

Die Rolle der D-Dopachrom Tautomerase (D-DT) in der Nierenfibrose

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

vorgelegt von

Lea Herkens, M.Sc.
aus
München, Deutschland

Berichter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Ralph Panstruga
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Sonja Djudjaj

Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Der Aufbau sowie die Funktion der Niere	1
1.2.	Das Tubulussystem der Niere	1
1.3.	Chronische Nierenerkrankungen und Nierenfibrose	3
1.4.	Die Entstehung der interstitiellen Nierenfibrose	4
1.5.	<i>In vivo</i> Nierenfibrose-Modelle	6
1.5.1.	Die unilaterale Ureterobstruktion	6
1.5.2.	Die unilaterale Ischämische Reperfusion	7
1.6.	Therapiemöglichkeiten gegen Nierenfibrose	8
1.7.	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor-Familie	9
1.7.1.	Die Charakterisierung des Makrophagen-Migrations-Faktors	9
1.7.2.	Die Charakterisierung der D-Dopachrom Tautomerase	12
2.	Ziel der Doktorarbeit	16
3.	Material & Methoden	17
3.1.	Material	17
3.1.1.	Reagenzien/Chemikalien	17
3.1.2.	Stimulanzen	20
3.1.3.	Kits	20
3.1.4.	Verbrauchsmaterialien	21
3.1.5.	Geräte	23
3.1.6.	Primärantikörper	24
3.1.7.	Sekundärantikörper	25
3.1.8.	Farbstoff	25
3.1.9.	Primer	26
3.1.10.	Sonden	26
3.1.11.	Zelllinien und Medien	26
3.1.12.	Humane Nierenbiopsien	27
3.1.13.	Öffentliche Datenbanken	28
3.1.14.	Software	28
3.2.	Methoden	29
3.2.1.	Tierexperimentelle Methoden	29
3.2.2.	Histologische Methoden	34
3.2.3.	Molekularbiologische Methoden	40
3.2.4.	Zellbiologische Methoden	49
3.2.5.	Statistische Auswertung	54
3.2.6.	Mitwirkung Dritter an der vorliegenden Arbeit	54

4.	Ergebnisse	55
4.1.	Identifikation der Lokalisierung von D-DT	55
4.1.1.	Verringerte Expression von D-DT in Tubulusepithelzellen in fibrotischem murinem Nierengewebe	55
4.1.2.	Expression von D-DT in proximalen und distalen Tubuli der gesunden murinen Niere	58
4.1.3.	Verringerte D-DT-Expression in der humanen Nierenfibrose	59
4.1.4.	Expression von D-DT in proximalen und distalen Tubuli der gesunden humanen Niere	62
4.2.	Identifikation der Regulierung von D-DT auf Protein-Ebene	63
4.2.1.	Stetig verringerte Expression von D-DT in Tubuli bei zunehmender muriner interstitieller Nierenfibrose	64
4.2.2.	Verringerte Expression von D-DT in der humanen Nierenfibrose	68
4.3.	Identifikation der Regulierung von <i>DDT/Ddt</i> auf mRNA-Ebene.....	69
4.3.1.	Verringerte <i>Ddt</i> -Expression in der murinen Nierenfibrose.....	70
4.3.2.	Verringerte <i>DDT</i> -Expression in der humanen Nierenfibrose	73
4.4.	Identifizierung der funktionellen Rolle von D-DT.....	75
4.4.1.	Einfluss von D-DT auf die Nierenfibrose und die Inflammation	75
4.4.2.	Verstärkte Fibroseausbildung in Mäusen mit Tubulusepithelzellspezifisch-deletiertem <i>Ddt</i> und systemisch-deletiertem <i>Mif</i>	82
4.4.3.	Präventive rD-DT Administration erzielt eine reduzierte Nierenfibrose.....	84
4.4.4.	Einfluss von D-DT auf die Proliferation und Apoptose	88
4.4.5.	Überprüfung der Regulation von D-DT/MIF und CD74	94
4.4.6.	Mechanistische Effekte von D-DT in fibrotischem Gewebe.....	97
5.	Diskussion	104
5.1.	D-DT wird in proximalen Tubuli exprimiert.....	104
5.2.	Verringerte Expression von D-DT in der Nierenfibrose auf Protein und mRNA-Ebene	105
5.3.	D-DT spielt eine nephroprotektive Rolle in der Nierenfibrose	106
5.4.	Induktion proliferativer Signalwege durch D-DT	112
6.	Zusammenfassung	115
7.	Literaturverzeichnis.....	116
8.	Anhang	124
8.1.	Appendix.....	124
8.2.	Abbildungsverzeichnis	128
8.3.	Abkürzungsverzeichnis	131
8.4.	Danksagung.....	134
8.5.	Eidesstattliche Erklärung.....	135

1. Einleitung

1.1. Der Aufbau sowie die Funktion der Niere

Der Mensch besitzt zwei Nieren, welche sich links und rechts von der Wirbelsäule, im Bauchraum, befinden. Die linke Niere ist ca. 1,5 cm höher angeordnet ¹. Eingeschlossen wird die Niere von der Nierenkapsel, darunter liegt die Nierenrinde (Cortex renalis), das Nierenmark (Medulla renalis), sowie die darin eingeschlossenen Nieren-Pyramiden, die Papille und das Nierenbecken, welches in den Harnleiter (Ureter) übergeht ². Der Cortex sowie die Medulla bilden das Nierenparenchym ².

Die Filtrationseinheiten einer Niere werden als Nephrone bezeichnet und ein gesunder Mensch besitzt zwischen 200.000 bis zu über 1.800.000 Nephrone ³. Ein Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen, welches aus dem Glomerulus sowie der umgebenen Bowmans-Kapsel aufgebaut ist, und dem daran angeschlossenen Tubulussystem (Abbildung 1). Ein Glomerulus besteht aus vier Zelltypen: den Podozyten, den glomerulären Endothelzellen, den Mesangialzellen sowie den parietalen Epithelzellen (PEC) ⁴.

Die primäre Funktion der Niere besteht in der Filtration großer Blutmengen, weshalb in der Niere eine Nierenarterie sowie -vene münden. Die homöostatische Einstellung erfolgt ebenfalls in der Niere, indem das Flüssigkeits-/Elektrolytgleichgewicht aufrechterhalten und der Säure-Basen-Stoffwechsel des Blutes, sowie die Kalzium-/Kaliumhomöostase reguliert wird ⁵. Darüber hinaus werden über die Niere Abfallstoffe (NH₃) ausgeschieden, der Blutdruck reguliert und rote Blutkörperchen produziert ⁵. Dafür wird das Blut durch die Gefäßwände des Glomerulus filtriert und das entstandene Filtrat (Primärharn) sammelt sich in der Bowmans-Kapsel. Nachfolgend fließt der Primärharn durch das Tubulussystem und wird durch Resorptions- und Sekretionsmechanismen in Sekundärharn umgewandelt. Das Tubulussystem wird im folgenden Abschnitt beschrieben und auf den proximalen Tubulus detailliert eingegangen.

1.2. Das Tubulussystem der Niere

Das Tubulussystem besteht aus dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife, mit einem dünnen absteigenden und einem dünnen aufsteigenden Ast, dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr (Abbildung 1). Davon befinden sich die proximalen

sowie die distalen Tubuli hauptsächlich im Cortex und die Henle-Schleife in der Medulla. Die Sammelrohre durchziehen sowohl den Cortex als auch die Medulla (Abbildung 1).

Der proximale Tubulus spielt eine entscheidende Rolle bei der Proteinverarbeitung, indem er gefilterte Proteine rückresorbiert und abbaut, um wichtige Nährstoffe zurückzugewinnen ⁶. Außerdem werden ungefilterte organische Anionen (OAs) und urämische Toxine sezerniert ⁶. Der proximale Tubulus beginnt an dem Nierenpol der Bowmans-Kapsel, an dieser Stelle gehen die PECs in die proximalen Tubulusepithelzellen (PTEC) über. Die PTECs bilden aneinandergereiht einen proximalen Tubulus, welcher an der apikalen, luminalen Seite einen Bürstensaum aus Mikrovilli aufweist. An der basolateralen Seite befindet sich das Tubulointerstitium. Aufgeteilt wird der proximale Tubulus in das Segment (S)1, S2 und S3 (Abbildung 1). Der Bürstensaum verliert von S1 bis S3 an Dichte.

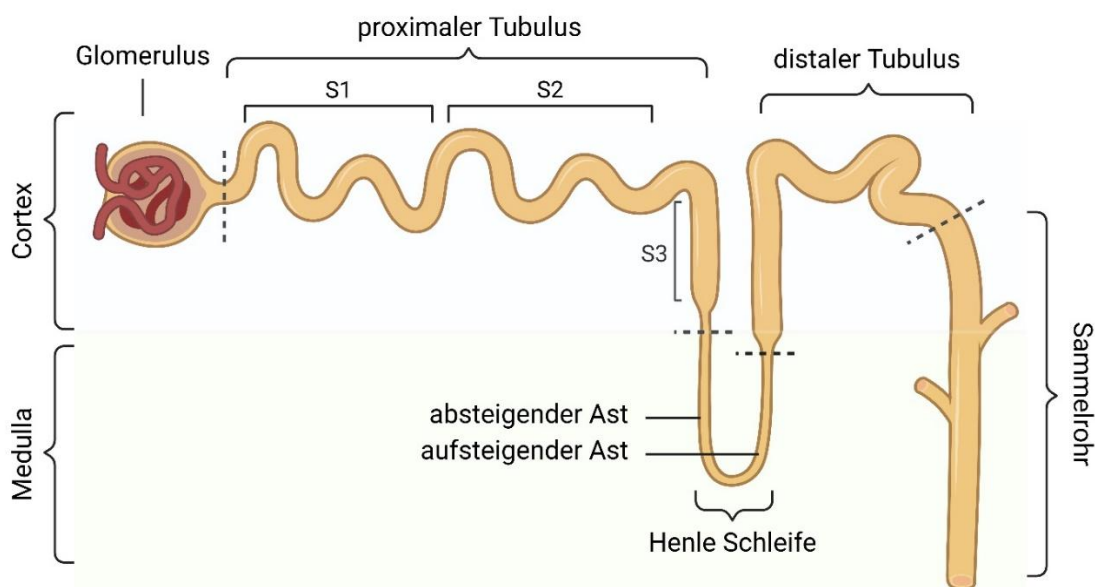


Abbildung 1: Aufbau eines Nephrons mit dem angeschlossenen Tubulussystem.

Der Glomerulus, die proximalen sowie die distalen Tubuli befinden sich hauptsächlich im Cortex und die Henle-Schleife (mit aufsteigendem und absteigendem Ast) in der Medulla. Die Sammelrohre durchziehen sowohl den Cortex als auch die Medulla. Der proximale Tubulus wird in die Segmente (S) 1-3 unterteilt. (Erstellt mit Biorender.com)

1.3. Chronische Nierenerkrankungen und Nierenfibrose

Weltweit sind mehr als 10 % der Bevölkerung von Nierenerkrankungen betroffen, die eine hohe Morbidität und Mortalität aufweisen ⁷. Der Schweregrad, die Häufigkeit und die Dauer von einer akuten Nierenschädigung (*Acute kidney injury* AKI) sowie das Alter der Patienten sind eng mit dem Fortschreiten einer chronischen Nierenerkrankung (*Chronic kidney disease* CKD) verbunden ⁸. Die Betroffenen weisen im Verlauf der Nierenerkrankung eine zunehmend schlechtere Nierenfunktion bis hin zur Niereninsuffizienz auf, weshalb eine Nierenersatztherapie (Dialyse, Transplantation) erforderlich wird. Laut der Studie „*Global Burden of Disease Study 2021*“ (Globale Krankheitslast) belegte die CKD 1990 den Platz 18 der Liste der Ursachen für die Gesamtzahl der Todesfälle weltweit, stieg aber 2021 auf den Platz 11 ⁹. Begründet wird die Zunahme durch die ansteigende Zahl älterer Menschen und die Zunahme der Krankheiten, die zu CKD führen, wie Diabetes, Fettleibigkeit, Arteriosklerose und Bluthochdruck ¹⁰. Es wird erwartet, dass die CKD 2040 den Platz 5 der Liste der Ursachen für die Gesamtzahl der Todesfälle weltweit belegen wird ⁷. Dies zeigt die Relevanz der CKD für die Gesamtbevölkerung.

Das Fortschreiten einer Nierenerkrankung führt unweigerlich zu einer Nierenfibrose. Die wichtigsten Prozesse bei der Entstehung der Nierenfibrose sind der Verlust von Nephronen, die induzierte Inflammation, die Aktivierung von Myofibroblasten durch unter anderem dem transformierenden Wachstumsfaktor β (TGF β), und die Ablagerung von extrazellulärer Bindegewebsmatrix (EZM) durch dual-positive *Platelet Derived Growth Factor* (PDGFR) α -positive PDGFR β -positive Fibroblasten und Myofibroblasten ^{11,12}. Sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen entstehen die Myofibroblasten überwiegend aus Perizyten und Fibroblasten ¹². Myofibroblasten sind eine Untergruppe aktivierter fibrogener Zellen mit einer erhöhten Expression von EZM-Proteinen und einer Neo-Expression von α -Glattmuskel-Aktin (α -SMA) ¹³.

Kommt es durch Myofibroblasten und Fibroblasten zu einer EZM-Ablagerung, wird funktionales Gewebe durch eine nicht-funktionelle EZM ersetzt, wodurch Narbengewebe entsteht. Insbesondere bewirkt TGF β die EZM-Synthese, außerdem hemmt es den EZM-Abbau durch Inhibition von Matrix-Metalloproteinasen (MMP). Es induziert die Transdifferenzierung von Myofibroblasten sowie die Proliferation von Mesangialzellen ¹⁴. Darüber hinaus bewirkt TGF β die tubuläre Degeneration vorwiegend durch Apoptose ¹⁵.

Grundlegend kann die Nierenfibrose in drei Nierenkompartimenten auftreten und hat jeweils einen spezifischen Namen: Glomerulosklerose in den Glomeruli, interstitielle (oder tubulointerstitielle) Fibrose im Tubulointerstitium und Arteriosklerose in den Gefäßen ¹⁶. Anschließend, wird die Entstehung der interstitiellen Nierenfibrose im Detail erläutert, da sie für die vorliegende Arbeit von besonderer Wichtigkeit ist.

1.4. Die Entstehung der interstitiellen Nierenfibrose

Die interstitielle Fibrose beschreibt eine im Tubulointerstitium lokalisierte Fibrose, welche durch ischämische Prozesse, Toxine, Drogen sowie metabolische/genetische Erkrankungen ausgelöst wird (Abbildung 2) ¹⁶. Dabei entsteht zwischen den Tubuli und den peritubulären Kapillaren eine extrazelluläre Matrix, welche vorwiegend von Fibroblasten sowie Myofibroblasten im Cortex und Perizyten in der Medulla gebildet wird ¹⁶. Der Abstand zwischen Kapillaren und Tubuli wird durch die interstitielle Fibrose vergrößert, was sich auch auf den Nährstoff- und Sauerstoffhaushalt der Tubuli auswirkt ¹⁶.

Eine Verletzung der Epithelzellen im Tubulointerstitium führt zu ihrer Dedifferenzierung, dies wird durch die Hochregulierung von den Notch-, *Wingless-Int-1* (Wnt)-, sowie geschlechtsbestimmende Region Y-Box 9 (*Sex Determining Region Y (SRY)-box 9 - SOX9*)-Signalwegen gekennzeichnet ¹⁴. Regeneriert sich diese Verletzung, so hat dies keine weiteren Auswirkungen auf die Zellen. Wohingegen eine dauerhafte Schädigung der Tubulusepithelzellen den Stillstand des Zellzyklus und die Seneszenz bewirkt ¹⁴. Dies geht mit der Freisetzung profibrotischer Faktoren und dem Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP) einher ¹⁴. Geschädigte vaskulär Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1)-positive Tubuli setzen parakrine Mediatoren wie TGFβ-, *Hedgehog* (Hh)- und Wnt-Liganden frei, die interstitielle Perizyten (Medulla) und Fibroblasten (Cortex) beeinflussen und die Differenzierung, Proliferation, sowie die Akkumulation der EZM von Myofibroblasten fördern ¹⁴.

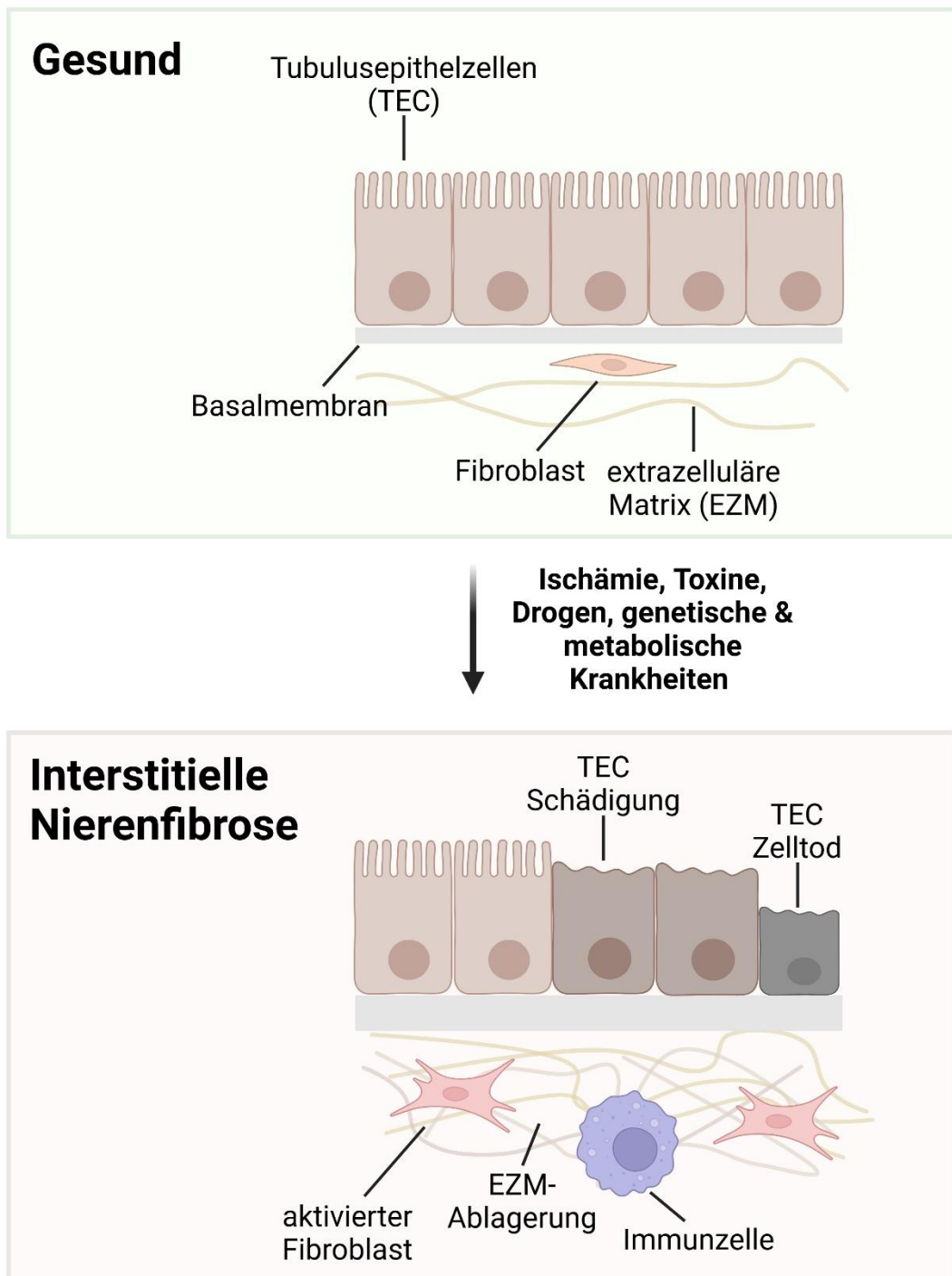


Abbildung 2: Die Entwicklung der interstitiellen Nierenfibrose.

Durch Ischämie, Toxine, Drogen sowie genetische und metabolische Prozesse kann sich die interstitielle Nierenfibrose ausbilden. Charakteristisch sind die Schädigung sowie der Zelltod der Tubulusepithelzellen (TEC) und die Ausbildung von extrazellulärer Matrix (EZM) durch aktivierte Fibroblasten. Weiterhin kommt es zur Infiltration von Immunzellen. (Adaptiert von Djurdjaj & Boor, 2019; Erstellt mit Biorender.com)

1.5. *In vivo* Nierenfibrose-Modelle

Derzeit gibt es keine zugelassenen spezifischen Therapien für die Nierenfibrose, daher sind verlässliche und reproduzierbare *in vivo* Modelle für die Erforschung der Nierenfibrose erforderlich. Es ist wichtig, die zugrunde liegenden Mechanismen der Erkrankung zu erforschen, therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren und mögliche Behandlungsmethoden zu validieren. Jeder ausgebildeten Nierenfibrose liegen spezifische Mechanismen zugrunde, die von der Ursache der Schädigung abhängen, wie z.B. die mechanische Obstruktion, Ischämie oder toxische Schädigung. Verschiedene *in vivo* Modelle ermöglichen es, diese unterschiedlichen Mechanismen und deren Auswirkungen auf die Nierenfibrose zu untersuchen. Auf zwei renale *in vivo* Fibrose-Modelle wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

1.5.1. Die unilaterale Ureterobstruktion

1973 wurde die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) erstmals als ein *in vivo* Nierenfibrose-Modell beschrieben und an Kaninchen durchgeführt¹⁷. Bei der UUO wird einer der beiden Ureter der Niere ligiert, wodurch folglich eine obstruierte Niere und eine kontralaterale, nicht obstruierte Niere entstehen (Abbildung 3). Der stationäre Urinfluss bewirkt den Anstieg des hydrostatischen Drucks, wodurch initial die Sammelrohre erweitert werden¹⁸. Dieser Druck wird anschließend auf die distalen und proximalen Tubuli übertragen, sodass es zur Abnahme der glomerulären Filtrationsrate und zur Ausbildung von mechanischer Dehnung der TECs kommt^{18,19}. Dies induziert die Schadensentwicklung in den TECs. Anschließend wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert, welches zur renalen Vasokonstriktion, der Apoptose der TECs, der Inflammation durch oxidativen Stress und der Fibrose beiträgt¹⁸. Als Folge von oxidativem Stress und der RAAS-Aktivierung wird mittels des nuklearen Faktor-Kappa-Leichtketten-Verstärkers von aktivierten B-Zellen (NF- κ B), die Transkription von Zielgenen initiiert, die Inflammation und Fibrose verursachen¹⁸. RAAS verursacht Fibrose durch die Aktivierung von TGF β /Smad- und Wnt/ β -Catenin-Signalwegen¹⁸. In der obstruierten Niere ist TGF β 1 signifikant hochreguliert, wodurch Fibroblasten aktiviert werden, die extrazelluläre Matrix produzieren¹⁸.

Es kann eine starke Korrelation zwischen der Progression der absterbenden TECs und der ausgebildeten Nierenfibrose im Cortex identifiziert werden^{18,20}. Jedoch wird keine signifikante pathologische Veränderung der Nierenglomeruli festgestellt²¹.

Zusammengefasst führt die UUO zu tubulärem Schaden als Folge des obstruierten Urinflusses und resultiert in der ausgebildeten Nierenfibrose ¹⁸.

1.5.2. Die unilaterale Ischämische Reperfusion

Die ischämische Reperfusion (I/R) stellt ein weiteres etabliertes Nierenfibrose-Modell dar. Bei der unilateralen I/R wird lediglich eine Nierenarterie für eine definierte Zeit, bei Aufrechterhaltung der Körpertemperatur, abgeklemmt (Abbildung 3). Dabei ist die Zeit der Ischämie, die benötigt wird, um einen irreversiblen Schaden zu generieren, abhängig von dem Mausstamm und dem Geschlecht der Maus.

Die I/R wird häufig verwendet, um die AKI beim Menschen nachzuahmen und den Mechanismus des Fortschreitens von der AKI zu der CKD zu untersuchen ²². Der ischämische Zustand induziert einen anaeroben Stoffwechsel ²³. Mitochondriale Schäden und ein Elektrolyt-Ungleichgewicht führen im Reperfusionszustand zu oxidativem Stress, durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS)-Retention ²³. Dies führt zu Zellschäden mittels Autophagie, Nekrose, Nekroptose sowie Apoptose ²³. Tubulusepithelzellen sind für jene ischämischen Verletzungen besonders anfällig ²⁴. Nach einer I/R in der Niere können sich die geschädigten Tubuli je nach Schwere der Ischämieverletzung entweder erholen, dedifferenzieren oder sich zu einer interstitiellen Entzündung und Fibrose entwickeln ²⁵. Zusammengefasst führt die I/R zu tubulärem Schaden und Nierenfibrose als Folge des ischämischen Zustands.

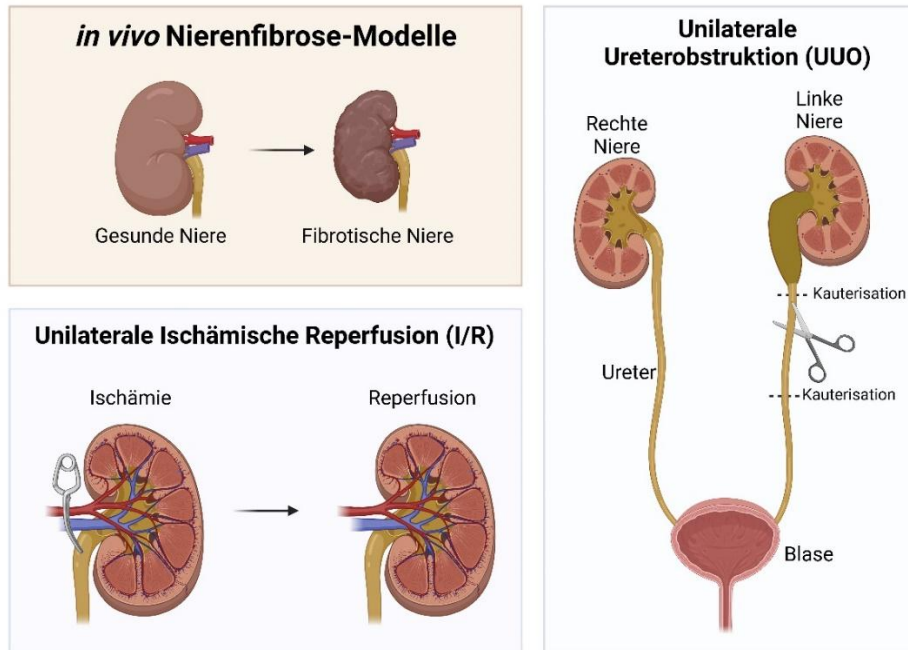


Abbildung 3: Übersicht über die *in vivo* Nierenfibrose-Modelle UUO sowie I/R.

Bei der unilateralen ischämischen Reperfusion (I/R) wird der renale Hilus für eine definierte Zeit abgeklemmt, wodurch es zu einer Ischämie kommt und nach dem Entfernen der Klemme eine Reperfusion ausgelöst wird. Bei der UUO wird der linke Ureter an zwei Stellen kauterisiert und anschließend in der Mitte durchtrennt. (Erstellt mit Biorender.com)

1.6. Therapiemöglichkeiten gegen Nierenfibrose

Bislang gibt es nur indirekte klinische Ansätze zur Behandlung der Nierenfibrose mit nephroprotektiven Medikamenten. Einer dieser Ansätze greift zielgerichtet in das RAAS ein. Als Beispiel kann der Renininhibitor Aliskiren genannt werden, welcher eine starke blutdrucksenkende Wirkung aufweist. Darüber hinaus besitzt Aliskiren in der Niere antifibrotische sowie antiproteinurische Wirkungen, da die Therapie das totale renale sowie das tubuläre TGF β 1 in den Nieren verringert²⁶. Trotz wissenschaftlicher Fortschritte bei der Erforschung der Mechanismen und ihrer therapeutischen Angriffspunkte gibt es derzeit keine direkten therapeutischen Optionen²⁷. Daher ist es von großer Bedeutung, die Erforschung der Mechanismen und potenziellen Angriffspunkte fortzusetzen, um in Zukunft eine therapeutische Maßnahme gegen die Nierenfibrose entwickeln zu können. Nachfolgend wird die Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF)-Familie eingeleitet, um anschließend auf die präklinischen antifibrotischen Wirkungen sowie die potenziellen Anwendungen als therapeutisches Mittel der MIF-Familie einzugehen.

1.7. Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor-Familie

Die MIF-Familie besteht aus drei homologen Proteinen: MIF, D-Dopachrom Tautomerase (D-DT/MIF-2) sowie D-Dopachrom Tautomerase-like (D-DTL). Diese Proteine sind der Gruppe der Zytokine zugeordnet, da sie regulatorische Funktionen übernehmen. *Mif* und *Ddt* bestehen aus drei Exons von nahezu identischer Größe (D-DT: Exon 1: 108 bp, Exon 2: 176 bp, Exon 3: 70 bp vs. MIF: Exon 1: 107 bp, Exon 2: 172 bp, Exon 3: 66 bp) und nur die nicht-kodierenden Introns haben unterschiedliche Längen (D-DT: Intron 1: 363 bp, Intron 2: 2144 bp vs. MIF: Intron 1: 190 bp, Intron 2: 96 bp) ²⁸. Insgesamt sind die humane *DDT* und *MIF* Boten-Ribonukleinsäure (*Messenger Ribonucleic Acid* mRNA) ~50 % identisch, hingegen weisen die murine *Ddt* und *Mif* mRNA ~40 % Identität auf ²⁸. Auf Proteinebene stimmen die Aminosäuresequenzen von D-DT und MIF bei Menschen und Mäusen zu 34 % bzw. 27 % überein ^{28,29}. Nachfolgend werden MIF und D-DT bezogen auf die Eigenschaften sowie Funktionen charakterisiert und die Rolle der Proteine in der Nierenfibrose beschrieben.

1.7.1. Die Charakterisierung des Makrophagen-Migrations-Faktors

MIF wurde 1966 als ein von T-Lymphozyten produzierter, löslicher Faktor beschrieben, welcher mit der Migration von Makrophagen, während einer allergischen Reaktion in Verbindung gebracht wurde ^{30,31}. Diese Reaktion war namensgebend für MIF, welches ein 12,5 Kilodalton (kDa) großes, pleiotropes, inflammatorisches Zytokin mit Chemokin-ähnlichen Funktionen ist. Unter homöostatischen Bedingungen wird MIF konstitutiv freigesetzt und ubiquitär exprimiert ³². MIF wird jedoch, anders als viele proinflammatorische Zytokine, nicht ausschließlich von Immunzellen exprimiert, sondern auch beispielsweise von Fibroblasten ³³ oder Epithelzellen ^{29,34}. Es lagert sich in aktiver Form als Homotrimer zusammen und beeinflusst die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen ^{35,36}.

MIF bindet hauptsächlich an das Typ II Transmembranprotein Cluster der Differenzierung (CD) 74 ^{29,37}. Außerdem bindet MIF sekundär an die CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren (CXCR) 2, 4 und 7 ^{29,38,39}. Wichtig für die Chemokin-ähnliche Funktion von MIF ist eine Pseudo(E)LR-Domäne ⁴⁰. Je nach Zelltyp und Entzündung bindet MIF an die jeweiligen Rezeptoren und bestimmt auf diesem Wege die Funktionalität ^{41,42}. MIF hat sowohl schützende als auch schädliche Auswirkungen auf

pathologische Prozesse. Beispielsweise führte eine I/R des Darms *in vivo* zu einem Anstieg des zirkulierenden MIFs im Serum, einer Zunahme der Gefäßpermeabilität und der Tumornekrosefaktor (TNF)-Produktion im Darm und in der Lunge ⁴³. Hingegen weist MIF nach einer myokardialen I/R *in vivo* eine kardioprotektive Rolle auf ⁴⁴. Ein weiteres Beispiel zeigt, dass MIF in einem hepatoxischen Leberschädigungsmodell antifibrotische Wirkung ausübt, während es in einer Leberentzündung, im Rahmen einer Leberverfettung (nichtalkoholische Steatohepatitis), profibrotische Eigenschaften aufweist ^{45,46}. Zuletzt vermittelt MIF eine glomeruläre Schädigung und pathologische Proliferation in der Glomerulonephritis ⁴⁷, hingegen weist MIF in der interstitiellen Nierenfibrose eine nephroprotektive Rolle auf ⁴⁸ (1.7.1.2; Abbildung 4). Das nachfolgende Kapitel fokussiert sich auf die protektive Rolle von MIF.

1.7.1.1. Die Bindung von MIF an CD74 und der vermittelte protektive Effekt

CD74 befindet sich auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen ⁴⁹. Darüber hinaus wird CD74 auf der Oberfläche von Nicht-APZs wie Endothelzellen und Epithelzellen, in Niere, Lunge, Darm, Herz, Leber und Haut exprimiert ^{29,50}. Die Bindung von MIF an den CD74 Rezeptor kann in verschiedenen Organen einen protektiven Effekt hervorrufen, indem die Zellproliferation sowie das Überleben induziert werden ²⁹. Die Stimulation von CD74 löst eine intrazelluläre Phosphorylierung aus und führt zu einer Komplexbildung mit dem Co-Rezeptor CD44, wodurch der signalregulierte Kinaseweg (ERK), die PI3K-Proteinkinase B (AKT)-Signaltransduktionskaskade, NF-κB oder der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-Signalweg aktiviert wird ^{50,51}.

Im Darm aktiviert MIF-CD74 den AKT- und den Extrazellulärsignal-regulierte Kinase (ERK)-Signalweg, folglich induziert es die Proliferation der Krypten-Zellen, um nach einer Verletzung der Epithelzell-Barriere, diese wieder zu schließen ⁵⁰. In der Lunge stimuliert die MIF-CD74 Bindung die Aktivierung des AKT-Signalweges, wodurch das Alveolarepithel, nach einer Lungenschädigung, geschlossen wird ⁵⁰. Im Herzen wird durch AMPK das Überleben der Kardiomyozyten, wie auch in der Leber das Überleben von Hepatozyten, hervorgerufen ⁵⁰. Auf die Rolle der CD74-MIF Stimulation in der Niere wird im anschließenden Kapitel näher eingegangen.

1.7.1.2. Die Rolle von MIF in der Nierenfibrose

In gesunden, humanen sowie murinen Nieren wird MIF hauptsächlich in den Tubulusepithelzellen der Niere exprimiert⁴⁸. In humanen, fibrotischen Nieren nimmt die MIF-Expression signifikant ab. Nach einer *in vivo* Fibrose-Induktion durch UUO und I/R wird ebenfalls signifikant weniger MIF exprimiert⁴⁸. In einem systemischen *Mif-Knockout* (KO) wird nach der Induktion der Fibrose in der UUO und I/R signifikant mehr Kollagen (Col I) und α -SMA exprimiert⁴⁸. Dies bedeutet, dass es zu einer signifikant stärkeren Fibrosebildung kommt, wenn MIF ausgeknockt wurde⁴⁸. Die systemische *Mif*-Deletion verstärkt ebenfalls signifikant die Inflammations-Marker F4/80 (Oberflächenmarker von Makrophagen), sowie ErHr3 (Oberflächenmarker von Monozyten) und die Deletion ging mit einer schlechteren Nierenfunktion einher⁴⁸.

In einer *in vivo* Interventionsstudie wurde therapeutisch, drei Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO, ein MIF-Inhibitor (ISO-1) sowie in einem zweiten Ansatz rekombinantes (r) MIF verabreicht⁴⁸. Durch den Inhibitor werden die Fibrose-Marker Col I sowie α -SMA und die Inflammations-Marker F4/80 sowie ErHr3 signifikant verstärkt exprimiert⁴⁸. Im Kontrast werden durch die Verabreichung von rMIF die Fibrose-Marker Col I sowie α -SMA und die Inflammations-Marker F4/80 sowie ErHr3 signifikant vermindert exprimiert⁴⁸. Dies bedeutet, dass MIF zur Reduktion der interstitiellen Nierenfibrose beiträgt.

Die Deletion von *Mif* führt *in vitro*, in Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten Tubulusepithelzellen, zu einem verstärkten G2/M-Zellzyklus-Arrest und einer erhöhten Expression des CDK-Inhibitors 1B (p27Kip1) sowie von proinflammatorischen und profibrotischen Mediatoren^{29,48}. *In vivo* resultieren ein *Mif*-KO sowie eine spezifische MIF-Inhibition durch ISO-1 in einer geringeren Apoptose der Tubulusepithelzellen nach Fibrose-Induktion durch die UUO. Demgegenüber führt die Behandlung mit rMIF in der UUO zu einem signifikanten Anstieg der Zahl der Tubulusepithelzellen, die Apoptose durchlaufen⁴⁸. Außerdem vermindert eine MIF-Inhibition durch ISO-1 *in vitro* die Proliferation der Tubulusepithelzellen, wohingegen rMIF die Proliferation verstärkt⁴⁸. Zusammenfassend wurde festgestellt, dass MIF eine endogene nephroprotektive Rolle spielt, indem es den Zellzyklusstillstand von Tubulusepithelzellen aufhebt und dadurch die Nierenfibrose verringert⁴⁸. Nachfolgend wird MIF als therapeutisches Mittel erläutert und die Probleme, die bei der Nutzung von MIF entstanden sind.

1.7.1.3. MIF als therapeutisches Mittel

Eine klinische Studie (NCT01765790) der Phase 1 zur MIF-Inhibition beschäftigte sich mit den pharmakokinetischen Eigenschaften der MIF-Inhibition durch Imalumab (BAX69). In der Studie sollte die Antitumoraktivität des MIF-Antikörpers getestet werden, jedoch wurde lediglich eine geringe Antitumoraktivität nachgewiesen. Die zweite klinische Studie (NCT01541670), die Imalumab in Phase 1 gegen Lupusnephritis eingesetzt hat, wurde vorzeitig abgebrochen. Als Grund wurde die Anzahl der Probanden mit schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen (SAEs) und/oder unerwünschten Ereignissen (AEs) unabhängig von der Kausalität genannt. Eine weitere klinische Studie (NCT02448810) der Phase 2a wurde auf der Grundlage einer allgemeinen Nutzen-Risiko-Bewertung vorzeitig beendet.

Dies legt nahe, dass MIF ein schwieriger Angriffspunkt bei der Behandlung von Krankheiten ist. Problematisch ist hierbei womöglich die konträre, zugleich schützende und schädliche Auswirkung auf pathologische Prozesse. Im nachfolgenden Kapitel wird auf das homologe Protein D-DT eingegangen, dessen Eigenschaften sowie seine Rolle in der Nierenfibrose erläutert werden.

1.7.2. Die Charakterisierung der D-Dopachrom Tautomerase

D-Dopachrom Tautomerase ist ein 13 kDa großes, 1993 erstmals beschriebenes Enzym, welches D-Dopachrom zu 5,6-Dihydroxyindole konvertiert ⁵². Sechs Jahre später, im Jahr 1999 wurde die signifikante strukturelle Homologie zu MIF entdeckt ⁵³. Aufgrund seiner Homologie wird es auch als MIF-2 bezeichnet, außerdem wird es der Gruppe der Zytokine zugeordnet. Es lagert sich in aktiver Form als Homotrimer zusammen ²⁹.

D-DT bindet an CD74, jedoch mit geringerer Affinität, verglichen mit MIF ^{29,54}. Außerdem bindet D-DT an CXCR4 ⁵⁵ und CXCR7 ^{29,56}. Die Bindung von D-DT an CXCR7 trägt zur Reparatur des Lungenepithels der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) bei ⁵⁶ (Abbildung 4). Die Pseudo(E)LR (Arg¹¹, Asp⁴)-Domäne von MIF, die für die Interaktion mit CXCR2 verantwortlich ist, fehlt D-DT ^{29,57}. Im Herzen konnte gezeigt werden, dass durch die fehlende Interaktion mit CXCR2 die negative, inotrope Wirkung von MIF aufgehoben wird, die die kardiale Kontraktilität verringert ^{29,58}. Die fehlende Domäne hat einen grundlegenden Einfluss auf die

Rekrutierung von Monozyten und Leukozyten und unterscheidet MIF folglich von D-DT^{29,58}.

D-DT wird konstitutiv und ubiquitär in der Leber und Niere exprimiert, ebenfalls in der Lunge, dem Herzen und dem Pankreas^{40,59}. Die mRNA von D-DT weist keine sekretorischen Signalsequenzen auf, was darauf hindeutet, dass D-DT über einen spezialisierten, nicht-klassischen Exportweg sezerniert wird^{29,40}. Im Vergleich zu MIF geben mit LPS stimulierte Makrophagen 20-mal mehr MIF ab als D-DT^{29,40}. Außerdem zeigt MIF eine steilere Dosisreaktion bei der Messung der Makrophagen-Migrationshemmung und der Glukokortikoid-Übersteuerung als D-DT^{28,29}. Dies deutet darauf hin, dass D-DT, verglichen mit MIF, ein weniger starkes Zytokin ist, das mit der Herunterregulierung von Entzündungen in Verbindung gebracht werden kann⁴⁰. Weiterhin ist D-DT auch das schwächere Chemokin, da MIF die Rekrutierung von Makrophagen an den Entzündungsherd durch seine Rezeptoren CXCR2/4 hervorruft⁶⁰. Interessanterweise weisen im entzündeten Fettgewebe MIF und D-DT eine reziproke Rolle auf, die möglicherweise darauf hindeutet, dass D-DT bei der Wundheilung vorteilhaft ist, indem es das Überleben und die Proliferation von Fibroblasten induziert⁶⁰.

1.7.2.1. Inhibition von D-DT

2014 wurde ein D-DT-Inhibitor namens 4-Iodo-6-Phenylpyrimidin (4-IPP) entdeckt (Abbildung 4). Dieser inhibiert sowohl MIF als auch D-DT, indem er kovalent an das Prolin-1 beider Enzyme bindet⁶¹. Dabei ist die Halbwertszeit von D-DT zweimal so lang verglichen mit MIF⁶¹. 2019 wurde 4-(3-Carboxyphenyl)-2,5-Pyridindicarboxylsäure (4-CPPC) als spezifischer D-DT Inhibitor identifiziert⁶² (Abbildung 4). 4-CPPC inhibiert die D-DT-CD74-Bindung in einer dosisabhängigen Weise, ohne die MIF-CD74-Bindung zu beeinflussen⁶². Vor allem hemmte 4-CPPC die D-DT-vermittelte Aktivierung von CD74 und verringerte die CD74-abhängige Signaltransduktion⁶². 4-CPPC bindet im aktiven, hydrophoben Zentrum von D-DT. Dabei erfolgte die Inhibierung auf kompetitive Art^{63,64}.

1.7.2.2. Die Bindung von D-DT an CD74 und der vermittelte protektive Effekt

Durch die Bindung des Liganden D-DT an den Membranrezeptor CD74 wird eine intrazelluläre Phosphorylierung ausgelöst, die die Rekrutierung von CD44 auslöst und deren Komplexbildung initiiert (Abbildung 4). CD74 kann jedoch auch in einer löslichen Form (sCD74) vorliegen, welcher die transmembranen und intrazellulären Regionen fehlen. Die Herstellung von sCD74 erfolgt durch Spaltung der extrazellulären Region von CD74 und kann extrazellulär an MIF und D-DT binden⁶⁵ (Abbildung 4). Es wird angenommen, dass sCD74 als selbstregulierender Mechanismus wirkt, der die Interaktion von MIF und D-DT mit dem CD74-Rezeptor auf der Zelloberfläche verhindert^{29,65}. D-DT weist eine ~3-fach höhere Assoziationsrate (k_a) zu sCD74, aber ~11-fach schnellere Dissoziationsrate (k_d) auf als MIF^{29,40}. Dies könnte bedeuten, dass die Bindung von D-DT an den Rezeptor nicht immer eine Signalkaskade auslöst, sondern auch zu seiner Internalisierung führen kann⁴⁰. Im Gegensatz zu MIF zeigt D-DT eine hohe Flexibilität des C-Terminus, die bspw. durch Phosphorylierungen ausgelöst werden können^{29,64}. Diese Erkenntnis zusammen mit den unterschiedlichen k_a - und k_d -Raten deuten darauf hin, dass sich der D-DT-induzierte Aktivierungsmechanismus von CD74 deutlich von dem entsprechenden Mechanismus von MIF unterscheidet und unterschiedliche Bindungsoberflächen und/oder Konformationen beinhaltet⁶⁴.

