeida D, Bilderback A, Ambrosino R, Kellum JA. Clinical Decision Support for In-Hospital AKI. *J Am Soc Nephrol* 2018; **29**(2): 654-60.
17. Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med* 2015; **41**(8): 1411-23.
18. Kellum JA, Chawla LS, Keener C, et al. The Effects of Alternative Resuscitation Strategies on Acute Kidney Injury in Patients with Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; **193**(3): 281-7.
19. Weisbord SD, Gallagher M, Jneid H, et al. Outcomes after Angiography with Sodium Bicarbonate and Acetylcysteine. *N Engl J Med* 2018; **378**(7): 603-14.
20. Chen H, Busse LW. Novel Therapies for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Rep* 2017; **2**(5): 785-99.
21. Späth MR, Bartram MP, Palacio-Escat N, et al. The proteome microenvironment determines the protective effect of preconditioning in cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney Int* 2019; **95**(2): 333-49.
22. Saadat-Gilani K, Zarbock A. Perioperative renal protection. *Curr Opin Crit Care* 2021; **27**(6): 676-85.
23. Grundmann F, Müller RU, Reppenhorst A, et al. Preoperative Short-Term Calorie Restriction for Prevention of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery: A Randomized, Controlled, Open-Label, Pilot Trial. *J Am Heart Assoc* 2018; **7**(6).
24. Grundmann F, Müller RU, Hoyer-Allo KJR, et al. Dietary restriction for prevention of contrast-induced acute kidney injury in patients undergoing percutaneous coronary angiography: a randomized controlled trial. *Sci Rep* 2020; **10**(1): 5202.

25. Osterholt T, Gloistein C, Todorova P, et al. Preoperative Short-Term Restriction of Sulfur-Containing Amino Acid Intake for Prevention of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery: A Randomized, Controlled, Double-Blind, Translational Trial. *J Am Heart Assoc* 2022; **11**(17): e025229.
26. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; **74**(5): 1124-36.
27. Joo JD, Kim M, D'Agati VD, Lee HT. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 2006; **17**(11): 3115-23.
28. Weidemann A, Bernhardt WM, Klanke B, et al. HIF activation protects from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**(3): 486-94.
29. Li JR, Ou YC, Wu CC, et al. Ischemic preconditioning improved renal ischemia/reperfusion injury and hyperglycemia. *IUBMB Life* 2019; **71**(3): 321-9.
30. Park KM, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem* 2001; **276**(15): 11870-6.
31. Ateş E, Genç E, Erkasap N, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats. *Transplantation* 2002; **74**(9): 1247-51.
32. Crowley LE, McIntyre CW. Remote ischaemic conditioning-therapeutic opportunities in renal medicine. *Nat Rev Nephrol* 2013; **9**(12): 739-46.
33. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; **12**(12): 5447-54.
34. Rosenberger C, Mandriota S, Jürgensen JS, et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in hypoxic and ischemic rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**(7): 1721-32.
35. Schödel J, Ratcliffe PJ. Mechanisms of hypoxia signalling: new implications for nephrology. *Nat Rev Nephrol* 2019; **15**(10): 641-59.
36. Kapitsinou PP, Haase VH. Molecular mechanisms of ischemic preconditioning in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2015; **309**(10): F821-34.
37. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**(12): 5510-4.
38. Verges S, Chacaroun S, Godin-Ribuot D, Baillieux S. Hypoxic Conditioning as a New Therapeutic Modality. *Front Pediatr* 2015; **3**: 58.
39. Yang CC, Lin LC, Wu MS, Chien CT, Lai MK. Repetitive hypoxic preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion induced oxidative injury via upregulating HIF-1 alpha-dependent bcl-2 signaling. *Transplantation* 2009; **88**(11): 1251-60.
40. Späth MR, Koehler FC, Hoyer-Allo KJR, Grundmann F, Burst V, Müller RU. Preconditioning strategies to prevent acute kidney injury. *F1000Res* 2020; **9**.
41. Daly PJ, Docherty NG, Healy DA, McGuire BB, Fitzpatrick JM, Watson RW. The single insult of hypoxic preconditioning induces an antiapoptotic response in human proximal tubular cells, in vitro, across cold storage. *BJU Int* 2009; **103**(2): 254-9.
42. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; **3**(10): 721-32.
43. Nagao A, Kobayashi M, Koyasu S, Chow CCT, Harada H. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(2).
44. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. 1935. *Nutrition* 1989; **5**(3): 155-71; discussion 72.
45. Ristow M, Schmeisser K. Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS). *Dose Response* 2014; **12**(2): 288-341.
46. Lin SJ, Kaeberlein M, Andalis AA, et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 2002; **418**(6895): 344-8.
47. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M. Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 2007; **6**(4): 280-93.



48. Iwasaki K, Gleiser CA, Masoro EJ, McMahan CA, Seo EJ, Yu BP. Influence of the restriction of individual dietary components on longevity and age-related disease of Fischer rats: the fat component and the mineral component. *J Gerontol* 1988; **43**(1): B13-21.
49. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; **11**(3): 298-300.
50. Brown-Borg HM. Longevity in mice: is stress resistance a common factor? *Age (Dordr)* 2006; **28**(2): 145-62.
51. Sinclair DA. Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**(9): 987-1002.
52. Tapia PC. Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Med Hypotheses* 2006; **66**(4): 832-43.
53. Lee BC, Kaya A, Gladyshev VN. Methionine restriction and life-span control. *Ann N Y Acad Sci* 2016; **1363**: 116-24.
54. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2007; **297**(8): 842-57.
55. Lonn E, Bosch J, Yusuf S, et al. Effects of long-term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2005; **293**(11): 1338-47.
56. Hwangbo DS, Lee HY, Abozaid LS, Min KJ. Mechanisms of Lifespan Regulation by Calorie Restriction and Intermittent Fasting in Model Organisms. *Nutrients* 2020; **12**(4).
57. Lee JM, Calkins MJ, Chan K, Kan YW, Johnson JA. Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis. *J Biol Chem* 2003; **278**(14): 12029-38.
58. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**(8): 545-55.
59. Anckar J, Sistonen L. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu Rev Biochem* 2011; **80**: 1089-115.
60. Brown-Borg HM, Rakoczy SG, Uthus EO. Growth hormone alters methionine and glutathione metabolism in Ames dwarf mice. *Mech Ageing Dev* 2005; **126**(3): 389-98.
61. Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, et al. The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell* 2015; **14**(4): 707-9.
62. Greer EL, Dowlatshahi D, Banko MR, et al. An AMPK-FOXO pathway mediates longevity induced by a novel method of dietary restriction in *C. elegans*. *Curr Biol* 2007; **17**(19): 1646-56.
63. Apfeld J, O'Connor G, McDonagh T, DiStefano PS, Curtis R. The AMP-activated protein kinase AAK-2 links energy levels and insulin-like signals to lifespan in *C. elegans*. *Genes Dev* 2004; **18**(24): 3004-9.
64. Weir HJ, Yao P, Huynh FK, et al. Dietary Restriction and AMPK Increase Lifespan via Mitochondrial Network and Peroxisome Remodeling. *Cell Metab* 2017; **26**(6): 884-96.e5.
65. Mair W, Morantte I, Rodrigues AP, et al. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTCL-1 and CREB. *Nature* 2011; **470**(7334): 404-8.
66. Lee C, Safdie FM, Raffaghello L, et al. Reduced levels of IGF-I mediate differential protection of normal and cancer cells in response to fasting and improve chemotherapeutic index. *Cancer Res* 2010; **70**(4): 1564-72.
67. Zimmerman JA, Malloy V, Krajcik R, Orentreich N. Nutritional control of aging. *Exp Gerontol* 2003; **38**(1-2): 47-52.
68. Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr* 1993; **123**(2): 269-74.
69. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. *Aging Cell* 2005; **4**(3): 119-25.

