

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg



**Der Einfluss des TM-PC-Systems auf die Regeneration des tubulären Kompartiments in Folge einer
akuten Schädigung bei vorbestehender diabetischer Nierenerkrankung**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Lukas Breitenstein
aus	Beckendorf-Neindorf
Magdeburg	2021

Bibliographische Beschreibung:

Breitenstein, Lukas:

Der Einfluss des TM-PC-Systems auf die Regeneration des tubulären Kompartiments in Folge einer akuten Schädigung bei vorbestehender diabetischer Nierenerkrankung – 2021. 60 Blätter, 16 Abb., 10 Tab., 45 Ref.

Kurzreferat:

Die Zahl der Patienten, die an Diabetes mellitus (DM) leiden, wächst von Jahr zu Jahr. Bisher etablierte Therapien der Folgeerkrankungen, wie der diabetischen Nephropathie (dNP), zielen auf eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufs ab. Allerdings entstehen durch vaskuläre und mitochondriale Dysfunktionen sowie eine vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) maladaptive Veränderungen, die eine vorzeitige stressbedingte Seneszenz verbunden mit einer verminderten Zellplastizität hervorrufen. In diesem Zusammenhang kommt es zu einer vermehrten Expression von p53 und p21, die einen Zellzyklusarrest induzieren und ein proinflammatorisches und profibrotisches Milieu schaffen. Dadurch sind Patienten im Rahmen der chronischen Nierenerkrankung prädisponiert für einen schweren Krankheitsverlauf nach akuten Nierenschädigungen (AKI). Daraus resultiert ein häufigerer Einsatz von Nierenersatzverfahren sowie eine erhöhte Mortalität. Wir stellen die Hypothese auf, dass diese gesteigerte Vulnerabilität durch eine Beeinträchtigung des Thrombomodulin (TM)-Protein C (PC)-Systems begünstigt wird. Im Kontext der dNP kommt es zu einem Verlust endothelialen TM, wodurch die Konzentration des aktivierten Protein C (aPC) sinkt. Dieses besitzt neben seiner antikoagulatorischen Wirkung auch zytoprotektive Eigenschaften. Wir zeigen, dass eine Anhebung der aPC-Konzentration den p21-induzierten Zellzyklusarrest sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufheben und eine Regenerationsfähigkeit der Nierentubuluszellen wiederherstellen kann. Dabei erhöht das aPC die Proliferationskapazität des tubulären Kompartiments und verbessert Parameter der Nierenfunktion. Diese Arbeit zeigt, dass die Vorbehandlung mit aPC die Regenerationsfähigkeit tubulärer Nierenzellen verbessern und den Schweregrad einer AKI reduzieren kann und somit Potential besitzt, als Prophylaxe für chronisch nierenkranke Risikopatienten zum Einsatz zu kommen.

Schlüsselwörter

Diabetes mellitus (DM) – Diabetische Nephropathie (dNP) – Akute Nierenschädigung (AKI) – Thrombomodulin-Protein C-System (TM-PC-System) – Aktiviertes Protein C (aPC) – p21 – Seneszenz

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	7
2. Material und Methoden.....	20
2.1. Material.....	20
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.2. Geräte.....	21
2.1.3. Antikörper.....	22
2.1.4. Maus- und Zelllinien.....	22
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Zellkultur.....	23
2.2.2. Immunoblot.....	25
2.2.3. Immunfluoreszenzfärbung (Zellen).....	26
2.2.4. STZ-Injektion und aPC-Behandlung.....	27
2.2.5. Ischemia-Reperfusion-Injury der Niere <i>in vivo</i>	28
2.2.6. Terminale Organentnahme.....	29
2.2.7. Isolierung primärer Tubuluszellen.....	29
2.2.8. ELISA (Urin- und Blutproben) zur Bestimmung funktioneller Nierenparameter.....	30
2.2.9. Immunfluoreszenzfärbung (Gewebe).....	30
2.2.10. Immunhistochemische Färbung.....	31
2.2.11. PAS-Färbung.....	32
2.2.12. Colony-formation Assay.....	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1. Regeneration von Tubuluszellen infolge einer akuten Schädigung durch Hypoxie.....	33
3.2. aPC verbessert die Regenerationsfähigkeit bei persistierender Hyperglykämie <i>in vitro</i>	37
3.3. aPC reduziert die Nierenzellschädigung durch Verminderung der DDR.....	40
3.4. aPC wirkt protektiv bei akuter Schädigung und vorhandener dNP <i>in vivo</i>	42
4. Diskussion.....	50
5. Zusammenfassung.....	54
6. Literaturverzeichnis.....	55
7. Danksagungen.....	58
8. Ehrenerklärung.....	59
9. Lebenslauf.....	60

Abkürzungsverzeichnis

AGE	Advanced Glycation Endproducts
AKI	Acute kidney injury
ANV	Akutes Nierenversagen
aPC	Aktiviertes Protein C
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
BUMPTs	Boston University mouse proximal tubule cells
BUN	Blood urea nitrogen
CDK	Cyclin dependent kinase
CFA	Colony-formation Assay
CKD	Chronic kidney disease
DAB	3,3' Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA-Damage-Response
DIMDI	Deutschen Instituts für Medizinische Dokumentation und Information
DM	Diabetes mellitus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNP	Diabetische Nephropathie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EPCR	Endothelialer Protein C Rezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT-4	Glukosetransporter Typ 4
H	Hypoxie
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HG	Hyperglykämie
HPF	Hauptgesichtsfeld
H/R	Hypoxie/Reperfusion
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IF	Immunfluoreszenz
i.p.	Intraperitoneal

IRI	Ischemia Reperfusion Injury
ITS	Insulin-Transferrin-Selen Medium
KCM	Kidney Culture Medium
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KIM-1	Kidney injury molecule-1
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
NG	Normoglykämie
NGAL	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin
ns	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PBS(T)	Phosphatgepufferte Salzlösung (mit Tween20)
PC	Protein C
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PTC	Primäre Tubuluszellen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Reperfusion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RB-Protein	Retinoblastom-Protein
rhEGF	Rekombinanter humaner epithelialer Wachstumsfaktor
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Puffer
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SASP	Seneszenz assoziierten sekretorischen Phänotyps
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGLT-2	Sodium dependent glucose co-transporter 2
STC	Scattered tubular cells
STZ	Streptozotocin
TGF- β	Transforming growth factor- β
TM	Thrombomodulin
TM-PC-System	Thrombomodulin-Protein C-System
UACR	Albumin-Kreatinin-Verhältnis im Urin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie.....	10
Abbildung 2:	Mechanismen der DDR führen zu zellulärer Seneszenz.....	12
Abbildung 3:	Potentielle Mechanismen der erhöhten Vulnerabilität und schlechteren Regenerationsfähigkeit infolge einer AKI bei Patienten mit CKD	16
Abbildung 4:	Aktivierung des PC und verschiedene aPC-vermittelte Effekte.....	17
Abbildung 5:	Physiologischer Regenerationsprozess von PTC nach H/R.....	34
Abbildung 6:	Physiologischer Regenerationsprozess <i>in vivo</i> nach IRI.....	36
Abbildung 7:	aPC verbessert die unter HG reduzierte Regenerationsfähigkeit nach H/R in BUMPTs.....	38
Abbildung 8:	aPC hebt <i>in vitro</i> den p21-induzierten Zellzyklusarrest auf.....	40
Abbildung 9:	aPC reduziert oxidative DNA-Schäden bei H/R und HG.....	41
Abbildung 10:	Induktion eines diabetischen Phänotyps und IRI für die <i>in vivo</i> Untersuchung.....	43
Abbildung 11:	aPC vermindert Gewebsschäden infolge einer bei dNP schwereren Ischämie.....	45
Abbildung 12:	aPC reduziert die IRI-induzierte p21-Expression der Niere <i>in vivo</i>	46
Abbildung 13:	Funktionelle Beeinträchtigung des Nierenparenchyms wird durch aPC reduziert.....	47
Abbildung 14:	Regenerationsfähigkeit des tubulären Systems nach IRI wird durch aPC verbessert...	48
Abbildung 15:	aPC induziert eine Koloniebildung nach IRI.....	49
Abbildung 16:	Schema zur Darstellung der Kontextabhängigen p21-Expression.....	52
Tabelle 1:	Chemikalien und Reagenzien.....	20
Tabelle 2:	Geräte.....	21
Tabelle 3:	Antikörper.....	22
Tabelle 4:	Zellkulturmedium für primäre Tubuluszellen.....	23
Tabelle 5:	Zellkulturmedium für primäre BUMPT-Zellen.....	24
Tabelle 6:	Herstellung des RIPA Puffers.....	25
Tabelle 7:	Herstellung der Polyacrylamidgele.....	26
Tabelle 8:	Puffer und Lösungen für den Immunoblot.....	26
Tabelle 9:	Insulinschema.....	28
Tabelle 10:	Schema zur Rehydrierung (bzw. Dehydrierung) der Gewebeschnitte.....	30

1. Einleitung

Diabetes Mellitus

Die weltweite Zunahme des Diabetes mellitus (DM) und seiner Folgeerkrankungen stellt sowohl für die Patienten als auch für das Gesundheitssystem eine große Belastung dar. Laut Angaben der *International Diabetes Federation* (IDF) aus dem Jahr 2019 leiden ca. 463 Millionen (= 9,3%) Erwachsene im Alter von 20 - 79 Jahren an DM. Sollte sich der Trend der letzten Jahre fortsetzen, würde nach Schätzung der IDF die Zahl der Erkrankten bis zum Jahr 2045 auf 700 Millionen steigen (1). Diese Entwicklung verdeutlicht den dringenden Bedarf neuer und innovativer Forschungsansätze in Bezug auf die Therapie und Prävention des DM und seiner Folgeerscheinungen wie der diabetischen Nephropathie (dNP). Bei der dNP handelt es sich um eine Nierenerkrankung, die im Rahmen des DM auftritt und mit einer Abnahme der Nierenfunktion einhergeht (2). Die dNP besitzt eine große klinische Relevanz, denn sie stellt die häufigste Ursache für die Entwicklung einer terminale Niereninsuffizienz in den westlichen Industriestaaten dar. Verglichen mit gesunden Menschen weisen DM-Patienten eine zehnfach höhere Prävalenz für das Auftreten einer terminale Niereninsuffizienz auf (1). Damit einhergehend nehmen das Risiko für ein akutes Nierenversagen (ANV) im Krankheitsverlauf, die dauerhafte Abhängigkeit von Nierenersatzverfahren sowie die Mortalitätsrate zu (3).

Der Begriff DM fasst eine Gruppe von Stoffwechselstörungen zusammen, die durch verschiedene Pathomechanismen eine chronisch progressive Erkrankung hervorrufen, welche sich durch erhöhte Blutzuckerspiegel auszeichnet. Ursächlich hierfür sind eine verminderte Insulinsekretion, eine erhöhte Insulinresistenz oder eine Kombination beider Störungen (4). Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas gebildet und nimmt als anaboles Hormon Einfluss auf verschiedene Stoffwechselwege. Außerdem vermittelt es einen antiglykämischen Effekt durch die Translokation von Glucosetransportern (GLUT-4) in die Zellmembran und sorgt somit entscheidend für die Aufrechterhaltung der physiologischen Glukosekonzentration im Blut.

Man unterscheidet auf Grundlage der Pathomechanismen einen DM Typ 1 und einen Typ 2 sowie weitere Sonderformen. Beim DM Typ 1 sind Autoantikörper mit einer Zerstörung der Insulinsekretierenden β -Zellen in den Inseln des Pankreas assoziiert. Diese Erkrankung tritt meist bereits im Kindes- oder Jugendalter auf. Beim DM Typ 2 liegt zunächst eine Insulinresistenz vor, die kompensatorisch zu einer Hyperinsulinämie führt. Im Verlauf können die β -Zellen eine suffiziente Insulinsekretion nicht aufrechterhalten und es entsteht die charakteristische diabetische Stoffwechsellage. Ein entscheidender Risikofaktor für die Manifestation eines DM Typ 2 ist das Vorliegen eines metabolischen Syndroms. Zusätzlich abzugrenzen sind der DM Typ 3, bei dem es aus verschiedenen Gründen zu einer eingeschränkten Funktion des endokrinen Pankreas kommt (z.B. MODY, medikamenteninduziert, postinfektiös, etc.) und der DM Typ 4, der im Rahmen einer

Schwangerschaft auftreten kann (Gestationsdiabetes; 5). Betrachtet man die Statistik in Deutschland, so weisen mindestens 6,9 Mio. Menschen einen DM Typ 2 und 32.000 Kinder und Jugendliche sowie 340.000 Erwachsene einen DM Typ 1 auf. Dabei wird die Belastung für das Gesundheitssystem deutlich, berücksichtigt man die fast doppelt so hohen Gesundheitskosten bei Patienten mit diagnostiziertem DM im Gegensatz zu vergleichbaren Personen ohne eine Diabeteserkrankung. Laut DIMDI (Deutsches Institut für Medizinische Dokumentation und Information) Daten beliefen sich dabei die Kosten für die medizinische Behandlung des DM in Deutschland im Jahr 2010 auf ca. 16,1 Mrd. €, was in etwa 10% der gesamten Ausgaben der Krankenversicherungen entspricht. Vordergründig sind dabei die Behandlung der Langzeitfolgen des DM (6). Aufgrund der persistierenden Hyperglykämie (HG) besitzen Patienten mit DM ein erhöhtes Risiko für atherosklerotische Ablagerungen. Solche makrovaskulären Veränderungen können zu cerebralen oder kardialen Ischämien führen und tragen maßgeblich zur erhöhten Mortalität im Vergleich zur gesunden Bevölkerung bei (4). Zusätzlich treten mikrovaskuläre Komplikationen in mehreren Organsystemen auf. Neben der diabetischen Retinopathie und Neuropathie ist besonders die dNP hervorzuheben.

Diabetische Nephropathie (dNP)

Die Niere ist ein zentrales Organ unseres Stoffwechsels und essentiell für die Aufrechterhaltung der Homöostase. Zum einen sorgt die Niere für die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen (z.B. Ammoniak, Harnstoff, Pharmaka) und Rückresorption von essentiellen Stoffwechselprodukten (z.B. Glukose, Aminosäuren). Zum anderen fungiert die Niere als endokrines Organ im Vitamin-D-Haushalt und bildet Erythropoetin für die Erythropoese. Außerdem spielt sie eine entscheidende Rolle in der Regulierung des Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalts. Daraus resultierend nimmt die Niere Einfluss auf den Flüssigkeitshaushalt und die Blutdruckregulation. Sie filtert täglich ungefähr 150 Liter Plasmavolumen, das durch Rückresorption und Sekretion zum Endharn konzentriert wird. Dabei stellt das Nephron die kleinste funktionelle Einheit dar und besteht seinerseits aus Glomerulus und dem dazugehörigen Tubulussystem, welches sich aus dem proximalen Tubulus, der Henle-Schleife und dem distalen Tubulus, der in das Sammelrohr übergeht, zusammensetzt. Die proximalen Tubulusepithelzellen machen den Großteil des renalen Cortex aus und weisen die stärkste Resorptionsleistung auf. Diese Funktionen sind mit einem hohen Energiebedarf assoziiert, was sich in einer hohen Anzahl an Mitochondrien und einem aeroben Stoffwechsel in den proximalen Tubuluszellen widerspiegelt. Daraus ergibt sich allerdings die besonders hohe Anfälligkeit gegenüber verschiedener Noxen wie einer Ischämie (7, 8). Insbesondere ist dabei die *Pars recta* des proximalen Tubulus am Übergang zur Henle-Schleife (S3 Segment) betroffen. Dieser Abschnitt ist in höchstem Maße metabolisch aktiv und benötigt demzufolge ausreichend Sauerstoff. Jedoch findet sich in diesem Bereich eher eine geringe basale Sauerstoffversorgung, woraus eine höhere Vulnerabilität resultiert (9). Im Falle einer Schädigung

verfügt das tubuläre Kompartiment zwar über ein hohes Maß an Regenerationsfähigkeit, allerdings ist diese begrenzt und abhängig von Stärke und Dauer der Schädigung (10). Von immer größer werdender Relevanz ist hierbei auch die Zunahme chronischer Nierenerkrankungen wie beispielsweise der dNP, die die Vulnerabilität für eine akute Schädigung deutlich erhöht (3).

Verschiedene Signalkaskaden und pathologische Mechanismen führen zur Ausbildung der dNP. Dazu zählen unter anderem hämodynamische und hormonelle Veränderungen, eine erhöhte Zahl glykierter Stoffwechselprodukte (*AGE, Advanced Glycation Endproducts*) und die vermehrte Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wodurch im Gesamtkontext die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und eine verstärkte Inflammation hervorgerufen werden (2, 11). Diese Prozesse führen bei ungefähr 20 - 40% der Patienten mit DM Typ 1 und 2 zu einer dNP, wobei die höchste Inzidenz im Zeitraum zwischen 10 - 20 Jahren nach Erstdiagnose liegt. (12). Eine besondere Schwierigkeit stellt der langsam progrediente Verlauf der Erkrankung sowie das Fehlen von klinisch etablierten Biomarkern in den frühen Erkrankungsstadien dar. Während bereits histopathologische Veränderungen beobachtet werden können, treten die typischen klinischen Symptome der Proteinurie und der abnehmenden Nierenfunktion erst verzögert auf. Diese Beobachtung spiegelt sich in der Stadieneinteilung nach Mogensen wider. Im Stadium der Hyperfiltration (Stadium I) und der Normoalbuminurie (Stadium II) finden sich zwar bereits pathologische Veränderungen, allerdings ist die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) noch normwertig bis mäßig eingeschränkt (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, KDOQI* Stadien I und II). Deshalb ist die regelmäßige diagnostische Evaluierung der Nierenfunktion (z.B. GFR, Kreatinin) und des Urinstatus (z.B. Albuminurie) entscheidend, um möglichst frühzeitig eine dNP zu erkennen (13). Darüber hinaus könnte die Einführung potentieller Biomarker wie des *kidney injury molecule-1* (KIM-1) oder des *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) zur Früherkennung der dNP beitragen (14). Eine konsequente Blutzuckereinstellung und antihypertensive Therapie mit ACE-Inhibitoren in frühen Stadien sind entscheidend für die Verlangsamung einer Progression der dNP und für das Verhindern von Komplikationen (2).

Der Pathomechanismus der dNP stellt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren dar und ist nicht vollständig aufgeklärt. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass neben einer Schädigung der Nierenglomeruli auch eine Schädigung der proximalen Tubuluszellen eine wichtige Rolle spielt. Letztere werden besonders früh von erhöhten Glucosekonzentrationen beeinflusst, denn sie besitzen eine hohe transzelluläre Glukosetransportrate, die auch entscheidende intrazelluläre Auswirkungen hat. Zunächst entsteht eine zelluläre Hypertrophie, die mit einer verstärkten Translokation von Natrium-abhängigen Glukosetransportern (SGLT-2) einhergeht, um die pathologisch erhöhte Glukosekonzentration im Harn durch tubuläre Rückresorption zu reduzieren. Die gleichzeitig verstärkte Natrium- und Chloridresorption wird durch die *Macula densa* registriert und induziert über tubuloglomeruläre Feedbackmechanismen eine Steigerung der GFR. Dies sorgt temporär für eine

glomeruläre Hyperfiltration. Erwähnenswert sind hierbei Erfolge aktueller Studien, die durch die medikamentöse Hemmung mittels SGLT-2-Inhibitoren langfristig eine Nephroprotektion nachweisen konnten und so die Relevanz dieses Mechanismus hervorheben (15). Im Rahmen der glomerulären Hyperfiltration werden Mediatoren ausgeschüttet, die zu einer Dilatation in den *Vasa afferentia* (NO; insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1, IGF-1; vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, VEGF) und einer Konstriktion in den *Vasa efferentia* (Angiotensin II) führen, wodurch der Druck in den Kapillaren der Glomeruli steigt und eine glomeruläre Hypertension entsteht (11, 16).

Die Blut-Harn-Schranke der Glomeruli besteht aus einem fenestrierten Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran sowie den Podozyten. Sie zeichnet sich durch eine mechanische Selektivität sowie anionische Proteine auf den Zelloberflächen (Glykokalix) aus. Unter physiologischen Bedingungen stellen die Kapillaren der Nierenkörperchen eine größen- und ladungsspezifische Filtrationsbarriere dar und hindern negativ geladene Proteine wie Albumin weitestgehend an einer Filtration aus dem Blut in den Primärharn. Durch die glomeruläre Hyperfiltration und Hypertension ist diese Barriere jedoch in ihrer Funktion eingeschränkt. Zusätzlich kann eine HG die Glykokalix der Zellmembranen verändern, sodass die negative Ladung der glomerulären Kapillarendothelzellen und Podozyten vermindert und so die Blut-Harn-Schranke durchlässiger wird. Bei geringen Mengen filtrierte Albumins wird dieses in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen und abgebaut. Überschreitet die Menge des filtrierte Albumins die Abbaukapazität des tubulären Kompartiments, so lässt sich diese im Urin zunächst als Mikro- (30 - 300 mg/ 24 h Urin) und im späteren Verlauf als Makroalbuminurie (>300 mg/ 24 h) (Stadium III / IV nach Mogensen) nachweisen. Dieser klinische Befund markiert einen wichtigen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf des DM und der dNP, denn mit dem Auftreten einer Albuminurie steigt das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen. Die Aufnahme des Albumins in die proximalen Tubuluszellen induziert unter anderem eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. *Transforming growth factor – β*, TGF-β). In der Folge kommt es zu einer vermehrten Zellinfiltration und es wird zunehmend extrazelluläre Matrix (EZM) gebildet, wodurch letztendlich eine tubulointerstitielle Fibrose entsteht (11, 17).

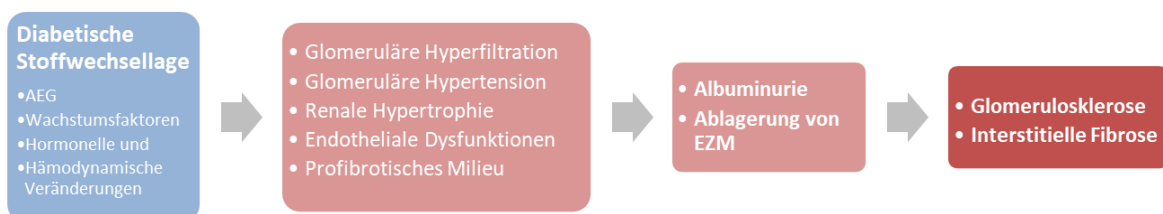


Abbildung 1: **Pathophysiologie der diabetischen Nephropathie**
(Modifizierte Abbildung: Umanath, Lewis 2018 – Update on Diabetic Nephropathy) (2)

Schematische Darstellung der Auswirkungen des diabetischen Milieus. Verschiedene Aspekte führen letztendlich zu einer Glomerulosklerose und interstitiellen Fibrose, die zusammen zu einer progredienten Abnahme der Nierenfunktion führen.