Die D-DT-CD74 Bindung kann, ähnlich wie die MIF-CD74 Bindung, einen protektiven Effekt auslösen (Abbildung 4). Im Herzen initiiert D-DT-CD74 einen, durch AMPK vermittelten, protektiven Mechanismus, da D-DT wichtige autokrine/parakrine Effekte während der I/R aufweist, die das Herz vor Verletzungen schützen⁶⁶. Außerdem weist rD-DT eine antifibrotische Wirkung in kardialen Fibroblasten auf, indem es die TGF β -induzierte SMAD-2-Aktivierung hemmt⁶⁷. Des Weiteren kann ein protektiver Effekt durch D-DT-CD74 in der Niere beobachtet werden, auf den im nachfolgenden Kapitel näher eingegangen wird.

1.7.2.3. Protektiver Effekt von D-DT in der Niere

D-DT induziert in akutem Nierenversagen *in vivo*, nach einer bilaterale I/R, starke regenerative Effekte auf proximale Tubulusepithelzellen durch Sekretorische-Leukozyten-Protease-Inhibitor (SLPI)- und Aktivierender-Transkriptionsfaktor 4 (ATF4)-abhängige Mechanismen⁶⁸. Die Zellproliferation wird durch SLPI-abhängige Aktivierung von Cyklin D1 und Cyklin T2 und die Zellregeneration durch Autophagie

ATF4-abhängige Aktivierung ausgelöst ⁶⁸. Außerdem zeigte ein *Ddt*-KO signifikant stärkere tubuläre Schäden nach einer Nierenfibrose-Induktion durch eine I/R verglichen mit WT-Mäusen ⁶⁸. Hingegen verbesserte die Gabe von D-DT die tubuläre Schädigung ⁶⁸. Dies kann darauf hindeuten, dass D-DT einen therapeutischen Nutzen in der Behandlung bei akutem Nierenversagen haben könnte (Abbildung 4). Die Rolle von D-DT in der Nierenfibrose bleibt ungeklärt.

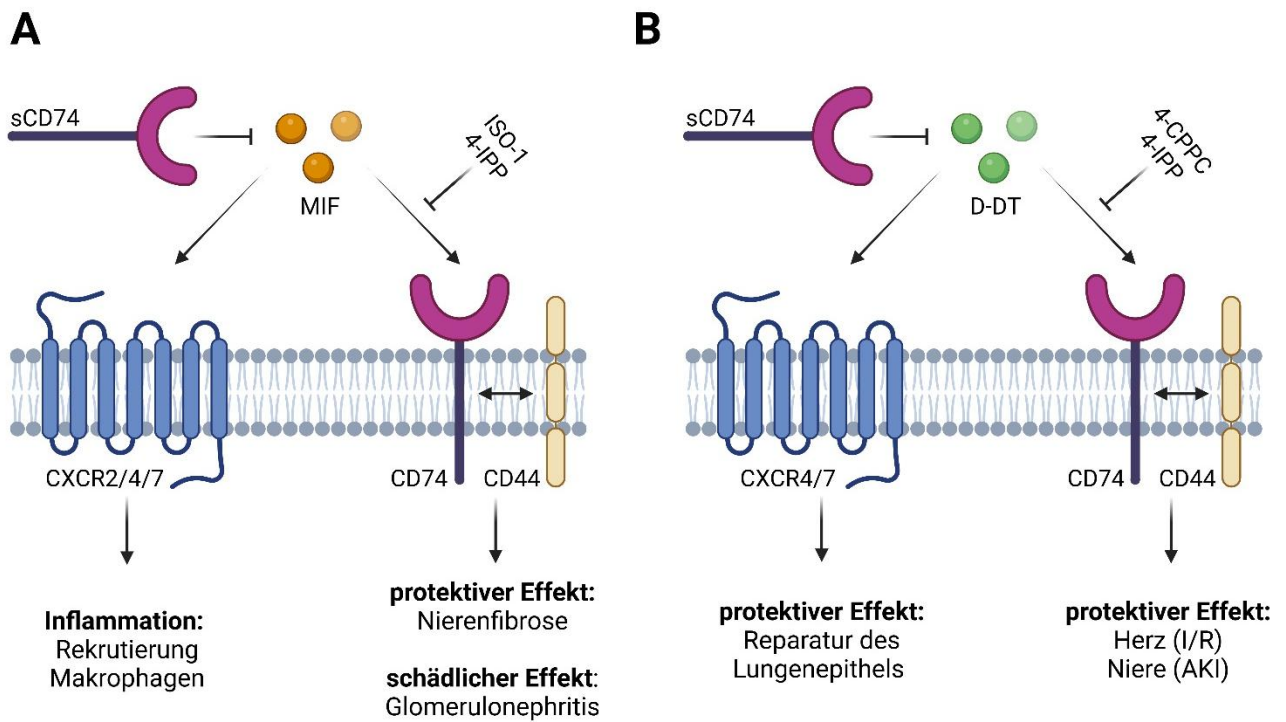


Abbildung 4: Die Interaktionen von MIF und D-DT.

A. Der Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) bindet an CXCR2, CXCR4 und CXCR7 und rekrutiert auf diesem Wege Makrophagen. MIF bindet außerdem an CD74 und löst die Komplexbildung mit CD44 aus, dies resultiert in einem protektiven Effekt in der Nierenfibrose und einem schädlichen Effekt in der Glomerulonephritis. Diese Interaktion kann durch den Inhibitor 4-IPP und den spezifischen Inhibitor ISO-1 verhindert werden. MIF bindet ebenso an den löslichen (s) CD74 Rezeptor und löst eine kompetitive Hemmung von D-DT aus. B. D-Dopachrom Tautomerase (D-DT) bindet an CXCR4 und CXCR7 und löst dadurch einen protektiven Effekt in der Lunge durch die Reparatur des Lungenepithels aus. D-DT bindet außerdem an CD74 und löst die Komplexbildung mit CD44 aus, wodurch ein protektiver Effekt im Herzen nach einer I/R und in der Niere nach einer AKI ausgelöst wird. Diese Interaktion kann durch den Inhibitor 4-IPP und den spezifischen Inhibitor 4-CPPC verhindert werden. D-DT bindet ebenso an den sCD74 Rezeptor und löst eine kompetitive Hemmung von D-DT aus. (Erstellt mit Biorender.com)

2. Ziel der Doktorarbeit

Der Zusammenhang zwischen D-DT und der Nierenfibrose ist derzeit unerforscht. Es konnte bereits in einer präklinischen Studie gezeigt werden, dass das homologe Protein von D-DT, MIF, in progressiven chronischen Modellen der Nierenfibrose protektiv wirkt, hingegen beeinflusst es immunvermittelte glomeruläre Nierenerkrankungen negativ. MIF kann deshalb nur bedingt als Therapeutikum gegen Nierenfibrose verwendet werden. Aufgrund der derzeit veröffentlichten protektiven Eigenschaft von D-DT und der Tatsache, dass D-DT bei Entzündung in geringerem Maße beteiligt ist, wird vermutet, dass D-DT bei interstitieller Nierenfibrose therapeutisch eingesetzt werden kann.

Das Ziel der Doktorarbeit ist die Identifizierung der Rolle von D-DT in der Nierenfibrose. Dafür wurde zunächst die Lokalisierung von D-DT in der gesunden und fibrotischen Niere geklärt. Die Expression von D-DT in der Nierenfibrose wurde *in vivo* durch die Nierenfibrose-Modelle (UUO und I/R) und Patientenbiopsien, mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, *Real time* Polymerasen Kettenreaktion (RT-PCR), RNA-in-situ-Hybridisierung, Western Blot und *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) analysiert. Öffentlich verfügbare Datensätze und Arrays wurden zudem reanalysiert und durch *in vitro*-Studien mit humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293T) ergänzt. Die funktionelle Rolle von D-DT *in vivo* wurde in *Ddt*-KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Geschwistermäusen und durch Verabreichung von rekombinantem D-DT in WT-Mäusen in einem Fibrosemodell (UUO) analysiert.

3. Material & Methoden

Der Material- und Methodenteil ist nach Standardprotokollen der Nephropathologie der Uniklinik RWTH Aachen verfasst und diese wurden entsprechend individuellen experimentellen Änderungen angepasst.

3.1. Material

3.1.1. Reagenzien/Chemikalien

Name	Hersteller
4-(3-Carboxyphenyl)-2,5-Pyridindicarboxylsäure	Biomol
4-Iodo-6-Phenylpyrimidin	Tocris
Amphotericin-B	Gibco™
Ammonium Hydroxid	Roth
Antigen-Demaskierungslösung, auf Zitronensäurebasis	Vector Laboratories
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bepanthen
Bromphenol blau (1 %)	Roth
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva
BSA Standard für Protein-Assays	Optima Interchim
Carprofen (50 mg/ml)	Rimadyl
Chloroform	Applichem
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Merck Sigma-Aldrich
DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid)	Thermo Fisher
dATP	Roth
dCTP	Roth
dGTP	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Merck Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat-Hydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck Sigma-Aldrich

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), hohe Glukose, GlutaMAX™	Gibco™
DMEM/F12	Gibco™
DMSO (Dimethyl Sulfoxid, C ₂ H ₆ SO)	MP
dTTP	Roth
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck Sigma-Aldrich
EGTA (Ethylenglycolbis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Merck Sigma-Aldrich
Eisenoxid, Puder 97 %	American Elements
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Immuno Tools
Essigsäure (100 %)	Roth
Ethanol (100 %)	Werner Hofman
Ethanol (70 %)	Werner Hofman
FKS (Fetales Kälberserum)	Gibco™
<i>First Strand Buffer</i>	Invitrogen
Formaldehyd Lösung 37 % (CH ₂ O)	Merck Sigma-Aldrich
Glycerin	Merck Sigma-Aldrich
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor	Thermo Scientific
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x)	Thermo Fisher Scientific
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonsäure)	Roth
Hämatoxylin-Lösung modifiziert nach Gill II	Merck Sigma-Aldrich
Histokitt	Carl Roth IHC materials Specifications
Hydrokortison (Hydrocortison-21- Hydrogensuccinat Natriumsalz)	Pfizer Pharma GmbH, Pharmacia GmbH
<i>Immu-Mount</i>	Shandon
Isofluran Florene	Abott
Isopropanol	VWR
Isotone 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl)	B. Braun
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Supelco
Ketamin	Serumwerk Bernburg
Kollagenase IV	Worthington Biochemical
Lackstift	VWR

Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck Sigma-Aldrich
Maisöl	Sigma-Aldrich
MES SDS Laufpuffer (20x) NuPage	Invitrogen
Methanol	VWR
Methylgrün	Merck Sigma-Aldrich
M-MLV Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific
MOPS SDS Laufpuffer (20x)	Invitrogen
Natriumacetat (NaCH ₃ COO)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	VWR Chemicals
Natriumdodecylsulfat (SDS, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S, 10 %)	Roth
Natriumhydroxid (NaOH, 1 M)	Merck Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid (NaOH, 5 M)	Merck Sigma-Aldrich
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich Chemie
NuPAGE™ 10 %, Bis-Tris, 1,5mm, Mini Protein Gele	Invitrogen
O.C.T. <i>Compound</i>	TissueTek®
Paraffin	Roth
PBS pH 7,4	Gibco
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Pierce™ ECL Western Blot Substrat	Thermo Fisher Scientific
<i>Primer random</i>	Roche
RNAlater® Lösung	Ambion Inc.
RNAscope™ Protease IV	ACDBio
RNAscope™ Protease Plus	ACDBio
RNAscope™ <i>Target Retrieval Reagent</i>	ACDBio
RNAscope™ <i>Wash buffer</i>	ACDBio
RNasin® Ribonuklease Inhibitor	Promega
Salzsäure (HCl, 1 M)	Applichem
Salzsäure (HCl, 37 %)	Roth
Schiffs Reagenz	Merck
Spectra <i>Multicolor Broad Range Protein Marker</i>	Thermo Scientific
Spectra <i>Multicolor High Range Protein Marker</i>	Thermo Scientific
SuperSignal™ West femto	Thermo scientific

SYBR Green I	Eurogentec
Trichloressigsäure (TCA, C ₂ HCl ₃ O ₂)	Alfa Aesar
Tris Ultra-rein	MP Biomedicals, LLC
Triton X-100	Appllichem
Trypan blau	ThermoFisher Gibco
Trypsin-EDTA (0,25 %)	Thermo Fisher Scientific
TWEEN20	Merck Sigma-Aldrich
Tween-20	Biorad
VECTASHIELD® <i>Antifade Mounting Medium</i>	Vector Laboratories
VisUCyte Antigen <i>Retrieval Reagent-Universal</i>	R&D
Wasserstoffperoxid (30 %)	Roth
Xylazin	WDT
Xylol	Roth
Zitronensäure	Merck Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Merck Sigma-Aldrich

3.1.2. Stimulanzen

Stimulanzen	Hersteller
Bromdesoxyuridin (BrdU)	Thermo Fisher
D-Dopachrom Tautomerase (D-DT)	Novus
Makrophagen-Migrations-Inhibitions Faktor (MIF)	Sino Biological
<i>Transforming Growth Factor-β</i> (TGFβ)	Gibco

3.1.3. Kits

Kit	Hersteller
<i>Avidin/Biotin blocking kit</i>	Vector Laboratories
<i>BCA assay: Protein assay kit</i>	Optima Interchim
<i>Cell Proliferation ELISA</i>	Roche
Drop DAB substrate kit, peroxidase (HRP) (3,3-diaminobenzidine)	Vector Laboratories
Human DDT / Dopamine Tautomerase (<i>Sandwich ELISA</i>) ELISA Kit - LS-F22186	LSBio

<i>Human/Mouse AKT Pathway Phosphorylation Array C1</i>	RayBiotech
<i>Human/Mouse MAPK Phosphorylation Array</i>	RayBiotech
<i>In Situ Cell Death Detection Kit, TMR rot</i>	Roche
<i>Mouse Apoptosis Array C1</i>	RayBiotech
<i>Mouse DDT / Dopamine Tautomerase (Sandwich ELISA) ELISA Kit - LS-F15772</i>	LSBio
<i>Mouse MIF (Sandwich ELISA) ELISA Kit - LS-F5436</i>	LSBio
<i>Opal 650 Reagent Pack</i>	Akoya
<i>Qubit Protein Broad Range Assay</i>	Invitrogen
<i>RNA Scope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2</i>	ACDBio
<i>RNeasy plus mini kit</i>	Qiagen
<i>RT-PCR 10-SN10-05</i>	Eurogentec
<i>VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP kit, peroxidase (Standard)</i>	Vector Laboratories

3.1.4. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
10 µl Pipettenspitzen	Starlab
1000 µl Pipettenspitzen	Starlab
200 µl Pipettenspitzen	Starlab
Amersham Protran® Nitrozellulosemembran 0,2 µm	GE Healthcare
Amersham Protran® Nitrozellulosemembran 0,45 µm	GE Healthcare
Ampuwa	Fresenius Kabi
Deckgläser (24x24 mm)	Roth
Glaskapillaren, heparinisiert Ø 0,8 mm	Hilgenberg
Kanüle, 21G ½“	BD Microlance™
Kanüle, 27G ½“	BD Microlance™
Kryoröhrchen (2 ml)	Simport Scientific

Mahlkugeln	RETSCH
Nahtmaterial Mersilene® 5,0	Ethicon
Nitril® X-Long Nitrilhandschuhe, M	Meditrade
NuPAGE™ 10 %, Bis-Tris, 1,5 mm, mini	
Protein Gele	Invitrogen
NuPAGE™ 4-12 %, Bis-Tris, 1,5 mm, mini	
Protein Gele	Invitrogen
NuPAGE™ 7 %, Tris-Acetate, 1,5 mm, mini	
Protein Gele	Invitrogen
Objektträger (<i>Superfrost plus</i>)	epredia
Operationsbesteck	Fine Scientific Tools
Parafilm	Bemis
PCR-Platte (96-Vertiefungen)	Biorad
Perfusorspritze, Original-Perfusor®, 50 ml	B. Braun
Pipetten (10, serologisch)	Corning Labomedic
Pipetten (25, serologisch)	Corning Labomedic
Pipetten (5, serologisch)	Corning Labomedic
Reaktionsgefäße (0.5 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1.5 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (2 ml)	Eppendorf
Schraubgefäß (15 ml)	Greiner
Schraubgefäß (50 ml)	Greiner
Serumröhrchen (Z-Serum-Gel)	Sarstedt
Sieb, BD Falcon™ cell stainer, 100 µm	BD Bioscience
Skalpell Feather Disposable Scalpel No 15	Feather Safety Razor Co LTD
Spritze, 1 ml BD Plastipak™	Becton Dickinson
TissueTek® Einbettkassetten	Sakura
Trans-Blot Turbo <i>mini-size</i> transfer stacks	Biorad
TransBlot Turbo, <i>mini-size</i> 0,2 µm Nitrozellulose	Biorad
TransBlot Turbo, <i>mini-size</i> LF PVDF	
Membranen	Biorad
Trockeneis	Uniklinik Aachen
QIAShredder	Qiagen
Zellkulturflasche (250 ml, T75)	Greiner

Zellkulturplatten (96-Vertiefungen)	Falcon™
Zellkulturplatten (6-Vertiefungen)	Falcon™
Zellschaber	Greiner

3.1.5. Geräte

Geräte	Hersteller
Aperio AT2 DX	Leica
Blutdruckmesssystem CODA Standard	Kent Scientific
Brutschrank	Thermo electron corporation
COMET™	Lunaphore
Dampfgarer	Braun
Elektrophorese System	Biorad
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch
Heizblock	Thermo Scientific
iBright FL 1500	Invitrogen
Kauter Erbotom Acc 450	Erbe
Kühlschrank (4 °C)	Bosch
Magnet Dyna Mag™-2	Invitrogen Dynal
Metabolischer Käfig (3600M021)	Tecniplast
Microskop LEICA DM750	Leica
Microskop Zeiss Axio Imager	Zeiss
Mikrowelle MW 802	Exquisit
NanoDrop 2000	peqlab
NuPAGE Novex Elektrophorese-System	Invitrogen
Objektträger-Hybridisierungsofen, InSlide Out™	Boekel Scientific
Ofen	Memmert
PCR System (7300 Real Time PCR)	Applied Biosystems
pH-Meter <i>FiveEasy Plus</i>	Mettler Toledo
Pipetten	eppendorf
Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte
Plattenzentrifuge	Starlab
PowerPac universal	Biorad
Präzisionswaage ABJ320-4NM	Kern

Qubit 4	Invitrogen
Rasierer Favoritta II	Aesculap
Rotationsmikrotom CUT5062	Slee
Schwingmühle MM 400 MM400	Retsch
Sterile Arbeitsbank (Zellkultur) Hera safe	Heraeus
Tecan <i>infinite</i> M200 (Microplate reader)	Formax Technologies
Thermocycler (ThermoMixer C)	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Thermo scientific
Tischzentrifuge	Biozym
Turboblotter (Trans-Blot turbo, Transfer system)	Biorad
Überkopfschüttler	Starlab
Ultraschallbad 220	Branson
Vaskuläre Klemme	Fine Science Tools GmbH
Vortex-Genie 2 G-560E	Heidolph
Waage EMS-3000-2	Kern
Wärmeplatte TC-1000 <i>Temperature Controller</i>	CWE Inc
Wasserbad	GFL
Wasserbad für Paraffinschnitte	Barnstead
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf

3.1.6. Primärantikörper

Target	Wirt	Klonalität	Hersteller	Verdünnung			
				WB	IHC	IF	Multiplex
GAPDH	Maus	Monoklonal	novusbio	1:1000			
α-SMA	Kaninchen	Monoklonal	abcam	1:1000	1:500		
Kollagen I	Ziege	Polyklonal	Southern Biotech		1:100		
Kollagen III	Ziege	Polyklonal	Biotech		1:100		
F4/80	Ratte	Monoklonal	BioRad		1:500		
ErHr3	Ratte	Monoklonal	Dianova BD		1:50		
CD45	Ratte	Monoklonal	Bioscience Sigma		1:200		
MIF	Kaninchen	Polyklonal	Aldrich	1:500			
D-DT	Kaninchen	Polyklonal	Abcam	1:500	1:500	1:100	1:100

CD74	Kaninchen	Polyklonal	Sigma Aldrich	1:100	
BrdU	Maus	Monoklonal	R&D	1 µg/ml	
Aquaporin 1	Kaninchen	Monoklonal	abcam		1:2000
Calbindin	Kaninchen	Monoklonal	abcam		1:600
SLC12A	Kaninchen	Monoklonal	abcam		1:2000
CD31	Kaninchen	Monoklonal	abcam		1:600
CD13	Kaninchen	Monoklonal	abcam		1:700
THP	Kaninchen	Polyklonal	Santa Cruz		1:100
Aquaporin 2	Kaninchen	Monoklonal	abcam		1:1000
UMOD	Kaninchen	Monoklonal	abcam		1:4000
Ki-67	Kaninchen	Monoklonal	abcam	1:250	

3.1.7. Sekundärantikörper

Name	Wirt	Isotyp	Konjugat	Hersteller
Anti-Kaninchen	Ziege	IgG	Biotin	Vector laboratories
Anti-Ziegen	Kaninchen	IgG	Biotin	Vector laboratories
Anti-Ratten	Kaninchen	IgG	Biotin	Vector laboratories
Anti-Maus	Ziege	IgG2a	Biotin	Vector laboratories
Anti-Kaninchen	Affe	IgG	Alexa Flour 647	Jackson/Dianova
Anti-Kaninchen	Affe	IgG	Alexa Flour 488	Invitrogen
Anti-Kaninchen	Affe	IgG	Alexa Flour 647	Invitrogen
Anti-Kaninchen	Ziege	IgG	HRP	Invitrogen
Anti-Maus	Ziege	IgG	HRP	Invitrogen
Anti-Kaninchen	Ziege	IgG	Alexa Flour Plus 555	Lunaphore
Anti-Kaninchen	Ziege	IgG	Alexa Flour Plus 647	Lunaphore
Anti-Maus	Ziege	IgG	Alexa Flour Plus 555	Lunaphore
Anti-Maus	Ziege	IgG	Alexa Flour Plus 647	Lunaphore

3.1.8. Farbstoff

Farbstoff	Emission	Kanal	Hersteller
Opal 650	650 nm	Cy 5	Akoya

3.1.9. Primer

Primer	Organismus	Sequenz (5' zu 3')	Hersteller
<i>Ddt</i> vorwärts	Maus	CCGCGTGAGCGTTACGATA	Invitrogen
<i>Ddt</i> rückwärts	Maus	AGAGACCAGAAGGTGAGCACA	Invitrogen
<i>DDT</i> vorwärts	Human	GATACTTATCCGCTTTTTCCCC	Invitrogen
<i>DDT</i> rückwärts	Human	AGAAGCAGCCAGTTCACAG	Invitrogen
<i>Gapdh</i> vorwärts	Maus	GGCAAATTCAACGGCACAGT	Invitrogen
<i>Gapdh</i> rückwärts	Maus	AGATGGTGATGGGCTTCCC	Invitrogen
<i>GAPDH</i> vorwärts	Human	AGCCACATCGCTCAGACACC	Invitrogen
<i>GAPDH</i> rückwärts	Human	GCGCCAATACGACCAA	Invitrogen
<i>RNA18SN1</i> vorwärts	Human	GCAGAATCCACGCCAGTACAAG	Invitrogen
<i>RNA18SN1</i> rückwärts	Human	GCTTGTTGTCCAGACCATTGGC	Invitrogen
<i>Acta2</i> vorwärts	Maus	AAGCATTTGCGGTGGACAAT	Invitrogen
<i>Acta2</i> rückwärts	Maus	CCTTCCAGCAGATGTGGATCA	Invitrogen
<i>ACTA2</i> vorwärts	Human	CTATGCCTCTGGACGCACAACT	Invitrogen
<i>ACTA2</i> rückwärts	Human	CAGATCCAGACGCATGATGGCA	Invitrogen

3.1.10. Sonden

Sonde	Organismus	Sondentyp	System	Hersteller
<i>Ddt</i>	Maus	C1	RNAScope Multiplex	ACDBio

3.1.11. Zelllinien und Medien

3.1.11.1. Primäre renale Tubulusepithelzellen

Die renalen Tubulusepithelzellen wurden aus murinen Nieren gewonnen und als adhärente Primärkultur gezüchtet. Die Isolation wird in Kapitel 1.20.4 beschrieben.

Bestandteil	Endkonzentration
DMEM F12 <i>Advanced</i>	500 ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml
HEPES	1 M
Hydrokortison	50 ng/ml
L-Glutamin	2 mM
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	100 µg/ml

3.1.11.2. HK-2 Zellen

HK-2 Zellen sind humane epitheliale Tubulusepithelzellen. Es handelt sich um eine adhärent wachsende, immortalisierte Zellkultur.

Bestandteil	Endkonzentration
DMEM F12	500 ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml
L-Glutamin	2 mM

3.1.11.3. HEK293T Zellen

HK-2 Zellen sind humane embryonale Nierenzellen. Es handelt sich um eine adhärent wachsende, immortalisierte Zellkultur.

Bestandteil	Endkonzentration
DMEM, hohe Glukose, GlutaMAX™	500 ml
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml

3.1.12. Humane Nierenbiopsien

Die anonymisierten humanen Nierenbiopsien stammen von Patienten mit fortgeschrittener Hydronephrose oder chronischer Pyelonephritis. Bei den Kontrollnieren handelt es sich um Nephrektomien entweder von tumorfernen

Bereichen von Nierenzellkarzinom-befallenen Nieren sowie Trauma-bedingte Nephrektomien, ohne offensichtliche pathologische Veränderungen. Die Proben wurden unter Genehmigung der lokalen Ethikkommission der RWTH Aachen (EK244/14, EK042/17 und EK016/17) verwendet.

3.1.13. Öffentliche Datenbanken

Die in dieser Dissertation analysierten Datensätze sind im *Gene Expression Omnibus Repository* (GEO) unter den folgenden Zugriffsnummern verfügbar: GSE36496 und GSE76882. Außerdem wurden nierenspezifische *Single Cell* Datensätze mittels des *Online Analyzers* <https://humphreyslab.com/SingleCell/> analysiert.

3.1.14. Software

Software	Hersteller
Aperio ImageScope	Leica
Bio-Rad CFX Maestro	BioRad
Biorender	Biorender
GEO2R	NCBI
GPowerNT	HHU
GraphPadPrism	Graphpad Software, Inc.
HORIZON Software	Lunaphore
iBright Analysis Software	Thermo Fisher
ImageJ	Wayne Rasband
Magellan Version VI	Medentis medical
Mendeley	Mendeley
Office365	Microsoft
Photoshop	Adobe
QuPath	Dr. Pete Bankhead
Serial Cloner	Serial Basics
Zeiss Zen	Zeiss

3.2. Methoden

3.2.1. Tierexperimentelle Methoden

3.2.1.1. Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte wie im TVA 81-02.04.2018.A251 beschrieben. Die Versuchstiere wurden am Institut für Versuchstierkunde der Uniklinik Aachen gehalten, gemäß der nach § 11 TierSchG erteilten Erlaubnis. Als international anerkannte Normen für die Haltung von Versuchstieren galt das deutsche Tierschutzgesetz und die Tierschutzversuchstierverordnung, die EU-Richtlinie 2010/63 und die publizierten Empfehlungen der *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) und der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS).

Die Tiere wurden in geschlossenen Barriersystemen gehalten. Die Tierhaltung erfolgte in einem 12-Stunden-Tag-/Nachtzyklus bei einer Raumtemperatur zwischen 20 und 24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 45-65 %. Es wurde eine tägliche Kontrolle des Allgemeinbefindens der Tiere durchgeführt.

Die Grundversorgung der Tiere (Füttern, Tränken, Umsetzen in frische Käfige) oblag den Versuchstierpflegern des Instituts für Versuchstierkunde der Uniklinik Aachen. Das Futter- und Wasserangebot erfolgte *ad libitum*.

3.2.1.2. Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

3.2.1.2.1. Carprofen-Analgesie

Konzentration Carprofen: 5 mg/kg Körpergewicht
Verdünnung in 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl)

3.2.1.2.2. Ketamin/Xylazin-Narkose

Konzentration Ketamin: 100 mg/kg Körpergewicht
Konzentration Xylazin: 10 mg/kg Körpergewicht
Verdünnung in 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl)

In diesem Modell einer primär interstitiellen Nierenfibrose wird durch unilaterale Ureterobstruktion (UUO) und einem daraus resultierenden Aufstau in den ableitenden Harnwegen, eine Hydronephrose induziert. Es entwickelt sich innerhalb weniger Tage eine tubulointerstitielle Schädigung mit Fibrose. Die UUO erfolgte wie im Tierversuchsantrag (TVA) 81-02.04.2018.A251 beschrieben. Das Ziel der Versuche war es, die funktionelle Rolle von D-DT in der Nierenfibrose zu ermitteln.

Für die UUO erfolgt die Analgesie durch Carprofen mindestens 30 min vor der Operation (OP) in der Dosierung 5 mg/kg, subkutan (s.c.). Daran angeschlossen wurden die Mäuse für ca. 15 min in eine Allgemeinnarkose (Ketamin und Xylazin intraperitoneal (i.p.) (100 bzw. 10 mg/kg) mit einem finalen Volumen von 10 µl/g Maus gelegt.

Die OPs wurden von PD Dr. Sonja Djudjaj durchgeführt. Die Tiere wurden auf eine Wärmeplatte gelegt, welche über einen Überhitzungsschutz verfügte, indem die Temperatur der Maus mittels Analsonde ununterbrochen gemessen und die Temperatur der Platte entsprechend reguliert wurde. Die Augen wurden mit Bepanthen-Salbe vor dem Austrocknen geschützt. Die Reflexe (Schwanzspitzen, Lid- und Zwischenzehen) wurden anschließend getestet. Wies die Maus keine Reflexe mehr auf, wurde das Fell im Bauchbereich rasiert. Nachfolgend wurde die Maus auf der Wärmeunterlage in Rückenlage mit Klebestreifen an den Pfoten vorsichtig fixiert und die Haut mit einem hautfreundlichen Desinfektionsmittel desinfiziert. Dann erfolgte eine mediane Längslaparotomie (ca. 2-3 cm Schnittlänge) und die linke Niere wurde freigelegt und der Nierenhilus dargestellt. Der linke Ureter wurde durch Elektrokauter mittig ligiert. Anschließend wurden die Muskelfaszie sowie die Haut mit einer fortlaufenden Naht (5,0, geflochten, Mersilene) verschlossen. Anschließend erwachte das Tier unter Beobachtung in einem separaten Käfig, der halbseitig mit einer Infrarotlampe beleuchtet ist, um ein Auskühlen des Tieres zu vermeiden.

Die Analgesie erfolgte durch Carprofen in der Dosierung von 5 mg/kg s.c. ca. 24 h, 48 h und 72 h nach der OP. Die Tiere wurden *post* OP drei Tage lang zweimal täglich kontrolliert. Anschließend erfolgte einmal täglich eine Visite der Tiere. Für das Versuchsvorhaben wurden transgene männliche Mäuse im Alter von 8-14 Wochen verwendet. Für jeden Zeitpunkt (Tag 2, Tag 5, Tag 10) wurden jeweils acht Mäuse des Genotyps *Ddt* ^{-/-} sowie acht Wildtyp (WT) Geschwistertiere verwendet.

3.2.1.2.3. *D-DT Interventionsstudie*

Um D-DT als mögliches therapeutisches Ziel für die Behandlung der Nierenfibrose zu überprüfen, wurden präventive Interventionen mit rD-DT und 4-IPP durchgeführt. Das rD-DT wurde verabreicht, um eine Überexpression von D-DT *in vivo* zu erzeugen. 4-IPP wurde verabreicht, um eine Inhibition von D-DT zu erzielen. Für das Versuchsvorhaben wurden männliche WT-Mäuse im Alter von 8-14 Wochen

verwendet. Jeweils acht Mäusen der Kontrollgruppe wurde das Vehikel und acht Mäusen wurde die jeweilige Substanz verabreicht.

Konzentrationen und Applikationen:

- rD-DT: 5 ng/g KG in 100 µl NaCl i.p. täglich (präventiv: ab Tag -2)
- 4-IPP: 50 µg/g KG in 100 µl 10 % DMSO in 90 % Maisöl i.p. täglich (präventiv: ab Tag -2). Sowie in einer Austestung 5 µg/g KG in 100 µl 10 % DMSO in 90 % Maisöl (präventiv: ab Tag -2)

3.2.1.3. Ischämie-Reperfusion (I/R)

Carforfen-Analgesie (3.2.1.2)

Ketamin/Xylazin-Narkose (3.2.1.2.2)

Dieses Modell ist durch anhaltende Entzündung und progrediente interstitielle Fibrose gekennzeichnet, die durch einen Ischämie/Reperfusion (I/R)-Schaden initiiert wird. Aufgrund der Ischämie werden Nekrosen in den Tubulusepithelzellen ausgelöst, wodurch es in Folge zu einer akuten Entzündung kommt. Diese ist am besten am Tag 1 zu beobachten, wobei spätere teils resorptive Entzündungen am Tag 14 und eine Fibrose am Tag 21 mit chronischer Nierenschädigung, die durch progressive tubulointerstitielle Fibrose und Funktionsverlust gekennzeichnet ist, erkannt werden können. Die I/R erfolgte wie im TVA 81-02.04.2018.A251 beschrieben.

Für die I/R erfolgte die Analgesie durch Carprofen (5 mg/kg) vor der OP (mind. 30 min vorher). Daran angeschlossen wurden die Mäuse für ca. 40 min in eine Allgemeinnarkose (Ketamin und Xylazin i.p.) (100 bzw. 10 mg/kg mit einem finalen Volumen von 10 µl/g Maus) gelegt.

Die OP wurde von PD Dr. Sonja Djudjaj durchgeführt. Dafür wurden die Mäuse auf eine Wärmeplatte überführt, welche über einen Überhitzungsschutz verfügt, indem die Temperatur des Tieres mittels Analsonde ununterbrochen gemessen und die Temperatur der Platte entsprechend reguliert wurde. Die Augen wurden mit Bepanthen-Salbe vor dem Austrocknen geschützt. Die Reflexe (Schwanzspitzen, Lid- und Zwischenzehen) wurden getestet. Wies die Maus keine Reflexe mehr auf, wurde das Fell lateral rasiert. Nachfolgend wurde die Maus auf der Wärmeunterlage in Seitenlage gelegt und die Haut mit einem hautfreundlichen Desinfektionsmittel desinfiziert. Anschließend wurde ein kleiner, ca. 1 cm lateraler Schnitt unterhalb der Rippen durchgeführt, die Niere vorsichtig vorverlagert und der gesamte linke renale

Hilus identifiziert und mit einer feinen vaskulären Klemme für einen definierten Zeitraum (30 min. für einen irreversiblen Schaden) abgeklemmt. Anschließend wurden die Muskelfaszie sowie die Haut mit einer fortlaufenden Naht (5,0, geflochten, Mersilene) verschlossen. Die Analgesie erfolgte durch Carprofen in der Dosierung von 5 mg/kg s.c. ca. 24 h, 48 h und 72 h nach der OP. Die Tiere wurden post OP drei Tage lang zweimal täglich kontrolliert. Anschließend erfolgte einmal täglich eine Visite der Tiere. Für das Versuchsvorhaben wurden transgene weibliche Mäuse im Alter von 8-14 Wochen verwendet. Es wurden jeweils acht Mäuse des Genotyps *Ddt* *-/-* sowie acht WT-Geschwistertiere verwendet.

3.2.1.4. Finale Nierenentnahme

Carforfen-Analgesie (3.2.1.2)

Ketamin/Xylazin-Narkose (3.2.1.2.2)

Vor der finalen Nierenentnahme wurde mind. 30 min vor Beginn des Finaleingriffs der Mäuse das Analgetikum Carprofen in der Dosierung 5 mg/kg KG s.c. verabreicht, um Schmerzen während des Eingriffs vorzubeugen. Anschließend wurde in Vollnarkose (Ketamin und Xylazin i.p. (100 bzw. 10 mg/kg) mit einem finalen Volumen von 10 µl/g Maus) nach Überprüfung der Reflexe (Schwanzspitzen, Lid- und Zwischenzehen) mittels einer heparinisierten Glaskapillare (Außendurchmesser 0,8 mm) einmalig retrobulbär Blut abgenommen. Danach erfolgte die Eröffnung des Brustkorbes mit Einschneiden der *Vena cava abdominalis*, Kanülierung der linken Herzkammer und Perfusion der Tiere mit ca. 40 ml sterilem NaCl. Dies erfolgt, damit die Erythrozyten in der Niere herausgespült werden und die durch das Hämoglobin ausgelöste Erythrozyten- Eigenfluoreszenz die histologischen Färbungen nicht beeinflusst. Nach der Perfusion wurde die Eröffnung des Abdomens und die Entnahme der Nieren durchgeführt. Der Tod trat nach der Perfusion durch vollständiges Ausbluten ein. Alles erfolgte in Vollnarkose, ohne dass die Maus aus der Narkose erwachte.

3.2.1.5. Serumgewinnung

Die Blutabnahme erfolgte am narkotisierten Tier (3.2.1.4). Um das Serum des Blutes zu erhalten, wurde das Blut in Z-Serum-Gel Röhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Röhrchen bei 1380 relative Zentrifugalbeschleunigung (g) bei 4 °C für 10

min zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig von den pelletierten Blutzellen getrennt abgenommen und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.6. Gewebefixation

3.2.1.6.1. Formalin

29 mM NaH₂PO₄ x H₂O
45,8 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
10 % (v/v) 37 % Formalin
In Reinstwasser
Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt.

3.2.1.6.2. Methacarn

3,72 M Chloroform
1,75 M Essigsäure (100 %)
14,84 M Methanol

Um das Gewebe für möglichst viele Untersuchungen nutzen zu können, wurde jede Niere mit Hilfe eines Skalpells zerteilt. Zunächst wurde die Niere im Längsschnitt halbiert. Eine Hälfte wurde durch einen Querschnitt geteilt und beide Teile wurden für histologische Untersuchungen verwendet. Die andere Nierenhälfte wurde gedrittelt und für Protein- und RNA Proben, sowie Gefrierschnitte verwendet. Die entstandenen Stücke wurden auf verschiedene Arten konserviert. Für histologische Untersuchungen wurde ein Teil der Niere in Methacarn und ein Teil in Formalin fixiert; ein weiterer Teil wurde für Gefrierschnitte verarbeitet.

Die entsprechenden Gewebestücke wurden mindestens 24 h bei 4 °C in Formalin bzw. Methacarn fixiert. Anschließend wurden sie in einem Entwässerungsautomaten dehydriert. Dieser Schritt wurde vom Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Uniklinik Aachen übernommen. Nachfolgend wurden die entwässerten Gewebestücke in Paraffin (Roth) eingebettet und bei RT gelagert.

Für die Gefrierschnitte wurde das Gewebe in O.C.T. Compound (TissueTek®) eingebettet und in Methylbutan (gelagert auf Trockeneis) eingefroren. Für den Erhalt von Protein und RNA aus dem Gewebe wurde die Medulla der Niere entfernt, da in den Protein- und RNA-Analysen nur der kortikale Bereich der Niere betrachtet wurde. Der Grund dafür ist die unterschiedliche Genexpression in der Medulla und im Cortex. Die Proteinprobe wurde in Trockeneis schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Proben für Genexpressionsanalysen wurden in einer RNAlater® (Ambion Inc.) für 24 h bei 4 °C fixiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.2.2. Histologische Methoden

3.2.2.1. Herstellen von Gewebeschnitten

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden 1 µm dünne Schnitte von den Gewebe-Paraffinblöckchen auf einem Rotationsmikrotom angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels aufgenommen, auf die Oberfläche eines Wasserbades (42 °C) abgelegt und von dort auf Objektträger überführt. Dann wurden sie über Nacht bei 50 °C im Ofen getrocknet und anschließend bei RT gelagert.

3.2.2.2. Perjodsäure-Schiffs-Reagenz-(PAS)-Färbung

3.2.2.2.1. 2 % Perjodsäure

88 mM Perjodsäure in Reinstwasser

Die Perjodsäure-Schiffs-Reagenz (PAS)-Färbung ist eine zytochemische Färbung, die durch eine pink bis magentarote Anfärbung von Glykolgruppen, eine gute Übersicht über Gewebestrukturen verleiht. Hämatoxylin sorgt durch Bindung an die Phosphatgruppen von Nukleinsäuren für eine blaue Kontrastfärbung der Zellkerne.

Zunächst wurde der Gewebeschnitt entparaffiniert. Der Gewebeschnitt wurde dafür dreimal für jeweils fünf Minuten (min) in Xylol inkubiert bei mehrmaliger Auf- und Abbewegung. Anschließend folgten 3 x 2 min Inkubation in 100 % Alkohol (EtOH), bei mehrmaliger Auf- und Abbewegung, sowie 2 x 2 min Inkubation in 95 % EtOH und 1 x 2 min Inkubation in 70 % EtOH. Der Schnitt wurde anschließend zweimal für 5 min in Reinstwasser gewaschen.

Darauffolgend wurde der Schnitt zunächst 30 min mit 2 %iger Perjodsäure behandelt, dreimal für 2 min mit Reinstwasser gewaschen und anschließend 1 h in der Schiffschens-Reagenz-Lösung im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Schnitt für 5 min unter fließendem Leitungswasser (35 °C) gewaschen, 5 min in Hämatoxylin inkubiert und schließlich 5 min in Reinstwasser inkubiert. Daran angeschlossen wurde der Schnitt 5 min in warmem Leitungswasser mit Kalziumkarbonat gebläut. Nachfolgend wurde der Schnitt 5 min in Leitungswasser gewaschen. Die Rehydrierung des Schnittes erfolgte kurz eindippend, zunächst 2 x in 95 % EtOH und anschließend 3 x in 100 % EtOH. 3 x 5 min Inkubation des Schnittes erfolgte in Xylol. Das Eindecken des Schnittes erfolgte mittels Histokitt und eines Deckglases. Der Schnitt trocknete bei RT.

3.2.2.3. Immunfluoreszenz

3.2.2.3.1. Citrat/Antigendemaskierungs-Lösung:

1 % (v/v) ml Antigen-Demaskierungslösung, auf Zitronensäurebasis in H₂O

3.2.2.3.2. 10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

83,2 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

31,6 mM KH₂PO₄ (H₂O frei)

12,3 mM NaCl

In Reinstwasser

Der pH-Wert wurde auf 7,2 – 7,4 eingestellt.

3.2.2.3.3. 1x PBS

10 % (v/v) 10x PBS (3.2.2.3.2)

In Reinstwasser

3.2.2.3.4. 1 % BSA/PBS:

1 % (m/v) BSA

In 1x PBS (3.2.2.3.3)

Die Immunfluoreszenz (IF) dient der Identifizierung von Proteinen in einem Gewebeschnitt mittels spezifischer Primärantikörper und fluoreszierender Sekundärantikörper.

Zunächst wurde der Gewebeschnitt entparaffiniert. Der Gewebeschnitt wurde dafür dreimal für jeweils fünf Minuten in Xylol inkubiert bei mehrmaliger Auf- und Abbewegung. Anschließend folgten 3 x 2 min Inkubation in 100 % EtOH, bei mehrmaliger Auf- und Abbewegung, sowie 2 x 2 min Inkubation in 95 % EtOH und 1x 2 min Inkubation in 70 % EtOH. Der Schnitt wurde anschließend zweimal für 5 min in Reinstwasser gewaschen.

Anschließend wurde die Antigendemaskierung durchgeführt, indem der Schnitt für 5 min in der Mikrowelle in der Citrat/Antigendemaskierungs-Lösung gekocht wurde. Nach dem Kochen wurden die Schnitte mindestens 30 Minuten lang bei RT abgekühlt und dann zweimal 5 min in 1x PBS gewaschen. Es folgte die Inkubation des Erstantikörpers für 1 Stunde (h) in einer Inkubationskammer. Die Verdünnungen der Antikörper in 1 % BSA/PBS erfolgten wie in der Tabelle (3.1.6) beschrieben. Angeschlossen wurde das Waschen in 1x PBS für 2x 5 min, sowie die Inkubation des Zweitantikörpers für 30 min in einer Inkubationskammer. Der Schnitt wurde gewaschen (2 x 5 min in 1x PBS) und anschließend wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1:10.000 in 1 % BSA/PBS) für 5 min auf den Schnitt gegeben. Zuletzt folgte ein

einmaliges Waschen für 5 min in Reinstwasser und das Eindecken des Schnittes mittels Immumount sowie eines Deckglases. Der Schnitt trocknete über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank.

3.2.2.4. Immunhistochemie (IHC)

1 % BSA/PBS (3.2.2.3.4)

Citrat/Antigendemaskierungs-Lösung (3.2.2.3.1)

10x PBS (3.2.2.3.2)

1x PBS (3.2.2.3.3)

3.2.2.4.1. *H₂O₂ Blockierlösung (3 %)*

3 % (v/v) H₂O₂
In Reinstwasser

3.2.2.4.2. *Tris Puffer 1x pH 7,6*

50,3 mM Tris
200 mM NaCl
In Reinstwasser
Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt.