70. Johnson JE, Johnson FB. Methionine restriction activates the retrograde response and confers both stress tolerance and lifespan extension to yeast, mouse and human cells. *PLoS One* 2014; **9**(5): e97729.
71. Hine C, Harputlugil E, Zhang Y, et al. Endogenous hydrogen sulfide production is essential for dietary restriction benefits. *Cell* 2015; **160**(1-2): 132-44.
72. Ignarski M, Rill C, Kaiser RWJ, et al. The RNA-Protein Interactome of Differentiated Kidney Tubular Epithelial Cells. *J Am Soc Nephrol* 2019; **30**(4): 564-76.
73. Bugner V, Tecza A, Gessert S, Kühl M. Peter Pan functions independently of its role in ribosome biogenesis during early eye and craniofacial cartilage development in *Xenopus laevis*. *Development* 2011; **138**(11): 2369-78.
74. Fatica A, Cronshaw AD, Dlakić M, Tollervey D. Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell* 2002; **9**(2): 341-51.
75. Pfister AS, Keil M, Kühl M. The Wnt Target Protein Peter Pan Defines a Novel p53-independent Nucleolar Stress-Response Pathway. *J Biol Chem* 2015; **290**(17): 10905-18.
76. Dannheisig DP, Schimansky A, Donow C, Pfister AS. Nucleolar Stress Functions Upstream to Stimulate Expression of Autophagy Regulators. *Cancers (Basel)* 2021; **13**(24).
77. Keil M, Meyer MT, Dannheisig DP, Maerz LD, Philipp M, Pfister AS. Loss of Peter Pan protein is associated with cell cycle defects and apoptotic events. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2019; **1866**(5): 882-95.
78. Moududee SA, Jiang Y, Gilbert N, et al. Structural and functional characterization of hMEX-3C Ring finger domain as an E3 ubiquitin ligase. *Protein Sci* 2018; **27**(9): 1661-9.
79. Cano F, Rapiteanu R, Sebastiaan Winkler G, Lehner PJ. A non-proteolytic role for ubiquitin in deadenylation of MHC-I mRNA by the RNA-binding E3-ligase MEX-3C. *Nat Commun* 2015; **6**: 8670.
80. Ruhl R, Rana S, Kelley K, et al. microRNA-451a regulates colorectal cancer proliferation in response to radiation. *BMC Cancer* 2018; **18**(1): 517.
81. Zhang J, Zhou YJ, Yu ZH, et al. Identification of core genes and clinical roles in pregnancy-associated breast cancer based on integrated analysis of different microarray profile datasets. *Biosci Rep* 2019; **39**(6).
82. Burrell RA, McClelland SE, Endesfelder D, et al. Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature* 2013; **494**(7438): 492-6.
83. Okamoto M, Kouwaki T, Fukushima Y, Oshiumi H. Regulation of RIG-I Activation by K63-Linked Polyubiquitination. *Front Immunol* 2017; **8**: 1942.
84. Kuniyoshi K, Takeuchi O, Pandey S, et al. Pivotal role of RNA-binding E3 ubiquitin ligase MEX3C in RIG-I-mediated antiviral innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; **111**(15): 5646-51.
85. Cano F, Lehner PJ. A novel post-transcriptional role for ubiquitin in the differential regulation of MHC class I allotypes. *Mol Immunol* 2013; **55**(2): 135-8.
86. Huang K, Liu D, Su C. Circ\_0007841 accelerates ovarian cancer development through facilitating MEX3C expression by restraining miR-151-3p activity. *Aging (Albany NY)* 2021; **13**(8): 12058-66.
87. Hu Q, Li C, Wang S, et al. LncRNAs-directed PTEN enzymatic switch governs epithelial-mesenchymal transition. *Cell Res* 2019; **29**(4): 286-304.
88. Li Y, Hu Q, Li C, et al. PTEN-induced partial epithelial-mesenchymal transition drives diabetic kidney disease. *J Clin Invest* 2019; **129**(3): 1129-51.
89. Shen LS, Hu XF, Chen T, Shen GL, Cheng D. Integrated network analysis to explore the key mRNAs and lncRNAs in acute myocardial infarction. *Math Biosci Eng* 2019; **16**(6): 6426-37.
90. Wong LL, Saw EL, Lim JY, Zhou Y, Richards AM, Wang P. MicroRNA Let-7d-3p Contributes to Cardiac Protection via Targeting HMGA2. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(7).
91. Jiao Y, George SK, Zhao Q, et al. Mex3c mutation reduces adiposity and increases energy expenditure. *Mol Cell Biol* 2012; **32**(21): 4350-62.
92. Han C, Jiao Y, Zhao Q, Lu B. Mex3c mutation reduces adiposity partially through increasing physical activity. *J Endocrinol* 2014; **221**(3): 457-68.