All diese Faktoren führen im weiteren Krankheitsverlauf zu spezifischen histopathologischen Gewebeveränderungen wie der pathognomonischen nodulären Sklerose der Glomeruli im Sinne eines Morbus Kimmelstiel-Wilsons, die allerdings nur in 10 - 50% der Fälle nachgewiesen werden kann. Weitere histologische Korrelate sind diffuse glomeruläre Läsionen und eine Verdickung der Basalmembran, eine Mesangiolyse, interstitielle Läsionen mit Zellinfiltration, Fibrose und tubuläre Atrophie sowie vaskuläre Veränderungen wie eine Hyalinose (2, 13). Insgesamt erhöhen diese Veränderungen nicht nur das Risiko für DM-Patienten eine chronische Niereninsuffizienz zu entwickeln, sondern steigern auch die Vulnerabilität des Gewebes für akute, nierenschädigende Ereignisse (AKI). Ein zentraler Aspekt der AKI bei vorbestehender chronischer Nierenerkrankung (z.B. dNP) ist die abnehmende Zellplastizität des tubulären Kompartiments. Diese geht mit einer eingeschränkten Proliferation der Tubuluszellen durch die Induktion eines Zellzyklusarrests einher und reduziert die regenerative Kapazität des tubulären Systems (9, 18).

Einfluss der DNA-Damage-Response (DDR) auf den Zellzyklus

Verschiedene Stimuli, wie zum Beispiel eine Ischämie oder vermehrte ROS-Bildung, induzieren durch unterschiedliche Mechanismen DNA-Schädigungen. Infolgedessen werden komplexe intrazelluläre Reaktionen zur DNA-Reparatur aktiviert, die unter dem Begriff der *DNA-Damage-Response* (DDR) zusammengefasst werden. Eine entscheidende Rolle in der Initiierung der DDR spielt dabei die Histonvariante H2AX. Finden sich infolge schädigender Einflüsse Doppelstrangbrüche im genetischen Material, so kommt es zu einer Phosphorylierung des Histons zum γ -H2AX. Dieses markiert beschädigtes Chromatin und ist Erkennungsstelle für Proteine der DNA-Reparatur sowie Checkpoint-Proteine (z.B. p53), die in diesem Zusammenhang durch eine Phosphorylierung aktiviert werden und inhibierend auf den Zellzyklus wirken (19). Es kommt unter anderem zur Translokation von p53 aus dem Zytoplasma in den Nukleus. Hier fungiert p53 als Transkriptionsfaktor und induziert unter anderem die Transkription von p21. Das p21 ist ein 20 kDa schweres Protein, welches aus 164 Aminosäuren besteht und als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) fungiert. Es hemmt die Zellteilung und weist dabei verschiedene Wirkungsmechanismen auf: Im Zellkern bindet und inhibiert es nach DNA-Schädigung unter anderem die CDK1 sowie CDK2 und verhindert somit den Übergang von der G1- in die S-Phase durch Bindung des hypophosphorylierten Retinoblastom-Proteins (RB-Protein) an E2F. Dies ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden, bevor eine Zellteilung stattfindet. Eine andere Wirkungsebene ist die Interaktion mit dem *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA). Dieses Protein ist ein Cofaktor der DNA-Polymerasen δ und η , die sowohl für die DNA-Replikation als auch -Reparatur verantwortlich sind. Es dient als Marker für Zellen in der S-Phase des Zellzyklus. Der Effekt des p21 beruht auf der Bindung an den Bereich des PCNA, welcher mit der DNA interagiert. Somit wird deutlich, dass das p21 entscheidenden Einfluss auf Reparatur und Replikation des genetischen Materials ausübt.

Darüber hinaus wird p21 eine essentielle Rolle in der Induktion von Zellalterungsprozessen (Seneszenz) zugeschrieben (Abb. 2). Außerdem wird eine Blockade der Progression von Zellen aus der G2-Phase in die Mitose beschrieben. Hierbei hat vor allem die Inhibierung der CDK1 eine wichtige Bedeutung. Die Eigenschaften von p21 sind somit als kontextabhängig anzusehen und werden durch das Ausmaß der DNA-Schädigung mitbestimmt.

Zellen sind bestrebt DNA-Schäden zu beheben, um die Entstehung von Genominstabilität oder kanzerogenen Sequenzen zu verhindern. Ein Zellzyklusarrest, wie er durch p21 induziert wird, ermöglicht dabei Reparaturmechanismen zu initiieren. Nehmen die Schäden allerdings ein irreparables Ausmaß an, so wird in den meisten Fällen eine Apoptose induziert. Jedoch gibt es auch Zellen, in denen es infolge der DNA-Schädigung zu einem dauerhaften Zellzyklusarrest kommt. Dieser Zustand wird als Stress-induzierte vorzeitige Seneszenz bezeichnet (18).

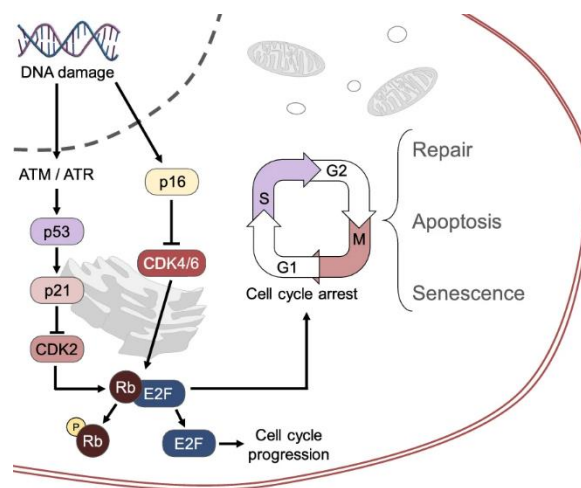


Abbildung 2: **Mechanismen der DDR führen zu zellulärer Seneszenz (Amaya-Montoya, Pérez-Londoño et al. 2020 – Cellular Senescence as a Therapeutic) (20)**

Während einer normalen Zellteilung kommt es im Verlauf der G1-Phase des Zellzyklus zu einer Phosphorylierung des RB-Proteins unter anderem durch die CDK2. Eine suffiziente Phosphorylierung des RB-Proteins ermöglicht die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, der seinerseits wichtige Gene für die S-Phase transkribiert, in der die Replikation der DNA stattfindet. Die DDR führt über die Aktivierung von p53/p21 (sowie p16) zu einem Zellzyklusarrest und zu zellulärer Seneszenz.

Auch im Rahmen der dNP können DNA-Schäden durch die Interaktion von ROS und DNA entstehen und zur Ausbildung einer vorzeitigen Seneszenz führen. Charakteristische Merkmale des Seneszenzphänotyps sind die Zunahme des proinflammatorischen Milieus und der Fibrose, indem Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrix gebildet werden (2, 21). Deshalb hat sich der Begriff des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP), der zur sterilen Entzündung beiträgt,

etabliert (22). Insgesamt schränken diese Veränderungen die Zellplastizität sowie die Proliferationskapazität der Zellen ein.

Im Zustand der Homöostase ist die basale Zellproliferationsrate in der Niere eher gering (23). Unter physiologischen Bedingungen besitzen die Niere und insbesondere die proximalen Tubuluszellen jedoch eine beachtliche Regenerationsfähigkeit, die infolge einer akuten Schädigung aktiviert werden kann. Die physiologischen Regenerationsprozesse im Rahmen einer akuten Nierenschädigung sind in den letzten Jahren Bestandteil verschiedener Studien gewesen. Dabei gibt es unterschiedliche Meinungen zum Ursprung der Regenerationsfähigkeit. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass das tubuläre Kompartiment einen entscheidenden Beitrag dazu leistet (8, 10, 24). Es gibt Hinweise darauf, dass der Ursprung der Regeneration nicht von interstitiellen oder zirkulierenden Stammzellen, sondern aus dem tubulären Kompartiment selbst stammt (10). Jedoch halten die Diskussionen in Fachkreisen an und es werden verschiedene Thesen verfolgt. In der Literatur werden die Zellen, die zur Regeneration beitragen, als *scattered tubular cells* (STC) bezeichnet. STC stellen allerdings keine präformierte Zellpopulation dar, sondern viel mehr geht man von einem speziellen Phänotyp aus, der bei Gewebsschädigung von den Tubuluszellen angenommen und im gesunden Nierengewebe nicht nachgewiesen werden kann (8, 24). Unter physiologischen Verhältnissen teilen sich proximale Tubuluszellen und bleiben dabei vollständig differenziert. Im Gegensatz dazu konnte den STC ein antiapoptotischer, regenerativer Phänotyp zugeschrieben werden, der sich durch eine partielle und temporäre Dedifferenzierung sowie genetische Reprogrammierung auszeichnet. Zusätzlich konnten in Oberflächenanalysen verschiedene Marker nachgewiesen werden, die diesen Phänotyp widerspiegeln. Dabei handelt es sich unter anderem um Vimentin, KIM-1 und Ki-67 (8, 10, 25). Verschiedene Studien zeigen, dass Tubuluszellen, die solche STC-Marker exprimieren, vermehrt Bromdesoxyuridin (BrdU) aufnehmen. Dies deutet auf eine erhöhte Zellteilungsrate hin, die Teil der vermehrten Regenerationsfähigkeit sein könnte.

Des Weiteren konnten stammzellähnliche Eigenschaften nachgewiesen werden. In der einfachen Zellkultur zeigen sich sowohl eine bessere Oberflächenadhäsion als auch eine höhere Neigung, Zellkolonien auszubilden verglichen mit normalen Tubuluszellen. Die Bildung von Zellkolonien spiegelt eine gesteigerte Proliferation wieder, was als ein wesentliches Charakteristikum von Stammzellen oder Zellen mit Stammzellpotential gilt und in der Kultur (*in vitro*) durch die Ausbildung von kugeligen Zellverbänden im Matrigel quantifiziert werden kann (8). Aufgrund eigener Ergebnisse und der vorhandenen Studienlage haben wir im vorliegenden Projekt die Hypothese aufgestellt, dass die endogene Reparatursfähigkeit der Niere im Kontext eines DM vermindert und somit die Regenerationsfähigkeit nach einer akuten Nierenschädigung, z.B. nach Ischämie-Reperfusionsschädigung, beeinträchtigt ist.

Ischemia-Reperfusion-Injury bei vorbestehender chronischer Nierenerkrankung (CKD)

Das ANV ist eine ebenso häufige wie lebensbedrohliche Komplikation im klinischen Alltag, deren zunehmendes Auftreten auf die Altersstruktur unserer Gesellschaft und die zunehmende Prävalenz chronischer Nierenerkrankungen (CKD) zurückzuführen ist. Dabei handelt es sich um ein Syndrom unterschiedlicher Genese, welches sich durch eine rasche Abnahme der Nierenfunktion auszeichnet. Charakteristische Veränderungen zeigen sich in einer verminderten glomerulären Filtrationsrate und erhöhten Retentionsparametern im Blut (Kreatinin, Blut-Harnstoff-Stickstoff) (9, 25). Laut den Diagnosekriterien der KDIGO liegt ein ANV vor, wenn mind. eines der folgenden Kriterien erfüllt ist: Ein Anstieg des Serumkreatinins um $\geq 0,3$ mg/dL (26,5 $\mu\text{mol/L}$) beziehungsweise ein Anstieg des Serumkreatinins auf das $\geq 1,5$ -Fache innerhalb von 48 Stunden oder eine neu aufgetretene Reduktion der Urinmenge $< 0,5$ mL/kgKG/h über 6 Stunden (26). Unglücklicherweise ist das ANV trotz vorhandener Therapiemöglichkeiten in Form einer Akutdialyse nach wie vor mit einer hohen Mortalität verbunden. Eine akute Nierenschädigung tritt in Folge verschiedener Mechanismen auf. Hierzu zählen das Auftreten ischämischer Ereignisse wie septische Krankheitsbilder mit kreislaufrelevanter Schocksymptomatik oder Operationen, die durch temporäre Ischämien das Nierengewebe schädigen. Des Weiteren tragen das Applizieren von Kontrastmittel bei bildgebenden Verfahren oder die Gabe nephrotoxischer Medikamente zur steigenden Prävalenz bei. In vielen Fällen des ANV handelt es sich um eine Ischämie-Reperfusionsschädigung, englisch *Ischemia-Reperfusion-Injury* (IRI).

Die IRI beschreibt ein vorübergehendes Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -versorgung eines Gewebes mit nachfolgender Wiederherstellung der physiologischen Blutversorgung und der Gefahr einer irreversiblen Gewebsschädigung. Hierbei verursacht die transiente Ischämie des Nierengewebes bei akuter Minderdurchblutung eine Schädigung der Nierentubuli, die sowohl zur Nekrose und Apoptose der Tubuluszellen führt als auch die Bildung von ROS sowie proinflammatorischen und profibrotischen Zytokinen fördert (9, 27). Abhängig von der Regenerationsfähigkeit des tubulären Kompartiments ist entweder eine vollständige Defektheilung oder eine unvollständige Regeneration mit der Entwicklung einer akuten beziehungsweise im späteren Verlauf einer chronischen Nierenerkrankung möglich. In Folge der AKI kommt es zunächst zu einer tubulären Obstruktion. Diese entsteht aufgrund einer Ansammlung von Proteinen und zellulären Fragmenten im Inneren des Tubulussystems. Abhängig vom Schweregrad der Nierenschädigung werden mehr oder weniger Nephrone in ihrer Funktion beeinträchtigt, wodurch eine vorübergehende Nierenfunktionsstörung im Sinne einer reduzierten GFR beobachtet werden kann. KIM-1 ist ein Phosphatidylserin-Rezeptor, der im Fall einer Schädigung der proximalen Tubuluszellen vermehrt exprimiert wird und seinerseits apoptotische Zellen und zelluläre Fragmente bindet, um so eine

Obstruktion des Tubuluslumens zu verhindern. Im Verlauf des Regenerationsprozesses wird der Zellschutt im Inneren der Tubuli von Makrophagen und Tubuluszellen selbst beseitigt.

Die überlebenden proximalen Tubuluszellen durchlaufen einen Reparaturprozess, der durch Dedifferenzierung und Proliferation gekennzeichnet ist und seinen Höhepunkt nach 48 Stunden erreicht. Es zeigt sich ein verändertes Transkriptionsmuster im Verlauf der Regeneration, welches zu diesem Zeitpunkt in vollem Ausmaß zum Tragen kommt. Nach 14 Tagen ist der Regenerationsprozess abgeschlossen und das Transkriptionsmuster wird an den Ausgangszustand angepasst. Zellen, die sich zu diesem Zeitpunkt noch in einem dedifferenzierten Zustand befinden, spiegeln eine gescheiterte Defektheilung wider (8–10).

Im Gegensatz zu diesem physiologischen Reparaturmechanismus kommt es bei der akuten auf chronischen Nierenschädigung zu maladapten Veränderungen, die gravierendere Gewebsschäden hervorrufen und die Regeneration einschränken. Dabei ist zwar der Übergang einer AKI zum chronischen Nierenversagen Thema zahlreicher Studien, die Erkenntnisse über Mechanismen im Fall einer AKI bei vorhandener CKD sind allerdings begrenzt. Unumstritten ist das Risiko für Patienten mit CKD, eine AKI zu erleiden und darüber hinaus in Folge dessen eine mangelhafte Regeneration aufzuweisen, deutlich erhöht. In Studien konnte gezeigt werden, dass 49% der Patienten mit CKD durch das Auftreten einer AKI innerhalb von 30 Tagen eine terminale Niereninsuffizienz erleiden, während es ohne AKI nur 1,5% betrifft. Vermutete Einflussfaktoren, die sich aus den Charakteristika der CKD ergeben, sind in Abbildung 3 dargestellt. Die vorzeitigen Alterungsprozesse und der Zellzyklusarrest, in deren Entstehung auch p53 und p21 eine entscheidende Rolle spielen, sind dabei wichtige Faktoren der Maladaptation (3, 9). Infolge des seneszenten Phänotyps entsteht ein proinflammatorisches und profibrotisches Milieu, welches durch die Ausschüttung verschiedener Mediatoren wie Zytokinen und dem Wachstumsfaktor TGF- β gekennzeichnet ist. Die dadurch entstehende Fibrose des Gewebes wird durch bindegewebig narbige Veränderungen charakterisiert, die das gesunde Nierengewebe verdrängen und so zur Abnahme der Nierenfunktion führen. Insbesondere dem TGF- β wird die Eigenschaft zugeschrieben durch die Induktion einer sogenannten Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zum Verlust der physiologischen Gewebestrukturen beizutragen (28). Das proinflammatorische Milieu erhöht das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit CKD. Kommt es bei einer solchen kardiovaskulären Komplikation zur Minderversorgung der Niere, kann so eine ischämisch-bedingte AKI entstehen.

Zum anderen wird durch die CKD negativer Einfluss auf den Vorgang der Autophagie genommen. Bei der Autophagie handelt es sich um einen zellulären Prozess des Abbaus zytoplasmatischer Elemente, wie Proteinaggregate und dysfunktionale Organellen. Durch den Abbau toxischer, zellulärer „Abfallprodukte“ und dem Recyceln von wiederverwertbaren Bestandteilen, wie z.B. Aminosäuren stellt die Autophagie einen wichtigen Mechanismus für die Aufrechterhaltung der zellulären

Homöostase dar. Die genaue Rolle der Autophagie in Bezug auf die Regeneration nach AKI bleibt ungeklärt, jedoch konnten in einigen Studien Hinweise gesammelt werden, dass eine Hemmung der Autophagie zu einem schwereren Verlauf der AKI führt. Eine solche Hemmung erfolgt beispielsweise im Rahmen der dNP, wodurch ein weiterer Erklärungsansatz für die erhöhte Vulnerabilität bei CKD geliefert werden kann (3, 9).

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt der CKD, insbesondere der dNP, ist der Einfluss der HG auf Endothelzellen und das darauf befindliche Thrombomodulin (TM; 29).

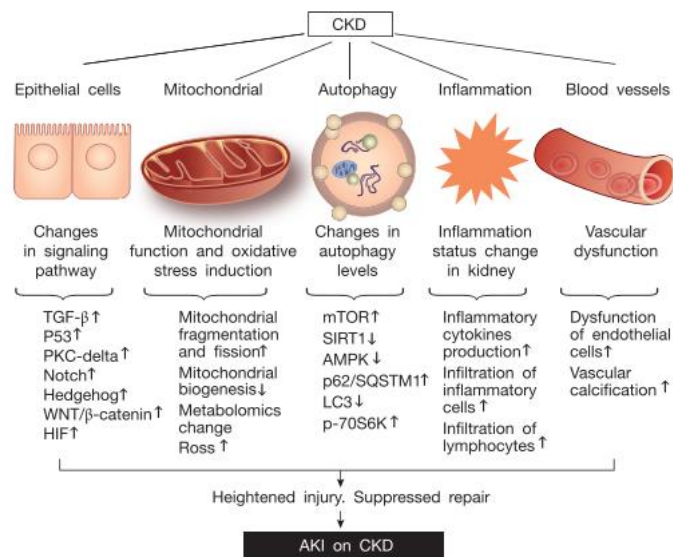


Abbildung 3: **Potentielle Mechanismen der erhöhten Vulnerabilität und schlechteren Regenerationsfähigkeit infolge einer AKI bei Patienten mit CKD (He, Wei et al. 2017 – AKI on CKD) (3)**

Schematische Darstellung möglicher Faktoren, die zur Sensibilisierung für eine AKI führen. Dabei spielen insbesondere epitheliale und mitochondriale Dysfunktionen, oxidativer Stress, Veränderungen im Prozess der Autophagie, chronische Inflammation und vaskuläre Veränderungen eine wichtige Rolle.

Das Thrombomodulin-Protein C-System (TM-PC-System)

Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle im körpereigenen Gerinnungssystem. Es besteht die Möglichkeit, über einen extrinsischen oder intrinsischen Weg die kaskadenartige Aktivierung der Gerinnungsfaktoren zu induzieren. Die gemeinsame Endstrecke und das Ziel der Blutgerinnung ist dabei die Ausbildung eines festen Aggregats aus Fibrin und Thrombozyten. Im Prozess der Hämostase stehen den prokoagulatorischen Gerinnungsfaktoren antikoagulatorische Faktoren gegenüber, die eine Hyperkoagulabilität verhindern sollen. Die Proteasen des Gerinnungssystems haben allerdings nicht nur eine entscheidende Rolle in der Blutgerinnung, sondern können mitunter auch Einfluss auf die zelluläre Homöostase nehmen. Das Thrombomodulin-Protein C-System (TM-PC-System) ist dabei von essentieller Bedeutung. Es besteht zum einen aus TM, welches ein membrangebundenes

Glykoprotein und Bestandteil der Glykokalix ist. Seinen antikoagulatorischen Effekt übt es dabei durch die Regulierung der Thrombinwirkung aus. Thrombin selbst ist eine Serinprotease und wichtigstes Enzym der Hämostase, da es direkt Thrombin aktiviert und zudem die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin katalysiert. Somit ermöglicht es die Vernetzung von Thrombozyten (29). TM besitzt als transmembranöses Protein einen extrazellulären Anteil an der Zelloberfläche, wodurch es Thrombin binden kann. Dies führt zum Verlust der prokoagulatorischen Komponente des Thrombins (29, 30). Weiterhin kommt es durch den Thrombomodulin-Thrombin-Komplex zur Aktivierung von Protein C (PC, aPC; Abb. 4).

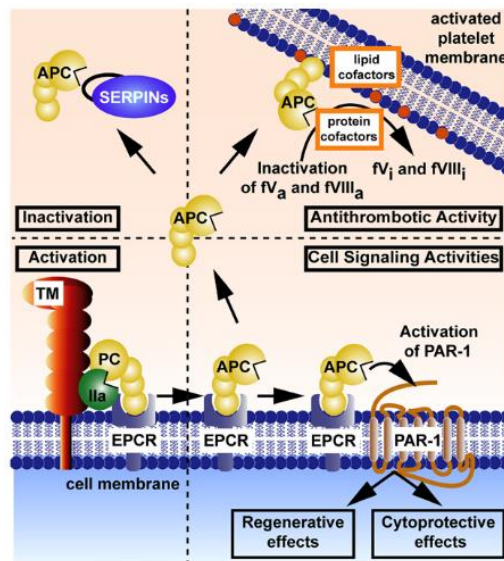


Abbildung 4: **Aktivierung des PC und verschiedene aPC-vermittelte Effekte (Griffin, Zlokovic et al. 2015 – Activated protein C) (31)**

Schematische Darstellung der Aktivierung des Protein C (PC) sowie Darstellung der antikoagulatorischen Wirkung und Interaktion mit Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR), über die hämostase-unabhängige Effekte hervorgerufen werden.