3.2.2.4.3. *3,3'-Diaminobenzidin (DAB)*

0,176 M DAB
In 1x Tris Puffer pH 7,6 (3.2.2.4.2)
Das DAB wurde über Nacht im Dunkeln gelöst.

3.2.2.4.4. *DAB-Lösung*

175 ml 3,93 mM DAB (3.2.2.4.3)
0,023 % (v/v) H₂O₂
In 1x Tris Puffer pH 7,6 (3.2.2.4.2)

3.2.2.4.5. *Methylgrün*

2 % (m/v) Methylgrün
73,5 mM Essigsäure
26,5 mM Natriumacetat
Der pH-Wert wurde auf 4,2 eingestellt und anschließend durch Filterpapier gefiltert.

Die Immunhistochemie (IHC) dient der Identifizierung von Proteinen in einem Gewebeschnitt mittels spezifischer Primärantikörper und enzymgekoppelter Sekundärantikörper, welche durch eine Enzym-Substrat-Reaktion einen Farbstoff freisetzen können.

Zunächst wurde der Gewebeschnitt entparaffiniert. Der Gewebeschnitt wurde dafür dreimal für jeweils fünf Minuten in Xylol inkubiert bei mehrmaliger Auf- und Abbewegung. Anschließend folgten 3 x 2 min Inkubation in 100 % EtOH, bei mehrmaliger Auf- und Abbewegung, sowie 2 x 2 min Inkubation in 95 % EtOH und 1 x 2 min Inkubation in 70 % EtOH. Der Schnitt wurde anschließend zweimal für 5 min in Reinstwasser gewaschen.

Anschließend wurde optional die Antigendemaskierung durchgeführt, indem der Schnitt dreimal für 5 min in der Mikrowelle in der Citrat/Antigendemaskierungs-Lösung gekocht wurde. Nach dem Kochen wurden die Schnitte mindestens 30 Minuten lang bei RT abgekühlt und dann zweimal fünf Minuten lang in 1x PBS gewaschen. Nachfolgend wurde die Aktivität der endogenen Peroxidasen mittels einer 10-minütigen Inkubation in 3 % H₂O₂ abgeblockt. Der Schnitt wurde zweimal für 5 min in 1x PBS gewaschen. Optional wurde das Blocken mittels des Avidin/Biotin-Kits (Vector Laboratories) und das nachfolgende Waschen (2x 5 min in 1x PBS) abgeschlossen. Es folgte die Inkubation des Erstantikörpers für 1 h in einer Inkubationskammer. Die Verdünnungen der Antikörper in 1 % BSA/PBS erfolgten wie in der Tabelle (3.1.6) beschrieben. Angeschlossen wurde das Waschen in 1x PBS für 2x 5 min, sowie die Inkubation des Zweitantikörpers für 30 min in einer Inkubationskammer. Der Schnitt wurde gewaschen (2 x 5 min in 1x PBS) und anschließend die ABC-HRP-Lösung des Kits (Vector Laboratories) für 30 min auf den Schnitt gegeben. Daran anschließend wurde der Schnitt gewaschen (2 x 5 min in 1x PBS). Infolgedessen wurde der Schnitt in der 3,3'-Diaminobenzidine (DAB)-Lösung in einem 37 °C Wasserbad für ca. 10 min inkubiert. Nach einem einmaligen Waschen für 2 min in Reinstwasser wurde die Gegenfärbung mit Methylgrün für 3 min durchgeführt. Die Rehydrierung des Schnittes erfolgte kurz eindippend, zunächst 2 x in 95 % EtOH und anschließend 3 x in 100 % EtOH. 3 x 5 min Inkubation des Schnittes erfolgte in Xylol. Das Eindecken des Schnittes erfolgte mittels Histokitt und eines Deckglases. Der Schnitt trocknete bei RT.

3.2.2.5. Auswertung der IHC-Färbung

Zur Auswertung der IHC-Färbungen wurden die Schnitte zunächst mithilfe des Leica Scanners und eines zuvor generierten Barcodes eingescannt. Anschließend wurden die Schnitte in der Aperio ImageScope (Leica) geöffnet und in einer 20-fachen Vergrößerung 10 Fotos von dem Cortex angefertigt. Diese Fotos wurden zu einem Fotostapel mit der Software ImageJ (Wayne Rasband) zusammengefügt und in ein 8-

Bit Foto transferiert. Nachfolgend wurde ein Schwellenwert festgelegt, um die Hintergrundfärbung von der spezifischen Färbung differenzieren zu können. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der angefärbten Fläche zur Gesamtfläche bestimmt.

3.2.2.6. Multiplex RNA-*in-situ*-Hybridisierung (RNAscope™)

3.2.2.6.1. Antigendemaskierungs-Lösung

10 % (v/v) 10x RNAscope™ Target Retrieval Reagent
In Reinstwasser

3.2.2.6.2. Waschpuffer

2 % (v/v) RNAscope™ Waschpuffer
In Reinstwasser

3.2.2.6.3. 20x SCC Puffer

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
In Reinstwasser
Den pH-Wert auf 7,0 einstellen
Den Puffer anschließend autoklavieren.

3.2.2.6.4. 5x SCC Puffer

25 % (v/v) 20x SCC (3.2.2.6.3)
In Reinstwasser

3.2.2.6.5. Opal

0,1 % (v/v) Opal 650
In TSA-Puffer (im Kit enthalten)

Die Multiplex RNA-*in-situ*-Hybridisierung wird verwendet, um mithilfe einer Sonde und fluoreszierender Amplifikation die Expression von spezifischer mRNA zu detektieren. Im Folgenden wird das Protokoll der Firma ACDBio verwendet und beschrieben. Das Kit sowie die Sonden wurden zunächst auf RT gebracht. Währenddessen wurden die Schnitte 1 h bei 50 °C gebacken. Anschließend wurden die Schnitte entparaffiniert, indem sie 2x 5 min in Xylol inkubiert wurden, sowie 2x 2 min in 100 % EtOH. Dann wurden die Schnitte bei RT für ca. 5 min getrocknet. Es folgten 10 min Inkubation mit H₂O₂ sowie zweimaliges kurzes dippen in Reinstwasser. Dann folgte die Antigendemaskierung im Dampfgarer. Dafür wurde die Antigendemaskierungs-Lösung

in eine Glasküvette im Dampfgerar auf ca. 99 °C erhitzt. Es folgte die Inkubation für 15 min. Dann wurden die Schnitte kurz in Reinstwasser gedippt und anschließend für 3 min in 100 % EtOH gegeben. Getrocknet wurden sie für ca. 5 min bei RT. Mithilfe eines Lackstiftes wurde nachfolgend das Gewebe umrandet. Dann wurde auf die Schnitte Protease Plus pipettiert und für 30 min bei 40 °C in einen Objektträger-Hybridisierungssofen gegeben. Nachfolgend wurden die Schnitte kurz in Reinstwasser gedippt und die Sonde/Kontrolle wurde auf die Schnitte gegeben und für 2 h bei 40 °C im Objektträger-Hybridisierungssofen inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen in Waschpuffer für jeweils 2 min. Anschließend wurden drei Amplifikationsschritte (Amp 1 bis Amp 3) angeschlossen. Amp1 sowie Amp2 wurden jeweils 30 min bei 40 °C inkubiert mit jeweils zweimaligem Waschen in Waschpuffer für jeweils 2 min. Amp3 wurde 15 min bei 40 °C inkubiert, wobei das Waschen wie zuvor beschrieben erfolgte. Nachfolgend wurde HRP-C1 Signal entwickelt, indem die Multiplex FL v2 HRP-C1 Probe für 15 min bei 40 °C auf die Schnitte gegeben und nachfolgend gewaschen wurde. Das Opal wurde für 30 min bei 40 °C inkubiert und im Anschluss gewaschen. Dann wurde der Multiplex FL v2 HRP-Blocker für 15 min bei 40 °C auf die Schnitte gegeben und gewaschen. Es folgte die Inkubation mit DAPI für 30 s bei RT. Das DAPI wurde danach entfernt und direkt mit Vectra Mount und einem Deckglas eingedeckt. Die Schnitte trockneten über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank.

3.2.2.7. Tubuluspanel Lunaphore COMET™

Um Tubuli in gesunden sowie fibrotischen Nieren bestmöglich darzustellen und Analysen zu tätigen, wurde ein Tubuluspanel für den vollautomatisierten COMET von Lunaphore entwickelt. Die Färbungen erfolgen automatisiert und bestehen pro Antikörper aus drei Zyklen: Detektion des DAPI-Signals, Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers und des entsprechenden Sekundärantikörpers sowie der Elution. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte jeweils für 4 min und die Inkubation des Sekundärantikörpers für 2 min. Die Verdünnungen der jeweiligen Antikörper wurden in 3.1.6 beschrieben.

Name	Marker
Proximaler Tubulus	CD13
Distaler <i>Convolutad</i> Tubulus	CALB1
Henle-Schleife	UMOD
Sammelrohr	AQP2

3.2.3. Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1. Herstellung von Proteinlysaten

3.2.3.1.1. Bokemeyer Puffer

50,4 mM HEPES

149,9 mM NaCl

71,4 mM MgCl₂

1 mM EGTA

1 % (v/v) Glycerol

0,1 % (v/v) Triton X-100

In Reinstwasser

Vor der Verwendung muss ein Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugefügt werden (10 µl/ml)

Die während der finalen Nierenentnahme erhaltenen kleinen, schockgefrorenen Gewebestücke (3.2.1.4) werden für die Proteinisolation genutzt. Zunächst wurde dem Bokemeyer-Puffer ein Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (10 µl/ml) zugesetzt. Es wurden pro Gewebestück 500 µL Bokemeyer Puffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 2-3 Mahlkugeln versetzt. Anschließend wurde das aufgetaute Gewebestück in den Puffer gegeben. Es folgte der Zellaufschluss in einer Kugel-Schwingmühle mit einer Frequenz von 20 Hz. Nachfolgend wurden die Proben dreimal für jeweils 10 s in einem Ultraschallbad aufgeschlossen. Zwischen den Beschallungen wurden die Proben auf Eis gelagert. Dann wurden die Proben bei 10.620 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BC-Assay oder Qubit (3.2.3.2; 3.2.3.3) wurden die Lysate bei -80 °C eingefroren.

3.2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure Assay (BCA)

3.2.3.2.1. BCA-Arbeitslösung

1,96 % (v/v) Reagenz B

98,04 % (v/v) Reagenz A

3.2.3.2.2. *BSA-Standardlösung*

BSA-Standard (im Kit enthalten)

Verdünnungen: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,062 mg/ml, 0,031 mg/ml in Reinstwasser

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Protein-Assay ist ein kolorimetrischer Assay, der mit detergenzlöslichen Proteinlösungen kompatibel ist. Er basiert auf einer chemischen Reaktion, in welcher Cu^{2+} -Ionen im alkalischen Milieu an die Proteine binden und einen violetten Farbkomplex bilden.

Im Folgenden wird das Kit „BC Assay: Protein Assay Kit“ der Firma Interchim beschrieben. Es wurde eine BSA-Standardlösung mit Konzentrationen von 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,062 mg/ml, 0,031 mg/ml und 0 mg/ml hergestellt. Die Proteinlysate wurden je nach Konzentration entweder unverdünnt oder 1/5 bis 1/10 verdünnt verwendet. 10 μl des jeweiligen Standards bzw. die Lysate wurden in Doppelbestimmung in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Die BCA-Arbeitslösung wurde nachfolgend vorbereitet und 200 μL dieser Arbeitslösung wurde in jede Vertiefung gegeben. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C im Ofen, konnte die Absorption mit *einem Multimode Microplate Reader* bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen werden.

Die relativen Konzentrationen der Proben konnten anhand einer Standardgeraden der BSA-Standardlösungen, unter Berücksichtigung der Verdünnungen, bestimmt werden.

3.2.3.3. **Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Qubit**

3.2.3.3.1. *Standard 1*

10 % (v/v) Standard 1
75 % (v/v) Protein BR Assay Buffer
15 % (v/v) Protein BR Reagenz

3.2.3.3.2. *Standard 2*

10 % (v/v) Standard 2
75 % (v/v) Protein BR Assay Buffer
15 % (v/v) Protein BR Reagenz

3.2.3.3.3. *Blank*

5 % (v/v) Bokemeyer Puffer (3.2.3.1.1)
80 % (v/v) Protein BR Assay Buffer
15 % (v/v) Protein BR Reagenz

3.2.3.3.4. Vorbereitung der Gewebelysate

5 % (v/v) Gewebelysat
80 % (v/v) Protein BR Assay Buffer
15 % (v/v) Protein BR Reagenz

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Qubit basiert auf der selektiven Reaktion von Farbstoffen mit Proteinen. Es folgt eine fluoreszenzbasierte Quantifizierung mit dem Qubit System.

Im Folgenden wird das Kit „Protein Broad Range Assay“ der Firma Invitrogen beschrieben. Zunächst wurden die Standards sowie der Blank hergestellt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Gewebelysate zur Analyse vorbereitet. Dafür wurden die Proben, wie oben beschrieben, pipettiert. Anschließend wurde das Programm „Protein Broad Range Assay“ am Qubit ausgewählt. Es wurden die zwei Standards nacheinander gemessen und es folgten die einzelnen Proben.

3.2.3.4. SDS-Gelelektrophorese

3.2.3.4.1. 0,5 M Tris pH 6,8

0,5 M Tris
In Reinstwasser
Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt

3.2.3.4.2. 0,5 M EDTA

0,5 M Titriplex III
In Reinstwasser
Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt

3.2.3.4.3. 4x Proben Puffer

24 % (v/v) Tris pH 6,8 (3.2.3.4.1)
20 % (v/v) Glycerol
2 % (m/v) SDS
2 % (m/v) Bromphenolblau
0,4 % (v/v) 0,5 M EDTA (3.2.3.4.2)
10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
In Reinstwasser

3.2.3.4.4. Waschpuffer (TTBS)

25 mM Tris
150 mM NaCl
0,1 % (v/v) Tween-20
In Reinstwasser

3.2.3.4.5. MES-Puffer

5 % (v/v) 20x MES-Puffer
In Reinstwasser

Die SDS-Gelelektrophorese dient der Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Die Geltaschen wurden mit insgesamt 20 µl der Probe beladen. Ein Teil davon bestand aus dem Volumen von 10-15 µg Proteinlysate, außerdem wurden 5 µl 4x Probenpuffer sowie die entsprechende Menge Reinstwasser zur Auffüllung auf 20 µl benötigt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 min in einem Heizblock denaturiert. Die Proben wurden nachfolgend für ca. 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde erneut für eine gute Durchmischung gesorgt und das Reaktionsgefäß wurde kurz für 12700 U/min bei 4 °C abzentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde die Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)-Apparatur aufgebaut, die Taschen des Gels mit Wasser gespült und mit 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)-Puffer befüllt. Auf das SDS-Gel wurden 5 µl des Markers und 20 µl der jeweiligen Probe aufgetragen. Zunächst wurde das Gel bei einer Spannung von 80 V gestartet, bis die blaue Lauffront auf gleicher Höhe durch das Sammelgel gelaufen war; anschließend wurde die Spannung auf 150 V erhöht. Wenn die Lauffront ca. 1 cm vor dem Ende des Gels ankam, konnte die Elektrophorese gestoppt werden.

3.2.3.5. Western-Blot (*Turbo blotting*)

Waschpuffer (TTBS) (3.2.3.4.4)

3.2.3.5.1. Turbotransfer-Puffer

20 % (v/v) 5 x Transfer Puffer (BioRad)
60 % (v/v) Reinstwasser
20 % (v/v) 100 % EtOH

3.2.3.5.2. Ponceau S

0,1 % (m/v) Ponceau Rot
5 % (v/v) Essigsäure
In Reinstwasser

3.2.3.5.3. 3 % BSA in TTBS

3 % (m/v) BSA
In TTBS (3.2.3.4.4)

3.2.3.5.4. *ECL Western Blot Substrat (Invitrogen)*

1 Teil Entwicklungslösung A

1 Teil Entwicklungslösung B

Angeschlossen an die SDS-Gelelektrophorese (3.2.3.4) erfolgte die Durchführung des Western-Blots, um die separierten Proteine auf eine Membran zu übertragen. Das Ziel des Western-Blots ist die Identifizierung eines Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers.

Eine Nitrozellulose-Membran sowie die Transfermembranen wurden in 1x Turbotransfer-Puffer getränkt. Dann wurden in einer Trans-Blot® Turbo-Kammer zunächst drei Transfermembranen, gefolgt von der Nitrozellulose-Membran, dem Gel sowie nochmals drei Transfermembranen, gestapelt. Der Transfer erfolgt in einem gemischten Übertragungsprogramm für 7 min. Nach dem Transfer wurde die Membran aus dem System entnommen, kurz mit TTBS gewaschen und dann mit Ponceau S angefärbt. Dies ermöglicht die Überprüfung des gleichmäßigen Transfers der Proteine und der Menge. Die Ponceau S-Färbung kann durch 5 min waschen mit TTBS unter leichtem Schütteln entfernt werden. Nachfolgend wurde die Membran zugeschnitten, in eine Inkubationsbox transferiert und mit 3 % BSA in TTBS für 1 h bei 30 °C auf einem Schüttler blockiert. Danach wurde die Membran in ein Schraubgefäß überführt und mit 5 ml des Erstantikörpers über Nacht bei 4 °C inkubiert. Gewaschen wurde dreimal für jeweils 5 min mithilfe von 20 ml TTBS. Anschließend wurden 5 ml des Zweitantikörpers in das Schraubgefäß gegeben und für 35 min bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift wie oben beschrieben. Alle Inkubationsschritte erfolgen auf einem Schraubgefäß-Roller. Zuletzt wurden die Entwicklungslösungen A und B in einem Verhältnis 1:1 auf die Membran gegeben und mit Hilfe des Geldokumentationssystems (iBright) entwickelt. Die Expositionszeiten betragen zwischen 30 s und 10 min.

3.2.3.6. **Auswertung des Western-Blots**

Das durch das Geldokumentationssystem (iBright) entstandene Foto wurde mit Hilfe der ImageJ Software (Wayne Rasband) densitometrisch analysiert. Dafür wurde zunächst eine Auswahl als Region von Interesse (ROI) definiert; diese Auswahl musste der Bandengröße entsprechen. Nachfolgend wurde von jeder Bande sowie dem jeweiligen Hintergrund der durchschnittliche Grau-Wert gemessen. Dies wurde sowohl für das Protein von Interesse als auch für das Protein, welches als

Ladekontrolle identifiziert wurde, durchgeführt. Die gemessene Pixeldichte der einzelnen Banden sowie des Hintergrundes wurde anschließend invertiert, indem die gemessene Dichte von 255 abgezogen wurde [1]. Dies erfolgte, da 0 als Schwarz und 255 als Weiß angesehen wurden. Die dazwischenliegenden Werte bilden die verschiedenen Grautöne. In einem nächsten Schritt wurde das Nettoprotein von Interesse bzw. der Ladekontrolle bestimmt, indem die invertierte Protein-Pixeldichte von der entsprechenden invertierten Hintergrund-Pixeldichte abgezogen wurde [2]. Zuletzt wurde der Nettowert des Proteins von Interesse durch den Nettowert der Ladekontrolle geteilt, um ein normalisiertes Verhältnis zu erhalten [3].

$$[1] \text{ Invertierte Pixeldichte} = 255 - \text{gemessene Pixeldichte}$$

$$[2] \text{ Nettowert} = \text{Invertierte Pixeldichte}_{\text{Protein}} - \text{Invertierte Pixeldichte}_{\text{Hintergrund}}$$

$$[3] \text{ Normalisiertes Verhältnis} = \frac{\text{Nettowert}_{\text{Protein von Interesse}}}{\text{Nettowert}_{\text{Ladekontrolle}}}$$

3.2.3.7. Humaner/muriner D-DT enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Im Folgenden wurde das Kit „*Human/Murine DDT / Dopamine Tautomerase ELISA Kit (Sandwich ELISA)*“ der Firma LSBio verwendet, um die Konzentration eines spezifischen Proteins zu bestimmen. Zunächst wurden die Reagenzien sowie die Proben und der Standard entsprechend dem Protokoll verdünnt. Anschließend wurden 100 µl der Probe, des Standards und des Blanks in eine 96-Lochplatte pipettiert und für 90 min bei 37 °C im Ofen inkubiert. Der Überstand wurde nachfolgend abpipettiert und zweimal gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des 1x Biotin-Detektierungsantikörpers auf die Platte gegeben und für 60 min bei 37 °C im Ofen inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen und die Zugabe des 1x HRP-Streptavidin Konjugats für 30 min bei 37 °C im Ofen. Nach einem fünfmaligen Waschen wurden 90 µl des 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrates in die Vertiefungen pipettiert und 10-20 min bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurden jeweils 50 µl der Stopp-Lösung auf die Platte gegeben und direkt im Tecan Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Konzentration von D-DT in den jeweiligen Proben wurde relativ zum Standard bestimmt.

3.2.3.8. RNA-Isolation aus Gewebe

3.2.3.8.1. RLT-Lysepuffer

1 % (v/v) β -Mercaptoethanol
In RTL Puffer (RNeasy plus mini kit, Qiagen)

Im Folgenden wurde das Kit „RNAeasy Plus mini Kit“ der Firma Qiagen verwendet, um Ribonukleinsäure (RNA) aus Gewebeproben zu isolieren. Die während der finalen Nierenentnahme erhaltenen kleinen, in RNALater eingelegten Gewebestücke (3.2.1.4) wurden für die RNA-Isolation genutzt. Zunächst wurde zur Erstellung des RLT-Lysepuffers, dem RLT-Puffer, β -Mercaptoethanol zugesetzt. Es wurden pro Gewebestück (ca. 5 mg) 600 μ l RLT-Lysepuffer in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 2-3 Mahlkugeln versetzt. Anschließend wurde das Gewebestück in den Puffer gegeben. Es folgte der Zellaufschluss in einer Kugel-Schwingmühle mit einer Frequenz von 20 Hz. Anschließend wurden die Lysate in QIAShredder Säulen (Qiagen) überführt und für 3 min bei 20.817 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde auf die im Kit enthaltenen gDNA-Säulen pipettiert und für 30 s bei 10.620 g zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde mit 600 μ l 70 % Ethanol versetzt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren entstand eine Durchmischung. 600 μ l dieses Gemisches wurden auf die rosafarbene RNeasy mini Säule überführt und bei 10.620 g 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und dieser Schritt wurde mit den restlichen 600 μ l wiederholt. Die Säule wurde mit 350 μ l des RW1-Puffers gewaschen und bei 10.620 g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und dieser Schritt wurde mit erneuten 350 μ l RW1-Puffer wiederholt. Es wurden nachfolgend 500 μ l RPE-Puffer hinzugefügt und bei 10.620 g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde zur Trocknung erneut zentrifugiert bei 20.817 g für 1 min. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und zur Elution der RNA wurden 30 μ l RNAase-freies Wasser hinzupipettiert. Die Zentrifugation erfolgte für 1 min bei 10.620 g. Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe eines Mikrovolumenspektralphotometers (NanoDrop) gemessen und die RNA wurde bei -80 °C eingefroren.

3.2.3.9. Herstellung von cDNA

3.2.3.9.1. Reaktionsansatz

8,3 % (v/v) 10 mM dNTPs
3,3 % (v/v) *Random primer*
20 % (v/v) 5x *First-Strand* Puffer (250 ng/μl)
2,3 % (v/v) RNasin (80 U)
3,3 % (v/v) M-MLV (200 U)

Die isolierte RNA (3.2.3.8) wurde mit Hilfe der M-MLV (*Moloney-Monkey Leukemia Virus*)-Reversen Transkriptase zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurde zunächst 1 μg RNA in 20 μl Reinstwasser in 0,5 ml Reaktionsgefäßen verdünnt. Anschließend wurde die RNA bei 75 °C für 10 min in einem Heizblock denaturiert und nachfolgend direkt auf Eis gekühlt. Darauffolgend wurde der Reaktionsansatz hinzupipettiert. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst für 10 min bei 25 °C inkubiert, dann für 60 min bei 42 °C. Gelagert wurde die cDNA bei -20 °C.

3.2.3.10. Echtzeit-Polymerase-Ketten-Reaktion (quantitative *real-time* PCR, qRT-PCR)

3.2.3.10.1. Sybr Grün (Eurogentec)

1,5 % (v/v) Sybr Grün Vorrat
In Dimethylsulfoxid (DMSO)

3.2.3.10.2. TE Puffer

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
In Reinstwasser

3.2.3.10.3. 3' und 5' Primer

100 pmol in TE-Puffer (3.2.3.10.2)
Vorverdünnung: 1 pmol in RNase freiem Wasser

3.2.3.10.4. Mastermix

10 % (v/v) 10x Puffer
7 % (v/v) MgCl₂
4 % (v/v) dNTP
0,5 % (v/v) Taq-Polymerase
3 % (v/v) Sybr Grün
75,5 % (v/v) RNase freies Wasser

Die qRT-PCR ist eine spezifische Methode zur Messung der mRNA-Expression, die zur absoluten Quantifizierung verwendet werden kann. Zunächst wurde der Mastermix

pipettiert und es wurden jeweils zu 43,5 µl Mastermix, 1,5 µl cDNA pipettiert. Anschließend wurde ein 1:1 Mix aus 3' und 5' Primer hergestellt und gut durchgemischt. 5 µl des Primer-Mixes wurden zu dem Mastermix hinzugegeben. 25 µl der Proben wurde in Duplikaten in eine 96-Loch-PCR-Platte gegeben. Mittels eines Klebestreifens wurde die Platte verschlossen. Um Luftblasen zu vermeiden, wurde die Platte in eine Plattenzentrifuge gegeben. Die Platte wurde nachfolgend in das BioRad *Real-Time PCR Detection System* gegeben, und das RT-PCR-Protokoll wurde zunächst für 30 s bei 95 °C gestartet. Dann begann ein Zyklus bei 95 °C für 5 s. Danach folgten 30 s bei 60 °C. Die Fluoreszenz wurde anhand der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) der Platte gemessen. Dieser Zyklus wurde 40-mal durchgeführt. Anschließend wurden die Schmelzwerte detektiert. Die Platte wurde 5 s auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurde die Temperatur kontinuierlich auf 95 °C erhöht. Während dieses Anstiegs wurden die Schmelzwerte aufgezeichnet und die Schmelzkurven erstellt.

3.2.3.11. Auswertung qRT-PCR mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode

Die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode wird zur Analyse von qRT-PCRs verwendet. Dabei handelt es sich um eine relative Quantifizierung der Genexpressionswerte auf der Grundlage von Ct-Werten. Zunächst wurde der Ct-Wert des Gens von Interesse vom Referenzgen abgezogen, um die ΔCt -Werte zu bestimmen. Anschließend wurde der $\Delta\Delta Ct$ Wert ermittelt, indem der ΔCt Wert der behandelten Probe vom ΔCt Wert der Kontrollprobe abgezogen wurde. Zuletzt wurde $2^{-\Delta\Delta Ct}$ errechnet.

3.2.3.12. Protein-Arrays

Im Folgenden wurde das Kit „Human and Mouse AKT, MAPK, Apoptosis Pathway Array“ der Firma RayBiotech verwendet und beschrieben. Diese Arrays stellen einen membranbasierten Antikörper-Array für das *Screening* und den Vergleich von Expressionsniveaus dar. Die Expressionsniveaus werden mit Hilfe des chemilumineszenten Signals detektiert. Auf diese Art kann die Expression vieler Proteine eines Signalweges effizient überprüft werden.

Zunächst wurden alle Komponenten auf RT gebracht. Währenddessen wurden die Proteinlysate mithilfe des Blockierpuffers auf eine Konzentration von 0,3 mg/ml verdünnt. Anschließend wurden die Membranen in die Plastikvorrichtung gegeben und mit 2 ml Blockierpuffer für 30 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde der Puffer

abgenommen und 1 ml des verdünnten Lysates auf die Membran gegeben und für 3 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x mit 2 ml des Waschpuffers 1 sowie 2 x mit 2 ml des Waschpuffers 2, für jeweils 5 min gewaschen. 1 ml des Detektionsantikörpers wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag, wie oben beschrieben, gewaschen. Anschließend wurden 2 ml des HRP-Anti-Kaninchen IgGs für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran gewaschen. Nachfolgend wurde in einer 1:1 Mischung der Detektionspuffer C mit dem Detektionspuffer D gemischt und 500 µl davon für 2 min auf die Membran gegeben. Dieser Schritt sollte möglichst dunkel ablaufen. Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit Hilfe des iBrights gemessen. Die Signale wurden mittels der von RayBiotech zur Verfügung gestellten Excel-Sheets ausgewertet.

3.2.4. Zellbiologische Methoden

3.2.4.1. Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.2.4.1.1. Kultivierung der primären renalen Tubulusepithelzellen

Primäre renale Tubulusepithelzellen wurden bei 37 °C und einer Begasung von 5 % CO₂ in supplementiertem Dulbeccos *Modified Eagle* Medium (DMEM) F12 *Advanced-Medium* (3.1.11.1) kultiviert. Die Zellen wachsen adhärent und weisen eine epitheliale Morphologie auf. Jeden Tag wurden die Zellen makroskopisch betrachtet und nach den Kriterien der Konfluenz, Adhärenz und Morphologie beurteilt. Entsprechend der Einschätzung wurden die Zellen in eine neue T-Flasche passagiert. Dafür wurden die Zellen zunächst vorsichtig mit vorgewärmtem 1x PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05 %) von der T-Flasche abgelöst. Nach einer kurzen Inkubation bei RT wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mit 8 ml supplementiertem Medium verdünnt, da das im Medium enthaltene FKS das Trypsin inaktiviert.

3.2.4.1.2. Kultivierung der HK-2 Zellen

Die immortalisierten HK-2 Zellen wurden bei 37 °C und einer Begasung von 5 % CO₂ in supplementiertem DMEM F12-Medium (3.1.11.2) kultiviert. Gewöhnlich wachsen sie adhärent und weisen eine epitheliale Morphologie auf. Jeden Tag wurden die Zellen makroskopisch betrachtet und nach den Kriterien der Konfluenz, Adhärenz und Morphologie beurteilt. Entsprechend der Einschätzung wurden die Zellen in eine neue T-Flasche passagiert. Dafür wurden die Zellen zunächst vorsichtig mit vorgewärmtem

1x PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05 %) von der T-Flasche abgelöst. Nach einer kurzen Inkubation bei RT wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mit 8 ml supplementiertem Medium verdünnt. Normalerweise wurden die Zellen alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in supplementiertem Medium in eine neue T-Flasche aufgeteilt und bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert.

3.2.4.1.3. Kultivierung der HEK293T Zellen

Die immortalisierten HEK293T Zellen wurden bei 37 °C und einer Begasung von 5 % CO₂ in supplementiertem DMEM-Medium (3.1.11.3) kultiviert. Gewöhnlich wachsen sie adhärent und weisen eine epitheliale Morphologie auf. Jeden Tag wurden die Zellen makroskopisch betrachtet und nach den Kriterien der Konfluenz, Adhärenz und Morphologie beurteilt. Entsprechend der Einschätzung wurden die Zellen in eine neue T-Flasche passagiert. Dafür wurden die Zellen zunächst vorsichtig mit vorgewärmtem 1x PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,05 %) von der T-Flasche abgelöst. Nach einer kurzen Inkubation bei RT wurde die Trypsin/EDTA-Lösung mit 8 ml supplementiertem Medium verdünnt. Normalerweise wurden die Zellen alle 2-4 Tage im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in supplementiertem Medium in eine neue T-Flasche aufgeteilt und bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert.

3.2.4.2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Probe der Zellsuspension genommen und mit Trypanblau verdünnt. Eine Neubauerkammer wurde mit der angesetzten Verdünnung befüllt und vier Großquadrate mit Hilfe des Mikroskops ausgezählt. Anschließend wurde das arithmetische Mittel der vier Zählungen gebildet. Es ist wichtig zu beachten, dass die Anzahl der Zellen pro Großquadrat zwischen 30 und 100 liegt, da eine zu hohe oder niedrige Anzahl von Zellen pro Großquadrat zu einer ungenauen Bestimmung der Zellzahl führen kann.

Mit folgender Formel wurde aus dem Mittelwert der Zählungen die Zellzahl bestimmt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor} \left(10^4 \frac{1}{\text{ml}} \right) \times \text{Mittelwert}$$

3.2.4.3. BrdU-Assay

Im Folgenden wurde das Kit „Cell Proliferation ELISA“ der Firma Roche verwendet und beschrieben. Diese Arrays stellen einen ELISA-basierten Assay zur Identifikation der Zellproliferation dar.

Zunächst wurden die Zellen in einer 96-Loch-Platte für 24 h inkubiert. Der BrdU-Stock wurde 1:100 im entsprechenden Zellkulturmedium verdünnt. 100 µl wurden auf die entsprechenden Zellen gegeben und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium verworfen und 100 µl FixDenat wurden für 30 min bei RT inkubiert. Nachdem das FixDenat verworfen worden war, wurden 100 µl anti-BrdU-PO-Lösung für 90 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurde die Platte dreimal mit 200 µl 1x PBS gewaschen und 100 µl Substrat-Lösung wurden für 5 min in jede Vertiefung hinzugegeben. Zuletzt wurde die Platte photometrisch bei einer Wellenlänge von 370 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm gemessen.

3.2.4.4. Isolierung von primären Tubulusepithelzellen aus murinem Nierengewebe

Bokemeyer-Puffer (3.2.3.1.1)

3.2.4.4.1. Eisenoxid-haltige PBS-Lösung

113 mM Fe₂O₃
In sterilem PBS

3.2.4.4.2. Kollagenase IV (1 mg/ml)

0,1 % (m/v) Kollagenase IV
In *Advanced* DMEM/F12

Für die Isolation wurde zunächst das Spendertier zur finalen Nierenentnahme (3.2.1.4) narkotisiert, mit einer eisenhaltigen PBS-Lösung perfundiert und die Niere wurde anschließend in gekühltes PBS gegeben. Nachfolgend wurde das Gewebe mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten, damit es dann mit dem Endstück eines Spritzenkolbens durch ein Gitter zerkleinert werden konnte. Die Zellmasse wurde in 9 ml Kollagenase IV aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen wurde die Suspension alle 10 min mit einer Pipette resuspendiert. Die Zellmasse wurde in ein 50 ml Schraubgefäß überführt und die Kollagenase-Reaktion wurde durch die Zugabe von 1,5 ml FCS gestoppt. Es folgte die Nutzung eines 100 µm Zellsiebs zur Beseitigung von größeren Gewebestückchen und die Überführung in ein neues

50 ml Schraubgefäß. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 31,6 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Es wurde mit 24 ml Medium gewaschen und die Zellsuspension wurde auf zwölf 2 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Es folgte nun die magnetische Abtrennung der Glomeruli durch eine Magnetvorrichtung, in welche die 2 ml Reaktionsgefäße eingespannt wurden. Dies ist möglich, da Glomeruli, verglichen mit den Tubuli, aufgrund ihrer Kapillarstruktur besonders viel Eisenoxid enthalten. Die eisenhaltigen Glomeruli hafteten aufgrund der magnetischen Kräfte an der Wand der Reaktionsgefäße. Nach diesem Schritt enthielt die Suspension hauptsächlich Tubulusepithelzellen. Die Tubulussuspension wurde mit kaltem PBS gewaschen und für 5 min bei 182 g, 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einem Tubulusepithelzell-spezifischen Wachstumsmedium resuspendiert oder zur direkten Lyse in Bokemeyer-Puffer aufgenommen.

3.2.4.5. TGFβ-Stimulation von immortalisierten Zellen

3.2.4.5.1. HCl Lösung

1 % (v/v) 4 nM HCl
In 0,1 % BSA/PBS

3.2.4.5.2. Hungermedium

500 ml DMEM (1x) + GlutaMAX
5 % (v/v) FKS
1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)

3.2.4.5.3. Stimulationslösung

0,001 % (m/v) TGFβ1
In HCl Lösung (3.2.4.5.1)

Zur Fibrose-Induktion in immortalisierten Zellen wurde eine TGFβ1-Stimulation durchgeführt. Zunächst wurden 250.000 Zellen pro 6-Loch-Vertiefung einer Zellkulturplatte ausgesät. Nachfolgend wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von > 90 % wachsen gelassen. Wenn die Zellen diese Konfluenz aufwiesen, wurde das Medium für 4 h durch Hungermedium ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen mit der Stimulationslösung im Hungermedium 24 h sowie 48 h stimuliert. Nach der Stimulation wurde das Medium in 2 ml Reaktionsgefäßen überführt und für 5 min bei 400 g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben

und bei -80 °C eingefroren. Die Zellen wurden währenddessen zur Proteinisolation bzw. RNA-Isolation vorbereitet.

3.2.4.6. Isolation von Protein aus kultivierten Zellen

Bokemeyer Puffer (3.2.3.1.1)

Die nach der Stimulation der Ziellinie sowie die nach der Isolation der renalen primären Tubulusepithelzellen entstandenen RNA-Proben (3.2.4.6; 3.2.4.7) wurden für die RNA-Isolation genutzt. Es wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte 100 µl Bokemeyer Puffer hinzugefügt und die Zellen mittels Zellscharber abgescharbt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal mit weiteren 100 µl Bokemeyer-Puffer wiederholt. Nachfolgend wurden die Proben dreimal für jeweils 10 s in einem Ultraschallbad aufgeschlossen. Zwischen den Beschallungen wurden die Proben auf Eis gelagert. Dann wurden die Proben bei 10.620 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BC-Assay oder Qubit (3.2.3.2; 3.2.3.3) wurden die Lysate bei -80 °C eingefroren.

3.2.4.7. Isolation von RNA aus kultivierten Zellen

RLT-Lysepuffer (3.2.3.8.1)

Im Folgenden wurde das Kit „RNAeasy Plus mini Kit“ der Firma Qiagen verwendet und beschrieben. Die nach der Stimulation der Ziellinie entstandenen RNA-Proben (3.2.4.6) wurden für die RNA-Isolation genutzt. Zunächst wurde dem RLT-Puffer, β-Mercaptoethanol zugesetzt. Es wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Zellkulturplatte 150 µl RLT-Lysepuffer hinzugefügt und die Zellen mittels Zellscharber abgescharbt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal mit weiteren 150 µl RLT-Lysepuffer wiederholt. Anschließend wurden die Lysate auf die im Kit enthaltenen gDNA-Säulen pipettiert und für 30 s bei 10.620 g zentrifugiert. Der entstandene Durchfluss wurde mit 600 µl 70 % Ethanol versetzt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren entstand eine Durchmischung. 600 µl dieses Gemisches wurden auf die rosafarbene RNeasy mini Säule überführt und bei 10.620 g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt wurde mit den restlichen

600 µl wiederholt. Die Säule wurde mit 350 µl des RW1-Puffers gewaschen und bei 10.620 g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt mit erneuten 350 µl RW1-Puffer wiederholt. Es wurden nachfolgend 500 µl RPE-Puffer hinzugefügt und bei 10.620 g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule wurde zur Trocknung erneut zentrifugiert bei 20.817 g für 1 min. Die Säule wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und zur Elution der RNA wurden 30 µl RNAase-freies Wasser hinzupipettiert. Die Zentrifugation erfolgte für 1 min bei 10.620 g. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Nanodrops gemessen und bei -80 °C eingefroren.

3.2.5. Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde der t-Test durchgeführt. Mithilfe des t-Tests für zwei Stichproben kann geprüft werden, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Gruppen besteht. Die Analyse der Varianz (ANOVA) wurde verwendet, um die Mittelwerte von drei oder mehr Datengruppen zu vergleichen.

3.2.6. Mitwirkung Dritter an der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Operationen an den Mäusen von PD Dr. Sonja Djudjaj durchgeführt. Das bedeutet, dass Sie eine mediane Längslaparotomie (ca. 2-3 cm Schnittlänge) durchgeführt, die linke Niere freigelegt und den linken Ureter wurde mittig ligiert hat (UUO). Außerdem hat Sie im Falle des I/R-Modells einen kleinen, ca. 1 cm langen, lateralen Schnitt unterhalb der Rippen durchgeführt, die Niere vorsichtig vorverlagert und den gesamten linken renalen Hilus mit einer feinen vaskulären Klemme für 30 min. abgeklemmt. Die Grundversorgung der Tiere (Füttern, Tränken, Umsetzen in frische Käfige) oblag den Versuchstierpflegern des Instituts für Versuchstierkunde der Uniklinik Aachen. Das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Uniklinik Aachen hat die fixierten Gewebeproben in einem Entwässerungsautomaten dehydriert. Die Gewebeschnitte wurden hauptsächlich von den Technischen Assistenten der Pathologie Aachen angefertigt.

4. Ergebnisse

Dieses Kapitel beschreibt die Ergebnisse der Forschungsarbeit. Es umfasst die Identifizierung, Lokalisierung, Regulierung sowie die funktionelle und mechanistische Rolle von D-DT.

4.1. Identifikation der Lokalisierung von D-DT

In der Niere weist MIF in der tubulointerstitiellen Fibrose antifibrotische Wirkungen auf, ausgelöst durch die Aufhebung des Zellzyklusstillstandes von Tubulusepithelzellen^{29,48}. Viele Nierenerkrankungen, insbesondere glomeruläre Erkrankungen, sind jedoch mit komplexen Prozessen verbunden, bei denen es zu umfangreichen zellulären Interaktionen in verschiedenen Nierenkompartimenten kommt²⁹. MIF scheint bei immun- und autoimmunvermittelter Glomerulonephritis krankheitsfördernd zu sein und könnte daher zur sekundären Glomerulosklerose beitragen, die wiederum eine tertiäre tubulointerstitielle Fibrose begünstigen könnte²⁹. Die Rolle von MIF bei der Nierenfibrose hängt wahrscheinlich von der jeweiligen Erkrankung und ihrem Stadium ab²⁹. Da das homologe Protein von MIF, D-DT, bei Entzündungen in geringerem Maße beteiligt ist, wird vermutet, dass D-DT bei interstitieller Nierenfibrose therapeutisch eingesetzt werden kann. Die Rolle von D-DT in der Nierenfibrose ist weitgehend unerforscht, weshalb zunächst die Lokalisierung von D-DT in murinen und humanen Nieren mithilfe histologischer Methoden identifiziert werden sollte.

4.1.1. Verringerte Expression von D-DT in Tubulusepithelzellen in fibrotischem murinem Nierengewebe

Zunächst sollte in gesundem murinem Nierengewebe detektiert werden, in welchem Nierenkompartiment, wie den Tubuli, dem Glomerulus, den Arterien oder den Venen bzw. Kapillaren, D-DT exprimiert wird. Dies wurde mittels einer IHC sowie der IF-Färbung von D-DT analysiert. Darüber hinaus wurde die murine D-DT Expression des gesunden Nierengewebes mit dem fibrotischen Nierengewebe verglichen (Abbildung 5). Die Färbekontrollen befinden sich im Anhang (Abbildung 43,44).

In gesundem murinem Nierengewebe wird D-DT im Tubulointerstitium und in den Parietalepithelzellen des Glomerulus exprimiert (Abbildung 5A, 5a + 5B, 5b). D-DT konnte auch in Zellen, welche sich im glomerulären Gefäßknäuel (Tuft) befinden, identifiziert werden (Abbildung 5B, 5b). Bei diesen Zellen handelt es sich

wahrscheinlich um Podozyten, dies kann jedoch ausschließlich an der Morphologie der Zellen ausgemacht werden (Abbildung 5B, 5b). Die Arterien sowie die Venen/Kapillare wiesen keine D-DT Expression auf (Abbildung 5C, 5c + 5D, 5d). Im fibrotischen Gewebe wurde D-DT stark vermindert in den Tubuli sowie in den Parietalepithelzellen der Bowman-Kapsel exprimiert (Abbildung 5E, 5e + 5F, 5f). Die Expression der D-DT-positiven Zellen im glomerulären Tuft des fibrotischen Gewebes hingegen entspricht der Expression des gesunden Gewebes (Abbildung 5F, 5f). Wie auch im gesunden Gewebe wurde D-DT im fibrotischen Gewebe nicht in den Arterien und den Venen/Kapillaren exprimiert (Abbildung 5G, 5g + 5H, 5h). Nachfolgend wurde sich hauptsächlich auf D-DT in den Nierentubuli fokussiert, da diese die in dieser Forschungsarbeit verwendeten Nierenfibrose-Modelle primär die Nierentubuli schädigen.

