

AUS DER ABTEILUNG
FÜR NEPHROLOGIE
PROF. DR. BERNHARD BANAS
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

„UNTERSUCHUNG DER KOLLAGEN I-EXPRESSION DURCH
TUBULUSEPITHELZELLEN BEI EXPERIMENTELLER NIERENFIBROSE“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Petra Diana Stöckert

2019

AUS DER ABTEILUNG
FÜR NEPHROLOGIE
PROF. DR. BERNHARD BANAS
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

„UNTERSUCHUNG DER KOLLAGEN TYP I-EXPRESSION DURCH
TUBULUSEPITHELZELLEN BEI EXPERIMENTELLER NIERENFIBROSE“

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Petra Diana Stöckert

2019

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Matthias Mack*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Hayo Castrop*

Tag der mündlichen Prüfung: *05. Juni 2019*

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Anatomie und Physiologie der Niere	5
1.2 Aufbau und Zusammensetzung von Bindegewebe	10
1.3 Die physiologische Wundheilung.....	12
1.4 Das Pax8–Gen.....	13
1.5 Pathophysiologie der renalen Fibrose	14
1.6 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	18
1.7 Pathophysiologie der unilaterale Ureterobstruktion	21
1.8 Zielsetzung	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Chemikalien	24
2.1.2 Puffer.....	25
2.1.3 Antikörper.....	26
2.1.4 Primer.....	26
2.1.5 Enzyme	28
2.1.6 Farbstoffe	28
2.1.7 Kits	29
2.1.8 Arzneistoffe	29
2.1.9 Operationsmaterialien	30
2.1.10 Geräte	30
2.1.11 Software.....	31
2.1.12 Sonstige Materialien.....	32
2.1.13 Versuchstiere	33
2.2 Methoden	34
2.2.1 Induzierbarer <i>Kollagen1a1</i> -Knockout: Das Cre/loxP-System	34
2.2.2 Das tetOn/Off-System in Pax8rtTAtetOCre-transgenen Mäusen	36
2.2.3 Verwendete Versuchstiere und die Abkürzungen der Genotypen	39
2.2.4 Genotypisierung der Versuchstiere	40
2.2.5 Die Unilaterale Ureterobstruktion	42
2.2.6 Aufarbeitung der Versuchstiere.....	42
2.2.7 Histologische Methoden	46
2.2.8 Molekularbiologische Methoden.....	47
2.2.9 Statistische Auswertung	53

3 Ergebnisse	54
3.1 Genotypisierung zur Rekrutierung der Versuchstiere.....	54
3.2 Behandlungsschemata zur Knockoutinduktion.....	55
3.3 Gute Verträglichkeit und Knockoutinduktion mit Doxycyclin sowie einer Auswaschphase von vier Tagen vor UUO	57
3.4 Nachweis des <i>Kollagen1a1</i> -Knockouts mittels PCR aus genomischer DNA	58
3.5 Nierenspezifität des <i>Kollagen1a1</i> -Knockouts	59
3.6 Größere Schwankungsbreite der Werte bei männlichen Tieren	60
3.7 Induktion von Nierenfibrose durch die unilaterale Ureterobstruktion	62
3.8 Vernachlässigbarer Rückgang der fibrotischen Fläche von UUO-Nieren bei Knockout-Tieren im Vergleich zu den Kontrollen	65
3.9 Keine Reduktion der Kollagen1a1-positiven Fläche in UUO-Nieren der Knockout-Tiere gegenüber den Kontrolltieren in der Immunhistologie.....	67
3.10 Kein Unterschied in der Expression von Kollagen1a1-mRNA in UUO-Nieren von Knockout-Mäusen und Kontrollen.....	69
3.11 Etablierung einer Auswertmethode für die durchflusszytometrische Untersuchung	71
3.12 Kein signifikanter Unterschied der Kollagen1a1-positiven Partikel in der FACS-Analyse von UUO-Nieren der Pax8-Cre x Col1a1 ^{fl/fl} +Doxy-Mäusen und den zugehörigen Kontrollen	72
3.13 Kein Einfluss des Knockouts auf die Menge CD45-positiver Zellen in der Niere	74
4 Diskussion	75
4.1 Der Kollagen1a1-Knockout ist nierenspezifisch und effektiv	76
4.2 Gut verträgliche Knockoutinduktion mit einer Doxycyclinkonzentration von 2 mg/ml	79
4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Inflammationsreaktion	80
4.4 UUO als geeignetes Modell der renalen Fibrose.....	81
4.5 Indirekte Verstärkung der renalen Fibrose durch Tubulusepithelzellen im UUO Modell	83
5 Zusammenfassung	90
6 Abkürzungsverzeichnis	92
7 Quellenangaben	95
8 Danksagung	100
9 Lebenslauf	101
10 Eidesstattliche Erklärung	103

1 Einleitung

1.1 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Nieren sind im Retroperitonealraum gelegene paarige Organe, die, zusammen mit den am oberen Nierenpol gelegenen Nebennieren, von einer Fettkapsel umgeben sind. Die Fettkapsel (*Capsula adiposa*) dient als Bau- und Speicherfett, das während Hungerzuständen abgebaut wird, wodurch die Niere im Nierenlager mobiler wird und soweit abrutschen kann, dass die Gefäße am *Hilus* abknicken [1]. Die bohnenförmigen Organe sind etwa 10 cm lang, 5 cm breit und 4 cm dick und wiegen je zwischen 120 g und 300 g [2]. Das Nierenparenchym wird von einer derben Kapsel umschlossen (*Capsula fibrosa*), diese ist sensibel innerviert und nur in sehr geringem Maße dehnbar, was beim Anschwellen der Nieren durch Erkrankungen zu großen Schmerzen führen kann [3]. Makroskopisch wird die Niere in eine 6-12 mm breite, dunklere Rinde (*Cortex renalis*) und das hellere Nierenmark (*Medulla renalis*) gegliedert. Medial liegt der *Hilus*, der Eingang der großen Blutgefäße und des Ureters in die Niere. Der *Hilus* mündet in den *Sinus renalis*, eine Höhlung, die Nierenbecken, Nierenkelche, Fettgewebe und große Blutgefäße enthält (Abb. 1).

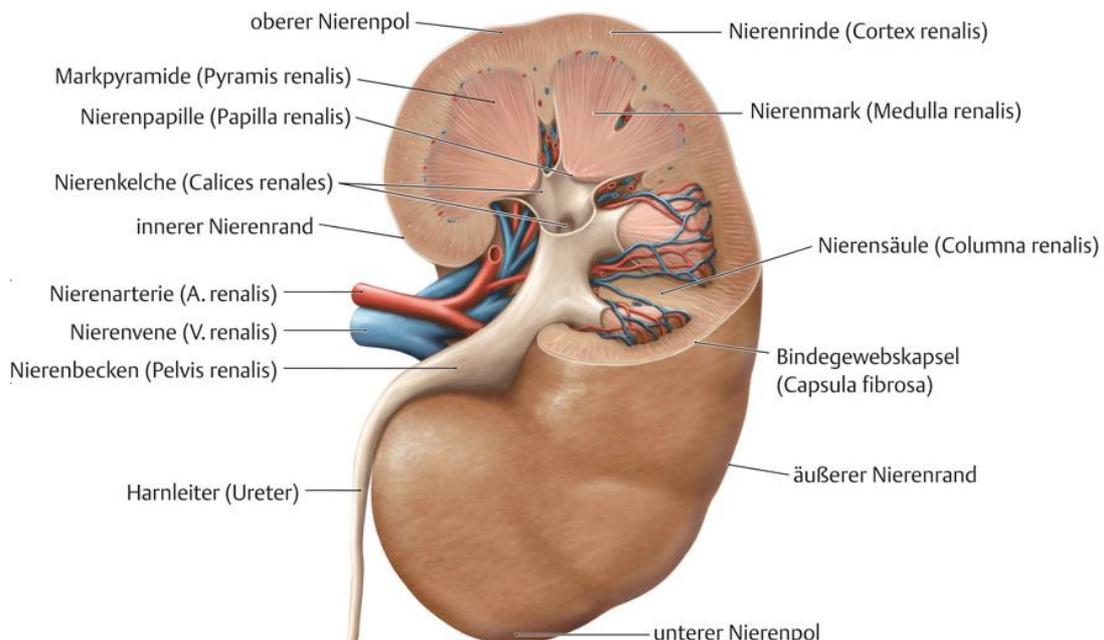


Abb. 1 Anatomischer Bau der Niere. Das pyramidenförmige Nierenmark wird von der dunkleren Nierenrinde umschlossen, in der die Glomeruli liegen. Die Blutversorgung und der Abgang des Ureters erfolgt über den *Hilus*. [4].

Die Nierenrinde liegt unmittelbar unter der Nierenkapsel und gliedert das Nierenmark durch die bis zum *Sinus renalis* reichenden Nierensäulen (*Columnae renales*) in pyramidenförmige Elemente. So wird – dreidimensional gesehen – jede Markpyramide von einem Rindenmantel umschlossen. Es ergeben sich sieben bis neun Markpyramiden, deren Basis in Richtung der Kapsel orientiert ist. Die Spitze der Pyramide (*Papilla renalis*) mündet in einem Nierenkelch (*Calyx renalis*). Die Nierenkelche vereinigen sich zum Nierenbecken (*Pelvis renalis*), von wo aus der Harn über den Ureter abfließt. Das Nierenmark stülpt sich in Form von Markstrahlen (*Radii medullares*) in die Rinde vor. Im Nierenmark sowie in den Markstrahlen verlaufen die für die Konzentrierung des Primärharns verantwortlichen Tubuli und Blutgefäße in gerader Richtung. In der Rinde dagegen verlaufen die Strukturen gewunden und werden als Nierenlabyrinth bezeichnet [1,2].

Die Durchblutung der Niere wird durch Autoregulation und andere Mechanismen sehr fein gesteuert. Alle vier bis fünf Minuten passiert das gesamte Blutvolumen die Niere. Die Blutversorgung der Nieren erfolgt über die auf Höhe des ersten oder zweiten Lendenwirbelkörpers von der *Aorta abdominalis* paarig abzweigenden *Arteriae renales*. Diese ziehen jeweils am *Hilus* in die Niere und teilen sich in die *Arteriae interlobares* auf, die in den Nierensäulen bis zur Basis der Markpyramiden verlaufen. An der Mark-Rinden-Grenze zweigen sich die Gefäße auf und verlaufen dort als *Arteriae arcuatae* bogenförmig weiter. Von den *Aa. arcuatae* ausgehend verlaufen senkrecht zur Nierenoberfläche *Arteriae interlobulares*, von denen sich die *Arteriolaes afferentes* ins Nierenkörperchen ziehen, wo sie sich zum Kapillarknäuel des Glomerulus aufzweigen. Von dort verlässt eine *Arteriola efferens* den Gefäßpol wieder und bildet ein reich verzweigtes Kapillarnetz zur Versorgung von Tubuli und Rinde. Die *Vasa recta*, gerade verlaufende Gefäße, begleiten das Tubulussystem und die Sammelrohre im Nierenmark und werden zu venösen *Vasa recta*, die sich zuerst zu *Venae arcuatae* und danach zu *Venae interlobares* zusammenschließen. Der venöse Abfluss erfolgt am *Hilus* über die *Vena renalis*, die in die *Vena cava inferior* mündet [2,5].

Entscheidend für die Funktion der Niere ist der Filtrationsapparat zur Gewinnung des Harns. Die klassische funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Es besteht aus dem Nierenkörperchen und dem Nierentubulussystem. Das Nierenkörperchen (Malpighi-Körperchen), wo der Primärharn entsteht, besteht aus Bowman-Kapsel und

Glomerulus, dem in die Kapsel eingestülpten Gefäßknäuel. In jeder Nierenrinde gibt 1-1,5 Millionen Glomeruli, die je einen Durchmesser von 150-300 µm aufweisen. Die anastomosierenden Kapillarschlingen werden von der *Arteriola afferens* gespeist, während der Abfluss über die *Arteriola efferens* erfolgt.

Die Filtrationsbarriere der Blut-Harn-Schranke besteht aus drei Schichten. Die Kapillarschlingen werden von einem gefensterten Endothel mit einer Porengröße von 70-100 nm ausgekleidet, das zwar Blutbestandteile, nicht aber Proteine zurückhält. Auf das Endothel folgt die glomeruläre Basalmembran, die als Filtrationsbarriere für Proteine dient. Sie besteht aus Kollagen Typ IV, Laminin, Fibronectin und Heparansulfat, dessen negative Ladung ebenfalls negativ geladene Plasmaproteine zurückhält. Die harnseitige Schicht bildet das viszerale Blatt der Bowman-Kapsel, das seinerseits auch wieder durch ein diskontinuierliches Epithel gebildet wird. Die Epithelzellen werden Podozyten genannt und besitzen miteinander verzahnte Fußfortsätze, die Lücken zwischen den Fortsätzen werden von einer Schlitzmembran mit nur kleinen Schlitzporen (< 5 nm) überspannt. Der Raum zwischen den Kapillarzellen wird durch das Mesangium ausgefüllt. Dieses unterstützt die Kapillarwände, die dem relativ hohen intrakapillären Druck ausgesetzt sind. Außerdem enthält es Mesangiumzellen, die durch die Filtration entstehende Ablagerungen phagozytieren und die mesangiale Matrix produzieren. Der Kapselraum, in den der Primärharn tropft, wird durch die Bowman-Kapsel gebildet. Das bereits beschriebene viszerale Blatt schlägt am Gefäßpol in das parietale Blatt um. Der Raum zwischen den beiden Blättern ist durch die Embryonalentwicklung bedingt, während der sich das Glomerulum in die zunächst ballonartige Bowman-Kapsel einstülpt. Gegenüber dem Gefäßpol befindet sich der Harnpol, wo das parietale Blatt der Bowman-Kapsel in den proximalen Tubulus übergeht. Die Filtration des Blutes erfolgt somit größen- und ladungsselektiv. Wasser und gelöste Moleküle bis zu einem Radius von etwa 1,8 nm werden fast ungehindert filtriert, außerdem können positiv geladene oder ungeladene Moleküle die Filtrationsbarriere wesentlich leichter durchdringen als negativ geladene. Harnpflichtige Substanzen wie Harnstoff, dem Endprodukt des Proteinstoffwechsels, Harnsäure oder Kreatinin werden glomerulär frei filtriert und im Tubulussystem unterschiedlich stark resorbiert. Pro Tag entstehen 140-180 l Primärharn, der beim gesunden Menschen frei von Proteinen und Blutzellen ist [1,2,6].

Da ein so großer Wasser- und Elektrolytverlust nicht ausgleichbar wäre, werden bis zu 99 % im Tubulussystem (Abb. 2) rückresorbiert.

Die Bowman-Kapsel mündet in den geknäuelten Teil des proximalen Tubulus (*Pars convoluta*), der in der Nierenrinde liegt. Dieser geht in den kürzeren, im Mark oder den Markstrahlen gelegenen, geraden Teil des proximalen Tubulus (*Pars recta*) über. Der gerade Anteil stellt bereits den Beginn der Henle-Schleife im Nierenmark dar. Der apikale Teil des Epithels ist mit einem dichten Bürstensaum bedeckt, der wichtige Enzyme wie Peptidasen, Carboanhydrasen und die alkalische Phosphatase enthält. Hauptaufgabe des proximalen Tubulus ist die Rückresorption von Wasser und Natrium. Außerdem werden wertvolle Stoffe wie Glucose oder Aminosäuren aus dem Primärharn rückgewonnen. Der Motor hierfür ist vor allem die basolateral gelegene $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Auch im geringen Maße filtrierte Albumin und Peptide werden in diesem Abschnitt mittels rezeptorvermittelter Endozytose aufgenommen. Im proximalen Tubulus werden zudem durch sekretorische Prozesse organische Säuren wie Oxalat oder Urat und organische Kationen wie Atropin oder Morphin sezerniert. Die *Pars recta* des proximalen Tubulus verjüngt sich zum absteigenden Teil des wesentlich dünneren intermediären Tubulus, dieser kehrt seine Richtung um und wird bei langen Henle-Schleifen zum dünnen aufsteigenden Teil. Während der absteigende Teil wasserdurchlässig ist, ist der aufsteigende Teil wasserdicht und trägt lediglich passiv zur Chloridresorption bei. Danach folgt der gerade Anteil des distalen Tubulus (*Pars recta*), der den Hauptteil des aufsteigenden Teils der Henle-Schleife bildet. In dem wasserundurchlässigen Teil werden Elektrolyte rückresorbiert, dies erfolgt hauptsächlich durch den $\text{Na}^+\text{-2Cl}^-\text{-K}^+\text{-Symporter}$. Im distalen Tubuluskonvolut (*Pars convoluta*) sorgt ein $\text{Na}^+\text{-Cl}^-\text{-Symporter}$ für intensive Natrium- und gegen Ende der *Pars convoluta* auch Wasserresorption, sodass der im aufsteigenden Teil noch hypotone Harn hier wieder isoton wird. Am Übergang zwischen der *Pars recta* und der *Pars convoluta* legt sich der Tubulus an den Gefäßpol des Ursprungsglomerulums an, diese Stelle wird als *Macula densa* bezeichnet und ist Teil des juxtaglomerulären Apparates. Zwischen dem distalen Tubulus und dem Sammelrohr befindet sich der kurze Verbindungstubulus (*Tubulus reuniens*), in dem, durch Aldosteron gesteuert, die Resorption von Na^+ und Wasser sowie die Sekretion von K^+ gefördert wird. Der letzte Abschnitt ist das im Mark gelegene Sammelrohr. Am Zellapex werden über spezielle Transporter in Typ-A-

Schaltzellen Protonen ins Sammelrohr lumen abgegeben oder über die selteneren Typ-B-Schaltzellen Bikarbonat sezerniert. So kann der Säure-Base-Haushalt mitreguliert werden. Hauptzellen resorbieren, gesteuert durch Aldosteron, Natrium zusammen mit Wasser und geben Kalium ins Lumen ab. Außerdem kann die Wasserrückresorption im Sammelrohr durch den Einfluss des Antidiuretischen Hormons (ADH) gesteigert werden. Wird ADH aus dem Hypophysenhinterlappen ausgeschüttet, bewirkt dies einen Einbau von Aquaporinen (Wasserkanälen) in die sonst wasserundurchlässigen Sammelrohre. Im Sammelrohr findet somit angepasst an den Wasser- und Säure-Base-Haushalt des Körpers die Feinregulation der Harnzusammensetzung statt [1,2].

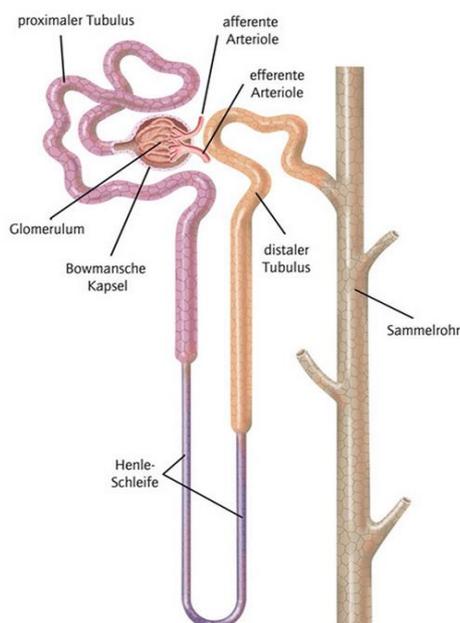


Abb. 2 Aufbau eines Nephrons. Der proximale Tubulus (lila) besteht, genau wie der distale Tubulus (gelb), aus einem gewundenen und einem geraden Teil. Hier nicht zu sehen ist der kurze Verbindungstubulus zwischen dem proximalen Tubulus und dem Sammelrohr (braun) [7].

Harn- und Blutfluss in der Niere folgen dem Gegenstromprinzip. Die harnleitenden Abschnitte sowie die Blutgefäße verlaufen in geringem Abstand parallel zueinander, die Fließrichtung von Blut und Harn ist jedoch gegenläufig. Dadurch kann ein osmotischer Konzentrationsgradient von 290 mosmol/l in der Nierenrinde und 1300 mosmol/l im Mark nahe der Papille aufrechterhalten werden. So kann die Zusammensetzung des Urins in einer hohen Schwankungsbreite an die Bedürfnisse des Körpers angepasst werden [1].

Der juxtaglomeruläre Apparat der Niere befindet sich am Gefäßpol jedes Glomerulums und dient der Regulation des Elektrolythaushaltes sowie der Blutdruckregulation. Er setzt sich aus der *Macula densa*, granulierten

juxtaglomerulären Zellen und extraglomerulären Mesangiumzellen zusammen. Der juxtaglomeruläre Apparat ermöglicht in jedem Nephron die tubuloglomeruläre Rückkopplung, außerdem befinden sich in der *Macula densa* Osmosensoren, die die Reninfreisetzung aus granulierten Zellen der *Arteriola afferens* induzieren können. Dadurch kann die Niere über das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem Plasmavolumen und Blutdruck regulieren [2].

Sinkt der Sauerstoffpartialdruck in der Nierenrinde, steigt die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1). Dadurch wird die Produktion von Erythropoetin in speziellen peritubulären Fibroblasten induziert. Erythropoetin bewirkt eine verstärkte Neubildungsrate von Erythrozyten [1]. Somit trägt auch das Bindegewebe mit seinen zellulären und Matrixkomponenten zur Nierenfunktion bei.

1.2 Aufbau und Zusammensetzung von Bindegewebe

Bindegewebe hat im Körper mannigfaltige Erscheinungsformen. Zum einen erfüllt es in Organen eine Stützfunktion, indem es Septen und die Kapsel bildet, zum anderen bildet es zusammen mit Blut- und Lymphgefäßen sowie Nerven das Stroma. Es liegt um epitheliale Strukturen herum und bildet dort durch einen hohen Wassergehalt Diffusionsräume für zum Beispiel Sauerstoff, Nährstoffe oder Stoffwechselendprodukte. Das Bindegewebe ist zudem Schauplatz vieler Krankheitsprozesse wie Kollagenosen oder Entzündungen.

Bindegewebe besteht aus wenigen, locker verteilten Zellen, die keinen geschlossenen Zellverband bilden, und extrazellulärer Matrix. Die Bindegewebszellen können in ortsständige und mobile Zellen unterteilt werden. Zu den ortsständigen Zellen zählen Fibroblasten und Fettzellen. Fibroblasten sind in ihrer Gestalt stark variable Zellen, die die extrazelluläre Substanz bilden. Sie differenzieren sich aus mesenchymalen Zellen und liegen häufig als spindelförmige Zellen mit langen, verzweigten Fortsätzen parallel zu Kollagenfasern vor. Sie sind über lockere Verbindungen mit Matrixkomponenten wie fibrillärem Fibronectin verbunden. Neben den ortständigen Zellen sind noch mobile Zellen wie Makrophagen, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und Plasmazellen zu finden. Die Menge und die prozentuale Zusammensetzung dieser Zellen variiert stark von

Organ zu Organ und kann auch zwischen verschiedenen Funktionsphasen eines Organs stark schwanken, so kommt es beispielsweise im Rahmen einer Entzündungsreaktion zu einer massiven Zellinfiltration.

Auch die extrazelluläre Matrix lässt sich in zwei Komponenten unterteilen. Die amorphe Grundsubstanz besteht unter anderem aus Hyaluronan, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Sie ist gelartig und wasserreich, sodass sie ein gutes Milieu zum Transport von Gasen, Metaboliten und Nährstoffen schafft. Bei den strukturgebenden Bindegewebsfasern handelt es sich um netzartige, stark dehbare, elastische Fasern oder Kollagenfasern. Die Anordnung der Kollagenfasern folgt der Funktion in der jeweiligen Struktur und kann entweder parallel oder mehr oder weniger geflechtartig sein.

Mit 25 % der Gesamtproteinmasse ist Kollagen das häufigste Protein des Körpers [2]. Kollagenfibrillen sind 15-130 nm dick und setzen sich aus drei linksgängigen α -Ketten zusammen, die eine rechtsgängige Tripelhelix bilden. Es sind ungefähr 25 verschiedene α -Ketten bekannt, die alle gemeinsam haben, dass jede dritte Aminosäure Glycin ist. Am rauen endoplasmatischen Retikulum wird Prokollagen synthetisiert. Danach wandert das Prokollagen vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, wobei es durch Vitamin C-abhängige Hydroxylierung und Glykosylierung weiter modifiziert wird. Durch unterschiedlich starke Hydroxylierung wird die Stabilität des Kollagens gesteuert. Je mehr Hydroxygruppen in das Molekül eingeführt werden, desto mehr Wasserstoffbrückenbindungen kann die α -Kette später mit anderen ausbilden und desto stabiler wird das Kollagenmolekül. Die Assemblierung zur Tripelhelix beginnt am C-terminalen Ende des Propeptids durch die Ausbildung von Disulfidbrücken. Danach winden sich die α -Ketten zur rechtsgängigen Tripelhelix. Anschließend wandern die Tripelhelices in den extrazellulären Raum und werden dort zu Tropokollagen weiter modifiziert.

Es gibt zwei Kollagengruppen. In fibrillären Kollagenen wie Kollagen Typ I, II, III, V und XI lagern sich die Tropokollagene zu Fibrillen zusammen, die durch kovalente Bindungen quervernetzt sind. Mehrere Kollagenfibrillen bilden zusammen wiederum Kollagenfasern. Die Übrigen der etwa 20 Kollagene sind Fibrillen assoziierte Kollagene, sie haben eine unregelmäßige Struktur der Tripelhelices, was ihre Beweglichkeit erhöht. Sie modifizieren die Eigenschaften der fibrillären Kollagene,

indem sie sich an deren Fibrillen anlagern [8,9]. Das häufigste Kollagen, Kollagen Typ I, ist ubiquitär im Körper zu finden. Es kommt in Haut, Sehnen und Bändern, der Kornea und im Organstroma der meisten Organe vor. Die Fibrillen dieses Typs haben einen Durchmesser von 50-90 nm. Die Tripelhelix besteht aus zwei identischen $\alpha_1(I)$ -Ketten sowie einer $\alpha_2(I)$ -Kette (Abb. 3). Die Zusammensetzung ist für die Funktion sehr wichtig. Eine Mutation in einem der beiden Gene, das für die α -Ketten des Kollagen Typ I kodiert, ist beispielsweise Ursache von Osteogenesis imperfecta [2,9]. Der Abbau von Kollagen erfolgt durch Kollagenasen, die von Leukozyten, Fibrozyten, synovialen B-Zellen und verwandten Zellen gebildet werden [2,9].

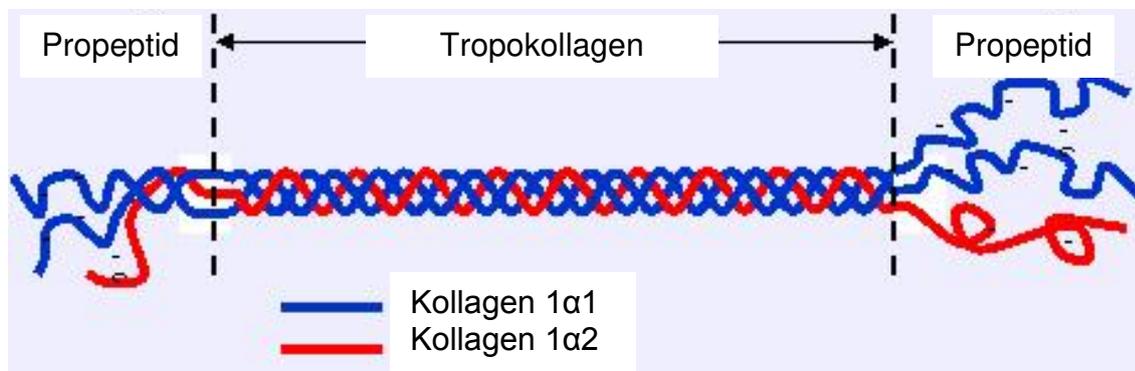


Abb. 3 Schematische Darstellung von Prokollagen. Zwei Kollagen $\alpha_1(I)$ -Ketten bilden zusammen mit einer Kollagen $\alpha_2(I)$ -Kette eine Tripelhelix. Nach Abspaltung der Propeptide bleibt Tropokollagen. Durch Polymerisation der Tropokollagen-moleküle entstehen schließlich die Kollagenfibrillen (Abb. modifiziert nach [10]).

1.3 Die physiologische Wundheilung

Kollagen ist nicht nur für Bindegewebe von Bedeutung, ihm kommt zudem eine wichtige Rolle im Rahmen der physiologischen Wundheilung zu.

Während der Wundheilung kommt es zur verstärkten Kollagensynthese. Wird Endothel beschädigt, kommt es zum Kontakt von Blut und subendotheliale Kollagen. Aus dem verletzten Endothel wird der von-Willebrand-Faktor freigesetzt, der eine Thrombozytenadhäsion am subendotheliale Kollagen und der Gefäßwand ermöglicht. Daraufhin werden die Thrombozyten aktiviert und bilden Aggregate aus, anschließend kommt es zu einer Entleerung verschiedener Mediatoren (z. B. Fibrinogen, Ca^{2+} , Serotonin und Wachstumsfaktoren wie dem platelet-derived growth factor (PDGF) und transforming growth factor β (TGF β) aus den α - und δ -Granula

der Thrombozyten [1]. Ein Großteil der Mediatoren dient dem Fortschreiten der Gerinnungskaskade und damit dem Wundverschluss. Zytokine wie PDGF und TGF β bewirken jedoch chemotaktisch das Einwandern von Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Mastzellen, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen [11]. Die eingewanderten Zellen werden anschließend aktiviert und produzieren reaktive Sauerstoffspezies, die das Gewebe zusätzlich schädigen. Zudem werden Zytokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt, die Fibroblasten aktivieren und zu einer Hochregulation der Produktion von extrazellulären Matrixproteinen führen [12]. Es werden die ersten Kollagenfibrillen aus Kollagen Typ I sowie Fibronektin gebildet und neue Blutgefäße sprossen ein. Die Fibroblasten differenzieren sich zu kontraktile Myofibroblasten um, die eine Annäherung der Wundränder bewirken. Parallel kommt es zur Reepithelialisierung des Gewebes [2,9] und die Zahl an proinflammatorischen Zellen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren wird wieder herunter reguliert, sodass eine mechanisch belastbare Bindegewebsnarbe in normalisiertem Zellmilieu übrig bleibt. Außerdem werden überschüssige Bindegewebsanteile proteolytisch abgebaut [12]. Verantwortlich für den Rückgang der Entzündungsreaktion sind beispielsweise antiinflammatorisch wirkende, alternativ aktivierte Makrophagen, die aus proinflammatorischen Makrophagen entstehen können (*ex vivo* durch Stimulation mit TGF β) oder schon im Rahmen der Entzündungsreaktion miteinwandern, oder spezielle regulatorische T-Zellen (FoxP3⁺) [12].