Protein C (PC) ist eine Serinprotease und ebenso Bestandteil des TM-PC-Systems. Es handelt sich dabei um ein Vitamin-K-abhängiges Protein aus 417 Aminosäuren, welches als Heterodimer vorliegt. PC wird vorrangig in der Leber gebildet und γ -carboxyliert als inaktives Zymogen in das Blut sezerniert (32, 33). In einigen Studien wurde auch eine Expression in Tubuluszellen der Niere nachgewiesen (29). Bei der Aktivierung des PC wird dieses durch den Thrombomodulin-Thrombin-Komplex an Arg169 gespalten. Eine vorherige Bindung an den endothelialen Protein C Rezeptor (EPCR) verstärkt diese Reaktion um ein Vielfaches (34). Im Fall einer Aktivierung zum aPC zeigt dieses eine Vielzahl von Effekten. Seine antikoagulatorische Wirkung vermittelt aPC im Plasma über die proteolytische Spaltung der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa (29, 30, 32; Abb. 4). Darüber hinaus besitzt es allerdings noch weitere,

Hämostase-unabhängige Eigenschaften. Ergebnisse verschiedener Studien lassen vermuten, dass aPC die Endothelbarriere verstärkt, antiinflammatorisch und antiapoptotisch wirkt und zusätzlich das regenerative Potential des Gewebes erhöht (31, 32). Dabei sind die zugrundeliegenden Mechanismen vielfältig und noch nicht ausreichend erforscht. Als sicher angesehen wird die Interaktion des aPC mit Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR; Abb. 4). Die PAR gehören zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren und kommen innerhalb der Zellmembranen in sogenannten *Lipid rafts* vor. In dieser Gruppe werden verschiedene Rezeptoren beschrieben (PAR1-4), die jedoch zell- und speziesspezifisch exprimiert werden. Beispielsweise exprimieren Tubuluszellen der Niere PAR1, PAR2 und PAR4. PARs können sowohl als Heterodimere als auch Protomere vorliegen und variable Interaktionen untereinander sowie mit anderen Rezeptoren (z.B. *Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR) eingehen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit eine Vielzahl unterschiedlicher, kontextabhängiger Signalkaskaden zu aktivieren. Verschiedene Proteasen des Gerinnungssystems können dabei mit den PARs interagieren. Beispielsweise ist Thrombin in der Lage PAR1, 3 und 4 zu aktivieren. Das aPC seinerseits aktiviert gebunden an EPCR die Rezeptoren PAR1 und PAR3 (31). Obwohl die gleichen Rezeptoren angesprochen werden, resultieren jedoch unterschiedliche Effekte aus der Aktivierung durch Thrombin respektive aPC. Begründet ist diese Diskrepanz durch verschiedene Aminosäuren, die im Rahmen der gezielten Proteinspaltung des N-Terminus exponiert werden und zu unterschiedlich konfigurierten neuen N-Termini führen. Die neue N-terminale Sequenz fungiert als gebundener Ligand, der eine Konformationsänderung der Rezeptoren induziert, wodurch es z.B. zur irreversiblen Aktivierung einer G-Proteinkaskade kommt (29). Die aPC-Konzentration im Plasma gesunder Menschen beträgt ungefähr 40 pM bei einer ungefähren Halbwertszeit von 15 - 20 Minuten (31). Trotzdem induziert aPC weitreichende Veränderungen, denn es ist in der Lage die Genexpression über epigenetische Modifikationen zu beeinflussen, wodurch unter anderem eine Reduktion der ROS-Bildung resultiert. Hierbei spielt die Inhibierung des Redoxenzym $p66^{shc}$ eine essentielle Rolle (30). Durch die epigenetischen Veränderungen lässt sich auch der langfristige zytoprotektive Effekt trotz der kurzen Plasmahalbwertszeit, beziehungsweise der nur temporären Injektionen in Tierversuchen erklären. Der nephroprotektive Effekt des aPC wird neben der Verminderung der ROS-Bildung über $p66^{shc}$ -Reduktion mit dessen Fähigkeit zur Inhibition der Inflammation in Verbindung gebracht (32, 35).

Bei einer diabetischen Stoffwechsellage sind die aPC Plasmaspiegel vermindert, vor allem infolge einer Veränderung der Glykokalix mit Verlust des endothelialen TM (29). Die Beeinflussung des Endothels führt nicht nur zu einer erhöhten Gerinnungsneigung, sondern infolge des Verlustes der zytoprotektiven Eigenschaften des aPC auch zu einer Dysfunktion von renalen Zellen wie Podozyten und Tubuluszellen. Allerdings kann durch eine aPC Substitution bei chronischen Schädigungen der Mangel kompensiert werden. So konnte in Tierstudien durch exogen appliziertes aPC eine

Verbesserung des Phänotyps der dNP hervorgerufen werden (29). Interessanterweise spielt aPC auch bei akuten Schädigungen wie der renalen IRI eine wichtige Rolle. Es ist bekannt, dass eine beeinträchtigte PC-Aktivierung den Krankheitsverlauf einer renalen IRI negativ beeinflusst und dieser Effekt durch Erhöhung des aPC-Spiegels reversibel ist (35).

Am Beispiel der dNP wird verdeutlicht, welchen Einfluss eine chronische Nierenschädigung ausüben kann und welche schwerwiegenden Folgen daraus resultieren. Bislang basiert die Therapie der Komplikationen des DM inklusive der dNP vorrangig auf einer adäquaten Blutzucker- und Blutdruckeinstellung, der Reduktion kardiovaskulärer Risikofaktoren und der Gabe von RAAS-Inhibitoren wie Ramipril (2). Angesichts des zunehmenden Auftretens der dNP und des ANV als dessen Folge wird der Bedarf an weiteren therapeutischen Interventionen größer. Erste Erfolge konnten dabei in der CREDENCE Studie beobachtet werden. Der SGLT-2 Hemmer Canagliflozin reduziert nachweislich die Progression der Nierenschädigung bei Patienten mit DM und darüber hinaus auch das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse (15).

Allerdings lässt der Mangel an aPC in der dNP und die dadurch schwerwiegendere IRI zusätzlich eine herausragende Bedeutung des TM-PC-Systems in der Pathophysiologie der renalen Schädigung und Regeneration vermuten. Bekannt ist, dass aPC bei einer akuten Schädigung schützt und protektive Eigenschaften in chronischen Krankheitsmodellen zeigt. Besteht jedoch auch ein Schutz infolge einer akuten Nierenschädigung bei bestehender chronischer Nierenerkrankung? In diesem Fall fehlt bereits im Vorfeld des akut schädigenden Ereignisses der endogene, schützende Faktor aPC. Somit stellt sich die Frage, ob der Mangel an aPC selbst einen Risikofaktor für das Auftreten einer AKI darstellt und ob dies durch Substitution von aPC umkehrbar sein könnte. Die Verbesserung des Phänotyps durch die zytoprotektive Wirkung des aPC würde neue therapeutische Ansätze im klinischen Alltag eröffnen, auch wenn zugrundeliegende Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Besonderes Augenmerk in unserer Arbeit haben wir deshalb auf den Effekt der Gerinnungsprotease aPC in den komplexen Abläufen der akuten bei gleichzeitig vorbestehender chronischer Nierenschädigung gelegt. Dabei steht der p21-induzierte Zellzyklusarrest und dessen Einfluss auf die tubuläre Regenerationsfähigkeit sowie die potentielle Steigerung der Zellplastizität durch aPC-Applikation im Vordergrund. Wir postulieren, dass eine Vorbehandlung mit aPC den Zellzyklusarrest von Tubuluszellen im Rahmen des Modells einer chronischen Nierenerkrankung aufheben und somit die Zellen vor dem Einfluss einer akuten Schädigung schützen kann.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Firma
Antibiotika/Antimykotika	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ammoniumpersulfat	EMSURE, Sigma-Aldrich, Deutschland
Antigen unmasking solution (Citrate-Based) H-3300	Vector Laboratories, USA
Antigen unmasking solution (Tris-Based) H-3301	Vector Laboratories, USA
APO Transferrin	Sigma-Aldrich, Deutschland
BD Matrigel Matrix growth factor reduced	BD Biosciences, Deutschland
Bovine Serum Albumine, fraction V (BSA)	Carl Roth GmbH, Deutschland
BUN ELISA kit	Roche diagnostics, Deutschland
DAB (3,3' Diaminobenzidin) + Puffer	Vector Laboratories, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium– low glucose	Sigma-Aldrich, Deutschland
DMEM Nutrient Mix F-12-Ham	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, Deutschland
Esenserum	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ethanol absolut	CHEMSOLUTE, Deutschland
Fetales Kälberserum	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Formaldehyd-Lösung 4%, neutral gepuffert	Otto Fischar GmbH&Co.KG, Deutschland
Glukoselösung	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH, Deutschland
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen Corp., USA
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, Deutschland
Hypoxie-Gasgemisch	AIR LIQUIDE Medical GmbH, Deutschland
Immobilon® Western Chemiluminescent HRP Substrat	Millipore Cooperation, USA
Insulin Lantus	Sanofi, Frankfurt, Deutschland
Interferon Gamma	Cell Sciences, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
ITS (Insulin-Transferrin-Selenium Medium)	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Ketamin	Pfizer, Deutschland
Kollagenasen (Typ I)	Worthington Biochemical Corp, USA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumdodecylsulfat	Sigma-Aldrich, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich, Deutschland
Nonidet P-40	AppliChem, Deutschland
Maus-Albumin ELISA kit	Bethyl Laboratories, USA
Methanol	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Periodsäure	Carl Roth GmbH, Deutschland
Pferdeserum	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Pierce TM BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Protease inhibitor cocktail	Roche diagnostics GmbH, Deutschland
rhEGF	R&D Systems, USA
Roti® Histokitt - Synthetisches Einschlussmittel	Carl Roth GmbH, Deutschland

Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) Acrylamidstammlösung	Carl Roth GmbH, Deutschland
Schiff-Reagenz	Carl Roth GmbH, Deutschland
Streptozotocin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Deutschland
Triton X 100	Carl Roth GmbH, Deutschland
Trypsin-EDTA	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Trypsin-Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Tween20	Carl Roth GmbH, Deutschland
Vectashield mounting medium with DAPI	Vector Laboratories, USA
X-Pand automatisierte Plattform für Kreatinin	Siemens, Deutschland
Xylazine	Bayer, Deutschland
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH, Deutschland

2.1.2. Geräte

Tabelle 2: Geräte

Produkt	Firma
ACCU Check Glucometer	Roche Diabetes Care GmbH, Deutschland
Biowizard Silverline	Kojair Blue Series Technology, Finnland
Boyden chambers	Corning Inc, USA
Zellschaber	Greiner Bio One GmbH, Deutschland
Cellstar Petrischalen 100x20mm/60x15 mm	Greiner Bio One GmbH, Deutschland
Cellstar 12/24/96 well cell culture plate	Greiner Bio One GmbH, Deutschland
Cellstrainer 100/70/40 µl Nylon	Falcon, USA
Centrifuge 5430R	Eppendorf, Deutschland
Chemilumineszenz-System MicroChemi 4.2	Biostep, Deutschland
Chromatographie Papier	Whatman, GE Healthcare, USA
Digi-Block JR	Laboratory Devices, USA
Easypet® 3	Eppendorf AG, Deutschland
Ecocell	MMM Group, Deutschland
Haereus fresco 17 centrifuge	Thermo Scientific, USA
Heracell Vios 160/150i CO2 Inkubator	Thermo Scientific, USA
Hypoxia Incubator Chamber	STEMCELL Technologies, Deutschland
IKA™ RH Basic 2 Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Imobilion-P Transfermembran	Merck Millipore, USA
Juli Stage - automated cell image system	NanoEnTek, Korea
Laborabzug	Köttermann, Deutschland
Lichtmikroskop CK40	Olympus, Deutschland
Menzel™ Mikroskop-Deckelgläschen	Fisher Scientific, Deutschland
Mikroskopobjekträger	Fisher Scientific, Deutschland
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Deutschland
Mixing Block MB-102	BIOER, China
neoLab Tischzentrifuge	neoLab Migge GmbH, Deutschland
Olympus Lichtmikroskop BX43F	Olympus, Deutschland
Olympus XC30 Kamera	Olympus, Deutschland
Olympus cellSens Dimension 1.5 Image software	Olympus, Deutschland
PARAFILM® M	Sigma-Aldrich, Deutschland
pH Meter pH3110	WTW, Deutschland
Pipetten (10-1000 µl)	Eppendorf, Deutschland
PowerPac™ HC	Bio-Rad, Deutschland

Precellys24 Homogenisator	Bertin technologies, Frankreich
Reaktionsgefäße (1,5ml)	Eppendorf, Deutschland
Rotofix 32 Zentrifuge	Hettich-Zentrifugen, Deutschland
Stripette 5/10/25 ml	Costar, USA
Synergy HTX multi mode reader	BioTek, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA

2.1.3. Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

Antikörper	Firma	Konzentration
Anti-Maus-IgG (Pferd)	Cell Signaling, Cat. #7076	1:4000 (WB)
Anti-Kaninchen-IgG (Ziege)	Cell Signaling, Cat. #7074	1:4000 (WB)
Anti-Kaninchen-IgG (Esel) - Alexa Fluor 546 konjugiert	Thermo Fisher, Cat. A10040	1: 350 (IF)
Anti-Kaninchen-IgG (Esel) - DyLight 488 konjugiert	Thermo Fisher, Cat. SA5-10038	1: 350 (IF)
β-Actin	Cell Signaling, Cat. #3700	1:1000 (WB)
GAPDH	Sigma Aldrich, Cat. G9545	1:30000 (WB)
KIM-1	Abcam, Cat. ab47635	1:1000 (WB)
Ki-67	Cell Signaling, Cat. #9129	1: 300 (IF)
p21	Abcam, Cat.ab188224	1:300 (WB) 1: 800 (IHC)
p53	Cell Signaling, Cat. #2524	1:1000 (WB)
PCNA	Abcam, Cat. ab18197	1:2000 (WB)
Vimentin	Cell Signaling, Cat. #5741	1:100 (IF), 1:1000 (WB)
Phaseolus Vulgaris Erythroagglutinin (PVE)- Fluorescein konjugiert	Vector, Cat. FL-1121	1:500 (IF)

2.1.4. Maus- und Zelllinien

Wildtyp C57BL/6 Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen. Um eine Randomisierung in den Versuchsgruppen sicherzustellen, wurde keine Vorauswahl getroffen. Mäuse wurden innerhalb der Kolonie gezüchtet und zufällig den verschiedenen Versuchsgruppen zugeteilt. Es wurde große Sorgfalt darauf verwendet, Wurfgeschwister unterschiedlichen Gruppen zuzuweisen. Darüber hinaus ist die Paarung von Wurfgeschwistern für die Versuchszucht strikt vermieden worden. Bei allen durchgeführten Tierversuchen wurden die vorgeschriebenen Standards und Protokolle des Tierschutzgesetzes befolgt (Regierungspräsidium Karlsruhe und Landesverwaltungsamt Halle, Deutschland).

BUMPT Zellen (*Boston University mouse proximal tubule cells*) konnten durch die Unterstützung der Boston University School of Medicine (Boston, USA) genutzt werden. Hierbei erfolgte die Kultivierung nach bestehenden Laborstandards (s.u.). Es wurde darauf geachtet, keine Zellen einer höheren Passage als 35 zu verwenden. Des Weiteren sind regelmäßige Screenings auf Mykoplasmen erfolgt, um mögliche Kontaminationen frühzeitig zu erkennen.

2.2. Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für die *in vivo* Experimente wurden sowohl BUMPT Zellen als auch frisch isolierte primäre Tubuluszellen verwendet. Für die Kultivierung der Zellen wurden 10 cm große Petrischalen verwendet, die in Inkubatoren bei entsprechenden Umgebungsbedingungen (s.u.) gelagert wurden. Jegliche Arbeiten mit den Zellen sind unter sterilen Bedingungen an der Sicherheitswerkbank für Zellkulturarbeiten durchgeführt worden.

Primäre Tubuluszellen

Im Anschluss an die Isolierung (2.2.7.) sind die primären Tubuluszellen bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert worden. Verwendet wurde hierfür das Kidney Culture Medium (s. Tabelle 4). Dabei fördert der rekombinante humane epitheliale Wachstumsfaktor (rhEGF) zunächst eine Proliferation und Differenzierung und führt so zu einer verstärkten Oberflächenadhäsion der Zellen in der Petrischale. Nach Adhäsion konnte auf ein Medium ohne rhEGF umgestellt werden, welches alle 48 - 72 Stunden erneuert wurde. Nachdem die Petrischalen ca. 80 - 90% von Zellen bewachsen worden sind, wurden die Experimente durchgeführt.

Tabelle 4: Zellkulturmedium für primäre Tubuluszellen

Kidney Culture Medium
DMEM/F-12 culture media
Insulin/Transferrin/Selenium (5 µg/ml, 2,75 µg/ml und 3,35 ng/ml)
APO Transferrin (2 µg/ml)
Hydrocortison (40 ng/ml)
Antibiotika (10000 u/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin)
Antimykotika (0,25 µg/ml Amphotericin B)
Rekombinanter humaner epithelialer Wachstumsfaktor (rhEGF; 0,01 µg/ml)

BUMPT-Zellen

Die immortalisierten BUMPT-Zellen befinden sich in einem dedifferenzierten Zustand, in dem sie sich unendlich oft teilen können. Der Grund hierfür ist das Einbringen einer Gensequenz, welche ein thermosensitives T-Antigen codiert und bei vermehrter Expression für die dauerhafte Teilungskapazität sorgt. Um diesen Zustand aufrechterhalten zu können, müssen die Zellen bei 33 °C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert werden. Außerdem ist die Zugabe von Interferon-γ zum Medium in einer Konzentration von 10 U/ml notwendig. Nur unter diesen Bedingungen findet eine Expression des T-Antigens statt. Die genaue Zusammensetzung des Zellmediums ist in Tabelle 5 zu finden. Zur Durchführung von Experimenten wurde die Differenzierung der Zellen induziert. Dazu wurden sie im Proliferationszustand trypsinisiert und anschließend bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Medium kultiviert,

in dem sich kein Interferon- γ befindet. Das Medium wurde alle 48 - 72 Stunden erneuert. Nachdem ca. 80 - 90% der Petrischalen von Zellen bewachsen wurden, sind die Experimente durchgeführt worden.

Tabelle 5: Zellkulturmedium für BUMPT Zellen

Proliferationsmedium	Differenzierungsmedium
500 ml DMEM low glucose (1,5 g/L) Medium 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung 10 U/ml Interferon- γ	500 ml DMEM low glucose (1,5 g/L) Medium 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung

Experimentelle Manipulationen der *in vitro* Bedingungen

Hyperglykämie (HG)

Bei Patienten mit DM herrscht eine persistierende HG, die die Zellen auf verschiedene Weisen beeinflusst. Um einen solchen Zustand *in vitro* zu simulieren, wurde dem Medium konzentrierte Glukoselösung zugegeben. Dabei wurde eine Konzentration von 30 mmol/l angestrebt. Nach Optimierung der Inkubationsdauer ist die Inkubation für 24 Stunden aufrechterhalten worden.

Simulation einer Hypoxie *in vitro*

Die Minderdurchblutung eines Gewebes ist gekennzeichnet durch einen Mangel an Nährstoffen und Sauerstoff. Diese Aspekte wurden auch bei der Simulation einer Ischämie *in vitro* berücksichtigt. Dafür wurde das Medium der Zellen durch phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ersetzt und die Petrischalen in eine Hypoxiekammer überführt. Im Anschluss ist die Kammer mit einem Gasgemisch aus 1% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid und 94% Stickstoff geflutet worden, um sicherzustellen, dass die Sauerstoffkonzentration auf ein Minimum reduziert wurde. Dies erfolgte für eine Dauer von 10 Minuten bei einem Flussvolumen von 40 - 50 L/min. Anschließend wurde der Zustand der Hypoxie für sechs Stunden in einem Inkubator mit 37 °C und 5% CO₂ aufrechterhalten. Um die Regenerationsfähigkeit der Zellen beurteilen zu können, wurde nach 6 Stunden die Reperfusionzeit begonnen, in der die Zellen wieder mit Medium bei 37 °C und 5% CO₂ (s.o.) inkubiert wurden. Nach Optimierung des Protokolls wurde die Reperfusion von 6 Stunden etabliert. Vorgegangene Veränderungen der Umgebungsbedingungen (z.B. HG) haben auch in der Reperfusionzeit Anwendung gefunden.

aPC-Vorbehandlung

Um den Effekt von aPC analysieren zu können, wurden die Zellen vor Beginn der Simulation einer HG, beziehungsweise Ischämie, mit aPC inkubiert. Dabei ist die Inkubation mit 20 nmol/l aPC für eine Stunde aufrechterhalten wurden, da dies aufgrund vorliegender Erfahrungen als hinreichend angesehen wird, um protektive Signalkaskaden durch aPC aktivieren zu können (35). Die

Kontrollgruppen wurden im gleichen Maße mit PBS vorbehandelt. Das aPC wurde im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität hergestellt. Dabei wurde durch chromatographische Verfahren PC aus einem Prothrombinkomplex isoliert und anschließend mit humanem Thrombin (5%) drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Um anschließend das Thrombin vom aPC zu trennen, wurde eine Ionenaustauschchromatographie verwendet. Die proteolytische Aktivität des aPC wurde vor Gebrauch standardmäßig kontrolliert (35, 36).

2.2.2 Immunoblot

Mit Hilfe des Immunoblots kann die Expression von Proteinen untersucht werden. Nach elektrophoretischer Auftrennung werden die Proteine auf eine Trägermembran übertragen und können anschließend mit Hilfe von Antikörpern detektiert und dargestellt werden. Zunächst ist die Gewinnung der Proteinlysate erfolgt. Hierzu wurde Radioimmunoprecipitation Assay Puffer (RIPA, s. Tabelle 6) auf die konfluenten Zellen gegeben, durch mechanische Einwirkung der Inhalt der Petrischale mobilisiert und schlussendlich in ein Eppendorfgesäß überführt.