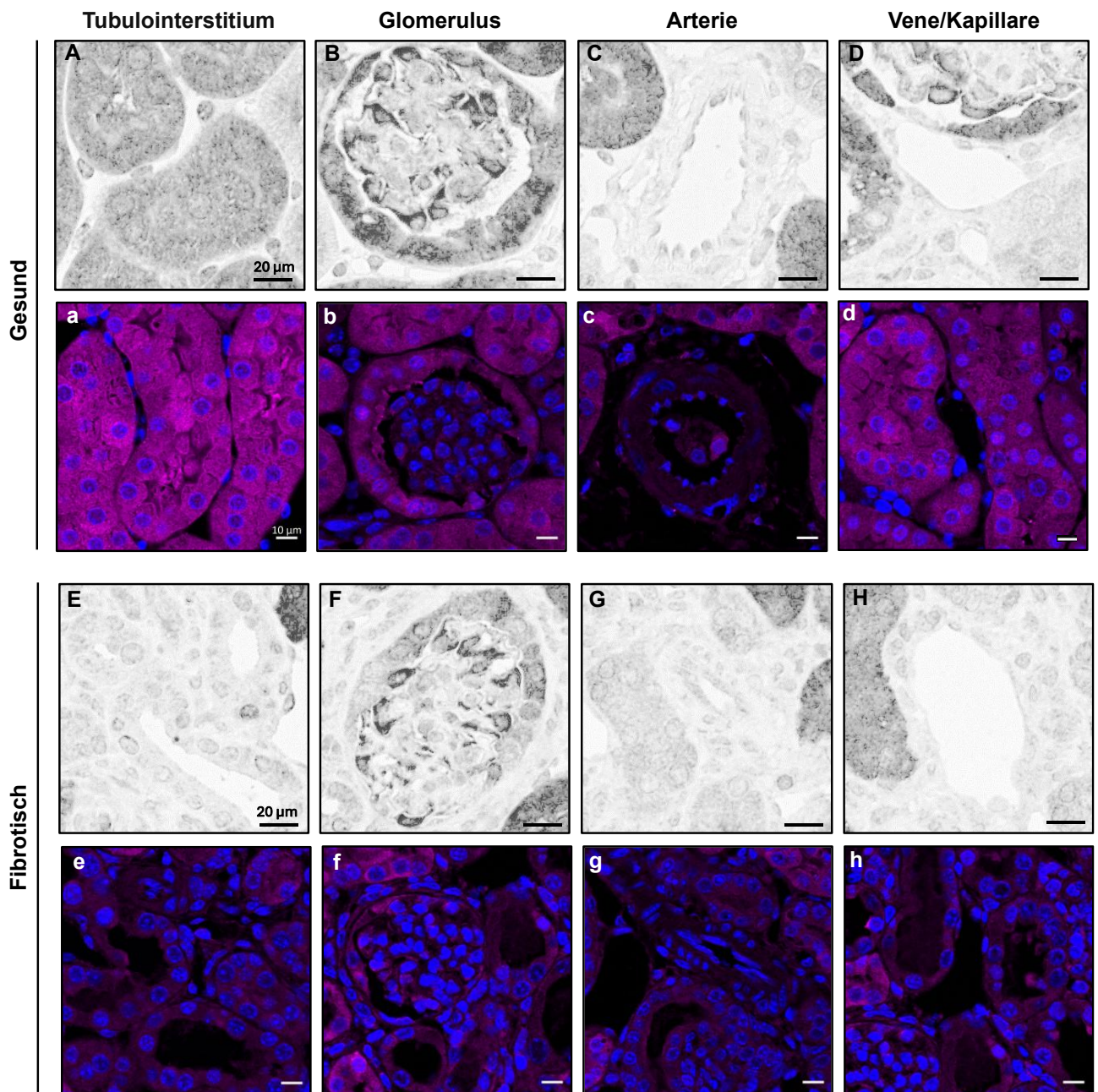


Abbildung 5: D-DT Expression in gesundem murinem Nierencortex.

Die IHC- (A-H) sowie IF-Färbung (a-h) zur Detektion von D-DT wurden sowohl in gesundem als auch in fibrotischem murinem Gewebe durchgeführt. Es wurden repräsentative Bilder des gesunden Tubulointerstitiums (A,a), -Glomerulus (B,b), -Arterie (C,c), -Vene/Kapillare (D,d), des fibrotischen Tubulointerstitiums (E,e), -Glomerulus (F,f), -Arterie (G,g), -Vene/Kapillare (H,h) gezeigt. Die D-DT Färbung der IHC wurde in grau (A-H) und die D-DT Färbung der IF in pink (a-h) visualisiert. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 20 µm (A-H) bzw. 10 µm (a-h) entspricht. Dieses Experiment wurde zweimal wiederholt. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; IF= Immunfluoreszenz; IHC= Immunhistochemie.

4.1.2. Expression von D-DT in proximalen und distalen Tubuli der gesunden murinen Niere

Nachdem identifiziert worden war, dass D-DT hauptsächlich in den Nierentubuli exprimiert wird, wurde die Expression von D-DT in den spezifischen Tubulusabschnitten (proximaler Tubulus, distaler Tubulus, Henle-Schleife und Sammelrohr) detektiert. Dies erfolgte mithilfe des entwickelten Tubuluspanels im Lunaphore COMET™ in gesundem murinem Nierengewebe. Als Marker wurden CD13 (proximaler Tubulus), Calbindin (Distaler Tubulus), Uromodulin (UMOD: Henle-Schleife) und Aquaporin 2 (AQP2: Sammelrohr) verwendet. Darüber hinaus wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Markierung von DNA genutzt, da DAPI an AT-reiche DNA bindet.

Zunächst konnte eine unterschiedlich starke D-DT Expression in der murinen Medulla im Vergleich zum Cortex identifiziert werden (Abbildung 5). Der Nieren-Cortex wies im Gegensatz zur Medulla eine starke D-DT Expression auf. Einzelne Nierentubuli der äußeren Medulla wiesen weiterhin eine schwächere D-DT Expression auf. In der inneren Medulla hingegen wurde keine D-DT Expression nachgewiesen. In der Niere waren vor allem Tubulussegmente D-DT-positiv. Aus diesem Grund wurde anschließend mithilfe verschiedener Tubulussegmentmarkern die Co-Lokalisierung mit D-DT analysiert, um einen Rückschluss auf die D-DT Expression in den entsprechenden Tubulussegmenten ziehen zu können. Die Co-Lokalisierung von CD13 und D-DT legt die Expression von D-DT in den CD13⁺-proximalen Tubuli nahe (Abbildung 6 weißer Bildausschnitt). Außerdem wurde eine schwache Co-Lokalisierung von D-DT und den Calbindin⁺-distalen Tubuli detektiert (Abbildung 6 türkiser Bildausschnitt). Es ist ebenso zu erkennen, dass D-DT nicht in der Henle-Schleife (Abbildung 6 oranger Bildausschnitt) und den Sammelrohren exprimiert wird (Abbildung 6 pinker Bildausschnitt).

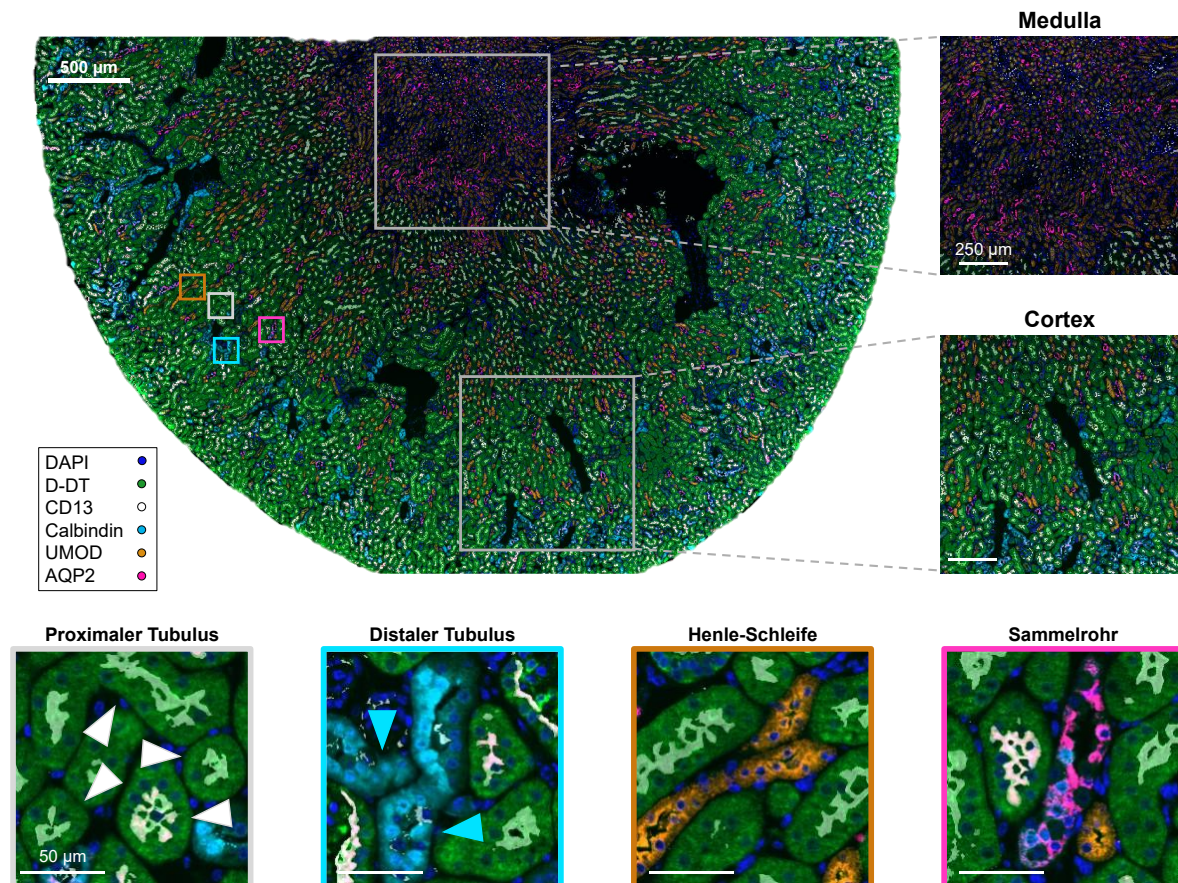


Abbildung 6: D-DT Expression in CD13⁺-proximalen Tubuli des murinen Nierengewebes.

Es wurde das Tubuluspanel, bestehend aus DAPI (blau), D-Dopachrom Tautomerase (D-DT; grün), CD13 (weiß), Calbindin (türkis), Uromodulin (UMOD; orange) und Aquaporin 2 (AQP2; pink), anhand einer gesunden murinen Niere, mithilfe des Lunaphore COMETs™ analysiert. Dargestellt ist das Übersichtsbild eines Nierenviertels. In diesem Übersichtsbild sind die stärker vergrößerten Bereiche der Medulla sowie des Cortex in grau eingezeichnet. Ein Bildausschnitt, welcher hoch vergrößerte proximale Tubuli zeigt, ist weiß, ein Bildausschnitt der distale Tubuli zeigt ist türkis, ein Bildausschnitt der Henle-Schleifen zeigt ist orange, und ein Bildausschnitt der Sammelrohre zeigt ist pink, dargestellt. Die ausgefüllten Pfeilspitzen weisen auf eine Co-Lokalisierung des jeweiligen Markers mit D-DT hin. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken mit der entsprechenden Größe (500 µm, 250 µm sowie 50 µm) abgebildet.

4.1.3. Verringerte D-DT-Expression in der humanen Nierenfibrose

Zunächst sollte, wie auch im murinen Gewebe, die D-DT in den Nierengewebskompartimenten lokalisiert werden. Des Weiteren sollte die murine Erkenntnis, dass die D-DT Expression im fibrotischen Gewebe verringert exprimiert wurde, im humanen fibrotischen Nierengewebe verifiziert werden.

Zunächst wurde die Lokalisierung von D-DT mittels einer IHC- und IF-Färbung in verschiedenen humanen Nierenkompartimenten detektiert. Die Färbekontrollen befinden sich im Anhang (Abbildung 45). Wie bereits im murinen Nierengewebe wurde D-DT hauptsächlich im gesunden Tubulointerstitium von den Tubulusepithelzellen der proximalen Tubuli exprimiert. Es konnte eine schwache Expression von D-DT im gesunden Glomerulus sowie in der Arterie oder in der Vene/Kapillare festgestellt werden. Im fibrotischen Gewebe wurde eine verminderte D-DT Expression im Tubulus festgestellt und es lag keine D-DT Expression im Glomerulus, anders als im murinen Gewebe, in der Arterie oder in der Vene/Kapillare vor (Abbildung 7).

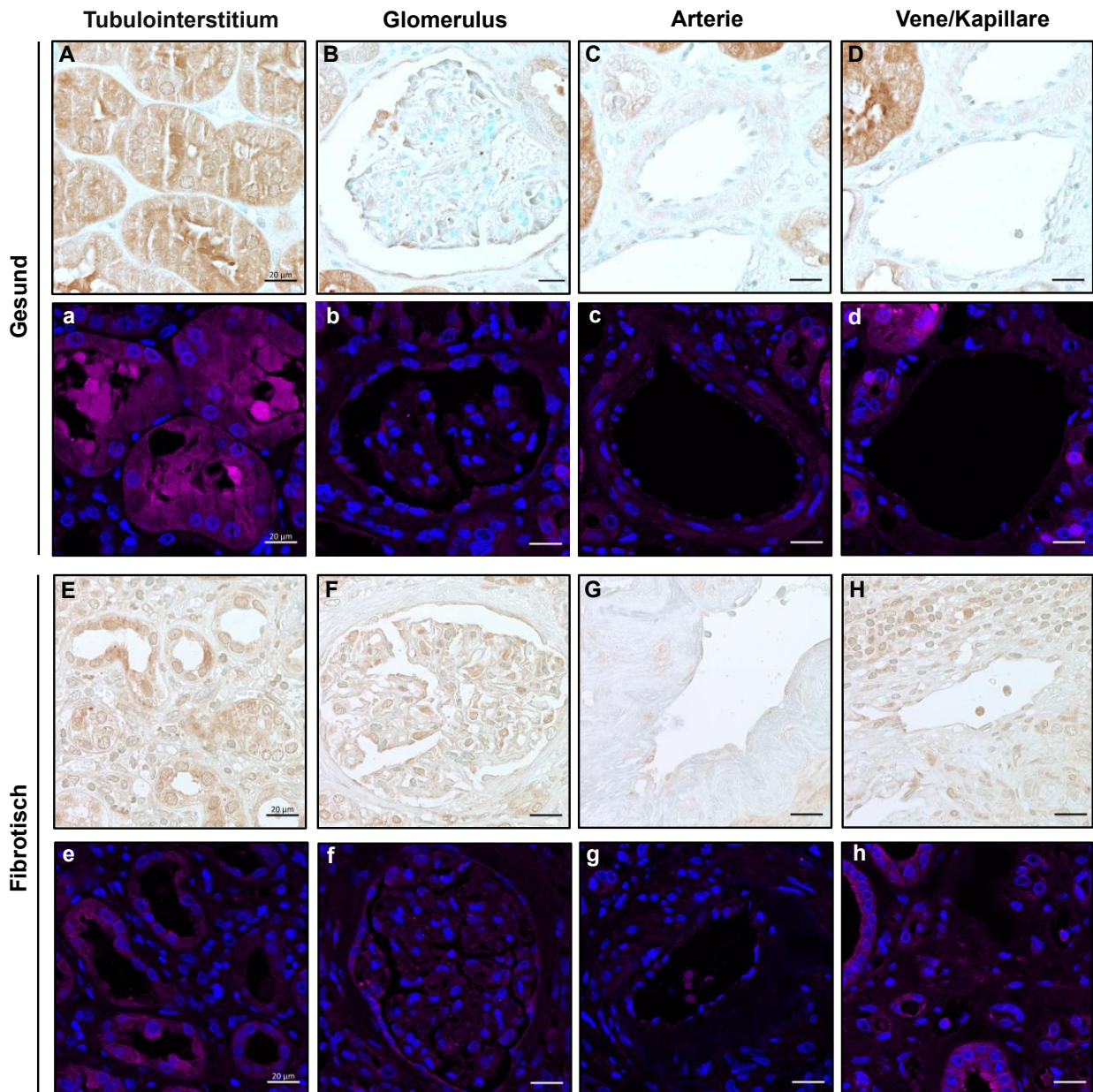


Abbildung 7: D-DT Expression in gesundem humanem Gewebe.

Die IHC- (A-H) sowie IF-Färbung (a-h) zur Detektion von D-DT wurden sowohl in gesundem als auch in fibrotischem humanem Gewebe durchgeführt. Es wurden repräsentative Bilder des gesunden Tubulointerstitiums (A,a), -Glomerulus (B,b), -Arterie (C,c), -Vene/Kapillare (D,d), des fibrotischen Tubulointerstitiums (E,e), -Glomerulus (F,f), -Arterie (G,g), -Vene/Kapillare (H,h) gezeigt. Die D-DT Färbung der IHC wurde in braun (A-H) und die D-DT Färbung der IF in pink (a-h) visualisiert. Die Nuklei wurden mit Methylgrün (A-H) sowie mit DAPI (a-h) gegengefärbt. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe 20 μm entspricht. Dieses Experiment wurde einmal mit gesundem humanem Nierengewebe (n=3) und fibrotischem humanem Nierengewebe (n=3) durchgeführt. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; IF= Immunfluoreszenz; IHC= Immunhistochemie.

4.1.4. Expression von D-DT in proximalen und distalen Tubuli der gesunden humanen Niere

Nachdem detektiert wurde, dass D-DT hauptsächlich in humanen Nierentubuli exprimiert wird, wurde die Expression von D-DT in den einzelnen Tubulusabschnitten lokalisiert. Dies erfolgte mittels des entwickelten Tubuluspanels im Lunaphore COMET™ in gesundem humanem Nierengewebe. Als Marker wurden CD13 (proximaler Tubulus), Calbindin (Distaler Tubulus), Uromodulin (UMOD: Henle-Schleife) und Aquaporin 2 (AQP2: Sammelrohr) verwendet. Darüber hinaus wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI zur Markierung der DNA genutzt.

Zunächst kann, wie auch in der gesunden murinen Niere, eine schwache D-DT Expression in der Medulla und eine starke D-DT Expression im Cortex identifiziert werden. Die Co-Lokalisierung von CD13 und D-DT legt die Expression von D-DT in den CD13⁺-proximalen Tubuli nahe (Abbildung 8 weißer Bildausschnitt). Eine schwache D-DT Expression wurde in den distalen Tubuli detektiert (Abbildung 8 türkiser Bildausschnitt). D-DT wurde nicht in der Henle-Schleife (Abbildung 8 oranger Bildausschnitt) und den Sammelrohren exprimiert (Abbildung 8 pinker Bildausschnitt). Die humane D-DT Expression in proximalen und distalen Tubuli entspricht der murinen Expression (Abbildung 6+8).

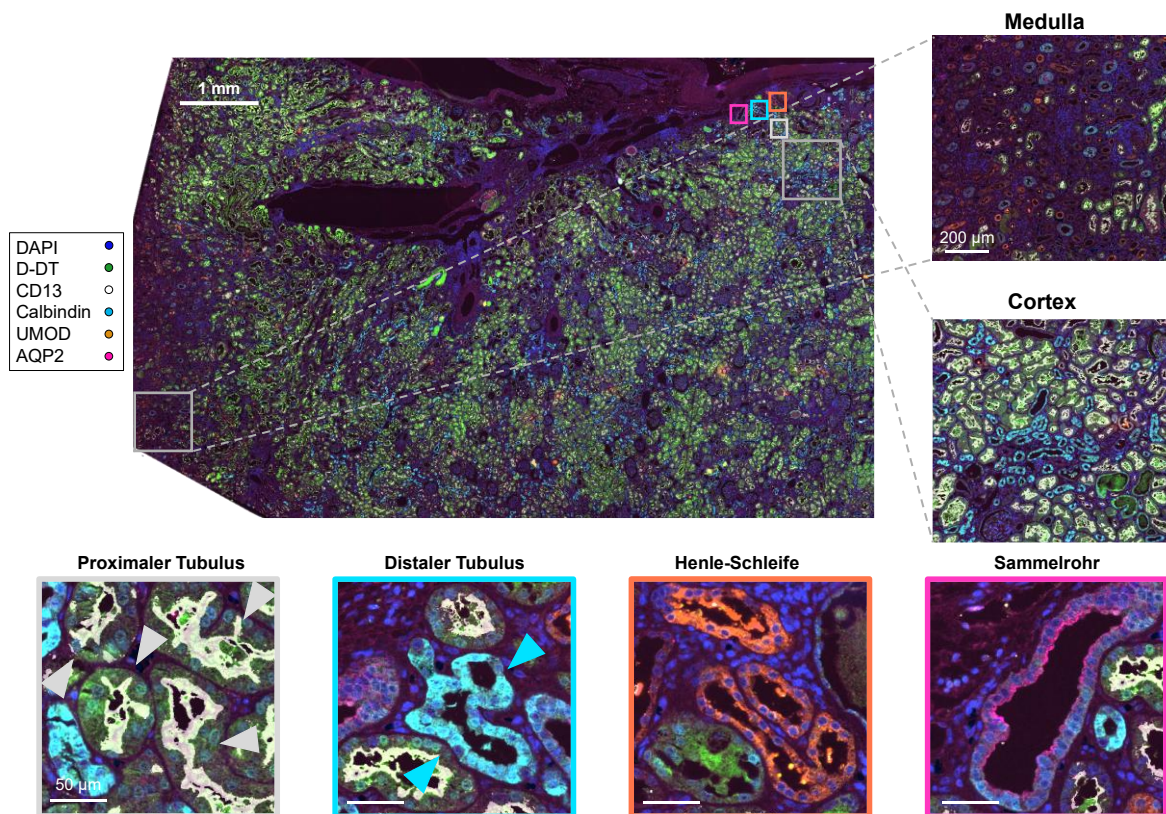


Abbildung 8: D-DT Expression in CD13⁺-proximalen Tubuli des humanen Nierencortex.

Es wurde das Tubuluspanel, bestehend aus DAPI (blau), D-Dopachrom Tautomerase (D-DT; grün), CD13 (weiß), Calbindin (türkis), Uromodulin (UMOD; orange) und Aquaporin 2 (AQP2; pink), anhand gesundem humanem Nierengewebe, mithilfe des Lunaphore COMETs™ analysiert. Dargestellt ist ein Übersichtsbild der humanen Niere. In diesem Übersichtsbild sind die stärker vergrößerten Bereiche der Medulla sowie des Cortex in grau eingezeichnet. Ein Bildausschnitt, welcher hochvergrößerte Henle-Schleifen zeigt, ist orange, ein Bildausschnitt der proximalen Tubuli zeigt ist weiß, ein Bildausschnitt der distale Tubuli zeigt ist türkis und ein Bildausschnitt der Sammelrohre zeigt ist pink dargestellt. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken mit der entsprechenden Größe (500 µm, 250 µm sowie 50 µm) abgebildet.

4.2. Identifikation der Regulierung von D-DT auf Protein-Ebene

Mithilfe verschiedener histologischer Methoden wurde bereits detektiert, dass D-DT hauptsächlich im Tubulointerstitium, insbesondere im proximalen Tubulus, im gesunden Nierencortex lokalisiert ist. Darüber hinaus wurde detektiert, dass D-DT verringert im fibrotischen Nierengewebe im Tubulointerstitium exprimiert wird. In diesem Kapitel soll im Weiteren die Regulierung von D-DT im fibrotischen Nierengewebe zu verschiedenen Zeitpunkten sowie durch verschiedene Fibrose-Ursachen mit Hilfe von histologischen sowie molekularbiologischen Methoden auf Protein-Ebene analysiert werden.

4.2.1. Stetig verringerte Expression von D-DT in Tubuli bei zunehmender muriner interstitieller Nierenfibrose

Mittels IHC- sowie IF-Färbung wurde in einem UUO-Zeitverlauf, welcher die Entwicklung der Nierenfibrose über die Zeit (Tag 2: Abbildung 9B, 9b; Tag 5: Abbildung 9C, 9c; Tag 10: Abbildung 9D, 9d) abbildet, die Expression von D-DT im fibrotischen Tubulointerstitium mit der D-DT Expression im gesunden Gewebe verglichen. Zwei Tage nach der UUO ist zu erkennen, dass D-DT weiterhin in weniger stark geschädigten Tubuli exprimiert wird (Abbildung 9 B,b). Im weiteren Verlauf, welcher mit der Dilatation der Tubuli einhergeht, wird D-DT stark vermindert in den dilatierten Tubuli exprimiert (Abbildung 9 C,c). Mit verstärkter Ausbildung der interstitiellen Fibrose nimmt die D-DT Expression weiter ab (Abbildung 9 D,d).

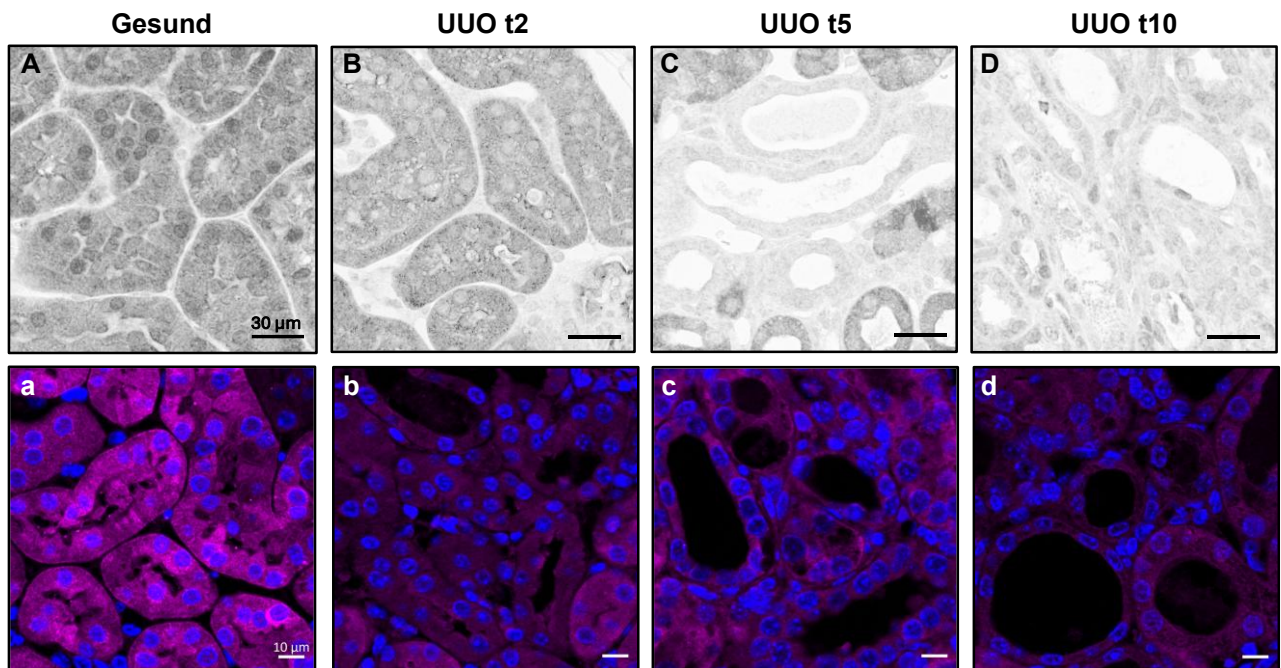


Abbildung 9: Stetig verringerte D-DT Expression im Verlauf der ansteigenden murinen Nierenfibrose.

Die IHC- (A-D) sowie die IF-Färbung (a-d) zur Detektion von D-DT wurden sowohl in gesundem als auch in fibrotischem Gewebe durchgeführt. Es wurden repräsentative Bilder des Tubulointerstitiums für gesundes (A), UUO Tag 2 (B), UUO Tag 5 (C) sowie UUO Tag 10 (D) Nierengewebes gezeigt. Färbung der IHC wurde in grau (A-H) und die D-DT Färbung der IF in pink (a-h) visualisiert. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 30 µm (A-D) bzw. 10 µm (a-d) entspricht. Dieses Experiment wurde zweimal wiederholt. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; IF= Immunfluoreszenz; IHC= Immunhistochemie; t= Tag; UUO= Unilaterale Ureterobstruktion.

Die Regulierung von D-DT während der murinen Nierenfibrose-Progression sollte darüber hinaus mithilfe des Western-Blots validiert werden. Das genutzte SHAM-Gewebe entstand aus Scheinoperationen. Dies bedeutet, dass den SHAM-Mäusen wie im UUO- bzw. I/R-Protokoll (3.2.1.2; 3.2.1.3) beschrieben, zunächst das identische Schmerzmittel verabreicht und sie anschließend narkotisiert wurden. Nachfolgend wurde der Bauchraum eröffnet, jedoch wurde der linke Ureter nicht ligiert, sondern intakt gelassen. Die Haltungsbedingungen der SHAM-operierten Mäuse unterscheiden sich nicht von denen der UUO bzw. I/R operierten Mäuse. Anschließend wurde der Bauchraum bzw. die Flanke mit einer Naht geschlossen und die Maus wurde gleichbehandelt wie die ligierten Mäuse. Am Versuchsende wurde die Niere mittels finaler Nierenentnahme (3.2.1.4) entnommen. Das SHAM-Gewebe bildet somit eine gesunde Kontrolle. Als Ladekontrolle, die zu der Normalisierung der Proteinmengen genutzt wird, wurde die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Expression von D-DT wurde in zwei verschiedenen Nierenmodellen der UUO (Abbildung 10A) sowie der I/R (Abbildung 10B) untersucht. Mit zunehmender Nierenfibrose ist 5 bis 14 Tage nach der UUO ein signifikanter Rückgang der D-DT Expression zu erkennen (Abbildung 10A). 21 Tage nach der I/R wurde, verglichen mit der SHAM-Kontrolle, ebenfalls signifikant weniger D-DT exprimiert (Abbildung 10B).

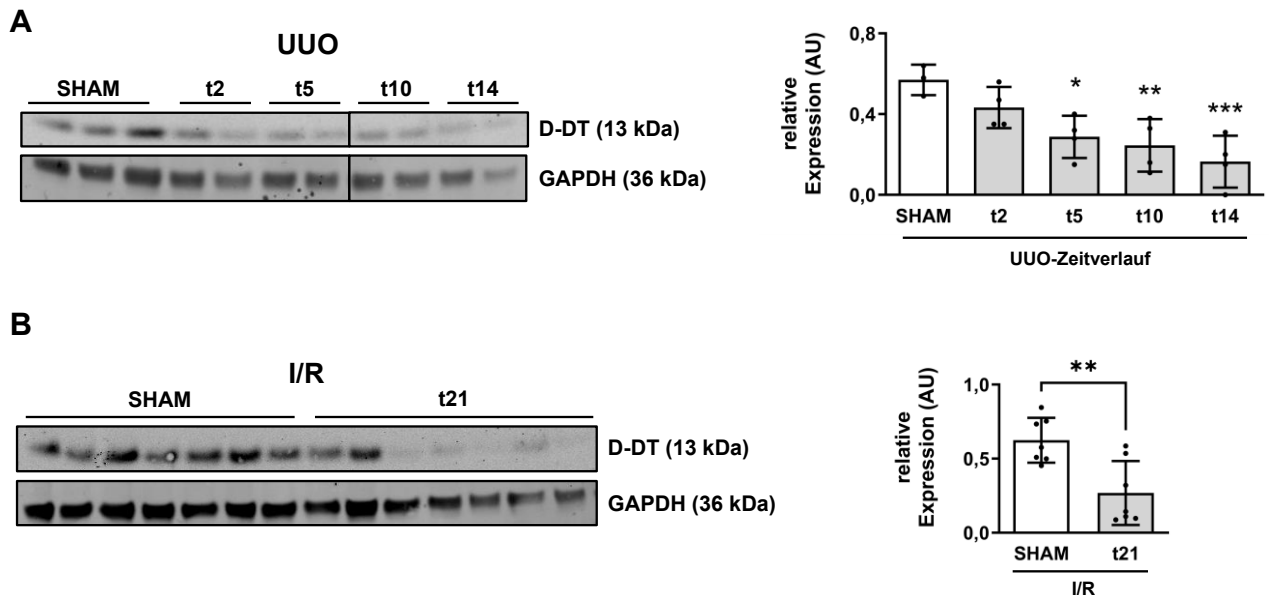


Abbildung 10: Verringerte murine D-DT Expression bei zunehmender Nierenfibrose.

Mithilfe der Western-Blot Analyse wurde in lysiertem UUUO-Gewebe (gesund (n=3), Tag 2 (n=4), Tag 5 (n=4), Tag 10 (n=4) und Tag 14 (n=4)) (A) und I/R-Gewebe (gesund (n=7), Tag 21 (n=7)) (B) die D-DT Expression überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der in A gezeigte Western-Blot ist ein repräsentativer Western-Blot. Die Western-Blots wurden densitometrisch analysiert und in Relation zur Ladekontrolle (GAPDH) gesetzt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde in A die ANOVA genutzt, verglichen wurde die Expression der jeweiligen Tage nach der UUUO mit den Expressionswerten der SHAM-Kontrollniere. In B wurde als statistischer Test der t-Test verwendet. t= Tag; UUUO= Unilaterale Ureterobstruktion; I/R= Ischämische Reperfusion; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. *p < 0,05; **p \leq 0,01; ***p \leq 0,001. AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

Mithilfe eines Zellkultur-Experimentes mit primären murinen Tubulusepithelzellen (pmTECs), welche mit dem profibrotischen Faktor TGF β 1 stimuliert wurden, wurde die Expression von D-DT zusätzlich *in vitro* in Zelllysaten überprüft (Abbildung 11). Am Tag 0 (t0) wurde die initiale Expression von D-DT analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine initiale Expression des 13 kDa großen D-DT-Proteins vorliegt. Nach einer Kultivierung der Zellen für 14 Tage (t14), wurden die pmTECs mit dem Vehikel (0,1 % BSA + 4 mM HCL) bzw. TGF β 1 für 24 h stimuliert. Entgegen der Annahme konnte das 13 kDa große D-DT 14 Tage nach der Stimulation nicht detektiert werden, jedoch eine Bande auf der Höhe von 50 kDa (Abbildung 11). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass immortalisierte humane und murine Tubulusepithelzellen grundsätzlich kein D-

DT exprimieren (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund konnte die Regulierung von D-DT in der Nierenfibrose *in vitro* nicht weitergehend analysiert werden.

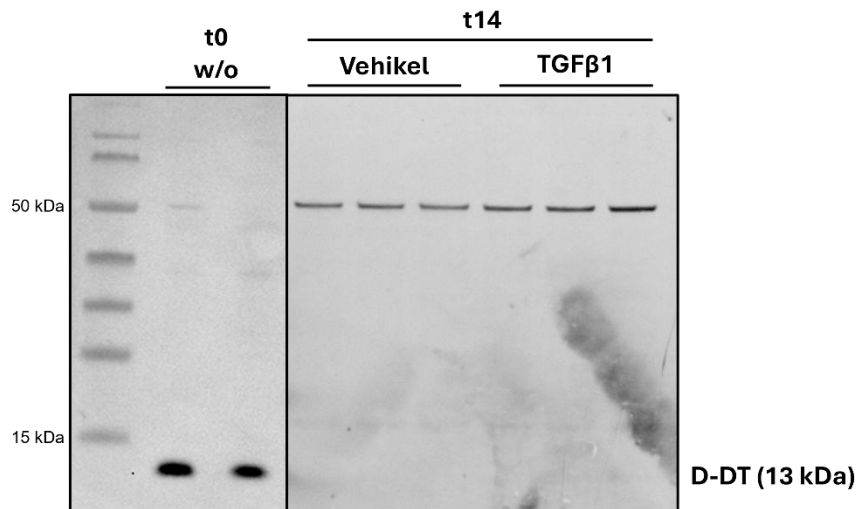


Abbildung 11: Expression des 13 kDa großen D-DTs nach der primären Kultivierung muriner Tubulusepithelzellen nicht detektierbar.

Mithilfe des Western-Blots sollten an Tag 0 (t0) lysierte und an Tag 14 (t14) lysierte primäre murine Tubulusepithelzellen (Vehicle (0,1 % BSA + 4 mM HCL) bzw. TGFβ1) die D-DT Expression detektiert werden. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. t= Tag; TGFβ1= Tumorwachstumsfaktor β1; D-DT= D-Dopachrom Tautomerase.

4.2.2. Verringerte Expression von D-DT in der humanen Nierenfibrose

Nachdem die verringerte murine Expression von D-DT bei zunehmender Nierenfibrose festgestellt wurde, sollte die Regulierung von D-DT während der humanen Nierenfibrose mithilfe des Western-Blots analysiert werden. Verglichen wurden dafür gesunde humane Nierenlysate mit fibrotischen Nierenlysaten. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Es konnte detektiert werden, dass D-DT im fibrotischen Gewebe signifikant verringert exprimiert wurde, verglichen mit den gesunden Nierenlysaten (Abbildung 12).

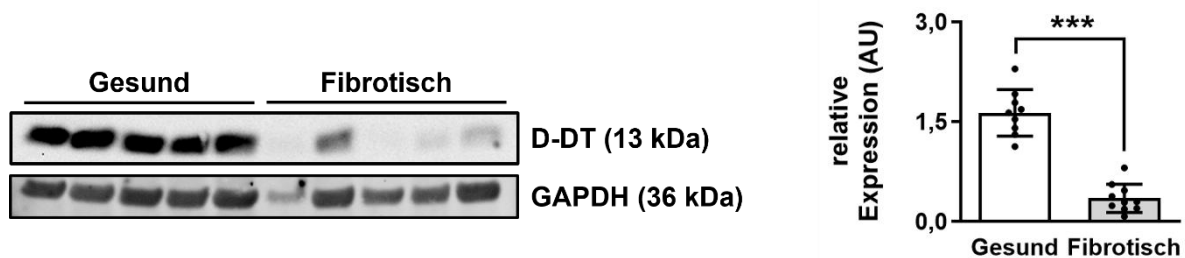


Abbildung 12: Verringerte D-DT Expression in humanem fibrotischem Gewebe.

Mithilfe der Western-Blot Analyse wurde in humanem lysiertem Nierengewebe (gesund (n=8), fibrotisch (n=8)) die D-DT Expression überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der gezeigte Western-Blot ist ein repräsentativer Western-Blot. Die Western-Blots wurden densitometrisch analysiert und in Relation zur Ladekontrolle gesetzt. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test verwendet. *** $p \leq 0,001$. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

Um eine Aussage über die Regulation von D-DT während der Fibroseprogression zu treffen, wurde ein Zellkultur-Experiment mit humanen HEK293T Zellen durchgeführt. Als profibrotische Stimulanz wurde humanes TGF β 1 verwendet. Die Stimulation erfolgte für 24 h und 48 h. Es wurde anschließend jeweils ein Zelllysate hergestellt und die Proteinexpression von D-DT (Abbildung 13A, 13B) und α -SMA (Abbildung 13A, 13C) über die Zeit mittels eines Western-Blots analysiert.

Aufgrund der signifikanten Hochregulierung der α -SMA Expression, verglichen mit dem Vehikel (0,1 % BSA + 4 mM HCL) nach 24 h und 48 h, konnte verifiziert werden, dass die TGF β 1-Stimulation die HEK293T Zellen aktiviert hat. Jedoch unterschied sich die D-DT Expression 24 h nach TGF β 1-Stimulation noch nicht von der Vehikel-Stimulation. Nach 48 h konnte ein signifikanter Rückgang der D-DT Expression detektiert werden (Abbildung 13).

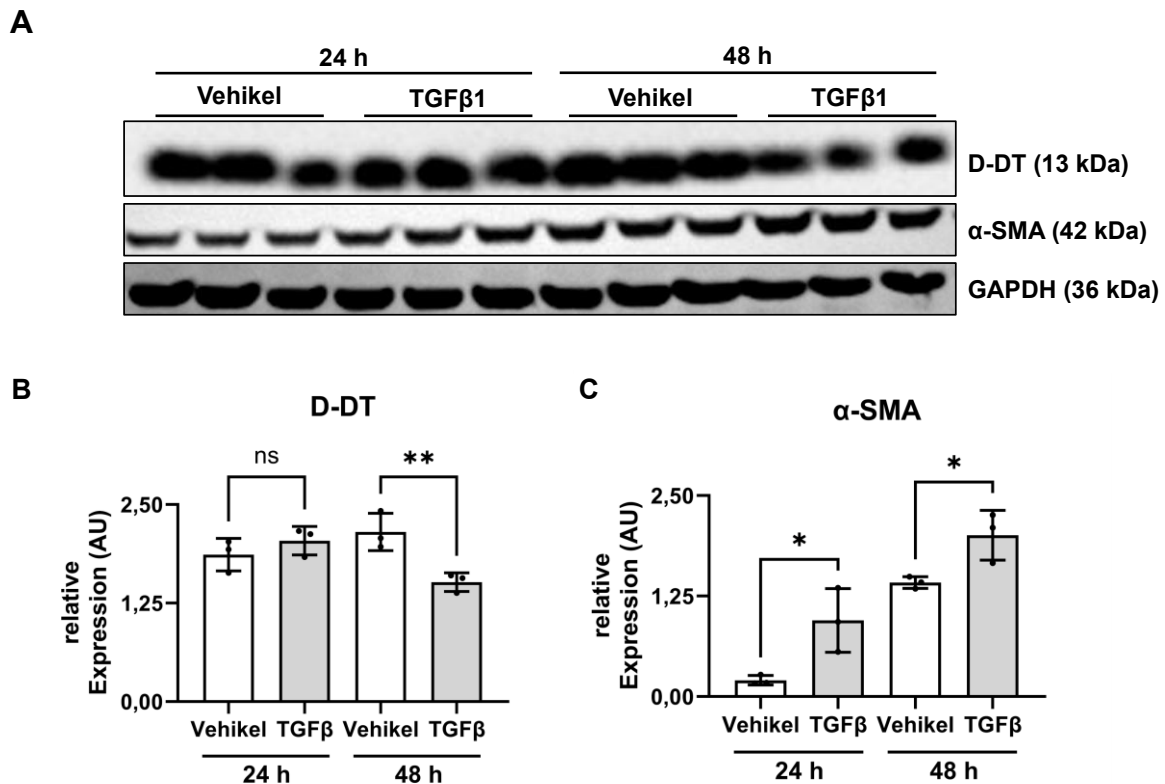


Abbildung 13: Verringerte D-DT Expression in TGFβ1-stimulierten HEK293T Zellen.

Mithilfe der Western-Blot Analyse wurde die D-DT (B) sowie α-SMA (C) Expression in HEK293T Zellen, stimuliert für 24 h und 48 h mit dem Vehikel (0,1 % BSA + 4 mM HCL) (B: jeweils n=3) bzw. TGFβ1, (C: jeweils n=3) überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der gezeigte Western-Blot (A) wurde densitometrisch analysiert und in Relation zur Ladekontrolle gesetzt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde in B und C die ANOVA genutzt, verglichen wurde die Expression nach 24 h und 48 h mit den Expressionswerten der Vehikel-Kontrolle. *p < 0,05; **p ≤ 0,01. HEK293= Humane embryonale Nierenzellen; TGFβ1= Tumorstromungsfaktor β1; D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; α-SMA= α-Glattmuskel-Aktin; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

4.3. Identifikation der Regulierung von *DDT/Ddt* auf mRNA-Ebene

Da eine mehrdimensionale Sicht auf biologische Prozesse wichtig ist, wurde neben der Regulierung von D-DT auf Protein-Ebene, auch die Regulierung von D-DT auf mRNA-Ebene untersucht. Dies lässt einen Rückschluss auf die Transkription von D-DT zu. Dies wurde mit Hilfe von bioinformatischen Datenbanken sowie molekularbiologischen Methoden in murinen sowie humanen gesunden sowie fibrotischen Nieren untersucht.

4.3.1. Verringerte *Ddt*-Expression in der murinen Nierenfibrose

Auf Protein-Ebene wurde D-DT mit zunehmender Nierenfibrose, verringert exprimiert. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch die mRNA Expression von *Ddt* in der Nierenfibrose herunterreguliert wurde. Mithilfe der öffentlichen Datenbank Genome Expression Omnibus (GEO) und nierenspezifischen Einzelzell-Datensätzen (Kidney Interactive Transcriptomics (KIT); Humphreyslab) wurde die aufgestellte Hypothese überprüft.

Die *Ddt*-Genexpression wurde in gesunden sowie in durch die UUO induzierten, fibrotischen murinen Nieren des Datensatzes GSE36496 überprüft. Das fibrotische Gewebe stammte von Mäusen 1, 2, 5 oder 9 Tage nach der durchgeführten UUO. Die Analyse ergab, dass *Ddt* in murinen fibrotischen Nieren signifikant herunterreguliert wurde. Die Expression nahm außerdem stetig im Zeitverlauf ab (Abbildung 14).