1.4 Das Pax8-Gen

Die Paired-box-Gene (Pax-Gene) sind gewebespezifische Transkriptionsfaktoren. Ihnen kommt eine besondere Rolle während der frühen Embryonalentwicklung, der Strukturierung des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Organogenese zu. Die Pax8-Gene haben alle eine DNA-Bindungsstelle, die sog. paired domain, gemeinsam. An ihrem C-terminalen Ende befindet sich zudem eine serin-/threoninreiche Domäne, die zur Transkriptionsaktivierung am Zielgen dient. Neben der paired domain haben außer Pax1 und 9 alle Pax-Proteine noch eine partielle oder vollständige Homodomäne. Die Spezifität der Bindung an die DNA wird durch die paired domain und die jeweilige Homodomäne gewährleistet. Nach ihrer Proteinstruktur sowie ihrer Transkriptionsspezifität und ihrer biochemischen Funktion

werden die Pax-Proteine in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe besteht aus Pax1 und 9, die zweite wird von Pax2, 5 und 8 gebildet. Die dritte Gruppe setzt sich aus Pax3 und 7 zusammen. Die letzte Gruppe beinhaltet Pax4 und 6 [13,14].

Der Transkriptionsfaktor Pax8 ist, zusammen mit Pax2, vor allem in der Nierenentwicklung wichtig. In adultem Nierengewebe ist Pax8 in Zellen des proximalen und distalen Tubulus, in der Henle-Schleife, im Sammelrohr sowie im parietalen Blatt der Bowman-Kapsel aktiv. Es ist somit im gesamten Tubulussystem der Niere zu finden, nicht aber im interstitiellen Nierengewebe, in Mesangiumzellen, Endothelzellen, Podozyten oder anderen tubulusfernen Zellen. Die Funktion des Pax8-Gens in der adulten Niere ist noch nicht vollständig geklärt, möglicherweise dient es der Aufrechterhaltung der hoch spezialisierten Aufgaben des Nierenepithels, wie der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes [15]. Extrarenal hingegen zeigt Pax8 nur geringe Aktivität, beispielsweise in der Schilddrüse [16].

1.5 Pathophysiologie der renalen Fibrose

Nierenerkrankungen treten aufgrund verschiedenster Ursachen auf. Diese können zum einen immunologisch sein, wie etwa beim systemischen Lupus erythematoses, der zu einer Immunkomplexnephritis (Lupusnephritis) führt. Zum anderen führen auch Nierensteine durch die Obstruktion der ableitenden Harnwege und die entstehende Inflammation zur Schädigung der Nieren. In den Industriestaaten rücken besonders metabolische Ursachen wie die diabetische Nephropathie in den Vordergrund. Epidemiologische Studien zeigen, dass chronische Nierenerkrankungen bereits bis zu 10 % der Weltbevölkerung betreffen [17]. Die Zunahme von Diabetes mellitus und Übergewicht mit den damit korrelierenden Erkrankungen wie Hypertonie lässt wohl auch die Prävalenz der chronischen Nierenerkrankungen weiter ansteigen [12]. Eine chronische Nierenerkrankung liegt vor, wenn für mindestens drei Monate eine verminderte Nierenfunktion besteht. Da chronische Nierenerkrankungen oft zunächst asymptomatisch verlaufen, wird die Diagnose verzögert und in fortgeschrittene Krankheitsstadien verschoben. Zudem stellen bei endgradigem Nierenversagen die Dialyse und die Nierentransplantation die einzigen Behandlungsoptionen dar, die enorme Einbußen im Bereich der Lebensqualität mit sich bringen und außerdem mit einem sehr hohen finanziellen

Aufwand verbunden sind [17]. Darüber hinaus sind chronische Nierenerkrankungen assoziiert mit einem verstärkten Auftreten von kardiovaskulären und zerebrovaskulären Erkrankungen, was Nierenerkrankungen und ihre suffiziente Behandlung noch weiter in den Fokus der Forschung rückt [18].

Den gemeinsamen Endpunkt von chronischen Nierenerkrankungen stellt die Nierenfibrose dar. Diese kann als tubulointerstitielle Fibrose oder als Glomerulosklerose ablaufen [19]. Ausgangspunkt für die Entstehung einer Nierenfibrose ist die Schädigung des Nierengewebes, die eine an sich physiologische Inflammation im Zuge der Wundheilung initiiert. Besteht der schädigende Einfluss anhaltend, kann es aus noch nicht vollständig bekannten Ursachen zur Dysregulation und einem überschießendem Wundheilungsprozess kommen und das Organ fibrosiert. Dadurch akkumuliert extrazelluläre Matrix, vor allem Kollagen Typ I und Fibronectin, im Interstitium, was zur Vernarbung des Organes mit permanentem Funktionsverlust führt [11]. Nach der Schädigung des Gewebes werden Zytokine freigesetzt, die Entzündungszellen chemotaktisch anlocken. Dadurch wandern beispielsweise Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Mastzellen ein. Diese werden anschließend aktiviert und produzieren daraufhin wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die Fibrose vorantreiben. Darüber hinaus entstehen reaktive Sauerstoffspezies, die das umgebende Gewebe zusätzlich schädigen und die Entzündungsreaktion verstärken. Durch diese Mechanismen werden kollagen-produzierende Zellen aktiviert [12]. Als Hauptproduzenten von Kollagen im Rahmen der Fibrose werden Myofibroblasten angesehen [20]. Dabei handelt es sich um spindel- oder sternförmige, kollagenproduzierende Zellen im Interstitium, die α -smooth muscle actin (α -SMA) und Vimentin exprimieren. Zudem weisen sie viel endoplasmatisches Retikulum und einen prominenten Golgi-Apparat auf, was ihre Syntheseleistung anzeigt. Im Zytoplasma sind mit Kollagen gefüllte Granula zu finden [17]. Dabei ist noch nicht vollständig geklärt, aus welcher Quelle sich Myofibroblasten entwickeln. Diskutiert werden fünf verschiedene Mechanismen, die zur Entstehung von Myofibroblasten führen (Abb. 4).

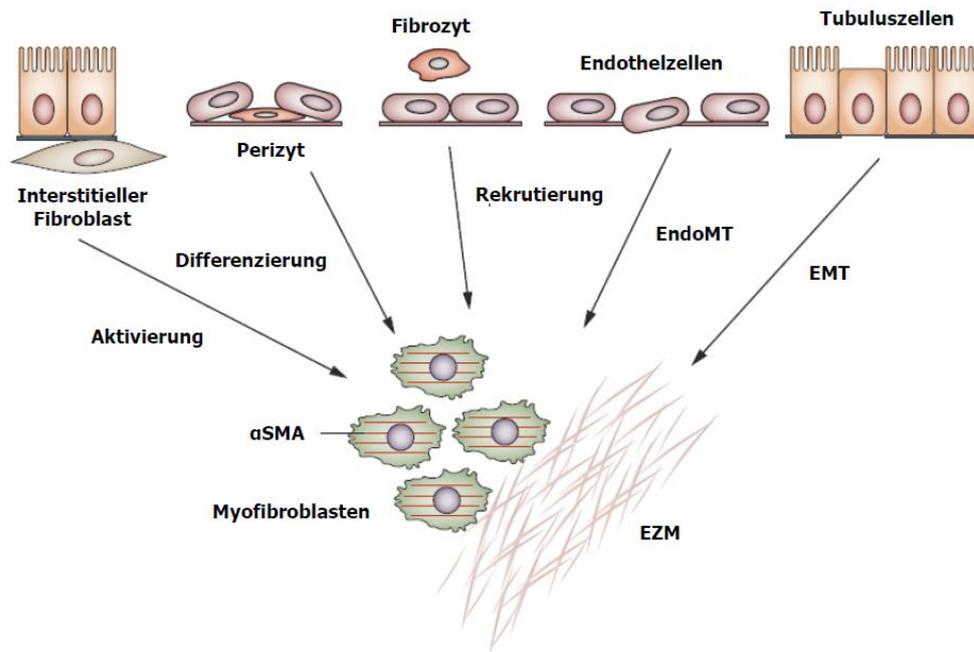


Abb. 4 Herkunft der Myofibroblasten in der Nierenfibrose. α -SMA⁺-Myofibroblasten können sich aus fünf verschiedenen Zelltypen entwickeln. Möglich ist eine Aktivierung von ortsständigen Fibroblasten mesenchymalen Ursprungs, die Differenzierung aus Perizyten, eine Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen, den im Blut zirkulierenden Fibrozyten sowie eine endothelial-mesenchymale Transition und eine epithelial-mesenchymale Transition (Abb. modifiziert nach [12]).

Fibroblasten sind mesenchymale, spindelförmige Zellen, die im Körper ubiquitär vorhanden sind und in ihrer Erscheinung stark variieren können. Sie produzieren viele Bestandteile der extrazellulären Matrix sowie proteolytische Enzyme und sorgen für die richtige Zusammensetzung und den Erhalt der jeweiligen Gewebestruktur. An ihrer Oberfläche exprimieren sie unter anderem den PDGF-Rezeptor β (PDGFR β) und Fibroblasten spezifisches Protein 1 (FSP1). Diese Marker sind jedoch unspezifisch und eignen sich nicht zur Charakterisierung von Fibroblasten [12]. Interstitielle Fibroblasten produzieren zudem Erythropoetin und übernehmen damit eine wichtige Funktion im Rahmen der Erythropoese [21]. Eine verringerte Produktion von Erythropoetin durch Fibroblasten nach deren Umdifferenzierung zu Myofibroblasten kann somit eine renale Anämie nach sich ziehen [19]. Wenn profibrotische Zytokine, wie vor allem TGF β 1, und Wachstumsfaktoren auf Fibroblasten wirken und die auf sie wirkende mechanische Belastung steigt, differenzieren sich die Fibroblasten zu Myofibroblasten [21]. Dabei behalten sie ihre

Oberflächenmarker PDGFR β und FSP1 und exprimieren zusätzlich Vimentin und α -SMA.

Als Perizyten bezeichnet man kontraktile Zellen, die sich mit ihren Zellfortsätzen um Kapillaren legen und diese damit stabilisieren. Sie sind mesenchymalen Ursprungs und regulieren den Durchmesser der Kapillaren und damit auch den in ihnen herrschenden Druck. Damit sind sie wichtig für die Mikrozirkulation des Blutes. In der Niere sind sie um die peritubulären Kapillaren zu finden und nur schwer von Fibroblasten zu differenzieren, da sie ähnliche Oberflächenmarker, wie beispielsweise PDGFR β , tragen [19]. Nach einer Schädigung der Niere bewirkt der inflammatorische Prozess, dass sich Perizyten vom Endothel lösen und ins Interstitium einwandern. Dort proliferieren sie und differenzieren sich zu Myofibroblasten um [12]. Zudem führt die Migration der Perizyten zu einer Destabilisierung der peritubulären Kapillaren. Dadurch kommt es zur Rarefizierung der Kapillaren und als Folge dessen zur chronischen Ischämie und Hypoxie im Interstitium. Hypoxie induziert wiederum Fibrose, indem es die Produktion von extrazellulärer Matrix beeinflusst. So können Perizyten auf verschiedene Weise zur Fibrose beitragen.

Auch Zellen der myeloischen Reihe, die Fibrozyten, werden als Vorläufer von Myofibroblasten aufgeführt. Zuerst wurden sie von Bucala *et al.* als zirkulierende spindelförmige Leukozytenpopulationen beschrieben. Fibrozyten tragen hämatopoetische Marker wie CD45 und CD11b und exprimieren zudem die Bindegewebsproteine Vimentin, Fibronektin sowie Kollagen Typ I und III [22]. Fibrozyten wandern nach Schädigung des Nierengewebes ins Parenchym ein und treiben dort die Ausbildung von Fibrose voran. Die Differenzierung von Fibrozyten zu Myofibroblasten wird durch profibrotische Zytokine wie TGF β und Interleukin 13 (IL-13) begünstigt und durch andere Entzündungszellen wie CD4⁺-Zellen moduliert. Geht die Entzündung und damit die Zahl an CD4⁺-Zellen zurück, reduziert sich auch die Zahl der Fibrozyten in der Niere [19]. Auch die Aktivierung der Renin-Angiotensin-Systems wirkt stimulierend auf die Zahl der Fibrozyten [12]. Die Migration und Kollagenproduktion von Fibrozyten ist durch viele Faktoren reguliert, die im Speziellen noch nicht exakt geklärt sind [19].

Andere mögliche Vorläuferzellen von Myofibroblasten stellen Epithelzellen dar. Im Rahmen einer endothelial-mesenchymalen Transition (EndoMT) lösen sich Endothelzellen der peritubulären Kapillarwand aus ihrem Zellverband und transdifferenzieren im Interstitium zu Myofibroblasten. Vor allem im Rahmen der Nierenfibrose bei diabetischer Nephropathie ist dieser Mechanismus zur Rekrutierung von Myofibroblasten gezeigt worden. Treibende Kraft ist auch hier TGF β , das vor allem in Frühstadien der renalen Fibrose die Transition von Endothelzellen fördert [23].

Zudem ist es möglich, dass Tubulusepithelzellen unter dem Einfluss eines profibrotischen Milieus ins Interstitium einwandern und sich dort zu Myofibroblasten transdifferenzieren. Dies wird als epithelial-mesenchymale Transition bezeichnet. Im folgenden Kapitel werden die Grundlagen der EMT genauer erläutert.

Schreitet die Fibrose voran, akkumulieren immer mehr der von Myofibroblasten produzierten Matrixbestandteile wie Kollagen Typ I und Fibronectin. Diese sind zunächst noch, wie auch im Rahmen der physiologischen Wundheilung, proteolytisch abbaubar. Beim Fortschreiten der Fibrose modifizieren Enzyme wie die Lysyloxidase und die Gewebstransglutaminase die Matrix und machen sie mittels Quervernetzung der einzelnen Kollagene durch Bildung von intermolekularen Schiff-Basen resistent gegen proteolytischen Abbau. Die Anhäufung von extrazellulärer Matrix führt zudem zu einer Schädigung der Tubuli, die daraufhin atrophieren. Dies geht mit einer verschlechterten tubulären Funktion einher. Durch die Transdifferenzierung von Perizyten und peritubulären Epithelzellen werden zudem die Kapillaren geschädigt, was zu einer Rarefizierung der kleinen Gefäße führt. Dadurch wird im Interstitium chronische Hypoxie induziert, welche durch eine Verschlechterung der Diffusionseigenschaften des fibrotischen Gewebes noch verstärkt wird. Hypoxie erzeugt im Gewebe zudem oxidativen Stress, was den *Circulus vitiosus* aus Inflammation, Gewebeschaden und Ausbildung von fibrotischem Gewebe weiter antreibt [12].

1.6 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Phänotypische Veränderungen von Epithelzellen hin zu mesenchymalen Zellen wurden in den 1980er Jahren erstmals von Elizabeth Hay im Primitivstreifen von

Hühnerembryos beschrieben [24]. Epithelien weisen charakteristische Merkmale, wie ein spezielles Zytoskelett oder Polarität auf.

Die EMT wird in drei Subtypen unterteilt. Bei der EMT Typ 1 handelt es sich um einen Prozess im Rahmen der Embryogenese und Organogenese. Dabei entstehen Zellen ohne invasives Potential, die auch keine Organfibrose verursachen. Es handelt sich somit um EMT, die im Rahmen der normalen Entwicklung von Gewebe stattfindet. Mit dem Umkehrprozess der EMT, der mesenchymal-epithelialen Transition (MET), können sich aus diesen transformierten Mesenchymzellen auch wieder Epithelzellen bilden [25,26]. EMT Typ 2 dient der Wundheilung oder trägt zur Fibrosebildung bei und soll im weiteren Verlauf näher beschrieben werden. Im Laufe der Karzinogenese entwickeln Zellen aggressives, invasives Verhalten und durchdringen die Basalmembran, was zur Entwicklung von Metastasen führt. Dieses maligne Geschehen kann durch die EMT Typ 3 verursacht werden. Sie ist somit mit der Entstehung und dem Fortschreiten von Krebs in Verbindung zu bringen [25,27].

In adultem Gewebe wird die EMT Typ 2 unter anderem im Rahmen der Nierenfibrose beschrieben. Um sich zu mesenchymalen Zelltypen wie Fibroblasten zu differenzieren, finden verschiedene, streng geregelte Umbauprozesse statt. Auslösend ist dabei eine Schädigung der tubulären Epithelzellen, diese führt zu einer Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Mediatoren [26]. Hauptinduktor ist hierbei TGF β 1, zusammen mit beispielsweise MMP-2, EGF und IGF-II [28,29]. In den Zellen wird eine Änderung der Genexpression über Transkriptionsfaktoren wie SNAIL, TWIST und ZEB ausgelöst. SNAIL wirkt dabei am Promotor von E-Cadherin und verursacht dort einen Rückgang der Transkriptionsrate. Neben E-Cadherin hemmt SNAIL die Expression von Claudin, Occludin, Desmoplakin und Plakoglobin. Durch einen Mangel an diesen Proteinbestandteilen verhindert SNAIL die Neubildung der für Epithel charakteristischen Zell-Zell Kontakte tight junctions, gap junctions, *Zonulae adhaerentes* und Desmosomen. Diese Strukturen werden während der EMT schrittweise abgebaut, sodass die Zellen aus ihrem Verband separiert werden. Durch diesen Integritätsverlust wird nicht nur die Barrierefunktion des Epithels zerstört,

sondern auch die Polarität der Epithelzelle. SNAIL aktiviert zudem Gene, die zur Ausbildung von Zellen mit mesenchymalem Phänotyp notwendig sind [24].

Neben einem Abbau der Zell-Zell-Kontakte kommt es zum Umbau des Mikrotubuli-Skelettes, was zu einer Elongation der Zelle führt. Damit ändert die Zelle ihre Erscheinung von der kuboiden Form einer Epithelzelle zu einer länglichen Form, ähnlich der der Fibroblasten. Zudem gewinnt die Zelle durch aktinreiche Ausläufer des Zytoskelettes an Motilität. Je nach ihrer Form und Lage werden diese Ausläufer Lamellipodien beziehungsweise Filopodien genannt. Des Weiteren wird eine Invasion der Zelle in den Extrazellulärraum ermöglicht, indem aktinreiche Invadopodien mit proteolytischer Funktion gebildet werden. Für Zellkontraktilität sorgen Aktin-Stressfasern.

Die Zellen produzieren nach der Transdifferenzierung Proteasen, welche die tubuläre Basalmembran zerstören, um in das peritubuläre Interstitium übertreten zu können [27]. Die Oberflächenbesetzung der Zelle ändert sich ebenfalls und gleicht schließlich dem eines Fibroblasten. Die Zelle beginnt mit der Expression von FSP1, einem intrazellulären Protein, das als Fibroblastenmarker dienen kann. Zudem wird das für Myofibroblasten typische α -SMA gebildet. Im Interstitium produzieren die transformierten Tubulusepithelzellen Komponenten der extrazellulären Matrix, vor allem Kollagen Typ I, und leisten damit einen Beitrag zur Fibrosebildung im geschädigten Nierengewebe [30,31]. Zudem führt die Transdifferenzierung der Tubulusepithelzellen zur sekundären profibrotischen Schädigung der Tubuli, da die Integrität der Tubuli verletzt wird. Diese Schädigung des Tubulusepithels trägt zusätzlich zum Voranschreiten der Fibrose bei. Wird die EMT inhibiert, kann dadurch die Fibrose im Interstitium verringert werden [32]. In welchem Ausmaß die EMT zur Nierenfibrose beiträgt, ist bis heute jedoch noch ungeklärt. In Studien von unter anderem LeBleu und Kalluri werden Werte von 5 % bis 36 % postuliert [20,29]. Um den Einfluss der EMT und damit auch die Bedeutung der Unterdrückung der EMT als Therapieziel quantifizieren zu können, muss der genaue Anteil der aus Tubulusepithelzellen entstehenden Myofibroblasten ermittelt werden.

1.7 Pathophysiologie der unilaterale Ureterobstruktion

Chronische Nierenerkrankungen enden häufig mit einer interstitiellen Nierenfibrose, die zu einer hochgradigen Einschränkung der Nierenfunktion führt. Ein häufig verwendetes murines Nierenfibrosemodell ist die unilaterale Ureterobstruktion (UUO) [33]. Dieses Modell bietet die Vorteile, dass kein exogenes Toxin in die Versuchstiere eingebracht werden muss und gleichzeitig die kontralaterale Niere (Kolaterale), trotz der kompensatorischen Veränderungen, als interne Kontrolle zur Verfügung steht, um individuelle Unterschiede zwischen den Versuchstieren abschätzen zu können [34]. Bei der UUO wird der Ureter ligiert und so der Harn in die Niere zurückgestaut. Durch diese mechanische Manipulation entstehen in der UUO-Niere schwerwiegende metabolische und hämodynamische Veränderungen [35]. Nach der Ligatur des Ureters kommt es initial zunächst zu einer Vasodilatation und in Folge dieser zu einem reaktiven Anstieg der Nierendurchblutung und einem höheren Filtrationsdruck. Nach etwa sechs Stunden kehrt sich diese Entwicklung durch eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriole, ausgelöst durch Mediatoren wie Angiotensin II und Thromboxan A₂, um. In Folge des verringerten Blutflusses sinkt sowohl der Druck in den glomerulären Kapillarschlingen als auch die glomeruläre Filtrationsrate stetig weiter ab [36]. Parallel dazu führt der Harnstau zur Ausbildung einer Hydronephrose und zur Dilatation der Nierentubuli, was sowohl zur mechanischen Schädigung als auch zur negativen Beeinträchtigung der Zellen durch Ischämie oder oxidative Metabolite führt. Dadurch kommt es zur Apoptose oder Nekrose der Zellen im distalen Tubulus und des Sammelrohres aber auch im Interstitium. Die Apoptose wird hauptsächlich durch Induktoren wie Angiotensin II, TGFβ₁, Zytokine wie TNFα, oxidativen Stress oder auch die mechanische Dehnung der Tubuli verursacht. Die Obstruktion des Ureters induziert zudem eine interstitielle Inflammation und eine Infiltration von Monozyten, T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten. Die Monozyten differenzieren sich klassisch zu Makrophagen um, die dann TGFβ₁ und TNFα produzieren. Alternativ aktivierte Makrophagen hingegen wirken der Inflammation entgegen und begünstigen das Überleben und die Proliferation von Zellen sowie die Ausschüttung von Proteinen der extrazellulären Matrix [34]. Die Akkumulation von extrazellulärer Matrix führt zur Obliteration von Kapillaren, die die Tubuli versorgen und zieht damit eine weitere ischämische Schädigung des Filtrationsapparates der Niere nach sich. Zudem werden durch die interstitielle

Entzündung einige Nephrone geschädigt, was zusätzlich zu einer Beeinträchtigung der noch intakten Nephrone durch vermehrte Belastung führt [35].

Bestimmte Zytokine, wie beispielsweise TGF β , bewirken eine Differenzierung von Fibroblasten und anderen Zelltypen zu Myofibroblasten, die Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Kollagen und Fibronectin, produzieren und α -SMA exprimieren. TGF β 1 bewirkt zudem durch die Bindung an den TGF β 1 Rezeptor die Aktivierung der intrazellulären Smad-Signalkaskade, wodurch Gene aktiviert werden, die für extrazelluläre Matrix Proteine wie Kollagen Typ I und Fibronectin kodieren [37]. Durch die genannten Vorgänge vergrößert sich die Zahl an hoch proliferativen Myofibroblasten im Niereninterstitium stetig, extrazelluläre Matrix akkumuliert und die Nierenfibrose schreitet voran. Etwa 14 Tage nach der UUO zeigt der Großteil der gestauten Niere einen hohen Anteil an Makrophagen und Fibroblasten [34].

1.8 Zielsetzung

Das Spektrum von Nierenerkrankungen ist sehr breit, doch vor allem progrediente Nierenerkrankungen führen meist zu terminalem Nierenversagen als Endstadium. Durch Schädigungen der Niere verschiedenster Genese kommt es zur fortschreitenden Einschränkung der Organfunktion, bis zum vollständigen Versagen der Nierenfunktion. Schädigungen der Nieren setzen eine Kaskade von Reparaturmechanismen zur Defektheilung in Gang. Doch vor allem bei chronischen Schädigungen führen sie oft zur überschießenden Ausbildung von extrazellulären Matrixproteinen wie Kollagen Typ I. Diese tubulointerstitielle Fibrosierung verursacht durch die vermehrte Proliferation von Bindegewebe einen Parenchymverlust. Die Frage welche Zelltypen für die Fibrosebildung verantwortlich sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Die Bedeutung einer endothelial-mesenchymalen Transition von Tubulusepithelzellen im Hinblick auf die Kollagen Typ I Produktion konnte bisher noch nicht quantifiziert werden. Der Anteil der Tubulusepithelzellen bei der Kollagenproduktion in der Nierenfibrose wird in dieser Arbeit im murinen Nierenfibrosemodell untersucht und es werden folgende Aufgabenstellungen bearbeitet.

1. Etablierung eines konditionellen *Kollagen1a1*-Knockouts spezifisch in Tubulusepithelzellen.

2. Analyse des Einflusses von Geschlecht auf die Kollagen Typ I-Produktion im verwendeten murinen Modell.
3. Untersuchung des Einflusses von Tubulusepithelzellen auf die Kollagen Typ I-Produktion im Laufe der Nierenfibrose.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Aceton	Immunfluoreszenz	Merck, Darmstadt
Agarose	PCR	Roth, Karlsruhe
BD Cytotfix/Cytoperm™	Intrazelluläre FACS-Färbung	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Lysing Solution	Extrazelluläre FACS-Färbung	BD Biosciences, Heidelberg
DEPC-behandeltes Wasser	RT-PCR	Ambion / life technologies, Waltham, USA
6x DNA Loading Dye	PCR	Thermo scientific, Rockford, USA
dNTP Mix, 100 mM	RT-PCR	Natutec, Frankfurt am Main
Essigsäure	Histologie	Roth, Karlsruhe
Faramount Aqueous Mounting Medium	Histologie	Dako, Jena
Fluoromount G mit DAPI	Immunfluoreszenz	eBioscience, San Diego, USA
Formaldehydlösung, 4%	Histologie	Uniklinikum Regensburg
Methanol	Immunfluoreszenz	Merck, Darmstadt
Nukleasefreies Wasser	RT-PCR	Qiagen, Hilden
RNasin	RT-PCR	Promega Corporation,
Roti-Histokitt-Eindeckmedium	Histologie	Roth, Karlsruhe
Roti-Histol	Histologie	Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 0,1 mol/l	Immunfluoreszenz	Roth, Karlsruhe

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Saponin	Intrazelluläre FACS-Färbung	Sigma Aldrich, Taufkirchen
SuperBlock Blocking Buffer	Immunfluoreszenz	Thermo scientific, Rockford, USA
Tissue Tek®, OCT™ Compound	Kryopräparatherstellung	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
Wasserstoffperoxid, 3%	Histologie	Merck, Darmstadt

2.1.2 Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung / Bezugsquelle
5x First Strand Buffer	Invitrogen / life technologies, Waltham, USA
5x Phusion HF Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
10x Amplification Buffer mit MgCl ₂	Genaxxon bioscience, Ulm
FACSClean	BD Biosciences, Heidelberg
FACSflow	BD Biosciences, Heidelberg
FACSRinse	BD Biosciences, Heidelberg
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS (10x)) pH 7,4	11,5 g Na ₂ HPO ₄ , 80 g NaCl 2 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCl Auf 1000 ml aufgefüllt mit Aqua dest.
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE (25x))	121 g Trisbase 28,55 ml Eisessig 50 ml EDTA (0,5M, pH 8) Auf 1000 ml aufgefüllt mit Aqua dest.