93. Lübbers DW, Baumgärtl H. Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO<sub>2</sub> distribution in the living tissue. *Kidney Int* 1997; **51**(2): 372-80.
94. Eckardt KU, Bernhardt WM, Weidemann A, et al. Role of hypoxia in the pathogenesis of renal disease. *Kidney Int Suppl* 2005; (99): S46-51.
95. Racusen LC, Monteil C, Sgrignoli A, et al. Cell lines with extended in vitro growth potential from human renal proximal tubule: characterization, response to inducers, and comparison with established cell lines. *J Lab Clin Med* 1997; **129**(3): 318-29.
96. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 2008; **73**(9): 994-1007.
97. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Semin Nephrol* 2003; **23**(5): 460-4.
98. Beyer J, Rick O, Weinknecht S, Kingreen D, Lenz K, Siegert W. Nephrotoxicity after high-dose carboplatin, etoposide and ifosfamide in germ-cell tumors: incidence and implications for hematologic recovery and clinical outcome. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**(10): 813-9.
99. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 2014; **740**: 364-78.
100. Wei Q, Dong G, Franklin J, Dong Z. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 2007; **72**(1): 53-62.
101. Yan M, Shu S, Guo C, Tang C, Dong Z. Endoplasmic reticulum stress in ischemic and nephrotoxic acute kidney injury. *Ann Med* 2018; **50**(5): 381-90.
102. Volarevic V, Djokovic B, Jankovic MG, et al. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. *J Biomed Sci* 2019; **26**(1): 25.
103. Seth R, Yang C, Kaushal V, Shah SV, Kaushal GP. p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury. *J Biol Chem* 2005; **280**(35): 31230-9.
104. Cavalcante GC, Schaan AP, Cabral GF, et al. A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(17).
105. Zhang W, Chen C, Jing R, Liu T, Liu B. Remote Ischemic Preconditioning Protects Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury through the PTEN/AKT Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 7629396.
106. Shizukuda Y, Mallet RT, Lee SC, Downey HF. Hypoxic preconditioning of ischaemic canine myocardium. *Cardiovasc Res* 1992; **26**(5): 534-42.
107. Stowe AM, Altay T, Freie AB, Gidday JM. Repetitive hypoxia extends endogenous neurovascular protection for stroke. *Ann Neurol* 2011; **69**(6): 975-85.
108. Li K, Zhou H, Zhan L, et al. Hypoxic Preconditioning Maintains GLT-1 Against Transient Global Cerebral Ischemia Through Upregulating Cx43 and Inhibiting c-Src. *Front Mol Neurosci* 2018; **11**: 344.
109. Tanaka Y, Hosoyama T, Mikamo A, et al. Hypoxic preconditioning of human cardiosphere-derived cell sheets enhances cellular functions via activation of the PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  pathway. *Am J Transl Res* 2017; **9**(2): 664-73.
110. Mitchell JR, Verweij M, Brand K, et al. Short-term dietary restriction and fasting precondition against ischemia reperfusion injury in mice. *Aging Cell* 2010; **9**(1): 40-53.
111. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Mol Aspects Med* 2011; **32**(3): 159-221.
112. Long P, Nguyen Q, Thurow C, Broderick TL. Caloric restriction restores the cardioprotective effect of preconditioning in the rat heart. *Mech Ageing Dev* 2002; **123**(10): 1411-3.
113. Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2009; **27**(9): 851-7.
114. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; **9**(7): 676-82.
115. Lim YC, McGlashan SR, Cooling MT, Long DS. Culture and detection of primary cilia in endothelial cell models. *Cilia* 2015; **4**: 11.
116. Bartram MP, Habbig S, Pahmeyer C, et al. Three-layered proteomic characterization of a novel ACTN4 mutation unravels its pathogenic potential in FSGS. *Hum Mol Genet* 2016; **25**(6): 1152-64.

117. pcDNA6-3XFLAG- Axin1. 2019. <https://www.addgene.org/123463/> (accessed 14.11.2022).
118. Choi JH, Zhong X, McAlpine W, et al. LMBR1L regulates lymphopoiesis through Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Science* 2019; **364**(6440).
119. Boettcher M, McManus MT. Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR. *Mol Cell* 2015; **58**(4): 575-85.
120. Volobueva AS, Orekhov AN, Deykin AV. An update on the tools for creating transgenic animal models of human diseases - focus on atherosclerosis. *Braz J Med Biol Res* 2019; **52**(5): e8108.
121. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* 2005; **5**(2): 209-19.
122. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 2005; **6**(4): 279-84.
123. Madias NE, Harrington JT. Platinum nephrotoxicity. *Am J Med* 1978; **65**(2): 307-14.
124. Chen X, An Y, Gao Y, et al. Rare Deleterious PARD3 Variants in the aPKC-Binding Region are Implicated in the Pathogenesis of Human Cranial Neural Tube Defects Via Disrupting Apical Tight Junction Formation. *Hum Mutat* 2017; **38**(4): 378-89.
125. Hao S, He W, Li Y, et al. Targeted inhibition of  $\beta$ -catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2011; **22**(9): 1642-53.
126. Anvarian Z, Mykityn K, Mukhopadhyay S, Pedersen LB, Christensen ST. Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019; **15**(4): 199-219.
127. Deane JA, Verghese E, Martelotto LG, et al. Visualizing renal primary cilia. *Nephrology (Carlton)* 2013; **18**(3): 161-8.
128. Goto H, Inoko A, Inagaki M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. *Cell Mol Life Sci* 2013; **70**(20): 3893-905.
129. Plevoda B, Sherman F. The diversity of acetylated proteins. *Genome Biology* 2002; **3**(5): reviews0006.1.
130. Jurczyk A, Gromley A, Redick S, et al. Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *J Cell Biol* 2004; **166**(5): 637-43.
131. Humbert MC, Weihbrecht K, Searby CC, et al. ARL13B, PDE6D, and CEP164 form a functional network for INPP5E ciliary targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**(48): 19691-6.
132. Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, et al. Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J Cell Biol* 2000; **151**(3): 709-18.
133. Perše M, Večerić-Haler Ž. Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *Biomed Res Int* 2018; **2018**: 1462802.
134. Ramesh G, Ranganathan P. Mouse models and methods for studying human disease, acute kidney injury (AKI). *Methods Mol Biol* 2014; **1194**: 421-36.
135. Bejoy J, Qian ES, Woodard LE. Tissue Culture Models of AKI: From Tubule Cells to Human Kidney Organoids. *J Am Soc Nephrol* 2022; **33**(3): 487-501.
136. Andrés-Sánchez N, Fisher D, Krasinska L. Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. *J Cell Sci* 2022; **135**(11).
137. Jeruc J, Vizjak A, Rozman B, Ferluga D. Immunohistochemical expression of activated caspase-3 as a marker of apoptosis in glomeruli of human lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2006; **48**(3): 410-8.
138. Gown AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem* 2002; **50**(4): 449-54.
139. Kavanagh E, Rodhe J, Burguillos MA, Venero JL, Joseph B. Regulation of caspase-3 processing by cIAP2 controls the switch between pro-inflammatory activation and cell death in microglia. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1565.
140. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* 2002; **62**(1): 237-44.
141. Yin C, Wang N. Kidney injury molecule-1 in kidney disease. *Ren Fail* 2016; **38**(10): 1567-73.