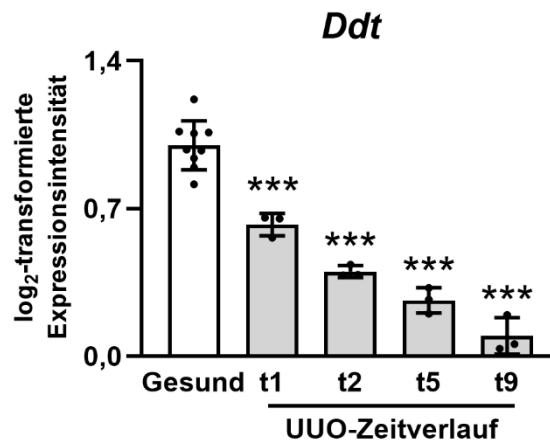


Abbildung 14: Verringerte *Ddt*-Expression in murinen fibrotischen Nieren.

In gesunden Nieren von SHAM-Kontrolltieren (n=9) sowie fibrotischen Nieren (Tag 1 nach der UUO: n=3; Tag 2 nach der UUO: n=3; Tag 5 nach der UUO: n=3; Tag 9 nach der UUO: n=4) des Datensatzes GSE36496 wurde die *Ddt*-Genexpression verglichen. Die Expressionswerte wurden auf das Niveau des gesunden Gewebes normalisiert (relativer Expressionswert = 1). Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde die ANOVA genutzt, verglichen wurde die Expression der jeweiligen Tage nach der UUO mit den Expressionswerten der gesunden Niere. ***p \leq 0,001. t= Tag; UUO= Unilaterale Ureterobstruktion; *Ddt* = D-Dopachrom Tautomerase.

Mithilfe nierenspezifischer Einzelzell-Datensätzen (KIT; Wu et al. 2018) wurde die Expression von *Ddt* in murinem gesundem, adultem sowie fibrotischem Nierengewebe, induziert durch eine UUO (Tag 14), in verschiedenen Zelltypen untersucht. In der gesunden Niere ist eine sehr schwache Expression von *Ddt* in

Podozyten, Mesangialzellen, Endothelzellen, in der Henle-Schleife, distalen Tubulusepithelzellen, im Sammelrohr, in interkalierten Zelle Typ A/B sowie in Makrophagen zu detektieren. Im gesunden Zustand wird *Ddt* jedoch hauptsächlich im proximalen Tubulus im Segment 3 (S3) exprimiert. Die Expression nahm im fibrotischen Gewebe auf das Niveau der schwach exprimierenden Zellen ab (Abbildung 15).

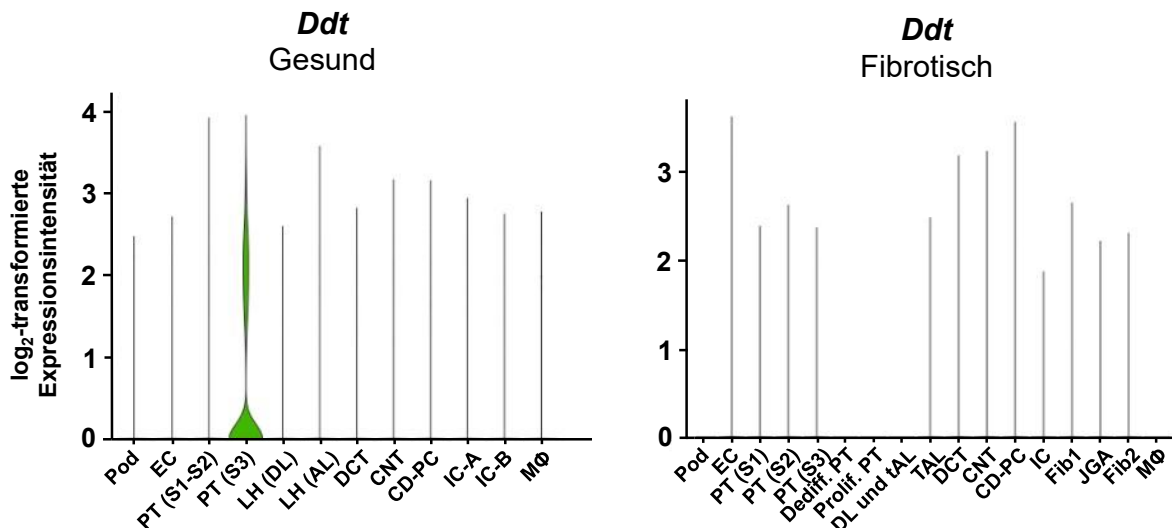


Abbildung 15: Verringerte *Ddt*-Expression in proximalen Tubulusepithelzellen in fibrotischem Gewebe.

Ein Einzelzell-Datensatz von gesunden, adulten, murinen Nieren wurde mit einem Einzelzell-Datensatz von fibrotischen, UUO Tag 14, murinen Nieren der *Kidney Interactive Transcriptomics* (KIT) verglichen. Die Expression von *Ddt* wurde in beiden Datensätzen in verschiedenen Zellen überprüft. Pod= Podozyt; MC= Mesangialzelle; EC= Endothelzelle; PT (S1-2)= proximale Tubuluszelle des Segmentes 1-2; PT (3)= proximale Tubuluszelle des Segmentes 3; LH= Zellen der Henle-Schleife; DCT= distaler *convoluted* Tubulus; CNT= Verbindungstubulus; CD-PC= Sammelrohr-Hauptzelle; IC-A/B= interkalierten Zelle Typ A/B; MΦ= Makrophage; Dediff= Dedifferenziert; Prolif= Proliferierend; DL+tAL= absteigender- und dünner, aufsteigender Teil der Henle-Schleife; TAL= dicker, aufsteigender Teil der Henle-Schleife; Fib. 1/2= Fibroblasten 1/2; JGA= Juxtaglomerulärer Apparat.

Die zuvor analysierte Genexpression von *Ddt* in einem Einzelzell-Datensatz zeigte, dass *Ddt* hauptsächlich in proximalen Tubuli exprimiert wird. Außerdem wurde *Ddt* im fibrotischen Nierengewebe in proximalen Tubuli herunterreguliert. Da Einzelzell-Datensätze jedoch keine räumliche Information bieten, ist eine zusätzliche gewebespezifische Lokalisierung von *Ddt*-mRNA sowie die Validierung der

verringerten *Ddt* Expression in fibrotischem Gewebe durch RNA *in situ* Hybridisierung erforderlich (Abbildung 16).

Die RNA *in situ* Hybridisierung zeigte, dass in gesundem murinem Nierengewebe die *Ddt* mRNA in den Nierentubuli exprimiert wurde. Die Expression wurde durch ein pinkes Signal visualisiert. Zwei bis zehn Tage nach der UUO nahm die *Ddt* Expression in den dilatierten Tubuli ab (Abbildung 16). Die Färbekontrollen befinden sich im Anhang (Abbildung 42).

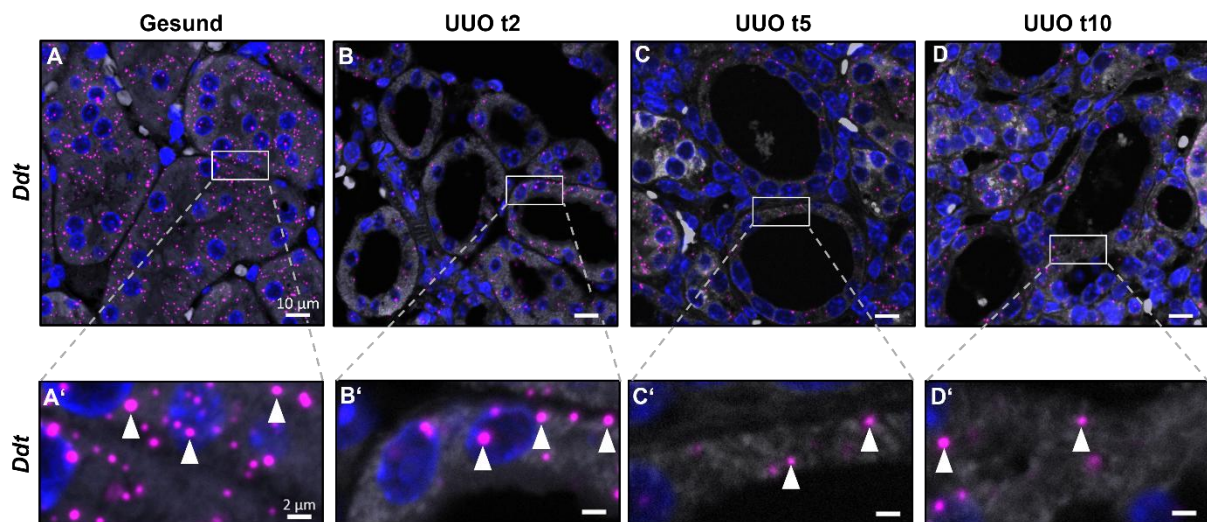


Abbildung 16: Rückgang der *Ddt* mRNA Expression in fibrotischem Gewebe.

Mittels RNA *in situ* Hybridisierung wurde die Expression der *Ddt* mRNA in gesundem Nierengewebe (A, A') sowie 2 Tage (B, B'), 5 Tage (C, C'), 10 Tage nach der UUO (D, D') in fibrotischem Nierengewebe überprüft. Die Expression wurde in pink visualisiert. Die weißen Pfeile weisen beispielhaft auf das *Ddt* mRNA Signal. Die Nuklei wurden mit DAPI gegengefärbt und sind in blau dargestellt. In grau wurde die Autofluoreszenz der Niere visualisiert. Der in den Bildern A-D abgebildete Maßstabsbalken, entspricht der Größe von 10 µm. Die Bilder A'-D' zeigen vergrößert die in den Bildern A-D markierten Bereiche. Der in den Bildern A-D abgebildete Maßstabsbalken, entspricht der Größe von 2 µm. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. t= Tag; UUO= Unilaterale Ureterobstruktion; *Ddt*= D-Dopachrom Tautomerase.

Die Regulierung von *Ddt* in gesundem bzw. fibrotischem Nierengewebe wurde des Weiteren mithilfe der quantitativen (q)RT-PCR überprüft (Abbildung 17).

Die Genexpression von *Ddt* (Abbildung 17A) und *Col3a1* (Abbildung 17B) der SHAM-Kontrollniere wurde mit der Genexpression von fibrotischem Nierengewebe, 2, 5, 10, sowie 14 Tage nach der UUO verglichen. Die *Ddt*-Expression zeigte ab Tag 2 einen abnehmenden Trend. Zehn sowie 14 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO konnte ein signifikanter Rückgang der *Ddt*-Expression verzeichnet werden (Abbildung

17A). Als Kontrolle der Fibrose-Bildung wurde die Expression des *Col3a1* Gens analysiert. Bis Tag 10 nach der UUU zeigte sich ein zunehmender Trend der *Col3a1*-Expression. Vierzehn Tage nach der UUU wurde signifikant stärker *Col3a1* exprimiert (Abbildung 17B). Dies bedeutet, dass mit zunehmender extrazellulärer Matrix die *Ddt*-Expression abnahm.

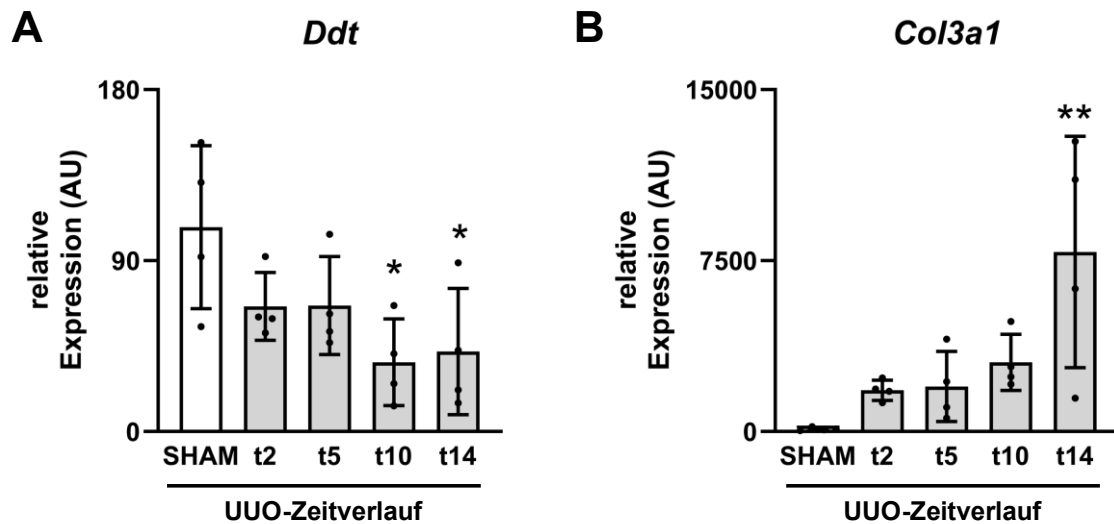


Abbildung 17: Verringerte *Ddt*-Expression in der Nierenfibroseprogression.

In einer qRT-PCR wurde die Expression der Gene *Ddt* (A) und *Col3a1* (B) in murinem SHAM-Gewebe (n=4) sowie in Gewebe, welches 2 (n=4), 5 (n=4), 10 (n=4) und 14 Tage (n=4) nach der UUU entnommen wurde, überprüft. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet. Zur Analyse wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode genutzt und die SHAM-Kontrolle wurde als 100 definiert. Das Experiment wurde einmal in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Expressionswerte wurden auf das Niveau des gesunden Gewebes normalisiert (relativer Expressionswert = 100). Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde ANOVA genutzt, verglichen wurde die Expression der jeweiligen Tage nach der UUU mit den Expressionswerten der gesunden Niere. *p < 0,05; **p \leq 0,01. *Ddt*= D-Dopachrom Tautomerase; *Col3a1*= Kollagen 3a1; t= Tag; UUU= Unilaterale Ureterobstruktion; I/R= Ischämische Reperfusion.

4.3.2. Verringerte *DDT*-Expression in der humanen Nierenfibrose

In murinen fibrotischen Nieren konnte eine verringerte *Ddt* Expression festgestellt werden. Nachfolgend wurde dieser Zusammenhang in humanen fibrotischen Nieren überprüft. Zunächst wurde die *DDT*-Genexpression von gesunden sowie fibrotischen humanen Nierenbiopsien des Datensatzes GSE76882 verglichen. Die *DDT*-Expressionsanalyse bestätigte die Hypothese, dass D-DT in fibrotischem Gewebe signifikant verringert exprimiert wird (Abbildung 18).

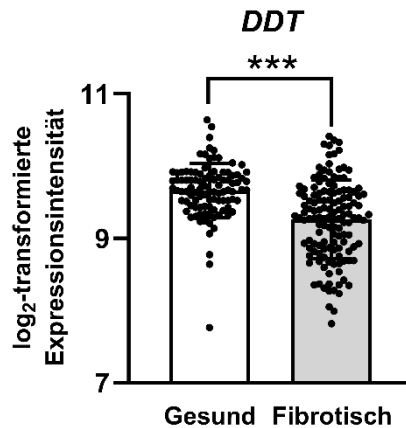


Abbildung 18: Verringerte *DDT*-Expression in humanen fibrotischen Nierenbiopsien.

In gesunden (n=99) sowie fibrotischen (n=135) Nierenbiopsien des Datensatzes GSE76882 wurde die *DDT*-Genexpression verglichen. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test verwendet. ***p \leq 0,001. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase.

Die Regulierung von *DDT* in gesundem und fibrotischem humanem Nierengewebe wurde darüber hinaus mittels einer qRT-PCR analysiert. Dafür wurde als Referenzgen *RNA18SN1* verwendet. *DDT* wurde im fibrotischen Gewebe signifikant schwächer exprimiert als im gesunden Gewebe (Abbildung 19).

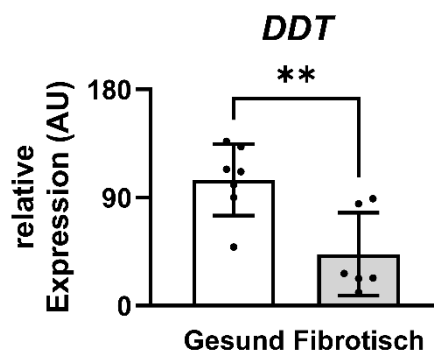


Abbildung 19: Rückgang der *DDT*-Expression in humanem fibrotischem Gewebe.

In einer qRT-PCR wurde die Expression der Gene *DDT* in humanem gesundem Gewebe (n=8) sowie in fibrotischem Gewebe (n=7) überprüft. Als Referenzgen wurde *RNA18SN1* verwendet. Zur Analyse wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode genutzt und das gesunde Gewebe wurde als 100 definiert. Das Experiment wurde einmal in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Expressionswerte wurden auf das Niveau des gesunden Gewebes normalisiert (relativer Expressionswert = 100). Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt. **p \leq 0,01. *DDT*= D-Dopachrom Tautomerase.

4.4. Identifizierung der funktionellen Rolle von D-DT

Durch die Analyse der Lokalisierung sowie Regulierung von D-DT auf Protein- sowie mRNA-Ebene, in gesundem und fibrotischem Gewebe, konnte identifiziert werden, dass D-DT hauptsächlich im Cortex von gesunden murinen sowie humanen Tubuli der Niere exprimiert wird. Außerdem wurde detektiert, dass D-DT in fibrotischen murinen und humanen Nieren, insbesondere in geschädigten Tubuli, auf Proteinebene und mRNA-Ebene, herunterreguliert wird. Folglich wurde mit dem dritten Ziel, der Untersuchung der funktionellen Rolle von D-DT, fortgefahren. Dadurch sollte identifiziert werden, welche biologische Funktion D-DT übernimmt und welche zellulären Prozesse es beeinflusst.

In diesem Kapitel wird die funktionelle Rolle von D-DT in *in vivo*-Fibrosemodellen (UUO sowie I/R) untersucht und beschrieben. Diese Modelle wurden an Mäusen mit einer systemischen *Ddt*-Defizienz sowie einer Tubulusepithelzell-spezifischen *Ddt*-Defizienz in Kombination mit einem systemischen *Mif*-KO angewendet. Außerdem sollte die präventive Wirkung von D-DT durch eine Interventionsstudie validiert werden.

4.4.1. Einfluss von D-DT auf die Nierenfibrose und die Inflammation

Zunächst wurde in *Ddt*-KO Mäusen, welche von Richard Bucala (Yale) zur Verfügung gestellt wurden, eine Nierenfibrose mittels UUO induziert. Die Versuche endeten an drei verschiedenen Zeitpunkten: Tag 2, Tag 5 und Tag 10. Der frühe Zeitpunkt (Tag 2) wurde benötigt, da bereits zwei Tage nach der Ureterligation der renalpelvine Raum erweitert wird und die Bestandteile des Nierenmarks, insbesondere das innere Mark und die Papille, mit fortschreitender Erkrankung deutlich reduziert werden. Zu diesem Zeitpunkt liegt bereits eine starke Immunantwort vor. Das Ziel bestand darin, Erkenntnisse über die akute Erkrankung sowie die Inflammation in diesem frühen Stadium zu erlangen. Wohingegen 5 Tage nach der UUO bereits eine interstitielle Nierenfibrose ausgebildet wurde, welche 10 Tage nach der UUO weiter ausgeprägt vorliegt. Diese Zeitpunkte dienen somit der funktionellen Analyse von D-DT in der interstitiellen Nierenfibrose. Außerdem sollten die in der UUO erhaltenen Ergebnisse durch ein weiteres *in vivo* Fibrose-Modell, der I/R, verifiziert werden.

Zur Analyse der jeweiligen Zeitpunkte wurden IHCs der entsprechenden Fibrosemarker α -Glattmuskel-Aktin (α -SMA), Kollagen Typ I (Col I) und Kollagen Typ III (Col III), sowie der Inflammationsmarker F4/80, welcher Makrophagen detektiert,

durchgeführt. *Lotus tetragonolobus lectin* (LTL) wurde als Differenzierungsmarker verwendet, da es spezifisch an Glykokonjugate des Bürstensaums proximaler Tubulusepithelzellen bindet. Ein Verlust der LTL-Positivität weist dabei auf eine Dedifferenzierung dieser Zellen hin.

4.4.1.1. Geringer Einfluss von D-DT in der akuten Phase der Nierenerkrankung

Zwei Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO, wurden IHC-Analysen von verschiedenen Fibrosemarkern durchgeführt, um eine Aussage über den Einfluss von D-DT in der akuten Phase der Nierenerkrankung treffen zu können. Beim Vergleich der kontralateralen Niere (gestrichelte orange Linie) mit den WT-Geschwistermäusen sowie den *Ddt*-KO-Mäusen zeigt sich ein Anstieg sämtlicher Fibrosemarker, was bestätigt, dass das Modell grundsätzlich funktioniert hat. Die untersuchten Fibrosemarker α -SMA, Col I sowie Col III zeigten einen geringen, nicht signifikanten (ns) Rückgang der Fibroblastenaktivierung und der Deposition von ECM in den *Ddt*-defizienten Mäusen (-/-) im Vergleich zu den WT-Geschwistertieren (+/+). Der Inflammationsmarker F4/80 wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf, jedoch war eine starke Streuung der relativen Expression der *Ddt*-KO-Mäusen zu erkennen. Ein geringer, nicht signifikanter, Rückgang des Differenzierungsmarkers LTL in den *Ddt*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT-Geschwistertieren, wies auf eine verminderte Integrität des Bürstensaums proximaler Tubulusepithelzellen hin (Abbildung 20).

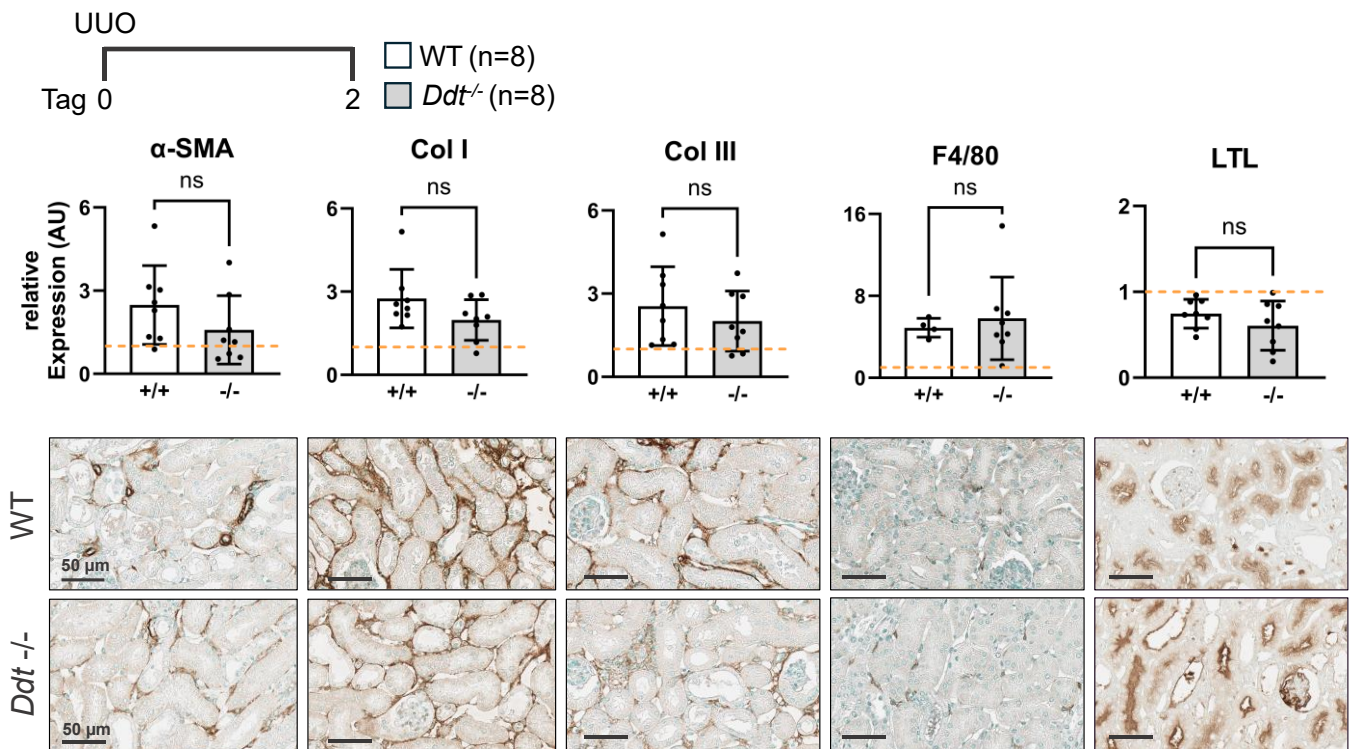


Abbildung 20: Schwach verringerte Fibrose in *Ddt*-defizienten Mäusen zwei Tage nach der UUO.

In einem Modell der Nierenfibrose, der UUO, wiesen *Ddt*-defiziente (-/-) Mäuse (n=8) im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern (+/+) (n=8) eine geringere Nierenfibrose zwei Tage nach der UUO auf, wie die immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten mit den Fibrosemarkern α -Glattmuskel-Aktin (α -SMA), Kollagen Typ I (Col I), Kollagen Typ III (Col III) zeigte. Als Inflammationsmarker wurde F4/80 und als Differenzierungsmarker wurde Lotus tetragonolobus lectin (LTL) verwendet. Die Werte gesunder kontralateraler Wildtyp Nieren wurden als 1 gesetzt, dargestellt durch die gestrichelte Linie. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 50 μ m entspricht. Die ausgewählten Bilder der jeweiligen Färbung sind repräsentativ. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der *Ddt*-KO Mäuse mit der Expression der Wildtyp-Mäuse. ns= nicht signifikant. *Ddt*= D-Dopachrom Tautomerase; UUO= Unilaterale Ureterobstruktion; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*); WT= Wildtyp.

4.4.1.2. Geringer Einfluss von D-DT in der initialen Phase der Nierenfibrose

Fünf Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO wurden IHC-Analysen von verschiedenen Fibrosemarkern durchgeführt, um eine Aussage über den Einfluss von D-DT in der Nierenfibrose treffen zu können. Ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der Fibrosemarker Col I sowie Col III konnte in den *Ddt*-KO-Mäusen (-/-), verglichen mit den WT-Geschwistermäusen (+/+) detektiert werden. Der Fibrosemarker α -SMA wies keine unterschiedliche Expression zwischen *Ddt*-KO- und WT-

Geschwistermäusen auf. Außerdem wurde kein Unterschied in der F4/80 Expression zwischen *Ddt*-KO- und Wildtyp-Geschwistermäusen festgestellt. Ebenfalls konnte keine unterschiedliche Expression des Differenzierungsmarkers LTL identifiziert werden (Abbildung 21).

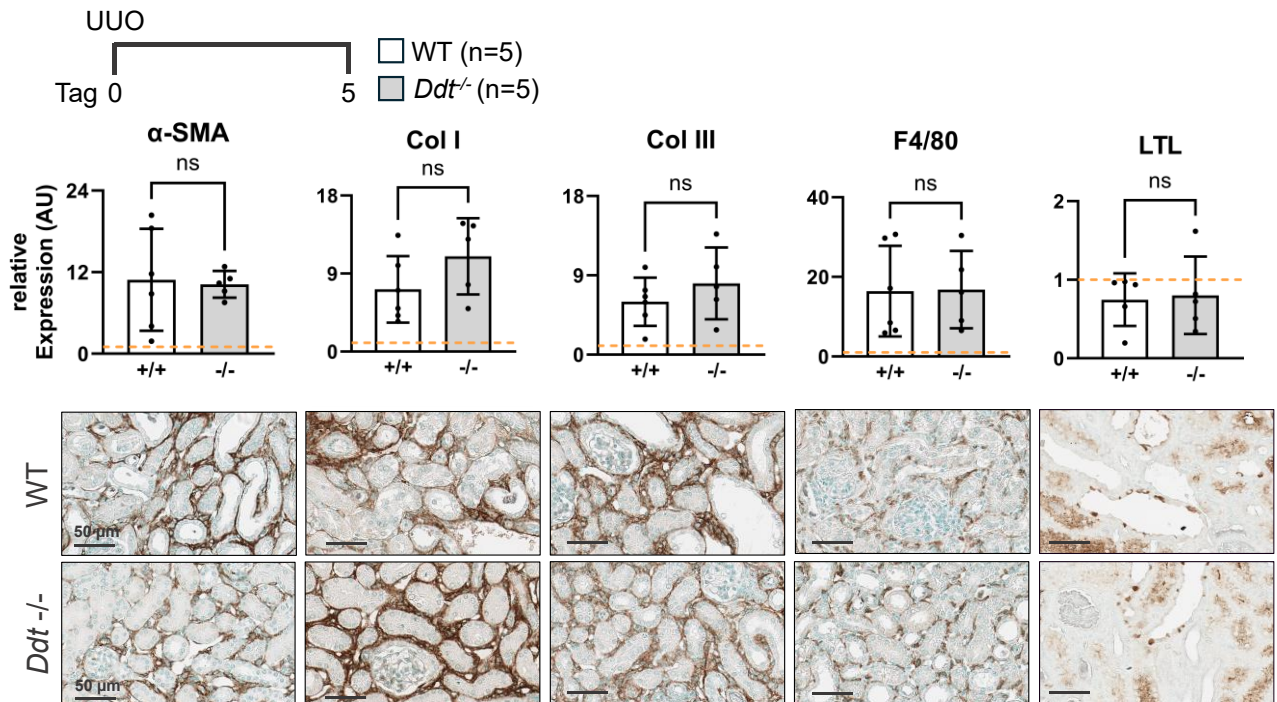


Abbildung 21: Schwach angestiegene Fibrose in *Ddt*-defizienten Mäusen fünf Tage nach der UOO.

In einem Modell der Nierenfibrose, der UOO, wiesen *Ddt*-defiziente (-/-) Mäuse (n=5) im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern (+/+) (n=5) eine angestiegene Nierenfibrose fünf Tage nach der UOO auf, wie die immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten mit den Fibrosemarkern α -Glattmuskel-Aktin (α -SMA), Kollagen Typ I (Col I), Kollagen Typ III (Col III) zeigte. Als Inflammationsmarker wurde F4/80 und als Differenzierungsmarker wurde Lotus tetragonolobus lectin (LTL) verwendet. Die Werte gesunder kontralateraler Wildtyp-Nieren wurden als 1 gesetzt, dargestellt durch die gestrichelte Linie. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 50 μ m entspricht. Die ausgewählten Bilder der jeweiligen Färbung sind repräsentativ. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der *Ddt*-KO Mäuse mit der Expression der Wildtyp-Mäuse. ns= nicht signifikant. *Ddt*= D-Dopachrom Tautomerase; UOO= Unilaterale Ureterobstruktion; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*); WT= Wildtyp.

4.4.1.3. Verstärkte Expression von Col III und reduzierte Funktionalität der Tubuli in *Ddt*-defizienten Mäusen

Zehn Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO wurden IHC-Analysen von verschiedenen Fibrosemarkern durchgeführt, um eine Aussage über den Einfluss von D-DT in der Progression der Nierenfibrose, verglichen mit Tag 5, treffen zu können. Ein nicht signifikanter Anstieg der Fibrosemarker α -SMA sowie Col I konnte in den *Ddt*-KO-Mäusen (-/-), verglichen mit den WT-Geschwistermäusen (+/+) detektiert werden. Hingegen wurde Col III signifikant stärker in *Ddt*-KO-Mäusen, verglichen mit den WT-Geschwistermäusen, exprimiert. Als Inflammationsmarker wurde F4/80 verwendet. Es wurde kein Unterschied in der Expression von F4/80 zwischen *Ddt*-KO- und WT-Geschwistermäusen festgestellt. Ein signifikanter Rückgang der LTL-Positivität in den *Ddt*-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT-Geschwistertieren deutet auf eine verminderte Integrität des Bürstensaums proximaler Tubuluszellen hin (Abbildung 22).

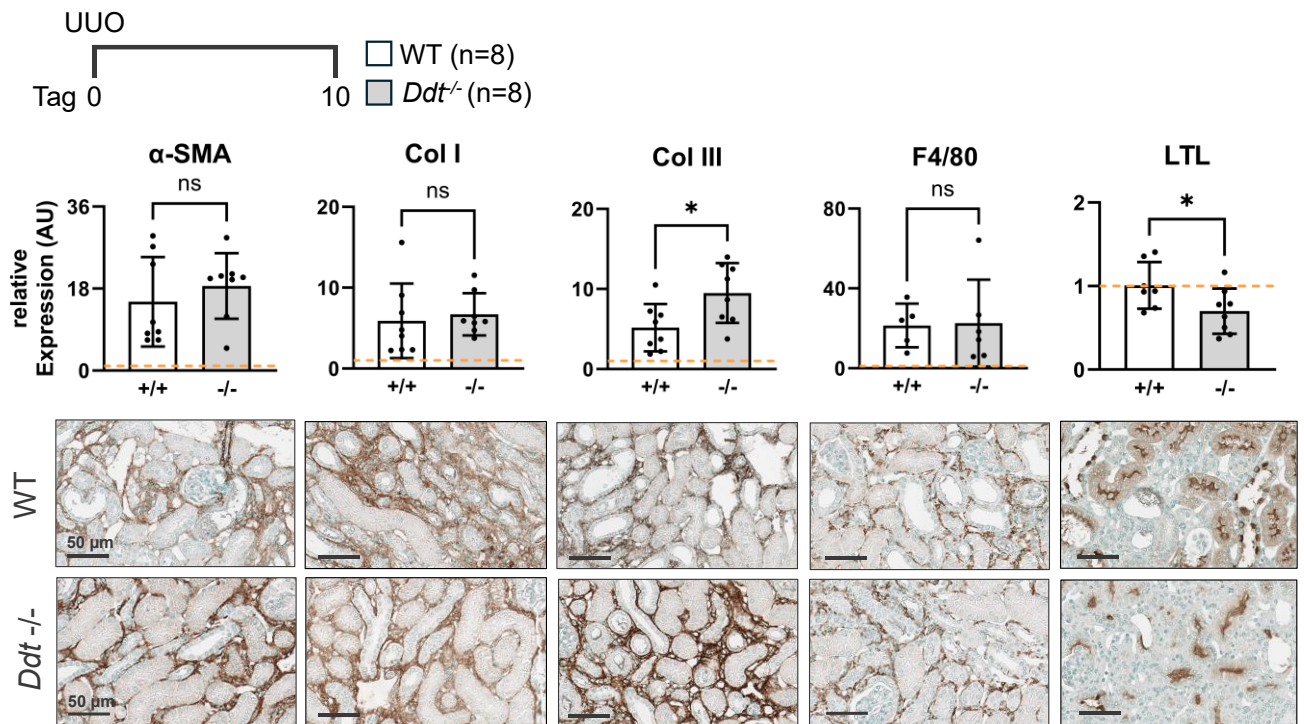


Abbildung 22: Verstärkte Col III Expression sowie reduzierte LTL Expression in *Ddt*-defizienten Mäusen zehn Tage nach der UUU.

In einem Modell der Nierenfibrose, der UUU, wiesen *Ddt*-defiziente (-/-) Mäuse (n=8) im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern (+/+) (n=8) eine angestiegene Nierenfibrose zehn Tage nach der UUU auf, wie die immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten mit den Fibrosemarkern α -Glattmuskel-Aktin (α -SMA), Kollagen Typ I (Col I), Kollagen Typ III (Col III) zeigte. Als Inflammationsmarker wurde F4/80 und als Differenzierungsmarker wurde Lotus tetragonolobus lectin (LTL) verwendet. Die Werte gesunder kontralateraler Wildtyp-Nieren wurden als 1 gesetzt, dargestellt durch die gestrichelte Linie. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 50 μ m entspricht. Die ausgewählten Bilder der jeweiligen Färbung sind repräsentativ. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der *Ddt*-KO-Mäuse mit der Expression der Wildtyp-Mäuse. ns= nicht signifikant; * $p < 0,05$. *Ddt*= D-Dopachrom Tautomerase; UUU= Unilaterale Ureterobstruktion; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*); WT= Wildtyp.

Die α -SMA Expression wurde darüber hinaus mithilfe des Western-Blots überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Es konnte detektiert werden, dass α -SMA signifikant stärker in *Ddt*-KO-Mäusen exprimiert wurde als in WT-Geschwistermäusen (Abbildung 23).

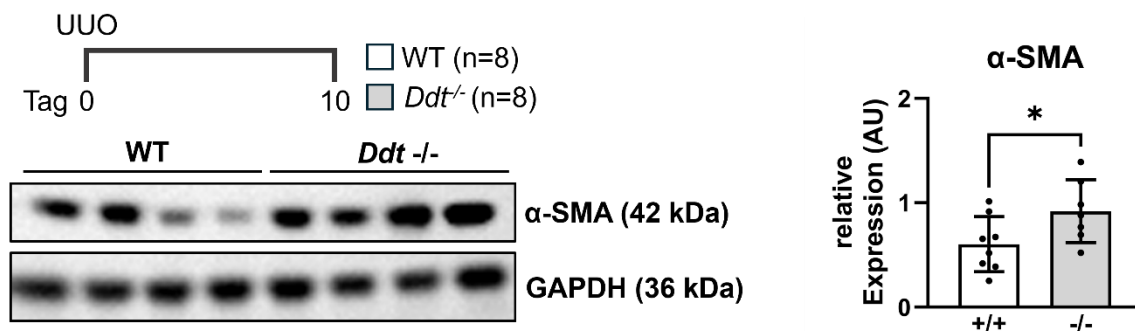


Abbildung 23: Signifikant erhöhte α-SMA Expression in *Ddt*-defizienten Mäusen.

Mithilfe der Western-Blot Analyse wurde in UUUO-Gewebe (*Ddt*-defiziente (-/-) Mäuse (n=8), Wildtyp-Wurfgeschwistern (+/+) (n=8)) die α-SMA Expression überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der gezeigte Western-Blot ist ein repräsentativer Western-Blot. Die Western-Blots wurden densitometrisch analysiert und in Relation zur Ladekontrolle gesetzt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der *Ddt*-KO Mäuse mit der Expression der Wildtyp-Mäuse. *p < 0,05. *Ddt*= D-Dopachrom Tautomerase; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; α-SMA= α-Glattmuskel-Aktin; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*); WT= Wildtyp.

4.4.1.4. Geringer Einfluss von D-DT in der durch die I/R induzierte Nierenfibrose

Zur Validierung der durch die UUUO erhaltenen Ergebnisse, wurde ein zweites *in vivo* Fibrose-Modell, die I/R, genutzt. In diesem Tierversuch wurde lediglich der Fibrosemarker Col III analysiert, da Col III in der interstitiellen Fibrose als Hauptbestandteil des fibrotischen Gewebes ermittelt wurde⁶⁹.

An Tag 0 wurde die I/R durchgeführt und an Tag 14 wurde der Versuch beendet. Die Expression des Fibrosemarkers Col III wurde in *Ddt*-KO-Mäusen mit der Expression in WT-Geschwistermäusen verglichen. Es konnte ein nicht signifikanter Anstieg von Col III in *Ddt*-KO-Mäusen detektiert werden (Abbildung 24).

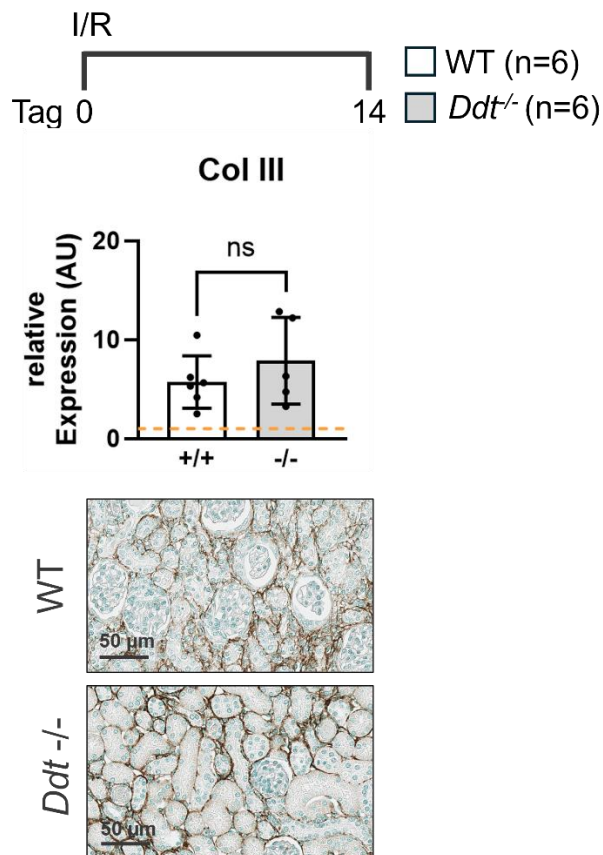


Abbildung 24: Schwach angestiegene Fibrose in *Ddt*-defizienten Mäusen 14 Tage nach der I/R.

In einem Modell der Nierenfibrose, der I/R, wiesen *Ddt*-defiziente (-/-) Mäuse (n=6) im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern (+/+) (n=6) eine angestiegene Nierenfibrose vierzehn Tage nach der I/R auf, wie die immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten mit dem Fibrosemarker Kollagen Typ III (Col III) zeigte. Die Werte gesunder kontralateraler Wildtyp-Nieren wurden als 1 gesetzt, dargestellt durch die gestrichelte Linie. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 50 μm entspricht. Die ausgewählten Bilder der jeweiligen Färbung sind repräsentativ. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der *Ddt*-KO-Mäuse mit der Expression der Wildtyp-Mäuse. ns= nicht signifikant. *Ddt*= D-Dopachrom Tautomerase; I/R= Ischämische Reperfusion; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*); WT= Wildtyp.

4.4.2. Verstärkte Fibroseausbildung in Mäusen mit Tubulusepithelzellspezifisch-deletiertem *Ddt* und systemisch-deletiertem *Mif*

Die vorherigen *in vivo* Experimente der *Ddt*-defizienten Mäuse zeigten einen Einfluss von D-DT auf die Nierenfibrose, da die *Ddt*-KO-Mäuse eine verstärkte Nierenfibrose aufwiesen. Verglichen mit den bereits publizierten Ergebnissen des homologen Proteins MIF in der Nierenfibrose, fiel der Effekt entgegen der Annahme vergleichsweise abgeschwächt aus. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass MIF möglicherweise einen kompensatorischen Effekt in den *Ddt*-defizienten Mäusen

aufweisen könnte. Um diese Vermutung zu analysieren, wurde die Nierenfibrose in Mäusen mit *Paired-Box-Protein 8* (Pax8)-zellspezifisch-deletiertem *Ddt* und systemisch-deletiertem *Mif* vergleichend mit Mäusen mit systemisch-deletiertem *Mif* untersucht. Die PAX8-zellspezifische Deletion von *Ddt* wurde mithilfe des Cre/loxP-Systems induziert. In dieser Linie wird die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pax8-Promotors exprimiert. Dies bedeutet, dass Cre ausschließlich in Zellen exprimiert wird, die auch Pax8 exprimieren. Die Deletion von D-DT erfolgte somit in allen Pax8-exprimierten Zellen. Diese Zellen sind unter anderem Tubulusepithelzellen in der Niere, jedoch auch follikuläre Epithelzellen in der Schilddrüse. Mit diesem konditionellen KO sollte außerdem die Funktionalität von D-DT in Tubulusepithelzellen getestet werden.

Fünf Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO wurden IHC-Analysen von verschiedenen Fibrosemarkern durchgeführt, um eine Aussage über den Einfluss von D-DT, bei nicht vorhandener MIF-Expression, in der Nierenfibrose und über die Funktionalität von D-DT in Tubulusepithelzellen treffen zu können. Ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der Fibrosemarker α -SMA konnte in den Pax8Cre⁺ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen, verglichen mit den Pax8Cre⁻ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen, detektiert werden. Hingegen wurden Col I und Col III signifikant stärker in Pax8Cre⁺ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen, verglichen mit den Pax8Cre⁻ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen, exprimiert. Als Inflammationsmarker wurde F4/80 verwendet, welcher keinen Unterschied zwischen den Gruppen Pax8Cre⁺ DDT-P *Mif*^{-/-} und Pax8Cre⁻ DDT-P *Mif*^{-/-} aufzeigte. Ein signifikanter Rückgang des Differenzierungsmarkers LTL in den Pax8Cre⁺ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Pax8Cre⁻ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen wies auf eine verminderte Integrität des Bürstensaums proximaler Tubulusepithelzellen hin (Abbildung 25).