Tabelle 6: Herstellung des RIPA Puffers

RIPA (100ml):
50 mM Tris HCl pH 7,4
1% Nonidet P-40
0.25% Natriumdeoxycholat
150 mM NaCl
1 mM EDTA

Nach kurzer Inkubationszeit ist die Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 g erfolgt, in deren Anschluss der Überstand mit den Proteinen entnommen wurde. Damit exakte Aussagen über die Expressionsunterschiede verschiedener Gruppen getroffen werden konnten, musste eine Konzentrationsgleichheit der Proben sichergestellt werden. Dies erfolgte mittels Extinktionsmessung nach Inkubation mit BCA-Reagenz. Nach Denaturierung durch temporäre Erhitzung wurden die Proteinlysate in Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamidgele aufgetragen. Je nach Molekülgröße des zu detektierenden Proteins kamen dabei verschieden konzentrierte Gele zum Einsatz (s. Tabelle 7). Durch den Einsatz der Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) wurden die Proteine entsprechend ihrer Molekülmasse aufgetrennt und daraufhin auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran transferiert. Diese Membranen wurden in Blockinglösung (5% BSA-PBST) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu reduzieren. Anschließend wurde der Blockinglösung der primäre Antikörper hinzugefügt und die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tabelle 7: Herstellung der Polyacrylamidgele

<u>Trenngel 10%: (2 Gele)</u>	<u>Trenngel 12,5%: (2 Gele)</u>	<u>Sammelgel 6%: (2 Gele)</u>
Tris HCl pH 8,8: 5 ml	Tris HCl pH 8,8: 5 ml	Tris HCl pH 6,8: 2 ml
Acrylamide 30: 6,7 ml	Acrylamide 30: 8,4 ml	Acrylamide 30: 1,6 ml
dH ₂ O: 8,1 ml	dH ₂ O: 6,4 ml	dH ₂ O: 4,3 ml
APS (10%): 200 µl	APS (10%): 200 µl	APS (10%): 80 µl
TEMED: 20 µl	TEMED: 20 µl	TEMED: 16 µl

Nach mehrmaligem Waschen mit PBST wurde am nächsten Tag der sekundäre Antikörper auf die Membran gegeben. Diese wurde für 4 Stunden bei 4 °C gelagert und im Anschluss mit PBST gewaschen. Mit Hilfe des Western Chemiluminescent HRP Substrates und unter Verwendung des Chemilumineszenz-System MicroChemi 4.2 ist der Blot entwickelt worden. Die Analyse der Blots ist unter Gebrauch der Software IMAGE J-Fiji erfolgt. Zur Durchführung der PAGE mussten folgende Puffer und Lösungen hergestellt werden:

Tabelle 8: Puffer und Lösungen für den Immunoblot

<u>Trenngelpuffer 500 ml:</u>	<u>Sammelgelpuffer 200 ml:</u>
Tris-HCL (1.5 M) = 0.825 g	Tris-HCL (1 M) = 30.275 g
10% iges SDS (0.4%) = 20 ml	10% iges SDS (0.4%) = 8 ml
Eingestellt auf pH = 8.8 und mit d. H ₂ O aufgefüllt	Eingestellt auf pH = 6.8 und mit d. H ₂ O aufgefüllt
<u>1x SDS Running-Buffer</u> 1 L:	<u>1x Transfer-Buffer</u> 1 L:
Tris: 3,02 g	Tris: 2,45 g
Glycine: 18,8 g	Glycine: 11,25 g
10% iges SDS: 10 ml	Methanol: 200 ml
<u>10x PBS</u> 1 L: (auf pH 7,4 eingestellt)	
NaCl: 80 g	
KCl: 2 g	
Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O): 14,4 g	
KH ₂ PO ₄ : 2,4 g	

2.2.3. Immunfluoreszenzfärbung (Zellen)

Die Expression von Proteinen ist zellspezifisch und kann zellspezifisch reguliert werden, unter anderem abhängig von äußeren Einflüssen, denen die Zellen ausgesetzt sind. Dabei kann mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung insbesondere die räumliche Verteilung im Gewebe visualisiert werden.

Zellen wurden in Petrischalen mit kleinen Deckgläsern wie beschrieben kultiviert und behandelt. Nach einem Waschschritt in PBS wurden die Zellen mit 3 ml gekühltem Paraformaldehyde (4%) für 15 Minuten inkubiert. Dadurch konnten die Zellen auf den Deckgläsern fixiert werden, was das Durchführen weiterer Arbeitsschritte der Färbetechnik ermöglichte. Nach dem Waschen in PBS

wurden die Deckgläser auf Parafilm platziert und in einer feuchten Kammer mit Blockinglösung inkubiert. Bei der Lösung handelte es sich um 2,5-5% Eseserum und 0,05% Tween20 gelöst in PBS. Das Tween20 wirkt als Detergens, welches durch das Freilegen von Antigenen die Affinität des Antikörpers erhöht. Bei der Anfärbung nuklearer Proteine ist zusätzlich das Detergens Triton-X100 in einer Verdünnung von 0,1% - 0,3% verwendet worden, welches durch seine stärkere Wirkung auch nukleare Antigene für die Färbung zugänglich macht. Mit Hilfe des Blockens soll eine höhere Spezifität des primären Antikörpers erreicht werden, da unspezifische Bindungsstellen durch diesen Schritt vermindert werden. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper mit der erforderlichen Verdünnung in der Blockinglösung gelöst und auf die Deckgläser mit den Zellen gegeben. Die Inkubationszeit hat hierbei 1 bis 2 Tage in einer feuchten Kammer bei 4 °C betragen. In Folge wurden die Deckgläser sorgfältig mehrmals mit PBS gewaschen, um Reste des primären Antikörpers zu entfernen. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Schritte in abgedunkelter Umgebung. Auch der sekundäre Antikörper wurde in der Blockinglösung gelöst und die Zellen damit für 1 bis 2 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Deckgläser auf einem Objektträger platziert und das Einbettungsmedium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) hinzugegeben. Dies ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die DNA anfärbt und somit Zellkerne sichtbar machen kann. Anschließend sind unter Gebrauch des Olympus Lichtmikroskop BX43F und der XC30 Kamera Aufnahmen der angefärbten Zellen getätigt worden. Die Einstellungen sind bei jedem Versuch optimiert und bei allen Aufnahmen gleichermaßen angewendet worden. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit Hilfe der Software IMAGE J-Fiji.

2.2.4. Streptozotocin (STZ)-Injektion und aPC-Behandlung

Streptozotocin ist ein Glucosamin mit alkylierender Wirkung. Es weist eine hohe Selektivität für die β -Zellen des Pankreas auf, welche auf der Expression des GLUT-2 Transporters beruht. Durch diesen Glucosetransporter, der an den β -Zellen in besonders hoher Dichte auftritt, gelangt das STZ in den Intrazellularraum und unterbindet durch Alkylierung der DNA die weitere Zellvermehrung, beziehungsweise induziert einen Zelltod. Die dadurch auftretende Hypoinsulinämie bietet die Möglichkeit in Tiermodellen eine chronische HG zu simulieren, wie sie typischerweise beim DM Typ 1 auftritt. Zur Induktion der persistierenden HG sind 8 Wochen alten Mäusen 60 mg STZ/kg Körpergewicht für 5 aufeinanderfolgende Tage intraperitoneal (i.p.) injiziert worden. Das STZ wurde dabei in 0,05 M Natrium-Citrat Lösung (pH 4,5) gelöst. Tieren der Kontrollgruppen wurde nur die Natrium-Citrat Lösung ohne das STZ verabreicht. Nach weiteren 7 Tagen im Anschluss an die letzte Injektion sind die Blutglukosewerte bestimmt worden. Für diesen Zweck wurde ein konventionelles Glucometer mit ACCU-CHEK Teststreifen verwendet. Bei mangelndem Ansprechen auf das STZ konnten erneut Injektionen vorgenommen werden, die an 3 aufeinanderfolgenden Tagen erfolgen

sollten. Als Richtwert für die erfolgreiche Induktion einer HG wurden 20 mmol/l (300 mg/dl) Blutglukose festgelegt. Regelmäßige Kontrollen des Blutglukosespiegels sollten schwerere Komplikationen verhindern und mit Hilfe von angepassten Insulininjektionen die Gesundheit der Versuchstiere aufrechterhalten. Dabei ist folgendes Injektionsschema zum Einsatz gekommen:

Tabelle 9: Insulinschema

Blutglukose	Insulin Lantus
22 - 24 mmol/l	10 µl
23 - 26 mmol/l	20 µl
27 - 29 mmol/l	30 µl
30 - 31 mmol/l	40 µl
> 31 mmol/l	50 µl

Neben dem Einsatz in den *in vitro* Experimenten wurde aPC auch im Tiermodell verwendet. Für die *in vivo* Anwendung wurde den Mäusen nach 6 Wochen persistierender HG (14 Wochen Lebensalter) oder gleichaltrigen Tieren der Kontrollgruppe 1 mg/kg aPC i.p. injiziert. Dies ist alle 2 Tage über einen Zeitraum von 2 Wochen durchgeführt worden. Der Vorbehandlung mit aPC sind die Entnahme von Urinproben (siehe 2.2.8.) und im Anschluss das Modell der IRI gefolgt (siehe 2.2.5.).

2.2.5 *Ischemia-Reperfusion-Injury (IRI) der Niere in vivo*

Die Simulation einer akuten Nierenschädigung erfolgte mit Hilfe des Modells der IRI. Dabei wird die Okklusion der Nierenarterie durch den Einsatz von Mikroaneurysma-Klemmen nachgeahmt. Dafür sind die Versuchstiere mit Ketamin (Ketavet®, 100 mg/kg Körpergewicht, i.p.) und Xylazin (Rompun®, 10 mg/kg Körpergewicht, i.p.) anästhesiert worden. Die Tiefe der Narkose ist durch das Überprüfen des Zwischenzehenreflexes bestätigt worden. Anschließend ist die *Cavitas abdominalis* durch einen medianen Schnitt eröffnet worden. Im Anschluss sind die Nieren sowie die dazugehörigen Gefäße freigelegt und die Nierenarterie mit Hilfe der Mikroaneurysma-Klemme verschlossen worden. Die Simulation der Ischämie wurde bilateral für 35 Minuten beziehungsweise nach STZ-Injektionen für 29 Minuten vorgenommen. Ein erfolgreiches Vorgehen wurde durch die Farbveränderungen des Nierengewebes angezeigt. Nach Ablauf der Zeit wurden die Klemmen entfernt und die Reperfusion des Gewebes ermöglicht. Während des gesamten Eingriffs und in der Aufwachphase wurde auf den Erhalt der Körpertemperatur geachtet und eine Wärmelampe verwendet. Nach einer Erholungsphase wurden die Versuchstiere wieder in ihren Käfig gesetzt, mit direktem Zugang zu Nahrung und Wasser. Die Reperfusionszeit betrug nach Optimierung des Protokolls 2 Tage. Nach deren Ablauf erfolgte die terminale Organentnahme. Bei Versuchstieren der Kontrollgruppen, die in Stamm und Alter mit den Tieren der IRI-Gruppen übereinstimmten, wurde nur die Bauchhöhle eröffnet und durch gleiches

Vorgehen wie bei den Interventionsgruppen wieder verschlossen. Auch bei ihnen erfolgte die terminale Organentnahme nach 2 Tagen.

2.2.6 Terminale Organentnahme

Nach 48 Stunden infolge der IRI wurden Blut- und Gewebeproben entnommen, damit weitere Analysen und Experimente durchgeführt werden konnten. Vor dem Eingriff wurde das Körpergewicht der Mäuse bestimmt. Die Anästhesie und Eröffnung der Bauchhöhle erfolgten wie bereits in dem Modell der IRI beschrieben. Anschließend wurden Blutproben zur Gewinnung von Plasma aus der *Vena cava inferior* mit Citrat befüllten Spritzen entnommen und in Eppendorfgefäße gegeben. Nach der Zentrifugation bei 2000 g für 10 Minuten wurde das Plasma als Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Im Plasma wurden mittels ELISA-Assays Nierenretentionsparameter gemessen. Im Anschluss wurde die linke Nierenarterie abgeklemmt und die Niere entnommen, um daraus Tubuluszellen und Proteine zu gewinnen. Des Weiteren wurde das Gewicht der entnommenen Niere bestimmt, um das Verhältnis zwischen Nieren- und Körpergewicht unter den verschiedenen Gruppen vergleichen zu können. Gewebeproben, die für histologischen Untersuchungen verwendet werden sollten, mussten mit Formaldehyd (4%, Raumtemperatur) perfundiert werden. Dazu wurde der Thorax der Versuchstiere eröffnet und eine Infusionsnadel in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt. So wurde zunächst PBS und darauffolgend Formaldehyd im Gefäßsystem verteilt. Dadurch sind Blutreste ausgespült und das Gewebe dauerhaft fixiert worden. Im Anschluss wurde auch die rechte Niere entfernt und für weitere histologische Untersuchungen in Formaldehyd gelagert.

2.2.7. Isolierung primärer Tubuluszellen

Die Isolierung primärer Tubuluszellen erfolgte nach etablierten Verfahren (37). Nach Entnahme der Nieren sind diese in 4 °C kalter Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) mit 1% Antibiotika/Antimykotika gelagert worden. Die Kapsel und das Mark wurden entfernt und der Kortex mit den Tubuli mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurde das kortikale Gewebe in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml HBSS, 200 units/ml Kollagenase, 200 units/ml Trypsin-Inhibitor gegeben. In einem Schüttelinkubator erfolgte unter ständiger Bewegung (30 rpm) eine Inkubation bei 37 °C für insgesamt 30 Minuten. Hierdurch sollten große Zellverbände getrennt und Bindegewebe verdaut, gleichzeitig aber auch durch den Trypsin-Inhibitor eine vollständige Lyse verhindert werden. Nachfolgend wurde die Suspension auf mehrere Zentrifugenröhrchen mit jeweils 5 ml aufgeteilt und mit 5 ml sterilem, hitze-inaktiviertem Pferdeserum versehen. Dies ermöglicht sowohl eine Sedimentation basierend auf der Dichte der in der Lösung befindlichen Partikel als auch die Inaktivierung von abbauenden Enzymen. Nach erfolgter Sedimentation ist der Überstand, in dem sich die proximalen Tubuluszellen befanden, in ein weiteres

Röhrchen überführt und für 7 Minuten bei 200 g zentrifugiert worden. Das entstandene Pellet wurde in Kidney Culture Medium (KCM) resuspendiert. Die Zellkultivierung erfolgte wie in 2.2.1. beschrieben.

2.2.8. ELISA (Urin- und Blutproben) zur Bestimmung funktioneller Nierenparameter

Das Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dem die Konzentration bestimmter Moleküle in verschiedenen Körperflüssigkeiten ermittelt werden kann. Als Proben dienten in unserem Fall Urin und Plasma der Versuchstiere. Im Vorfeld der terminalen Organentnahme während der Reperfusionzeit wurden die Tiere für 24 Stunden in metabolischen Käfigen gehalten, um den Urin über einen längeren Zeitraum zu sammeln. Die Plasmaproben stammten aus dem Blut der *Vena cava*, welches wie in 2.2.6. beschrieben entnommen worden ist.

Für die Durchführung des Nachweises von BUN (blood urea nitrogen) wurde ein kinetisches Testkit mit Urease (Roche diagnostics, Deutschland) verwendet. Zur Bestimmung von Albumin wurde ein herkömmliches Maus-Albumin ELISA kit (Bethyl Laboratories, USA) verwendet. Die Kreatininkonzentration wurde mithilfe der modifizierten Jaffé-Methode in einem kommerziell erhältlichen Messsystem ermittelt (X-Pand automatisierte Plattform, Siemens, Deutschland). Die Messungen erfolgten im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität in Magdeburg.

2.2.9. Immunfluoreszenzfärbung (Gewebe)

Aus dem gewonnenen Material der terminalen Organentnahme wurden unter anderem in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte hergestellt. Vor der Gewebefärbung müssen die Schnitte deparaffiniert und rehydriert werden. Dazu sind die Objektträger für 30 Minuten auf 65 °C erhitzt und im Anschluss durch das Waschen in Xylol von Rückständen des Paraffins befreit worden. In mehreren Ethanollösungen absteigender Konzentration ist die Rehydrierung nach folgendem Schema erfolgt:

Tabelle 10: Schema zur Rehydrierung (bzw. Dehydrierung) der Gewebeschnitte

Ethanolkonzentration	Dauer
99% Ethanol	20 Sekunden
96% Ethanol	20 Sekunden
80% Ethanol	20 Sekunden
70% Ethanol	20 Sekunden
50% Ethanol	20 Sekunden
30% Ethanol	20 Sekunden
Destilliertes H ₂ O	2 x 5 Minuten

Während der Fixierung des Gewebes kommt es zur Ausbildung von Methylenbrücken zwischen den Epitopen der Antigene, die eine Vernetzung der Proteine hervorruft. Die Demaskierung der Epitope ist durch den Gebrauch von Puffer zur Antigen-Rückgewinnung möglich. Hierfür wurden die Objektträger in eine Küvette mit 80 µl Puffer, abhängig vom Protein auf Tris(hydroxymethyl)aminomethan oder Citrat basierend, gelöst in 800 µl destilliertem Wasser platziert und die Küvette für 30 Minuten in kochendes Wasser gestellt. Nach dem Abkühlen und einem Waschschrift in PBS sind die Gewebeschnitte mit Blockinglösung inkubiert worden. Ähnlich wie bei der Immunfluoreszenzfärbung von Zellen bestand diese aus 2,5 - 5% Eseserum, 0,05% Tween20 sowie 0,5% Triton-X100, im Fall einer Färbung von nukleären Proteinen, gelöst in PBS. Das Blocken der unspezifischen Antikörperbindungsstellen ist für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur erfolgt. Im Anschluss wurde der primäre Antikörper entsprechend der erforderlichen Verdünnung in der Blockinglösung gelöst und auf die Objektträger gegeben. Die Inkubation ist in einer feuchten Kammer bei 4 °C vorgenommen worden und hat in Abhängigkeit des verwendeten Antikörpers 1 bis 3 Tage andauert. Nach mehrmaligem Waschen der Objektträger mit PBS wurden die Gewebe unter gleichen Bedingungen für 1 bis 2 Stunden mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend erneut in PBS gewaschen. In einem letzten Schritt wurde jeweils ein Tropfen Einbettungsmedium mit DAPI auf die Gewebeschnitte gegeben und der Objektträger mit einem Deckglas bedeckt. Anschließend sind unter gleichen Bedingungen wie in 2.2.3. beschrieben Aufnahmen des angefärbten Gewebes getätigt und mit Hilfe der Software IMAGE J-Fiji ausgewertet worden.

2.2.10. Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbetechnik ist ein weiteres Verfahren zum spezifischen Nachweis von Proteinen. Ihr Ablauf gestaltet sich ähnlich dem der Immunfluoreszenzfärbung. Zunächst mussten die Paraffinschnitte deparaffiniert und rehydriert werden. Dazu sind die Objektträger für 30 Minuten auf 65 °C erhitzt und im Anschluss durch das Waschen in Xylol von Rückständen des Paraffins befreit worden. Die Rehydrierung folgte dabei demselben Schema wie in 2.2.9. beschrieben. Anschließend ist die Demaskierung der Epitope durch den Gebrauch von Puffer zur Antigen-Rückgewinnung durchgeführt worden. Nach dem Abkühlen musste zunächst die endogene Peroxidase gehemmt werden, um bei der Auswertung mögliche unspezifische Anfärbungen zu reduzieren. Dazu sind die Gewebeschnitte mit 0,3% H₂O₂ in Wasser für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden. Im Anschluss wurde in gleicher Art und Weise die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie die 1. und 2. Antikörperinkubation, wie sie in 2.2.9. beschrieben ist, durchgeführt. Für die Anfärbung des Gewebes ist letztendlich die Reaktion der Diaminobenzidin-Lösung (DAB) mit der am 2. Antikörper gebundenen Meerrettichperoxidase verantwortlich. Damit eine einheitliche Farbintensität entsteht, wurde die Inkubationszeit für alle Gewebeschnitte konstant gehalten. Daraufhin wurden die Schnitte

mit Hämatoxylin gegengefärbt, dehydriert und im Einbettungsmedium fixiert. Anschließend sind unter gleichen Bedingungen wie in 2.2.3. beschriebenen Aufnahmen des angefärbten Gewebes getätigt und mit Hilfe der Software IMAGE J-Fiji ausgewertet worden.

2.2.11. Periodsäure-Schiff-Reaktion (PAS)-Färbung

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte sind wie in 2.2.9. beschrieben zunächst deparaffiniert und rehydriert worden. Nach 30 Minuten bei 65 °C und einem Waschschrift in Xylol wurden sie nach identischem Schema durch die Ethanollösungen geführt (s. Tabelle 7). Anschließend wurde durch die Inkubation mit Periodsäure für fünf Minuten eine Oxidation des Gewebes hervorgerufen. Im Anschluss an die 15-minütige Inkubation mit Schiff-Reagenz wurden die Schnitte mit Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt. Um eine längere Fixierung zu gewährleisten, wurden die Ethanollösungen in umgekehrter Reihenfolge durchlaufen, um das Gewebe zu dehydrieren. Eingebettet in synthetischem Einschlussmittel wurden die Schnitte mit Deckgläsern bedeckt. Wiederum wurden Aufnahmen und Auswertung nach bekanntem Schema vorgenommen (s. 2.2.3.).

2.2.12. Colony-formation Assay (CFA)

Zellen mit einem stammzellähnlichen Phänotyp können *in vitro* Kolonien formen. Zur Koloniebildung werden die Zellen üblicherweise in Matrigel, in dem dreidimensionale Zellverbände wachsen können, kultiviert. In Anlehnung an das Protokoll aus der Publikation von Lindgren, Boström et al. „Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules“ (38) ist das Colony-formation Assay (CFA) mit geringfügigen Abwandlungen durchgeführt worden. Die Isolierung von Tubuluszellen ist wie in 2.2.7. beschrieben vorgenommen worden. Die entstandene Zellsuspension wurde jeweils mit 5000 Zellen in einem Verhältnis von 1:1 mit BD Matrigel Matrix growth factor reduced (BD Biosciences) gemischt. Dabei ist das Matrigel während der Arbeitsschritte ständig auf Eis gelagert worden, damit ein vorzeitiges Aushärten vermieden werden konnte. Anschließend ist das Gemisch in 24-well Boyden chambers pipettiert und bei 37 °C bis zur Aushärtung gelagert worden. Zur Versorgung der Zellen wurden 500 µl Medium in den unteren Teil der Kammer gegeben und das Gel zusätzlich mit 200 µl bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Über 3 Wochen hinweg sind die Zellen beobachtet und regelmäßig das Medium gewechselt worden. Zur Auswertung des Assays wurden mit Hilfe der Juli Stage Bilder des Matrigels aufgenommen.