142. Horký M, Kotala V, Anton M, Wesierska-Gadek J. Nucleolus and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **973**: 258-64.
143. Weichhart T. Mammalian target of rapamycin: a signaling kinase for every aspect of cellular life. *Methods Mol Biol* 2012; **821**: 1-14.
144. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 1983; **64**(3): 313-20.
145. Veland IR, Awan A, Pedersen LB, Yoder BK, Christensen ST. Primary cilia and signaling pathways in mammalian development, health and disease. *Nephron Physiol* 2009; **111**(3): p39-53.
146. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc* 2012; **7**(12): 2080-9.
147. Terada Y, Inoue K, Matsumoto T, et al. 5-Aminolevulinic acid protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising the anticancer efficiency of cisplatin in rats in vitro and in vivo. *PLoS One* 2013; **8**(12): e80850.
148. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 1996; **270**(4 Pt 2): F700-8.
149. Wu Y, Connors D, Barber L, Jayachandra S, Hanumegowda UM, Adams SP. Multiplexed assay panel of cytotoxicity in HK-2 cells for detection of renal proximal tubule injury potential of compounds. *Toxicol In Vitro* 2009; **23**(6): 1170-8.
150. Rota C, Imberti B, Pozzobon M, et al. Human amniotic fluid stem cell preconditioning improves their regenerative potential. *Stem Cells Dev* 2012; **21**(11): 1911-23.
151. Walzl A, Unger C, Kramer N, et al. The Resazurin Reduction Assay Can Distinguish Cytotoxic from Cytostatic Compounds in Spheroid Screening Assays. *J Biomol Screen* 2014; **19**(7): 1047-59.
152. Tanase DM, Gosav EM, Radu S, et al. The Predictive Role of the Biomarker Kidney Molecule-1 (KIM-1) in Acute Kidney Injury (AKI) Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(20).
153. Arthur JM, Hill EG, Alge JL, et al. Evaluation of 32 urine biomarkers to predict the progression of acute kidney injury after cardiac surgery. *Kidney Int* 2014; **85**(2): 431-8.
154. Wang X, Grunz-Borgmann EA, Parrish AR. Loss of  $\alpha$ (E)-catenin potentiates cisplatin-induced nephrotoxicity via increasing apoptosis in renal tubular epithelial cells. *Toxicol Sci* 2014; **141**(1): 254-62.
155. Wiraja C, Mori Y, Ichimura T, Hwang J, Xu C, Bonventre JV. Nephrotoxicity Assessment with Human Kidney Tubuloids using Spherical Nucleic Acid-Based mRNA Nanoflares. *Nano Lett* 2021; **21**(13): 5850-8.
156. Kokura K, Kuromi Y, Endo T, et al. A kidney injury molecule-1 (Kim-1) gene reporter in a mouse artificial chromosome: the responsiveness to cisplatin toxicity in immortalized mouse kidney S3 cells. *J Gene Med* 2016; **18**(10): 273-81.
157. Huang JX, Kaeslin G, Ranall MV, et al. Evaluation of biomarkers for in vitro prediction of drug-induced nephrotoxicity: comparison of HK-2, immortalized human proximal tubule epithelial, and primary cultures of human proximal tubular cells. *Pharmacol Res Perspect* 2015; **3**(3): e00148.
158. Benedetti G, Fredriksson L, Herpers B, Meerman J, van de Water B, de Graauw M. TNF- $\alpha$ -mediated NF- $\kappa$ B survival signaling impairment by cisplatin enhances JNK activation allowing synergistic apoptosis of renal proximal tubular cells. *Biochem Pharmacol* 2013; **85**(2): 274-86.
159. Wang Z, Schley G, Türkoglu G, et al. The protective effect of prolyl-hydroxylase inhibition against renal ischaemia requires application prior to ischaemia but is superior to EPO treatment. *Nephrol Dial Transplant* 2012; **27**(3): 929-36.
160. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, et al. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res* 2008; **77**(3): 463-70.
161. Kimura K, Iwano M, Higgins DF, et al. Stable expression of HIF-1alpha in tubular epithelial cells promotes interstitial fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; **295**(4): F1023-9.
162. Rankin EB, Tomaszewski JE, Haase VH. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res* 2006; **66**(5): 2576-83.
163. Wenger RH, Kurtcuoglu V, Scholz CC, Marti HH, Hoogewijs D. Frequently asked questions in hypoxia research. *Hypoxia (Auckl)* 2015; **3**: 35-43.

164. Wolff M, Fandrey J, Jelkmann W. Microelectrode measurements of pericellular PO<sub>2</sub> in erythropoietin-producing human hepatoma cell cultures. *Am J Physiol* 1993; **265**(5 Pt 1): C1266-70.
165. Stiehl DP, Wirthner R, Köditz J, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem* 2006; **281**(33): 23482-91.
166. Keeley TP, Mann GE. Defining Physiological Normoxia for Improved Translation of Cell Physiology to Animal Models and Humans. *Physiol Rev* 2019; **99**(1): 161-234.
167. Koivunen P, Hirsilä M, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. *J Biol Chem* 2004; **279**(11): 9899-904.
168. Hirsilä M, Koivunen P, Günzler V, Kivirikko KI, Myllyharju J. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 2003; **278**(33): 30772-80.
169. Ribatti D, Presta M, Vacca A, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 1999; **93**(8): 2627-36.
170. Xie Y, Jiang D, Xiao J, et al. Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion-induced kidney injury by activating autophagy via the SGK1 signaling pathway. *Cell Death Dis* 2018; **9**(3): 338.
171. Dannheisig DP, Beck E, Calzia E, Walther P, Behrends C, Pfister AS. Loss of Peter Pan (PPAN) Affects Mitochondrial Homeostasis and Autophagic Flux. *Cells* 2019; **8**(8).
172. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert FM, Lamond AI. The nucleolus under stress. *Mol Cell* 2010; **40**(2): 216-27.
173. Peng W, Robertson L, Gallinetti J, et al. Surgical stress resistance induced by single amino acid deprivation requires Gcn2 in mice. *Sci Transl Med* 2012; **4**(118): 118ra11.
174. Guo F, Cavener DR. The GCN2 eIF2 $\alpha$  kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell Metab* 2007; **5**(2): 103-14.
175. Kamata S, Yamamoto J, Kamijo K, et al. Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. *Mol Nutr Food Res* 2014; **58**(6): 1309-21.
176. Hill CM, Kaeberlein M. Anti-ageing effects of protein restriction unpacked. *Nature* 2021; **589**(7842): 357-8.
177. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; **460**(7253): 392-5.
178. Wilkinson JE, Burmeister L, Brooks SV, et al. Rapamycin slows aging in mice. *Aging Cell* 2012; **11**(4): 675-82.
179. Polak P, Hall MN. mTOR and the control of whole body metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 2009; **21**(2): 209-18.
180. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* 2018; **120**(3): 159-67.
181. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 2012; **12**(9): 12347-60.
182. Koehler FC, Fu CY, Späth MR, et al. A systematic analysis of diet-induced nephroprotection reveals overlapping changes in cysteine catabolism. *Transl Res* 2022.
183. Pan TT, Chen YQ, Bian JS. All in the timing: a comparison between the cardioprotection induced by H<sub>2</sub>S preconditioning and post-infarction treatment. *Eur J Pharmacol* 2009; **616**(1-3): 160-5.
184. Ji K, Xue L, Cheng J, Bai Y. Preconditioning of H<sub>2</sub>S inhalation protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by induction of HSP70 through PI3K/Akt/Nrf2 pathway. *Brain Res Bull* 2016; **121**: 68-74.
185. Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. The role of gasotransmitters NO, H<sub>2</sub>S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *Br J Pharmacol* 2015; **172**(6): 1587-606.