Rückschluss die Überexpression von D-DT durch die Verabreichung von rD-DT, zu einer verringerten Nierenfibrose führen. Diese Interventionsstudie sollte die therapeutische Anwendbarkeit von D-DT überprüfen. Die Verabreichung von 4-IPP hingegen bewirkt eine akute und direkte Inhibition von D-DT. Diese Interventionsstudie sollte den Einfluss von kurzzeitig inaktivierten D-DT untersuchen, da die *Ddt*-KO-Mäuse eine vollständige Elimination des *Ddt* aufwiesen, was langfristige Anpassungen oder Kompensationen zur Folge haben kann. Erwartet wird, dass die präventive Gabe von 4-IPP die Nierenfibrose verstärkt.

Fünf Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO wurden IHC-Analysen von verschiedenen Fibrosemarkern durchgeführt, um eine Aussage über den präventiven Effekt von rD-DT in der Nierenfibrose treffen zu können. Eine signifikante Reduktion der Expression der Fibrosemarker α -SMA sowie Col III konnte in den mit rD-DT behandelten Mäusen, verglichen mit den Vehikel (NaCl) behandelten Mäusen, detektiert werden. Es wurde keine unterschiedliche Expression des Fibrosemarkers Col I festgestellt. Als Inflammationsmarker wurde F4/80 verwendet. Es wurde kein Unterschied von F4/80 zwischen den mit rD-DT behandelten- und den mit Vehikel behandelten Mäusen festgestellt. Eine schwache Zunahme des Differenzierungsmarkers LTL in den mit rD-DT behandelten Mäusen im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Mäusen, wies auf eine verbesserte Integrität des Bürstensaums proximaler Tubulusepithelzellen hin (Abbildung 26).

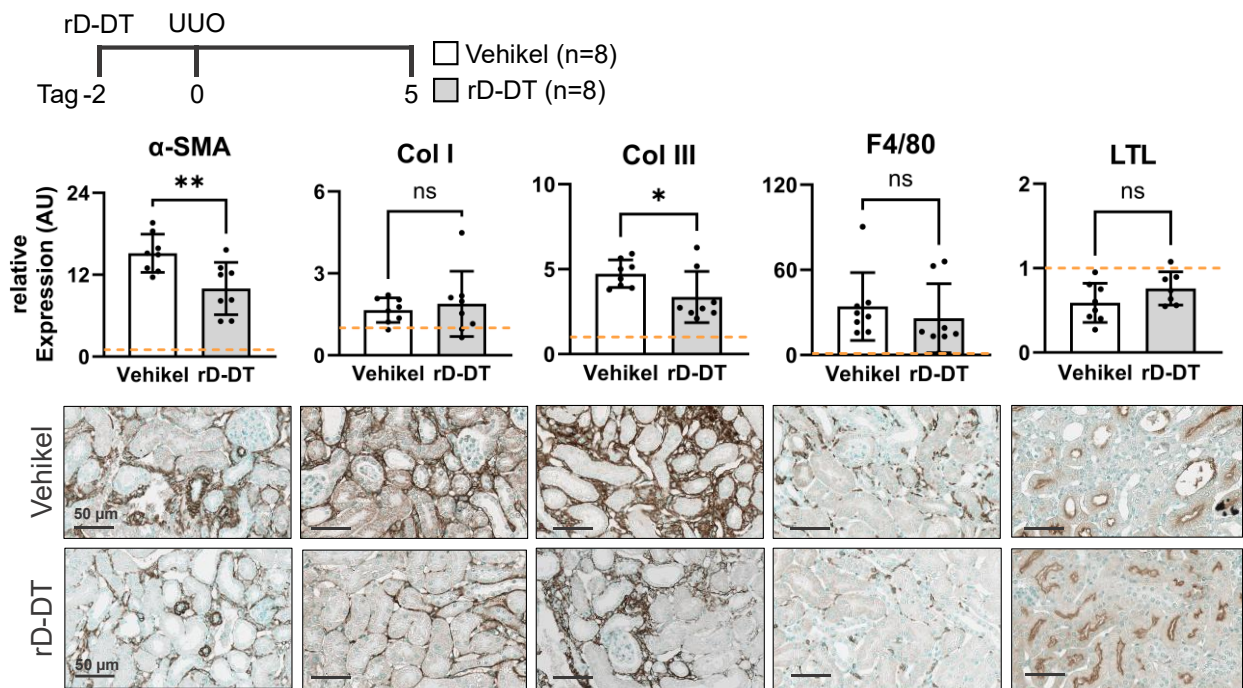


Abbildung 26: Verringerte Fibrose in mit rD-DT behandelten Mäusen fünf Tage nach der UUO.

In einem Modell der Nierenfibrose, der UUO, wiesen mit rD-DT behandelte Mäuse (n=8) im Vergleich zu den mit dem Vehikel (NaCl) behandelten Mäusen (n=8) eine verringerte Nierenfibrose fünf Tage nach der UUO auf, wie die immunhistologische Färbung von Gewebeschnitten mit den Fibrosemarkern α -Glattmuskel-Aktin (α -SMA), Kollagen Typ I (Col I), Kollagen Typ III (Col III) zeigte. Als Inflammationsmarker wurde F4/80 und als Differenzierungsmarker wurde Lotus tetragonolobus lectin (LTL) verwendet. Die Werte gesunder kontralateraler WT-Nieren wurden als 1 gesetzt, dargestellt durch die gestrichelte Linie. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 50 μ m entspricht. Die ausgewählten Bilder der jeweiligen Färbung sind repräsentativ. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der Vehikel behandelten Mäuse mit der Expression der mit rD-DT behandelten Mäuse. ns= nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$. r= rekombinant; D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; UUO= Unilaterale Ureterobstruktion AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

Die α -SMA Expression wurde darüber hinaus mithilfe des Western-Blots überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Es konnte detektiert werden, dass α -SMA nicht unterschiedlich in *Ddt*-KO-Mäusen exprimiert wurde als in WT-Geschwistermäusen. Jedoch wies die Vehikel (NaCl)-Gruppe eine starke Streuung der relativen Expression auf (Abbildung 27).

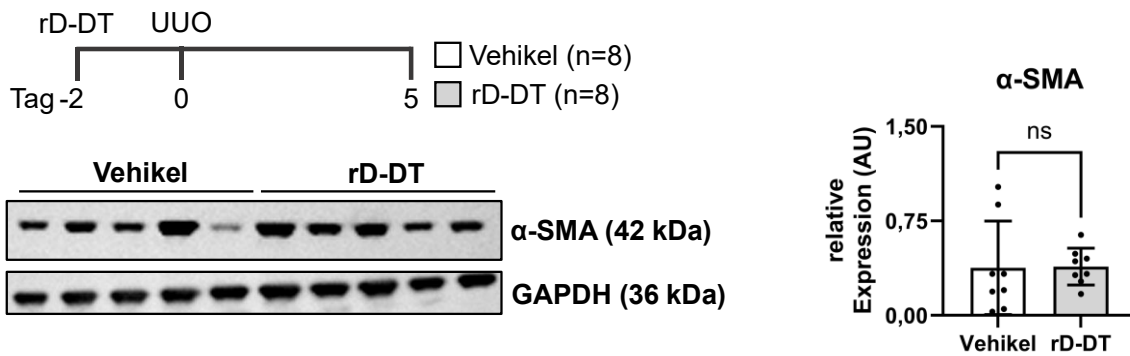


Abbildung 27: Keine unterschiedliche α -SMA Expression zwischen Vehikel behandelten und rD-DT behandelten Mäusen.

Mithilfe der Western-Blot Analyse wurde in UUO-Gewebe (Vehikel (NaCl) behandelte Mäuse (n=8), rD-DT behandelte Mäuse (n=8)) die α -SMA Expression überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der gezeigte Western-Blot ist ein repräsentativer Western-Blot. Die Western-Blots wurden densitometrisch analysiert und in Relation zur Ladekontrolle gesetzt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der Vehikel behandelten Mäuse mit der Expression der rD-DT behandelten Mäuse. ns= nicht signifikant, *Ddt*= D-Dopachrom Tautomerase; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; α -SMA= α -Glattmuskel-Aktin; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

4.4.3.1. 4-IPP induziert eine verstärkte D-DT Expression

In einer weiteren Interventionsstudie sollte der reverse Effekt zu der rD-DT Gabe überprüft werden, indem D-DT durch 4-IPP kovalent inhibiert wird. 4-IPP ist jedoch kein spezifischer D-DT Inhibitor, sondern inhibiert auch MIF durch eine kovalente Bindung. 4-IPP inhibiert MIF mit signifikant höherer Affinität und Inaktivierungsrate als D-DT, bei dem die Hemmung wesentlich schwächer ausfällt⁶¹.

Die Betrachtung der ausgewerteten IHC-Färbung des Fibrosemarkers α -SMA zeigte, dass eine ähnliche α -SMA-Expression zwischen den Vehikel (10 % DMSO in 90 % Maisöl) behandelten Mäusen und den mit 4-IPP behandelten Mäusen vorlag (Abbildung 28). Dies widerspricht der Hypothese, dass die Inhibition von D-DT, wie auch die *Ddt*-deletierten Mäuse, eine verstärkte Fibrose-Expression aufweisen sollten. Es wurde vermutet, dass die Inhibition von D-DT zu einer Aktivierung einer kompensatorischen Rückkopplungsschleife geführt haben könnte, bei der die Zelle den Funktionsverlust von D-DT durch kompensatorische Transkriptionsverstärkung auszugleichen versucht. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Proteinlysate der Nieren beider Versuchsgruppen angefertigt. In Nierengewebslysaten von mit 4-IPP

behandelten Mäusen wurde die D-DT-Expression signifikant hochreguliert, im Vergleich zu den Vehikel behandelten Mäusen (Abbildung 28). Dies bestätigte die zuvor aufgestellte Hypothese und weist möglicherweise auf eine kompensatorische Rückkopplungsschleife, die in einer verstärkten D-DT Expression resultiert, hin.

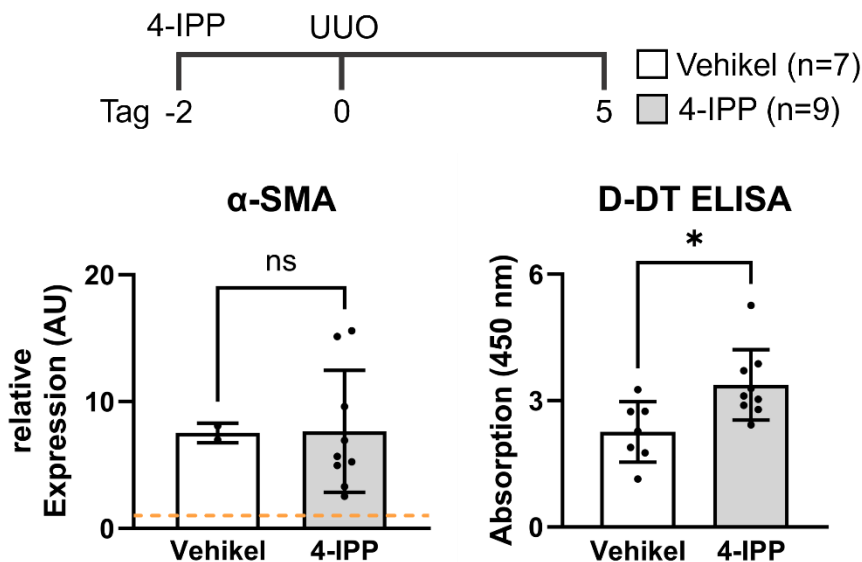


Abbildung 28: 4-IPP bewirkt eine signifikant verstärkte D-DT Expression.

Ab Tag -2 wurde täglich 4-IPP (n=9) bzw. das Vehikel (10 % DMSO in 90 % Maisöl) (n=7) verabreicht, an Tag 0 wurde die UUO durchgeführt und an Tag 5 wurde der Versuch beendet. Die Expression von α -SMA wurde mittels Immunhistochemie überprüft sowie die D-DT Expression mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt. Die Werte gesunder kontralateraler Vehikel-Nieren wurden als 1 gesetzt, dargestellt durch die gestrichelte Linie. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der mit Vehikel behandelten Mäuse mit der Expression der mit 4-IPP behandelten Mäuse. ns= nicht signifikant; *p < 0,05. 4-IPP= 4-Iodo-6-phenylpyrimidine; D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; MIF= Makrophagen-Migrations-Inhibitions Faktor; UUO= Unilaterale Ureterobstruktion; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

4.4.4. Einfluss von D-DT auf die Proliferation und Apoptose

Nachdem der protektive Effekt von D-DT in der Nierenfibrose identifiziert wurde, wurde anschließend der Grund für den protektiven Effekt von D-DT analysiert. Da bereits die protektive Wirkung von MIF auf der Induktion der Proliferation in Tubulusepithelzellen sowie der Induktion der Apoptose beruht ⁴⁸, wurde der Effekt von D-DT auf die Proliferation und Apoptose analysiert.

4.4.4.1. D-DT bewirkt die tubuläre Proliferation *in vivo*

Ein für die Nierenfibrose protektiver Mechanismus ist die Proliferation von Tubulusepithelzellen sowie die verminderte Proliferation von Fibroblasten. Aus diesem Grund wurde die resultierende proliferative Wirkung von D-DT auf Tubulusepithelzellen sowie interstitielle Zellen, wie Fibroblasten, untersucht. Dafür wurde in *Ddt*-defizienten Mäusen sowie den WT-Geschwistermäusen zwei Tage nach der Fibrose Induktion durch die UUO, Bromdesoxyuridin (BrdU) injiziert. BrdU ist ein Tymidinanalogon, welches während der S-Phase der Zellteilung in die DNA eingebaut wird und somit proliferierende Zellen markiert. Es wurde ein früher Zeitpunkt für diesen Versuch genutzt, da bereits zwei Tage nach der Obstruktion des Ureters eine starke akute Proliferation der Tubulusepithelzellen sowie der interstitiellen Zellen ausgelöst wird. In den späteren Zeitpunkten (5 sowie 10 Tage nach der UUO) wurde als Proliferationsmarker das Kiel-Antigen 67 (Ki-67) verwendet. Dies liegt darin begründet, da Ki-67 alle aktiven Zellzyklusphasen markiert und somit identifiziert werden kann, ob es zu diesen Zeitpunkten noch aktive Zellteilung in den Tubulusepithelzellen bzw. interstitiellen Zellen gibt.

Die Anzahl an BrdU positiver Tubulusepithelzellen sowie interstitieller Zellen der *Ddt*-defizienten Mäuse wurde zwei Tage nach der UUO mit der Anzahl positiver Zellen der WT-Geschwistermäuse verglichen. Die *Ddt*-KO Mäuse wiesen signifikant weniger BrdU⁺-Tubulusepithelzellen sowie signifikant mehr BrdU⁺-interstitielle Zellen auf. Die totale Anzahl an BrdU⁺-Zellen hat sich zwischen den Gruppen nicht verändert. (Abbildung 29). Dies bedeutet, dass aufgrund der Deletion von *Ddt* eine signifikant verringerte Proliferation der Tubulusepithelzellen und eine signifikant verstärkte Proliferation der interstitiellen Zellen, wie bspw. Fibroblasten wurden hervorgerufen.

Nachfolgend wurde die Proliferation der Tubulusepithelzellen sowie der interstitiellen Zellen der späteren Zeitpunkte mithilfe des Proliferationsmarkers Ki-67 analysiert. Die Gabe des rD-DTs, verglichen mit dem Vehikel (NaCl), fünf Tage nach der UUO, resultierte in einem signifikanten Anstieg von Ki-67⁺-Tubulusepithelzellen, sowie in einer signifikanten Reduktion von interstitiellen Ki-67⁺-Zellen (Abbildung 30A). Die gesamte Anzahl an Ki-67⁺-Zellen hat sich in rD-DT behandelten Mäusen verglichen mit den Vehikel-behandelten Mäusen nicht verändert (Abbildung 30B). Die Verabreichung von D-DT resultiert folglich in einer signifikant verstärkten Proliferation

der Tubulusepithelzellen und einer signifikant verringerten Proliferation der interstitiellen Zellen.

Anschließend wurde die Proliferation der Tubulusepithelzellen sowie der interstitiellen Zellen der *Ddt*-defizienten Mäuse sowie der WT-Geschwistermäuse 10 Tage nach der UO₁₂ detektiert. Der *Ddt*-KO resultierte, verglichen mit den WT-Geschwistermäusen, in einem leichten, nicht signifikanten Rückgang der Ki-67⁺-Tubulusepithelzellen sowie einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der interstitiellen Ki-67⁺-Zellen (Abbildung 30). Die gesamte Anzahl an Ki-67⁺-Zellen reduzierte sich geringfügig in *Ddt*-KO-Mäusen (Abbildung 30).

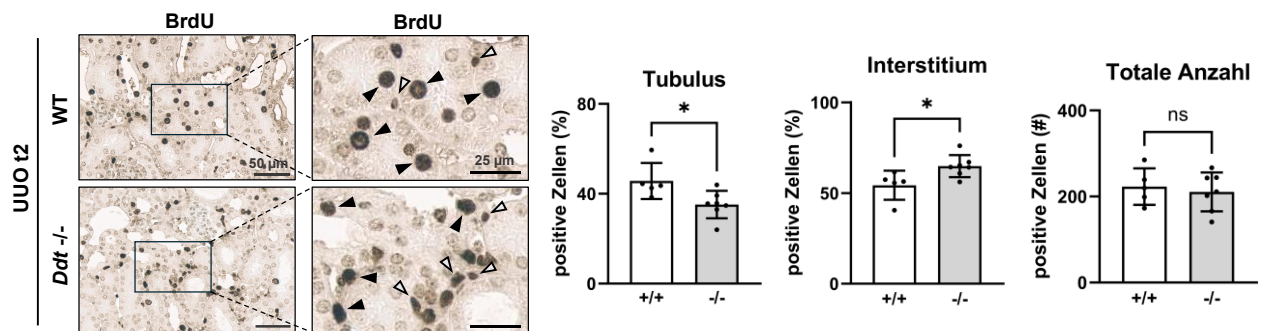


Abbildung 29: Verringerte Anzahl BrdU positiver Tubulusepithelzellen in *Ddt*-defizienten Mäusen.

Verglichen wurden die BrdU-positiven Tubulusepithelzellen, interstitielle Zellen sowie die gesamte Anzahl an Ki-67-positiven Zellen in WT (+/+) (n=8) und *Ddt*^{-/-} (n=8) Mäusen 10 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UO₁₂. Es wurde jeweils ein repräsentatives Bild der WT- sowie *Ddt*^{-/-} Mäusen gezeigt. Es wurde jeweils ein Hellfeld-Bild einer 20-fachen Vergrößerung jedes Tieres ausgewertet. Die BrdU-positiven Tubulusepithelzellen wurden relativ zu der gesamten Anzahl an BrdU-positiven Zellen ausgewertet, ebenso wie die BrdU-positiven interstitiellen Zellen. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 50 µm entspricht. Des Weiteren ist eine Vergrößerung des repräsentativen Bildes mit einem Maßstabsbalken der Größe von 25 µm abgebildet. In dieser Vergrößerung wurden beispielhaft positive Tubulusepithelzellen mit einem ausgefüllten schwarzen Pfeil markiert. Positive interstitielle Zellen wurden mit einem ausgefüllten grauen Pfeil markiert. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt. ns= nicht signifikant; *p < 0,05. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase, r= rekombinant, BrdU= Bromdesoxyuridin, t=Tag; WT= Wildtyp; WT= Wildtyp.

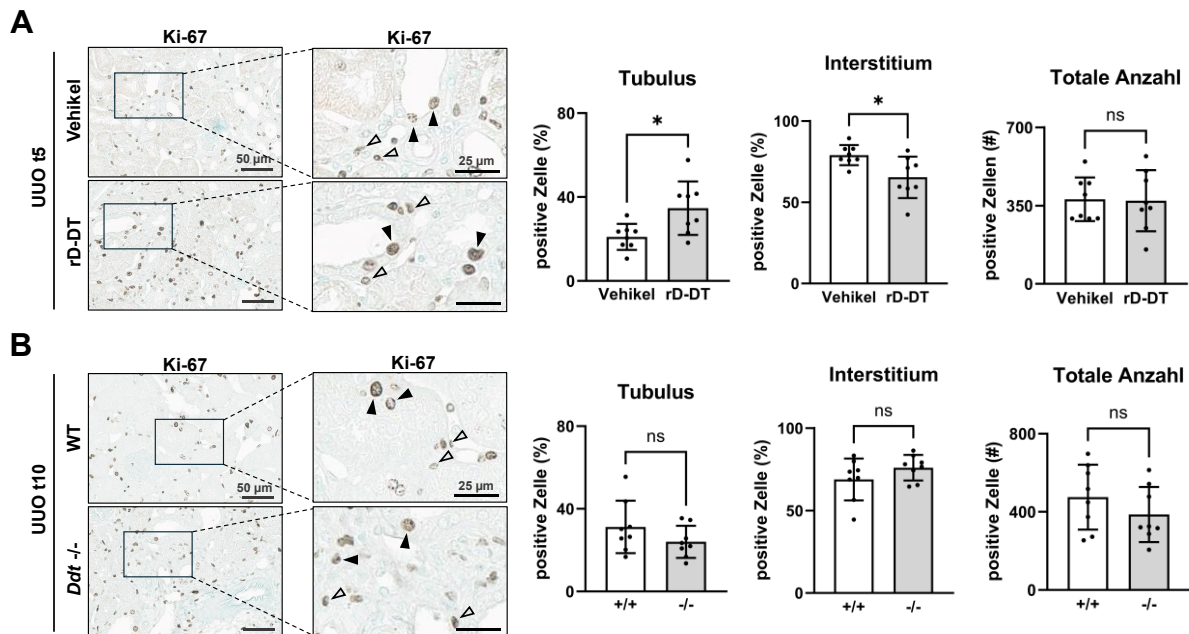


Abbildung 30: D-DT verstärkt die Proliferation der Tubulusepithelzellen.

A. Verglichen wurden die Ki-67-positiven Tubulusepithelzellen, interstitielle Zellen sowie die gesamte Anzahl an Ki-67-positiven Zellen in Vehikel (NaCl)- (n=8) und rD-DT behandelten Mäusen (n=8) 5 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO. Es wurde jeweils ein repräsentatives Bild der Vehikel- sowie rD-DT behandelten Mäusen gezeigt. B. Verglichen wurden die Ki-67-positiven Tubulusepithelzellen, interstitielle Zellen sowie die gesamte Anzahl an Ki-67-positiven Zellen in WT-Geschwistermäusen (+/+) (n=8) und *Ddt* -/- (n=8) Mäusen 10 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO. Es wurde jeweils ein repräsentatives Bild der WT- sowie *Ddt* -/- Mäusen gezeigt. Es wurde jeweils ein Hellfeld-Bild einer 20-fachen Vergrößerung jedes Tieres ausgewertet. Die Ki-67-positiven Tubulusepithelzellen wurden relativ zu der gesamten Anzahl an Ki-67-positiven Zellen ausgewertet, ebenso wie die Ki-67-positiven interstitiellen Zellen. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 50 μm entspricht. Des Weiteren ist eine Vergrößerung des repräsentativen Bildes mit einem Maßstabsbalken der Größe von 25 μm abgebildet. In dieser Vergrößerung wurden beispielhaft positive Tubulusepithelzellen mit einem ausgefüllten schwarzen Pfeil markiert. Positive interstitielle Zellen wurden mit einem ausgefüllten grauen Pfeil markiert. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt. ns= nicht signifikant; * $p < 0,05$. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase, r= rekombinant, Ki-67= Kiel-Antigen 67, t=Tag; WT= Wildtyp.

4.4.4.2. D-DT erzielt die Induktion der tubulären Proliferation *in vitro* in HK-2 Zellen

D-DT bewirkte in Nierenfibrose-Modellen *in vivo* eine Induktion der Proliferation der Tubulusepithelzellen. Dieses Ergebnis sollte *in vitro* in der humanen HK-2 Tubulusepithelzelllinie verifiziert werden. Dafür wurden die HK-2 Zellen mit rD-DT in

verschiedenen Konzentrationen (256, 512, 1024 ng/ml) für 24 h stimuliert. Anschließend wurde ein BrdU-Zellkulturassay durchgeführt, um die Proliferation der Tubulusepithelzellen zu überprüfen. Detektiert wurde eine mit zunehmender rD-DT Konzentration, signifikant zunehmende Proliferation (Abbildung 31). In einem zweiten Versuchsteil wurden die HK-2 Zellen zunächst 30 min mit 512 ng/ml rD-DT stimuliert und anschließend für 24 h mit dem MIF und D-DT-Inhibitor 4-IPP bzw. dem 4-IPP Vehikel (DMSO) co-inkubiert. Es konnte detektiert werden, dass die durch das rD-DT ausgelöste Proliferation, durch die Zugabe des Inhibitors 4-IPP signifikant vermindert wurde (Abbildung 31).

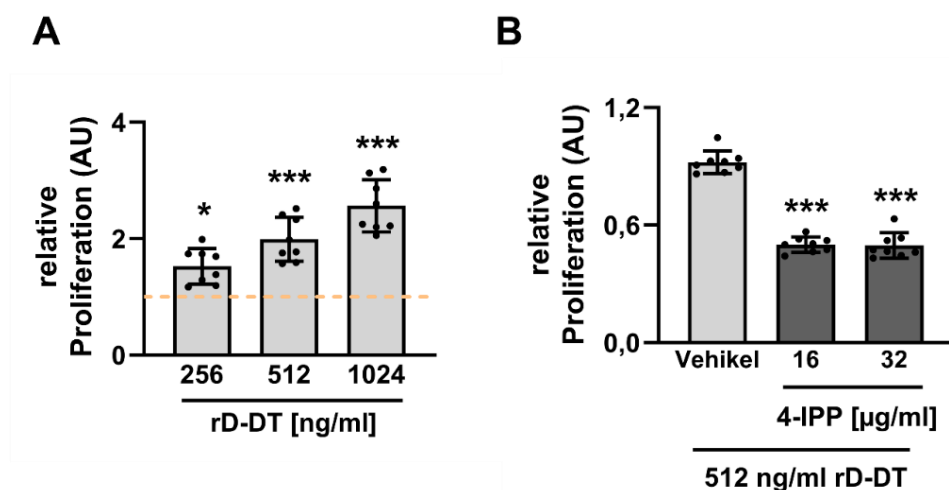


Abbildung 31: rD-DT induziert die Proliferation der humanen Tubulusepithelzellen *in vitro*.

A. Humane Tubulusepithelzellen (HK-2) wurden für 24 h mit rD-DT in verschiedenen Konzentrationen (256, 512, 1024 ng/ml) stimuliert. B. Humane Tubulusepithelzellen (HK-2) wurden für 30 min rD-DT (512 ng/ml) stimuliert, anschließend wurde der Inhibitor 4-IPP hinzugegeben (16, 32 µg/ml) und gemeinsam für 24 h inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde mittels des BrdU-Assays ermittelt und in Relation zu der Stimulations-Kontrolle (NaCl) normiert. Es wurden die einzelnen Datenpunkte (n=8) sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt. *p < 0,05, ***p \leq 0,001. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase.D-DT, r= rekombinant, AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

4.4.4.3. D-DT induziert die Apoptose *in vivo*

Ein weiterer protektiver Mechanismus, welcher die Nierenfibrose verringern kann, ist die Apoptose, indem bspw. dysfunktionale Tubulusepithelzellen eliminiert werden. Deshalb wurde der Effekt von D-DT auf die Apoptose untersucht. Als Apoptosemarker wird die gespaltete Caspase-3 (*cleaved* Caspase-3), welche an der späten Phase der Apoptose beteiligt ist, genutzt. Die inaktive Caspase 3 liegt im physiologischen

Zustand im Zytoplasma vor und wird nach der Apoptose-Induktion in ihre aktive Form gespalten (cl. Caspase). Mithilfe einer IHC-Färbung dieses Markers sollte ein Rückschluss auf den Einfluss von D-DT in der Apoptose gezogen werden.

Die Gabe des rD-DTs, verglichen mit der Gabe des Vehikels (NaCl), fünf Tage nach der UUO zeigte keine Unterschiede in der Anzahl an cl. Caspase-3⁺-Tubulusepithelzellen. Der *Ddt*-KO resultierte, verglichen mit den WT-Geschwistermäusen, zehn Tage nach der UUO, in einem signifikanten Rückgang der cl. Caspase-3⁺-Tubulusepithelzellen. Es konnte somit eine signifikant verringerte Apoptose detektiert werden, wenn *Ddt* eliminiert wurde (Abbildung 32).

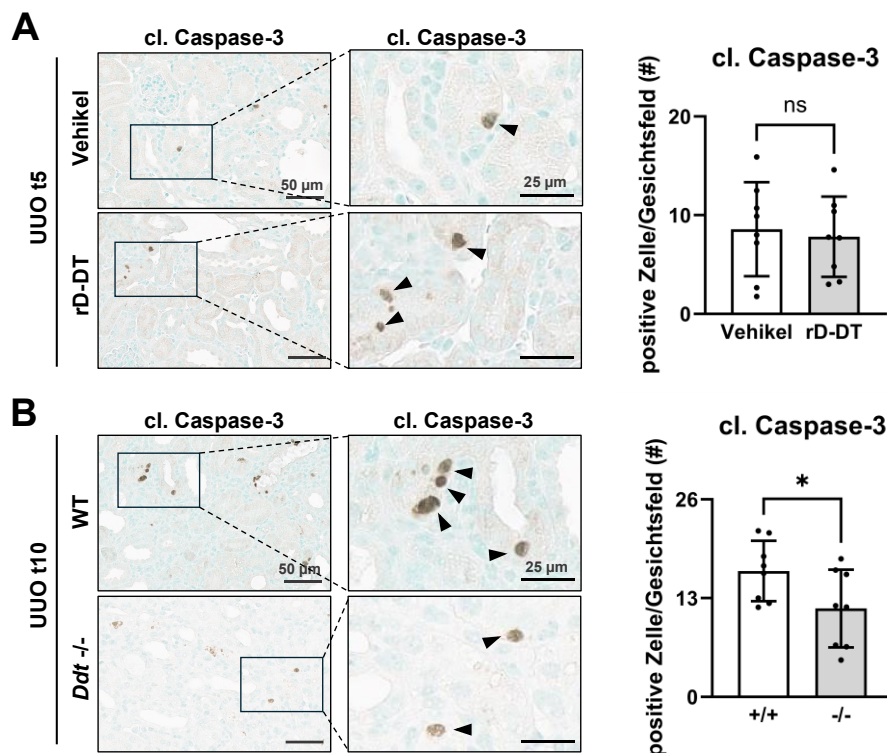


Abbildung 32: *Ddt*-defiziente Mäuse zeigten eine verminderte Anzahl apoptotischer cl. Caspase-3⁺-Tubulusepithelzellen nach der UUO.

A. Verglichen wurden die cl. Caspase 3-positiven Tubulusepithelzellen in Vehikel (NaCl)- (n=8) und rD-DT behandelten Mäusen (n=8) 5 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO. Es wurde jeweils ein repräsentatives Bild der Vehikel- sowie rD-DT behandelten Mäusen gezeigt. B. Verglichen wurden cl. Caspase 3-positiven Tubulusepithelzellen in WT-Geschwistermäusen (+/+) (n=8) und *Ddt* ^{-/-} (n=8) Mäusen 10 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO. Es wurde jeweils ein repräsentatives Bild der Vehikel- sowie rD-DT behandelten Mäusen gezeigt. Es wurden jeweils zehn Hellfeld-Bilder einer 20-fachen Vergrößerung jedes Tieres ausgewertet. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 50 µm entspricht. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt. ns= nicht signifikant; *p < 0,05. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase, r= rekombinant, cl= cleaved, t=Tag, WT= Wildtyp.

4.4.5. Überprüfung der Regulation von D-DT/MIF und CD74

Nachdem gezeigt wurde, dass D-DT eine funktionelle Rolle in nierenfibrotischen Prozessen spielt, sollte nachfolgend geklärt werden, wie die Expression von D-DT gesteuert wird. Angesichts der strukturellen und funktionellen Homologie von D-DT zu MIF und da beide Liganden an den gleichen Rezeptor CD74 binden, wurde untersucht, ob MIF und CD74 direkt oder indirekt die Expression von D-DT beeinflussen. Dafür wurde in *Mif*-defizienten Mäusen (*Mif* $-/-$) (Abbildung 33A) und *Cd74*-defizienten Mäusen (*Cd74* $-/-$) (Abbildung 33B) die Expression von D-DT detektiert. Außerdem wurde in *Ddt*-defizienten Mäusen (*Ddt* $-/-$) (Abbildung 33C) die Expression von MIF überprüft. Für die Detektion der jeweiligen Proteine wurden Nierenlysate hergestellt und diese mittels Gelelektrophorese und anschließendem Western-Blot analysiert. Zu detektieren war, dass D-DT weder von MIF noch von CD74 reguliert wurde, da sich die Expression von D-DT in beiden KOs nicht von den jeweiligen WT-Geschwistermäusen (+/+) unterschieden hat (Abbildung 33A, 33B). Außerdem konnte zwischen den *Ddt*-KO-Mäusen (*Ddt* $-/-$) und den WT-Geschwistermäusen (+/+) keine unterschiedliche MIF-Expression festgestellt werden (Abbildung 33C). Diese Analyse legt somit nahe, dass D-DT nicht direkt von MIF oder CD74 beeinflusst wird und keine kompensatorische Rolle in physiologischen Prozessen ausübt.

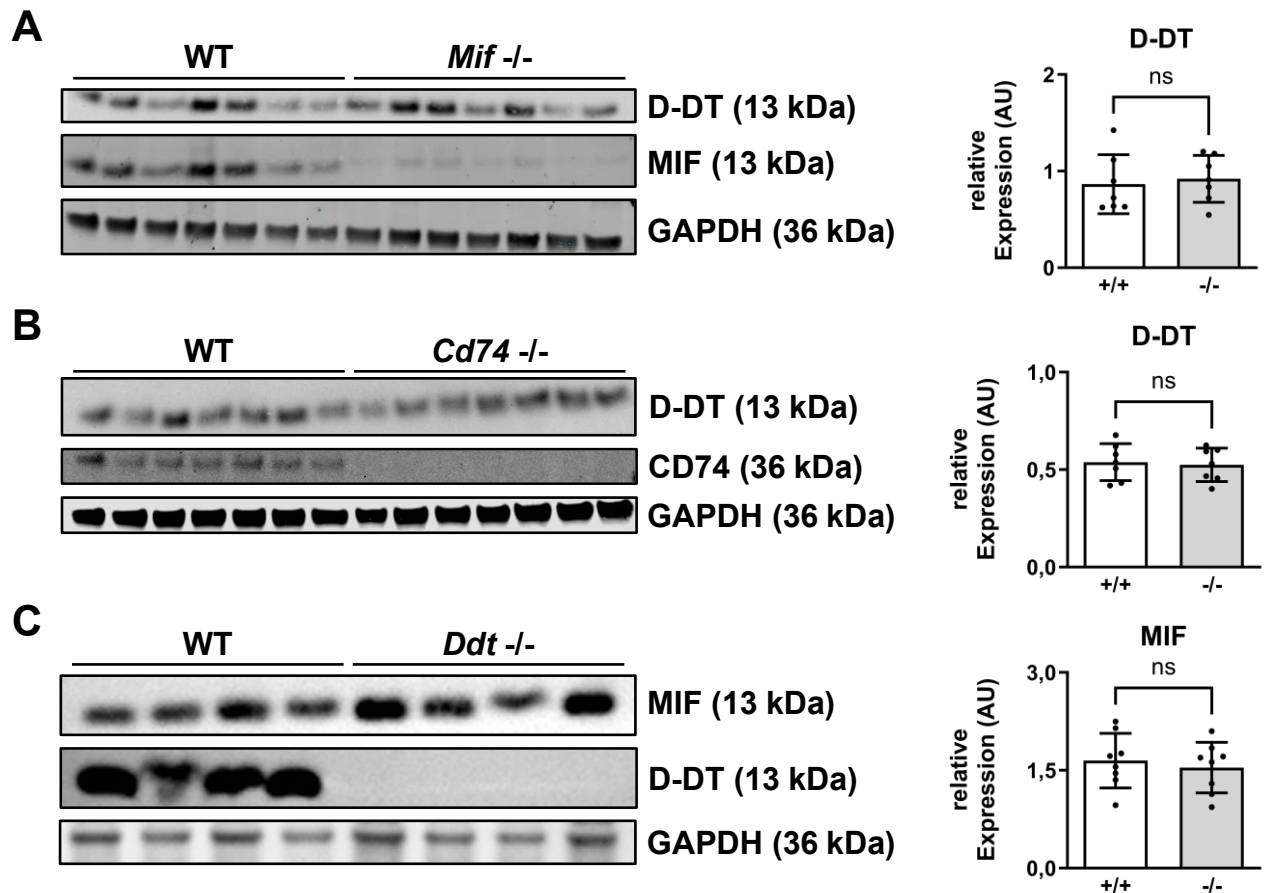


Abbildung 33: D-DT Expression von MIF und CD74 unabhängig.

Mithilfe der Western-Blot Analyse wurde in *Mif*^{-/-}; *Cd74*^{-/-} und *Ddt*^{-/-} defizienten (-/-) Mäusen (n=8) sowie den entsprechenden Wildtyp-Wurfgeschwistern (+/+) (n=8) unter physiologischen Bedingungen die D-DT sowie MIF-Expression überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der gezeigte Western-Blot ist ein repräsentativer Western-Blot. Die Western-Blots wurden densitometrisch analysiert und in Relation zur Ladekontrolle gesetzt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der KO-Mäuse mit der Expression der Wildtyp-Mäuse. ns= nicht signifikant; D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; MIF= Makrophagen-Migrations-Inhibitions Faktor; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*); WT= Wildtyp.

Des Weiteren wurde die Relation von D-DT und MIF in fibrotischem Gewebe analysiert. Dadurch sollten Erkenntnisse über die direkte oder indirekte Regulation von D-DT und MIF und den möglichen Zusammenhang in der Pathophysiologie fibrotischer Prozesse gewonnen werden. Dafür wurde in Nierenlysaten und dem Serum der *Ddt*^{-/-} KO Studie, 10 Tage nach der UUO (Abbildung 34A) sowie der rD-DT-Interventionsstudie, 5 Tage nach der UUO (Abbildung 34B) die Expression von MIF

mittels eines ELISAs detektiert. Diese Analyse zeigte, dass keine veränderte MIF-Expression in den Nierenlysaten oder im Serum vorlag, sowohl bei der Deletion von *Ddt* (Abbildung 34A) als auch bei der Überexpression von D-DT (Abbildung 34B). In den untersuchten fibrotischen Modellen konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von D-DT und MIF festgestellt werden.

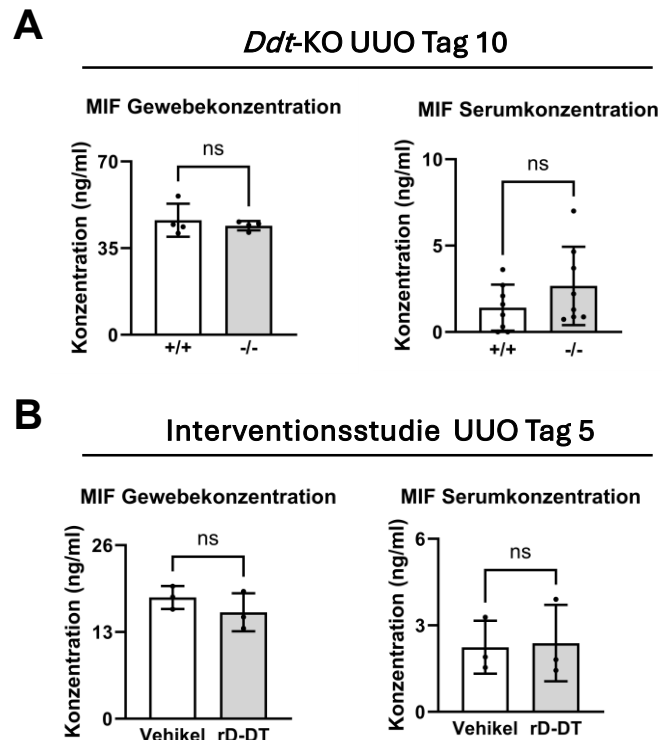


Abbildung 34: MIF wird unabhängig von D-DT exprimiert.

In A wurde die MIF-Konzentration in ng/ml in Nierenlysaten sowie im Serum von *Ddt*-KO Mäusen 10 Tage nach der UUO in einem MIF-*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) detektiert. Verglichen wurden jeweils die *Ddt*-KO-Mäuse (-/-) (n=4) mit den Wildtyp-Wurfgeschwistern (+/+) (n=4). In B wurde die MIF-Konzentration in ng/ml in Nierenlysaten sowie dem Serum in der Interventionsstudie, in welcher Mäuse mit rD-DT bzw. dem Vehikel (NaCl) behandelt wurden, 5 Tage nach der UUO in einem MIF-*Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) detektiert. Verglichen wurden jeweils die Vehikel behandelten Mäuse (Vehikel) (n=3) mit den mit rD-DT behandelten Mäusen (rD-DT) (n=3). Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der *Ddt*-KO-Mäuse mit der Expression der Wildtyp-Mäuse und die Expression der mit Vehikel behandelten Mäuse mit der Expression der mit rD-DT behandelten Mäuse. ns= nicht signifikant. r=rekombinant; D-DT= D-Dopachrom Tautomerase; MIF= Makrophagen-Migrations-Inhibitions Faktor; UUO= Unilaterale Ureterobstruktion.

4.4.6. Mechanistische Effekte von D-DT in fibrotischem Gewebe

Nachdem die nephroprotektive Rolle von D-DT in der Nierenfibrose identifiziert wurde und kompensatorische Effekte von MIF und CD74 ausgeschlossen wurden, sollte nachfolgend bestimmt werden, mithilfe welches molekularen Mechanismus diese Funktion von D-DT ausgeübt wird.

Dazu sollen in diesem Kapitel die mechanistischen Effekte von D-DT im fibrotischen Gewebe identifiziert werden. Dafür wurde eine Analyse der wichtigen Signalwege von MIF durchgeführt, da aufgrund der starken Homologie, ähnliche Signalwege für D-DT eine Rolle spielen könnten. Fokussiert wurde sich auf Signalwege, welche in der Proliferation eine Rolle spielen, da bereits gezeigt wurde, dass D-DT einen Einfluss auf die Proliferation von Tubulusepithelzellen sowie interstitiellen Zellen der Niere nimmt. Die Relevanz dieser identifizierten Signalwege für die Nierenfibrose wurde in humanem gesundem und fibrotischem Gewebe überprüft. Zuletzt wurde überprüft, ob D-DT diese Signalwege für seine Funktionalität nutzt.

4.4.6.1. MIF-Signalwege

Zunächst wurden der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)/Extrazelluläre signalregulierte Kinase (ERK)-Signalweg sowie der AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)-Signalweg als relevante MIF-Signalwege identifiziert (Abbildung 35). Der MAPK/ERK-Signalweg bewirkt häufig die Proliferation von Zellen. Wichtige Signalproteine innerhalb des MAPK/ERK-Signalweges sind ERK1/2. Der AMPK α -Signalweg hingegen bewirkt oftmals die Suppression der Proliferation. Im AMPK α -Signalweg ist AMPK α ein wichtiges Signalprotein (Abbildung 35).

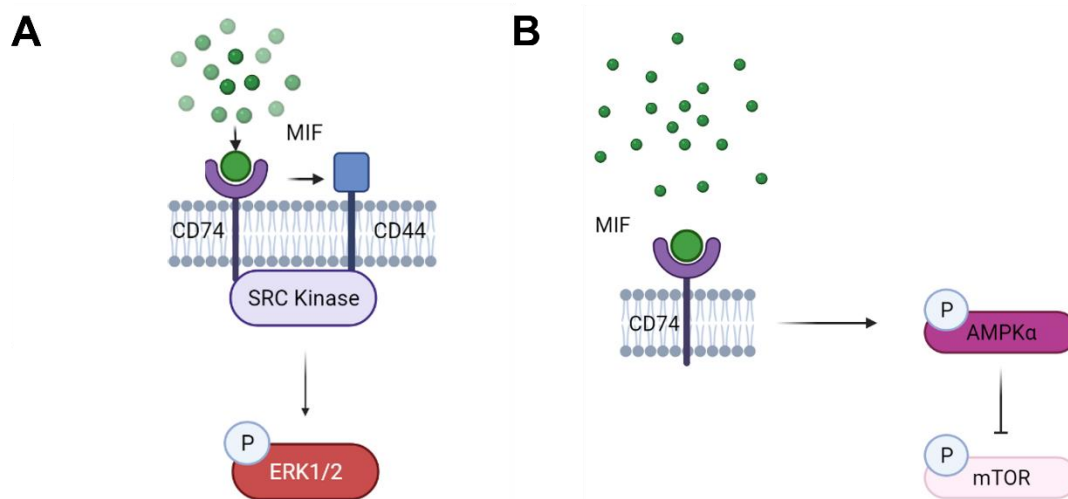


Abbildung 35: MAPK/ERK sowie AMPK sind wichtige Signalwege von MIF.