2.1.3 Antikörper

Antikörper	Spezifität	Konjugat	Klon	Konzentration	Bezugsquelle
CD45	Maus	FITC	30-F11	0,5 mg/ml	Biolegend, San Diego, USA
CD11b	Maus	PE	M1/70	0,2 mg/ml	Biolegend, San Diego, USA
Kollagen I	Maus	Biotin	7G5D2	1 mg/ml	Chondrex, Redmond, USA
Isotypkontrolle zu Kollagen I	Ratte	Biotin	R35-95	1 mg/ml	BD, Heidelberg, Germany
Streptavidin	Biotin	APC	-	0,2 mg/ml	BDBiosciences, Heidelberg
Kollagen I	Maus	-	polyklonal	1 mg/ml	Abcam, Cambridge, Großbritannien
F (ab') ₂ fragment of goat antirabbit IgG	Kaninchen	Alexa Flour 594	polyklonal	2 mg/ml	life technologies, Waltham, USA

2.1.4 Primer

Bezeichnung	Bezugsquelle
Desoxyribonukleotide (A, T, C und G)	Promega, Fitchburg, USA
Oligonukleotide/Oligo(dT)20	Invitrogen / life technologies, Waltham, USA
Random Primers	Promega, Fitchburg, USA
Primer 80011 cre-MAC1 (PCR für Kollagen) 5' CCT GTC TTG TCC CCT CCT CTC TTT TAG G 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg

Bezeichnung	Bezugsquelle
Primer 80012 cre-MAC1 (PCR für Kollagen) 5' CTC AGT CCC TGT TTC TGC TGC TTG AAT 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer 80027 flp-MAC1 (PCR für flox) 5' ACA TGC TCG CAC GTA CTT CAT TCC C 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer 80028 flp-MAC1 (PCR für flox) 5' CAC CAC AGC TCT CTA AGA TCC CCC G 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer S1X-A (PCR für Pax8-Cre) 5' GCA TAA CCA GTG AAA CAG CAT TGC TG 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer S1X-B (PCR für Pax8-Cre) 5' GGA CAT GTT CAG GGA TCG CCA GGC G 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Pax8 fp (ST1) (PCR für rtTA) 5'CCA TGT CTABGAC TGG ACA AGA 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Pax8 rp (ST2) (PCR für rtTA) 5'CTC CAG GCC ACA TAT GAT TAG 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer β -Aktin Fgf23 for #26 (qPCR) 5' TAT GGA TCT CCA CGG CAA C 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer β -Aktin Fgf23 rev #26 (qPCR) 5' GTC CAC TGG CGG AAC TTG 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Kollagen mCol1 for (qPCR) 5' TGT TCA GCT TTG TGG ACC TC 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg
Primer Kollagen mCol1 rev (qPCR) 5' TCA AGC ATA CGG GTT TC 3'	Eurofins Genomics, Ebersberg

Bezeichnung	Bezugsquelle
GeneRuler 100bp DNA-Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 1kbp DNA-Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Enzyme

Bezeichnung	Aktivität	Bezugsquelle
Kollagenase Typ I	0,25-1,0 U/mg	Sigma Aldrich, Steinheim
Phusion Hot Start II DNA-Polymerase	2 U/ μ l	Thermo Scientific, Waltham, USA
Reverse Transkriptase M-LV	200 U/ μ l	Invitrogen / life technologies, Waltham, USA
RNAse A	700 U/ml	Qiagen, Hilden
Taq DNA-Polymerase	5 U/ μ l	Genaxxon bioscience, Ulm

2.1.6 Farbstoffe

Bezeichnung	Bezugsquelle
Anilinblaulösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Mayers Hämalaulösung	Merck, Darmstadt
Phosphormolybdänsäurelösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Phosphorwolframsäurelösung	Sigma Aldrich, Steinheim
SYBR Safe	Invitrogen/life technologies, Waltham, USA
SYBR Green (in QuantiTect SYBR Green PCR Kit)	Qiagen, Hilden

Bezeichnung	Bezugsquelle
Weigerts Eisen-Hämatoxylin Lsg. A und B	Sigma Aldrich, Steinheim
Eosin-G-Lösung 0,5 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Beize (Bouin's Solution)	Sigma Aldrich, Steinheim

2.1.7 Kits

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit	DNA-Isolation	Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy mini Kit (250)	RNA-Isolation	Qiagen, Hilden
KAPA Mouse (10x KAPA Express)	Genotypisierung	Peqlab/VWR, Erlangen
Genotyping Hot Start Kit	Genotypisierung	International GmbH, Erlangen

2.1.8 Arzneistoffe

Wirkstoff	Verwendung	Konzentration	Hersteller
Atipamezolhydrochlorid	Antagonist	5 mg/ml	Vetoquinol, Ravensburg
Fentanylcitrat	Narkose	0,1 mg/ml	Janssen, Beerse, Belgien
Flumazenil	Antagonist	0,5 mg/ml	Hexal, Holzkirchen
Medetomidinhydrochlorid	Narkose	1 mg/ml	Vetoquinol, Ravensburg
Midazolam	Narkose	1 mg/ml	Rotexmedica, Trittau

Wirkstoff	Verwendung	Konzentration	Hersteller
Naloxonhydrochlorid	Antagonist	0,4 mg/ml	Ratiopharm, Ulm
Doxycyclinhyclat	Cre-Induktion	1/2 mg/ml	Ratiopharm, Ulm
Dexpanthenol	Augenschutz bei OPs	5 %	BAYER, Leverkusen

2.1.9 Operationsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dumont #7 Pinzette 11,5 cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Extra feine Graefe Pinzette, gebogen, 10 cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Extra feine Schere, gerade, 8,5 cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Graefe Pinzette, gerade, 10 cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Lexer-baby Schere, gebogen, 10 cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Semken-Pinzette, gebogen, 13 cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Semken-Pinzette, gerade, 13 cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Retraktor, stumpf, 2,5 cm	Fine Science Tools, Heidelberg
Novosyn resorbierbares chirurgisches Nahtmaterial, geflochten, 4/0	Braun, Melsungen
Optilene nicht resorbierbares monofiles Nahtmaterial 5/0	Braun, Melsungen

2.1.10 Geräte

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Nanodrop 2000c und 3300	DNA, RNA-Messungen, GFR-Messungen	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikroskop Axiostar plus	Histologie	Zeiss, Oberkochen

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Geldokusystem Quantum 100	PCR	Vilber Lourmat SAS, Frankreich
ChemiDoc XRS+ Imaging System	PCR	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
ViiA 7 Real-Time PCR system	qPCR	Thermo Scientific, Waltham, USA
FACS Canto II	FACS-Analyse	BD Biosciences, Heidelberg
Mikroskop AxioObserver.Z1	Immunfluoreszenz	Zeiss, Oberkochen

2.1.11 Software

Bezeichnung	Verwendung	Herausgeber
BD FACSDiva Software 8.0.1	FACS-Analyse	BD Biosciences, Heidelberg
Carl Zeiss AxioVision Rel.4.8.1	Histologie	Zeiss, Oberkochen
GraphPad Prism 5	Statistische Auswertung	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Image Lab 5.2	PCR	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Meta Imaging Series 4.6 (MetaMorph)	Histologie	Molecular devices, San Jose, USA
NanoDrop2000 und 3300	DNA/RNA-Messungen	Thermo Scientific, Waltham, USA
QuantumCapt	PCR	Vilber Lourmat SAS, Frankreich
ViiA 7	qPCR	Life technologies, Waltham, USA

2.1.12 Sonstige Materialien

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
384-well Mikrotiterplatte, transparent	qPCR	Applied Biosystems, Darmstadt
AccuCheck Counting Beads	FACS-Analyse	Invitrogen /life technologies, Waltham, USA
Cell-Strainers, 70 nm	Vereinzelung der Zellen	Falcon / Corning Inc., Tewksbury, USA
Cell-Strainers, 40 nm	Vereinzelung der Zellen	Falcon / Corning Inc., Tewksbury, USA
Deckgläser 24x24 mm	Histologie	Roth, Karlsruhe
Einmalskalpell (No. 10, No. 11)	Präparation von Gewebe	Pfm, Köln
Einmalspritzen (1 ml)	Injektionen	BD Biosciences, Heidelberg
Insulinspritzen 1 ml, 27G	GFR-Messung	BD Medical, Heidelberg
Kanülen 27G	GFR-Messung	BD Medical, Heidelberg
Kapillaren, Minicaps, 0,5 µl	GFR-Messung	Hirschmann, Eberstadt
Kapillaren, Minicaps, 5 µl	GFR-Messung	Hirschmann, Eberstadt
Liquid Blocker – Super PAP Pen	Immunfluoreszenz	Science Services, München
Objektträger SuperFrost Plus	Histologie	Thermo Scientific, Waltham, USA
Reagenzröhre mit Schraubverschluss, Polypropylene, konisch, 50 ml, 15 ml	Zellbiologische Methoden	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzröhre, Polystyrene, Rundboden, 5 ml	FACS-Analyse	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich

2.1.13 Versuchstiere

Stamm	Abkürzung	Herkunft
Pax8rtTAtetOCre	Pax8-Cre	Clinical Research Centre, Freiburg im Breisgau
Col1a1 ^{fl/fl} (Hintergrund C57BL/6J)	Col1a1 ^{fl/fl}	Genoway, Lyon, Frankreich
Pax8rtTAtetOCre x Col1a1 ^{flox/flox}	Pax8-Cre x Col1a1 ^{fl/fl}	Eigene Zucht

2.2 Methoden

2.2.1 Induzierbarer *Kollagen1a1*-Knockout: Das Cre/loxP-System

Das Cre/loxP-System stellt eine effektive Methode dar, um zelltypspezifische, *in vivo* induzierbare Knockout-Mäuse zu generieren [38]. Grundsätzlich werden im Cre/loxP-System zwei verschiedene genetisch veränderte Mauslinien benötigt. In die erste Mauslinie werden sogenannte sites (*loxP*: „locus of crossover P1“) eingefügt, die das Zielgen flankieren. Eine *loxP* site ist eine DNA-Sequenz, die nicht im natürlichen Mausgenom zu finden ist und aus zwei verschiedenen Elementen besteht. Den Kern bildet ein Mittelstück, das die Ableserichtung festlegt. Das Mittelstück wird von einer palindromischen Sequenz flankiert. Die *loxP* sites werden mit Hilfe einer gezielten Mutagenese vor und nach der gewünschten Gensequenz ins Genom von embryonalen Stammzellen eingebracht. Um einen Knockout zu generieren, muss eine Gensequenz gewählt werden, die für die Funktionalität des Zielgens unerlässlich ist [38]. Es muss darauf geachtet werden, keine anderen Gene beziehungsweise Transkriptionsfaktoren zu beschädigen [39]. Die Sequenz zwischen den *loxP* sites wird als „gefloxt“ bezeichnet. Entfällt diese gefloxt Sequenz, verliert das Zielgen seine Funktion. Die zweite benötigte Mauslinie enthält die genetische Information für eine Cre-Rekombinase (Cre: „creates Recombination“), die zur Familie der Integrasen zählt [38]. Die Cre-Rekombinase erkennt spezifisch *loxP* sites und katalysiert je nach Orientierung der *loxP* sites die Exzision, Inversion, Insertion oder Translokation des geflochten DNA-Stücks (Abb. 5) [39]. Ist die Orientierung der flankierenden *loxP* sites gleich, entfernt die Cre-Rekombinase die geflochte Sequenz irreversibel und es verbleibt nur eine *loxP* site im Genom (Abb. 5A). Befindet sich nur eine *loxP* site im Genom, kann dies zur Insertion eines DNA-Abschnittes genutzt werden, das selbst auch eine *loxP* site enthält (Abb. 5B). Sind dagegen zwei *loxP* sites in gegensätzlicher Orientierung vorhanden, kommt es zu einer Inversion der geflochten Sequenz und es können weiterhin zwei *loxP* sites detektiert werden (Abb. 5C). Die Inversion wird im Mausmodell allerdings selten verwendet, da es zwar initial zu einer Inaktivierung des Gens kommt, diese sich aber durch Reversion spontan wieder aufheben kann [38]. Werden *loxP* sites auf verschiedenen Chromosomen platziert, kommt es zu einer Translokation (Abb. 5D). [39] Die Cre-Rekombinase kann je nach Promotor entweder in allen Zellen oder zelltypspezifisch exprimiert werden. Wird die Cre-Rekombinase zelltypspezifisch aktiv, bietet dies die Möglichkeit auch *in*

in vivo zelltypspezifische Analysen durchzuführen, die bei einem ubiquitären Knockout der jeweiligen Zellreihe pränatal letal wären oder große phänotypische Veränderungen mit sich bringen würden [38]. In dieser Arbeit wurde ein System gewählt, in dem zelltypspezifisch eine Exzision der Exone 47 bis 51 des *Kollagen1a1*-Gens stattfindet, wodurch die Expression von Kollagen Typ I in diesen Zellen stark reduziert wird (Abb. 6). Dazu erfolgte in Vorarbeiten die Insertion der *loxP* sites an die gewünschte Position im Genom, die für das C-terminale Ende des Propeptids sowie den Poly-A-Schwanz kodiert. Diese Elemente sind entscheidend für die Stabilisierung der RNA, für die α -Kette des Kollagens sowie die Tripelhelixbildung (Abb. 6A). Das *Kollagen1a1*-Genkonstrukt mit den *loxP* sites wurde anschließend in embryonale Stammzellen (C57BL6/J) übertragen. Dazu erfolgte die Selektion von embryonalen Stammzellen durch eine Neomycin-Resistenzkassette (*neo*) positiv durch die Behandlung mit Neomycin sowie deren Injektion in Mäuse. Vor und hinter der Neomycinkassette befindet sich jeweils eine FRT-Sequenz, die von einer Flp-Rekombinase erkannt wird. Durch Paarung der generierten Mäuse mit Mäusen, die die Flp-Rekombinase exprimieren, kann die Neomycinkassette durch die flankierende FRT-Sequenz somit wieder entfernt werden (Abb. 6B). Durch weitere Verpaarung untereinander entstanden schließlich homozygote Mäuse, bei denen die *Col1a1*-Region von *loxP* sites flankiert wird (*Col1a1^{fl/fl}*). Sobald diese Tiere mit Cre- Deleter Mäusen verpaart werden, wird der geflochte Teil des *Kollagen1a1* Gens deletiert und somit die Expression von Kollagen Typ I stark gemindert (Abb. 6C).

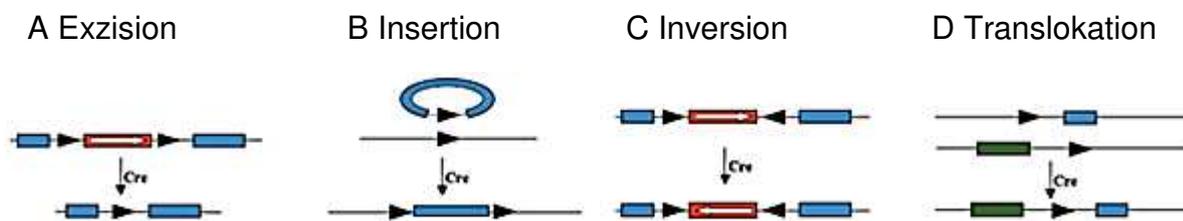


Abb. 5 Möglichkeiten der Genmodifikation durch das Cre/loxP-System. Abhängig von der Orientierung und Platzierung der *loxP* sites können verschiedene genetische Veränderungen vorgenommen werden. Die Richtung der weißen Pfeile zeigt die Ableserichtung des Zielgens (Cre-Rekombinase)

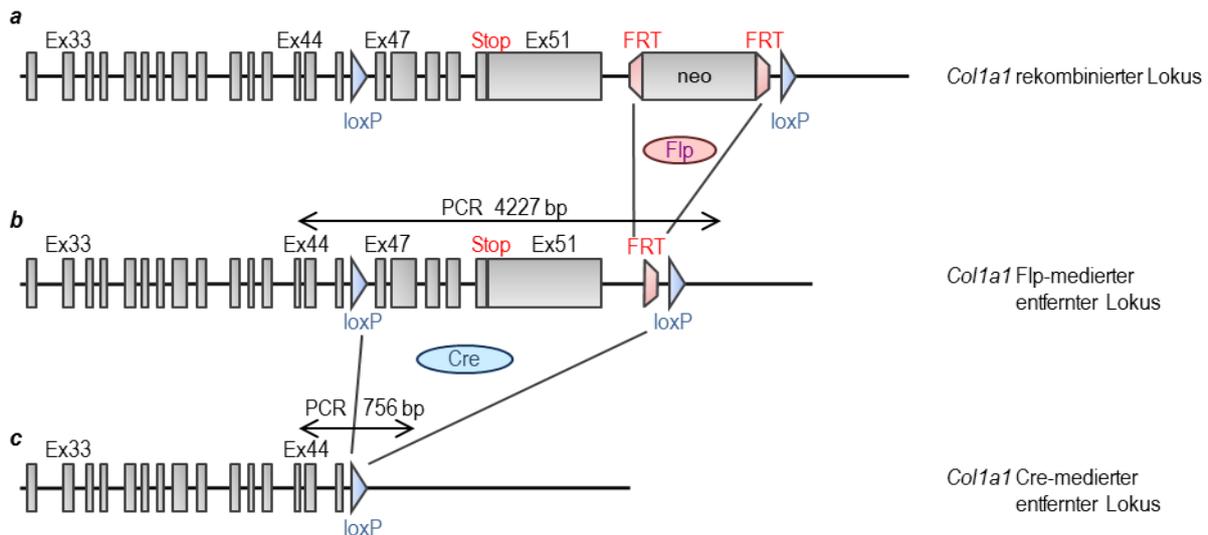


Abb. 6 Schematische Visualisierung des induzierbaren *Kollagen1a1*-Knockouts. (A) Mittels homologer Rekombination werden *loxP* sites im *Kollagen1a1*-Gen (zwischen die Exone (Ex) 46 und 47) und am Ende des Gens (nach Exon 51) inseriert. (B) Exzision der Neomycinkassette durch die Flp-medierte Rekombination. Die PCR liefert ein Produkt mit einer Länge von 4227 Basenpaaren. (C) Deletion des von *loxP* sites flankierten Abschnitts (Exon 47 bis 51) durch Cre-medierte Rekombination. Es ergibt sich ein neues PCR Produkt, dessen Länge 756 Basenpaare beträgt.

2.2.2 Das tetOn/Off-System in Pax8rtTAtetOCre-transgenen Mäusen

Eine weitere häufig verwendete gentechnische Veränderung neben dem Cre/*loxP*-System stellt der Tetracyclin abhängige Knockout (tetOn/Off-System) dar. Während das Cre/*loxP*-System einen irreversiblen Knockout generiert, ermöglicht das tetOn/Off-System die reversible Beeinflussung der Transkription durch tetracyclinabhängige Transkriptionsfaktoren [40]. Tetracyclin ist ein Breitbandantibiotikum, das im klinischen Bereich Anwendung bei Erkrankungen der Atemwege, des Gastrointestinaltrakts und des Urogenitalbereiches findet. Als kostengünstige Alternative kann zur Induktion des Knockouts auch das Analogon Doxycyclin (DOX) verwendet werden [41]. Dieses System ermöglicht es exogen die Genexpression in transgenen Mäusen reversibel zu kontrollieren und so Defekte in der Embryonalentwicklung oder postnatal früh letale Phänotypen zu umgehen [42]. Zudem können selektiv einzelne Zelltypen in verschiedenen Entwicklungsstufen untersucht werden [39]. Zur Beeinflussung der Genexpression wird ein Tetracyclin abhängiger Transaktivator benötigt (tTA). In Anwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin ändert sich die Konformation des Transaktivators und dieser kann nicht mehr an eine spezifische Tetracyclinoperator-Konsensussequenz (tetO) binden [43]. An den Operator ist ein Minimalpromotor gekoppelt, beide Elemente zusammen

bilden das Tetracyclin Responsive Element (TRE). Durch die Bindung des Transaktivators an das TRE wird dieses deaktiviert und die Transkription des Zielgens gestoppt [39]. Wird durch die Anwesenheit von Tetracyclin die Transkription des Zielgens unterbunden, spricht man vom tetOff-System (Abb. 7A). Wird hingegen ein reverser Tetracyclin abhängiger Transaktivator (rtTA) verwendet, der nur an Tetracyclin gebunden am TRE aktivierend wirkt, kann auf diese Art die Transkription des Zielgens induziert werden (tetOn, Abb. 7B) [39,44]. Das tetOn/Off-System ist binär, das heißt, um den gewünschten Effekt am Zielgen zu erzielen, müssen zwei transgene Mauslinien miteinander gekreuzt werden. Die eine Mauslinie enthält die genetische Information für den tTA oder rtTA, der in einem zelltypspezifischen Promotor platziert wird, um Gewebsspezifität zu erreichen. Die zweite Mauslinie enthält die genetische Information für das TRE und das gewünschte Zielgen (Abb. 7) [43].

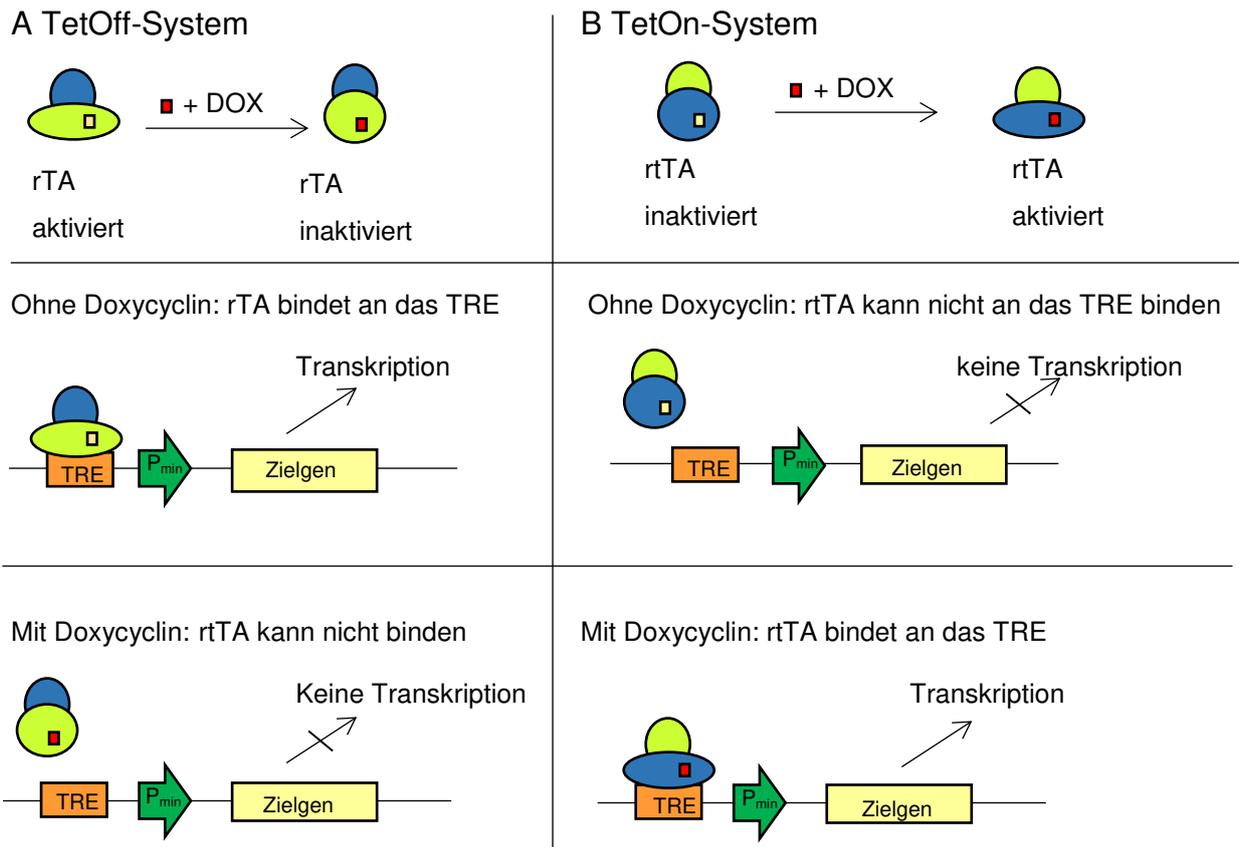


Abb. 7 Schematische Darstellung des tetOn/Off-Systems zur Generierung eines konditionellen Knockouts mittels Doxycyclininduktion. Die Bindung von Doxycyclin an den rTA bzw. rtTA führt zu einer Konformationsänderung von der aktivierten zur inaktivierten Form (rTA) und vice versa bei einem rtTA (DOX = Doxycyclin/Tetracyclin; rTA = reverser tetracyclinabhängiger Transaktivator; TRE = Tetracyclin responsive element, P_{min} = Minimalpromotor; Abb. modifiziert nach [39]).

Zur Generierung der verwendeten *Pax8rtTAtetOCre*-transgenen Mäuse wurde der rtTA als 6,6 kb langes DNA-Fragment in den Pax8-Promotor injiziert. Dadurch wird die Transkription des rtTA durch den Pax8-Promotor gesteuert und der rtTA entsteht nur in Zellen, in denen das Pax8-Gen aktiv ist. Da das Pax8-Gen, wie unter 1.4 beschrieben, fast ausschließlich in Nierentubulusepithelzellen aller Tubulusabschnitte aktiv ist, wird eine hohe Spezifität für diese Zellen erreicht [42,45,45]. In Anwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin wird die Bindung des rtTA an das TRE ermöglicht und die Transkription der ebenfalls ins Genom eingebrachten Cre-Rekombinase wird induziert. Um den Beitrag der Kollagen Typ I-Expression von Tubulusepithelzellen im Nierenfibrosemodell zu untersuchen, wurden die *Pax8rtTAtetOCre*-Mäuse mit *Col1a1^{flox/flox}*-Mäusen gekreuzt. Werden diese dreifach transgenen Mäuse mit Tetracyclin oder Doxycyclin behandelt, entsteht wie unter 2.2.1 beschrieben die Cre-

Rekombinase in Tubulusepithelzellen und bewirkt die Exzision des *Col1a1*-Allels (Abb. 8).

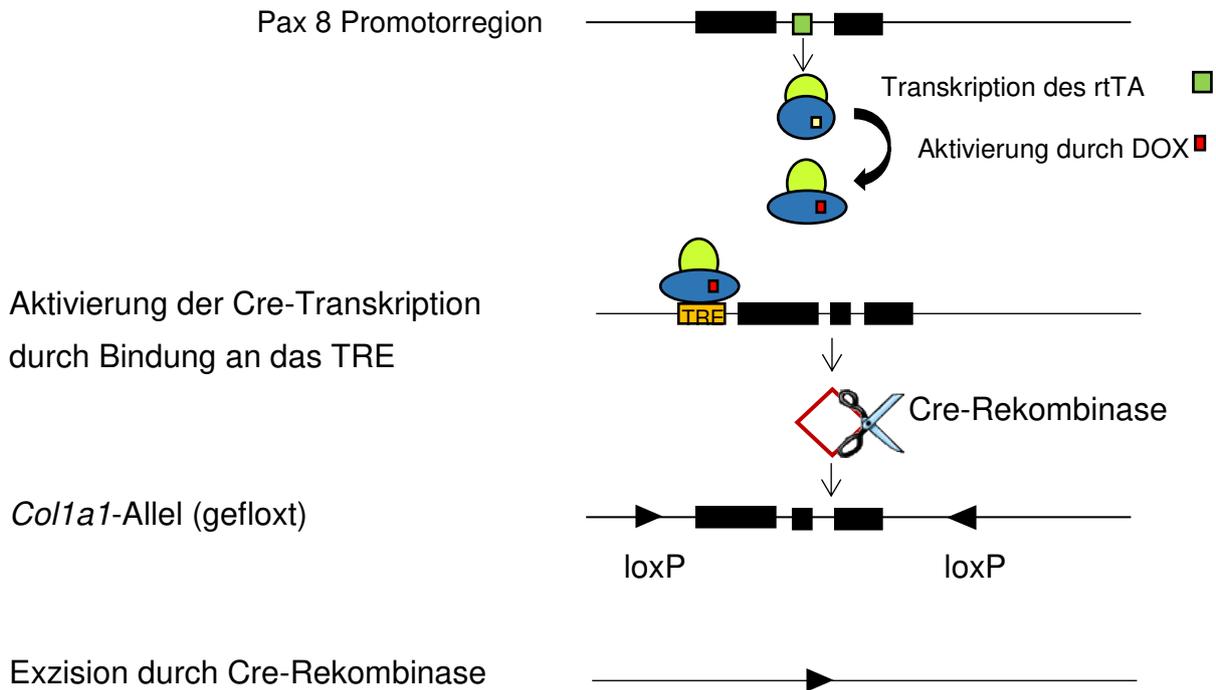


Abb. 8 Induzierbarer *Kollagen1a1* Knockout in Pax8rtTAetOCre-transgenen Mäusen. Der reverse Transaktivator (rtTA) ist im Promotor Pax8-Gen gelegen, sodass dieser nur in Zellen transkribiert wird, in denen das Pax8-Gen aktiv ist. (DOX = Doxycyclin/Tetracyclin).

2.2.3 Verwendete Versuchstiere und die Abkürzungen der Genotypen

Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in den folgenden Kapiteln für die einzelnen Versuchstiergruppen die nachstehenden Abkürzungen verwendet (Tab. 1).

Tab. 1 Abkürzungen der verwendeten Genotypen.

Genotyp/Bedeutung	Abkürzung
Pax8rtTAetOCre x Kollagen1a1 ^{flox/flox}	Pax8-Cre x Col1a1 ^{fl/fl}
Pax8rtTAetOCre x Kollagen1a1 ^{wt/wt}	Pax8-Cre
Kollagen1a1 ^{flox/flox}	Col1a1 ^{fl/fl}
Kontralaterale Niere	Kolat
Induziert/mit Doxycyclin behandelt	+Doxy
Nicht induziert/nicht mit Doxycyclin behandelt	ØDoxy
α-Kette von Kollagen Typ I	Col1a1

2.2.4 Genotypisierung der Versuchstiere

Da es bei der Zucht der Mäuse immer wieder zum Verlust des Pax8rtTA-Konstruktes, der Cre-Rekombinase oder in seltenen Fällen auch die *loxP* sites kommt, ist es nötig, vor Versuchsbeginn diese drei Elemente im Genom der Mäuse nachzuweisen. Durch Genotypisierung kann somit sichergestellt werden, dass der Knockout auch stattfinden kann. Zur Genotypisierung der Versuchstiere wurden ca. 2 mm lange Schwanzbiopsien entnommen. Aus diesen wurde die DNA mit Hilfe des KAPA Mouse Genotyping Kits (peqlab) isoliert. Dazu wurden zu jedem Biopsat 88 µl DNase freies Wasser, 10 µl KAPA Express Extract Buffer (10x) und 2 µl KAPA Express Extract Enzyme (1 U/µl) gegeben. Die Mischung wurde 10 Min bei 75 °C zur enzymatischen Lyse des Gewebes inkubiert. Anschließend folgte die Inaktivierung des Enzymes über 5 Min bei 95 °C. Die Messung der DNA-Konzentration erfolgte mittels eines Spektralfotometers. Zur Überprüfung des Genotyps wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) für das Pax8rtTA-Konstrukt, für die Cre-Rekombinase und die *loxP* sites durchgeführt (Tab. 2). Hierfür wurden zu je 40 ng DNA jeweils 9,0 µl DNase-freies Wasser, 12,5 µl KAPA2G Genotyping Mix (2x) sowie 1,25 µl des jeweiligen forward und reverse Primers gegeben. Die PCR erfolgte gemäß den nachstehenden Protokollen.