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Nephrons.....	13
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Nierenkörperchens.....	14
Abbildung 3: Regulation der Proteine MEX3C und PPAN durch Cisplatin oder Hypoxie .....	19
Abbildung 4: Plasmidkarte des Vektors AAV-CAGGS-EGFP .....	43
Abbildung 5: Plasmidkarte des Vektors pcDNA6-3xFLAG-PPAN.....	44
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips der Integrations-PCR. ....	49
Abbildung 7: HKC-8-Zellen bilden Marker für Zell-Zellkontakte aus. ....	55
Abbildung 8: HKC-8-Zellen bilden Zilien aus.....	57
Abbildung 9: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Cisplatin und den Zelllinien HKC-8 und HK2.....	58
Abbildung 10: Messung des Zellüberlebens mit XTT bei hohen Zellzahlen.....	59
Abbildung 11: Zellzahlen vor und nach Cisplatinexposition. ....	60
Abbildung 12: Cisplatin verringert Expression des Proliferationsmarkers Ki-67. ....	61
Abbildung 13: Aktivierte Caspase-3 durch Cisplatin. ....	61
Abbildung 14: Stabilisierung von HIF1 $\alpha$ in Hypoxie. ....	62
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur hypoxischen Präkonditionierung.....	63
Abbildung 16: Etablierung der Hypoxiedauer und Regenerationszeit.....	63
Abbildung 17: Optimierung der Dauer des hypoxischen Reizes und des Intervalls bis zur Schädigung.....	64
Abbildung 18: Cisplatin-Schädigungsmodell mit hypoxischer Präkonditionierung in HKC-8-Zellen.....	65
Abbildung 19: KIM1-mRNA in HKC-8-Zellen ist nach Cisplatinexposition verringert. ..	66
Abbildung 20: Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Cisplatin und renalen Primärzellen. .....	66
Abbildung 21: Cisplatin-Schädigungsmodell mit renalen Primärzellen. ....	67
Abbildung 22: PPAN-Lokalisation in transgenen humanen Zelllinien. ....	68
Abbildung 23: PPAN-Fusionsproteine weisen je nach Tag und Vektor einen anderen Lokalisationsort auf. ....	69
Abbildung 24: Lokalisation von endogenem PPAN.....	69
Abbildung 25: PPAN-Lokalisation unter Stresseinwirkung durch Hypoxie und Cisplatin. .....	71

<b>Abbildung 26: Schematischer Versuchsablauf: Knock-down PPAN oder MEX3C vor Cisplatin-Schädigungsmodell und hypoxischer Vorbehandlung.....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 27: Knock-down der Proteine PPAN oder MEX3C im Cisplatin-Schädigungsmodell mit hypoxischer Vorbehandlung in HKC-8-Zellen.....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 28: Knock-down von PPAN oder MEX3C ändert nicht die Resistenz in renalen Primärzellen gegenüber einer Schädigung durch Cisplatin. ....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 29: Schwefelarmes RPMI Medium ändert nicht die mTor Aktivität.....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildung 30: Schematische Darstellung: Präkonditionierung durch schwefelarmes RPMI Medium im Cisplatin-Schädigungsmodell. ....</b>	<b>77</b>
<b>Abbildung 31: Auswirkung der Restriktion schwefelhaltiger Aminosäuren auf Cisplatinschaden.....</b>	<b>77</b>
<b>Abbildung 32: Reproduktion eines publizierten Schädigungsmodells.....</b>	<b>78</b>



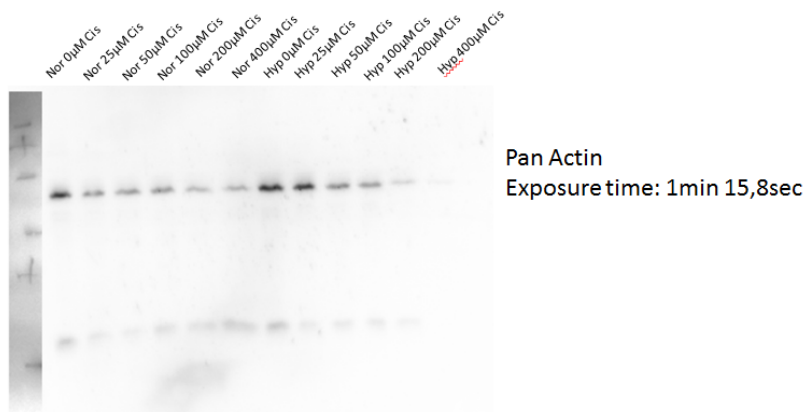
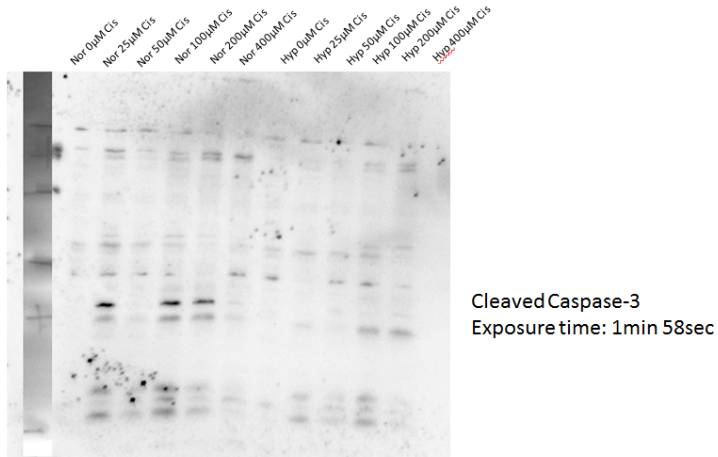
## 7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	27
Tabelle 2: Restriktionsenzyme .....	27
Tabelle 3: Plasmide .....	27
Tabelle 4: Puffer und Lösungen.....	29
Tabelle 5: Bakterien.....	29
Tabelle 6: siRNA .....	30
Tabelle 7: Zelllinien .....	30
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien .....	32
Tabelle 9: Geräte.....	33
Tabelle 10: PCR-Primer.....	34
Tabelle 11: qPCR-Primer.....	34
Tabelle 12: Primärantikörper .....	35
Tabelle 13: Sekundärantikörper .....	36
Tabelle 14: Software.....	36
Tabelle 15: Nutzung von externen Instituten .....	37
Tabelle 16: Q5-PCR .....	41
Tabelle 17: PCR-Zyklen für PCR mit Q5-Polymerase.....	41
Tabelle 18: Gelelektrophorese .....	41
Tabelle 19: MluI- und NotI-Verdau.....	42
Tabelle 20: BpI-Verdau .....	45
Tabelle 21: Ligationsansatz.....	45
Tabelle 22: BigDye-Pipettierschema.....	47
Tabelle 23: BigDye-PCR-Protokoll .....	47
Tabelle 24: CaPO <sub>4</sub> -Transfektionslösung .....	47
Tabelle 25: Transfektion mit Lipofectamine 2000 DNA Transfection Reagent.....	47
Tabelle 26: Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX für siRNA .....	48
Tabelle 27: Reagenzien zur Zellaufbereitung für Western Blot.....	51
Tabelle 28: Trenngel.....	51
Tabelle 29: Sammelgel .....	52