MIF bindet an CD74 und löst zwei gezeigte Signalwege aus. MIF= Makrophagen-Migrations-Inhibitions Faktor; ERK= Extrazelluläre signalregulierte Kinase; AMPK= AMP-aktivierte Proteinkinase; mTOR= mechanistisches Ziel von Rapamycin. (Erstellt mit Biorender.com)

4.4.6.2. Der MAPK/ERK- sowie der AMPK-Signalweg spielen in fibrotischem Gewebe eine Rolle

Die Signalproteine (p-)ERK1/2 (Abbildung 36) sowie (p-)AMPKα (Abbildung 37) der identifizierten Signalwege wurden auf ihre Relevanz in humanem fibrotischem Nierengewebe überprüft. Dafür wurde die Expression dieser Signalproteine in humanen Nierenlysaten mittels Western-Blot-Analyse analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Signalproteine ERK1/2 sowie p-ERK1/2 in fibrotischem humanem Nierengewebe signifikant hochreguliert wurden (Abbildung 36). Dies kann bedeuten, dass der MAPK/ERK-Signalweg in fibrotischem Gewebe hochreguliert wurde. In fibrotischem Gewebe wurde auch AMPKα im Gegensatz zu gesundem Gewebe reguliert, jedoch wurde signifikant weniger AMPKα sowie p-AMPKα exprimiert (Abbildung 37).

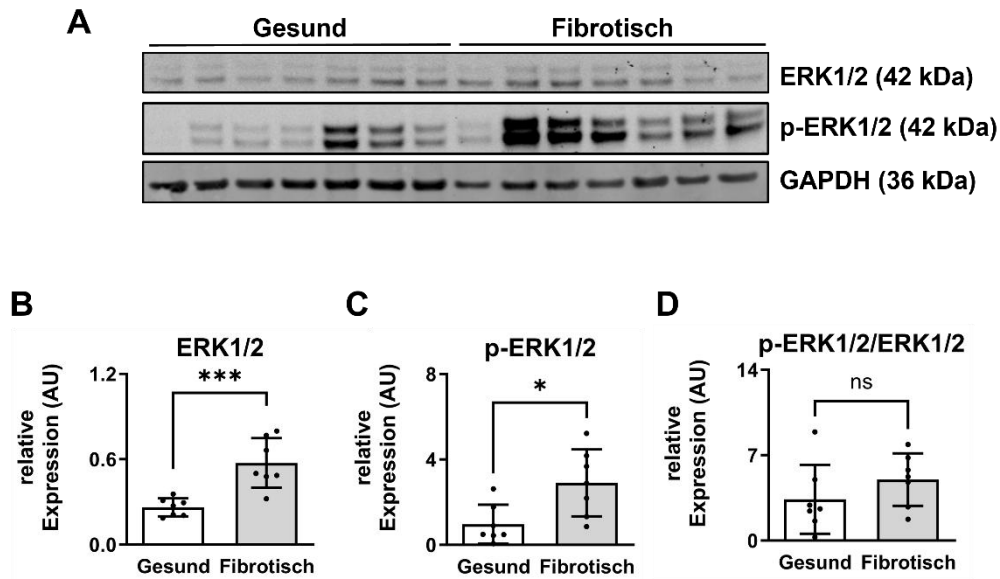


Abbildung 36: Der MAPK/ERK-Signalweg spielt in fibrotischem humanem Nierengewebe eine funktionelle Rolle.

Mithilfe der Western-Blot Analyse wurde in gesundem (n=7) und fibrotischem humanem Nierengewebe (n=7) die phosphorylierte (p) und die totale extrazelluläre signalregulierte Kinase 1/2 (ERK1/2) Expression überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der gezeigte Western-Blot ist ein repräsentativer Western-Blot. Die Western-Blots wurden densitometrisch analysiert und in Relation zur Ladekontrolle gesetzt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression des gesunden mit dem fibrotischen Gewebe. ns= nicht signifikant; *p < 0,05; ***p \leq 0,001; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

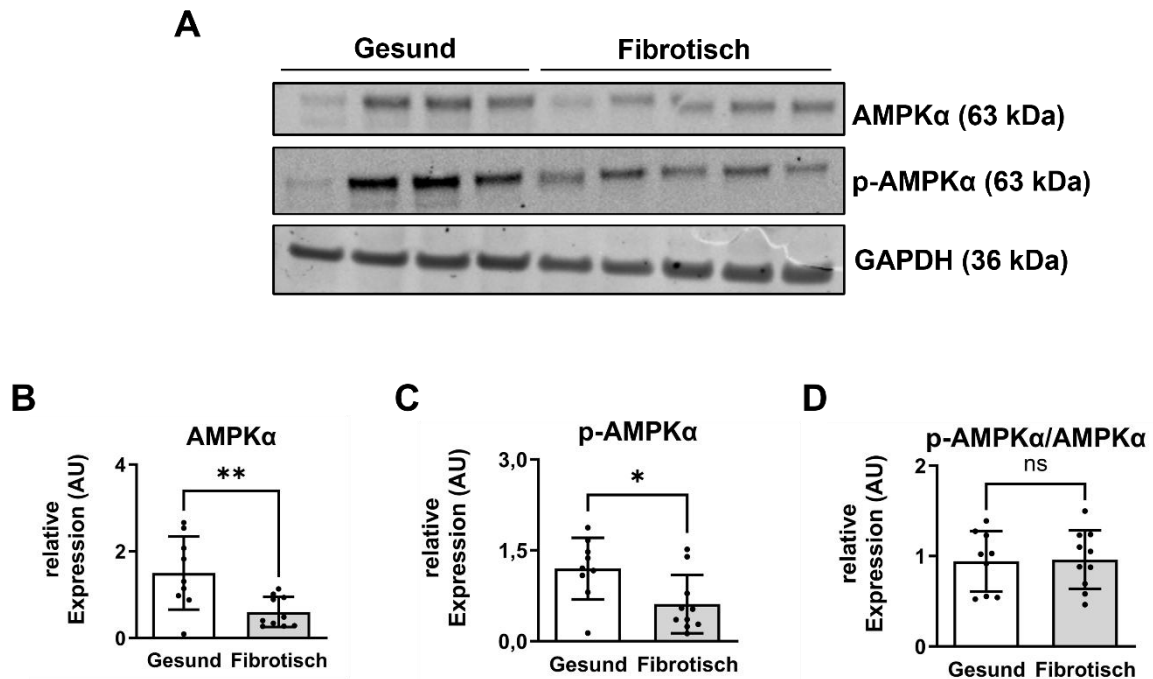


Abbildung 37: Der AMPKα-Signalweg spielt in fibrotischem humanem Nierengewebe eine funktionelle Rolle.

Mithilfe der Western-Blot Analyse wurde in gesundem (n=7) und fibrotischem humanem Nierengewebe (n=7) die phosphorylierte (p) und die totale-AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPKα) Expression überprüft. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Der gezeigte Western-Blot ist ein repräsentativer Western-Blot. Die Western-Blots wurden densitometrisch analysiert und in Relation zur Ladekontrolle gesetzt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression des gesunden mit dem fibrotischen Gewebe. ns= nicht signifikant; *p < 0,05; **p \leq 0,01; GAPDH= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

4.4.6.3. D-DT beeinflusst den AKT- und MAPK-Signalweg

Die vorherige Analyse bestätigte die Relevanz der, in der Proliferation relevanten Signalproteine ERK- sowie der AMPKα in fibrotischem humanem Nierengewebe. Zur Identifikation der mechanistischen Rolle von D-DT in der Regulation der Nierenfibrose und insbesondere zur Analyse der Aktivierung von ERK und AMPKα wurden MAPK- und AKT-Phosphorylierungsarrays verwendet. Diese erlauben eine gezielte Erfassung multipler Signalproteine und liefern Hinweise auf die pro- oder antiproliferative Signaltransduktion. Die Signalwege wurden *in vivo* in der präventiven rD-DT Interventionsstudie, welche 5 Tage nach der UO endete, validiert. Dafür wurde die

Expression definierter Signalproteine in einem AKT- (Abbildung 38A) sowie MAPK-Arrays (Abbildung 38B) überprüft.

Der AKT-Array zeigte eine deutliche Hochregulierung aller im AKT-Array validierten Signalproteine in mit rD-DT behandelten Mäusen, verglichen mit den Vehikel (NaCl) behandelten Mäusen (Anhang Abbildung 46). Signifikant stärker exprimiert wurden die Signalproteine *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma* (Raf-1), Prolin-reiches AKT Substrat mit einem Molekulargewicht von 40 kDa (PRAS40), Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3)a sowie GSK3b (Abbildung 38A).

Nachfolgend wurde die Rolle von D-DT in dem proliferationsfördernden Signalweg MAPK mittels des MAPK-Arrays validiert. Betrachtet man alle Signalproteine des Arrays so kann eine Hochregulierung des Signalweges in rD-DT-behandelten Mäusen, verglichen mit den Vehikel-behandelten Mäusen, festgestellt werden (Anhang Abbildung 47). Signifikant stärker exprimiert wurden die Signalproteine Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen (MKK)3, MKK6, p53, p70S6k, Hitzeschock-Protein 27 (HSP27) und ribosomale S6 Kinase 1 (RSK1) (Abbildung 38B).

Zusammenfassend konnten zellproliferations- und wachstumsfördernde Signalproteine (Raf-1, PRAS40, GSK3a/b, p70S6k sowie RSK1) durch die Administration von rD-DT *in vivo* signifikant hochreguliert werden. Außerdem wurden proapoptotische Signalproteine (MKK3, MKK6) signifikant hochreguliert. Außerdem konnte die Behandlung von Mäusen mit rD-DT *in vivo* die zelluläre Stressantwort induzieren (p53, MKK3, MKK6, HSP2) (Abbildung 38).

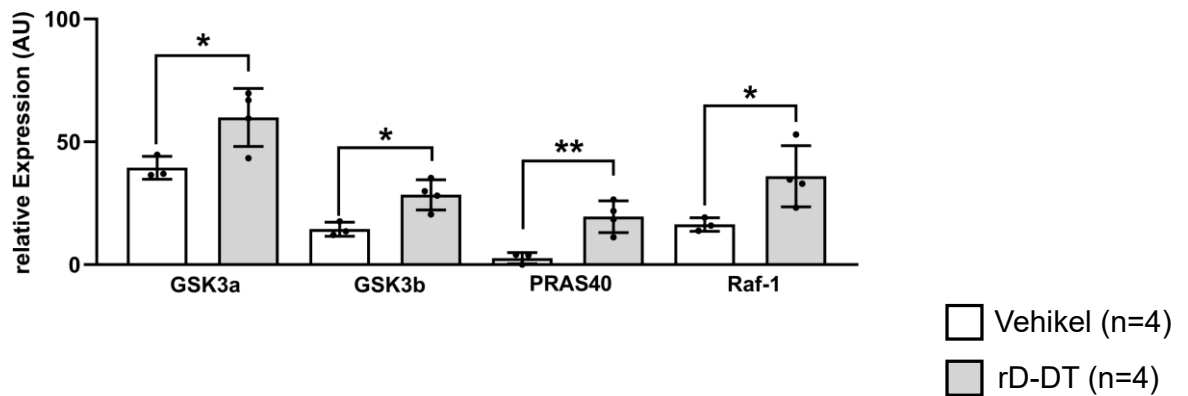
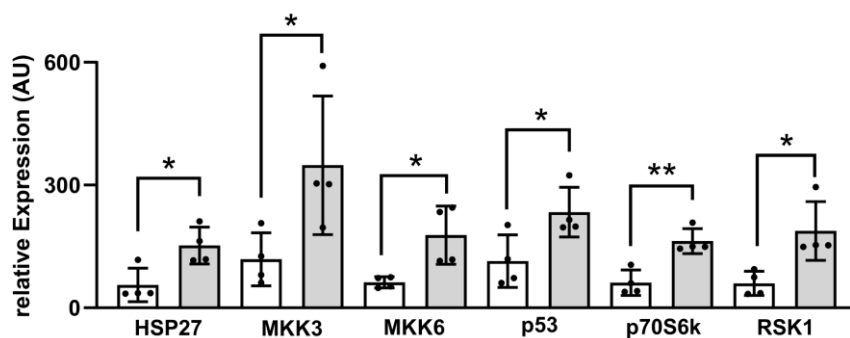
A**AKT-Array****B****MAPK-Array**

Abbildung 38: Hochregulierung einiger AKT- sowie MAPK-Signalproteine in mit rD-DT behandelten Mäusen.

Verglichen wurden verschiedene Signalproteine des AKT-Signalweges (A) und MAPK-Signalweges (B) mit Hilfe des AKT- sowie MAPK-Arrays in Vehikel (NaCl)- (n=4) und in mit rD-DT behandelten Mäusen (n=4) 5 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO. Dargestellt wurden ausgewählte Signalproteine in A: GSK3a, GSK3b, PRA S40 und Raf-1 und in B: HSP27, MKK3, MKK6, p53, p70S6k und RSK1 welche eine signifikant veränderte Expression aufwiesen. Aufgetragen wurde jeweils die relative Expression. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der mit Vehikel behandelten Mäuse mit der Expression der mit rD-DT behandelten Mäuse. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$. AKT= Proteinkinase B; MAPK= Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen; MKK= Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen; HSP27= Hitzeschock-Protein 27; RSK1= ribosomale S6 Kinase 1; GSK3= Glykogensynthase-Kinase 3; Raf-1=Rapidly Accelerated Fibrosarcoma, PRAS40=Prolin-reiches AKT-Substrat mit einem Molekulargewicht von 40 kDa; AU = willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

Zusammenfassend wurde D-DT unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich in proximalen Tubuli detektiert. In fibrotischem murinen und humanen Nierengewebe wurde D-DT vermindert exprimiert. Die Nierenfibrose der *Ddt*-defizienten Mäuse wurde verstärkt, wohingegen die Administration der Mäuse mit rD-DT die Nierenfibrose verbesserte. Des Weiteren verstärkte D-DT die Proliferation von Tubulusepithelzellen und verminderte die Proliferation von interstitiellen Zellen *in vivo* in der Nierenfibrose. Darüber hinaus bewirkte die Deletion von *Ddt* eine verstärkte Apoptose. D-DT wurde unabhängig von CD74 oder MIF exprimiert und MIF wies keine kompensatorischen Eigenschaften bei einer Depletion von *Ddt* auf. Außerdem resultierte D-DT in der fibrotischen Niere, nach der UUO, in einer verstärkten Expression von Signalproteinen aus proliferativen sowie proapoptotischen Signalwegen.

5. Diskussion

Diese Studie beschäftigte sich mit der Lokalisierung, der Regulierung und der Identifizierung der funktionellen Rolle von D-DT in der Nierenfibrose. Die thematische Fokussierung auf D-DT, basiert auf der Sequenz- und Strukturhomologie zum bereits gut charakterisierten MIF, welches eine nephroprotektive Rolle in der Nierenfibrose aufweist ⁴⁸. Dem gegenüber steht die MIF-vermittelte Entwicklung der pathologisch proliferativen Glomerulosklerose und die Initiation inflammatorischer Prozesse ^{47,48,60,70}. Diese protektive sowie pathologische Eigenschaft von MIF und die Interaktion in inflammatorischen Prozessen machen es zu einem kritischen Angriffspunkt zur therapeutischen Behandlung einer Nierenfibrose, da mit Nebenwirkungen gerechnet werden muss.

D-DT hingegen fehlt die Pseudo(E)LR (Arg¹¹, Asp⁴)-Domäne von MIF, die für die Interaktion mit CXCR2 zuständig ist. Diese Rezeptorbindung hat einen grundlegenden Einfluss auf die Rekrutierung von Monozyten und Leukozyten ⁵⁷. Aus diesem Grund wird ein geringerer Einfluss von D-DT auf die Inflammation vermutet. Im Herzen konnte bereits gezeigt werden, dass die fehlende Interaktion mit CXCR2, die von MIF ausgelöste negative, inotrope Wirkung, aufhebt ⁵⁸. Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, ob D-DT auch im pathophysiologischen Kontext der Nierenfibrose eine protektive Wirkung aufweist und als potenzieller Angriffspunkt für ein Therapeutikum betrachtet werden kann.

Dieses Kapitel diskutiert die Rolle von D-DT in der Nierenfibrose auf der Grundlage der Ergebnisse der Forschungsarbeit. Dabei werden die Hauptziele, die Lokalisierung und Regulierung von D-DT in gesundem und fibrotischem Gewebe, sowie die funktionelle Rolle von D-DT analysiert.

5.1. D-DT wird in proximalen Tubuli exprimiert

In dieser Studie konnte die hauptsächliche mRNA sowie Protein Expression von D-DT im proximalen Tubulus gesunder Mäuse und Menschen im Nierencortex nachgewiesen werden. Die identifizierte Lokalisierung stimmt mit der Expression des homologen Proteins von D-DT, MIF, überein ⁴⁸. Proximale Tubuli spielen eine wichtige Rolle bei pathologischen Prozessen der tubulointerstitiellen Fibrose ⁷¹. Des Weiteren wurde mithilfe der nierenspezifischen Einzelzell-Datensätzen die starke Expression

von D-DT im S3 des proximalen Tubulus detektiert, verglichen mit der S1 und S2 Expression. Dies kann ebenfalls mit der Rolle von D-DT in der Nierenfibrose zusammenhängen, da im S1 Segment bei einer Tubulusschädigung TNF α produziert wird und dies im S2 und S3 zu oxidativem Stress führt ⁷². Es wird vermutet, dass Stressreaktionen im Tubulus, insbesondere oxidativer Stress, an der Ausbildung einer Nierenfibrose beteiligt sind ⁷³.

Um zu überprüfen, ob D-DT an diesen pathologischen Prozessen beteiligt ist, wurde zunächst die Regulierung von D-DT in der Nierenfibrose analysiert.

5.2. Verringerte Expression von D-DT in der Nierenfibrose auf Protein und mRNA-Ebene

In fibrotischem murinem Nierengewebe wurde D-DT auf der mRNA- sowie der Protein-Ebene signifikant herunterreguliert, verglichen mit dem gesunden Kontrollgewebe. Dies wurde in den Nierenfibrose-Modellen UUO sowie I/R detektiert. Außerdem wurde im UUO-Zeitverlauf die stetige D-DT Abnahme bei zunehmender Produktion der extrazellulären Matrix und die damit verbundene zunehmende Fibrose-Progression detektiert. Darüber hinaus kann auch der Verlust der D-DT Expression nach 14 Tagen *in vitro* Kultivierung von murinen primären Tubulusepithelzellen damit in Einklang gebracht werden. Die Kultivierung von Zellen auf einer Plastikoberfläche einer Zellkultur-Flasche löst bereits aufgrund der starren Kunststoffoberflächen und der daraus resultierenden mangelnden Flexibilität der Zelle, im Vergleich zu einer natürlichen Umgebung, eine mechanische Belastung der Zelle aus ⁷⁴. Diese Belastung führt infolgedessen zu zellulären Stressreaktionen, welche wiederum zu einer Aktivierung der Zellen und zur Ausbildung eines profibrotischen Zustands führen können ^{73,74}. Ist dies der Fall, so würde die Beobachtung des Verlustes der D-DT Expression in kultivierten Zellen, der Analyse der verringerten D-DT Expression im fibrotischen Zustand entsprechen. Die *in vitro* Kultivierung von HEK293T Zellen bestätigt diese Hypothese, da die Expression des Fibrosemarkers α -SMA in den Vehikel-stimulierten Zellen mit der Dauer der Kultivierung von 24 h zu 48 h zunahm. Dies bedeutet, dass ohne die Aktivierung der Zellen durch TGF β die alleinige Kultivierung der Vehikel-stimulierten Zellen zu einer Zunahme des profibrotischen-Zustands der HEK293T Zellen führt.

In fibrotischem humanem Nierengewebe wurde D-DT auf der Protein- sowie der mRNA-Ebene ebenfalls signifikant herunterreguliert, verglichen mit dem gesunden Kontrollgewebe. Zusammengefasst führte im murinen wie auch im humanen Gewebe die ausgebildete Nierenfibrose zu einer verringerten D-DT Expression im Nierentubulus (Abbildung 39). Diese verringerte Expression von D-DT die erstmalig in fibrotischem Gewebe untersucht wurde entspricht, wie auch schon die Lokalisierung von D-DT, der Regulierung von MIF in humanem und murinem fibrotischem Nierengewebe ⁴⁸. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass MIF eine renoprotektive Wirkung in der Fibrose aufweist. Da die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass D-DT vergleichbar zu MIF exprimiert und reguliert wird, wurde nachfolgend überprüft, ob D-DT auch eine ähnliche funktionelle Rolle in der Nierenfibrose wie MIF ausübt.

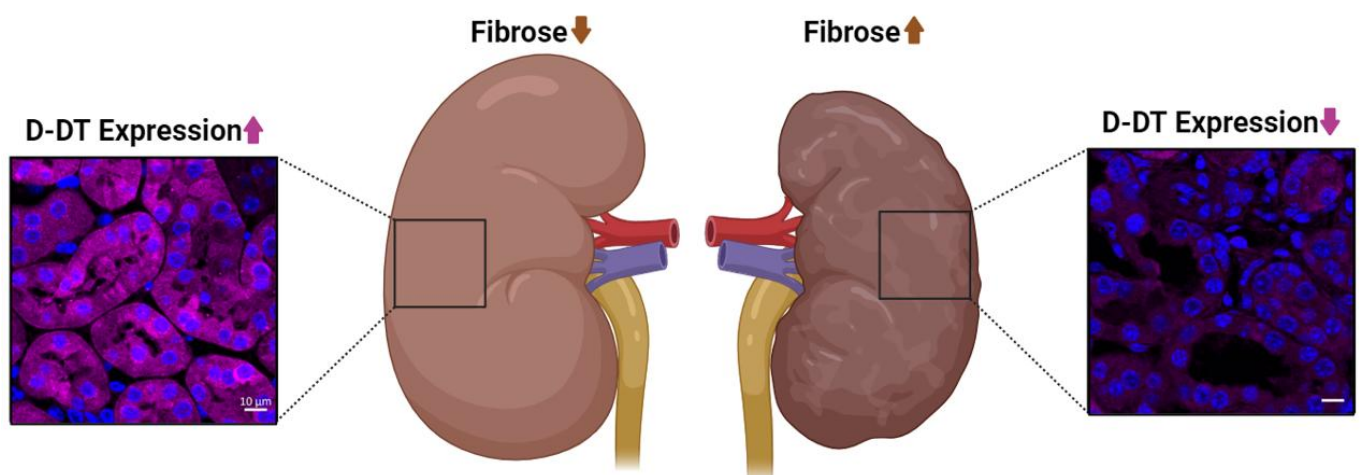


Abbildung 39: Verminderte D-DT Expression in fibrotischen Nieren.

D-DT wird in den Tubuli des Cortex der gesunden Niere exprimiert und in fibrotischem Gewebe ist diese Expression herunterreguliert. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase. (Erstellt mit Biorender.com)

5.3. D-DT spielt eine nephroprotective Rolle in der Nierenfibrose

Zur Identifikation der funktionellen Rolle von D-DT wurde zunächst das *in vivo* Nierenfibrose-Modell UUO in *Ddt*-defizienten-Mäusen durchgeführt. Zwei Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO konnte ein geringer, nicht signifikanter Rückgang der Fibrosemarker in den *Ddt*-KO Mäusen, verglichen mit den WT-Mäusen detektiert werden. Dies kann damit begründet werden, dass die Fibrose an Tag 2 noch nicht ausgeprägt ist und sich erst im späteren Verlauf die extrazelluläre Matrix stärker

entwickelt. Dieser leichte Rückgang der Fibrosemarker konnte bereits in *Mif*-KO Mäusen zwei Tage nach der UUO, verglichen mit den WT-Geschwistermäusen, identifiziert werden ⁴⁸. Jedoch wurde bereits zwei Tage nach der durchgeführten UUO in *Mif*-defizienten eine signifikant verstärkte Inflammation verglichen mit den WT-Geschwistermäusen detektiert werden ⁴⁸. Eine verstärkte Inflammationsreaktion wurde zwei Tage nach der UUO in *Ddt*-defizienten Mäusen hingegen nicht identifiziert. Dies bedeutet, dass D-DT keinen Einfluss auf die Inflammation zu nehmen scheint, jedoch sein Homolog MIF. Grundsätzlich entspricht die nicht veränderte Inflammation der allgemeinen Hypothese, dass D-DT einen geringen Einfluss auf inflammatorische Prozesse hat, aufgrund der fehlenden Pseudo(E)LR (Arg¹¹, Asp⁴)-Domäne ⁵⁷. Diese Domäne ist für die Interaktion mit dem Rezeptor CXCR2 zuständig, welcher die Rekrutierung von Monozyten und Leukozyten vermittelt ⁵⁷.

Fünf Tage nach der UUO wurde ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der Fibrosemarker Col I sowie Col III in den *Ddt*-defizienten Mäusen, verglichen mit den WT-Geschwistermäusen, detektiert. Der Fibrosemarker α -SMA zeigte hingegen keinen Unterschied zwischen den *Ddt*-defizienten Mäusen und den WT-Geschwistermäusen. Dies kann damit begründet werden, dass während der Operation dieser Mäuse die Kauterisation unzureichend funktioniert hat. Das hat wiederum dazu geführt, dass sich nur eine geringe Nierenfibrose ausgebildet hat. Dadurch kann womöglich die lediglich geringe Steigerung der Fibrosemarker erklärt werden. Im Vergleich zu Vorstudien wurde außerdem eine unerwartet hohe Varianz beider Gruppen festgestellt, ebenso ist die relative Expression der Fibrosemarker verglichen mit der kontralateralen Niere geringer als zuvor ⁴⁸. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass die Operationen, weniger gut funktioniert haben als in Vorversuchen.

Zehn Tage nach der Induktion der Fibrose durch die UUO, konnte in *Ddt*-KO-Mäusen, verglichen mit den WT-Geschwistermäusen, eine signifikant verstärkte Expression des Fibrose-Markers Col III in einer IHC-Färbung und eine signifikant stärkere α -SMA Expression in einer Western-Blot Analyse detektiert werden. Wohingegen Col I keine veränderte Expression in *Ddt*-KO Mäusen, verglichen mit den WT-Geschwistermäusen, aufwies. Col III als auch Col I wurden als die am häufigsten vorkommenden Gruppen von Kollagenen im Bindegewebe identifiziert ⁷⁵. In der interstitiellen Fibrose wurde jedoch Kollagen III als Hauptbestandteil des fibrotischen Gewebes ermittelt ⁶⁹. Dies erklärt möglicherweise die signifikante Steigerung von Col III und den nicht signifikanten Anstieg von Col I in fibrotischen *Ddt*-KO-Mäusen,

verglichen mit WT-Geschwistermäusen. Der signifikant reduziert exprimierte Differenzierungsmarker LTL in *Ddt*-defizienten Mäusen verwies auf einen reduzierten Bürstensaum in Tubulusepithelzellen. Die massive Erweiterung der Nierentubuli sowie ein Verlust der Bürstensaumstruktur der Tubulusepithelzellen sind Reaktionen infolge der UUO ⁷⁶. Der Bürstensaum ist eine hochdynamische, organisierte, spezialisierte Membran, die eine Vielzahl von Glykoproteinen erhält, die für die Funktionen der Tubulusepithelzellen erforderlich sind ⁷⁷. Daraus resultierend weist eine reduzierte LTL-Expression auf eine stärkere Schädigung der Tubuli hin, da verstärkt der Bürstensaum verloren wurde ⁷⁸. Die Inflammationsmarker zeigten keine unterschiedliche Expression zwischen *Ddt*-KO- und WT-Geschwistermäusen. Dies steht im Gegensatz zu der signifikant gesteigerten Expression der Inflammation in den homologen *Mif*-KO-Mäusen, verglichen mit den WT-Geschwistermäusen ⁴⁸. Zusammengefasst wurde festgestellt, dass *in vivo* zehn Tage nach der UUO die *Ddt*-Defizienz in einer signifikant verstärkten Produktion der extrazellulären Matrix sowie in einer verstärkten Schädigung der Tubulusepithelzellen resultierte.

Um die Ergebnisse in einem weiteren Nierenfibrose-Modell zu bestätigen, wurde die I/R durchgeführt und der Versuch wurde 14 Tage danach beendet. Im Tierversuchsantrag (81-02.04.2018.A251) wurden für dieses Versuchsvorhaben weibliche Mäuse beantragt, um die Zucht optimal auszunutzen. Im Vergleich zu männlichen Tieren weisen weibliche Mäuse eine reduzierte Fibroseausprägung auf ⁷⁹. Aufgrund dieser Tatsache wurde bereits die Zeit der durchgeführten Ischämie im Vergleich zu Männchen um fünf Minuten verlängert. Es wurde nur eine geringe Steigerung des Fibrosemarkers Col III in *Ddt*-defizienten Mäusen und WT-Geschwistermäusen verglichen mit der kontralateralen Niere festgestellt. Dies stellt einen Hinweis auf die unzureichende Funktionalität des Nierenfibrosemodells dar. Ein Grund für die abgeschwächte Fibroseausbildung ist möglicherweise, die schützende Wirkung des weiblichen Östrogens vor einer Nierenschädigung ⁸⁰. Vermutlich hat die Ischämiezeit in dem verwendeten Maushintergrund SV129 nicht ausgereicht und hätte verlängert werden müssen, um eine solide Nierenfibroseausbildung zu erhalten. Dieser Versuch sollte außerdem in männlichen Mäusen wiederholt werden. Trotz der geringeren Aussagekraft des I/R Versuches konnte durch Col III der Trend einer verstärkten Bildung von extrazellulärer Matrix in *Ddt*-defizienten Mäusen bestätigt werden.

Aufgrund der in allen Versuchen weniger stark ausgeprägten Fibrosemodelle im Vergleich zu Vorversuchen, sollte für Nierenfibrose-Versuche mit *Ddt*-KO-Mäusen die Rückkreuzung der Mauslinie auf einen C57BL/6 Maus-Hintergrund in Betracht gezogen werden, da SV129 Mäuse resistenter gegen die Ausbildung von Nierenfibrose sind als C57BL/6 Mäuse^{81,82}. Vor diesem Hintergrund ist auch zu berücksichtigen, dass der bei *Ddt*-KO-Mäusen beobachtete Effekt einer verstärkten Nierenfibrose im Vergleich zu den bereits publizierten Ergebnissen zum homologen Protein MIF deutlich abgeschwächt ausfiel⁴⁸.

Mithilfe der UUO und, im verminderten Maße, auch der I/R, wurde in *Ddt*-defizienten Mäusen eine verstärkte Nierenfibrose nachgewiesen. Die zusätzliche Intervention durch die Verabreichung von rD-DT sollte hingegen, entsprechend der Hypothese, präventiv vor der Entwicklung der Nierenfibrose schützen. Die Fibrosemarker α -SMA und Col III zeigten eine signifikant reduzierte Expression in mit rD-DT behandelten Mäusen, verglichen mit den Vehikel-behandelten Mäusen. Somit bewirkte das rD-DT eine verminderte Ausbildung der Nierenfibrose. Die nicht veränderten Inflammationsmarker deuteten erneut auf die untergeordnete Rolle von D-DT in der Inflammation hin. Vor diesem Hintergrund wurde die Frage aufgeworfen, ob MIF als funktionelles Homolog von D-DT eine kompensatorische Rolle übernimmt. Zu diesem Zweck wurden Mäuse mit tubulusepithelspezifisch (*Pax8*)-deletiertem *Ddt* und systemisch deletiertem *Mif* fünf Tage nach der Induktion der Fibrose durch die UUO analysiert. Col I und Col III wurden signifikant stärker in *Pax8Cre*⁺ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen verglichen mit den *Pax8Cre*⁻ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von *Ddt* in den Tubulusepithelzellen additive Effekte zur *Mif*-Deletion aufweist. Außerdem deutet der Versuch darauf hin, dass MIF keine kompensatorischen Effekte ausübt und die verstärkte Fibrose in *Pax8Cre*⁺ DDT-P *Mif*^{-/-} verglichen mit den *Pax8Cre*⁻ DDT-P *Mif*^{-/-} Mäusen durch die *Ddt*-Defizienz ausgelöst wurde. Die bereits formulierte These, dass MIF, D-DT wahrscheinlich nicht kompensiert, wird durch die Ergebnisse der Serum- und Gewebekonzentrations-Bestimmung von MIF in der *Ddt*-KO Studie 10 Tage nach der UUO sowie der rD-DT Interventionsstudie 5 Tage nach der UUO gestützt. Diese Ergebnisse zeigten, dass es bei einer *Ddt*-Defizienz sowie D-DT Überexpression zu keiner Veränderung der MIF-Expression kam. Dies spricht ebenfalls für eine unabhängige und nicht kompensatorische Expression von MIF.

Weiterführend wurde die Regulierung von D-DT in Abhängigkeit von MIF und CD74 überprüft. In *Mif*-defizienten Mäusen und WT-Geschwistermäusen sowie in *Cd74*-defizienten und WT-Geschwistermäusen wurden keine Unterschiede in der Expression von D-DT festgestellt. Andersherum wurden in *Ddt*-defizienten Mäusen ebenfalls keine Unterschiede in der MIF-Expression detektiert. Dies bedeutet, dass D-DT unabhängig von seinem homologen Protein oder seinem Rezeptor CD74 exprimiert wird.

Interessanterweise wurde für MIF in der Nierentumorentstehung detektiert, dass eine MIF-Inhibition in einer D-DT Kompensation resultierte ⁸³. Dies stimmt mit der signifikanten verstärkten D-DT Expression nach vorheriger MIF Inhibition durch 4-IPP überein. Es ließe sich vermuten, dass MIF den potenteren Faktor darstellt, da seine Inhibition kompensatorische Mechanismen erfordern könnte, während der Verlust von D-DT möglicherweise keiner solchen Kompensation bedarf.

Der Grund für den protektiven Effekt von D-DT in der Nierenfibrose könnte in der Proliferation von Tubulusepithelzellen begründet werden, da dies bereits für MIF gezeigt werden konnte ⁴⁸. Bereits zwei Tage nach der UUO, wurde in *Ddt*-KO Mäusen signifikant weniger proliferierende Tubulusepithelzellen hingegen signifikant verstärkt proliferierende interstitielle Zellen, wie bspw. Fibroblasten, detektiert. Deshalb wurde vermutet, dass die Verabreichung von rD-DT in der Interventionsstudie gegenteilige Ergebnisse zeigen wird. Dies konnte durch die verstärkte Proliferation von Tubulusepithelzellen sowie die verringerte Anzahl an proliferierenden interstitiellen Zellen in rD-DT behandelten Mäusen bestätigt werden. Des Weiteren konnte *in vitro* der proliferative Effekt von rD-DT in humanen Tubulusepithelzellen verifiziert werden. Dieser Effekt wurde bereits zuvor in murinen proximalen Tubulusepithelzellen nachgewiesen, einhergehend mit der Erkenntnis, dass D-DT molekulare Reaktionen auslöst, die zu einer umfassenden Regeneration der Tubulusepithelzellen führen ⁶⁸. Des Weiteren wurde MIF-CD74 bereits als wichtige Signalachse für die Regeneration der Nierentubuli identifiziert ⁸⁴. Aufgrund der starken Homologie zwischen MIF und D-DT liegt es nahe, dass dies ebenfalls auf D-DT zutrifft, und dies würde die durch D-DT ausgelöste verstärkte Proliferation von Tubulusepithelzellen untermauern. Eine proliferative Wirkung von D-DT wurde außerdem bereits in B16F10-Melanomzellen, im Alveolarepithel sowie in einer humanen Leberkrebszelllinie (HepG2) nachgewiesen ^{56,85,86}. In anderen Studien wurden indirekte Signal-Crosstalks durch Wnt/ β -Catenin zwischen Tubulusepithelzellen und interstitiellen Fibroblasten identifiziert ⁸⁷. Außerdem wird CD74 in den gesunden Tubulusepithelzellen nur schwach exprimiert, jedoch wird

die Expression in zahlreichen Nierenerkrankungen hochreguliert⁸⁸. Vergleicht man die Expression von CD74 von Tubulusepithelzellen mit Fibroblasten, so ist eine deutlich stärkere Expression von CD74 in Tubulusepithelzellen fibrotischer Nieren von Mäusen festzustellen, sodass zelltypspezifische Ligandenantworten zu erwarten sind⁸⁸. Auf der anderen Seite wird in fibrotischen Nieren von Mäusen CXCR4 in Fibroblasten deutlich stärker exprimiert als in Tubulusepithelzellen⁸⁸. Es liegt somit nahe, dass eine unterschiedliche Signaltransduktion, ein *Crosstalk* oder die unterschiedliche Expression von CD74/CXCR4 zwischen Tubulusepithelzellen und interstitiellen Zellen eine Begründung dafür bietet, dass dieselbe Rezeptorbindung von D-DT pro- oder antiproliferative Effekte haben kann.

Darüber hinaus resultierte die *Ddt*-Deletion in einer signifikant verminderten Anzahl an cl. Caspase-3 positiver Zellen. Die Behandlung von WT-Mäusen mit rD-DT, verglichen mit den Vehikel-behandelten Mäusen, zeigte keine unterschiedliche Anzahl an cl. Caspase-3 positiver Zellen. Dies liegt wohlmöglich an der großen Streuung der Vehikel-behandelten Tiere. Grundsätzlich konnte dieser Zusammenhang der verringerten Apoptose bereits in *Mif*-KO Mäusen identifiziert werden⁴⁸. Die Beseitigung irreparabel geschädigter Zellen ist die wichtigste physiologische Aufgabe der Apoptose⁴⁸.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von D-DT unabhängig von MIF zur Zunahme der Fibrose führte. Die Gabe des rD-DT resultierte in einer verringerten Fibroseausbildung und folglich kann D-DT eine nephroprotektive Rolle zugeordnet werden, die aus einer verstärkten Proliferation der Tubulusepithelzellen und einer verringerten Proliferation von interstitiellen Zellen resultiert (Abbildung 40).

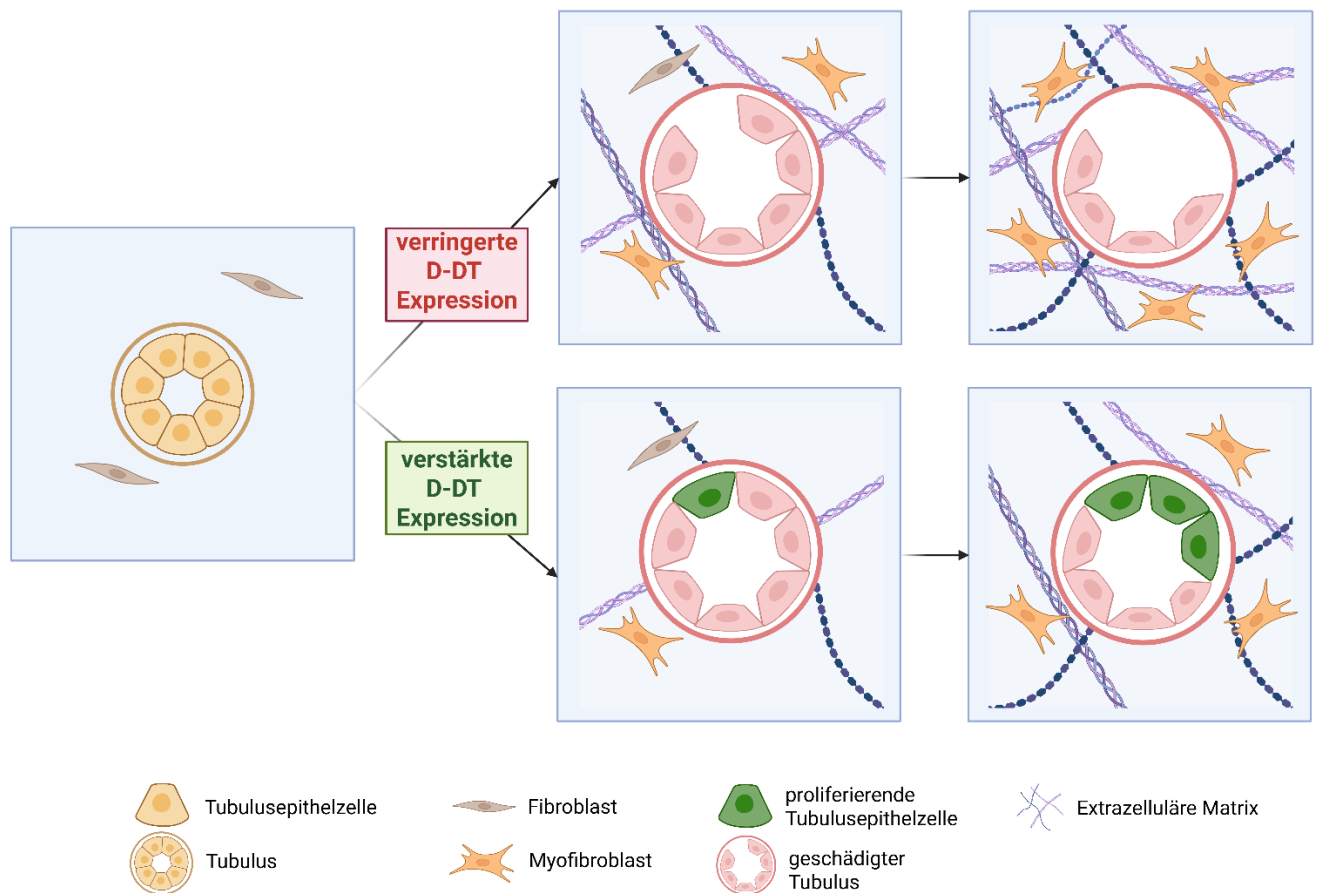


Abbildung 40: D-DT ist ein nephroprotektiver Faktor.

In der Abbildung werden zwei Szenarien (verringerte bzw. verstärkte D-DT Expression) beginnend von der physiologischen Ausgangssituation (gesunder Tubulus) aufgezeigt. Liegt eine verringerte D-DT Expression vor, so wird eine verstärkte interstitielle Fibrose ausgelöst. Hingegen resultiert die verstärkte D-DT Expression in einer verringerten interstitiellen Fibrose, welches mit der verstärkten Proliferation von Tubulusepithelzellen einhergeht.

5.4. Induktion proliferativer Signalwege durch D-DT

Zunächst konnte detektiert werden, dass die für MIF relevanten Signalwege, der MAPK/ERK- sowie der AKT-Signalweg in fibrotischem humanem Gewebe eine Rolle spielen. Dies konnte anhand von Signalproteinen des jeweiligen Signalweges ausgemacht werden. Folglich wurde in Protein-Arrays der gesamte Signalweg überprüft. Im AKT-Array wurde in mit rD-DT behandelten Mäusen GSK3a, GSK3b, PRAS40 sowie Raf-1 signifikant verstärkt exprimiert. Dies legt nahe, dass durch D-DT der AKT-Signalweg im Nierengewebe aktiviert wird. Im Einklang damit zeigte eine Publikation die Aktivierung des AKT-Signalweges durch D-DT in Kardiomyozyten sowie

Hepatozyten^{55,56}. In der Leber führte die Aktivierung des AKT-Signalweges zur Verminderung der Leberfibrose⁸⁹.

Die Signalproteine MKK3, MKK6, p53, p70S6k, HSP27, RSK1 wurden in rD-DT behandelten Mäusen, verglichen mit den Vehikel Mäusen, im MAPK-Array signifikant verstärkt exprimiert. Die Proteine ERK1/2, GSK3a sowie GSK3b zeigten außerdem einen Trend zu einer verstärkten Expression in rD-DT behandelten Mäusen. Somit konnte identifiziert werden, dass D-DT in der Aktivierung des MAPK-Signalweges im Nierengewebe resultiert. In Präadipozyten konnte die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch D-DT bereits verifiziert werden⁹⁰. Publierte Daten zeigen, dass die Inhibierung des MAPK-Signalweges die Nierenfibrose reduziert⁹¹. Dies kann damit zusammenhängen, dass der MAPK-Signalweg und insbesondere das Signalprotein ERK1/2 zur Proliferation der Zellen führt⁹². Da die verwendeten Nierengewebelysate hauptsächlich aus Tubulusepithelzellen bestehen, wird spekuliert, dass die durch D-DT ausgelöste Proliferation der Tubulusepithelzellen hauptsächlich durch die Aktivierung des AKT- sowie MAPK-Signalweges induziert wird.

Zusammengenommen legen die Daten der Studie nahe, dass D-DT in gesundem Nierengewebe in proximalen Tubuli produziert und in fibrotischem Nierengewebe signifikant verringert exprimiert wird (Abbildung 41). Außerdem kann D-DT als ein neuer endogener tubulärer nephroprotektiver Faktor angesehen werden, welcher die tubuläre Proliferation verstärkt (Abbildung 41).