Tab. 2 PCR- Einstellungen zur Identifizierung der Cre Rekombinase, der *loxP* sites und des Pax8rtTA- Konstruktes

Identifizierung der Cre-Rekombinase:

1. Zyklus: 94 °C	3 Min	} 35 Zyklen
2. Zyklus: 94 °C	30 Sek	
66 °C	30 Sek	
72 °C	30 Sek	
3. Zyklus: 72 °C	10 Min	

Identifizierung der *loxP* sites:

1. Zyklus: 94 °C	3 Min	} 35 Zyklen
2. Zyklus: 94 °C	30 Sek	
65 °C	30 Sek	
72 °C	60 Sek	
3. Zyklus: 72 °C	10 Min	

Identifizierung des Pax8rtTA-Konstruktes:

1. Zyklus: 94 °C	3 Min	} 35 Zyklen
2. Zyklus: 94 °C	30 Sek	
60 °C	30Sek	
72 °C	45 Sek	
3. Zyklus: 72 °C	10 Min	

Nach der PCR wurden zur Analyse mittels Gelelektrophorese jeweils 20 µl des PCR Produktes auf ein 1,5 % Agarosegel (1,5 g Agarose gelöst in 100 ml TAE-Puffer), welches mit 50 ml Sybr Safe versetzt wurde, aufgetragen. An dieses wurde zunächst eine Spannung von 80 V für 10 min angelegt und die Spannung anschließend für weitere 30-35 Min auf 60 V herunterreguliert. Die negativ geladene DNA wandert zum Pluspol, dabei können sich kleine DNA-Stücke besser durch die Maschen des Agarosegels fortbewegen und entfernen sich in der gleichen Zeit weiter vom Auftragungsort am Minuspol. Auf diese Weise können die DNA-Amplifikate nach ihrer Länge sortiert werden. Zum Vergleich wurde auf jedes Gel zusätzlich ein DNA-Ladder (100 bp) aufgetragen. Für die PCR zum Nachweis der Cre-Rekombinase war eine Bande bei 726 bp zu erwarten, zur Darstellung des Pax8rtTA-Konstrukts ein Signal bei 640 bp. Die PCR zur Detektion der *loxP* sites lieferte für Mäuse, die homozygot bezüglich der geflochten Region waren, eine Bande bei 569 bp, im Falle einer heterozygoten Maus zwei Banden, eine Bande bei 569 bp und eine Bande bei 459 bp für das Wildtypgen. Eine reine Wildtypmaus liefert eine Bande bei 459 bp. Die Banden konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Dokumentation fotografiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}-Mäuse als Versuchstiere verwendet. Als Kontrollgruppen dienten homozygote Col1a1^{fl/fl}-Mäuse sowie Pax8-Cre-Mäuse.

2.2.5 Die Unilaterale Ureterobstruktion

Die Versuchstiere wurden zunächst gewogen und anschließend durch die intraperitoneale Applikation von Fentanyl (0,05 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Dormitor (0,5 mg/kg) narkotisiert. Nachdem überprüft wurde, ob das geeignete Narkosestadium erreicht wurde, erfolgte der Schutz der Augen vor dem Austrocknen mittels Bepanthen Augen und Nasensalbe. Danach wurde die Maus in Rückenlage auf eine Wärmeplatte (28 °C) gelegt, um intraoperativ eine Hypothermie der Maus zu vermeiden. Das Operationsgebiet wurde mit 70 % Ethanol desinfiziert, welcher das Fell leicht befeuchtete und verklebte, sodass eine Rasur nicht nötig war. Die Bauchdecke und das Peritoneum wurden mit einer ca. 0,7 cm langen Inzision links lateral der *Linea alba* in etwa auf Höhe des Abgangs der hinteren Extremität eröffnet. Die Wundhaken wurden angelegt und das Darmkonvolut zur Seite verlagert bis der rechte Harnleiter sichtbar wurde. Der Ureter wurde an zwei Stellen mit einem nicht resorbierbaren Faden umschlungen und mit je drei festen Knoten ligiert. Um eine fast vollständige Obstruktion zu erreichen, wurde ein Faden mit einer Dicke von etwa 0,1-0,15 mm verwendet [46]. Nachdem das Darmkonvolut wieder in anatomische Position gebracht wurde, erfolgte der Verschluss von Peritoneum und Bauchmuskulatur mit einem resorbierbaren 4-0 Faden. Die Hautnaht erfolgte mit Einzelknopfnähten unter Verwendung eines nicht resorbierbaren 5-0 Fadens. Eine Mischung aus Naloxon (1,2 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Antisedan (2,5 mg/kg) wurde als Antagonist der Narkose *subcutan* in die Nackenfalte injiziert. Anschließend wurden die Mäuse mindestens zwei Stunden bis zum vollständigen Erwachen unter die Wärmelampe gestellt und beobachtet. Bei einem postoperativ schlechten Allgemeinzustand wurden bis zu 500 µl Kochsalzlösung (0,9 %) intraperitoneal injiziert.

2.2.6 Aufarbeitung der Versuchstiere

2.2.6.1 Durchflusszytometrische Analyse

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen einer Probe nach ihrer Größe, Granularität, Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung sortiert [47]. Dazu wird das zu untersuchende Material zunächst zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und mit den gewünschten fluoreszenzgekoppelten

Antikörpern zur intra- und extrazellulären Färbung inkubiert. Nach dieser Vorbereitung werden die markierten Zellen zusammen mit einer Trägerflüssigkeit mittels hydrodynamischer Fokussierung im Durchflusszytometer in einem laminaren Strom einzeln durch eine Messküvette geleitet. In dieser treffen verschiedene Laserstrahlen mit monochromatischem Licht auf den Probenstrom. Dadurch wird das Licht verschieden gestreut. Über das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter, FSC) wird die Größe jeder Zelle gemessen, über das Seitwärtsstreulicht (Sidescatter, SSC) dagegen ihre Granularität. Wurde die Probe im Vorfeld mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern inkubiert, wird beim Auftreffen des Lichtstrahles auf das Fluorochrom ein Teil der Lichtenergie absorbiert und Licht einer geringeren Wellenlänge emittiert. Diese Fluoreszenzsignale werden dann über Spiegel gebündelt und nach den verschiedenen Fluorochromen sortiert [47]. Photodetektoren messen das gestreute und das emittierte Licht und wandeln es in elektrische Signale um. So können mit Hilfe verschiedener Fluorochrome pro Zelle mehrere intra- oder extrazelluläre Proteine oder Marker gleichzeitig nachgewiesen werden. Wichtig dabei ist es, die Fluorochrome so zu wählen, dass die zu vermessenden Zellen durch die Bindung nicht beeinflusst oder aktiviert werden und der spektrale Überlappungsbereich der Fluorochrome möglichst gering ist [47]. In der vorliegenden Arbeit wurde das FACS Canto II von BD Biosciences verwendet. Bei diesem Gerät besteht die Möglichkeit mit drei Lasern mehrere Kanäle gleichzeitig zu messen. Für die durchgeführten Versuche genügte es, drei verschiedene Fluorochrome zu verwenden. Der Farbstoff FITC (Fluoresceinisothiocyanat) wurde an den CD45-Antikörper gekoppelt und PE (Phycoerythrin) an den CD 11b-Antikörper gebunden. Es erfolgte somit eine direkte Antikörperfärbung. Zur Detektion des biotinylierten Kollagen Typ I wurde eine indirekte Antikörperfärbung mit APC konjugiertem Streptavidin durchgeführt. Die Ergebnisse werden als zweidimensionales Streudiagramm angezeigt, bei dem die Fluoreszenz eines Antikörpers entweder gegen die Größe, die Granularität oder die Fluoreszenz eines anderen Antikörpers aufgetragen ist [48].

2.2.6.2 Gewinnung und Verarbeitung der Proben

Das Töten der Versuchsmäuse erfolgte mittels zervikaler Dislokation, anschließend wurde das Fell mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Nach Entnahme beider Nieren und

vorsichtiger Entfernung der Nierenkapsel wurde je ein Viertel jeder Niere zur Kryo- und zur Paraffineinbettung verwendet. Zur DNA- und RNA Isolation wurde je ein Sechzehntel in flüssigem Stickstoff gefroren und die verbleibenden drei Achtel zur FACS-Analyse weiterverarbeitet. Nach Zerkleinerung der Nierenstücke mit dem Skalpell folgte deren Aufnahme in 5 ml eisgekühltem HANKS Puffer mit gelöster Kollagenase I (1 mg/ml). Der HANKS Puffer enthält Proteinzusätze, die als stabilisierende Schutzkolloide wirken und die passive Verklumpung der Oberflächenmoleküle („patching“) sowie die Ansammlung der Proteine an einem Zellpol vermeiden („capping“) [47]. Danach erfolgte der Verdau der Suspensionen über einen Zeitraum von 30 Min bei einer Temperatur von 37 °C unter ständiger Bewegung. Dadurch werden die Kollagenstrukturen des Bindegewebes, die die Zellen verbinden, zerstört und eine Separierung der Zellen ist möglich. Anschließend wurde eine Einzelzellsuspension erstellt. Dazu mussten die Nierenstücke mit dem Spritzenstempel einer 2 ml Spritze zuerst vorsichtig durch ein 70 µm Sieb gedrückt, Falcon, Stempel und Sieb mit HANKS Puffer gespült, das Volumen auf 10 ml aufgefüllt und zentrifugiert (1600 rpm, 7 Min, 4 °C) werden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Danach wurde die Lösung in gleicher Weise durch ein 40 µm Sieb gedrückt, Falcon, Spritzenstempel und Sieb wurden wieder gespült und das Volumen (4 ml) auf zwei FACS-Röhrchen für die Isotyp-Kontrolle und den Antikörper aufgeteilt. Das Spülen der Petrischale, in dem die Einzelzellsuspension erstellt wurde, erfolgte mit 2 ml PBS, die dann wieder auf die beiden FACS-Röhrchen aufgeteilt wurden (Endvolumen je 3 ml). Der letzte Schritt war die Zentrifugation der Proben (1600 rpm, 7 Min, 4 °C) und das Absaugen des Überstandes.

2.2.6.3 Extra- und intrazelluläre Färbung zur durchflusszytometrischen Analyse

Zur extrazellulären Färbung wurden je 10 µl einer 1:100 mit PBS verdünnten Antikörperlösung gegen die Oberflächenantigene CD45 (FITC) und CD11b (PE) zur Nierensuspension gegeben, gut gemischt und 25Min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 4 ml PBS abgestoppt, die Proben zentrifugiert (1600 rpm, 7 Min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit 150 µl Zytofix/Zytoperm, um die Zellen zum einen für den Antikörper zur

Detektion von intrazellulärem Kollagen Typ I durchlässig zu machen und zum anderen um störende Erythrozyten zu lysieren. Nach 20 Min Inkubationszeit wurden 4 ml Saponin (0,1 %, PBS) zugegeben, die Proben wieder zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend folgte die intrazelluläre Färbung von Kollagen sowie der Isotypkontrolle (Verdünnung 1:100, Saponin, je 10 µl) mit dem biotinylierten Antikörper. Nach 50 Min Inkubationszeit schlossen sich ein weiterer Waschschrift sowie die Zugabe von 10 µl Streptavidin (APC, 1:100, Saponin) an. Dies musste weitere 35 Min inkubieren bevor nach einem weiteren Waschschrift 20 µl Counting Beads zugegeben wurden. Danach konnten die Proben mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Alle Proben wurden 120 Sek analysiert.

2.2.7 Histologische Methoden

2.2.7.1 Paraffin-Einbettung und Masson-Trichrom-Färbung

Zur Erstellung von histologischen Schnitten wurde je ein Viertel der entnommenen Nieren in Formaldehyd fixiert und anschließend mit Paraffin ausgegossen. Aus den Paraffinblöcken mit den Organproben wurden mit einem Mikrotom 3 µm dicke Schnitte erstellt. Nach dem Aufbringen der Paraffinschnitte auf die Objektträger erfolgte die Trocknung dieser über 48 Stunden bei 37 °C. Die Paraffinschnitte wurden mit der Masson-Trichrom-Färbung behandelt, um Zellen und vor allem Bestandteile des Bindegewebes wie Kollagen sichtbar zu machen. Dazu mussten die Schnitte zuerst 10 Min in Rotihistol inkubiert und anschließend mit Hilfe einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert werden. Nach gründlichem Spülen in endionisiertem Wasser wurden die Schnitte über Nacht in einer Beize (Bouin's Solution) belassen, da dies später die Haftung der Färbereagenzien verbessert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zuerst unter fließendem Wasser gespült bis keine Beize mehr zu sehen war und dann fünf Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung inkubiert. Danach mussten die Schnitte weitere fünf Minuten unter fließendem Wasser gebläut und anschließend noch gespült werden. Weigerts Eisenhämatoxylin Lösung färbt Zellkerne dunkelblau bis schwarz. Das Zytoplasma wurde im nächsten Schritt mit Hilfe einer fünfminütigen Inkubation in Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin rot gefärbt. Nach einem Spülschritt folgte die Inkubation mit Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdänsäurelösung (5 Min) und Anilinblau (15 Min), um Bindegewebsfasern hellblau anzufärben. Die Schnitte wurden zudem maximal eine Minute mit 1%iger Essigsäure inkubiert, die die Farben brillanter erscheinen lässt. Abschließend wurden die Schnitte wieder in endionisiertem Wasser gespült und mit Hilfe der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Danach wurden die Schnitte mindestens fünf Minuten in Rotihistol inkubiert und dann mit dem Rotikit eingedeckelt.

Von jedem Schnitt wurden 10-15 Bilder in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Diese Bilder wurden dann mit Hilfe der Programmes MetaMorph ausgewertet. Dabei wurde auf jedem Bild die fibrotische Fläche ermittelt. Aus den Werten aller Bilder eines Präparates wurde der Mittelwert gebildet, der dann in die Auswertung zum Vergleich der Versuchsgruppen einging.

2.2.7.2 Kryologische Einbettung und immunhistologische Kollagenfärbung

Ein Viertel der beim Versuchsende entnommenen Nieren wurde jeweils in Tissue Tek O.C.T. compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff gefrosten. Danach wurden die Blöcke bei -80 °C gelagert. Die Präparate wurden bei -20 °C in einem Kryotom in 3 µm dicke Proben geschnitten und auf Objektträger aufgetragen. Die Schnitte mussten zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet werden, bevor sie durch zehnmünütige Inkubation in eisgekühltem Aceton fixiert werden konnten. Anschließend wurden die Schnitte bei -20 °C gelagert. Zur immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte zunächst zehn Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und angetrocknet. Danach wurden die Schnitte mit Fettstift umrandet und anschließend zehn Minuten in PBS gewaschen. Es folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen in den Schnitten mit Superblock für 30 Min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden erneut in PBS gewaschen und dann über Nacht mit einem Anti-Kollagen-Rabbit-Primärantikörper (1:1000 verdünnt) in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal für drei Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper Anti-Rabbit Alexa Flour 594 (1:500 verdünnt) für 30 Min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte wiederum dreimal für drei Minuten bei Raumtemperatur gewaschen, bevor sie mit Fluoromount G mit DAPI, welches die Zellkerne durch die Bindung an DNA im Fluoreszenzmikroskop blau färbt, eingedeckelt werden konnten.

Zur Auswertung wurden jeweils 10-15 sich nicht überlappende Bilder pro Schnitt bei 20-facher Vergrößerung gemacht. Anschließend wurde die Kollagen positive Fläche dieser Bilder mit dem Programm MetaMorph ermittelt. Aus den Werten der 15 Bilder pro Schnitt wurde ein Mittelwert gebildet, der dann zum Vergleich der Versuchsgruppen herangezogen wurde.

2.2.8 Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1 Die Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaktion) verwendet, die eine DNA-Replikation *in vitro* darstellt. Dazu wurde eine thermostabile DNA-Polymerase, die zwei Primer für

die gewünschte DNA-Sequenz, dNTPs als Bausteine, Puffer und $MgCl_2$ zur Verbesserung der Funktion der Polymerase benötigt. Diese Zutaten wurden zum DNA-Template, das als Matrize diente, gegeben. Die PCR lief in 20-40 Zyklen ab und bestand aus drei Schritten. Der erste Schritt war die Denaturierung der DNA. Durch Erhitzen der DNA-Probe auf $95\text{ }^\circ\text{C}$ wurde die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten. Darauf folgte die Annealingphase, in der die Primer an das passende DNA-Stück banden. Die Annealingtemperatur lag in der Regel zwischen $40\text{ }^\circ\text{C}$ und $70\text{ }^\circ\text{C}$ und war für jedes Primerpaar individuell zu bestimmen. Je mehr Guanin oder Cytosin in der Sequenz des Primers enthalten war, desto höher lag aufgrund der größeren Anzahl der Wasserstoffbrückenbindung auch die Annealingtemperatur. In der dritten Phase fand die DNA-Synthese statt. Die Polymerase synthetisierte am freien 3'OH-Ende des Primers aus den Substraten ATP, GTP, CTP und TTP komplementär zur DNA-Matrize einen neuen DNA-Strang. Die in der PCR verwendeten thermostabilen DNA-Polymerasen haben ihre Arbeitstemperatur bei $70\text{-}72\text{ }^\circ\text{C}$, wurden aber auch während des Schrittes der Denaturierung nicht zerstört, sodass sie der Reaktion nur einmal zu Beginn der Reaktion beigefügt werden mussten. Durch die hohe Arbeitstemperatur wurden Primerdimere und Basenfehlpaarungen reduziert [8]. Nachdem der Doppelstrang zwischen den Primern vervollständigt war, begann der nächste PCR-Zyklus mit der Denaturierung. Auf diese Weise verdoppelte sich die Anzahl der DNA-Kopien in jedem Zyklus. So konnte aus einer geringen DNA-Menge eine große Menge der gewünschten DNA-Sequenz amplifiziert werden [8].

Eine Variante der PCR ist die quantitative Echtzeit-PCR. Diese lief im Grunde nach dem gleichen Schema ab, mit dem Unterschied, dass der DNA-Probe zusätzlich noch ein Farbstoff, in der vorliegenden Arbeit Sybr Green, beigefügt wurde, der eine hohe Affinität zu doppelsträngiger DNA zeigte. Sybr Green interkalierte in doppelsträngige DNA, dadurch entstand ein Komplex, der ein detektierbares Fluoreszenzsignal aussandte. Verdoppelte sich die DNA-Menge in einem Zyklus, so verdoppelte sich gleichzeitig auch das Fluoreszenzsignal (Abb. 9). Das Fluoreszenzsignal wurde nach jedem Zyklus gemessen. Je größer die ursprünglich DNA-Menge in der Probe war, desto schneller stieg diese im Laufe der PCR durch die exponentielle Vermehrung an und desto eher konnte das Signal detektiert werden. Trug man das Fluoreszenzsignal im zeitlichen Verlauf auf, so war zu Beginn

eine exponentielle Phase zu beobachten, die über einen linearen Verlauf in eine Plateauphase überging. Der Beginn des exponentiellen Anstieges wurde als Schwellenwert bzw. Ct-Wert angegeben. Der Ct-Wert lag umso niedriger, je größer die DNA-Menge des in der Probe gesuchten DNA-Abschnittes war. Zur Quantifizierung wurde zusätzlich zum untersuchten Amplifikat ein Housekeeper benötigt. Dies ist ein DNA-Abschnitt, der ubiquitär vorhanden ist und nicht reguliert wird. Damit liefert der Housekeeper das Basislevel der DNA- bzw. cDNA-Menge in der Probe [49].

Zur Auswertung wurde in dieser Arbeit die Δ Ct-Methode verwendet. Mit der qPCR wurde die *Kollagen1a1*-Expression in der Niere auf RNA-Ebene untersucht. Zur Berechnung wurde β -Aktin als Housekeeper verwendet, da dieses Gen nicht reguliert wird. Vom Ct-Wert der *Kollagen1a1*-Probe wurde die β -Aktin-Probe subtrahiert und so das Δ Ct gebildet. Zur Auswertung wurde dieser Wert in die Formel $2^{-\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt. Auf diese Weise kann die mRNA-Menge des regulierten *Kollagen 1a1*-Gens in der Probe quantitativ verglichen werden. Zur Ermittlung der Effektivität der PCR wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe einer der Proben erstellt. (1:10, 1:100, 1:1000). Die Ct-Werte der Verdünnungen wurden verglichen, um zu sehen, ob eine entsprechend niedrigere Konzentration auch einen höheren Ct-Wert liefert.

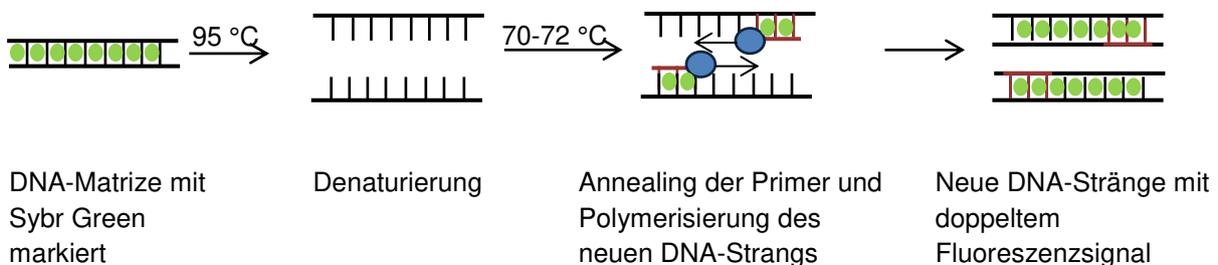


Abb. 9 Schematische Darstellung der PCR. Sybr Green interkaliert in doppelsträngige DNA und liefert dort gebunden ein messbares Fluoreszenzsignal

(● DNA-Polymerase, ● Sybr Green).

2.2.8.2 Isolation der RNA

Zu Analyse der RNA wurde jeweils ein Sechzehntel der am Versuchsende entnommenen Nieren verwendet, die nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff gefrosten und anschließend bei -80 °C gelagert wurden. Zur RNA-Isolation fand das Kit von Macherey-Nagel Verwendung. Die Proben wurden zunächst in $350\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer (LBP) homogenisiert und lysiert. Anschließend wurde das

Homogenisierungsprodukt auf eine Filtrationssäule gegeben und die genomische DNA abfiltriert. Dazu wurden die Proben zentrifugiert (11000 g, 30 Sek, 20 °C). Das Filtrat wird mit 100 µl binding solution (BS) versetzt und auf eine weitere Säule gegeben, die die RNA zurückhält. Diese wurde wiederum zentrifugiert (11000 g, 15 Sek, 20 °C) und der Durchfluss verworfen. Auf die Säule wurde anschließend ein Waschpuffer (200 µl WB 1) gegeben und die Proben wiederum zentrifugiert (11000 g, 15 Sek, 20 °C). Dieser Schritt wurde in gleicher Weise mit dem zweiten Waschpuffer (600 µl WB 2) wiederholt. Danach wurde noch einmal WB2 (250 µl) auf die Säule gegeben und danach zum Trocknen zentrifugiert (11000 g, 2 Min, 20 °C). Auf die trockene Säule wurden 30 µl DEPC Wasser gegeben, um die RNA auszuspülen. Dazu wurde die Säule erneut zentrifugiert (11000 g, 1 Min, 20 °C). Die RNA befand sich danach im Durchfluss, in dem der RNA-Gehalt mittels NanoDrop gemessen wurde.

2.2.8.3 Reverse Transkription

Nach Isolation und Messung des exakten RNA-Gehalts folgte das Umschreiben der RNA in cDNA mit dem Kit von Promega. Dazu wurden 3 µg RNA (bei hohem RNA-Gehalt nur 2 µg, die Differenz wurde beim abschließenden Auffüllen mit Wasser ausgeglichen) in 9 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und mit 1 µl Primern (Random Primer) versetzt. Der Ansatz wurde für exakt 10 Min bei 70 °C inkubiert und anschließend in ein Eisbad gestellt. Zu den Proben wurden anschließend 0,75 µl Wasser, 4 µl dNTPs, 4 µl Puffer (first strand buffer), 0,25 µl Ribonuklease-Inhibitor (RNAsin, 40 U) sowie 1 µl reverse Transkriptase (RT MMLV) gegeben. Zudem wurde eine Probe mit allen Komponenten außer der reversen Transkriptase als Negativkontrolle angesetzt. Auf die einstündige Inkubation bei 37 °C folgte das Abstoppen der Reaktion bei 94 °C (für 2 Min). Danach wurde der Ansatz auf 750 µl aufgefüllt, falls 3 µg DNA eingesetzt wurden. Bei nur 2 µg DNA Einsatz wurde nur ein Endvolumen von 500 µl angestrebt.

2.2.8.4 Analyse der *Kollagen1a1*-Expression mittels qPCR

Neben 5 µl cDNA der Probe wurden für die qPCR 10 µl Master Mix (Quiagen) mit allen nötigen Reagenzien, 3 µl nukleasefreies Wasser sowie jeweils 1 µl des forward und des reverse Primers benötigt. Die PCR (Tab.3) wurde mit Primern für Fibronectin, *Kollagen Typ I* und β -Aktin (vgl. Primerauflistung im Materialteil, jeweils 1:10 verdünnt) nach nachstehendem Programm durchgeführt, wobei β -Aktin als Housekeepergen diente. Zur Durchführung der PCR erfolgte die Auftragung von je 15 µl der Proben auf eine 384 Well-Platte.

Tab. 3 qPCR Programm für β -Aktin, Fibronectin und *Kollagen1a1*

1. Zyklus: 50 °C	2 Min	
95 °C	10 Min	
2. Zyklus: 98 °C	15 Sek	} 40 Zyklen
58 °C	60 Sek	
3. Zyklus: 95 °C	15 Sek	
58 °C	1 Min	
95 °C	15 Sek	

2.2.8.5 DNA-Isolation aus Nieren

Beim Versuchsende wurde sowohl von der UUO-Niere als auch von der kontralateralen Niere 1/16 zur DNA-Analyse entnommen, zerkleinert, in flüssigem Stickstoff gefrostet und anschließend bei -80 °C gelagert. Zur Isolierung der DNA mit dem Kit von Quiagen wurde den aufgetauten Proben zunächst jeweils 175 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K zugefügt. Nach gründlichem Vortexen folgte eine Lysephase von vier bis fünf Stunden bei 56 °C im Thermoschüttler (400 rpm). Danach wurden dem Gemisch 4 µl RNase A zugegeben und gut gemischt. Nach zweiminütiger Inkubation folgte das Vortexen der Proben für 15 Sekunden. Danach wurden den Proben in zwei Schritten 200 µl AL Puffer und 200 µl 96-100%iger Ethanol zugefügt und im Anschluss jeweils wieder gut gemixt. Anschließend wurde das gesamte Probenvolumen auf eine Filtrationssäule gegeben, die die gelöste DNA bei der Zentrifugation (6000 g, 1 Min, 20 °C) zurückhält. Danach wurden zunächst 500 µl AW 1 Puffer auf die Säule gegeben und diese zentrifugiert (6000 g, 1 Min, 20 °C) und dann folgten 500 µl AW 2 Puffer. Zur Trocknung der Membran erfolgte ein Zentrifugationsschritt (20000 g, 3 Min, 20 °C) Die Säule wurde mit 200 µl DNase-freiem Wasser für eine Minute inkubiert und eine Minute bei 8000 g zentrifugiert. Der DNA-Gehalt im Durchfluss wurde am NanoDrop vermessen.

2.2.8.6 Detektion des verkürzten *Kollagen1a1*-Allels mittels PCR

Mit der DNA aus den entnommenen Nieren wurde eine PCR (Tab. 4) zur Detektion des durch den Knockout verkürzten *Kollagen1a1*-Allels durchgeführt. Dazu wurden je 20 ng DNA mit 10 µl Phusion HF Puffer (5x), 1 µl dNTP Mix, 0,5 µl Phusion Hot Start II DNA-Polymerase, je 2,5 µl des forward und des reverse Primers und 32,5 µl Wasser vermengt. Anschließend wurde eine PCR nach dem unten abgebildeten Schema durchgeführt. Danach wurden je 8 µl Loading dye (6x) zum PCR Produkt gegeben. Je 20 µl des Gemisches aus Loading dye und PCR-Produkt wurden auf ein 1%iges, mit Sybr Safe angereichertes Agarosegel aufgetragen. Das Sybr Safe ließ dabei die DNA später unter einer UV-Lampe sichtbar werden. Zur Orientierung wurde zudem ein DNA-Ladder (1 kb) mit aufgetragen. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte bei einer Spannung von 50 V in den ersten 10 Min und dann für weitere 60 Min bei 60 V. Nach erfolgreichem Knockout konnte unter UV-Licht das Signal der

verkürzten *Kollagen1a1*-Bande bei 746 bp sichtbar gemacht werden. Da es sich bei der eingesetzten DNA stets um Misch-DNA aus Zellen mit und ohne Knockout handelte, war auch nach erfolgreichem Knockout immer noch eine schwache Bande des regulären *Kollagen1a1*-Gens mit 4227 bp zu sehen, welche aber in der Intensität deutlich reduziert war. Ohne Knockout erschien nur eine Bande bei 4227 bp, diese fiel oft nur sehr schwach aus, da das sehr lange Amplifikat zu einem großen Anteil in der Auftragungstasche verblieb und unter UV-Licht dort sichtbar wurde. Außerdem war die PCR aufgrund der Länge von 4227 bp weniger effektiv als bei dem deutlich verkürzten Amplifikat nach erfolgreichem Knockout (746 bp).

Tab. 4 PCR- Einstellung zur Identifizierung des verkürzten *Kollagen1a1*-Allels

1. Zyklus: 98 °C	30 Sek	} 35 Zyklen
2. Zyklus: 98 °C	10 Sek	
65 °C	30 Sek	
72 °C	150 Sek	
3. Zyklus: 72 °C	10 Min	

2.2.9 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden zunächst in Microsoft Excel gesammelt. Abweichende Dateiformate wurden in dieses überführt, um Berechnungen oder Ähnliches vorzunehmen. Alle Grafiken wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 5 erstellt. Dazu wurden die Rohdaten aus Excel in dieses Programm kopiert und den entsprechenden Versuchsgruppen zugeordnet. Zur Darstellung in den Grafiken wurden die Mittelwerte der Versuchsgruppen als arithmetisches Mittel \pm Standard Error of the Mean (SEM) verwendet. Um einen möglichen signifikanten Unterschied feststellen zu können wurde mit GraphPad Prism 5 ein einseitiger, ungepaarter T-Test durchgeführt. Zur Durchführung von Mehrfachvergleichen wurde ein einfaktorier ANOVA mit Bonferroni's post-hoc-Tests verwendet. Als Signifikanzniveau wurde jeweils der Wert $p=0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

Der Einfluss von Tubulusepithelzellen auf die Entstehung von Nierenfibrose ist bis heute noch nicht vollständig geklärt. Bereits 2003 postulierte Kalluri *et al.*, dass bis zu 36 % der Fibroblasten durch die EMT lokal aus Tubulusepithelzellen rekrutiert werden [29]. Im Gegensatz dazu wird der EMT bei LeBleu *et al.* als Quelle von nur etwa 5 % der Myofibroblasten eine nur geringe Bedeutung beigemessen [20]. Um Klarheit über diese widersprüchlichen Ergebnisse zu erlangen, wurde das Modell eines induzierbaren *Kollagen1a1*-Knockouts in Tubulusepithelzellen etabliert, mit dem die Kollagen Typ I-Produktion durch Tubulusepithelzellen unterdrückt wird.