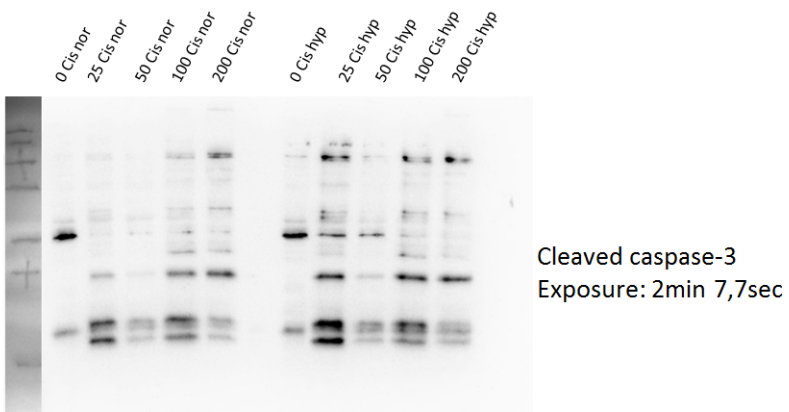
### 7.3. Abbildungen im Anhang

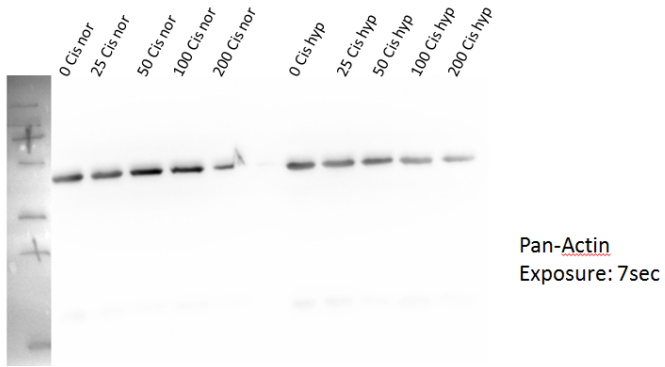
#### 7.3.1. Originale Western Blots zu Abbildung 13

Nr. 1

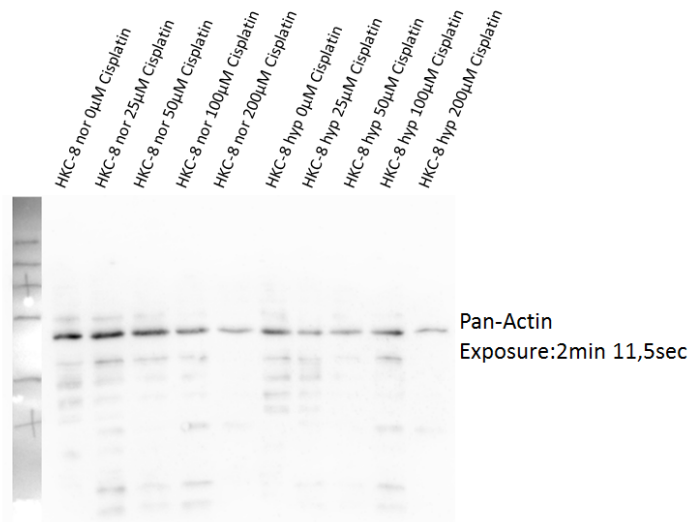
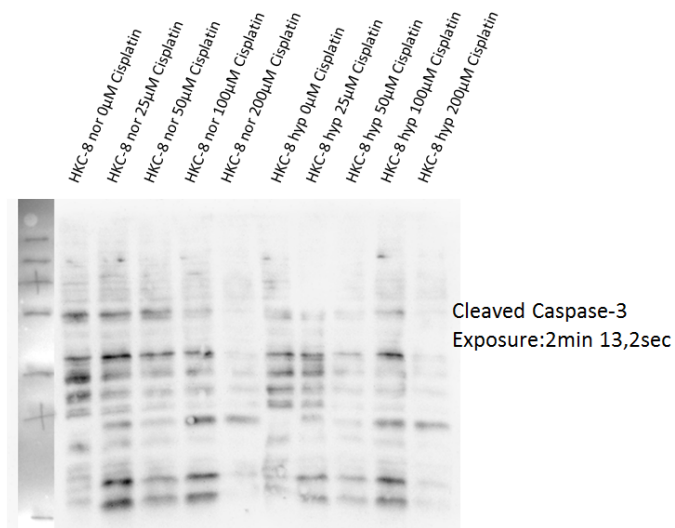