3. **Ergebnisse**

3.1. Regeneration von Tubuluszellen infolge einer akuten Schädigung durch Hypoxie

Zellen weisen eine Vielzahl von physiologischen Reparaturmechanismen auf, die in Folge eines schädigenden Einflusses aktiviert werden können. Um zu evaluieren, in welchem Zeitraum nach einer Zellschädigung diese Reparaturvorgänge initiiert werden, haben wir das Modell der Hypoxie in Kombination mit einer variablen Reoxygenierungszeit angewendet (Abb. 5). Hierzu wurden primäre Tubuluszellen (PTC) aus Wildtyp C57BL/6J Mäusen verwendet. Die Dauer der Hypoxie wurde dabei mit 6 Stunden konstant gehalten und verschiedene Markerproteine sind nach 6, 12 und 24 Stunden Reperfusionzeit untersucht worden. Dabei handelt es sich um Vimentin, welches eine Dedifferenzierung anzeigt und KIM-1 als Marker für tubuläre Zellschäden. KIM-1 fungiert nicht nur als Marker der dNP (s.o.), sondern wird auch bei akuter Zellschädigung vermehrt exprimiert. Nach 6 und 12 Stunden Reperfusionzeit zeigt sich in der Immunfluoreszenzfärbung eine gesteigerte Expression von Vimentin, die nach 24 Stunden wieder abnimmt. Eine ähnliche Tendenz zeichnet sich im Immunoblot ab, was insgesamt auf eine Dedifferenzierung als Teil des Regenerationsprozesses im Rahmen einer Zellschädigung hinweist. Die Expression von KIM-1 nimmt im Verlauf zu. Für die weiteren Experimente wurden daraufhin 6 Stunden Hypoxie sowie 6 Stunden Reperfusion angewendet.

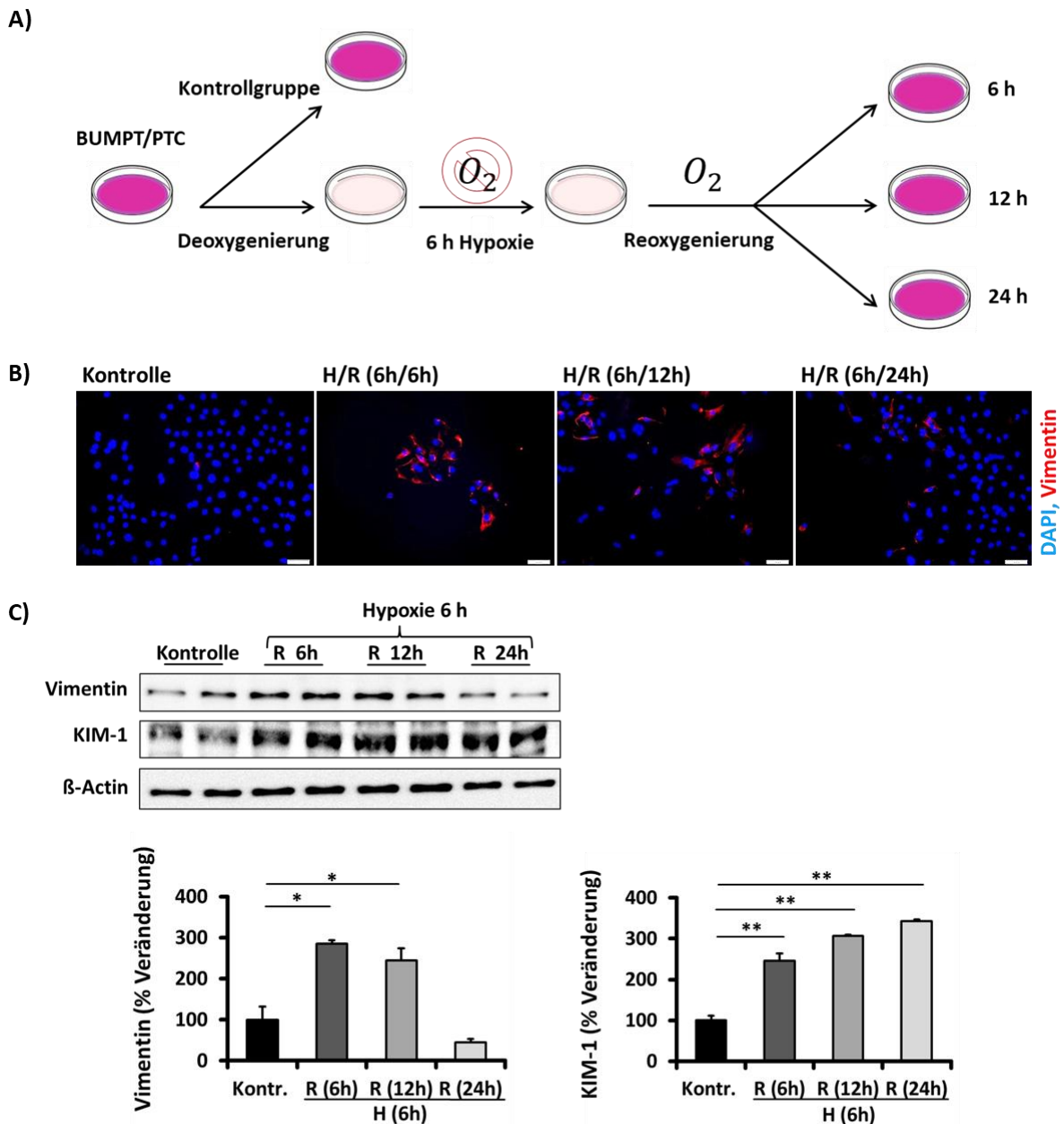


Abbildung 5: Physiologischer Regenerationsprozess von PTC nach H/R

- A) Schematische Darstellung des Experimentalaufbaus der Hypoxie und Reoxygenierung (H/R) von primären Tubuluszellen (PTC).
- B) Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung für den Dedifferenzierungsmarker Vimentin (rot) in PTC von Wildtyp Mäusen. Die PTC wurden 6 Stunden Hypoxie (H) und anschließend unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten (R) ausgesetzt. Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau gefärbt. Bereits nach 6 Stunden Reperfusionzeit wird Vimentin verstärkt exprimiert. Im Verlauf ist die Expression rückläufig (Die Hilfsmarkierung im Bild repräsentiert 50 μm).
- C) Repräsentative Immunoblots für die Expression von Vimentin und KIM-1 in PTC von Wildtyp Mäusen. Die PTC wurden 6 Stunden Hypoxie (H) und anschließend unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten (R) ausgesetzt. Bis 12 Stunden Reoxygenierungszeit zeigt sich eine vermehrte Expression des Dedifferenzierungsmarkers Vimentin. KIM-1 weist eine mit der Reoxygenierungsdauer zunehmende Expression auf. Zusätzlich verdeutlichen Quantifizierungen der Blots Expressionsänderungen nach Normierung mit Hilfe von β -Actin. Diese Abbildungen fassen Daten von 3 unabhängigen Experimenten zusammen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t -Test).

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, wie sich das Expressionsmuster im multifaktoriellen Zusammenspiel verschiedener Signalkaskaden *in vivo* gestaltet. Hierzu wurde bei C57BL/6J Mäusen ein dem H/R-Modell ähnliches Verfahren angewendet. Die IRI ermöglicht es ebenso in Abhängigkeit verschiedener Reperfusionzeiten das Regenerationsverhalten zu untersuchen. Für die gesunden Wildtyp Mäuse wurde eine bilaterale Ischämie der *Arteriae renales* von 35 Minuten durchgeführt (23, 24). Zunächst wurde eine Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin genutzt, um den Verlauf der Regeneration darzustellen. In Folge einer akuten Schädigung wie der IRI spiegelt die Expression und die damit einhergehende Veränderung des Phänotyps die Induktion eines Reparaturmechanismus wider. Deshalb wurden nach der Ischämiephase Proben an den Tagen 1, 2 und 6 generiert. Es sollte ein Eindruck gewonnen werden, nach welcher Reperfusionzeit die Reparaturprozesse ihr größtes Ausmaß annehmen. *In vivo* zeigt Vimentin nach 2 Tagen die höchste Expression, die anschließend wieder abnimmt und somit auf eine temporäre Dedifferenzierung der Zellen hindeutet (Abb. 6). In einem weiteren Experiment sind jeweils nach 2, 6 und 10 Tagen Proteinlysate gewonnen worden, um mittels Immunoblots eine semi-quantitative Aussage bezüglich des zeitlichen Verlaufs zu erhalten. Zwei Tage nach der Zellschädigung scheint die Dedifferenzierung *in vivo* bereits stark ausgeprägt zu sein, was die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt (Abb. 6). Im Verlauf ist die Expression des Vimentin rückläufig, was für eine erneute Differenzierung spricht. Des Weiteren wurde die Expression von PCNA untersucht, die einen ähnlichen Verlauf aufweist und auf eine temporär erhöhte Proliferationsrate hindeutet. Daraufhin wurden in weiteren *in vivo* Experimenten eine Reperfusionzeit von 2 Tagen infolge der temporären Ischämie verwendet.

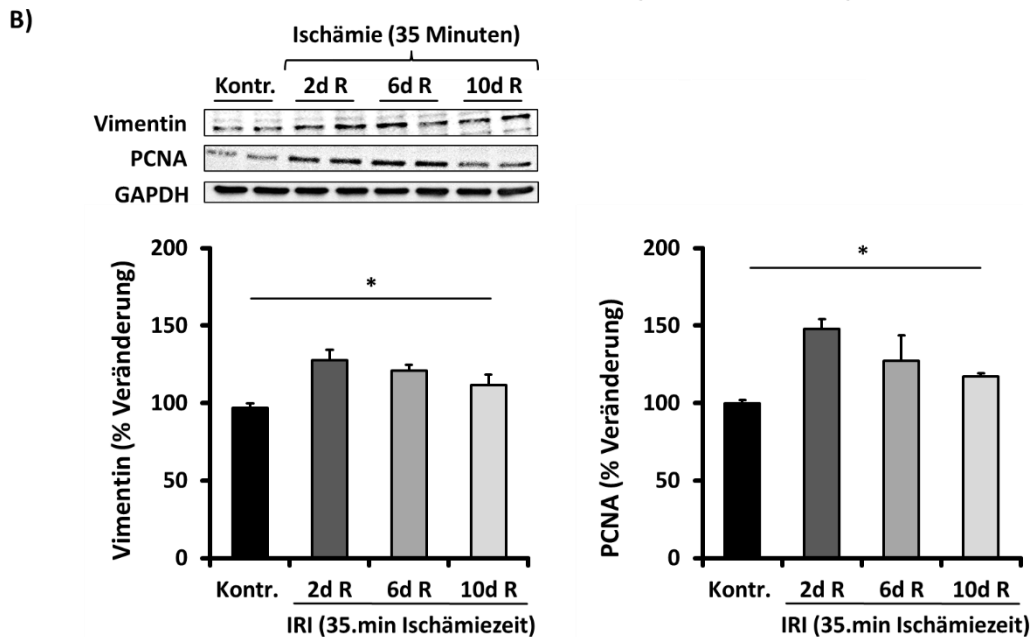
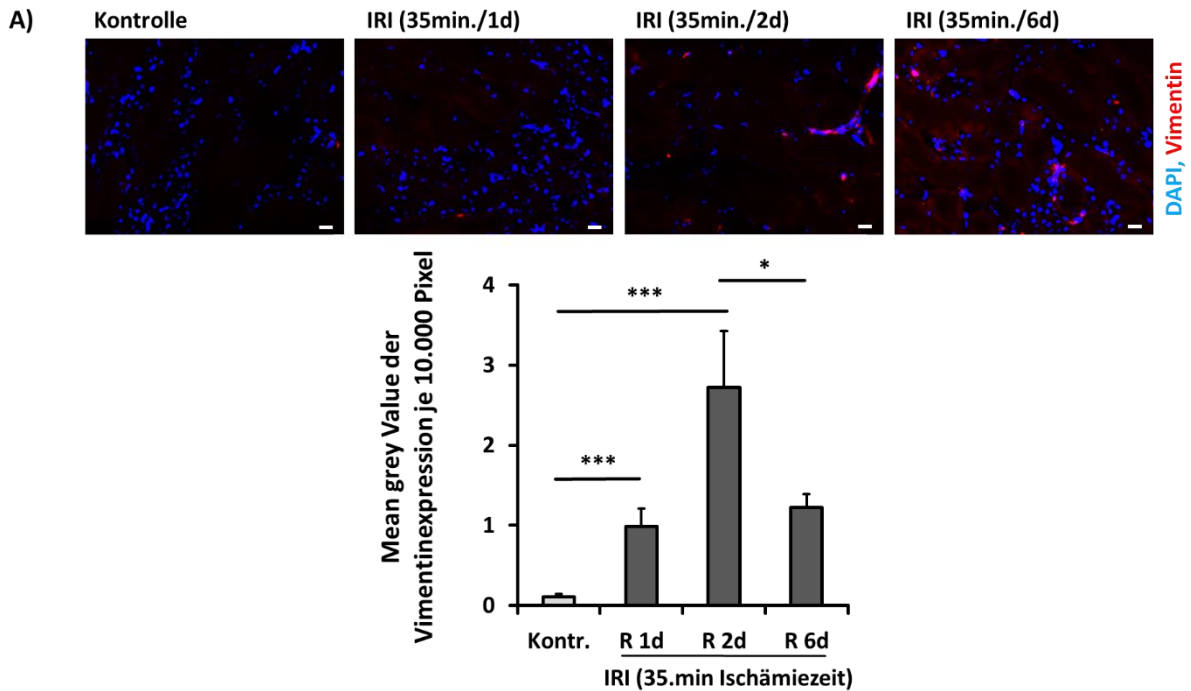


Abbildung 6: Physiologischer Regenerationsprozess *in vivo* nach IRI

- A) Immunfluoreszenzfärbung für den Dedifferenzierungsmarker Vimentin (rot) von Wildtyp Mäusen. Im Rahmen der IRI wurden die Wildtyp Mäuse einer bilateralen Ischämie für 35 Minuten ausgesetzt und im Anschluss nach 1, 2 und 6 Tagen Reperfusion untersucht. Nach 2 Tagen ist die Expression des Vimentin am höchsten und nimmt im Verlauf bis Tag 6 wieder ab (Die Hilfsmarkierung im Bild repräsentiert 50 μ m). Die Quantifizierung des Mean grey value der Vimentinexpression je Hauptgesichtsfeld (HPF) verdeutlicht die Unterschiede. Es wurden 5 Mäuse pro Gruppe untersucht; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 (t -Test).
- B) Repräsentative Immunoblots für die Expression von Vimentin und PCNA in Gewebelysaten von Wildtyp Mäusen. Es sind eine 35-minütige Ischämiedauer und anschließend unterschiedliche Reperfuionszeiten angewendet worden. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von Vimentin und PCNA nach 2 Tagen, die nach 6 und 10 Tagen rückläufig war. Zusätzlich verdeutlichen Quantifizierungen der Blots Expressionsänderungen nach Normierung mit Hilfe von GAPDH. Es wurden 6 Mäuse pro Gruppe untersucht; * p < 0,05; ** p < 0,01 (ANOVA).

3.2. aPC verbessert die Regenerationsfähigkeit bei persistierender Hyperglykämie *in vitro*

Die in den Abbildungen 5 und 6 präsentierten Daten zeigen den Vorgang der Regeneration infolge einer akuten Schädigung ohne renale Vorschädigung. Als zentraler Aspekt dieser Arbeit wurde der Einfluss einer chronisch bestehenden Zellschädigung auf diesen physiologischen Prozess untersucht. Aus medizinischer Sicht ist die dNP als Folge einer persistierenden HG ein Beispiel für eine solche chronische Vorschädigung. Zunächst wurde *in vitro* die HG durch Zugabe von Glucose in das Zellkulturmedium simuliert. Vor dem Induzieren der akuten Schädigung durch Hypoxie und Reperfusion (6 h/6 h) ist eine Glukoseinkubation für 24 Stunden erfolgt. Dieses Vorgehen ermöglicht eine Aussage über die Regeneration bei einer Kombination aus chronischer und akuter Schädigung. Zusätzlich ist untersucht worden, ob aPC einen Effekt auf die H/R-Schädigung der tubulären Zellen hat. Um den Effekt der exogenen Applikation unter den gegebenen Bedingungen beurteilen zu können, ist bei einer Gruppe eine einstündige Inkubation mit aPC erfolgt (s. 2.2.1). Für die Experimente wurden BUMPT-Zellen verwendet (Abb. 7). Verglichen mit der akuten Schädigung reagieren die Zellen nach HG und H/R mit einer geringeren Dedifferenzierung, verdeutlicht durch eine verminderte Expression von Vimentin. Des Weiteren scheint die Vorbehandlung mit aPC einen protektiven Effekt darzustellen. Vimentin und PCNA werden verstärkt exprimiert, wodurch eine erhöhte Regenerationskapazität angezeigt wird. Hingegen ist die Expression von KIM-1 reduziert, was eine verminderte Zellschädigung repräsentiert (Abb. 7).

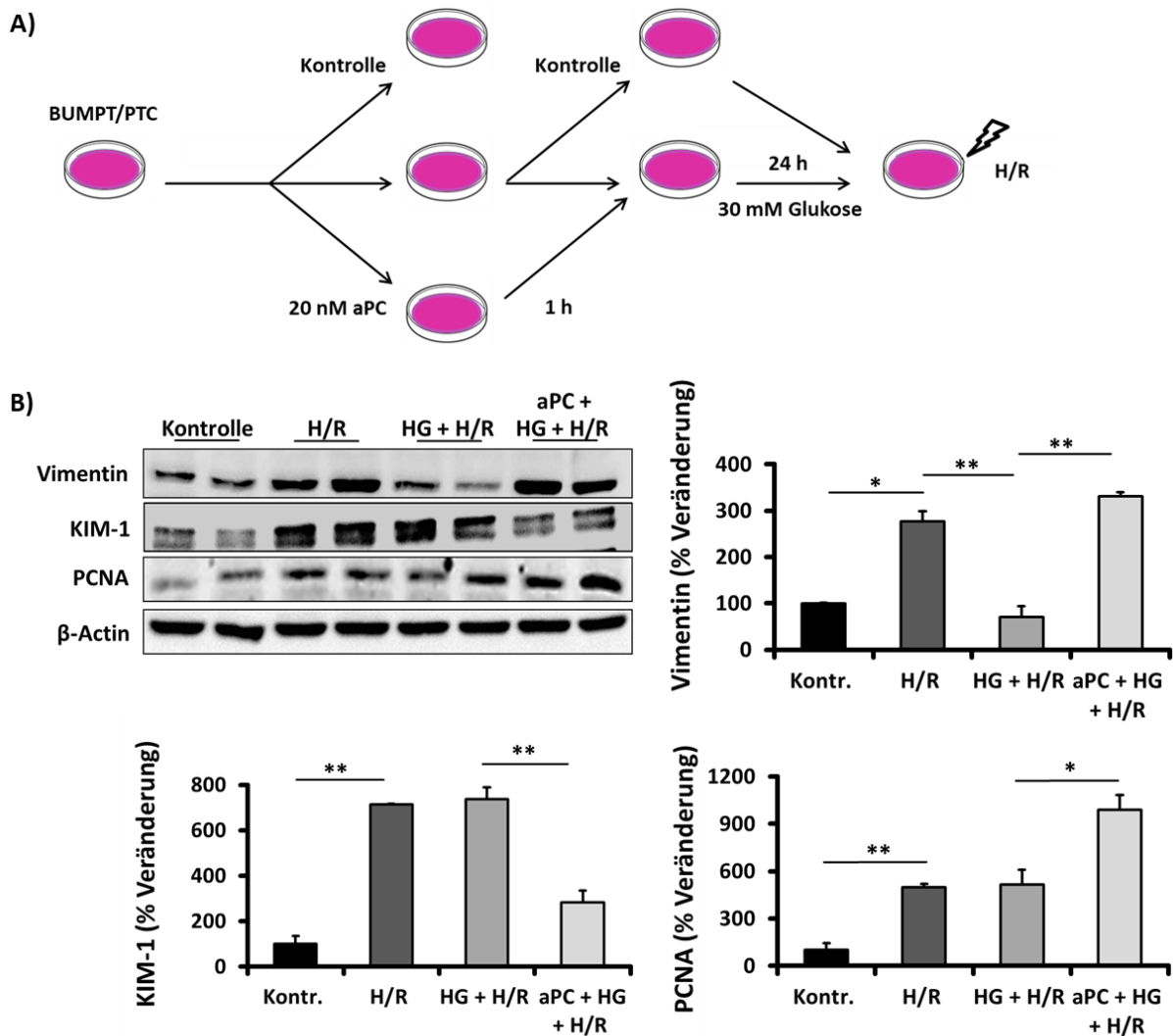


Abbildung 7: aPC verbessert die unter HG reduzierte Regenerationsfähigkeit nach H/R in BUMPTs

- A) Schematische Darstellung des Experimentalaufbaus im Vorfeld der Hypoxie und Reoxygenierung (H/R).
- B) Repräsentative Immunoblots für die Expression von Vimentin, KIM-1 und PCNA in BUMPT-Zellen. Die Zellen wurden 6 Stunden Hypoxie (H) und anschließend 6 Stunden Reoxygenierung (R) ausgesetzt. Teilweise ist eine 24 Stunden andauernde Inkubation mit Glukose (HG) vorausgegangen, um eine chronische Zellschädigung zu simulieren. Der Einfluss des TM-PC-Systems wurde durch die Vorbehandlung einer Gruppe mit aPC untersucht. Es zeigt sich, dass aPC eine Wiederherstellung der Regenerationsfähigkeit, gemessen an der Expression von Vimentin und PCNA, ermöglicht und protektiv in Folge der akuten Schädigung wirkt. Zusätzlich verdeutlichen Quantifizierungen der Immunoblots Expressionsänderungen nach Normierung mit Hilfe von β -Actin. Diese Abbildungen fassen Daten von 3 unabhängigen Experimenten zusammen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t-Test).