3.1 Genotypisierung zur Rekrutierung der Versuchstiere

Da der Genotyp der Versuchstiere phänotypisch nicht sichtbar war, wurden vor Beginn der Experimente die Versuchstiere genotypisiert, um sicherzustellen, dass nur Versuchstiere mit den Genotypen Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}, Col1a1^{fl/fl} und Pax8-Cre x Col1a1^{wt/wt} verwendet wurden, die die drei Versuchsgruppen bildeten. Zur Bestimmung des Genotyps wurden Schwanzbiopsien der Versuchstiere analysiert. Nach der DNA-Isolation konnte mittels PCR ermittelt werden, ob die transgenen Elemente *Pax8rtTA*, *Pax8-Cre* und beide *loxP sites* vorhanden sind. Das Ergebnis wurde mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht (Abb. 10). Die entstandenen Konstrukte hatten eine Länge von 640 bp (*Pax8rtTA*), 280 bp (*Pax8-Cre*) und 569 bp (*loxP sites*, homozygot). Wenn die *loxP sites* nur heterozygot im Genom vertreten waren, ergab die PCR neben der Bande bei 569 bp eine Bande bei 459 bp, die das Wildtypgen repräsentiert. Dementsprechend lieferten Mäuse ohne *loxP sites* im Genom ausschließlich die eine Bande bei 459 bp. Für die Versuche wurden nur Tiere verwendet, bei denen die Genotypen Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}, Col1a1^{fl/fl} und Pax8-Cre x Col1a1^{wt/wt} eindeutig nachgewiesen werden konnten.

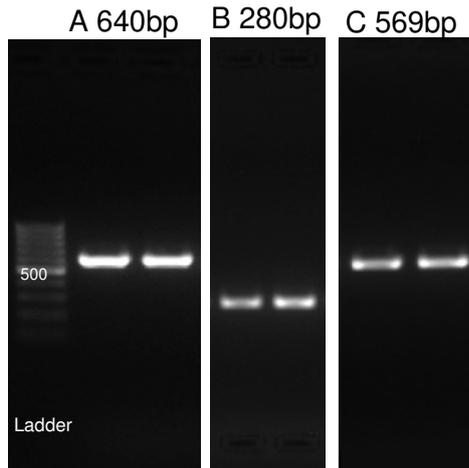


Abb. 10 Darstellung der zur Genotypisierung amplifizierten Produkte. Es wurde ein 100 bp DNA-Ladder mit einer helleren Bande bei 500 bp verwendet. Darauf folgen exemplarisch jeweils zwei Mäuse mit der Bande von Pax8rtTA (A, 640bp), *Pax8-Cre* (B 280bp) und *loxP* sites (C 569bp, homozygot).

3.2 Behandlungsschemata zur Knockoutinduktion

Zur Induktion des Knockouts wurden die Tiere mit Doxycyclin im Trinkwasser behandelt. Dazu wurde eine Doxycyclinlösung mit der jeweils gewünschten Konzentration erstellt und mit Sucrose versetzt, um den bitteren Geschmack des Doxycyclins zu maskieren. Da Doxycyclin lichtempfindlich ist, mussten dunkle Trinkflaschen verwendet werden. Das Medizinalwasser wurde den Versuchstieren jeweils über einen Zeitraum von 14 Tagen *ad libitum* verabreicht [45]. Das Trinkwasser wurde alle vier Tage gewechselt und die Tiere bei dieser Gelegenheit gewogen, um den Gewichtsverlauf während der Medikamentenbehandlung zu überwachen. Zur Etablierung wurde die Effektivität des Knockouts bei drei verschiedenen Versuchsmodalitäten analysiert.

Als erstes erfolgte die Gabe von Medizinalwasser mit 1 mg/ml Doxycyclin und 2 % Sucrose über einen Zeitraum von 14 Tagen, anschließend folgte eine Latenzzeit von vier Tagen, in der die Tiere wieder normales Trinkwasser erhielten und schließlich die unilaterale Ureterobstruktion (Abb. 11A). Zum anderen wurde Doxycyclin (1 mg/ml, 2 % Sucrose) über 14 Tage verabreicht, dann 14 Tage normales Trinkwasser und schließlich die unilaterale Ureterobstruktion (Abb. 11B). In der dritten Versuchsmodalität wurde die Doxycyclinkonzentration erhöht (2 mg/ml, 5 % Sucrose), aber das Medizinalwasser wieder über 14 Tage gegeben, gefolgt von vier Tagen normalem Trinkwasser und anschließender unilateraler Ureterobstruktion (Abb. 11C). Nach der unilateralen Ureterobstruktion wurde 14 Tage gewartet, damit sich bis zur Aufarbeitung ein ausreichendes Maß an Fibrose ausbilden konnte [34].

3.3 Gute Verträglichkeit und Knockoutinduktion mit Doxycyclin sowie einer Auswaschphase von vier Tagen vor UUO

Zur Generierung eines effektiven, gut verträglichen Knockouts von Kollagen Typ I wurden verschiedene Induktionszeiträume und Doxycyclinkonzentrationen getestet (Abb. 11). Sowohl die Induktion mit 1 mg/ml als auch eine Doxycyclinkonzentration von 2 mg/ml lieferten in Nierenbiopsien am Versuchsende einen suffizienten Knockout von *Kollagen1a1*. Zudem war zu beobachten, dass beide Konzentrationen von den Mäusen gut vertragen wurden.

Neben verschiedenen Konzentrationen von Doxycyclin im Trinkwasser wurden auch verschiedene Latenzzeiten zwischen der Verabreichung des Doxycyclins und der Durchführung der UUO getestet. Beide Versuchsgruppen erhielten zunächst 14 Tage Doxycyclin (1 mg/ml, 2 % Sucrose) *ad libitum* im Trinkwasser. Danach wurde der einen Versuchsgruppe in einer viertägigen Auswaschphase normales Trinkwasser angeboten bevor die UUO erfolgte. Die zweite Versuchsgruppe erhielt dagegen vor der UUO über 14 Tage normales Trinkwasser, um das Doxycyclin stärker auszuwaschen (vgl. Abb. 12A/12B). Ein Vergleich der beiden Versuchsschemata ergab keine Unterschiede in der Ausbildung der Fibrose. Zur Auswertung wurde eine Immunhistologie verwendet. Dazu wurden zunächst Gefrierschnitte erstellt und über Nacht mit einem Anti-Kollagen-rabbit Primärantikörper inkubiert, der am nächsten Tag mit einem Sekundärantikörper (Alexa Fluor 594) für das Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht wurde. Von jedem Schnitt wurden 10-15 nicht überlappende Bilder bei 20-facher Vergrößerung angefertigt und anschließend mit dem Programm MetaMorph die Kollagen Typ I-positive Flächen als Anteil der Gesamtfläche der fibrotischen Niere ausgewertet.

Des Weiteren erfolgte die Auswertung mittels Masson-Trichrom-Färbung. Dazu wurde ein Viertel jeder entnommenen Niere in Paraffin eingebettet, daraus histologische Schnitte erstellt und diese mit den entsprechenden Färbereagenzien behandelt, um Bindegewebe sichtbar zu machen. Von jedem Schnitt wurden 10-15 nicht überlappende Bilder gemacht. Anschließend erfolgte die Auswertung der fibrotischen Fläche als Anteil der Gesamtfläche der ligierten Nieren mit dem Programm MetaMorph.

Sowohl die histologische als auch die molekularbiologische Auswertung zeigte ein äquivalentes Niveau der Fibroseparameter bei einer Auswaschzeit des Doxycyclins von vier und von 14 Tagen (Abb. 12). Aufgrund der geringeren Wartezeit bei äquivalenten Ergebnissen wurden die Mäuse in der vorliegenden Arbeit 14 Tage mit Doxycyclin behandelt, dann folgte die kurze Auswaschphase von vier Tagen bis zur UUO und nach weiteren 14 Tagen das Versuchsende.

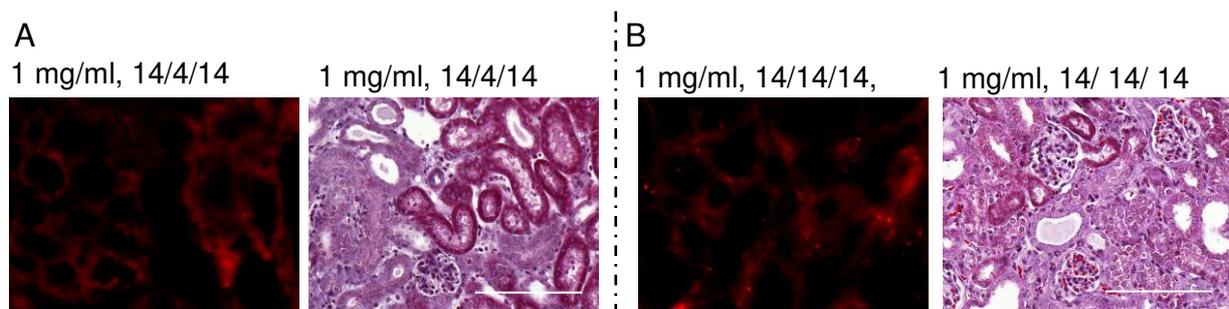


Abb. 12 Äquivalente Akkumulation von *Kollagen1a1* bei einer Latenzzeit zwischen Knockout-Induktion und UUO von vier Tagen und 14 Tagen. Verwendet wurden UUO-Nieren von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} (+Doxy) Mäusen. Bei beiden Behandlungsschemata erhielten die Mäuse zunächst über einen Zeitraum von 14 Tagen Doxycyclin (1 mg/ml, + 2 %Sucrose) *ad libitum* im Trinkwasser. Anschließend wurde der einen Versuchsgruppe (A) vier Tage normales Wasser verabreicht, der anderen dagegen 14 Tage (B). Danach folgte die UUO und nach weiteren 14 Tagen das Versuchsende. (Immunfluoreszenz (*Kollagen1a1* = rot), Masson-Trichrom-Färbung (fibrotische Fläche = blau), 40 x Vergrößerung, Maßstäbe 100 µm).

3.4 Nachweis des *Kollagen1a1*-Knockouts mittels PCR aus genomischer DNA

Die Überprüfung der Funktionalität des Knockouts wurde mittels PCR von DNA aus den entnommenen Nieren durchgeführt. Nach der Entnahme der Nieren beim Versuchsende wurde DNA aus der Niere isoliert und mittels PCR der Erfolg des Knockouts kontrolliert. Dazu wurde eine Sequenz aus dem *Kollagen1a1*-Gen amplifiziert. Ursprünglich liefert die PCR ein Produkt mit einer Länge von 4227 bp, nach erfolgreicher Exzision und Rekombination (Abb. 6) ergibt sich ein neues Produkt mit nur noch 746 bp (Abb. 13).

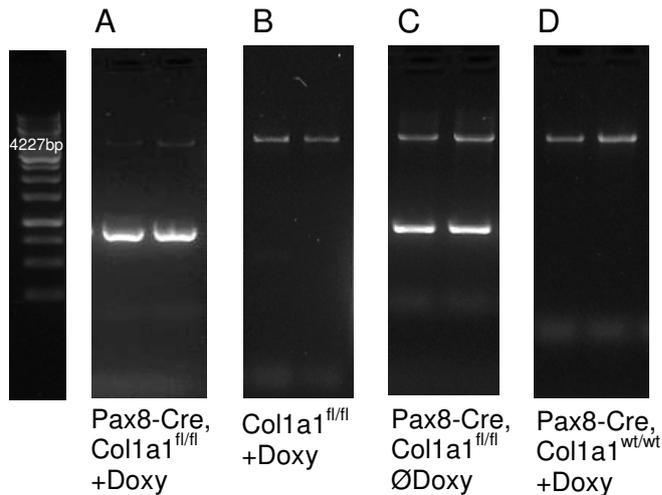


Abb. 13 Gelelektrophorese der *Kollagen1a1*-PCR zur Kontrolle des Knockouts. Verwendet wurde DNA aus UO-Nieren, die beim Versuchsende entnommen wurden. Ganz links ist der DNA-Ladder (1 kb) mit der deutlichen Bande bei 3000 bp zu sehen. Danach folgen je zwei Mäuse der Genotypen Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy (746bp) (A), Col1a1^{fl/fl} +Doxy (B) (amplifiziertes Konstrukt ohne Knockout, 4227bp), Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (C) und Pax8-Cre x Col1a1^{wt/wt} +Doxy, (D).

In der Gelelektrophorese wird deutlich, dass der *Kollagen1a1*-Knockout in den Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Tieren funktionsfähig ist. Es zeigt sich eine verkürzte Bande bei 746 bp, die erst nach erfolgtem Knockout amplifiziert werden kann. Zusätzlich ist ganz schwach noch die ursprüngliche Bande bei 4227 bp zu sehen. Bei den Kontrollgruppen Col1a1^{fl/fl} (+Doxy) und Pax8-Cre (+Doxy) hingegen amplifiziert kein verkürztes *Kollagen1a1*-Knockout-Konstrukt mit einer Länge von 746 bp (Abb. 13B/D). Die Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}-Tiere ohne Doxycyclinbehandlung (ØDoxy) zeigen trotz fehlender Knockoutinduktion die Bande des verkürzten *Kollagen1a1*-Knockout-Konstrukts, was darauf hinweist, dass der Cre-Promotor eine Eigenaktivität aufweist und zum Teil auch ohne Induktion mittels Doxycyclin ein *Kollagen1a1*-Knockout in Tubulusepithelzellen stattfindet.

3.5 Nierenspezifität des *Kollagen1a1*-Knockouts

Um zu zeigen, dass der *Kollagen1a1*-Knockout spezifisch in der Niere stattfindet, wurde beim Versuchsende zusätzlich zu den Nieren eine Schwanzbiopsie der Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} (+Doxy) Mäuse entnommen. Nach Isolation der DNA wurde eine

PCR zur Detektion des durch den Knockout verkürzten *Kollagen1a1*-Allels durchgeführt (Abb. 14). Die PCR liefert aus der DNA von Schwanzbiopsien der mit Doxycyclin behandelten Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}-Mäuse lediglich die unveränderte lange Bande (4227 bp) des *Kollagen1a1*-Allels. Bei DNA aus Nieren der gleichen Tiere dagegen amplifiziert das durch den Knockout verkürzte Allel mit einer Länge von 746 bp (Abb. 14).

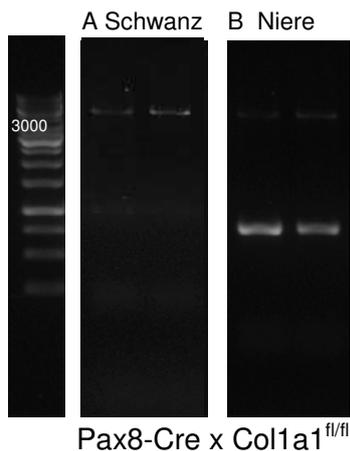


Abb. 14 Gelelektrophorese der *Kollagen1a1*-PCR mit DNA zum Nachweis der Nierenspezifität. Ganz links der DNA-Ladder (1 kb) mit einer deutlichen Bande bei 3000 bp. Verwendet wurde DNA aus Schwanzbiopsien (A) und UUO-Nieren (B) von Pax8 x Col1a1^{fl/fl} (+Doxy)-Mäusen, beides am Versuchsende gewonnen.

3.6 Größere Schwankungsbreite der Werte bei männlichen Tieren

Neben dem Einfluss der Tubulusepithelzellen auf die Ausbildung der Nierenfibrose stellte sich auch die Frage, inwiefern das Geschlecht der Tiere die Versuchsergebnisse beeinflusst. Dazu wurden in jeder Versuchsgruppe sowohl Männchen als auch Weibchen verwendet und die Ergebnisse sowohl nach Geschlechtern getrennt als auch gemeinsam ausgewertet. Meist wiesen die Männchen höhere Streuung der Werte auf, die es sehr schwierig machte kleine Unterschiede zu detektieren. Daher wurden weibliche (Abb. 15A) und männliche Tiere (Abb. 15B) in den späteren Versuchen getrennt ausgewertet

Auch bei der Analyse der *Kollagen1a1*-mRNA konnte eine Abweichung der Ergebnisse detektiert werden. Bei der Auswertung mit Hilfe der $2^{-\Delta Ct}$ -Methode konnten zwar keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, doch zeigten sich bei separater Auswertung männlicher und weiblicher Tiere unterschiedliche Tendenzen. Die Versuchsgruppe (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy) wurde jeweils mit nicht induzierten Mäusen verglichen (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy). Dabei wurde bei

den weiblichen Tieren der Versuchsgruppe im Schnitt ein Wert von 0,30 erreicht. Diese lagen damit niedriger als die nicht induzierten Mäuse (0,41, Abb. 16A). Bei den männlichen Tieren zeigte sich dagegen ein diametrales Bild. Bei den Männchen ergab die $2^{-\Delta Ct}$ Methode in der Versuchsgruppe einen Wert von 0,32, während die nicht induzierten Tiere im Durchschnitt auf 0,23 kamen und damit deutlich niedriger lagen (Abb. 16B).

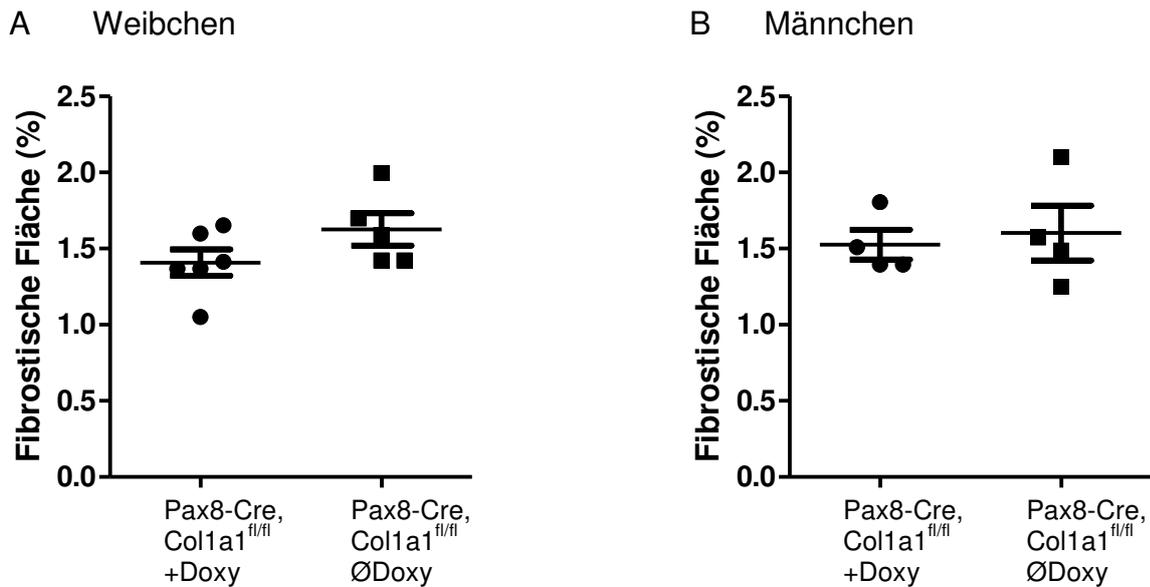


Abb. 15 Größere Streuung der Werte bei Nieren männlicher Versuchstiere als bei Weibchen. Verwendet wurden Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}-Tiere, von denen eine Hälfte mit 2 mg/ml Doxycyclin induziert wurde (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy), während die andere Hälfte immer normales Trinkwasser erhielt (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy). Es erfolgte die statistische Auswertung von mit Masson-Trichrom-Färbung behandelten Paraffinschnitten von UUO-Nieren. (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy n = 4, Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy n = 4, Mittelwerte ±SEM).

Zudem zeigten die weiblichen Tiere eine deutlich höhere Belastbarkeit, eine kürzere postoperative Regenerationsphase und eine geringere Sterblichkeitsrate. Damit waren weibliche Tiere für das UUO-Modell besser geeignet. Aufgrund der geringeren Streubreite, besseren Vergleichbarkeit, höheren Belastbarkeit und den insgesamt stimmigeren Ergebnissen im Rahmen der mRNA-Analyse wurden Weibchen bevorzugt für die Versuche verwendet.

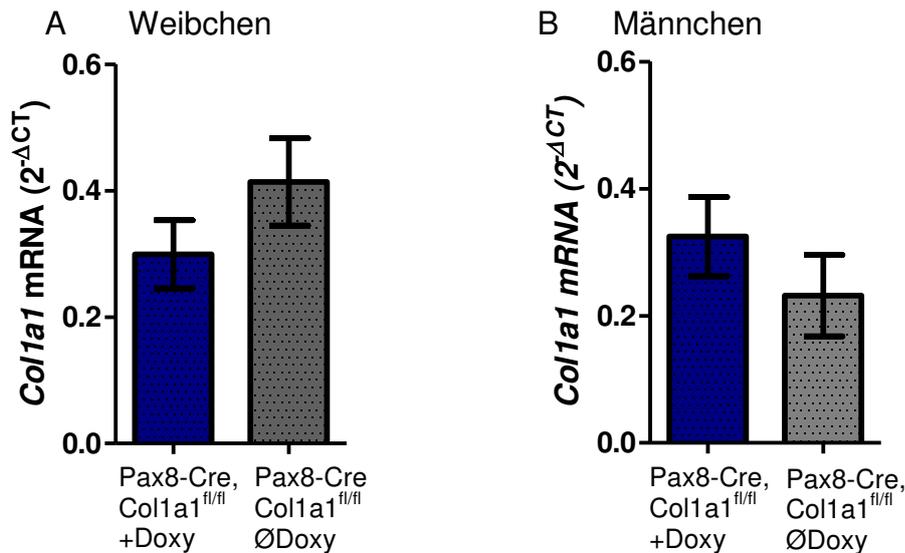


Abb. 16 Inkonsistente Ergebnisse bei der getrennten Auswertung von männlichen und weiblichen Versuchstieren. Aus den UUO-Nieren von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Versuchstieren und nicht induzierten Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy-Mäusen wurde zunächst die mRNA isoliert und mittels qPCR analysiert. Dazu wurde die 2^{-ΔCt}-Methode verwendet. (A) Auswertung der Kollagen1a1-mRNA (Col1a1 mRNA) von Weibchen, Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy (n = 4), Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (n = 4). (B) Auswertung der Kollagen1a1-mRNA von männlichen Tieren Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy (n = 3), Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (n = 6). Mittelwerte ±SEM.

3.7 Induktion von Nierenfibrose durch die unilaterale Ureterobstruktion

Als Modell der renalen Fibrose wurde die unilaterale Ureterobstruktion gewählt. Die Versuchstiere (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy) wurden zunächst 14 Tage mit Doxycyclin (2 mg/ml + 5 % Sucrose) *ad libitum* behandelt, anschließend erfolgte eine Pause von vier Tagen, in denen den Tieren normales Wasser zu trinken angeboten wurde. Daran anschließend wurde die UUO durchgeführt und nach weiteren 14 Tagen der Versuch beendet und sowohl die ligierte Niere als auch die kontralaterale Niere entnommen. Um nachweisen zu können, dass die UUO ein effektives Modell zur Induktion der renalen Fibrose darstellt, wurden die Nieren durchflusszytometrisch, histologisch sowie auf mRNA-Ebene untersucht. Bei der FACS-Analyse wurde eine signifikant höhere Infiltration von CD45-positiven Zellen in der UUO-Niere im Vergleich zur kontralateralen Niere festgestellt. CD45 stellt einen Leukozytenmarker dar und spiegelt daher die Infiltration von Leukozyten in die ligierte Niere wider. Der Anteil an CD45-positiven Zellen weist in der kontralateralen Niere einen Basalwert von durchschnittlich 1,2 % auf, dagegen betrug dieser Wert in den UUO-Nieren im Mittel 5,7 % (Abb. 17). Das bedeutet eine fast fünffach höhere

Infiltration von CD45-positiven Zellen. Ein noch stärkerer Anstieg war bei Kollagen1a1-positiven Partikeln pro Niere in den UUO-Nieren gegenüber den kontralateralen Nieren messbar. Während in kontralateralen Nieren im Mittel nur 0,075 % Kollagen1a1-positive Partikel gefunden wurden, lag dieser Wert in UUO-Nieren bei durchschnittlich 4,9 % (Abb. 17). Es war durch die UUO also eine 65-fache Erhöhung des prozentualen Anteils Kollagen1a1-positiver Partikel pro Niere zu verzeichnen. Zur Betrachtung auf molekularbiologischer Ebene wurde mRNA aus den entnommenen Nieren gewonnen und in cDNA transkribiert. Die so gewonnene cDNA wurde zur Analyse mittels qPCR herangezogen. Mit Hilfe von Primern für Kollagen Typ I und β -Aktin als Housekeeper wurde die Expression von Kollagen1a1-mRNA untersucht. Dabei ergab sich eine hoch signifikant höhere Menge von Kollagen1a1-mRNA in den ligierten Nieren als in den kontralateralen (Abb. 17). In den UUO-Nieren lieferte die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode einen Wert von 0,32, während die kontralateralen Nieren nur bei 0,02 lagen. Die Kollagen-mRNA-Expression stieg in UUO-Nieren also um das 16-fache im Vergleich zur kontralateralen Niere an. Zur histologischen Untersuchung wurden zum einen Paraffinschnitte mit der Masson-Trichrom-Färbung koloriert und zum anderen mit Schnitten kryokonservierter Präparate eine Immunfluoreszenz mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I durchgeführt. Sowohl in der Masson-Trichrom-Färbung, als auch in der Immunfluoreszenz zeigten sich bei nicht ligierten Nieren nur sehr geringe Mengen an Kollagen. In den UUO-Nieren dagegen konnten in beiden Färbungen deutliche Kollagenablagerungen detektiert werden. In der Masson-Trichrom-Färbung war zudem ein deutlich dilatiertes Tubulussystem als morphologische Veränderung in den UUO-Nieren zu erkennen (Abb. 18).

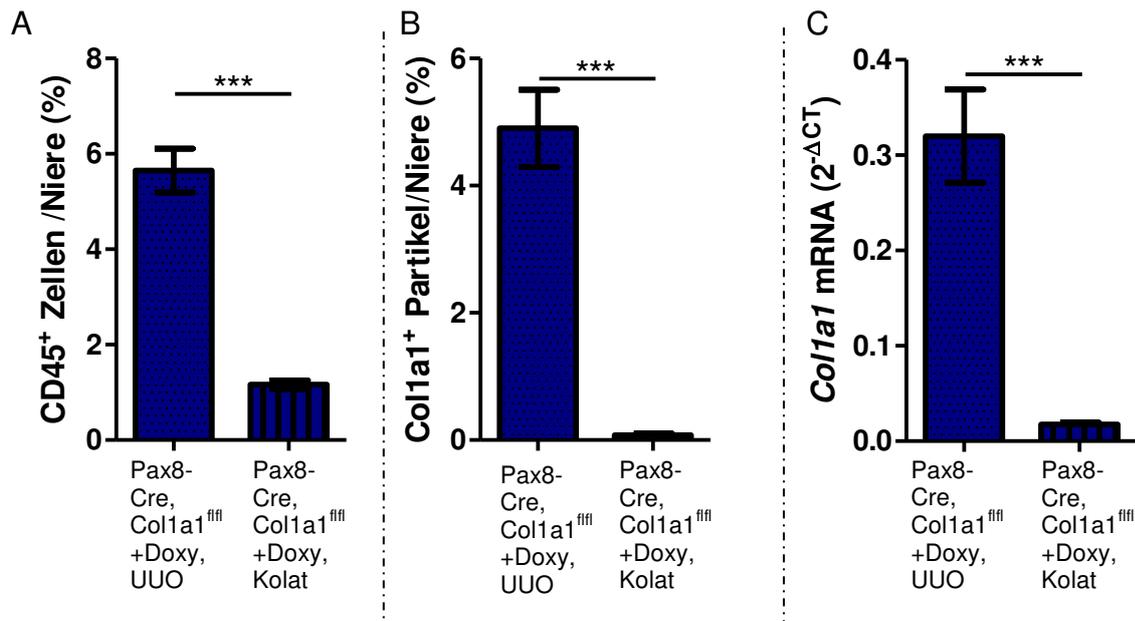


Abb. 17 Starke Reaktion der Niere auf die Ligatur des Ureters im Rahmen der UUU. Verwendet wurden Nieren von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy. Die Durchflusszytometrie zeigt eine deutliche Infiltration von CD45-positiven Zellen (UUU n = 3, Kolat n = 4) (A) sowie einen signifikanten Anstieg Kollagen1a1-positiver Partikeln (UUU n = 3, Kolat n = 4) (B). In der Analyse der RNA wird ein deutlicher Anstieg der Kollagen1a1-mRNA sichtbar (UUU n = 4, Kolat n = 4) (C). Es wurde ein einseitig ungepaarter T-Test zur statistischen Analyse verwendet (***)p<0,001, Mittelwerte ±SEM).

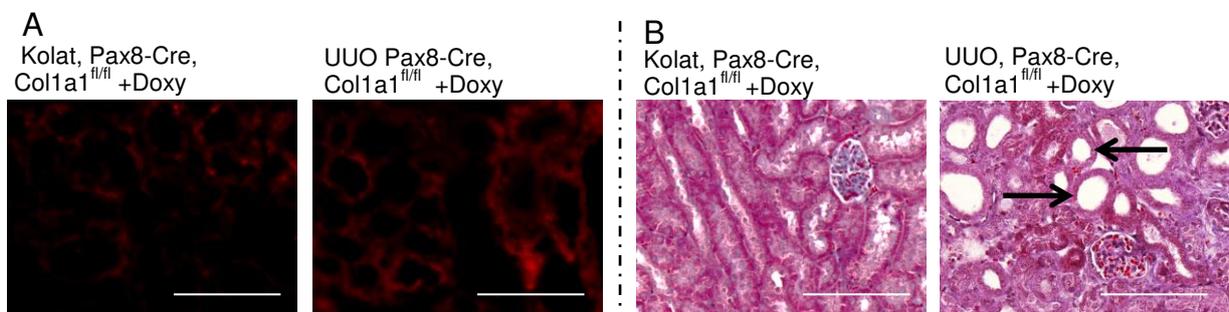


Abb. 18 Histologischer Nachweis der morphologischen Veränderungen in Nieren durch die UUU. (A) In der Immunfluoreszenzfärbung zeigt sich eine deutlich stärkere Einlagerung von Kollagen1a1 (rot) in der ligierten Niere (UUU) im Vergleich zur kontralateralen Niere (Kolat). (B) Masson-Trichrom-Färbung: Zu sehen ist eine Anreicherung von Bindegewebe (blau) sowie die Dilatation des Tubulussystems (schwarze Pfeile) in den UUU-Nieren. Die kontralaterale Niere dagegen enthält fast kein Bindegewebe und ein kompaktes Tubulussystem. (Immunfluoreszenz, Masson-Trichrom-Färbung, 40x Vergrößerung, Maßstäbe 100 µm).