Nr. 2



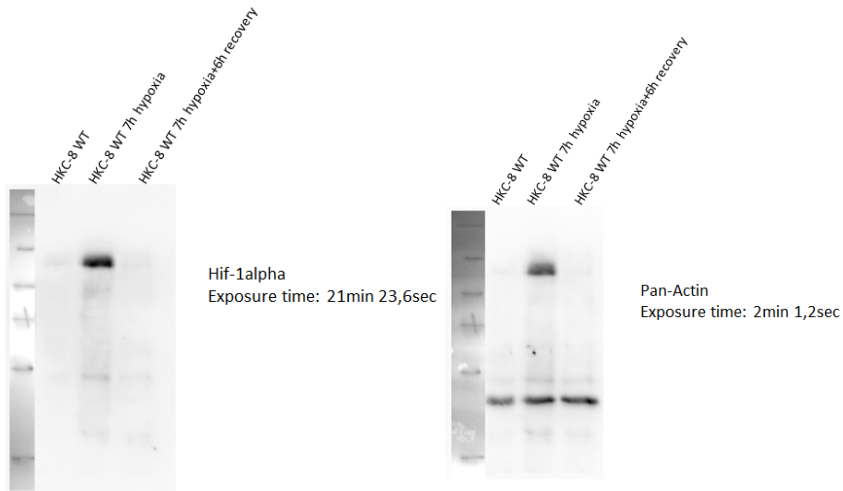


Nr. 3

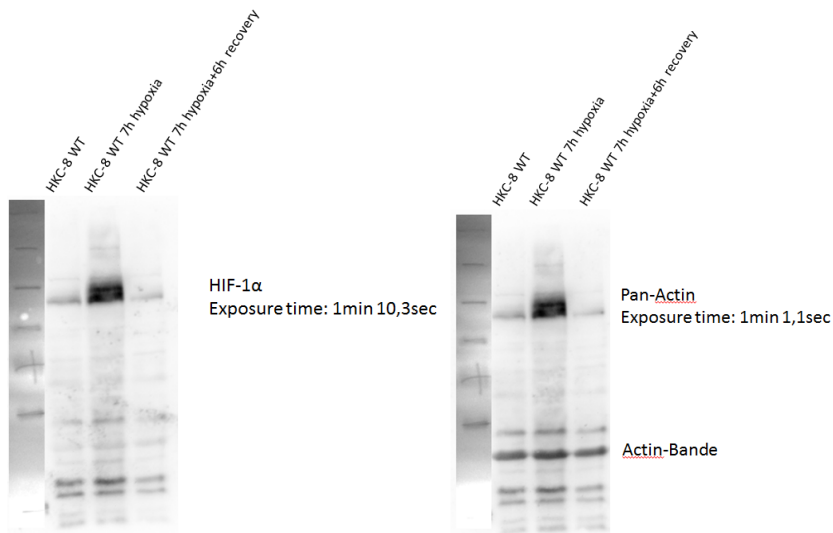


### 7.3.2. Originale Western Blots zu Abbildung 14

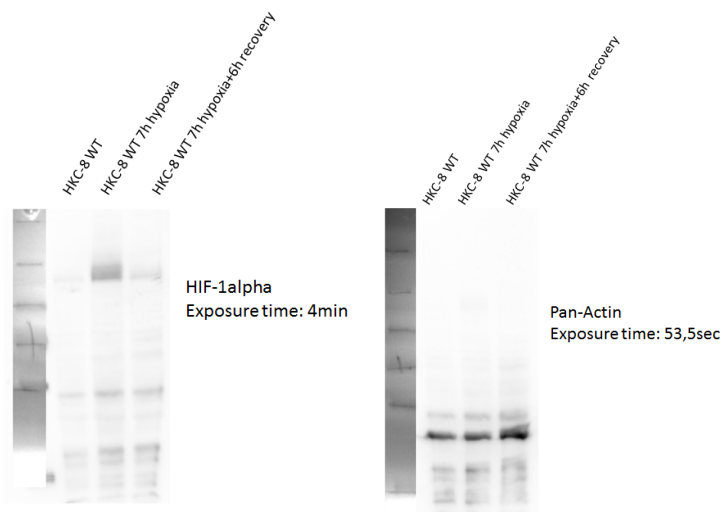
Nr.1



Nr.2

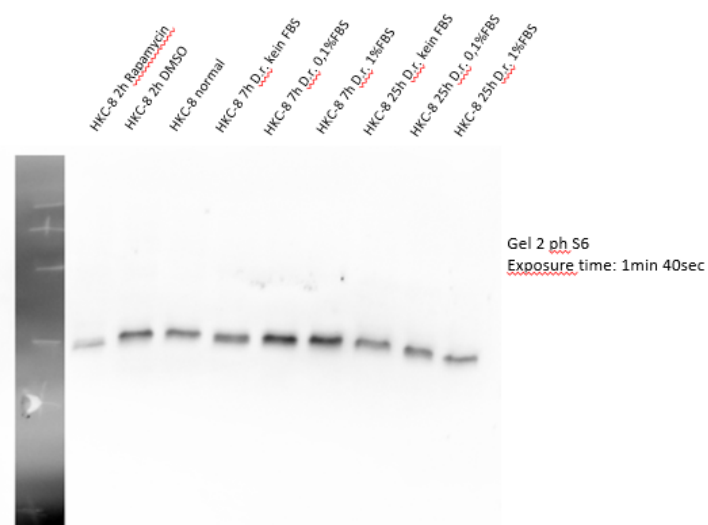
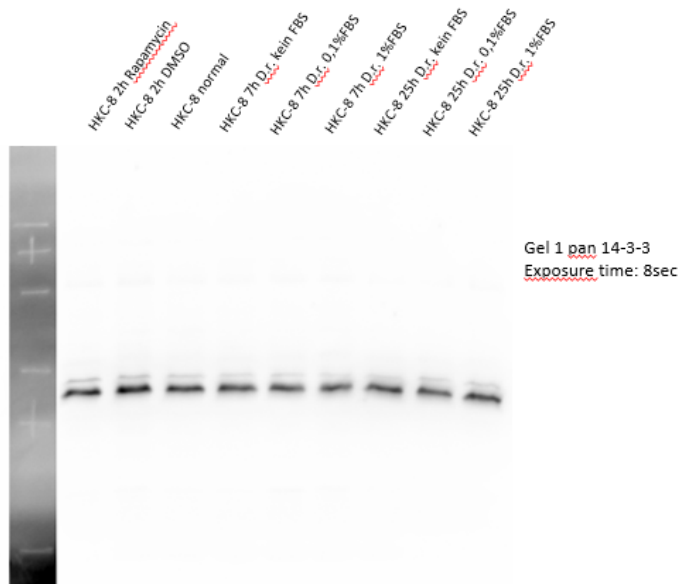
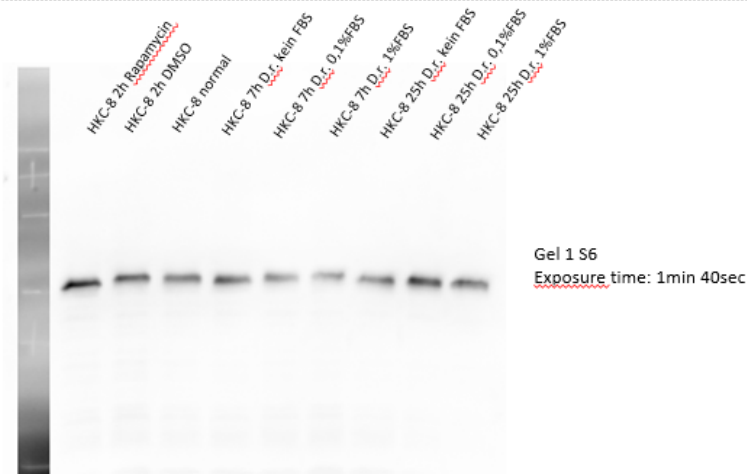


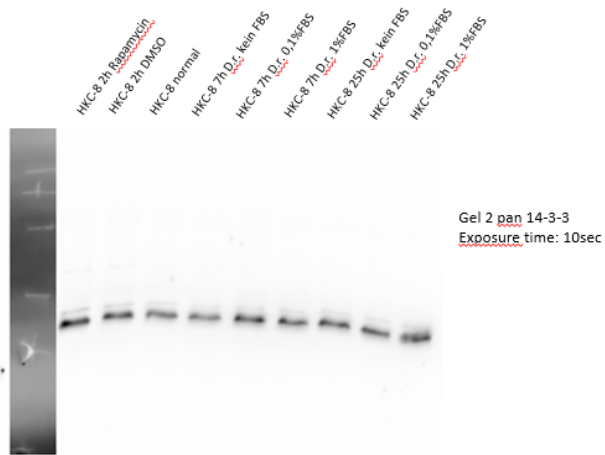
Nr.3



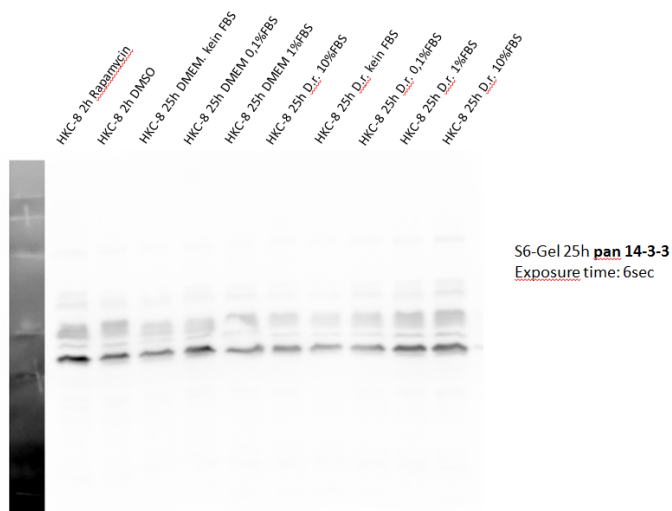
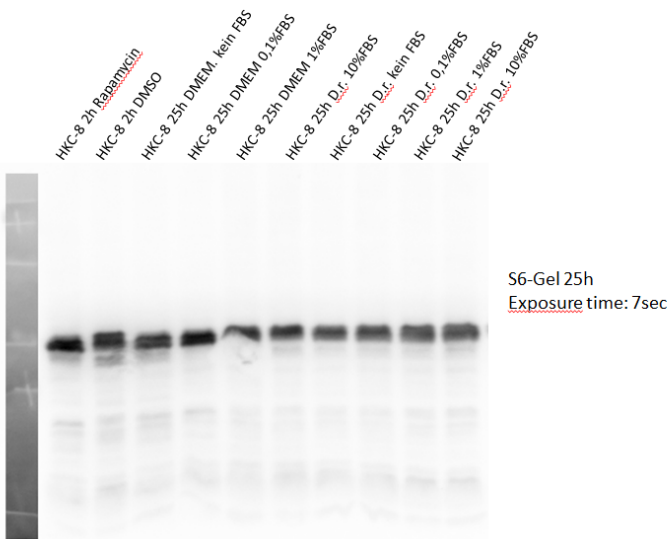
### 7.3.3. Originale Western Blots zu Abbildung 29