Zusammenfassend werden bei persistierender HG eine verminderte Dedifferenzierung und Proliferation sowie damit einhergehend eine schlechtere Regeneration nach akuten ischämischen Ereignissen beobachtet. Als mögliche Ursache kommt dabei der CDK-Inhibitor p21 in Frage. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass p21 nicht nur unter persistierender HG *in vitro*, sondern auch in Tiermodellen mit einem induzierten DM vermehrt exprimiert wird. Das p21 vermittelt bei Aktivierung unter anderem einen Zellzyklusarrest und fördert bei dauerhaft erhöhter Expression Zellalterungsprozesse. Diese sind mit der Induktion eines Seneszenzphänotyps assoziiert, der eine vermehrte Bildung von EZM fördert und ein proinflammatorisches Milieu induziert. Somit schränkt eine dauerhaft erhöhte p21-Expression die Zellteilung nach erlittener Gewebsschädigung ein. Der Einfluss der HG auf die p21-Expression ist durch Zugabe von Glukose in das Zellkulturmedium untersucht worden. Dabei wurden die Zellen 12, 24 und 48 Stunden inkubiert, um eine Aussage über die Abhängigkeit von Dauer der HG und entsprechender p21-Expression treffen zu können. Es zeigt sich eine zunehmende Expression mit steigender Inkubationsdauer, die eine Ausbildung des Seneszenzphänotyps widerspiegelt (Abb. 8). In diesem Mechanismus könnte die protektive Wirkung des aPC, welches die Expression von p21 und dessen vorgeschaltetem Regulator p53 reduzieren kann, begründet sein (32, 39). Erneut wurden Zellen einem Modell der akuten auf chronischen Nierenschädigung ausgesetzt und dabei eine Gruppe im Vorfeld mit aPC inkubiert. Es zeigt sich dabei eine signifikante Verringerung der Expression beider Proteine (Abb. 8). Schlussfolgernd sollte das Aufheben des Zellzyklusarrests so wiederum für eine adäquate Regeneration sorgen und die pathologischen Veränderungen der HG kompensieren.

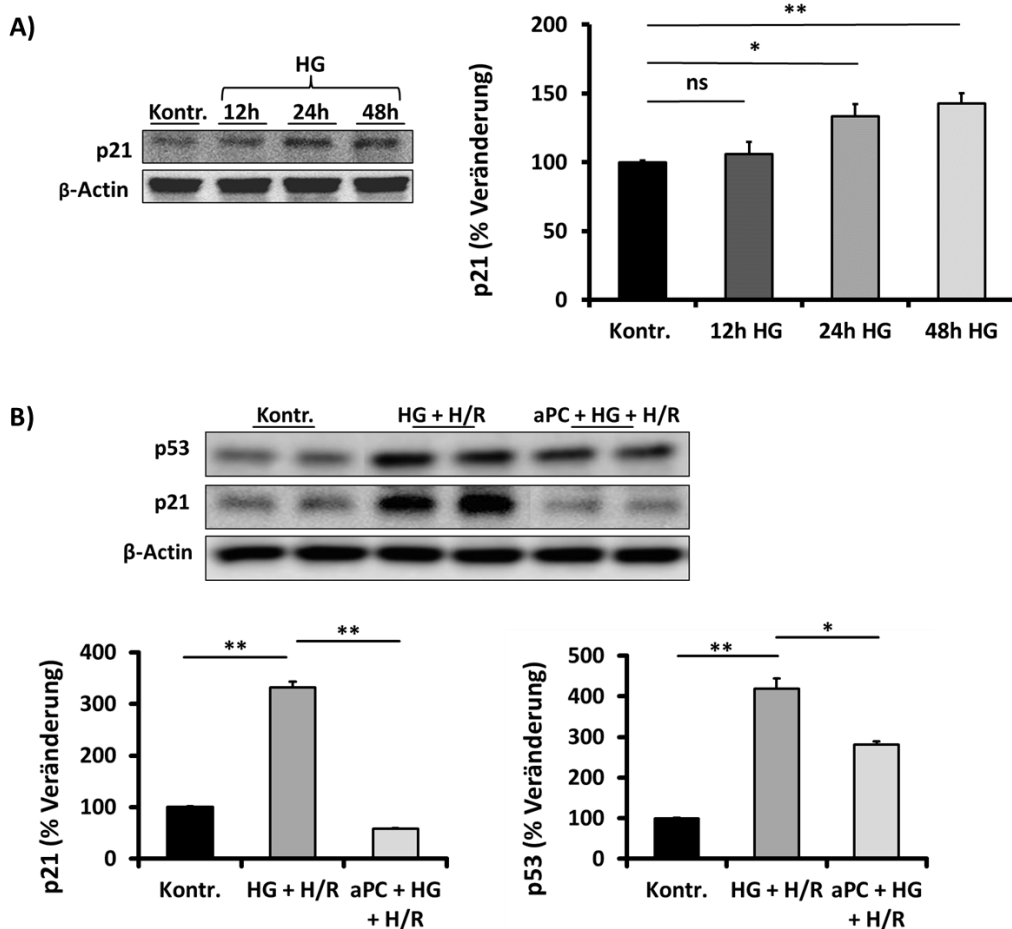


Abbildung 8: **aPC hebt *in vitro* den p21-induzierten Zellzyklusarrest auf**

- A) Repräsentativer Immunoblot für die Expression des Seneszenzmarkers p21 in BUMPT-Zellen. Darstellung des Verlaufs der Expression von p21 in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Glukose. p21 zeigt eine steigende Expression bei zunehmender Inkubationsdauer. Zusätzlich verdeutlicht eine Quantifizierung des Blots Expressionsänderungen nach Normierung mit Hilfe von β -Actin. Diese Abbildungen fassen Daten von 3 unabhängigen Experimenten zusammen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (*t*-Test).
- B) Immunoblot für die Expression von p53 und p21 in BUMPT-Zellen. Die Zellen wurden 6 Stunden Hypoxie (H) und anschließend 6 Stunden Reoxygenierung (R) ausgesetzt. Teilweise ist eine 24 Stunden andauernde Inkubation mit Glukose (HG) vorausgegangen, um eine chronische Zellschädigung zu simulieren. Der Einfluss des TM-PC-Systems wurde durch die Vorbehandlung einer Gruppe mit aPC untersucht. Aktiviertes Protein C ist in der Lage, p53 zu inhibieren, woraus eine verringerte Expression des p21 resultiert. Im Vergleich zur Gruppe ohne aPC-Inkubation sind die Seneszenzeigenschaften folglich reduziert. Zusätzlich verdeutlichen Quantifizierungen der Blots Expressionsänderungen nach Normierung mit Hilfe von β -Actin. Diese Abbildungen fassen Daten von 3 unabhängigen Experimenten zusammen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (*t*-Test).

3.3. aPC reduziert die Nierenzellschädigung durch Verminderung der DDR

Der Mechanismus, durch den aPC die p21-Expression reduziert, ist bislang nicht definiert. Deshalb haben wir versucht, in der DNA-Schädigung einen möglichen Erklärungsansatz zu finden. Das p53 und p21 werden im Rahmen der DDR aktiviert und induzieren einen Zellzyklusarrest. Ein Schlüsselprotein

der DDR ist dabei γ -H2AX, welches als Marker für DNA-Schäden beschädigtes Chromatin anzeigt. Um einen möglichen Zusammenhang mit der aPC-Wirkung darzustellen, haben wir erneut eine HG (24 h) in BUMPT-Zellen induziert und anschließend diese einer H/R (6 h/6 h) ausgesetzt. In der Immunfluoreszenzfärbung für γ -H2AX zeigte sich bei der Gruppe, die im Vorfeld mit aPC inkubiert wurde, eine verringerte γ -H2AX-Expression (Abb. 9). Damit wird deutlich, dass das Ausmaß der DNA-Schädigung geringer ist, was als Erklärungsansatz für die protektive Wirkung des aPC fungieren kann.

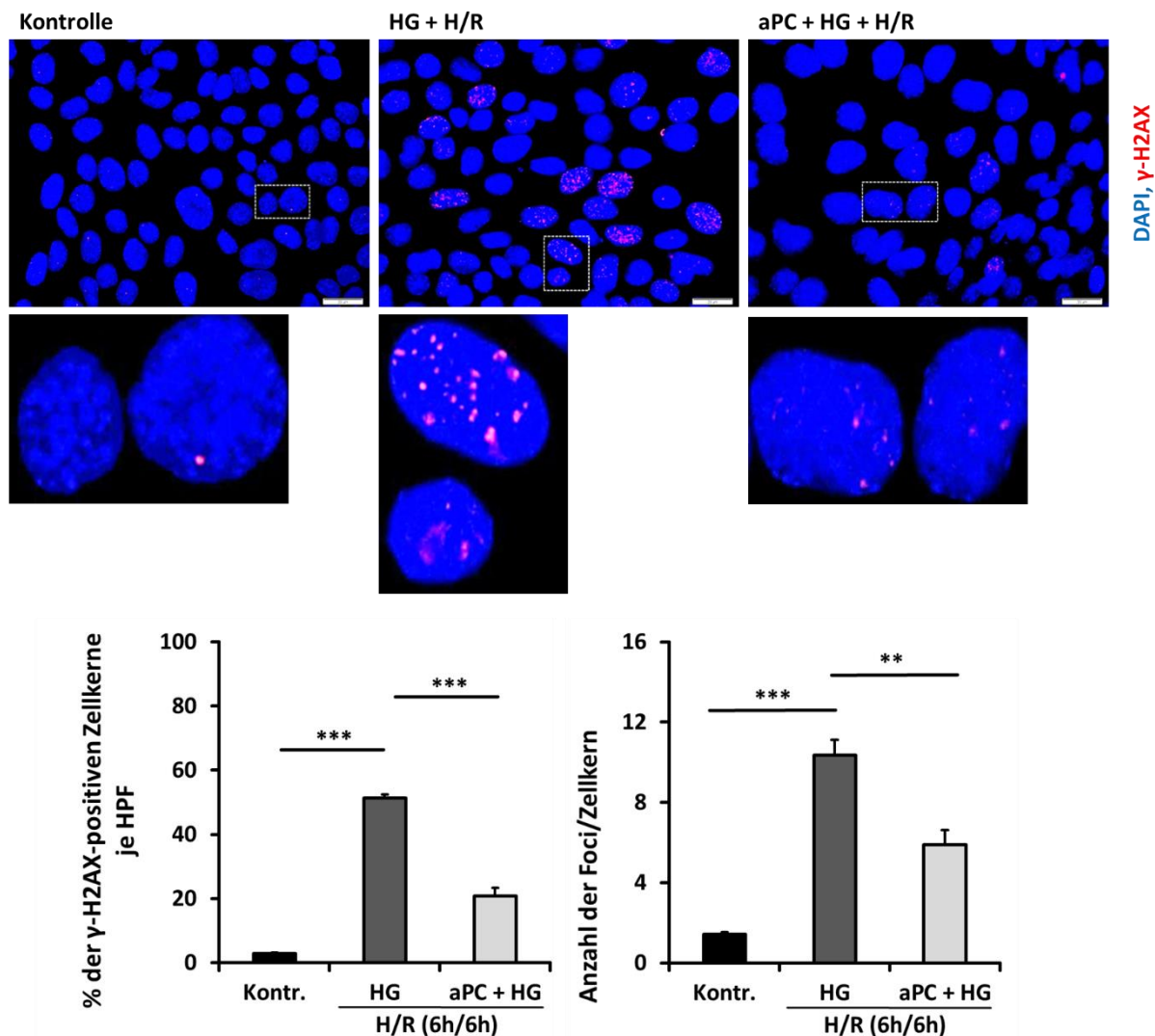


Abbildung 9: aPC reduziert oxidative DNA-Schäden bei H/R und HG

Immunfluoreszenzfärbung für γ -H2AX als Marker für DNA-Schäden (rot) bei BUMPT-Zellen inklusive Detailaufnahmen einzelner Zellkerne. Die Zellen wurden 6 Stunden Hypoxie (H) und anschließend 6 Stunden Reoxygenierung (R) ausgesetzt. Teilweise ist eine 24 Stunden andauernde Inkubation mit Glukose (HG) vorausgegangen, um eine chronische Zellschädigung zu simulieren. Der Einfluss des TM-PC-Systems wurde durch die Vorbehandlung einer Gruppe mit aPC untersucht (Die Hilfsmarkierung im Bild repräsentiert 20 μ m). Die Quantifizierung des prozentualen Anteils γ -H2AX-positiver Zellkerne je HPF sowie die Anzahl der Foci/Zellkern verdeutlicht die Unterschiede. Diese Abbildungen fassen Daten von 3 unabhängigen Experimenten zusammen; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t -Test).

3.4. aPC wirkt protektiv bei akuter Schädigung und vorhandener dNP *in vivo*

Auf Grundlage dieser Ergebnisse haben wir entschieden, den Einfluss des aPC auf den Regenerationsprozess nach akuter Schädigung bei chronischem Grundleiden in einem Tiermodell fortzuführen. Zunächst musste untersucht werden, welche Dauer einer Ischämie das Überleben der Versuchstiere bis zum Analysezeitpunkt gewährleistet. Gleichzeitig sollte diese Ischämie aber auch eine ausgeprägte akute Nierenschädigung hervorrufen. Deshalb wurde in 8 Wochen alten Wildtyp C57BL/6J Mäusen eine diabetische Stoffwechsellage induziert und nach 16 Wochen eine bilaterale IRI mit variabler Ischämiedauer durchgeführt. Mit 29 Minuten Ischämie ist die Überlebensrate der Versuchstiere am größten gewesen. Basierend auf diesen Ergebnissen ist die weitere Planung des Vorgehens erfolgt.

Erneut wurde ein DM in 8 Wochen alten Wildtyp Mäusen induziert. Nachdem die Versuchstiere eine dNP entwickelt hatten, erfolgte in einer Gruppe die Vorbehandlung mit aPC über 2 Wochen. Gleichermaßen wurde die Vorbehandlung auch in einer gesunden Kontrollgruppe angewendet. Im Anschluss wurde die IRI durchgeführt und sowohl funktionelle Parameter bestimmt als auch Gewebe histologisch untersucht (Abb. 10).

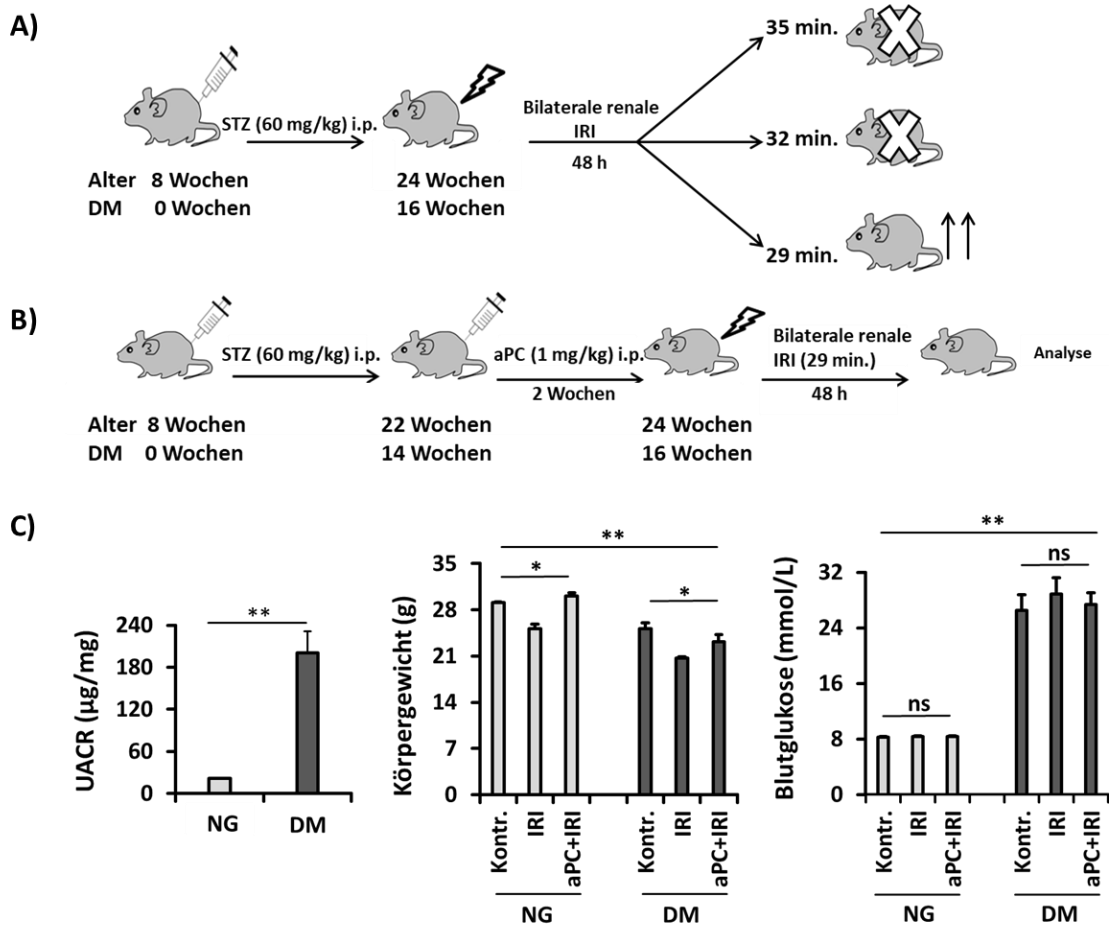


Abbildung 10: Induktion eines diabetischen Phänotyps und IRI für die *in vivo* Untersuchung

- A) Darstellung des Optimierungsprozesses bei der Durchführung der IRI. Als Ischämiezeit wurden 29 Minuten festgelegt, da dadurch neben einer ausreichenden Gewebsschädigung ein Überleben der Versuchstiere ermöglicht werden konnte.
- B) Schematische Darstellung der Vorgehensweise im *in vivo* Experiment.
- C) Analyse der Blut- und Urinproben von Wildtyp Mäusen. Nachweis für das Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage mit dNP durch Quantifizierung des UACR, dem Verhältnis von Albumin und Kreatinin im Urin. Die Mittelwerte der Kontroll- und DM-Mäuse wurden verglichen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit normalen Glukosespiegeln (NG) zeigen die Tiere mit DM eine deutliche chronische Nierenschädigung; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (*t*-Test). Der Vergleich des Körpergewichts innerhalb der NG-beziehungsweise DM-Gruppen zeigt einen signifikanten Unterschied auf, der sich durch die IRI ergibt. Außerdem weisen die DM-Mäuse im Durchschnitt ein signifikant niedrigeres Körpergewicht auf. Des Weiteren zeigt die Gegenüberstellung der Blutglukosewerte zum Zeitpunkt der Analyse keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppen, allerdings deutlich höhere Blutglukosewerte der DM-Gruppe im Gegensatz zur NG-Gruppe (Kontrollgruppen $n = 6$, übrige Gruppen $n = 4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA).

Diese Daten veranschaulichen das Vorliegen eines deutlich ausgeprägten Phänotyps des DM. Damit einhergehend ist eine chronische Schädigung des Nierengewebes im Sinne einer dNP zu erwarten. Wichtige histopathologische Merkmale sind dabei eine Erweiterung des Innendurchmessers der Tubuli und vorhandene Zellnekrosen. Die PAS-Färbung zur histologischen Beurteilung des Tubulussystems zeigt bereits ohne Anwendung der IRI Unterschiede zwischen der NG- und der DM-Kontrollgruppe, die auf eine dNP hinweisen. Noch gravierender präsentieren sich diese Unterschiede infolge der IRI, durch die es zu einer starken Erweiterung der Tubuli und vermehrten Zellnekrosen kommt (Abb. 11). Dadurch wird eindrücklich dargestellt, wie viel Einfluss die vorbestehende dNP auf das Ergebnis eines akut eintretenden ischämischen Ereignisses hat. Die NG IRI-Gruppe präsentiert deutlich geringere gewebe-pathologische Korrelate der Ischämie als die DM IRI-Gruppe. Erfreulicherweise konnte durch die aPC-Vorbehandlung die Schädigung des tubulären Kompartiments reduziert und die Integrität des Tubulussystems verbessert werden. Dies spiegelt sich auch in der Expression von p21 und KIM-1 wider. Die Durchführung eines Immunoblots zeigt in der DM IRI + aPC-Gruppe eine Abnahme der p21 und KIM-1-Expression im Vergleich zur DM IRI-Gruppe (Abb. 11). Es ist hierbei anzunehmen, dass der Zellzyklusarrest nach aPC-Vorbehandlung aufgehoben wurde und die exzessive Zellschädigung reduziert werden konnte.