3.8 Vernachlässigbarer Rückgang der fibrotischen Fläche von UUO-Nieren bei Knockout-Tieren im Vergleich zu den Kontrollen

Im Verlauf der renalen Fibrose kommt es zur vermehrten Ablagerung von Kollagen Typ I. Die Kollagenbildung soll unter anderem durch Tubulusepithelzellen der Niere erfolgen. Um den zelltypspezifischen Einfluss der Tubulusepithelzellen mit Hilfe histologischer Schnitte zu quantifizieren, wurde die Masson-Trichrom-Färbung wie unter 2.2.7.1 beschrieben verwendet. Im Vergleich der fibrotischen Fläche von UUO-Nieren der Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Tiere mit der Col1a1^{fl/fl} +Doxy Kontrollgruppe konnte keine signifikante Reduktion gezeigt werden (Abb. 19). Die fibrotische Fläche verringerte sich im Mittel von 2,06 % bei den Col1a1^{fl/fl}-Kontrolltieren auf 1,74 % bei den Tieren mit der zelltypspezifischen Defizienz von Kollagen Typ I. Dies stellt keinen signifikanten Rückgang der fibrotischen Fläche dar. In der Masson-Trichrom-Färbung zeigte sich ein etwa identisches Maß an fibrotischer Fläche in UUO-Nieren von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}-Tieren, die mit Doxycyclin behandelt wurden und den Kontrollen mit gleichem Genotyp, die kein Doxycyclin erhalten hatten (Mittelwerte: Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy 1,74 %, Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy, 1,63 %) (Abb. 20). Werden die Versuchsgruppen Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy und Pax8-Cre +Doxy miteinander verglichen, liefert der einfaktorielle-ANOVA mit Bonferroni's post-hoc-Tests einen signifikanten Unterschied ($p = 0,0134$) der prozentualen fibrotischen Fläche in den UUO-Nieren der Knockout-Mäuse (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy) und der dritten Kontrollgruppe (Pax8-Cre +Doxy). Während die Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}-Tiere wie bereits beschrieben eine fibrotische Fläche von etwa 1,74 % der gesamten UUO-Niere haben, beträgt dieser Anteil bei den Pax8-Cre Tieren im Mittel 2,17 % (Abb. 20). Somit konnte histologisch ein geringer Rückgang der Kollagen-Produktion in UUO-Nieren von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy im Vergleich zu der Kontrollgruppe Pax8-Cre +Doxy festgestellt werden.

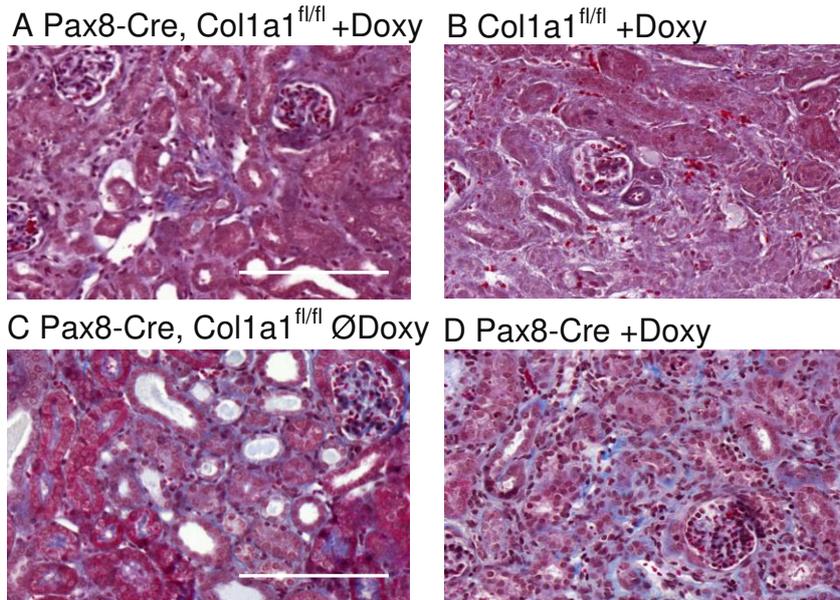


Abb. 19 Reduktion der fibrotischen Fläche in UUO-Nieren der Knockout-Tiere. Verwendet wurde die Masson-Trichrom-Färbung. Zu sehen sind in etwa äquivalente Anteile an fibrotischer Fläche bei den Knockout-Tieren mit Doxycyclinbehandlung (A Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy), der Col1a1^{fl/fl} +Doxy Kontrollgruppe (B) und der Kontrollgruppe ohne Doxycyclinbehandlung (C Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy). Lediglich bei der Kontrollgruppe und Pax8-Cre +Doxy (D) ist im Vergleich zu den Knockout Tieren eine signifikant höhere Kollagen1a1-Ablagerung (blau) im Gewebe der UUO-Nieren zu beobachten. (Vergrößerung: 40x, Maßstäbe 100 µm).

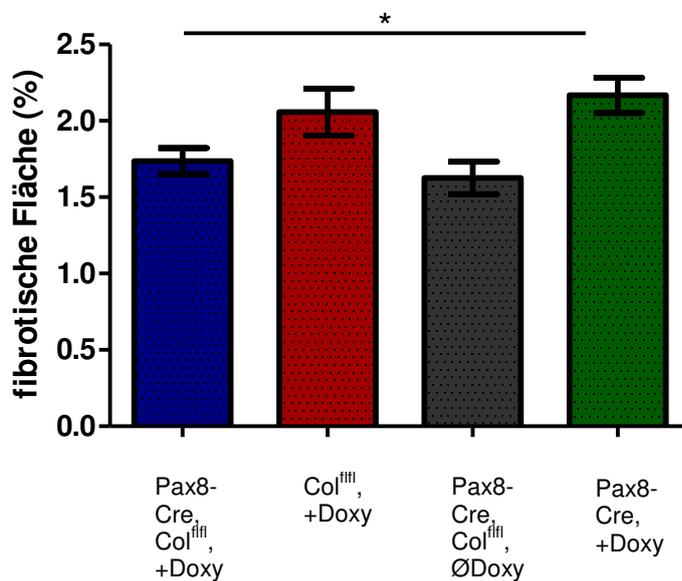


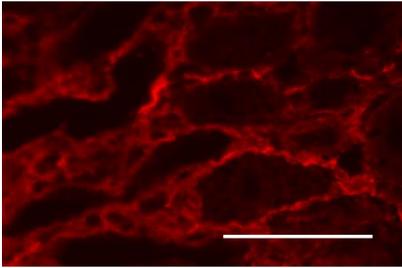
Abb. 20 Auswertung der fibrotischen Fläche (%) pro Niere. Die Knockout-Tiere der Versuchsgruppe (blau, Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy, n = 22) weisen einen signifikant geringeren Anteil an fibrotischer Fläche (%) auf als die Kontrollgruppe Pax8- Cre +Doxy (grün, n = 10). Es zeigt sich allerdings kein Unterschied der Knockout-Tiere zu der Kontrollgruppe Col1a1^{fl/fl} (rot, n = 10) und den nicht induzierten Pax8-Cre Col1a1^{fl/fl} ØDoxy Mäusen (grau, n = 5). Zur statistischen Auswertung wurde einfaktorieller-ANOVA mit Bonferroni's post-hoc-Test verwendet. Die Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgt als Mittelwerte ±SEM. (Masson-Trichrom-Färbung, *p < 0,05).

3.9 Keine Reduktion der Kollagen1a1-positiven Fläche in UUO-Nieren der Knockout-Tiere gegenüber den Kontrolltieren in der Immunhistologie

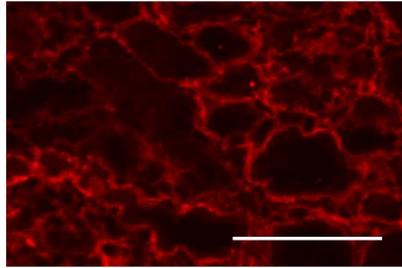
Zum quantitativen Vergleich der Akkumulation von Kollagen1a1 in Tieren, die zelltypspezifisch defizient für Kollagen Typ I sind, und Kontrollen wurde mittels Immunfluoreszenz, wie bereits unter 2.2.7.2 beschrieben, selektiv Kollagen Typ I angefärbt. Dadurch konnten spezifisch die Ablagerungen von Kollagen1a1 in UUO-Nieren von Knockout-Tieren und den zugehörigen Kontrollen untersucht werden.

Die Auswertung ergab keine signifikante Reduktion der Kollagen1a1-positiven Fläche in UUO-Nieren von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Tieren mit Knockoutinduktion im Vergleich zu Col1a1^{fl/fl} +Doxy Kontrollen (Abb. 21). Der prozentuale Anteil der Kollagen1a1-positiven Fläche reduzierte sich im Mittel von 1,46 % bei den Col1a1^{fl/fl} +Doxy Tieren auf 1,22 % bei den Knockout-Tieren. Es erfolgte damit kein signifikanter Rückgang der Kollagen1a1-positiven Fläche. Zwischen Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} Tieren, die Doxycyclin über 14 Tage erhalten haben (2 mg/ml, 5 % Sucrose) und Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}-Tieren ohne Doxycyclinbehandlung zeigte sich ebenfalls kein Unterschied. Bei der Auswertung der Kollagen1a1-positiven Fläche ergaben sich etwa äquivalente Werte für beide Versuchsgruppen (Mittelwerte: Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy 1,22%, Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy 1,37%). Größer aber nicht signifikant ist dagegen der Unterschied zwischen Pax8 x Col1a1^{fl/fl} +Doxy und Pax8-Cre +Doxy Kontrolltieren. Wie bereits beschrieben, liefern die UUO-Nieren der Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Tiere im Mittel einen Wert von 1,22 % Kollagen1a1-positiver Fläche, die Pax8-Cre +Doxy Kontrolltiere zeigen dagegen durchschnittlich 1,55 % Kollagen1a1-positive Fläche pro Niere. Dies bedeutet eine Reduktion der fibrotischen Fläche um 0,33 % und damit keinen signifikanten Unterschied (Abb. 22).

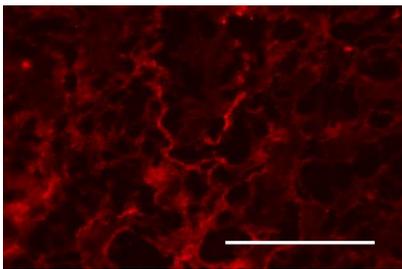
A Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy



B Col1a1^{fl/fl} +Doxy



C Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy



D Pax8-Cre +Doxy

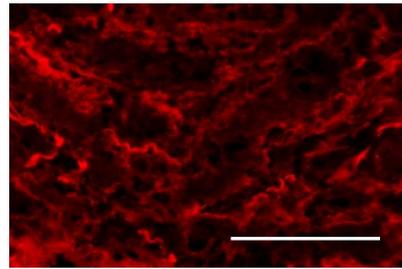


Abb. 21 Immunhistologie die UUO-Nieren mit einem Antikörper gegen Kollagen1a1. Die Knockout-Tiere (A Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy) zeigen vergleichbare Mengen an Kollagen1a1-Ablagerungen wie die Kontrolltiere Col1a1^{fl/fl}+Doxy (B), Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (C) und Pax8-Cre +Doxy (D). (Immunfluoreszenzfärbung, Vergrößerung: 40x, Maßstäbe 100 µm).

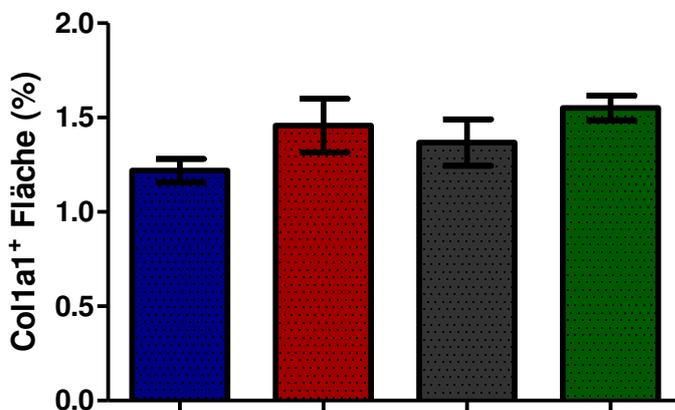


Abb. 22 Vergleich der Kollagen1a1-positiven Fläche (%) der vier Versuchsgruppen. Verwendet wurden UUO-Nieren weiblicher Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy (blau, n = 20) Tiere, Col1a1^{fl/fl} +Doxy Tiere (rot, n = 11), Mäuse des Genotyps Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (grau, n=5) und Pax8-Cre +Doxy Mäuse (grün, n = 10). Es wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Kollagen1a1-positiv Fläche pro Niere ermittelt. Zur statistischen Auswertung wurde einfaktoriellem-ANOVA mit Bonferroni's post-hoc-Test verwendet, dabei zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse. Die Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgt als Mittelwerte ±SEM.

3.10 Kein Unterschied in der Expression von Kollagen1a1-mRNA in UUO-Nieren von Knockout-Mäusen und Kontrollen

Um die Kollagen1a1-Produktion nicht nur histologisch, sondern auch auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde RNA aus den entnommenen Nieren isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels qPCR analysiert. Als Housekeeper diente β -Aktin. Bei der qPCR fanden Primer für Kollagen1a1 Verwendung, die in einem vom Knockout unberührten Teil des Gens binden. Dadurch konnten Unterschiede in der Transkriptionsrate von *Kollagen1a1* und somit der Aktivität der Fibrose detektiert werden. Es wurde jeweils ein Dreifachansatz jeder Probe verwendet. Bei der Analyse der mRNA-Mengen wurde die $2^{-\Delta Ct}$ -Methode herangezogen. Bei dieser Methode bedeutet ein kleinerer Wert auch, dass weniger mRNA des Zielgens in der Probe war und *vice versa*. Da qPCR Analysen aus unterschiedlichen Versuchsansätzen nicht vergleichbar sind, wurden die Versuche bei dieser Analyse nicht gepoolt. Zuerst wurden Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Mäuse mit der Col1a1^{fl/fl} +Doxy Kontrollgruppe verglichen. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 23A). Die Versuchsgruppe erreichte mit der $2^{-\Delta Ct}$ -Methode im Mittel einen Wert von 0,15, während die Kontrollgruppe Col1a1^{fl/fl} +Doxy mit 0,2 im Schnitt einen ähnlichen Wert erzielte ($p = 0,13$). Die beiden anderen Kontrollgruppen lieferten ein analoges Ergebnis. Wurden induzierte und nicht induzierte Versuchstiere gegenübergestellt, (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy, Mittelwert = 0,3 und Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy, Mittelwert = 0,41) zeigte sich ebenfalls ein nicht signifikantes Ergebnis ($p = 0,12$, Abb. 23B). Zuletzt folgte der Vergleich von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Mäusen und Pax 8-Cre +Doxy Mäusen ohne *loxP* site in ihrem Genom (Pax8-Cre +Doxy). Dabei zeigte die mRNA-Analyse annähernd äquivalente Werte von Versuchs- und Kontrollgruppe. Die Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy wiesen im Mittel einen Wert von 0,075 vor, der Mittelwert bei der Pax8-Cre +Doxy Mäusen präsentierte sich mit 0,074 fast identisch (Abb. 23C). Insgesamt zeigte sich in der Analyse der Expression von Kollagen1a1-mRNA bei den vorliegenden kleinen Gruppengrößen ($n = 3-8$, vgl. Abb. 23) kein verwertbarer Unterschied.

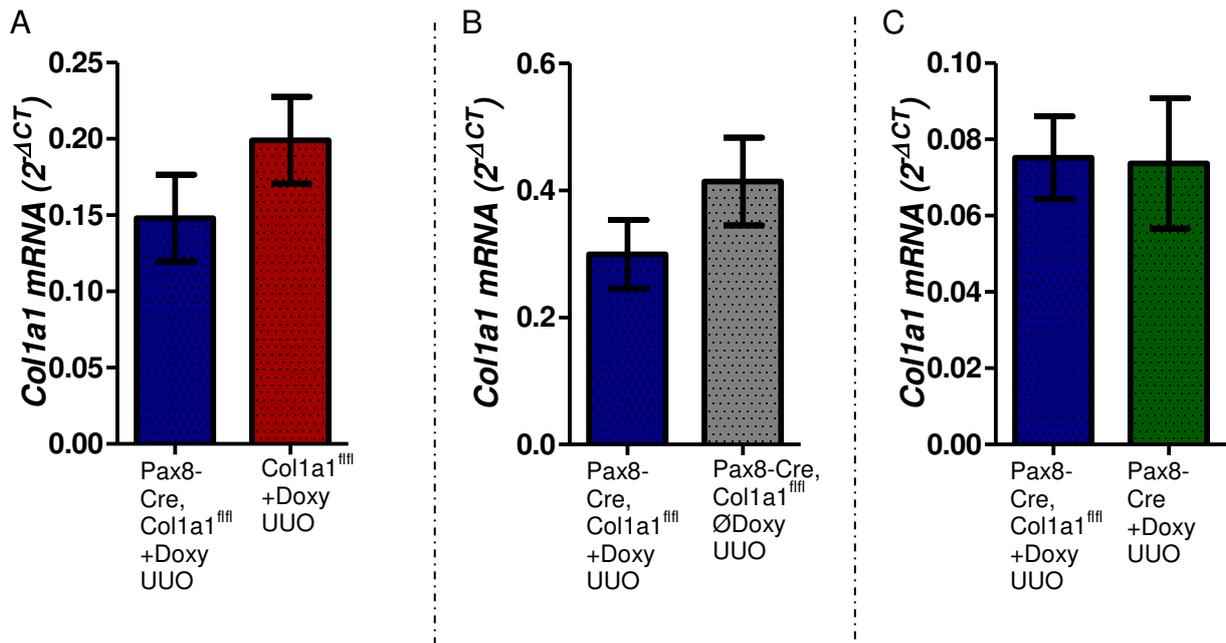


Abb. 23 Die Kollagen1a1-Expression auf mRNA Ebene ist in Versuchs- und Kontrollgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Verwendet wurde RNA aus UUU-Nieren der Knockout-Tiere (blau, Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy, A n = 5, B n = 6, C n = 6) sowie der Kontrollgruppen Col1a1^{fl/fl} +Doxy (A, rot, n = 4), Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (B, grau, = 3) und Pax8-Cre +Doxy (C, grün, n = 8). Die RNA wurde in cDNA transkribiert und eine qPCR für Kollagen1a1 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels $2^{-\Delta Ct}$ Methode, zur statistischen Auswertung wurde ein einseitig ungepaarter T-Test verwendet (Mittelwert \pm SEM).

3.11 Etablierung einer Auswertmethode für die durchflusszytometrische Untersuchung

Die Durchflusszytometrie diente sowohl der Untersuchung der Zellinfiltration als auch der weiteren Quantifizierung der Kollegenablagerung in den ligierten Nieren. Zur Aufbereitung wurden drei Achtel der beim Versuchsende entnommenen Nieren zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet und zur Analyse mittels Durchflusszytometrie angefärbt. Extrazellulär wurden CD45 und CD11b gefärbt und intrazellulär Kollagen1a1 und die Isotyp-Kontrolle. Der Isotyp diente zur Bestimmung eines Basalwertes an unspezifischen Bindungen, der vom Wert des spezifischen Antikörpers subtrahiert werden musste. Zur Auswertung wurden die Beads und andere störende Signale zunächst in der SSC-A/FSC-A-Auftragung durch ein Vorgate ausgegrenzt (Leukozyten-Gate in Abb. 24A). Ausgehend von den Signalen dieses Gates wird eine Population von sowohl Kollagen1a1-positiven als auch CD45 low-positiven Partikeln und die CD45-positive Population eingegated (Abb. 24B). Die Lage des Kollagen-positiven/CD45 low-Gates wurde je nach Lage der Isotypenkontrolle angepasst. Dazu wird die eine Anzeige mit der Auftragung der Signalstärke des Kollagens bzw. Isotyps auf der y-Achse gegen die CD45-Positivität auf der x-Achse gewählt. Zur Berechnung der absoluten Zellzahl in der Niere wurden *Counting Beads* hinzugefügt und folgende Formel verwendet:

$$Coll1a1+, CD45 - Events * \frac{\text{eingesetzte Counting beads}}{\text{gemessene Counting beads}} * \frac{m(\text{Niere gesamt})}{m(\text{eingesetzte Niere})} * 2$$

Diese Berechnung führte aber aufgrund der oft proportional sehr geringen Zellzahl zu unplausiblen Ergebnissen. Da in den UUO-Nieren aufgrund der starken Destruktion der Nieren oft nur wenige Events aufgenommen werden können, werden überproportional viele Beads gemessen. Dies führt zu einer Verzerrung der Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen und in Folge dessen zu Ergebnissen, die nicht den tatsächlichen Anteil der Kollagen1a1-positiven Zellen widerspiegeln. Daher wurden die Auswertungen als prozentualer Anteil der Signale im Vorgate (Leukozyten-Gate in Abb. 24A) vorgenommen.

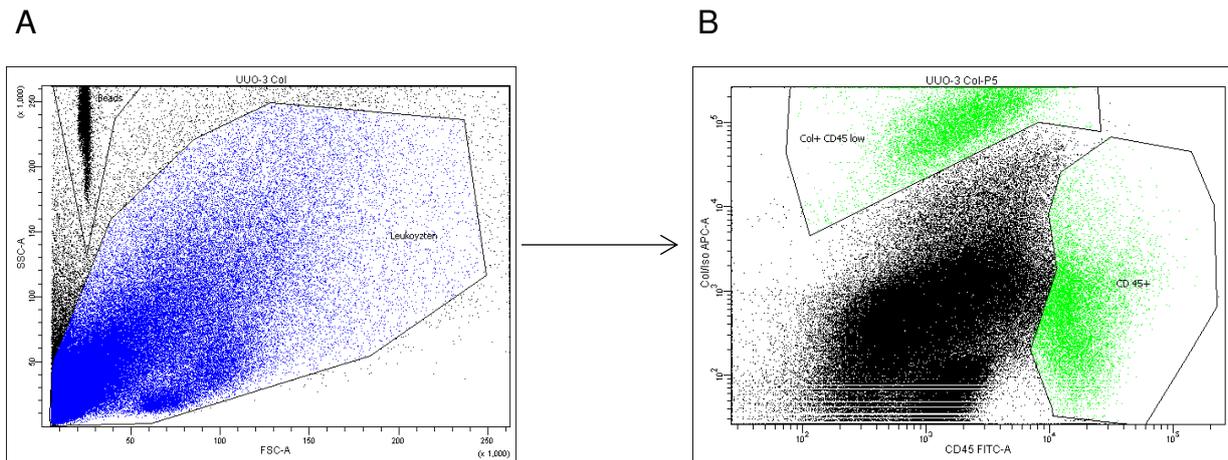


Abb. 24 Gatingstrategie bei FACS-Analysen. Zuerst wird ein Vorgate gesetzt (Leukozyten-Gate in A) und ausgehend von diesem mit Hilfe der Isotypkontrollen die Kollagen-positiven, CD45 low positiven Zellen (Col1a1+, CD45 low) sowie die CD45-positiven Zellen (CD45+) ausgewählt (B).

3.12 Kein signifikanter Unterschied der Kollagen1a1-positiven Partikel in der FACS-Analyse von UUO-Nieren der Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} + Doxy-Mäusen und den zugehörigen Kontrollen

Zur weiteren Analyse der Kollagen1a1 Menge in Knockout Tieren wurde zusätzlich zu histologischen Methoden durchflusszytometrisch die Menge an Kollagen1a1-positiven Partikeln quantifiziert. Die am Versuchsende entnommenen Nieren wurden wie bereits beschrieben zur FACS Analyse vorbereitet und die isolierten Zellen extra- sowie intrazellulär angefärbt. Da sich der Antikörper spezifisch gegen Kollagen1a1 richtet, kann ein geringerer Anteil an Kollagen1a1-positiven Partikeln an der Gesamtzellzahl als eine schwächere Ausbildung der renalen Fibrose interpretiert werden. In der Auswertung wurde die Zahl der Kollagen1a1-positiven Partikel auf die im Leukozyten-Gate (vgl. Abb. 24) gemessene Zellzahl bezogen und dann in Prozent dieses Wertes angegeben. In die Auswertung wurden aufgrund der besseren Vergleichbarkeit lediglich weibliche Tiere einbezogen.

Die Auswertung dieser Analyse ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kollagen1a1-positiven Partikeln pro Niere (in %) von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy-Mäusen und den Kontrollen ($p = 0,14$). Während in Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Knockout Tiere durchschnittlich 3,41 % Kollagen1a1-positive Partikel pro Niere detektierbar waren, lag dieser Wert bei den Col1a1^{fl/fl}-Tieren bei 4,16 %. Es konnte auch kein signifikanter Unterschied der Knockout Tiere (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl})

+Doxy) und den beiden anderen Kontrollgruppen festgestellt werden. Bei den nicht induzierten Kontrolltieren (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy) ließen sich im Mittel 3,46 % Kollagen1a1-positive Partikel nachweisen (p = 0,85, Vergleichsgruppe: Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy) und die Pax8-Cre +Doxy Kontrolltiere lieferten 3,87 % Kollagen1a1-positive Partikel (p = 0,44, Vergleichsgruppe: Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy). Somit ließ sich trotz Zusammenfassung aller Versuche zu keiner der Kontrollgruppen ein signifikanter Unterschied feststellen. Allerdings ist deutlich erkennbar, dass, wie auch bei den histologischen Auswertmethoden, die Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy und ØDoxy annähernd identische Mittelwerte aufwiesen (Pax8-Cre, Col1a1^{fl/fl} +Doxy: 3,41, Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy: 3,46). Während sich bei den Gruppen Col1a1^{fl/fl} +Doxy (MW: 4,16) und Pax8-Cre +Doxy (MW: 3,87) im Mittel tendenziell mehr Kollagen1a1-positive Partikel nachweisen ließen, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war. Somit ergaben sich in der Zusammenschau der histologischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen insgesamt stringente Ergebnisse (Abb. 25).

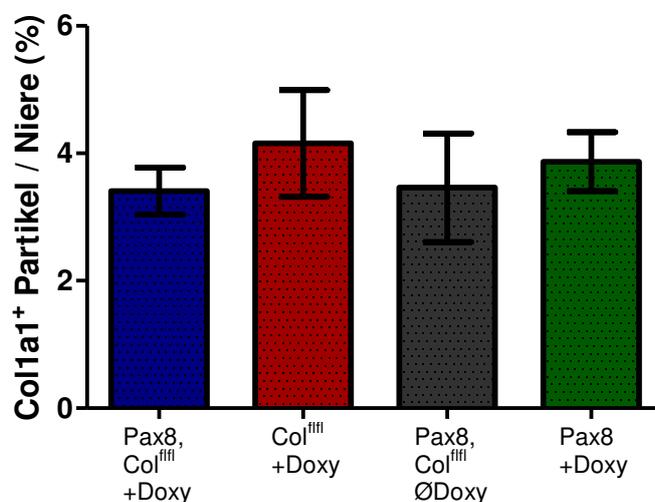


Abb. 25 FACS - Analyse der Kollagen1a1 (Col1a1)-positiven Partikel pro Niere in Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Knockout Mäusen im Vergleich den drei Kontrollgruppen. Verwendet wurden UUO-Nieren von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy (n = 21), Col1a1^{fl/fl} +Doxy (n = 9), Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (n = 5), und Pax8-Cre +Doxy (n = 10) Mäusen, alle weiblichen Geschlechts. Zu sehen ist keine signifikante Reduktion der Kollagen1a1-positiven Partikel in Nieren, die Knockout-Tiere (blau) im Vergleich mit den Kontrollgruppen Col1a1^{fl/fl} + Doxy (rot), Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (grau) und Pax8-Cre +Doxy (grün). Zur statistischen Auswertung wurde einfaktorielles ANOVA mit Bonferroni's post-hoc-Test verwendet. Die Darstellung der FACS-Analyse erfolgt als Mittelwerte ±SEM.

3.13 Kein Einfluss des Knockouts auf die Menge CD45-positiver Zellen in der Niere

Zur Vervollständigung der Ergebnisse wurden in der FACS Analyse zudem CD45-positive Partikel untersucht. Dabei diente CD45 als Marker hämatopoetischer Zellen und damit der Zellinfiltration. Durch die FACS Analyse konnte die Leukozyteninfiltration quantifiziert werden. Die CD45-positiven Zellen bzw. Partikel wurden anschließend mittels FACS Analyse gemessen und als prozentualer Anteil der im Leukozytengate aufgenommenen Partikel ausgewertet. Dazu wurden UUO-Nieren aus den Knockout-Tieren (Pax8 x Col1a1^{fl/fl} +Doxy) und den drei Kontrollgruppen entnommen und 3/8 der Nieren zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Danach wurde wie bereits unter Punkt 2.2.6.2 beschrieben eine extrazelluläre Färbung mit einem Antikörper gegen CD45 durchgeführt. Kommt es zu einer renalen Schädigung, folgt eine Infiltration von Leukozyten. Es wurde kein signifikanter Unterschied der CD45-positiven Partikel pro Niere in Prozent festgestellt. Die UUO-Nieren der Pax8 x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Tiere enthielten im Mittel 4,60 % CD45-positive Partikel, die Col1a1^{fl/fl} +Doxy Tiere 5,78 %, die Pax8 x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy Tiere 4,79 % und die Pax8-Cre+ Doxy Tiere 4,01 % CD45-positive Partikel pro Niere (Abb. 26).