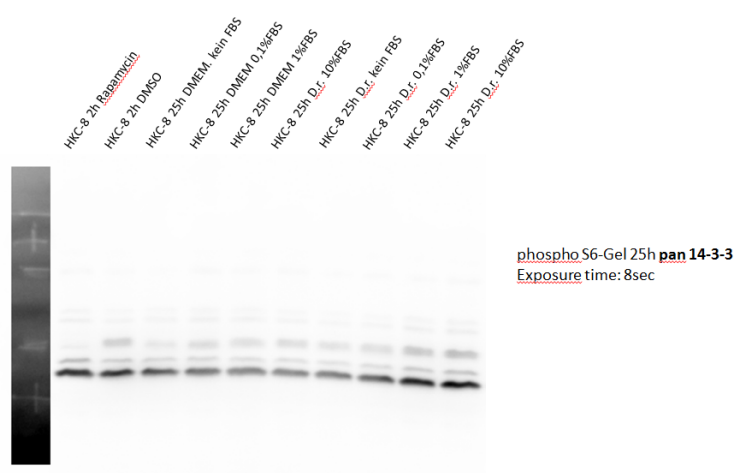
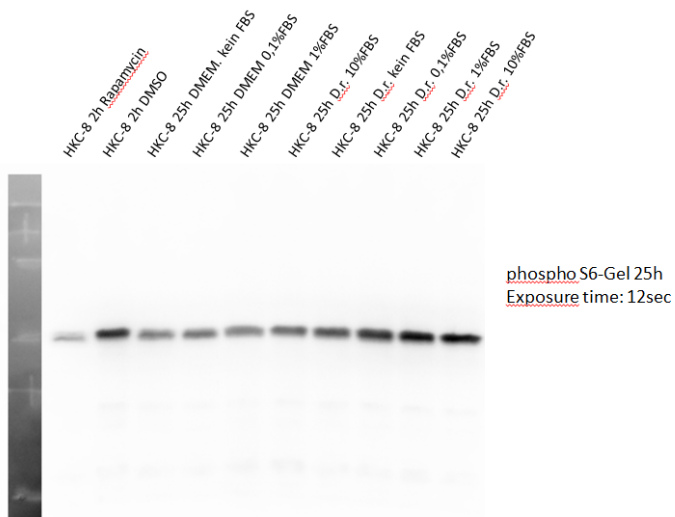
Nr.1



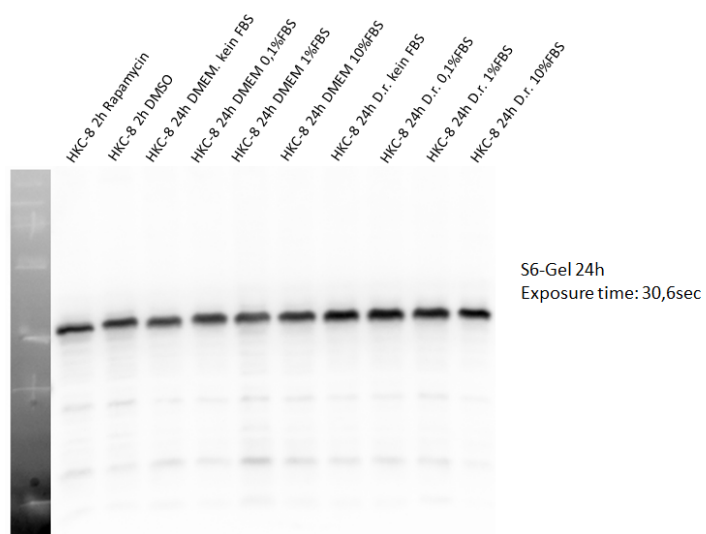


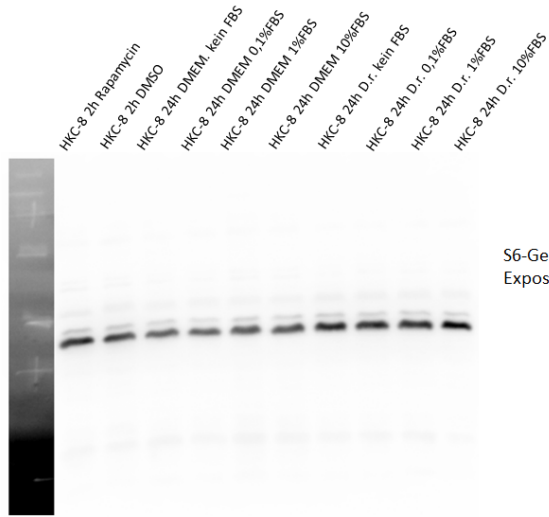
Nr. 2



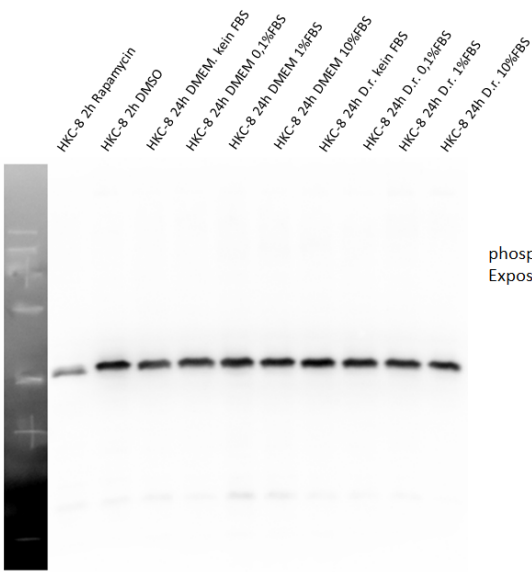


Nr. 3

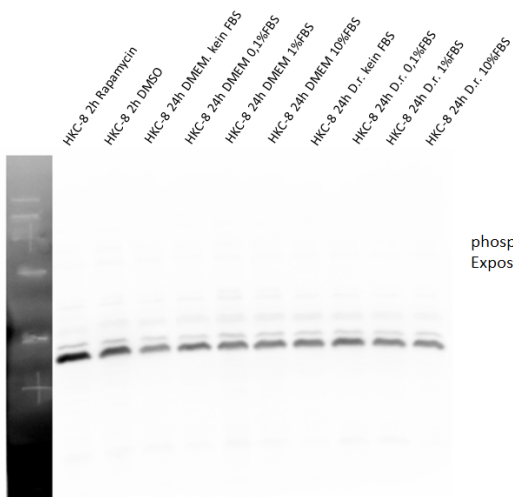




S6-Gel 24h pan 14-3-3  
Exposure time: 14sec



phospho-S6-Gel 24h  
Exposure time: 33,2sec



phospho-S6-Gel 24h pan 14-3-3  
Exposure time: 8sec



## **8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen**

keine