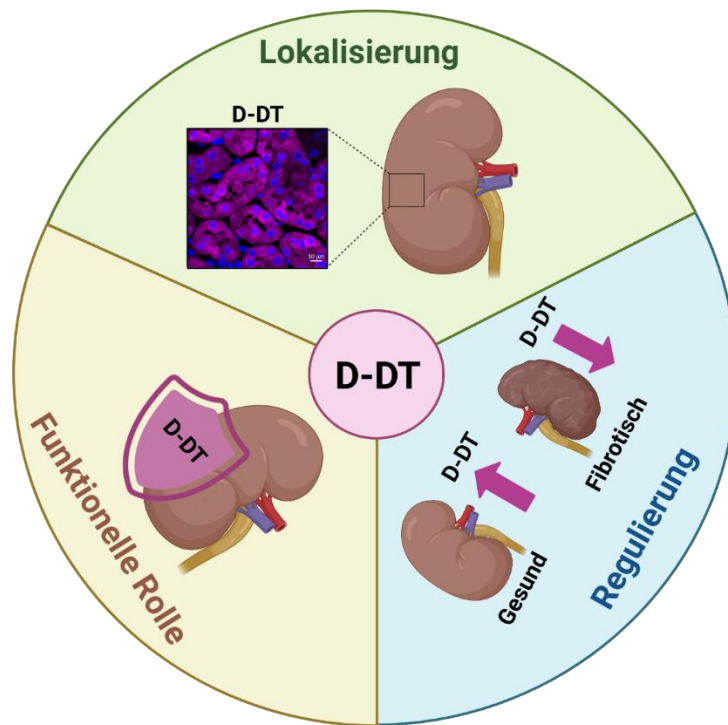


Abbildung 41: Die Rolle von D-DT in der Nierenfibrose.

In dieser Studie wurde die Lokalisierung, die Regulation und die funktionelle Rolle von D-DT in der Nierenfibrose untersucht. D-DT wird in gesunden proximalen Tubuli der Niere exprimiert und in fibrotischem Nierengewebe ist diese Expression signifikant vermindert. D-DT kann zudem eine nephroprotektive Rolle zugeordnet werden. D-DT= D-Dopachrom Tautomerase. (Erstellt mit Biorender.com)

6. Zusammenfassung

Weltweit sind mehr als 10 % der Bevölkerung von Nierenerkrankungen betroffen. Das Fortschreiten einer Nierenerkrankung führt unweigerlich zu einer Nierenfibrose. Derzeit gibt es keine zugelassenen spezifischen Therapien, nur indirekte klinische Ansätze zur Behandlung der Nierenfibrose mit nephroprotektiven Medikamenten. Über endogene Faktoren, die die Fibrose begrenzen, ist weniger bekannt. Der Makrophagen-Migrations-Inhibitionsfaktor (MIF) gilt als potenzieller Schutzfaktor, da er durch Aufhebung des Zellzyklusarrests in Tubulusepithelzellen die Regeneration geschädigter Tubuli fördert und somit fibrotischen Umbauprozessen entgegenwirken kann.

Die D-Dopachrom Tautomerase (D-DT) ist ein strukturelles und funktionelles Homolog von MIF. Über die Lokalisierung, die Regulierung und die funktionelle Rolle von D-DT in gesunden Nieren und in der Nierenfibrose ist sehr wenig bekannt. Die Expression von D-DT in gesunden Nieren und in der Nierenfibrose wurde *in vivo* in der einseitigen Ureterobstruktion (UUO) sowie in der Ischämie-Reperfusion (I/R) und in gesunden und fibrotischen Patientenbiopsien mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, RT-PCR, RNA-*in-situ*-Hybridisierung, Western Blot und Enzymimmunoassay (ELISA) untersucht. Öffentlich verfügbare Datensätze und Arrays wurden reanalysiert und durch *in-vitro*-Studien ergänzt. Die funktionelle Rolle von D-DT *in vivo* wurde in D-DT-Knockout-Mäusen (KO) im Vergleich zu Wildtyp-Wurfgeschwistern (WT) und durch Verabreichung von rekombinantem D-DT in WT-Mäusen im UUO-Modell analysiert.

Die mRNA- und Proteinexpression von D-DT wurde sowohl in gesunden Nieren von Mäusen als auch von Menschen hauptsächlich in den proximalen Tubuli lokalisiert. Die Expression war in fibrotischem Nierengewebe von Patienten und Mäusen deutlich reduziert. Eine erneute Analyse der *Ddt/DDT*-Expression in öffentlich zugänglichen Array-Daten von Mäusen und Menschen bestätigte diese Resultate zusätzlich. *In vitro* zeigten HEK293T-Zellen eine signifikant verringerte D-DT-Expression, wenn sie mit dem profibrotischen transformierenden Wachstumsfaktor- β 1 (TGF β 1) stimuliert wurden. *Ddt*-KO-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen zeigten eine signifikant verstärkte Nierenfibrose im UUO-Modell, während die Behandlung mit rekombinantem D-DT die Fibrose signifikant verbesserte. Darüber hinaus induzierte rD-DT die Proliferation der Tubulusepithelzellen.

Die Experimente deuten darauf hin, dass D-DT ähnlich wie MIF, eine schützende Rolle in der Nierenfibrose spielt. Es initiiert einen proliferativen Effekt auf Tubulusepithelzellen durch die Aktivierung des AKT- und MAPK-Signalweges. Des Weiteren wurden antiapoptotische Effekte ausgehend von D-DT festgestellt. Zusammengefasst legen die Daten der Studie nahe, dass D-DT als ein neuer endogener tubulärer nephroprotektiver Faktor angesehen werden kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Saito, S. Evaluation of cases where the right kidney is higher than the left kidney. *International Journal of Urology* **10**, 359–363 (2003).
2. Preuss, H. G. Basics of Renal Anatomy and Physiology. *Clin Lab Med* **13**, 1–11 (1993).
3. Hoy, W. E. *et al.* A stereological study of glomerular number and volume: Preliminary findings in a multiracial study of kidneys at autopsy. *Kidney Int Suppl* **63**, S31–S37 (2003).
4. He, B. *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals the mesangial identity and species diversity of glomerular cell transcriptomes. *Nature Communications* **2021 12:1** **12**, 1–19 (2021).
5. Murray, I. V. & Paolini, M. A. Histology, Kidney and Glomerulus. *StatPearls* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554544/> (2023).
6. Faivre, A. *et al.* Spatiotemporal Landscape of Kidney Tubular Responses to Glomerular Proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology* **35**, 854–869 (2024).
7. Kovesdy, C. P. Epidemiology of chronic kidney disease: an update 2022. *Kidney Int Suppl (2011)* **12**, 7 (2022).
8. Zhang, T., Widdop, R. E. & Ricardo, S. D. Transition from acute kidney injury to chronic kidney disease: mechanisms, models, and biomarkers. *Am J Physiol Renal Physiol* **327**, F788–F805 (2024).
9. Naghavi, M. *et al.* Global burden of 288 causes of death and life expectancy decomposition in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet* **403**, 2100–2132 (2024).
10. Jha, V. *et al.* Chronic kidney disease: Global dimension and perspectives. *The Lancet* **382**, 260–272 (2013).
11. Yuan, Q., Tang, B. & Zhang, C. Signaling pathways of chronic kidney diseases, implications for therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* **7**, (2022).
12. Kuppe, C. *et al.* Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature* **2020 589:7841** **589**, 281–286 (2020).
13. Zhao, W., Wang, X., Sun, K. H. & Zhou, L. α -smooth muscle actin is not a marker of fibrogenic cell activity in skeletal muscle fibrosis. *PLoS One* **13**, e0191031 (2018).

14. Huang, R., Fu, P. & Ma, L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2023 8:1 8**, 1–20 (2023).
15. García-Sánchez, O., López-Hernández, F. J. & López-Novoa, J. M. An integrative view on the role of TGF- β in the progressive tubular deletion associated with chronic kidney disease. *Kidney Int* **77**, 950–955 (2010).
16. Djurdjaj, S. & Boor, P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis. *Mol Aspects Med* **65**, 16–36 (2019).
17. Nagle, R. B., Bulger, R. E., Cutler, R. E., Jervis, H. R. & Benditt, E. P. Unilateral obstructive nephropathy in the rabbit. I. Early morphologic, physiologic, and histochemical changes. *Laboratory Investigation* **28**, 456–467 (1973).
18. Martínez-Klimova, E., Aparicio-Trejo, O. E., Tapia, E. & Pedraza-Chaverri, J. Unilateral Ureteral Obstruction as a Model to Investigate Fibrosis-Attenuating Treatments. *Biomolecules* **9**, (2019).
19. Chevalier, R. L., Thornhill, B. A., Forbes, M. S. & Kiley, S. C. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy. *Pediatric Nephrology* **25**, 687–697 (2010).
20. Chevalier, R. L., Forbes, M. S. & Thornhill, B. A. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* **75**, 1145–1152 (2009).
21. Guo, J., Wu, W., Sheng, M., Yang, S. & Tan, J. Amygdalin inhibits renal fibrosis in chronic kidney disease. *Mol Med Rep* **7**, 1453–1457 (2013).
22. Dong, Y. *et al.* Ischemic duration and frequency determines AKI-to-CKD progression monitored by dynamic changes of tubular biomarkers in IRI mice. *Front Physiol* **10**, 153 (2019).
23. Wu, M. Y. *et al.* Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry* **46**, 1650–1667 (2018).
24. Dewolf, S. E. *et al.* DAMPs Released From Injured Renal Tubular Epithelial Cells Activate Innate Immune Signals in Healthy Renal Tubular Epithelial Cells. *Transplantation* **106**, 1589–1599 (2022).
25. Cheng, Y. T., Tu, Y. C., Chou, Y. H. & Lai, C. F. Protocol for renal ischemia-reperfusion injury by flank incisions in mice. *STAR Protoc* **3**, (2022).
26. Gross, O. *et al.* Renal Protective Effects of Aliskiren Beyond Its Antihypertensive Property in a Mouse Model of Progressive Fibrosis. *Am J Hypertens* **24**, 355–361 (2011).

27. Moeller, M. J. *et al.* New Aspects of Kidney Fibrosis-From Mechanisms of Injury to Modulation of Disease. *Front Med (Lausanne)* **8**, (2022).
28. Merk, M., Mitchell, R. A., Endres, S. & Bucala, R. D-dopachrome tautomerase 1 (D-DT or MIF-2): Doubling the MIF cytokine family. *Cytokine* **59**, 10 (2012).
29. Herkens, L., Droste, P. & Boor, P. The multifaced role of the macrophage-migration-inhibitory-factor (MIF)-family in organ fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **329**, C119 (2025).
30. Bloom, B. R. & Bennett, B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* **153**, 80–82 (1966).
31. David, J. R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 72–77 (1966).
32. Brocks, T. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor protects from nonmelanoma epidermal tumors by regulating the number of antigen-presenting cells in skin. *The FASEB Journal* **31**, 526 (2016).
33. Abe, R., Shimizu, T., Ohkawara, A. & Nishihira, J. Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1500**, 1–9 (2000).
34. He, X. X. *et al.* Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis. *Gut* **55**, 797–802 (2006).
35. Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. & Bucala, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* **179**, 1895–1902 (1994).
36. Mitchell, R. A. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 345–350 (2002).
37. Leng, L. *et al.* MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. *J Exp Med* **197**, 1467 (2003).
38. Bernhagen, J. *et al.* MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* **13**, 587–596 (2007).

39. Alampour-Rajabi, S. *et al.* MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J* **29**, 4497–4511 (2015).
40. Merk, M. *et al.* The D-dopachrome tautomerase (DDT) gene product is a cytokine and functional homolog of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, E577–E585 (2011).
41. Alampour-Rajabi, S. *et al.* MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB Journal* **29**, 4497–4511 (2015).
42. Schwartz, V. *et al.* A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett* **583**, 2749–2757 (2009).
43. Amaral, F. A. *et al.* The Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Cascade of Events Leading to Reperfusion-Induced Inflammatory Injury and Lethality. *Am J Pathol* **171**, 1887–1893 (2007).
44. Rassaf, T., Weber, C. & Bernhagen, J. Macrophage migration inhibitory factor in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **102**, 321–328 (2014).
45. Heinrichs, D. *et al.* Protective role of macrophage migration inhibitory factor in nonalcoholic steatohepatitis. *The FASEB Journal* **28**, 5136–5147 (2014).
46. Heinrichs, D. *et al.* Unexpected Pro-Fibrotic Effect of MIF in Non-Alcoholic Steatohepatitis Is Linked to a Shift in NKT Cell Populations. *Cells* **2021**, Vol. 10, Page 252 **10**, 252 (2021).
47. Djudjaj, S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor mediates proliferative GN via CD74. *Journal of the American Society of Nephrology* **27**, 1650–1664 (2016).
48. Djudjaj, S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor limits renal inflammation and fibrosis by counteracting tubular cell cycle arrest. *Journal of the American Society of Nephrology* **28**, 3590–3604 (2017).
49. Burg, F. M. *et al.* Differential expression of Ia and Ia-associated invariant chain in mouse tissues after in vivo treatment with IFN-gamma. *The Journal of Immunology* **136**, 940–948 (1986).
50. Farr, L., Ghosh, S. & Moonah, S. Role of MIF Cytokine/CD74 Receptor Pathway in Protecting Against Injury and Promoting Repair. *Front Immunol* **11**, 543730 (2020).

51. Shi, X. *et al.* CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex. *Immunity* **25**, 595 (2006).
52. Odh, G., Hindemith, A., Rosengren, A. M., Rosengren, E. & Rorsman, H. Isolation of a new tautomerase monitored by the conversion of D-dopachrome to 5,6-dihydroxyindole. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 619–624 (1993).
53. Sugimoto, H. *et al.* Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry* **38**, 3268–3279 (1999).
54. Ralchev Ralchev, N. *et al.* Exploring the Role of CD74 and D-Dopachrome Tautomerase in COVID-19: Insights from Transcriptomic and Serum Analyses. *J Clin Med* **12**, 5037 (2023).
55. Bounkari, E. *et al.* MIF-2/D-DT is an atypical atherogenic chemokine that promotes advanced atherosclerosis and hepatic lipogenesis. *bioRxiv* 2021.12.28.474328 (2021) doi:10.1101/2021.12.28.474328.
56. Song, S. *et al.* D-dopachrome tautomerase contributes to lung epithelial repair via atypical chemokine receptor 3-dependent Akt signaling. *EBioMedicine* **68**, (2021).
57. Illescas, O., Pacheco-Fernández, T., Laclette, J. P., Rodriguez, T. & Rodriguez-Sosa, M. Immune modulation by the macrophage migration inhibitory factor (MIF) family: D-dopachrome tautomerase (DDT) is not (always) a backup system. *Cytokine* **133**, 155121 (2020).
58. Weber, C. *et al.* Structural determinants of MIF functions in CXCR2-mediated inflammatory and atherogenic leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 16278–16283 (2008).
59. Alaskarov, A., Barel, S., Bakavayev, S., Kahn, J. & Israelson, A. MIF homolog d-dopachrome tautomerase (D-DT/MIF-2) does not inhibit accumulation and toxicity of misfolded SOD1. *Scientific Reports* 2022 12:1 **12**, 1–13 (2022).
60. Kim, B. S. *et al.* D-dopachrome tautomerase in adipose tissue inflammation and wound repair. *J Cell Mol Med* **21**, 35 (2017).
61. Rajasekaran, D. *et al.* Targeting distinct tautomerase sites of D-DT and MIF with a single molecule for inhibition of neutrophil lung recruitment. *The FASEB Journal* **28**, 4961 (2014).

62. Tilstam, P. V. *et al.* A selective small-molecule inhibitor of macrophage migration inhibitory factor-2 (MIF-2), a MIF cytokine superfamily member, inhibits MIF-2 biological activity. *J Biol Chem* **294**, 18522 (2019).
63. Pantouris, G., Bucala, R. & Lolis, E. J. Structural Plasticity in the C-Terminal Region of Macrophage Migration Inhibitory Factor-2 Is Associated with an Induced Fit Mechanism for a Selective Inhibitor. *Biochemistry* **57**, 3599 (2018).
64. Parkins, A. *et al.* Ligand-induced conformational changes enable intersubunit communications in D-dopachrome tautomerase. *Biophys J* **122**, 1268 (2023).
65. Tanese, K. & Ogata, D. The role of macrophage migration inhibitory factor family and CD74 in the pathogenesis of melanoma. *Exp Dermatol* **33**, e15122 (2024).
66. Qi, D. *et al.* The vestigial enzyme D-dopachrome tautomerase protects the heart against ischemic injury. *J Clin Invest* **124**, 3540 (2014).
67. Ma, Y. *et al.* Cardiomyocyte d-dopachrome tautomerase protects against heart failure. *JCI Insight* **4**, (2019).
68. Ochi, A. *et al.* MIF-2/D-DT enhances proximal tubular cell regeneration through SLPI- and ATF4-dependent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* **313**, F767 (2017).
69. Genovese, F. *et al.* Imbalanced turnover of collagen type III is associated with disease progression and mortality in high-risk chronic kidney disease patients. *Clin Kidney J* **14**, 593 (2020).
70. Herkens, L., Droste, P. & Boor, P. The multifaced role of the macrophage migration inhibitory factor family in organ fibrosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **329**, C119–C135 (2025).
71. Nakajima, H. *et al.* Gene expression profile of renal proximal tubules regulated by proteinuria. *Kidney Int* **61**, 1577–1587 (2002).
72. Kalakeche, R. *et al.* Endotoxin Uptake by S1 Proximal Tubular Segment Causes Oxidative Stress in the Downstream S2 Segment. *J Am Soc Nephrol* **22**, 1505 (2011).
73. Patera, F., Gatticchi, L., Cellini, B., Chiasserini, D. & Reboldi, G. Kidney Fibrosis and Oxidative Stress: From Molecular Pathways to New Pharmacological Opportunities. *Biomolecules* **14**, 137 (2024).
74. Zeiger, A. S., Hinton, B. & Van Vliet, K. J. Why the dish makes a difference: Quantitative comparison of polystyrene culture surfaces. *Acta Biomater* **9**, 7354–7361 (2013).

75. Rasmussen, D. G. K. *et al.* Collagen turnover profiles in chronic kidney disease. *Scientific Reports* 2019 9:1 **9**, 1–11 (2019).
76. Xu, H. *et al.* Blocking connexin 43 and its promotion of ATP release from renal tubular epithelial cells ameliorates renal fibrosis. *Cell Death Dis* **13**, 511 (2022).
77. Yu, A. *et al.* Changes in the expression of renal brush border membrane n-glycome in model rats with chronic kidney diseases. *Biomolecules* **11**, (2021).
78. Gurung, R. L. *et al.* Association of leukocyte telomere length with chronic kidney disease in East Asians with type 2 diabetes: a Mendelian randomization study. *Clin Kidney J* **14**, 2371 (2021).
79. Aufhauser, D. D. *et al.* Improved renal ischemia tolerance in females influences kidney transplantation outcomes. *J Clin Invest* **126**, 1968–1977 (2016).
80. Soljancic, A. *et al.* Protective role of testosterone in ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **304**, R951–R958 (2013).
81. Walkin, L. *et al.* The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review. *Fibrogenesis Tissue Repair* **6**, 18 (2013).
82. Djurdjaj, S. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor limits renal inflammation and fibrosis by counteracting tubular cell cycle arrest. *Journal of the American Society of Nephrology* **28**, 3590–3604 (2017).
83. Pasupuleti, V. *et al.* Dysregulated D-dopachrome Tautomerase, a Hypoxia-inducible Factor-dependent Gene, Cooperates with Macrophage Migration Inhibitory Factor in Renal Tumorigenesis. *J Biol Chem* **289**, 3713 (2013).
84. Shachar, I. An essential MIF-CD74 signaling axis in kidney tubular regeneration, with prospects for precision medicine and pharmacological augmentation. *Am J Physiol Renal Physiol* **313**, F1084–F1086 (2017).
85. Kobold, S. *et al.* The macrophage migration inhibitory factor (MIF)-homologue D-dopachrome tautomerase is a therapeutic target in a murine melanoma model. *Oncotarget* **5**, 103 (2013).
86. TAKAHASHI, A., IWATA, T. & YAMASHITA, K. Knockdown of D-dopachrome Tautomerase Inhibits Cell Proliferation in Human HepG2 Cell Line. *Anticancer Res* **41**, 4077–4082 (2021).
87. Tan, R. J., Zhou, D. & Liu, Y. Signaling Crosstalk between Tubular Epithelial Cells and Interstitial Fibroblasts after Kidney Injury. *Kidney Diseases* **2**, 136 (2016).

88. Wu, H., Kirita, Y., Donnelly, E. L. & Humphreys, B. D. Advantages of Single-Nucleus over Single-Cell RNA Sequencing of Adult Kidney: Rare Cell Types and Novel Cell States Revealed in Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* **30**, 23–32 (2019).
89. Shamsan, E. *et al.* The role of PI3k/AKT signaling pathway in attenuating liver fibrosis: a comprehensive review. *Front Med (Lausanne)* **11**, 1389329 (2024).
90. Ishimoto, K. *et al.* D-dopachrome tautomerase promotes IL-6 expression and inhibits adipogenesis in preadipocytes. *Cytokine* **60**, 772–777 (2012).
91. Sugiyama, N., Kohno, M. & Yokoyama, T. Inhibition of the p38 MAPK pathway ameliorates renal fibrosis in an NPHP2 mouse model. *Nephrol Dial Transplant* **27**, 1351–1358 (2012).
92. Sun, Y. *et al.* Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct Res* **35**, 600–604 (2015).

8. Anhang

8.1. Appendix

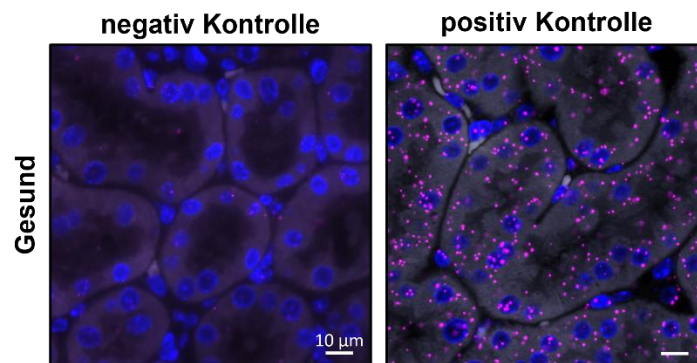


Abbildung 42: Negativ- und Positivkontrolle der *Ddt*-RNA *In Situ* Hybridisierung.

Die Kontrolle der RNA *In Situ* Hybridisierung zur Detektion von *Ddt*, wurde in gesundem Gewebe durchgeführt. Es wurden repräsentative Bilder des gesunden Tubulointerstitiums gezeigt. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 10 µm entspricht.

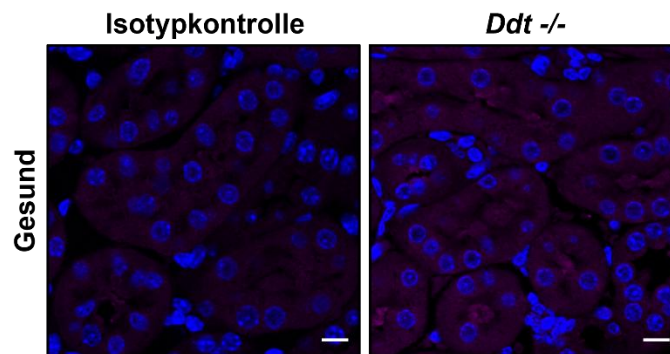


Abbildung 43: Immunfluoreszenzkontrollen: Isotypkontrolle sowie *Ddt*-KO.

Die Kontrolle der Immunfluoreszenz zur Detektion von D-DT, wurde in gesundem Gewebe durchgeführt. Es wurden repräsentative Bilder des gesunden Tubulointerstitiums gezeigt. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 10 µm entspricht.

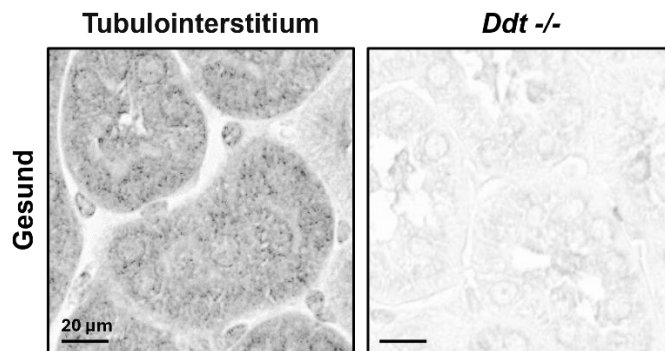


Abbildung 44: Immunhistochemie-Kontrolle: *Ddt*-KO.

Die Kontrolle der Immunhistochemie zur Detektion von D-DT, wurde in gesundem Gewebe durchgeführt. Es wurden repräsentative Bilder des gesunden Tubulointerstitiums gezeigt. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 20 µm entspricht.

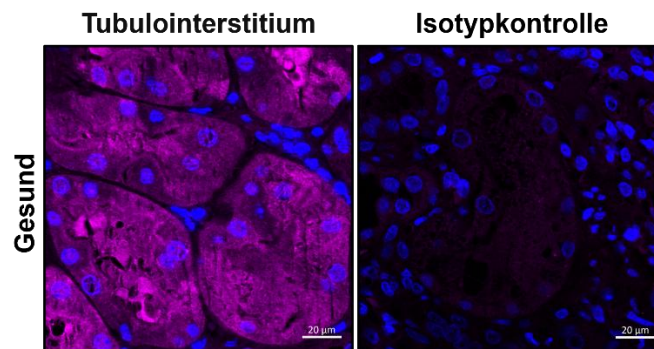


Abbildung 45: Immunfluoreszenz-Kontrolle: Humanes gesundes Gewebe sowie die Isotypkontrolle.

Die Kontrolle der Immunfluoreszenz zur Detektion von D-DT, wurde in gesundem Gewebe durchgeführt. Es wurden repräsentative Bilder des gesunden Tubulointerstitiums gezeigt. In jedem Bild ist ein Maßstabsbalken abgebildet, welcher der Größe von 20 µm entspricht.

AKT-Array

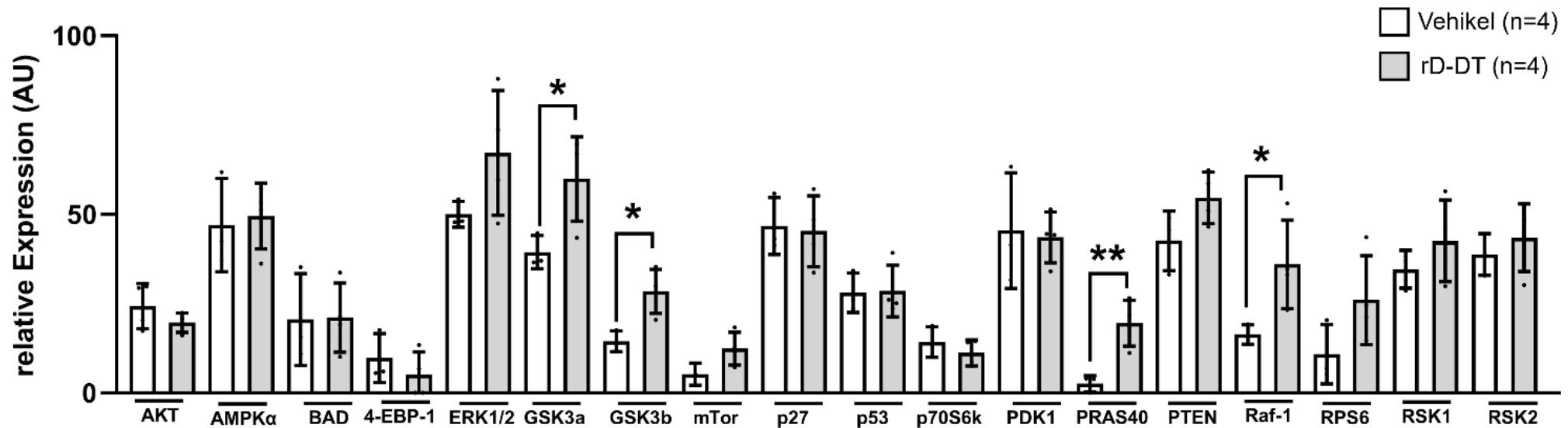


Abbildung 46: Hochregulierung des AKT-Signalweges in rD-DT behandelten Mäusen.

Verglichen wurden verschiedene Signalproteine des AKT-Signalweges mit Hilfe des AKT-Arrays in Vehikel- (n=4) und rD-DT behandelten Mäusen (n=4) 5 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UUO. Aufgetragen wurde jeweils die relative Expression. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der Vehikel behandelten Mäuse mit der Expression der mit rD-DT behandelten Mäuse. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$. AKT= Proteinkinase B; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

MAPK-Array

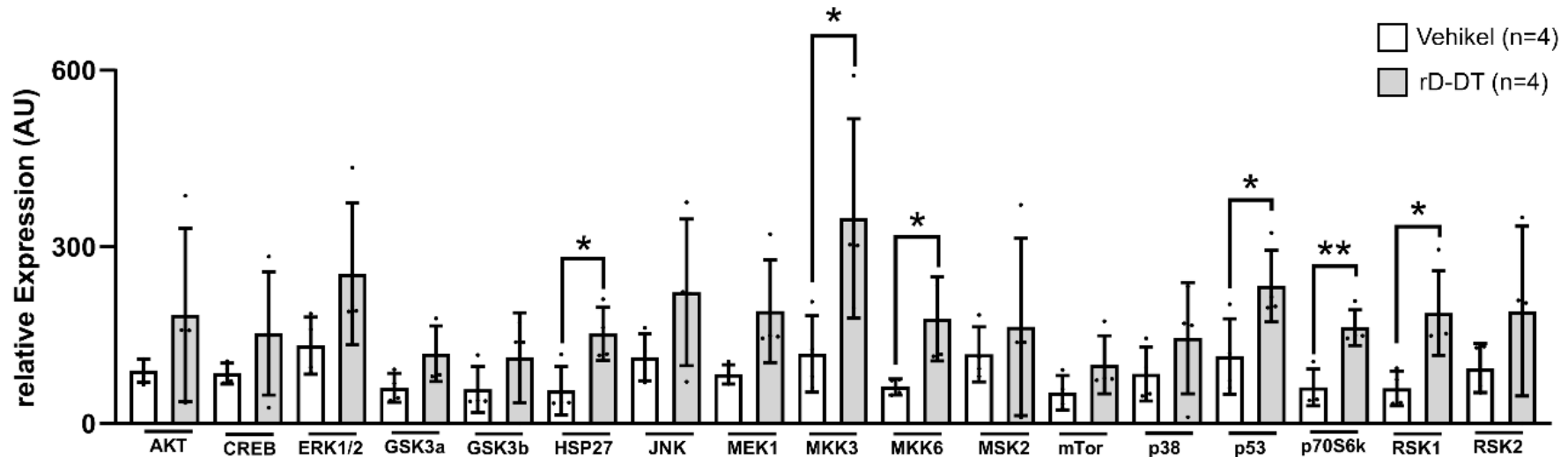


Abbildung 47: Hochregulierung des MAPK-Signalweges in rD-DT behandelten Mäusen.

Verglichen wurden verschiedene Signalproteine des ERK/MAPK-Signalweges mit Hilfe des MAPK-Arrays in Vehikel- (n=4) und rD-DT behandelten Mäusen (n=4) 5 Tage nach der Fibrose-Induktion durch die UO. Aufgetragen wurde jeweils die relative Expression. Es wurden die einzelnen Datenpunkte sowie die entsprechenden Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Als statistischer Test wurde der t-Test genutzt, verglichen wurde die Expression der Vehikel behandelten Mäuse mit der Expression der mit rD-DT behandelten Mäuse. * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$. MAPK= Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinasen; AU= willkürliche Einheit (*arbitrary unit*).

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Nephrons mit dem angeschlossenen Tubulussystem.	2
Abbildung 2: Die Entwicklung der interstitiellen Nierenfibrose.	5
Abbildung 3: Übersicht über die in vivo Nierenfibrose-Modelle UUO sowie I/R.	8
Abbildung 4: Die Interaktionen von MIF und D-DT.	15
Abbildung 5: D-DT Expression in gesundem murinem Nierencortex.	57
Abbildung 6: D-DT Expression in CD13 ⁺ -proximalen Tubuli des murinen Nierengewebes.	59
Abbildung 7: D-DT Expression in gesundem humanem Gewebe.	61
Abbildung 8: D-DT Expression in CD13 ⁺ -proximalen Tubuli des humanen Nierencortex.	63
Abbildung 9: Stetig verringerte D-DT Expression im Verlauf der ansteigenden murinen Nierenfibrose.	64
Abbildung 10: Verringerte murine D-DT Expression bei zunehmender Nierenfibrose.	66
Abbildung 11: Expression des 13 kDa großen D-DTs nach der primären Kultivierung muriner Tubulusepithelzellen nicht detektierbar.	67
Abbildung 12: Verringerte D-DT Expression in humanem fibrotischem Gewebe.	68
Abbildung 13: Verringerte D-DT Expression in TGF β 1-stimulierten HEK293T Zellen.	69
Abbildung 14: Verringerte Ddt-Expression in murinen fibrotischen Nieren.	70
Abbildung 15: Verringerte Ddt-Expression in proximalen Tubulusepithelzellen in fibrotischem Gewebe.	71
Abbildung 16: Rückgang der Ddt mRNA Expression in fibrotischem Gewebe.	72
Abbildung 17: Verringerte Ddt-Expression in der Nierenfibroseprogression.	73
Abbildung 18: Verringerte DDT-Expression in humanen fibrotischen Nierenbiopsien.	74
Abbildung 19: Rückgang der DDT-Expression in humanem fibrotischem Gewebe. ...	74
Abbildung 20: Schwach verringerte Fibrose in Ddt-defizienten Mäusen zwei Tage nach der UUO.	77
Abbildung 21: Schwach angestiegene Fibrose in Ddt-defizienten Mäusen fünf Tage nach der UUO.	78

Abbildung 22: Verstärkte Col III Expression sowie reduzierte LTL Expression in Ddt-defizienten Mäusen zehn Tage nach der UUO.	80
Abbildung 23: Signifikant erhöhte α -SMA Expression in Ddt-defizienten Mäusen.	81
Abbildung 24: Schwach angestiegene Fibrose in Ddt-defizienten Mäusen 14 Tage nach der I/R.....	82
Abbildung 25: Verstärkte Fibrose und verminderte Integrität des Bürstensaums der Tubuli in Mäusen mit Tubulusepithelzellspezifisch-deletiertem Ddt und systemisch-deletiertem Mif, fünf Tage nach der UUO.....	84
Abbildung 26: Verringerte Fibrose in mit rD-DT behandelten Mäusen fünf Tage nach der UUO.	86
Abbildung 27: Keine unterschiedliche α -SMA Expression zwischen Vehikel behandelten und rD-DT behandelten Mäusen.....	87
Abbildung 28: 4-IPP bewirkt eine signifikant verstärkte D-DT Expression.	88
Abbildung 29: Verringerte Anzahl BrdU positiver Tubulusepithelzellen in Ddt-defizienten Mäusen.....	90
Abbildung 30: D-DT verstärkt die Proliferation der Tubulusepithelzellen.	91
Abbildung 31: rD-DT induziert die Proliferation der humanen Tubulusepithelzellen in vitro.....	92
Abbildung 32: Ddt-defiziente Mäuse zeigten eine verminderte Anzahl apoptotischer cl. Caspase-3 ⁺ -Tubulusepithelzellen nach der UUO.	93
Abbildung 33: D-DT Expression von MIF und CD74 unabhängig.....	95
Abbildung 34: MIF wird unabhängig von D-DT exprimiert.	96
Abbildung 35: MAPK/ERK sowie AMPK sind wichtige Signalwege von MIF.....	98
Abbildung 36: Der MAPK/ERK-Signalweg spielt in fibrotischem humanem Nierengewebe eine funktionelle Rolle.....	99
Abbildung 37: Der AMPK α -Signalweg spielt in fibrotischem humanem Nierengewebe eine funktionelle Rolle.....	100
Abbildung 38: Hochregulierung einiger AKT- sowie MAPK-Signalproteine in mit rD-DT behandelten Mäusen.	102
Abbildung 39: Verminderte D-DT Expression in fibrotischen Nieren.....	106
Abbildung 40: D-DT ist ein nephroprotektiver Faktor.	112
Abbildung 41: Die Rolle von D-DT in der Nierenfibrose.....	114
Abbildung 42: Negativ- und Positivkontrolle der Ddt-RNA In Situ Hybridisierung.	124
Abbildung 43: Immunfluoreszenzkontrollen: Isotypkontrolle sowie Ddt-KO.....	124

Abbildung 44: Immunhistochemie-Kontrolle: Ddt-KO.....	125
Abbildung 45: Immunfluoreszenz-Kontrolle: Humanes gesundes Gewebe sowie die Isotypkontrolle.	125
Abbildung 46: Hochregulierung des AKT-Signalweges in rD-DT behandelten Mäusen.	126
Abbildung 47: Hochregulierung des MAPK-Signalweges in rD-DT behandelten Mäusen.....	127

8.3. Abkürzungsverzeichnis

-/-	<i>Knockout</i>
+/+	Wildtyp
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
4-CPPC	4-(3-Carboxyphenyl)-2,5-Pyridindicarboxylsäure
4-IPP	4-Iodo-6-Phenylpyrimidin
AE	unerwünschten Ereignissen
AKI	<i>Acute kidney injury</i>
AKT	Proteinkinase B
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATF	Aktivierender-Transkriptionsfaktor
AU	willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster der Differenzierung
cDNA	komplementäre DNA
CKD	<i>Chronic kidney disease</i>
cl. Caspase-3	gespaltene Caspase-3
Col	Kollagen
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptoren
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol-Dihydrochlorid
D-DT	D-Dopachrom Tautomerase
D-DTL	D-Dopachrom Tautomerase- <i>like</i>
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR6	Todesrezeptor 6
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycolbis(aminoethylether
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	Extrazellulärsignal-regulierte Kinase
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
et al	<i>at alia</i>
EtOH	Ethanol
EZM	extrazellulärer Bindegewebsmatrix
FKS	Fetales Kälberserum
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
g	relative Zentrifugalbeschleunigung

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GEO	<i>Genome Expression Omnibus</i>
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
HCl	Salzsäure
HEK	humane embryonale Nierenzellen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
Hh	<i>Hedgehog</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP27	Hitzeschock-Protein 27
i.p.	intraperitoneal
I/R	ischämische Reperfusion
IF	Immunfluoreszenz
IGFBP	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor-bindendes Protein
IHC	Immunhistochemie
IZKF	Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung
ka	Assoziationsrate
kd	Dissoziationsrate
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ki-67	Kiel-Antigen 67
KIT	<i>Kidney Interactive Transcriptomics</i>
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LTL	Lotus tetragonolobus lectin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor
min	Minute
mind.	mindestens
M-MLV	<i>Moloney-Monkey Leukemia Virus</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
mTOR	mechanistisches Ziel von Rapamycin
NaCH ₃ COO	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NF-κB	Kappa-Leichtketten-Verstärker von aktivierten B-Zellen
NH ₃	Ammoniak
ns	nicht signifikant
OP	Operation

p27Kip1	CDK-Inhibitors 1B
PAS	Perjodsäure-Schiffsches-Reagenz
PAS	Perjodsäure-Schiffsches-Reagenz
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGFR	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PEC	parietalen Epithelzellen
pmTECs	primären murinen Tubulusepithelzellen
PRAS40	Prolin-reiches AKT Substrat mit einem Molekulargewicht von 40 kDa
PTEC	proximalen Tubulusepithelzellen
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
r	rekombinant
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Raf-1	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
RFU	relativen Fluoreszenzeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region von Interesse
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
RSK1	ribosomale S6 Kinase 1
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real time</i> Polymerasen Kettenreaktion
S	Segment
s	löslich
s.c.	subkutan
SAE	schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen
SASP	Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
SLPI	Sekretorische-Leukozyten-Protease-Inhibitor
SOX	<i>Sex Determining Region Y (SRY)-box</i>
t	Tag
TCA	Trichloressigsäure
TGFβ	transformierender Wachstumsfaktor-β
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL R2	Apoptose-induzierender Ligand-Rezeptor 2
TVA	Tierversuchsantrag
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
VCAM	vaskulär Zelladhäsionsmolekül
Wnt	<i>Wingless-Int</i>
WT	Wildtyp
α-SMA	α-Glattnuskel-Aktin

8.4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An allererster Stelle danke ich meiner Doktormutter PD Dr. Sonja Djudjaj. Liebe Sonja, ich danke dir für deine fachliche Unterstützung, deine geduldige Betreuung und dein offenes Ohr in Höhen und Tiefen. Durch dich habe ich D-DT und die benötigten Methoden kennengelernt. Du hast mir jedoch nicht nur wissenschaftlich den Weg gewiesen, sondern mir auch gezeigt, wie wichtig Leidenschaft und Genauigkeit in der Forschung sind. Für deine Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Ralph Panstruga für die bereitwillige Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit sowie für die damit verbundene Zeit und Mühe.

Meinen Kolleg/innen im Institut für Pathologie, insbesondere der Nephropathologie, danke ich für die gute Zusammenarbeit, spannende Diskussionen und vor allem für die unzähligen Momente, in denen wir zusammen gelacht haben. Ihr habt die langen Tage sehr viel schöner gemacht. Liebe Cherelle, ich möchte dir ganz besonders danken. Mittlerweile bist du eine meiner engsten Freundinnen und ich danke dir für deine fachliche und persönliche Hilfe. Auch dein geheimer Milchmäuschen-Vorrat konnte meine Laune schnell heben.

Besonders dankbar bin ich meinen Freunden. Ihr habt mich daran erinnert, dass es ein Leben außerhalb des Labors gibt. Ihr habt mich aufgefangen, wenn es mal nicht rund lief, und mich gefeiert, wenn es etwas zu feiern gab. Jeder Spieleabend, jedes Essen oder jeder Urlaub mit euch hat mir viel Kraft gegeben.

Mein größter Dank gilt meiner Familie. Liebe Mama, lieber Papa, lieber Tim, ihr habt mich all die Jahre über ermutigt, meinen Weg zu gehen. Ohne eure Unterstützung und Liebe hätte ich diese Arbeit nicht schreiben können. Vielen Dank, dass ihr mir immer Halt gebt.

Lieber Paul, ohne dich hätte diese Arbeit nicht nur viel mehr Rechtschreibfehler, sondern sie hätte es zum Teil wahrscheinlich auch nicht gegeben. Du hast mich immer unterstützt, ob an den Wochenenden oder in Nachtschichten, und ich konnte immer auf dich zählen. Natürlich gilt ein großer Dank auch Tito, der mir dabei geholfen hat, meinem Stress „wegzulaufen“ und sein Freudentanz jedes Tief beseitigte.

Diese Dissertation ist deshalb nicht nur mein Werk, sondern auch ein Stück von Euch allen.

8.5. Eidesstattliche Erklärung

Lea Herkens

erklärt hiermit, dass diese Dissertation und die darin dargelegten Inhalte die eigenen sind und selbstständig, als Ergebnis der eigenen originären Forschung, generiert wurden. Hiermit erkläre ich an Eides statt

1. Diese Arbeit wurde vollständig oder größtenteils in der Phase als Doktorand dieser Fakultät und Universität angefertigt;
2. Sofern irgendein Bestandteil dieser Dissertation zuvor für einen akademischen Abschluss oder eine andere Qualifikation an dieser oder einer anderen Institution verwendet wurde, wurde dies klar angezeigt;
3. Wenn immer andere eigene- oder Veröffentlichungen Dritter herangezogen wurden, wurden diese klar benannt;
4. Wenn aus anderen eigenen- oder Veröffentlichungen Dritter zitiert wurde, wurde stets die Quelle hierfür angegeben. Diese Dissertation ist vollständig meine eigene Arbeit, mit der Ausnahme solcher Zitate;
5. Alle wesentlichen Quellen von Unterstützung wurden benannt;
6. Wenn immer ein Teil dieser Dissertation auf der Zusammenarbeit mit anderen basiert, wurde von mir klar gekennzeichnet, was von anderen und was von mir selbst erarbeitet wurde;
7. Ein Teil oder Teile dieser Arbeit wurden zuvor veröffentlicht, und zwar in:
Herkens L, et al. The role of D-dopachrome Tautomerase (Macrophage Migration Inhibitory Factor 2) in Kidney Fibrosis: SA-OR23. Journal of the American Society of Nephrology 2024, doi: 10.1681/ASN.2024psth7b5p

Datum

Unterschrift