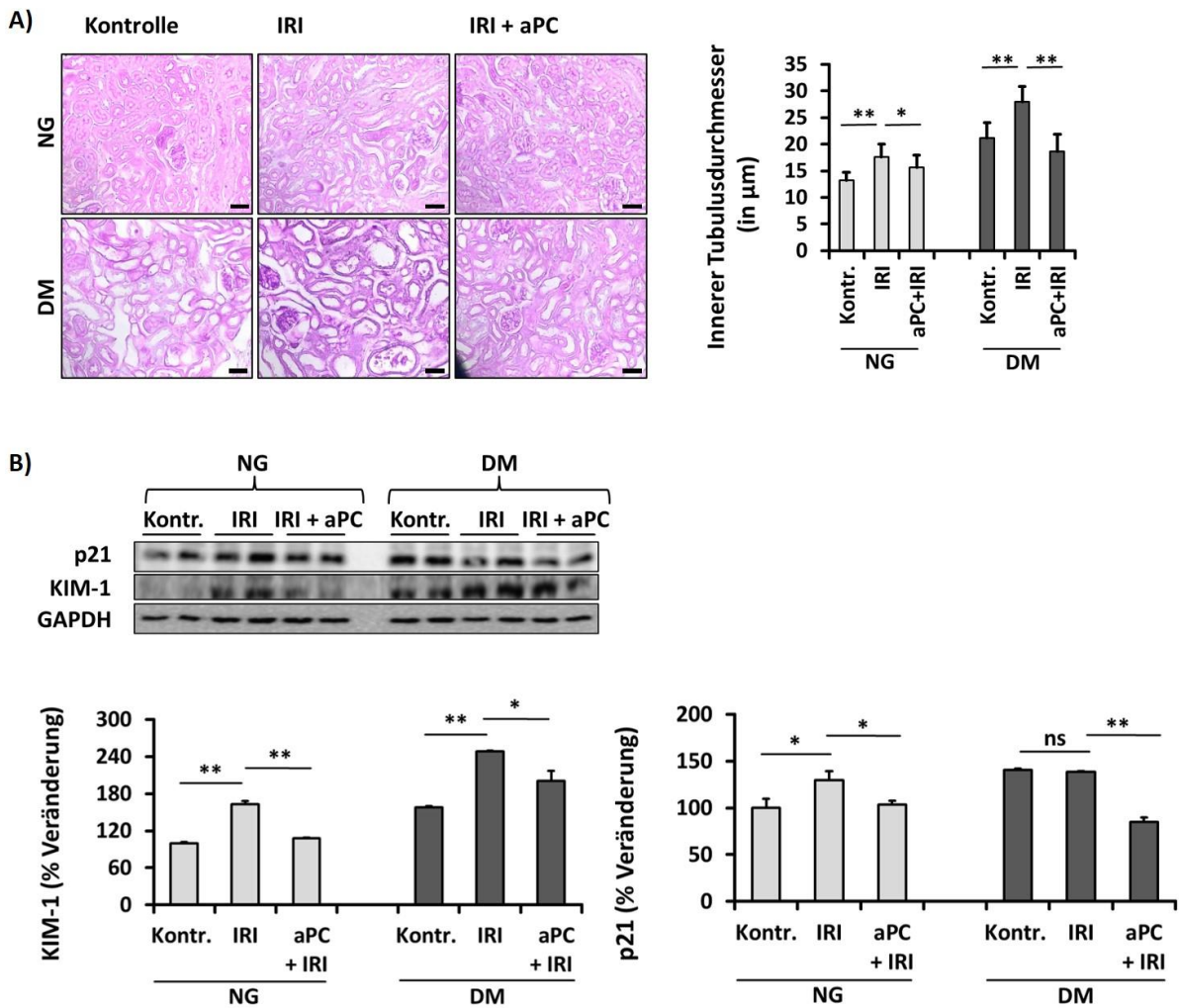


Abbildung 11: aPC vermindert die Gewebsschäden infolge einer bei dNP schwereren Ischämie

- A) PAS-Färbung der Gewebeschnitte zur Darstellung des Tubulussystems von Wildtyp Mäusen. Kontrollgruppe und Gruppe mit diabetischem Phänotyp wurden der IRI ausgesetzt und dabei zum Teil mit aPC vorbehandelt. Die Tubuli erscheinen nach IRI deutlich erweitert und es können vermehrt Zellnekrosen beobachtet werden. aPC verbessert den Phänotyp (Die Hilfsmarkierung im Bild repräsentiert 50 μ m). Die Quantifizierung des inneren Tubulusdurchmessers verdeutlicht die Unterschiede und den Effekt von aPC (Kontrollgruppen n = 6, übrige Gruppen n = 4); * p < 0,05; ** p < 0,01 (t -Test).
- B) Immunoblot für die Expression von p21 und KIM-1 von den gewonnenen Gewebelysaten. Kontrollgruppe und Gruppe mit diabetischem Phänotyp wurden der IRI ausgesetzt und dabei zum Teil mit aPC vorbehandelt. aPC verringert sowohl die p21 als auch die KIM-1-Expression. Zusätzlich verdeutlichen Quantifizierungen der Immunoblots Expressionsänderungen nach Normierung mit Hilfe von GAPDH (Kontrollgruppen n = 6, übrige Gruppen n = 4); * p < 0,05; ** p < 0,01 (t -Test).

Aufgrund unserer Daten gehen wir davon aus, dass die Tubuluszellen in ihrer Regeneration durch einen p21-induzierten Zellzyklusarrest und somit verstärkter Zellalterung eingeschränkt sind. Um diese Hypothese durch experimentelle Arbeit zu stützen, erfolgte eine immunhistochemische Färbung für p21. Neben den histologischen Veränderungen, wie der Erweiterung des Tubulusdurchmessers im

Vergleich zur Kontrollgruppe, zeigt die Färbung eine verstärkte Expression von p21 in der DM und der DM IRI-Gruppe. Das aPC reduziert die Expression von p21 und erhöht somit die Zellplastizität (Abb. 12).

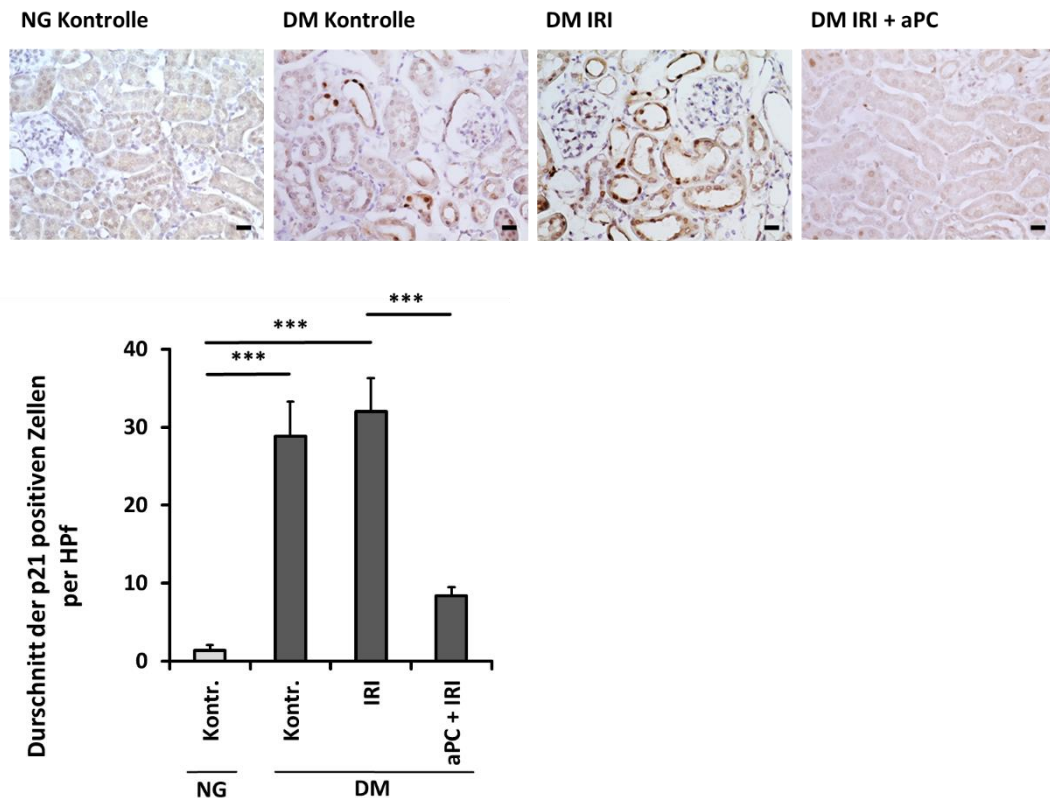


Abbildung 12: aPC reduziert die IRI-induzierte p21-Expression der Niere *in vivo*

Immunhistochemische Färbung für einen Marker des Zellzyklusarrests p21 (dunkelbraun) in Gewebeschnitten von Wildtyp C57BL/6 Mäusen. Es erfolgte ein Vergleich der NG-Kontrollgruppe und Gruppen mit DM, die teilweise der IRI ausgesetzt beziehungsweise zusätzlich mit aPC vorbehandelt wurden. Es zeigte sich eine erhöhte Expression unter diabetischer Stoffwechsellage, die durch die aPC-Applikation verringert werden konnte (Die Hilfsmarkierung im Bild repräsentiert 50 μ m). Die Quantifizierung des inneren Tubulusdurchmessers verdeutlicht die Unterschiede und den Effekt von aPC. Es wurden 3 Versuchstiere pro Gruppe untersucht; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (t -Test).

Als Konsequenz der geschädigten Gewebestruktur entsteht ein Funktionsverlust des Nierenparenchyms. Insgesamt ergibt sich funktionell das Bild einer Niereninsuffizienz. Charakterisiert werden kann dies unter anderem durch den Nachweis eines erhöhten Quotienten von Nierengewicht zu Körpergewicht im Rahmen einer Ödembildung als Reaktion auf die Schädigung. Des Weiteren kann mit Hilfe der Analyse von Retentionsparametern wie dem *Blood-Urea-Nitrogen* (BUN) eine verminderte Nierenfunktion durch die dNP und darauffolgende Ischämie bestätigt werden. Die Applikation von aPC verbessert insbesondere in der DM-Gruppe die funktionellen Parameter (Abb. 13).

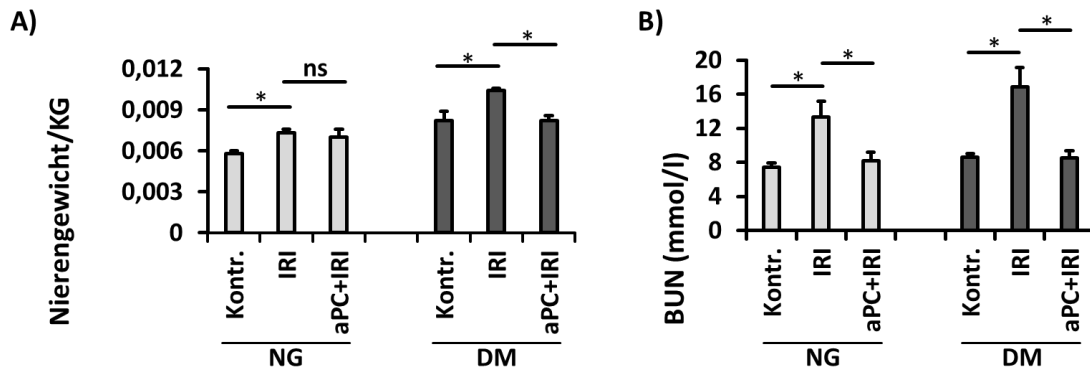


Abbildung 13: Funktionelle Beeinträchtigung des Nierenparenchyms wird durch aPC reduziert

- A) Quantifizierung des Verhältnisses von Nierengewicht zu Körpergewicht von Wildtyp Mäusen der Versuchsgruppen des beschriebenen Experiments. Es zeigt Organveränderungen im Sinne einer Hypertrophie im Rahmen der dNP beziehungsweise einer Ödembildung als Konsequenz der IRI an. aPC kann dabei positiven Einfluss auf die Organstruktur bei dNP nehmen und verhindert eine übermäßige Hypertrophie der Niere (Kontrollgruppen n = 6, übrige Gruppen n = 4); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t-Test).
- B) Quantifizierung der Retentionsparameter aus dem Blut von Wildtyp Mäusen der Versuchsgruppen des beschriebenen Experiments. BUN zeigt die deutlich verschlechterte Nierenleistung an, die aus der IRI resultiert. Die aPC-Vorbereitung kann diese wiederherstellen (Kontrollgruppen n = 6, übrige Gruppen n = 4); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t-Test).

Das Nierengewebe besitzt physiologischer Weise die Fähigkeit, bis zu einem gewissen Grad der Schädigung eine Defektheilung zu initiieren. Dabei wird durch die Noxe ein Reparaturmechanismus induziert, der sich durch eine Dedifferenzierung und erhöhte Teilungsraten der Tubuluszellen äußert. Zur Darstellung der sich proliferierenden Zellen wurde die Immunfluoreszenzfärbung für den Proliferationsmarker Ki-67 durchgeführt. Ki-67 ist ein Protein, welches sich während der Zellteilung auf der Oberfläche des Chromosoms befindet und dort als Nachweis sich teilender Zellen genutzt werden kann. Es zeigt sich eine erhöhte Zahl Ki-67 positiver Zellen in der NG IRI-Gruppe im Vergleich zur NG-Kontrollgruppe. Dies spiegelt die physiologische Regeneration nach akuter Schädigung wider. Hingegen sind die Änderungen in der DM-Gruppe nicht signifikant. Hierdurch wird erneut verdeutlicht, dass vorgeschädigte Zellen durch eine zunehmende Seneszenz und Zellzyklusarrest eine reduzierte Teilungskapazität besitzen. Das aPC erhöht die Zahl der Ki-67 positiven Zellen in der DM IRI + aPC-Gruppe signifikant und scheint somit den Zellzyklusarrest aufzuheben (Abb. 14). Ähnlich deutliche Veränderungen können in der Expression von PCNA beobachtet werden. In dem durchgeführten Immunoblot zeigt sich eine zunehmende Zellproliferation in der NG-Gruppe infolge der IRI, wohingegen diese in der DM IRI-Gruppe ausbleibt. Ebenfalls ist aPC hier in der Lage, die PCNA-Expression zu erhöhen und signalisiert somit eine vermehrte Teilungsbereitschaft der Zellen (Abb. 14).

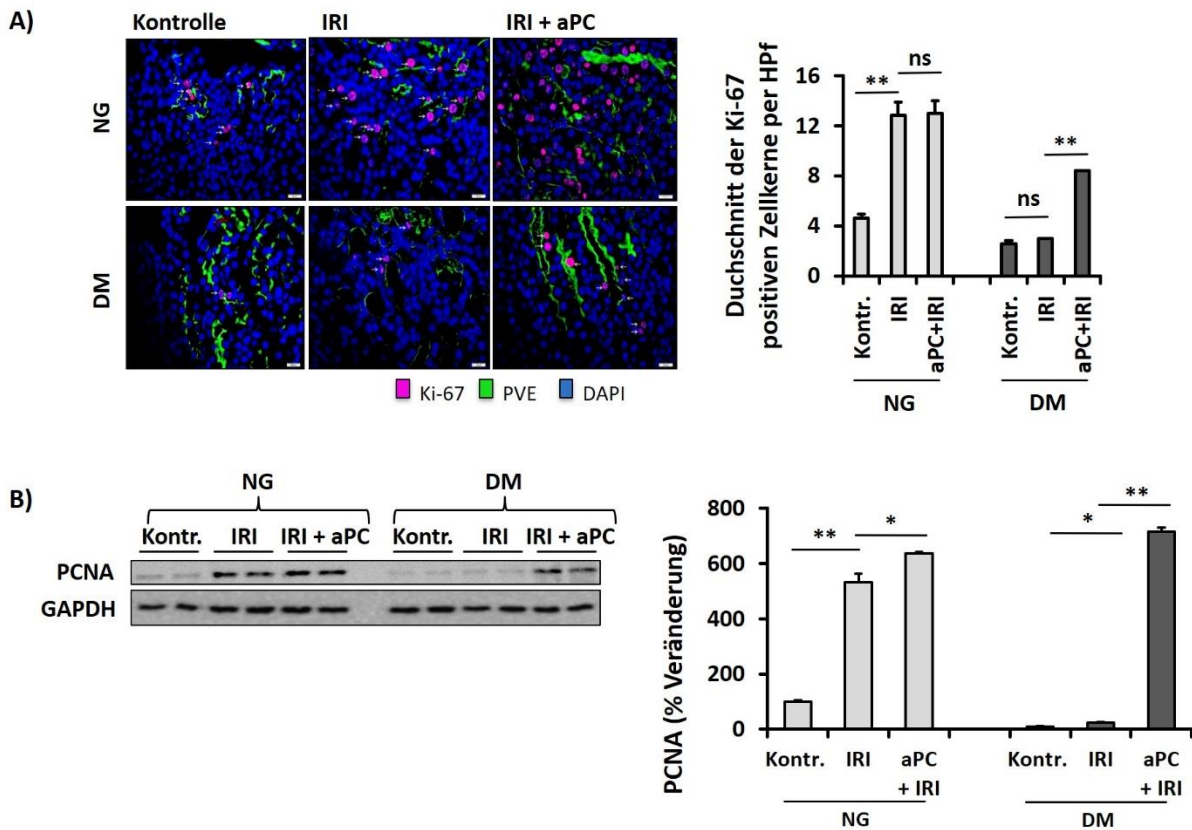


Abbildung 14: Regenerationsfähigkeit des tubulären Systems nach IRI wird durch aPC verbessert

- A) Doppelte Immunfluoreszenzfärbung für den Proliferationsmarker Ki-67 (pink) und PVE (grün) als spezifische Anfärbung des Bürstensaums der Tubuluszellen von Wildtyp Mäusen. Kontrollgruppe und Gruppe mit diabetischem Phänotyp wurden der IRI ausgesetzt und dabei zum Teil mit aPC vorbehandelt. Die IRI induziert eine verstärkte Zellproliferation zur Defektheilung in der NG-Gruppe. In der DM IRI-Gruppe ist die Zahl der Ki-67-positiven Zellen nicht signifikant gestiegen, kann aber durch aPC erhöht werden (Die Hilfsmarkierung im Bild repräsentiert 50 μ m). Die Quantifizierung der durchschnittlichen Ki-67 positiven Zellen pro Hauptgesichtsfeld (HPF) verdeutlicht die Unterschiede und den Effekt von aPC (Kontrollgruppen n = 6, übrige Gruppen n = 4); * p < 0,05; ** p < 0,01 (t -Test).
- B) Immunoblot für die Expression des Proliferationsmarkers PCNA von den gewonnenen Gewebelysaten. Kontrollgruppe und Gruppe mit diabetischem Phänotyp wurden der IRI ausgesetzt und dabei zum Teil mit aPC vorbehandelt. Die IRI induziert eine verstärkte Zellproliferation zur Defektheilung in der NG-Gruppe. PCNA ist in der DM IRI-Gruppe verringert exprimiert, kann aber durch aPC erhöht werden. Zusätzlich verdeutlichen Quantifizierungen der Blots Expressionsänderungen nach Normierung mit Hilfe von GAPDH (Kontrollgruppen n = 6, übrige Gruppen n = 4); * p < 0,05; ** p < 0,01 (t -Test).

Ein weiterer Aspekt, der in diesem Zusammenhang verdeutlicht wird, ist die Dedifferenzierung im Rahmen der Regeneration. Visualisiert wird dies durch das CFA. Nach IRI nimmt ein Teil der Zellen einen stammzellähnlichen Phänotyp an. Gekennzeichnet ist ein solcher Phänotyp unter anderem durch die Ausbildung von Zellkolonien, die sphärische Raumstrukturen annehmen. Dieser Prozess wird durch den Zellzyklusarrest gehemmt, ist jedoch durch aPC-Applikation wieder induzierbar (Abb. 15).

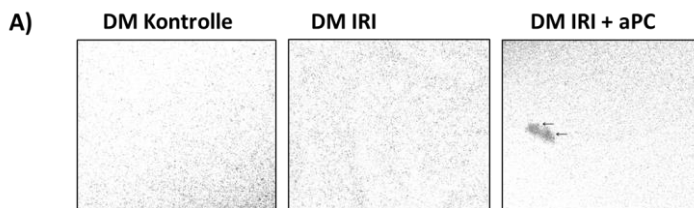


Abbildung 15: aPC induziert eine Koloniebildung nach IRI

- A) Repräsentatives Bild eines Colony-formation Assays (CFA) durchgeführt bei isolierten Tubuluszellen der Wildtyp DM-Mäuse. Es erfolgt ein Vergleich der DM-Kontrollgruppe mit den der IRI ausgesetzten beziehungsweise zusätzlich mit aPC vorbehandelten Gruppen. Das Formen von Zellkolonien zeigt die Annahme eines stammzellähnlichen Phänotyps während der Regeneration. Während die IRI bei DM keine Koloniebildung induzieren kann, ermöglicht die vorheriger aPC-Applikation das Formen von Zellkolonien.

Die gesammelten Daten bestätigen zum einen die Annahme einer verstärkten Gewebsschädigung durch die IRI bei bereits vorhandener chronischer Nierenschädigung im Rahmen einer dNP. Zum anderen veranschaulichen sie den nephroprotektiven Effekt der aPC-Applikation im Vorfeld einer akuten Nierenschädigung. Dabei zeigen *in vitro* sowie *in vivo* Ergebnisse die effektive Reduktion der p21-Expression. In diesem Zusammenhang wird die Zellplastizität durch die Annahme eines stammzellähnlichen Phänotyps wiederhergestellt und die Proliferationsrate gesteigert. Als Konsequenz daraus ergeben sich verbesserte histopathologische und funktionelle Eigenschaften.

4. Diskussion

Das Auftreten des akuten Nierenversagens stellt ein bedeutsames Risiko im klinischen Alltag dar. Dabei spielen in der Genese vor allem die Durchführung von Operationen mit einer temporären Ischämie, Antibiotikagaben oder die Applikation von Kontrastmittel bei bildgebenden Verfahren eine entscheidende Rolle. Besonders prädisponiert sind hierbei Patienten mit hohem Alter, DM, Übergewicht und weiteren Risikofaktoren (40). Wir konnten zeigen, dass eine chronische Vorschädigung des Gewebes die Regenerationskapazität bei einem akuten ischämischen Ereignis einschränkt. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass die Gerinnungsprotease aPC die Regenerationsfähigkeit positiv beeinflusst. Durch unsere Arbeit konnten wir nachweisen, dass aPC einen nephroprotektiven Effekt bei akuter Schädigung und vorbestehender Nierenerkrankung ausübt. Dabei wurde sowohl aus histopathologischer als auch rein funktioneller Sicht (Abb. 11, 13) eine signifikante Reduktion der Nierenschädigung durch Vorbehandlung mit aPC erreicht. Gleichzeitig ist auffällig, dass aPC in der Lage ist, die persistierend erhöhte p21-Expression sowohl *in vitro* (Abb. 8) als auch *in vivo* (Abb. 11, 12) zu senken. Die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass der dadurch gewährleistete Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus maßgeblich zur Defektheilung beitragen könnte. Ursächlich hierfür könnte zumindest anteilig die Reduktion der DNA-Schädigung sein (Abb. 9), die somit die Auswirkungen der DDR im Sinne einer vorzeitigen Seneszenz vermindert. Dabei ist es möglich, dass die aPC-vermittelte Hemmung der ROS-Bildung die DNA-Schädigung und somit die DDR verringert (30). Welcher genaue Mechanismus der protektiven Wirkung des aPC zu Grunde liegt, bleibt jedoch Gegenstand weiterer Experimente und Studien.