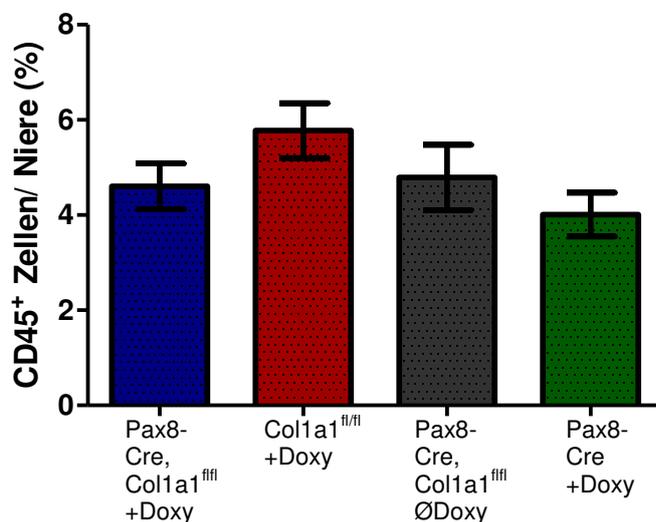


Abb. 26 FACS Analyse der CD45-positiven Zellen pro Niere. Verwendet wurden UUO-Nieren der Knockout-Tiere (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy, blau, n = 18) und der Kontrollen (Col1a1^{fl/fl} +Doxy (rot, n = 10), Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy (grau, n=5), Pax8-Cre +Doxy (grün, n = 9)), die mit einem Antikörper gegen CD45 behandelt wurden. Die FACS-Analyse ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der prozentualen Menge der CD45-positiven Partikel pro Niere. Zur statistischen Auswertung wurde einfaktorielles ANOVA mit Bonferroni's post-hoc-Test verwendet. Die Darstellung der FACS-Analyse der CD45-positiven Zellen erfolgt als Mittelwerte ±SEM.

4 Diskussion

Mit einer Prävalenz von 10-13 % avancieren chronische Nierenerkrankungen (CKD) immer mehr zur Volkskrankheit. Ein Grund dafür ist der demographische Wandel einhergehend mit einem steigenden Durchschnittsalter der Bevölkerung. Bereits 35,8 % der über 64-jährigen leiden unter einer CKD [50]. Die Auslöser für CKD haben sich in den letzten Jahrzehnten stark gewandelt. Heute führen die diabetische sowie hypertensive Nephropathie als Erkrankungen der Wohlstandsgesellschaft deutlich häufiger zu CKD als infektiöse Ursachen [51]. Ein weiteres Problem ist, dass die Erkrankung lange asymptomatisch verläuft und deshalb oft erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt wird. Im Falle eines terminalen Nierenversagens als Endstadium der CKD stehen mit Dialyse und Nierentransplantation nur noch stark eingeschränkte Behandlungsoptionen zur Verfügung. Die Niereninsuffizienz wird anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR) in fünf verschiedene Stadien eingeteilt, wobei eine GFR < 15 ml/Min Stadium 5 oder terminale Niereninsuffizienz bedeutet [50]. CKD gehen für betroffene Patienten oft mit hohen Einbußen im Bereich der Lebensqualität einher, zudem erhöht sich die Mortalität mit Eintreten der Dialysepflicht bis auf 20 % pro Jahr [52]. Dies ist auch dadurch mitbedingt, dass durch eine verringerte GFR das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse und Hospitalisierung stark ansteigt [18,50,52]. Als Komorbiditäten einer eingeschränkten Nierenfunktion treten neben einem erhöhten Level an Entzündungsfaktoren auch eine verstärkte Blutgerinnung, Anämie, verstärkte Verkalkung der Arterien und vieles mehr auf [52]. Zudem stellt die chronische Niereninsuffizienz durch hohe Behandlungskosten ein sozio-ökonomisches Problem dar [51].

Chronische Nierenerkrankungen haben eine gemeinsame Endstrecke, die renale Fibrose. Dabei kommt es zum Parenchymverlust und zur Einlagerung von extrazellulären Matrixproteinen, vor allem Kollagen Typ I [53]. Dabei ist immer noch nicht vollständig geklärt, welche Zellen für die Produktion der extrazellulären Matrix verantwortlich sind, die schlussendlich zur Fibrosierung des Organs führt. Immer wieder wird dabei die Rolle der Tubulusepithelzellen diskutiert, die aus ihrem Zellverband emigrieren sollen, um dann im Extrazellularraum Kollagen Typ I zu produzieren. In welchem Umfang die Tubulusepithelzellen zur Kollagen Typ I Produktion beitragen, ist jedoch immer noch umstritten. In der vorliegenden Arbeit ist dargestellt worden, in welchem Maß die Tubulusepithelzellen via epithelial-

mesenchymaler Transition an der Kollagen Typ I Produktion im Rahmen der Nierenfibrose beteiligt sind.

4.1 Der Kollagen1a1-Knockout ist nierenspezifisch und effektiv

Um den Einfluss der Tubulusepithelzellen ermitteln zu können, wurde ein TetOn-System verwendet. Es wurden Mäuse generiert, die einen reversen Tetracyclin abhängigen Transaktivator (rtTA) innerhalb des Pax8-Gens aufwiesen. So wurde das rtTA nur in Zellen transkribiert, in denen auch das Pax8-Gen aktiv war. Wie bereits unter 1.4 beschrieben, war dieses Gen hauptsächlich in Tubulusepithelzellen und extarenal in nur wenigen Zellen, beispielsweise in der Schilddrüse, aktiv. Der rtTA induzierte wiederum die Transkription der Cre-Rekombinase, die ebenfalls ins Genom eingebracht wurde. Als letzte genetische Veränderung erfolgte die Insertion von *loxP* sites in das *Kollagen1a1*-Gen. Sobald die Cre-Rekombinase durch Doxycyclininduktion (oder dem Analogon Tetracyclin) exprimiert wurde, bewirkte diese die Exzision eines Teils des *Kollagen1a1*-Gens, sodass instabile mRNA entstand und kein Kollagen Typ I mehr gebildet werden konnte. Da diese dreifach transgenen Pax8rtTAtetOCre-Mäuse nur im Zusammenspiel von allen drei genetischen Elementen einen nierenspezifischen *Kollagen1a1*-Knockout liefern konnten, erfolgte vor Versuchsbeginn die Überprüfung aller drei Elemente mittels PCR. Diese Methode erwies sich als effektiv und schnell durchführbar, sodass sich bereits aus kleinen DNA-Mengen in Schwanzbiopsien der Genotyp sicher feststellen ließ. Nach Versuchsende konnte das Ergebnis nochmals anhand von Nierenbiopsien verifiziert werden. Aufgrund des vorher bestimmten Genotyps war es nicht mehr notwendig, die drei transgenen Elemente in den Nieren einzeln nachzuweisen, sondern lediglich den erfolgten *Kollagen1a1*-Knockout zu bestimmen. Als Methode wurde hierzu wiederum eine PCR verwendet. Dabei lieferte das Wildtyp-Kollagen ein PCR-Produkt mit einer Länge von 4227 bp. Nach erfolgtem Knockout ergab sich dagegen nur noch ein Rudiment mit einer Länge von 746 bp. Dieses Genprodukt war deutlich in Nieren von mit Doxycyclin induzierten Versuchstieren (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}) nachzuweisen. Damit zeigte sich auch die Effektivität des Knockouts, da das Wildtyp-Gen nur noch sehr schwach zu detektieren war. Ein vollständiger Verlust des Wildtyp-Gens war nicht zu erwarten, da es sich bei der eingesetzten DNA-Probe aus der Niere stets um Misch-DNA handelte. In Tubulusepithelzellen fand der Knockout statt, in den übrigen Zellen der Niere (Bindegewebszellen, Endothelzellen,

infiltrierte Zellen der hämatopoetischen Reihe) dagegen nicht. Daher musste auch immer ein Rest der Wildtyp-DNA nachzuweisen sein. Der deutliche Intensitätsrückgang der Wildtypbande zeigte aber deutlich den Erfolg des Knockouts. Bei dieser Analyse war auffällig, dass bei nicht induzierten Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy Mäusen sowohl das Wildtyp-Gen als auch das Kollagen-Fragment nachzuweisen waren. Ohne Doxycyclininduktion hätte kein Knockout erfolgen und somit auch kein verkürztes Kollagenprodukt nachweisbar sein dürfen. Dies ließ darauf schließen, dass der Promotor für die Cre-Rekombinase eine gewisse Eigenaktivität aufweist. Somit kam es auch ohne Doxycyclin in geringem Maße zur Expression der Cre-Rekombinase, was bei Tieren mit *loxP* sites im Genom zu einem Knockout von *Kollagen1a1* führte. Der Knockout war dann allerdings nicht vollständig, da neben dem verkürzten Fragment auch noch die Wildtypform des Gens, in deutlich höherer Intensität als bei den Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy Knockouttieren nachweisbar war. Das bedeutete, dass die Ergebnisse der nicht induzierten Kontrollgruppe auch nur etwas eingeschränkt verwertbar sind, da zum Teil auch in der Gruppe Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy ein *Kollagen1a1*-Knockout stattfindet. In welchem Ausmaß der Knockout stattfand, konnte allerdings nicht genau beziffert werden, daher konnten die Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy ihrer Funktion als Kontrollgruppe auch nicht gerecht werden.

Bei den induzierten Kontrollgruppen Col1a1^{fl/fl} + Doxy und Pax8-Cre +Doxy dagegen war trotz Doxycyclinbehandlung nur die Wildtyp-Kollagenbande nachzuweisen. Diese beiden Genotypen eigneten sich damit ausgezeichnet als Kontrollgruppen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Pax8rtTAetOCre Mäuse mit Doxycyclin behandelt einen effektiven Knockout von Kollagen Typ I lieferten. Aus den Ergebnissen lässt sich allerdings kein Rückschluss darauf ziehen, ob es tatsächlich zu einem vollständigen Knockout in allen Tubulusepithelzellen kommt, oder ob dieser Knockout vielleicht auch nur in beispielsweise 80 % oder 50 % der Tubulusepithelzellen stattfindet. Wäre dies der Fall, könnte der Einfluss der EMT auf die Ausbildung der Nierenfibrose in den vorliegenden Ergebnissen unterschätzt werden, da ein nur partieller Knockout folglich auch eine geringere Beeinflussung der Fibrosebildung bedeuten würde.

Neben der Effektivität des Knockouts, stellte sich die Frage der Spezifität des Knockouts in Nierentubulusepithelzellen. Bei Traykova-Brauch *et al.* wurde eine Spezifität

für Nierentubulusepithelzellen des Pax8rtTA bereits 2008 *in vivo* bewiesen [16]. Dazu wurden Pax8rtTA-Mäuse mit NZL-2-Mäusen gekreuzt. NZL-2-Mäuse besaßen ein Tetracyclin abhängiges Element, das zur Ausbildung einer nuklearen β -Galaktosidase führte. Diese Mäuse wurden zusammen mit Kontrollmäusen anschließend für 10 Tage mit dem Tetracyclinanalogon Doxycyclin behandelt. Danach ließ sich bei den Pax8rtTA Mäusen in den Tubulusepithelzellen aller Abschnitte, nicht aber in denen der Kontrollmäuse, eine starke β -Galaktosidaseaktivität nachweisen. Dagegen war in Zellen der Glomeruli, Mesangiumzellen und Endothelzellen sowie viszeralen und parietalen Epithelzellen keine β -Galaktosidaseaktivität nachweisbar. Extrarenal konnte lediglich periportal eine sehr geringe Aktivität nachgewiesen werden [16]. Auf Grund der eindeutigen Daten von Traykova-Brauch *et al.* wurde für die vorliegende Arbeit die Spezifität des Knockouts in Nierentubulusepithelzellen angenommen. Unterstrichen wurde die Spezifität des Knockouts in Nierentubulusepithelzellen in dieser Arbeit durch eine vergleichende PCR von Kollagen Typ I in Schwanz- und Nierenbiopsien von Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl}-Mäusen nach Behandlung mit Doxycyclin. Dazu wurde DNA aus Schwanzbiopsien, die beim Versuchsende entnommen wurde, verwendet. In diesen Proben konnte nur das Wildtyp-Kollagen nachgewiesen werden. Mit der durchgeführten PCR ließ sich allerdings nicht direkt nachweisen, dass der Knockout spezifisch in Nierentubulusepithelzellen stattfindet, da es sich bei der aus Nieren extrahierten DNA immer um Misch-DNA aus Tubulusepithelzellen und beispielsweise Bindegewebs- und Epithelzellen handelte. Doch Bindegewebs- und Epithelzellen waren auch in der Schwanzbiopsie, sodass die Aktivität des TetOn-Systems und damit der Cre-Rekombinase außerhalb der Tubulusepithelzellen auch in Schwanzbiopsien nachweisbar gewesen wäre, da sowohl Endothelzellen als auch Bindegewebszellen ubiquitär im Körper vertreten sind. Ein Knockout in diesen Zellen durch Fehlfunktionen des TetOn-Systems wäre somit auch in den genotypisierten Schwanzbiopsien detektierbar gewesen. Somit stellten die Pax8rtTAtetOCre-Mäuse eine effektive Methode dar, um die Kollagen Typ I-Produktion durch Tubulusepithelzellen zu untersuchen. Und in Zusammenschau mit den Ergebnissen von Traykova *et al.* und der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pax8rtTAtetOCre-Mäuse gekreuzt mit Col1a1^{fl/fl}-Mäusen spezifisch in Tubulusepithelzellen einen Knockout von Kollagen Typ I lieferten.

4.2 Gut verträgliche Knockoutinduktion mit einer Doxycyclinkonzentration von 2 mg/ml

Bei der Induktion der Cre-Rekombinase war das Ziel eine Doxycyclinkonzentration zu verwenden, bei der ein ausreichend hoher Spiegel im Gewebe erreicht wurde, um einen vollständigen Knockout zu gewährleisten. Im Modell eines Doxycyclin abhängigen Knockouts wurden in der Literatur bisher unterschiedlichste Doxycyclinkonzentrationen verwendet. Bei *in vitro*-Versuchen wurde bei Gossen *et al.* bereits bei einer Konzentration von 1 µg/ml Doxycyclin im Kulturmedium eine ausreichende Aktivierung erzielt [43]. Bei *in vivo*-Versuchen wurden hingegen deutlich höhere Konzentrationen benötigt. Kistner *et al.* verwendeten beispielsweise ein Doxycyclinkonzentration von 2 mg/ml über einen Zeitraum von einer Woche. Dies nutzten sie für Luciferase-Reporter-mäuse, bei denen das Luciferase-Gen unter Kontrolle des P_{hCMV} (human cytomegalovirus immediate early promotor) steht. Zudem wurde in diese Mäuse ein Tetracyclin-kontrollierter, reverser Transaktivator eingekreuzt, der nach Aktivierung mittels Doxycyclin die Transkription des P_{hCMV} induziert. In Versuchen mit diesen Mäusen konnten Kisten *et al.* eine bis zu 10⁵-fache Steigerung der Luciferase-Aktivität nach Induktion mit 2 mg/ml Doxycyclin über eine Woche detektieren. In ihren Versuchen verwendeten sie auch deutlich geringere Doxycyclinkonzentrationen (200 ng/ml, 2 µg/ml, 20 µg/ml). Dabei stellten sie fest, dass bei geringeren Konzentrationen die Aktivität der Luciferase nicht mehr in allen Organen nachzuweisen war, oder nur in geringem Maße anstieg [44]. Zudem wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass eine Induktion mit 2 mg/ml von den Mäusen genauso gut toleriert wurde, wie eine Induktion mit 1 mg/ml Doxycyclin. Wichtig war dabei nur 5 % Sucrose zum Trinkwasser zu mischen, um den bitteren Geschmack des Doxycyclins zu maskieren. Außerdem musste darauf geachtet werden das Wasser regelmäßig alle vier Tage zu wechseln. Dies diente zum einen dazu, die Frische des Wassers zu gewährleisten, damit es von den Mäusen gut angenommen wird, und zum anderen sollte einem potentiellen Wirkverlust durch zu lange Lagerung vorgebeugt werden. Zudem musste die Doxycyclin-Lösung in dunklen Trinkflaschen verabreicht werden, da Doxycyclin lichtempfindlich ist und es ansonsten in seiner Wirkung abgeschwächt werden könnte [45]. Liu *et al.* untersuchten die Rolle von Autophagie im Rahmen der Erhaltung der Nierentubuli und der Regeneration nach

Ischämie-Reperusionsversuchen. Dabei verwendeten sie $Atg5^{flox/flox}$ Pax8rtTAetOCre-Mäuse und induzierten diese mit einer Doxycyclinkonzentration von 2 mg/ml (+ 5 % Sucrose) [45]. Im Unterschied zu Kistner *et al.* wurde in diesen Versuchen Doxycyclin über 14 statt über 7 Tage verabreicht. Da diese Versuche zum Verhalten der Niere nach einer ischämischen Schädigung den pathophysiologischen Abläufen der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche ähnlicher waren und bezüglich der Verträglichkeit keine Einwände bestanden, wurde Doxycyclin ebenfalls über 14 Tage verabreicht. Der deutliche Knockoutnachweis ließ darauf schließen, dass eine Knockoutinduktion bei einem Tetracyclin abhängigen Modell, mit einer Konzentration von 2 mg/ml Doxycyclin (+ 5 % Sucrose) über 14 Tage einen vollständigen Knockout bei gleichzeitig guter Verträglichkeit generierte. Bezüglich der Auswaschphase zwischen der Induktion mit Doxycyclin und der UUO, 14 versus 4 Tage, konnten in dieser Arbeit keine Unterschiede festgestellt werden. Daher wurde aufgrund der Zeitersparnis die kürzere Auswaschphase und bei guter Verträglichkeit und effektivem Knockout eine Induktion des Knockouts mit 2 mg/ml Doxycyclin über 14 Tage gewählt.

4.3 Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Inflammationsreaktion

In den Versuchen konnten männliche und weibliche Tiere nicht gemeinsam ausgewertet werden, da eine Divergenz der Ergebnisse beider Geschlechter festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis wurde unter anderem von Forschungsarbeiten von Zore *et al.* untermauert, die feststellten, dass die Inflammationsreaktion geschlechtsabhängig ist [54]. Einen ersten Hinweis lieferte dabei die Tatsache, dass Autoimmunkrankheiten zu 80 % Frauen betreffen. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Funktion des Immunsystems liegt also nahe. In Versuchen mit knochenmarkstransplantierten Mäusen wurde festgestellt, dass intrazellulär, je nach Geschlecht der Maus, eine unterschiedliche Aktivierung von hämatopoetischen Stammzellen erfolgte [54]. In einer Studie von Kararigas *et al.* wurde ebenfalls ein geschlechtsspezifischer Unterschied im Verlauf der Inflammationsreaktion und Fibrosebildung festgestellt [55]. Hierzu wurde das linksventrikuläre Remodeling bei erhöhter Druckbelastung des linken Ventrikels untersucht. Dabei zeigte sich auf RNA-Ebene bei Männern eine erhöhte Induktion

von Genen, die im Rahmen der Fibrosebildung aktiviert wurden. Dagegen wurden bei Frauen proinflammatorische Gene vermehrt unterdrückt. Dazu kam es bei Frauen zu einer Suppression von profibrotischen Faktoren wie TGF β und Angiotensinogen und einem geringeren Anstieg von Zytokinen und Chemokinen. Insgesamt beobachteten Kararigas *et al.* somit deutliche geschlechtstypische Unterschiede in der Inflamationsreaktion und anschließenden Fibrosierung des linken Ventrikels bei erhöhter Druckbelastung. Frauen wiesen durch eine abgeschwächte Entzündungsreaktion einen gewissen Schutz gegen unkontrollierte Fibrosebildung und linksventrikuläres Remodeling auf [55]. Die in dieser Studie untersuchten proinflammatorischen und profibrotischen Faktoren sind auch im Rahmen der Nierenfibrosebildung aktiv. Damit waren ähnliche geschlechtstypische Unterschiede auch im Rahmen der UUO als Modell der druckinduzierten Nierenfibrose anzunehmen. In einer Forschungsarbeit über den altersbedingten Rückgang der Nierenfunktion von Baylis *et al.* konnte ebenfalls der Einfluss von Sexualhormonen auf den Erhalt einer gesunden Nierenfunktion festgestellt werden [56]. Dabei wirkten Östrogene sowohl kardiovaskulär als auch renoprotektiv. Dies beruhte auf dem Effekt von Östrogen auf den Erhalt der Stickstoffmonoxidproduktion (NO) durch das Endothel. Ein intrarenales Absinken der NO Produktion korrelierte deutlich mit einer Progression von CKD [56]. Damit hatten Geschlechtshormone auch Einfluss auf die Ausbildung der Nierenfibrose. Aufgrund dieser nicht zu vernachlässigenden geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden in der vorliegenden Arbeit nur weibliche Tiere in die Auswertung mit einbezogen. Dadurch konnte eine Verzerrung der Versuchsergebnisse durch den Kofaktor Geschlecht verhindert werden.

4.4 UUO als geeignetes Modell der renalen Fibrose

Um die Fibrosierung der Niere im Rahmen der CKD zu simulieren, wurde in der vorliegenden Arbeit das Modell der UUO gewählt. Dabei konnte eine gute Fibroseinduktion in der ligierten Niere im Vergleich zur kontralateralen Niere gezeigt werden. In der FACS Analyse zeigte sich eine signifikante Infiltration von CD45-positiven Zellen. Der Leukozytenmarker CD45 lässt auf die Infiltration durch Zellen hämatopoetischer Abstammung schließen. In der vorliegenden Arbeit konnte ein 5-facher Anstieg der Leukozyteninfiltration im Gegensatz zur kontralateralen Niere

gemessen werden. Dabei war davon auszugehen, dass auch bereits der Basalwert der kontralateralen Niere im Vergleich zu gesunden Nieren eine erhöhte Leukozyteninfiltration aufwies, da der Verlust der UUO-Niere Kompensationsreaktionen mit Hypertrophie und Hyperfiltration hervorrief [57]. Des Weiteren stieg auch der prozentuale Anteil Kollagen1a1-positiver Partikel pro Niere durch die UUO um das 65-fache an. Zudem wurden die UUO-Nieren auch auf mRNA-Ebene untersucht. Dabei konnte in der vorliegenden Arbeit in UUO-Nieren ein Anstieg des $2^{-\Delta Ct}$ Wertes auf das 16-fache gemessen werden. Damit ist auf eine suffiziente Fibroseinduktion durch die UUO zu schließen. Histologisch zeigte sich nach UUO ein durch den Harnstau dilatiertes Tubulussystem sowie Bindegewebeinlagerungen. Somit konnte in dieser Arbeit mittels UUO innerhalb von 14 Tagen eine Induktion der renalen Fibrose erreicht werden. Die UUO als im Moment am häufigsten verwendetes murines Modell der renalen Fibrose wies allerdings auch Grenzen in Anwendung und Übertragbarkeit auf. Ein Vorteil des Modells war sicherlich seine einfache Durchführbarkeit mit kurzer Narkosedauer und geringer Belastung für die Maus und dass bereits innerhalb von 14 Tagen eine renale Fibrose induziert werden kann [34]. Außerdem waren die Infiltration inflammatorischer Zellen sowie der Anstieg profibrotischer Faktoren als wichtige Merkmale der Fibrogenese im UUO-Modell nachweisbar [58]. Zudem steht die kontralaterale Niere trotz kompensatorischer Veränderungen als interne Kontrolle zur Verfügung. Als Einschränkung des Modells musste aber bedacht werden, dass eine Obstruktion des Harnleiters als Ursache der renalen Fibrose klinisch nur bei Kindern eine größere Rolle spielt [35]. Im Erwachsenenalter sind die Hauptursachen für CKD die diabetische sowie die hypertensive Nephropathie. Deshalb mussten Ergebnisse, die mit dem Modell der UUO erzielt wurden, mit denen aus anderen Fibrosemodellen, wie dem der Adenin-induzierten Nephropathie, verglichen werden. Es war aber denkbar, dass eine Übertragbarkeit des Modells auch auf CKD anderer Genese, wie beispielsweise ein verringerter Blutfluss, besteht [36]. Eine weitere Schwäche des UUO Modells stellte dar, dass die Restfunktion der ligierten Niere nicht gemessen werden konnte. Zur Kompensation dieses Nachteils hätte man aber auf das Modell der reversiblen UUO zurückgreifen können.

4.5 Indirekte Verstärkung der renalen Fibrose durch Tubulusepithelzellen im UUO

Modell

Der von Kalluri *et al.* postulierte zentrale Anteil von 30-36 % der Kollagen Typ I-Produktion via EMT im Rahmen der renalen Fibrose konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden [25,29]. Histologisch konnte mittels Trichrom Färbung und Immunfluoreszenz keine signifikante Reduktion der renalen Fibrose und spezifisch von Kollagen Typ I bei Mäusen mit einer zelltypspezifischen Defizienz von *Kollagen1a1* in den Tubulusepithelzellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Col1a1^{fl/fl}+Doxy und Pax8-Cre +Doxy) gezeigt werden. Lediglich einmalig ergab sich im Rahmen der Auswertung der histologischen Untersuchung mittels Trichrom Färbung eine signifikante Reduktion der fibrotischen Fläche in den Nieren der Knockouttiere im Vergleich zu Pax8-Cre +Doxy Kontrollen. Die Kontrollgruppe Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy, die, wie bereits unter 4.1 beschrieben, durch einen Promotor mit Eigenaktivität auch ohne Induktion mit Doxycyclin einen partiellen Knockout von Kollagen Typ I zeigte, lieferte wie erwartet keine signifikant unterschiedlichen Werte zu den Knockouttieren. Die Ergebnisse weisen auf einen sehr geringen Einfluss der EMT auf die Fibrosebildung bei CKD hin, der nur mit einer sehr großen Gruppengröße nachweisbar gewesen wäre. Selbst durch das Zusammenfassen mehrerer Versuche zeigte sich lediglich einmalig beim histologischen Vergleich der Knockout Tiere (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy) mit den Pax8-Cre +Doxy Kontrollen mit Hilfe der Trichrom Färbung ein signifikanter Unterschied. Durch diese Signifikanz ist abzuleiten, dass Tubulusepithelzellen die Ausbildung renaler Fibrose durchaus mitbedingen, allerdings nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen.

Insgesamt war der Rückgang der fibrotischen Fläche nur vernachlässigbar gering. In der Immunhistologie betrug der Anteil der Kollagen1a1-positiven Fläche bezogen auf die Gesamtniere bei den Knockouttieren im Schnitt 1,2 %, in den Kontrollgruppen Col1a1^{fl/fl} +Doxy und Pax8-Cre +Doxy lag dieser Wert dagegen bei etwa 1,5 %. Durch den Knockout von Kollagen Typ I in Tubulusepithelzellen verringerte sich die Kollagen1a1-positive Fläche nicht signifikant um lediglich 0,3 Prozentpunkte. Die Kontrollgruppe Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy wies im Schnitt eine Kollagen1a1-positive Fläche von 1,4 % und liegt damit nahe am Wert der anderen Kontrollgruppen (1,5 %). Durch die Eigenaktivität des Promotors und dem daraus resultierenden partiellen Kollagen Typ I Knockout war ein signifikanter Unterschied dieser

Kontrollgruppe zu den Mäusen mit einer kompletten Defizienz für Kollagen Typ I in Tubulusepithelzellen auch nicht zu erwarten. Wurde also immunhistologisch spezifisch Kollagen Typ I angefärbt, befanden sich die Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy Mäuse mit partiellem Knockout durch einen Promotor mit Eigenaktivität annähernd auf einem Niveau mit den anderen Kontrollgruppen komplett ohne Knockout (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy: 1,4 %, Col1a1^{fl/fl} +Doxy und Pax8-Cre +Doxy 1,5 %, Knockouttiere: 1,2 %). In dieser Färbung zeigt sich somit, wie gering die tatsächliche Kollagenproduktion Typ I durch Tubulusepithelzellen ist. Im Falle des nur partiellen Knockouts der Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy Mäuse hatte das Fehlen von Kollagen Typ I bereits keinen Einfluss (1,4 % Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy vs. 1,5 % bei den beiden anderen Kontrollen). Es konnte also insgesamt kein signifikanter Unterschied in der Produktion von Kollagen Typ I nachgewiesen werden.

Auch in der Masson-Trichrom-Färbung ließ sich dies weiter bestätigen. In dieser Färbung ließ sich in den UO Nieren nach erfolgtem Knockout eine fibrotische Fläche von 1,7 % der Gesamtfläche detektieren. Dies bedeutet eine nicht signifikante Reduktion der fibrotischen Fläche im Vergleich zur Col1a1^{fl/fl} +Doxy Kontrollgruppe, die im Schnitt einen Anteil der fibrotischen Fläche (2,1 %). Die Kontrollgruppe Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} ØDoxy zeigte durch den Promotor mit Eigenaktivität auch in dieser Färbung mit den Knockout-Tieren vergleichbare Werte (1,6 % fibrotische Fläche). Lediglich die Pax8-Cre +Doxy-Kontrollgruppe lieferte nach dem Zusammenfassen aller Versuche signifikant unterschiedliche Ergebnisse. Die fibrotische Fläche betrug in dieser Gruppe im Schnitt 2,1 %. Der Wert der Knockouttiere (Pax8-Cre x Col1a1^{fl/fl} +Doxy) lag bei ca. 1,7 %. Dies bedeutet lediglich eine Reduktion des Anteils der fibrotischen Fläche an der Gesamtniere um 0,4 Prozentpunkte durch den Knockout. Dadurch zeigt sich, dass der direkte Einfluss der Tubulusepithelzellen nur sehr gering ist. Der minimale Rückgang war nur nach Zusammenfassung mehrerer Versuche mit entsprechend höheren Versuchstierzahlen zu detektieren.

In der Masson-Trichrom-Färbung ließ sich Bindegewebe beziehungsweise die fibrotische Fläche, aber nicht spezifisch Kollagen Typ I nachweisen. Damit stellte diese Methode auch ein Maß für die indirekten Effekte des Kollagen Typ I-Knockouts in Tubulusepithelzellen auf die Fibrosebildung in der Niere dar. Neben Kollagen Typ I werden bei der Fibrosebildung auch andere Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin und elastische Fasern gebildet [2,9].

Zudem ließ sich auch in der FACS-Analyse kein signifikanter Unterschied an Kollagen1a1-Partikeln pro Niere messen. Dadurch konnte noch einmal die Annahme bestätigt werden, dass Tubulusepithelzellen nur einen irrelevanten Beitrag zur Kollagen Typ I-Bildung im Rahmen renaler Fibrose leisten. Ein so geringer Effekt war in der FACS-Analyse erst bei einer ausreichend großen Zahl an Proben nachweisbar. Die FACS-Analyse stellt durch die individuelle Verarbeitung der Proben eine Methode mit geringer Sensitivität dar, sodass kleinere Unterschiede schnell maskiert werden. Zur Analyse der Infiltration von Zellen hämatopoetischen Ursprungs wurden die CD45⁺-Zellen pro Niere mittels FACS-Analyse aufgezeichnet. Dabei konnte kein erhöhter oder erniedrigter Influx von CD45⁺ in UUO-Nieren nach dem Kollagen Typ I-Knockout detektiert werden. Die Leukozyteninfiltration wurde somit vom Kollagen Typ I-Knockout in Tubulusepithelzellen nicht beeinflusst.

Des Weiteren wurde auf mRNA-Ebene die Transkriptionsrate von *Kollagen1a1* in UUO-Nieren analysiert. Dabei ergab die Auswertung der quantitativen PCR keine signifikant unterschiedlichen Werte zwischen der Versuchsgruppe und den Kontrollen. Dies war zu erwarten, da das Ergebnis der qPCR auf DNA aus einem vollständigen Teilstück der Niere bestand, somit nicht nur Tubulusepithelzellen, sondern unter anderem auch Endothel- und Bindegewebszellen enthielt. In den Tubulusepithelzellen hatte der Knockout zwar stattgefunden und es konnte kein Kollagen1a1 mehr gebildet werden, in den übrigen Zellen der Niere sowie infiltrierenden Zellen aber schon. Der Knockout von Kollagen Typ I in Tubulusepithelzellen verringert die Transkriptionsrate von *Kollagen1a1* nur vernachlässigbar, sodass ein Nachweis auf mRNA-Ebene mit der verwendeten Misch-DNA nicht möglich war.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit der Einfluss renaler Tubulusepithelzellen auf die Ausbildung von Nierenfibrose genauer definiert werden. Es konnte widerlegt werden, dass Tubulusepithelzellen als Quelle von bis zu 36 % der Myofibroblasten dienen, wie es von Iwano und Kaluri postuliert wurde [29,30]. In deren Studien wurde der Anteil aufgrund methodischer Schwächen deutlich überschätzt, da als Nachweisgrundlage FSP1 diente. Die Basis dafür war die Beobachtung, dass in fibrotischem Nierengewebe sowohl Myofibroblasten als auch die FSP1-Expression hochreguliert wurde. FSP1 fand sich dabei nicht nur im Interstitium, sondern auch in Tubulusepithelzellen. Das führte zu der Annahme, dass Myofibroblasten via EMT

auch aus Tubulusepithelzellen rekrutiert werden. Le Hir *et al.* entdeckten aber eine Diskrepanz zwischen FSP1-positiven Zellen und solchen, die morphologisch als Myofibroblasten identifiziert werden konnten [59]. In genaueren Analysen der Zellen konnte FSP1 bei mononukleären Zellen nachgewiesen werden. Dadurch konnte durch FSP1-positive Zellen in Tubulusepithelien nicht auf eine EMT geschlossen werden [59]. Zudem gelang die Dokumentation der EMT bisher nur *in vitro*. Bereits 1999 konnten von Fan *et al.* beispielsweise eine TGF β -stimulierte EMT mit Tubulusepithelzellen aus Ratten beobachtet werden. Die Induktion der EMT via TGF β wurde durch den Kontakt der stimulierten Zellen mit Kollagen Typ I, also dem Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix bei renaler Fibrose, verstärkt [60]. Kollagen Typ I diente somit als zusätzlicher Stimulus für eine EMT. Trotz der Verwendung unterschiedlicher Methoden konnte der Transit einer Tubulusepithelzelle durch die Basalmembran *in vivo* nie dokumentiert werden [27]. Faulkner *et al.* markierten Tubulusepithelzellen beispielsweise mit Texas Red-dextran. Es konnte eine gute Aufnahme des Tracers in proximale Tubulusepithelzellen detektiert werden. Der durch Endozytose aufgenommen Fluoreszenzfarbstoff wäre während einer möglichen Transition der Basalmembran in der Zelle verblieben und weiter nachweisbar gewesen, während Oberflächenmarker möglicherweise verloren gehen hätten können. Trotzdem konnte nie eine aus dem Tubulusverband gelöste Zelle im Interstitium nachgewiesen werden [61]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte kein relevanter direkter Einfluss der Tubulusepithelzellen auf die Ausbildung der renalen Fibrose nachgewiesen werden. Es fand sich histologisch insgesamt kein signifikanter Rückgang der Kollagen Typ I-Bildung und sowohl in der FACS -Analyse als auch auf mRNA-Ebene war dieser Effekt ebenfalls nicht nachweisbar.

Nach einer Schädigung durch zum Beispiel Druck, Hypoxie oder chemische Einflüsse werden durch Tubulusepithelzellen Chemokine und Zytokine ausgeschüttet, welche konsekutiv zur vermehrten Infiltration von Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten in den peritubulären Raum führen [62]. Zudem zeigte Bonventre 2014 den Einfluss eines tubulären Schadens auf die Progression der renalen Fibrose. Kommt es zu einer starken oder wiederholten Schädigung der Nierentubuli, führt dies zu einem Arrest der geschädigten Zellen in der G2/M-Phase des Zellzykluses und nicht zur Apoptose. Dies führt zur Aktivierung

von DNA-Reparaturmechanismen und zur Synthese und Sekretion von profibrotischen Faktoren [63]. So wird zum Beispiel TGF β frei, ein starker Induktor der EMT. Kommt es dann zu einer EMT oder partiellen EMT, bedeutet dies einen erneuten Schaden für das Tubulusepithel sowie eine peritubuläre Dysfunktion [62]. Dadurch kommt es zur weiteren Aggravation der Hypoxie, zu einer Gefäßrarefizierung und chronischer Inflammation und damit zum stärkeren Anstieg von Zytokinen und Chemokinen, die sowohl die Nierenfibrose als auch die EMT antreiben. Dadurch startet ein *circulus vitiosus* aus Schädigung, Inflammation, EMT und damit erneuter Schädigung, der die überschießenden Reparaturmechanismen, die zur Fibrosierung führen, immer stärker antreibt [63]. Die EMT bedeutet einen zusätzlichen Schädigungsreiz, der, wenn die EMT durch die überschießende Reaktion der Niere in übersteigertem Maß abläuft, die Ausbildung einer renalen Fibrose so sekundär intensiviert. In Nierenbiopsien von Patienten mit unterschiedlichen Nierenerkrankungen konnte von Rastaldi *et al.* gezeigt werden, dass, unabhängig von der Genese des Schadens, Tubulusepithelzellen proliferieren und sich phänotypisch verändern. So kommt es zu einem Verlust der Zell-Zell-Kontakte und zu einer Aktivierung der Kollagen Typ I-Produktion [64]. In gesunden Nieren ist Kollagen Typ IV-Hauptbestandteil der Basalmembran [2,65]. Wird die Niere durch Noxen wie Hypertension geschädigt, verdickt sich die Basalmembran, zudem ändert sich ihre Zusammensetzung und es lagert sich vermehrt Kollagen Typ I ab [65]. Es ist naheliegend, dass dieses Kollagen Typ I von geschädigten Tubulusepithelzellen gebildet wird, die eine EMT oder zumindest eine partielle EMT, wie von Huang *et al.* beschrieben, durchgemacht haben [66]. Dies wäre eine Möglichkeit den Rückgang der Kollagen1a1-positiven Fläche in der histologischen Auswertung dieser Arbeit überzeugend zu erklären. Dieser Effekt konnte auch in Versuchen von Rastaldi *et al.* nachgewiesen werden [64].

Die EMT ist daher ein Phänomen, das primär eher in geringem Ausmaß zur interstitiellen Kollagen Typ I-Produktion im Rahmen der renalen Fibrose beiträgt. Erst sekundär kommt es durch den Schaden, den die Transdifferenzierung der Epithelzelle im Tubulus hinterlässt, zu einer Verstärkung der Fibrosebildung und zur Verdickung der tubulären Basalmembran durch die Einlagerung von Kollagen Typ I. So korrelierte in einer Studie von Rastaldi *et al.* die Zahl der transdifferenzierten

Tubulusepithelzellen mit der Einschränkung der Nierenfunktion, der Leukozyteninfiltration und dem Ausmaß der renalen Fibrose [64].

Die Plausibilität der EMT oder einer partiellen EMT wird auch dadurch unterstützt, dass sich außer dem Sammelrohr alle Anteile des Tubulussystems aus dem metanephritische Mesenchym entwickeln. Dieser embryonale Entwicklungsvorgang geschieht mittels mesenchymal-epithelialer Transdifferenzierung [67]. Es spricht nichts gegen eine Umkehrbarkeit dieses Prozesses, um im Falle einer Schädigung der Niere regulierend einzugreifen.

Buchtler *et al.* untersuchten in ihrer Arbeit einen heterozygoten Knockout von Kollagen Typ I (homozygot wäre pränatal letal) in allen Zellen und setzten diese Werte in Zusammenhang mit einem Kollagen Typ I-Knockout in hämatopoetischen Zellen. Dadurch konnten sie nachweisen, dass 38-50 % der Kollagen Typ I-Produktion nach 14-tägiger UUO im Rahmen der Nierenfibrose durch hämatopoetische Zellen erfolgt. Zudem wurde die Kollagen Typ I-Ablagerung nach 7 im Vergleich zu 14 Tagen UUO untersucht. Dabei zeigte sich, dass hämatopoetische Zellen nicht sofort zur Kollagen Typ I-Produktion beitragen, sondern erst nach einer gewissen Latenzphase, da sie erst in die Nieren immigrieren müssen [53]. Dies könnte unter anderem durch die EMT getriggert werden, da durch den sekundären Tubulusschaden sowie Zytokine und Chemokine, die durch die Inflamationsreaktion frei werden, ein profibrotisches Milieu geschaffen wird. Somit zeigte sich in dieser Arbeit, dass die tatsächliche Kollagen Typ I-Produktion zu einem wichtigen Teil durch hämatopoetische Zellen übernommen wird, während tubuläre Epithelzellen eher sekundär mitwirken, indem sie die Infiltration hämatopoetischer Zellen induzieren und ein profibrotisches Umfeld schaffen [53].

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass Tubulusepithelzellen nicht wesentlich zur Produktion von interstitiellem Kollagen Typ I beitragen. Viel mehr könnte es durch die Schädigung der Tubuli zu einer Aggravation der Inflamationsreaktion und damit zu einem noch stärkeren Schaden kommen. Tubuläre Epithelzellen haben das Potential zur mesenchymalen Transdifferenzierung und Produktion von Kollagen Typ I. Das von ihnen produzierte Kollagen wird aber vor allem in der tubulären Basalmembran abgelagert, wo es zu einer weiteren Schädigung der Niere und der Nierenfunktion führen könnte. Dadurch

wird ein Teufelskreis aus Nierenschädigung, Inflammation, EMT und damit erneuter Schädigung in Gang gesetzt, der letztendlich die Ausbildung einer renalen Fibrose begünstigen könnte.

5 Zusammenfassung

In der alternden Gesellschaft stellen chronische Nierenerkrankungen ein zunehmendes sozio-ökonomisches Problem dar. Unter anderem Wohlstandserkrankungen wie Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie schädigen auf Dauer das Nierengewebe, was zu einer fortschreitenden Defektheilung mit Funktionsverlust des Nierenparenchyms führt. Dies endet oft in einer CKD und im schlimmsten Fall zur Dialysepflicht und der damit einhergehenden massiven Einschränkung der Lebensqualität. Daher besteht ein großes Interesse neue Therapieansätze zu finden, mit denen die Entstehung oder zumindest Progression von chronischen Nierenerkrankungen verhindert werden kann. Dafür ist es wichtig die pathophysiologischen Mechanismen sowie die an der Ausbildung von renaler Fibrose beteiligten Zellpopulationen exakt zu kennen, um schließlich mögliche Ansatzpunkte für eine Therapie zu identifizieren. Bei der Entstehung renaler Fibrose spielt Kollagen Typ I als Hauptkomponente extrazellulärer Matrix eine entscheidende Rolle. Es gibt allerdings verschiedenste Theorien, welche Zellen zu der Kollagenproduktion im Rahmen der Nierenfibrose in welchem Ausmaß beitragen. Eine der am umstrittensten Theorien stellt dabei die EMT dar. Der Anteil der Kollagen Typ I-Produktion durch Zellen, die via EMT aus Tubulusepithelzellen entstanden sind, schwankt in verschiedenen Studien zwischen 5 % und 36 %. Dabei ist bisher völlig unklar, ob Tubulusepithelzellen tatsächlich an der Produktion von Kollagen Typ I beteiligt sind oder eher indirekt durch die Generierung eines profibrotischen Milieus und Rekrutierung von hämatopoetischen Zellen zur Progression der Fibrose beitragen.

In der vorliegenden Dissertation wird der Einfluss von Tubulusepithelzellen auf die Ausbildung der renalen Fibrose spezifiziert. Hierzu wurde die UUO als Fibrosemodell genutzt und Mäuse mit einem induzierbaren Knockout von Kollagen1a1 spezifisch in Tubulusepithelzellen generiert.

Bei den Versuchen zeigte sich, dass Tubulusepithelzellen zwar Kollagen Typ I sezernieren können, aber tatsächlich nur zu einem vernachlässigbar kleinen Anteil zur Kollagen Typ I-Entstehung beitragen. Das von Tubulusepithelzellen produzierte Kollagen Typ I könnte vor allem in der Basalmembran eingelagert werden und so zur Funktionseinschränkung und einer sekundären Schädigung führen. Dies sowie der durch die EMT entstehende Defekt in den Tubuli könnte zur Aggravation der

Inflamationsreaktion und zu erhöhten Spiegeln von profibrotischen Zytokinen und Chemokinen führen. Dadurch könnte es zu einem verstärkten Influx hämatopoetischer Entzündungszellen und sekundär auch zur verstärkten renalen Fibrosierung kommen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Tubulusepithelzellen primär nur unwesentlich zur Kollagen I-Produktion im Rahmen der renalen Fibrose beim UUO-Modell beitragen.

6 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
α -SMA	α -smooth muscle actin
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADH	Antidiuretisches Hormon
APC	Allophycocyanin
Bp	Basenpaare
CDK	Chronic kidney disease
cDNA	complementary DNA
Cl ⁻	Chloridion
cm	Centimeter
Col1a1 ^{fl/fl}	Col1a1a1 ^{flox/flox}
Ct	cycle threshold
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOX	Doxycyclin
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EndoMT	Endothelial-mesenchymale Transition
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FSC	Forward Scatter
FSP 1	Fibroblasten-spezifisches Protein 1
G	Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrations Rate
HIF	hypoxieinduzierter Faktor
IGF	Insulin-like growth factor
i.p.	Intraperitoneal
Ind.	Induziert/mit Doxycyclin behandelt
K ⁺	Kaliumion
Kb	Kilobasenpaare

Kg	Kilogramm
Kolat	Kontralaterale Niere
Lsg.	Lösung
MET	Mesenchymal-epitheliale Transformation
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
Mg	Milligramm
Min	Minuten
MMP	Matrix-Metalloproteasen
Mosmol	Milliosmol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Na ⁺	Natriumion
NL	Niederlande
Nicht ind.	Nicht induziert/ nicht mit Doxycyclin behandelt
Nm	Nanometer
NZL	New Zealand-L
Pax Gene	Paired-box-Gene
Pax8	Pax8rtTAtetOCre
Pax8 x Col1a1 ^{fl/fl}	Pax8rtTAtetOCre x Col1a1 ^{fllox/fllox}
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGFRβ	<i>Platelet-derived growth factor-Rezeptor β</i>
P _{min}	Minimalpromotor
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	rounds per minute
RT MMLV	Reverse Transkriptase Moloney Murine Leukemia Virus
rtTA	reverse Transaktivator
Sek	Sekunde
SEM	standard error of the mean
SSC	Side Scatter
TGF	Transforming Growth Faktor
TNF	Tumornekrosefaktor

TGFβ	Transforming growth faktor β
TRE	Tetracyclin responsive element
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion/ Niere nach unilateraler Ureterobstruktion
V.	Vena
vgl.	Vergleiche
Vv.	Venae

7 Quellenangaben

1. Behrends J. Physiologie: 93 Tabellen. 2nd ed. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme; 2012. 830 p. ger.
2. Welsch U, Deller T. Sobotta Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller. 3rd ed. s.l.: Urban Fischer Verlag - Lehrbücher; 2011. 608 p. ger.
3. Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem. 3rd ed.; 2011. XV, 607 S.
4. Bildquelle: Anatomie der Niere:
https://www.thieme.de/statics/dokumente/thieme/final/de/dokumente/tw_pflegepaedagogik/abb-10-02-aufbau-der-niere.jpg.
5. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Innere Organe: 121 Tabellen. 3rd ed. Prometheus, LernAtlas der Anatomie / Michael Schünke; Erik Schulte; Udo Schumacher. Ill. von Markus Voll; Karl Wesker. Stuttgart: Thieme; 2012. 486 p. ger.
6. Pape H-C, Klinker R, Brenner B, Silbernagl S, editors. Physiologie. 7th ed. s.l.: Georg Thieme Verlag KG; 2014. 1024 p.
7. Bildquelle: Aufbau eines Nephrons:
http://www.tierfreunde.bayer.de/static/media/images/upload/katze/katze_gross/Aufbau_Nephron_1000.jpg.
8. Rassow J. Biochemie: 50 Tabellen. 2nd ed. Duale Reihe. Stuttgart: Thieme; 2008. 836 p. ger.
9. Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 4th ed. Stuttgart: Thieme; 2012. 680 p. ger.
10. Bildquelle: Aufbau von Kollagen Typ I
<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/COL1A2ID411ch7q22.html>.
11. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028–40. doi: 10.1038/nm.2807. PubMed PMID: 22772564.
12. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(12):684–96. doi: 10.1038/nrneph.2011.149. PubMed PMID: 22009250.
13. Blake JA, Ziman MR. Pax genes: regulators of lineage specification and progenitor cell maintenance. *Development.* 2014;141(4):737–51. doi: 10.1242/dev.091785. PubMed PMID: 24496612.
14. Sharma R, Sanchez-Ferras O, Bouchard M. Pax genes in renal development, disease and regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2015;44:97–106. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.09.016. PubMed PMID: 26410163.
15. Tong G-X, Yu WM, Beaubier NT, Weeden EM, Hamele-Bena D, Mansukhani MM, et al. Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical study. *Mod Pathol.* 2009;22(9):1218–27. doi: 10.1038/modpathol.2009.88. PubMed PMID: 19525927.
16. Traykova-Brauch M, Schonig K, Greiner O, Miloud T, Jauch A, Bode M, et al. An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular

- function in transgenic mice. *Nat Med.* 2008;14(9):979–84. doi: 10.1038/nm.1865. PubMed PMID: 18724376.
17. Boor P, Floege J. The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(8):3027–36. doi: 10.1093/ndt/gfs296. PubMed PMID: 22851626.
 18. Townsend RR. Arterial stiffness and chronic kidney disease: lessons from the Chronic Renal Insufficiency Cohort study. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(1):47–53. doi: 10.1097/MNH.0000000000000086. PubMed PMID: 25470015.
 19. Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int.* 2015;87(2):297–307. doi: 10.1038/ki.2014.287. PubMed PMID: 25162398.
 20. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med.* 2013;19(8):1047–53. doi: 10.1038/nm.3218. PubMed PMID: 23817022.
 21. Meran S, Steadman R. Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis. *Int J Exp Pathol.* 2011;92(3):158–67. doi: 10.1111/j.1365-2613.2011.00764.x. PubMed PMID: 21355940.
 22. Bucala, R, LA Spiegel, J Chesney, M Hogan, et al. Circulating Fibrocytes Define a New Leukocyte Subpopulation That Mediates Tissue Repair. *Molecular Medicine.* 1994.
 23. Li J, Qu X, Bertram JF. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol.* 2009;175(4):1380–8. doi: 10.2353/ajpath.2009.090096. PubMed PMID: 19729486.
 24. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178–96. doi: 10.1038/nrm3758. PubMed PMID: 24556840.
 25. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420–8. doi: 10.1172/JCI39104. PubMed PMID: 19487818.
 26. Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadhagara K, Carstens JL, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med.* 2015;21(9):998–1009. doi: 10.1038/nm.3902. PubMed PMID: 26236991.
 27. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: Fact or fantasy? *J. Clin. Invest.* 2011;121(2):468–74. doi: 10.1172/JCI44595.
 28. Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl).* 2004;82(3):175–81. doi: 10.1007/s00109-003-0517-9. PubMed PMID: 14752606.
 29. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2003;112(12):1776–84. doi: 10.1172/JCI200320530.

30. Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest*. 2002;110(3):341–50. doi: 10.1172/JCI15518. PubMed PMID: 12163453.
31. Strutz F. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of Cell Biology*. 1995;130(2):393–405. doi: 10.1083/jcb.130.2.393.
32. Zhou D, Liu Y. Renal fibrosis in 2015: Understanding the mechanisms of kidney fibrosis. *Nat Rev Nephrol*. 2016;12(2):68–70. doi: 10.1038/nrneph.2015.215. PubMed PMID: 26714578.
33. Liu Y, Sun J, Miao L, Ji L, Luo M, Li B, et al. A porcine model of relief of unilateral ureteral obstruction: study on self-repairing capability over multiple time points. *Mol Cell Biochem*. 2016;419(1-2):115–23. doi: 10.1007/s11010-016-2755-5. PubMed PMID: 27381184.
34. Ucer0 AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Ramos AM, et al. Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol*. 2014;46(4):765–76. doi: 10.1007/s11255-013-0520-1. PubMed PMID: 24072452.
35. Chevalier RL, Forbes MS, Thornhill BA. Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 2009;75(11):1145–52. doi: 10.1038/ki.2009.86. PubMed PMID: 19340094.
36. VAUGHAN ED, MARION D, POPPAS DP, FELSEN D. PATHOPHYSIOLOGY OF UNILATERAL URETERAL OBSTRUCTION: STUDIES FROM CHARLOTTESVILLE TO NEW YORK. *The Journal of Urology*. 2004;172(6):2563–9. doi: 10.1097/01.ju.0000144286.53562.95.
37. Murphy AM, Wong AL, Bezuhly M. Modulation of angiotensin II signaling in the prevention of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2015;8:7. doi: 10.1186/s13069-015-0023-z. PubMed PMID: 25949522.
38. *Methods in Nutrition Science: Cre/loxP System for Generating Tissue-specific Knockout Mouse Models*.
39. Bockamp E, Maringer M, Spangenberg C, Fees S, Fraser S, Eshkind L, et al. Of mice and models: improved animal models for biomedical research. *Physiol Genomics*. 2002;11(3):115–32. doi: 10.1152/physiolgenomics.00067.2002. PubMed PMID: 12464688.
40. Schonig K, Freundlieb S, Gossen M. Tet-Transgenic Rodents: a comprehensive, up-to date database. *Transgenic Res*. 2013;22(2):251–4. doi: 10.1007/s11248-012-9660-9. PubMed PMID: 23180363.
41. Dellas C. *Kurzlehrbuch Pharmakologie*. 1st ed. Kurzlehrbuch. München: Elsevier Urban & Fischer; 2014. 614 p. ger.
42. Traykova-Brauch M, Schonig K, Greiner O, Miloud T, Jauch A, Bode M, et al. An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nat Med*. 2008;14(9):979–84. doi: 10.1038/nm.1865. PubMed PMID: 18724376.
43. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992;89(12):5547–51. doi: 10.1073/pnas.89.12.5547.

44. Kistner A, Gossen M, Zimmermann F, Jerecic J, Ullmer C, Lubbert H, et al. Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996;93(20):10933–8. doi: 10.1073/pnas.93.20.10933.
45. Liu S, Hartleben B, Kretz O, Wiech T, Igarashi P, Mizushima N, et al. Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia-reperfusion injury. *Autophagy*. 2012;8(5):826–37. doi: 10.4161/auto.19419. PubMed PMID: 22617445.
46. Thornhill BA, Forbes MS, Marcinko ES, Chevalier RL. Glomerulotubular disconnection in neonatal mice after relief of partial ureteral obstruction. *Kidney Int*. 2007;72(9):1103–12. doi: 10.1038/sj.ki.5002512. PubMed PMID: 17728704.
47. Luttmann W. *Der Experimentator: Immunologie*. 3rd ed. Der Experimentator. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; 2009. 309 p. ger.
48. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7th ed. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2014. 1093 p. ger.
49. Mühlhardt C. *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. 6th ed. Experimentator. Heidelberg, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.; Springer; 2009. ger.
50. Stenvinkel P. Chronic kidney disease: a public health priority and harbinger of premature cardiovascular disease. *J Intern Med*. 2010;268(5):456–67. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02269.x. PubMed PMID: 20809922.
51. Zhang Q-L, Rothenbacher D. Prevalence of chronic kidney disease in population-based studies: systematic review. *BMC Public Health*. 2008;8:117. doi: 10.1186/1471-2458-8-117. PubMed PMID: 18405348.
52. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *ACC Current Journal Review*. 2004;13(12):13. doi: 10.1016/j.accreview.2004.11.016.
53. Buchtler S, Grill A, Hofmarksrichter S, Stöckert P, Schiechl-Brachner G, Rodriguez Gomez M, et al. Cellular Origin and Functional Relevance of Collagen I Production in the Kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(7):1859–73. doi: 10.1681/ASN.2018020138. PubMed PMID: 29777019.
54. Zore T, Palafox M, Reue K. Sex differences in obesity, lipid metabolism, and inflammation-A role for the sex chromosomes? *Mol Metab*. 2018. doi: 10.1016/j.molmet.2018.04.003. PubMed PMID: 29706320.
55. Kararigas G, Dworatzek E, Petrov G, Summer H, Schulze TM, Baczko I, et al. Sex-dependent regulation of fibrosis and inflammation in human left ventricular remodelling under pressure overload. *Eur J Heart Fail*. 2014;16(11):1160–7. doi: 10.1002/ejhf.171. PubMed PMID: 25287281.
56. Baylis C. Sexual dimorphism in the aging kidney: differences in the nitric oxide system. *Nat Rev Nephrol*. 2009;5(7):384–96. doi: 10.1038/nrneph.2009.90. PubMed PMID: 19488070.
57. Hauser P, Kainz A, Perco P, Bergmeister H, Mitterbauer C, Schwarz C, et al. Transcriptional response in the unaffected kidney after contralateral

- hydronephrosis or nephrectomy. *Kidney Int.* 2005;68(6):2497–507. doi: 10.1111/j.1523-1755.2005.00725.x. PubMed PMID: 16316326.
58. Eddy AA, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(8):1233–47. doi: 10.1007/s00467-011-1938-2. PubMed PMID: 21695449.
 59. Le Hir M, Hegyi I, Cueni-Loffing D, Loffing J, Kaissling B. Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys. *Histochem Cell Biol.* 2005;123(4-5):335–46. doi: 10.1007/s00418-005-0788-z. PubMed PMID: 15856273.
 60. Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC, et al. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int.* 1999;56(4):1455–67. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00656.x. PubMed PMID: 10504497.
 61. Faulkner JL, Szczykalski LM, Springer F, Barnes JL. Origin of Interstitial Fibroblasts in an Accelerated Model of Angiotensin II-Induced Renal Fibrosis. *Am J Pathol.* 2005;167(5):1193–205. doi: 10.1016/S0002-9440(10)61208-4.
 62. Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(2):212–22. doi: 10.1681/ASN.2008121226. PubMed PMID: 20019167.
 63. Bonventre JV. Primary proximal tubule injury leads to epithelial cell cycle arrest, fibrosis, vascular rarefaction, and glomerulosclerosis. *Kidney Int Suppl (2011).* 2014;4(1):39–44. doi: 10.1038/kisup.2014.8. PubMed PMID: 26310195.
 64. Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, et al. Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. *Kidney Int.* 2002;62(1):137–46. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00430.x. PubMed PMID: 12081572.
 65. Burns WC, Kantharidis P, Thomas MC. The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease. *Cells Tissues Organs (Print).* 2007;185(1-3):222–31. doi: 10.1159/000101323. PubMed PMID: 17587828.
 66. Huang S, Susztak K. Epithelial Plasticity versus EMT in Kidney Fibrosis. *Trends Mol Med.* 2016;22(1):4–6. doi: 10.1016/j.molmed.2015.11.009. PubMed PMID: 26700490.
 67. Liu Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2004;15(1):1–12. doi: 10.1097/01.ASN.0000106015.29070.E7.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit in professioneller sowie in persönlicher Hinsicht unterstützt haben.

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Matthias Mack danken. Er gab mir die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit und damit auch zum Erlernen der vielfältigen und interessanten Methoden. Seine Begeisterung für das Thema renale Fibrose war ansteckend und verlieh immer wieder neue Motivation. Zudem zeigte er stets großes Interesse an meiner Arbeit stand mir bei Problemen immer mit seiner enormen fachlichen Kompetenz zur Seite. Die Gespräche mit ihm zeigten oft neue Blickwinkel auf und lieferten bereichernde Denkanstöße.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei den Kollegen aus der „AG Mack“ Yvonne, Simone, Kathrin, Dagmar, Sophia, Stefanie und Nicole bedanken. Ihre Unterstützung hat das Gelingen dieser Arbeit erst möglich gemacht, da sie mir beim Erlernen neuer Methoden, Versuchsenden und bei sämtlichen Problemen im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Zudem Ganz besonders möchte ich natürlich Simone danken, die mich bei während meiner Arbeit betreut hat und in unzähligen Gesprächen immer ein offenes Ohr sowie eine kompetente Erklärung für mich hatte. Zudem hat sie viel Zeit investiert um mir die UUO beizubringen. Mein besonderer Dank geht auch an Sophia und Kathrin, die mir mit wirklich großer Geduld alle relevanten Methoden beigebracht haben und auf deren Hilfe ich während der ganzen Arbeit zählen konnte. Ohne ihre Hilfe wären die Versuchsenden gar nicht möglich und zudem viel langweiliger gewesen. Durch ihre kompetente Hilfe und da sie stets auch für mich mitdachten verhinderten sie viele Fehler und unterstützten mich großartig.

Insgesamt möchte ich mich für die schöne Zeit im Labor danken, alle haben mich herzlich aufgenommen und den Laboralltag mit lustigen Gesprächen und Erlebnissen versüßt, sodass ich immer noch gerne zu Besuch komme.

Außerdem gilt ein besonderer Dank meiner Familie, auf die ich immer zählen kann und die mich stets in allem unterstützt.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Petra Diana Stöckert