Bisher konnte bereits gezeigt werden, dass aPC erstens nephroprotektiv in der dNP (39) sowie zweitens bei akuter Nierenschädigung (35) wirkt. Unter physiologischen Bedingungen besitzt die Niere eine hohe regenerative Kapazität (10, 41), die bei akuter Nierenschädigung, zum Beispiel in Folge einer IRI, zur Rekonvaleszenz der Niere beiträgt. An dieser Stelle bleibt zu diskutieren, dass sich in bisherigen Studien unterschiedliche Ergebnisse zum Mechanismus der Regeneration nach einer akuten Schädigung des Nierengewebes finden lassen. Dieser ist letztlich nicht geklärt und weiterhin Gegenstand der Forschung. Einige Publikationen postulieren, dass eine kleine präformierte Pax2 positive Zellpopulation für die Regeneration des tubulären Kompartiments verantwortlich ist (42). Diese soll eine verminderte Vulnerabilität gegenüber schädigender Noxen aufweisen und im Anschluss durch eine gesteigerte Proliferation die Integrität des Gewebes wiederherstellen. Darüber hinaus wird von dem Phänomen der Endoreplikation gesprochen, die von Tubuluszellen ausgeht und mit einer Hypertrophie sowie einer Vervielfachung des genetischen Materials assoziiert ist, ohne dass eine Zellteilung erfolgt (42). Andere Studien zeigen konträre Ergebnisse. Es wird hier von einer Defektheilung durch Dedifferenzierung der überlebenden Zellen ausgegangen, die keine vorbestehende Zellpopulation darstellen und nach erfolgter Geweberegeneration wieder

differenzieren. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass alle Zellen in der Lage sind, in den Zellzyklus einzutreten. Im Rahmen der Dedifferenzierung nehmen die betroffenen Zellen einen stammzellähnlichen Phänotyp an (10). Dies stellt eine Theorie dar, die mit unseren Ergebnissen vereinbar wäre. Zum einen wurde im CFA eine Koloniebildung nur nach erfolgter IRI beobachtet und nicht unter physiologischen Kontrollbedingungen (Abb. 15). Zum anderen konnten wir eine temporäre Expression von Markerproteinen der Dedifferenzierung zeigen (Abb. 5, 6). Es bleibt bislang also nicht sicher geklärt, ob nur eine Stammzellpopulation durch das aPC positiv beeinflusst wird oder die Gesamtheit aller Zellen. Unabhängig von dieser Streitfrage konnten wir den positiven Effekt des aPC im Rahmen einer akuten und vorbestehenden chronischen Nierenschädigung nachweisen, wobei dies zur Erueierung der mechanistischen Hintergründe dieser kontroversen Thematik sicherlich eine Rolle spielen wird.

Die hohe Regenerationsfähigkeit der Niere unter physiologischen Bedingungen ist im Rahmen einer CKD, zum Beispiel der dNP, eingeschränkt (3). Eine vermutete Ursache aus unserer Sicht ist dabei die p21-induzierte Seneszenz. Dadurch lässt sich spekulieren, dass die mechanistischen Hintergründe in einer Kombination aus chronischer und akuter Nierenschädigung komplexer sind und sich von den Regenerationsprozessen in gesunden Organismen unterscheiden. Unter anderem wird dies durch die janusköpfige Funktion des p21 gezeigt.

Als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) besitzt p21 regulatorische Eigenschaften in Bezug auf den Zellzyklus und steuert unter anderem Zellalterungsprozesse. In der G1- und S-Phase kann durch p21 ein Zellzyklusarrest hervorgerufen werden, zum Beispiel als Reaktion auf schwerere DNA-Schäden. Außerdem sorgt das Vorhandensein von ROS, die bei einer persistierenden HG vermehrt gebildet werden, durch komplexe Mechanismen über p53 und p21 für die Entstehung von Seneszenz (21). Dieser Zellzyklusarrest führt dazu, dass nach einer zusätzlichen akuten Schädigung die Zellen in ihrem Bestreben zur Defektheilung eingeschränkt sind. Allerdings kann p21 auch in einem anderen Kontext erhöht sein. Wie in Abbildung 11 gezeigt, kommt es unter Normoglykämie bei IRI zu einer vermehrten Expression von p21. Dies lässt vermuten, dass die Regenerationsfähigkeit von der Dynamik der p21-Expression abhängt. Eine kurzfristige Erhöhung nach akuter Schädigung führt zu einem Zellzyklusarrest, welcher es ermöglicht, potenziell geschädigte DNA zu reparieren, bevor sich die Zellen teilen (18). In diesem Zusammenhang scheint eine temporäre Erhöhung der p21-Expression sogar protektiv zu wirken. Im Kontext der dNP hingegen handelt es sich um eine chronisch erhöhte Expression von p21, die in diesem Fall Zellalterungsprozesse vorantreibt und insgesamt einen negativen Einfluss auf die Regenerationskapazität ausübt (3). Unsere Ergebnisse bestätigen diese Theorie und heben die Relevanz einer chronischen Schädigung auf die Regenerationskapazität hervor (Abb. 16). Die gesammelten *in vivo* Daten veranschaulichen die Folgen einer solch eingeschränkten Regenerationsfähigkeit, wie man sie auch bei Patienten mit DM vermuten kann.

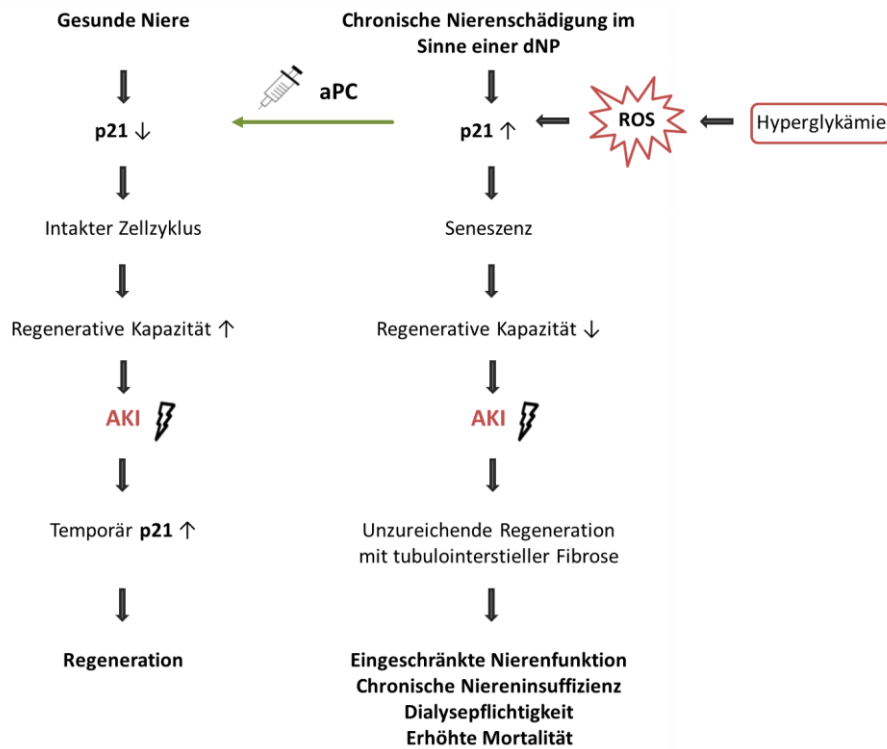


Abbildung 16: **Schema zur Darstellung der Kontextabhängigen p21-Expression**

Eine persistierende Hyperglykämie (HG) induziert Zellalterungsprozesse und vermindert die Regenerationsfähigkeit. Das aPC kann den Zustand der chronisch erhöhten p21-Expression aufheben und die regenerative Kapazität wiederherstellen.

Dabei repräsentiert unser Tiermodell den Zustand und die Folgen der veränderten Stoffwechsellage, wie sie beim Menschen mit pathologisch erhöhten Glukosewerten zu erwarten wären. Im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe ist bei den Versuchstieren mit DM das Ausmaß der Schädigung höher und die Regenerationsfähigkeit deutlich eingeschränkt, was sich auf histopathologischer Ebene zeigt und durch die gemessenen Funktionsparameter bestätigen lässt. Zu erwähnen ist dabei, dass der von uns induzierte STZ-bedingte DM eher einem DM Typ 1 entspricht. Die Entwicklung einer dNP verläuft in DM Typ 1 und 2 allerdings auf ähnliche Weise (2). Daher kann im Umkehrschluss auch von einem identischen Effekt des aPC ausgegangen werden, unabhängig von der Genese des DM. Die Vorbehandlung mit aPC konnte die erhöhte p21-Expression der Tiere mit DM reduzieren und die Regenerationsfähigkeit deutlich verbessern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorliegende Arbeit zum Effekt von aPC in der „acute-on-chronic“ Nierenschädigung eine therapeutische Zielstruktur aufzeigt, die es in der Arzneimittelforschung zu verfolgen gilt. Den bisher nur eingeschränkt therapierbaren Folgeerscheinungen des DM und der erhöhten Vulnerabilität für akute Schädigungen, könnten so durch innovative Therapieansätze neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnet werden. Mit unserem experimentellen Ansatz konnten wir nachweisen, dass eine Vorbehandlung mit aPC suffizient vor einer

folgenden akuten Schädigung schützt. Dadurch sehen wir Potential für die klinische Anwendung des aPC im Sinne einer Prophylaxe. Ein akutes Nierenversagen durch vorübergehende Ischämie ist eine häufige postoperative Komplikation, zum Beispiel nach komplizierten Operationen am Herzen. Abhängig von der Patientenpopulation wird in Studien von einem 7,7 - 40% Risiko für die Entwicklung eines ANV berichtet. Damit einhergehend nimmt das Mortalitätsrisiko deutlich zu. Besonderes Risiko für schwere Verläufe besteht dabei vor allem für Patienten mit bereits vorbestehender Nierenerkrankung, wie der dNP, übereinstimmend mit den *in vivo* Ergebnissen unserer Forschungsarbeit (40, 43). Unglücklicherweise ist dieses Patientenkontingent durch die kardiovaskulären Risikofaktoren besonders häufig von sekundären Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems betroffen, die einer Operation bedürfen (17). Dieser Zusammenhang verdeutlicht die Relevanz der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, um bei Risikopatienten die Nierenfunktion aufrechterhalten und Folgebehandlungen oder eine Dialysepflichtigkeit abwenden zu können. Dabei sollte zunächst durch weitere Forschungsarbeit der genaue Wirkungsmechanismus aufgedeckt und die Unbedenklichkeit des Einsatzes einer aPC-basierten Therapie an Menschen überprüft werden. Außerdem gilt es nach ischämischen Ereignissen Langzeitbeobachtungen durchzuführen, um langfristige Ergebnisse der Behandlung oder Prophylaxe mit aPC zu sammeln. Rekombinantes aPC (Drotrecogin) hat sich bereits kurzzeitig im klinischen Gebrauch im Rahmen der Sepsistherapie befunden. Es sollte durch seine antiinflammatorische und antikoagulatorische Wirkung Mikroembolien und somit Organschäden in der Sepsis und im septischen Schock verringern. Allerdings standen die antikoagulatorischen Nebenwirkungen im Sinne von starken Blutungen einem positiven Effekt entgegen, sodass sich diese Therapiestrategie nicht etablierte (44). Deshalb sollte zur Vorbeugung möglicher Wechsel- und Nebenwirkungen in Bezug auf die Hämostase dieser Effekt des aPC gehemmt werden. Hierfür gibt es bereits etablierte Methoden, die auf eine spezifische antikörpervermittelte (HAPC1573) Blockierung der antikoagulatorischen Wirkung, bei Erhalt der zytoprotektiven, da Rezeptor-abhängigen, Effekte beruhen (35). Die antikoagulatorischen und zytoprotektiven Eigenschaften des aPC werden durch verschiedene Domänen des Proteins vermittelt, sodass eine Trennung dieser Eigenschaften durch gezielte Veränderungen des Proteins möglich ist. So wird bereits eine rein zytoprotektive Form des aPC (3K3A-aPC) im Rahmen ischämischer Schlaganfälle klinisch erprobt. Erste Studien an gesunden Probanden bestätigen die fehlenden antikoagulatorischen Eigenschaften und zeigen das Auftreten nur geringer Nebenwirkungen (45). Aktuell laufen Phase II Studien mit dieser Substanz. Des Weiteren werden Medikamente wie z.B. Parmodulin, welches über eine direkte Interaktion mit PAR-1 antiinflammatorisch wirkt, in klinischen Studien erforscht. Diese Entwicklung weckt die Hoffnung, dass der von uns beobachtete nephroprotektive Effekt des aPC in Zukunft in der Prophylaxe oder Therapie des akuten Nierenversagens Beachtung findet und die Durchführung weiterer klinischer Studien angeregt wird.

5. Zusammenfassung

Das akute Nierenversagen (ANV) stellt ein schwerwiegendes Krankheitsbild im klinischen Alltag dar und kann durch eine Vielzahl verschiedener Ursachen hervorgerufen werden. Dabei hängt die Häufigkeit und der Schweregrad der Nierenschädigung entscheidend von den Vorerkrankungen und dem aktuellen Gesundheitszustand der Patienten ab. Während 5 - 10% der hospitalisierten Patienten auf peripheren Normalstationen von einer akuten Nierenschädigung betroffen sind, beläuft sich der Anteil der Intensivpatienten mit ANV auf bis zu 60% (26). Darüber hinaus prädisponiert eine bereits vorbestehende chronische Nierenerkrankung (CKD) für das Auftreten von akuten Schädigungen und verringert das Regenerationspotential der Niere. Eine zunehmende Bedeutung wird in diesem Zusammenhang der diabetischen Nephropathie (dNP) im Rahmen eines Diabetes Mellitus (DM) zugeschrieben. Sie stellt in westlichen Industrienationen die häufigste Ursache für eine CKD dar (3). Die ansonsten hohe Regenerationsfähigkeit, insbesondere des tubulären Kompartiments, ist dabei unter anderem durch vaskuläre und mitochondriale Dysfunktionen, oxidativen Stress sowie chronische Inflammation eingeschränkt (3, 9). In unserer Forschungsarbeit konnten wir eine durch diese Faktoren induzierte, vorzeitige Seneszenz beobachten, die sich in einem p21-induzierten Zellzyklusarrest zeigt. Eine mögliche Ursache dafür sehen wir in der Beeinträchtigung des Thrombomodulin-Protein C-Systems (TM-PC-System) mit verminderter Protein C-Aktivierung. DM-Patienten weisen einen Verlust des endothelialen TM auf, der zu einem Mangel an aktivierten Protein C (aPC) führt, was mit vermehrter Seneszenz assoziiert ist. Diese Veränderungen tragen zu einer verringerten Zellplastizität im Regenerationsprozess bei. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten wir einen zytoprotektiven Effekt des aPC darlegen, durch den der p21 induzierte Zellzyklusarrest aufgehoben und die Proliferationsrate gesteigert werden konnte. In unserem *in vivo* Modell der akuten Schädigung bei vorbestehender CKD wurde die erhöhte Vulnerabilität in Folge der dNP deutlich. Des Weiteren ist durch die Wiederherstellung einer ausreichenden aPC-Konzentration die Zellplastizität des tubulären Kompartiments erhöht worden. Dies führt zu einer effektiven Verbesserung histopathologischer und rein funktioneller Merkmale der Niere. Schlussfolgernd sehen wir in der Vorbehandlung mit aPC das Potential einer suffizienten Behandlung, beziehungsweise Prophylaxe, der akuten Nierenschädigung bei chronisch nierenkranken Patienten. Insbesondere könnte dies Anwendung im Vorfeld größerer Operationen mit Ischämierisiko oder bildgebenden Verfahren mit Kontrastmittelapplikation finden. Erste Studien mit aPC ohne antikoagulatorische Wirkkomponente wurden bereits durchgeführt (45). Derzeit zielt die Therapie der dNP darauf ab, das Voranschreiten der Erkrankung zu verlangsamen. Die Gabe rein zytoprotektiver Formen des aPC könnte somit die Effektivität der Standardtherapie der dNP verbessern und Risikopatienten vor einem ANV oder Nierenersatzverfahren bewahren. Zusammenfassend stellt die zytoprotektive Wirkung des aPC einen innovativen Therapieansatz dar, dessen Mechanismen und Langzeitauswirkungen in Folgestudien weiterführend zu untersuchen sind.

6. Literaturverzeichnis

1. International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas 2019: 9th edition. Brüssel, Belgien: International Diabetes Federation 2019.
2. Umanath K, Lewis JB: Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis* 2018; 71(6): 884–95.
3. He L, Wei Q, Liu J, et al.: AKI on CKD: heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms. *Kidney Int* 2017; 92(5): 1071–83.
4. Chawla A, Chawla R, Jaggi S: Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab* 2016; 20(4): 546–51.
5. Herold G (ed.): Innere Medizin 2018: Eine vorlesungsorientierte Darstellung unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Gerd Herold 2018.
6. Deutsche Diabetes Gesellschaft (DDG) und diabetesDE – Deutsche Diabetes-Hilfe: Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2020 Die Bestandsaufnahme. Mainz: Verlag Kirchheim + Co GmbH 2019.
7. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M (eds.): Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie mit Online-Repetitorium. 31st ed. Berlin: Springer 2017.
8. Berger K, Moeller MJ: Mechanisms of epithelial repair and regeneration after acute kidney injury. *Semin Nephrol* 2014; 34(4): 394–403.
9. Ferenbach DA, Bonventre JV: Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol* 2015; 11(5): 264–76.
10. Chang-Panesso M, Kadyrov FF, Lalli M, et al.: FOXM1 drives proximal tubule proliferation during repair from acute ischemic kidney injury. *J Clin Invest* 2019; 129(12): 5501–17.
11. Lin Y-C, Chang Y-H, Yang S-Y, Wu K-D, Chu T-S: Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *J Formos Med Assoc* 2018; 117(8): 662–75.
12. Osama Gheith, Nashwa Farouk, Narayanan Nampoory, Medhat A Halim, Toriki Al-Otaibi: Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *Journal of Nephro pharmacology* 2016(5(1)): 49–56.
13. Furuichi K, Shimizu M, Okada H, Narita I, Wada T: Clinico-pathological features of kidney disease in diabetic cases. *Clin Exp Nephrol* 2018; 22(5): 1046–51.
14. Satirapoj B: Tubulointerstitial Biomarkers for Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* 2018; 2018: 2852398.
15. Perkovic V, Jardine MJ, Neal B, et al.: Canagliflozin and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes and Nephropathy. *N Engl J Med* 2019; 380(24): 2295–306.
16. Vallon V: The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011; 300(5): R1009-22.
17. Stehouwer CDA, Smulders YM: Microalbuminuria and risk for cardiovascular disease: Analysis of potential mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17(8): 2106–11.

18. Cmielová J, Rezáčová M: p21Cip1/Waf1 protein and its function based on a subcellular localization corrected. *J Cell Biochem* 2011; 112(12): 3502–6.
19. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P: H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids* 2010; 2010.
20. Amaya-Montoya M, Pérez-Londoño A, Guatibonza-García V, Vargas-Villanueva A, Mendivil CO: Cellular Senescence as a Therapeutic Target for Age-Related Diseases: A Review. *Adv Ther* 2020; 37(4): 1407–24.
21. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D'Arca D: ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 3565127.
22. Childs BG, Gluscevic M, Baker DJ, et al.: Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(10): 718–35.
23. Kusaba T, Lalli M, Kramann R, Kobayashi A, Humphreys BD: Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014; 111(15): 5753.
24. Berger K, Bangen J-M, Hammerich L, et al.: Origin of regenerating tubular cells after acute kidney injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(4): 1533–8.
25. Kramann R, Kusaba T, Humphreys BD: Who regenerates the kidney tubule? *Nephrol Dial Transplant* 2015; 30(6): 903–10.
26. Moore PK, Hsu RK, Liu KD: Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis* 2018; 72(1): 136–48.
27. Lejay A, Fang F, John R, et al.: Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 91: 11–22.
28. Loeffler I, Wolf G: Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Diabetic Nephropathy: Fact or Fiction? *Cells* 2015; 4(4): 631–52.
29. Madhusudhan T, Kerlin BA, Isermann B: The emerging role of coagulation proteases in kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 2016; 12(2): 94–109.
30. Bock F, Shahzad K, Wang H, et al.: Activated protein C ameliorates diabetic nephropathy by epigenetically inhibiting the redox enzyme p66Shc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(2): 648–53.
31. Griffin JH, Zlokovic BV, Mosnier LO: Activated protein C: biased for translation. *Blood* 2015; 125(19): 2898–907.
32. Shahzad K, Kohli S, Al-Dabet M'dM, Isermann B: Cell biology of activated protein C. *Curr Opin Hematol* 2019; 26(1): 41–50.
33. Timothy Mather, Vaheh Oganessyan, Peter Hof, Robert Huber, Steven Foundling, Charles Esmon, Wolfram Bode: The 2.8 Å crystal structure of Gla-domainless activated protein C. *The EMBO Journal* 1996(vol.15 no.24): 6822–31.
34. Griffin JH, Mosnier LO, Fernández JA, Zlokovic BV: 2016 Scientific Sessions Sol Sherry Distinguished Lecturer in Thrombosis: Thrombotic Stroke: Neuroprotective Therapy by Recombinant-Activated Protein C. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36(11): 2143–51.

35. Dong W, Wang H, Shahzad K, et al.: Activated Protein C Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Restricting Y-Box Binding Protein-1 Ubiquitination. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26(11): 2789–99.
36. Nazir S, Gadi I, Al-Dabet M'dM, et al.: Cytoprotective activated protein C averts Nlrp3 inflammasome-induced ischemia-reperfusion injury via mTORC1 inhibition. *Blood* 2017; 130(24): 2664–77.
37. Anne C. Breggia, Jonathan Himmelfarb: Primary mouse renal tubular epithelial cells have variable injury tolerance to ischemic and chemical mediators of oxidative stress: Methodological Report. *Oxid Med Cell Longev* 2008; 2008(October/November/December): 33–8.
38. Lindgren D, Boström A-K, Nilsson K, et al.: Isolation and characterization of progenitor-like cells from human renal proximal tubules. *Am J Pathol* 2011; 178(2): 828–37.
39. Isermann B, Vinnikov IA, Madhusudhan T, et al.: Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis. *Nat Med* 2007; 13(11): 1349–58.
40. Park JT: Postoperative acute kidney injury. *Korean J Anesthesiol* 2017; 70(3): 258–66.
41. Yang G, Jia Y, Li C, Cheng Q, Yue W, Pei X: Hyperglycemic Stress Impairs the Stemness Capacity of Kidney Stem Cells in Rats. *PLoS ONE* 2015; 10(10): e0139607.
42. Lazzeri E, Angelotti ML, Peired A, et al.: Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nat Commun* 2018; 9(1): 1344.
43. Karkouti K, Wijeyesundera DN, Yau TM, et al.: Acute kidney injury after cardiac surgery: focus on modifiable risk factors. *Circulation* 2009; 119(4): 495–502.
44. Martí-Carvajal AJ, Solà I, Glud C, Lathyris D, Cardona AF: Human recombinant protein C for severe sepsis and septic shock in adult and paediatric patients. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 12: CD004388.
45. Patrick Lyden, Howard Levy, Sara Weymer, Kent Pryor, William Kramer, John H. Griffin, Thomas P. Davis, and Berislav Zlokovic: Phase 1 Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of 3K3A-APC in Healthy Adult Volunteers. *Curr Pharm Des.* 2013(19(42)): 7479–85.

7. Danksagungen

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

8. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Der Einfluss des TM-PC-Systems auf die Regeneration des tubulären Kompartiments in Folge einer akuten Schädigung bei vorbestehender chronischer Nierenerkrankung

im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Berend Isermann

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen, als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 24.06.2021

Lukas Breitenstein

9. Darstellung des Bildungsweges

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.