

**Die Rolle des Transkriptionsfaktors  
NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen für die  
Expression profibrotischer und  
proinflammatorischer Gene in der  
gesunden und in der fibrotischen Niere**



**DISSERTATION**  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MEDIZIN (DR. MED.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vorgelegt von  
Marina Julia Vöckl aus Vilshofen  
Im Jahr 2023



**Die Rolle des Transkriptionsfaktors  
NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen für die  
Expression profibrotischer und  
proinflammatorischer Gene in der  
gesunden und in der fibrotischen Niere**



**DISSERTATION**  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MEDIZIN (DR. MED.)  
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Vorgelegt von  
Marina Julia Vöckl aus Vilshofen  
Im Jahr 2023

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Oktober 2020 bis Juli 2023 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 09.08.2023

Die Arbeit wurde angeleitet von: Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner

Prüfungskommission:

Vorsitzende:	Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner
1. Prüfer:	Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner
2. Prüfer:	Herr Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Fuchshofer

Unterschrift: \_\_\_\_\_

(Marina Vöckl)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Aufbau und Funktionen der Niere .....	5
1.2 Osmolaritätsgradient und Osmoprotektion .....	7
1.3 Die NFAT – Familie .....	9
1.3.1 Struktur und Funktionen von NFAT5 .....	11
1.3.2 Rolle von NFAT5 in der Niere.....	13
1.3.3 Bedeutung von NFAT5 für die Nierenentwicklung .....	14
1.4 Nierenfibrose .....	15
1.5 Schädigungsmarker LCN2.....	19
1.5.1 Allgemeine Informationen zum Schädigungsmarker LCN2 .....	19
1.5.2 LCN2 – Lokalisation in der Niere .....	23
1.5.3 Befunde zur Funktion von LCN2 in der Niere .....	24
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	27
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1 Material.....	28
2.1.1 Geräte .....	28
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits.....	30
2.1.4 Primer .....	32
2.1.5 Antikörper .....	33
2.1.6 Sonden für in-situ Hybridisierung .....	34
2.1.7 Puffer und Lösungen .....	34
2.1.8 Software und Internetdienste.....	36
2.2 Methoden.....	37
2.2.1 Versuchstiere .....	37
2.2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten.....	38
2.2.3 Färbetechniken.....	39
2.2.4 Mikroskopie .....	44

2.2.5	Messung der Genexpression in Wildtyp- und NFAT5-Knockout-Nieren.....	45
2.2.6	Statistische Analysen .....	48
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
3.1	Expression von NFAT5 im FoxD1-Kompartiment der Niere .....	49
3.2	Auswirkungen der Deletion von NFAT5 im Stromakompartiment auf die Nierenentwicklung .....	50
3.3	Bedeutung der NFAT5 Deletion für die Expression profibrotischer und proinflammatorischer Gene in basalen Wildtyp- und Knockout-Mäusen.....	52
3.4	Bedeutung der NFAT5 Deletion für die Entwicklung von Myofibroblasten in basalen Wildtyp- und Knockout-Mäusen .....	65
3.5	Expression des Schädigungsmarkers LCN2.....	69
3.6	Zellspezifische Zuordnung der Expression von LCN2 .....	71
3.7	Die Rolle von NFAT5 für die Progression einer Nierenfibrose .....	81
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>89</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>103</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	103
7.2	Abkürzungsverzeichnis .....	109
7.3	Eidesstattliche Erklärung .....	114
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>115</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktionen der Niere

Die Niere (lat.: Ren, altgr.: Nephros) übernimmt einige der elementarsten Funktionen im Körper und ist für einen funktionierenden Organismus und die Homöostase unerlässlich.

An erster Stelle steht dabei die Eliminierung harnpflichtiger und toxischer Substanzen sowie die Regulation des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts.

Des Weiteren nehmen die Nieren über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) einen wichtigen Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks und des Blutvolumens.

Für die Ausscheidung der harnpflichtigen Substanzen mit dem Urin wird in den Glomeruli pro Tag 180 l des sog. Primärharns aus dem Blutplasma abfiltriert. In dem sich anschließenden Tubulus- und Sammelrohrsystem, welche zusammen das harnleitende System eines jeden der ca. 1-1,5 Mio. Nephrone bilden, wird dieser Primärharn in seiner Zusammensetzung derart verändert, dass sich die Urinausscheidung auf ein- bis zwei Liter pro Tag beläuft. (vgl. Huppelsberg and Walter, 2013, pp. 169–170).

Makroskopisch wird die Niere in Rinde (Cortex), äußeres und inneres Mark (Medulla) unterteilt.

Mikroskopisch besteht eine Niere aus ca. 1-1,5 Mio. Nephrone, welche die kleinsten funktionellen Einheiten der Niere darstellen.

Da für die Filtration und die nachfolgende Harnkonzentrierung sowie die Osmoprotektion der Aufbau eines Nephrons von entscheidender Bedeutung ist, soll dieser im Folgenden erläutert werden.

Das Blut gelangt über die Arteria renalis und einem nachgeschalteten Verzweigungssystem zu den zuführenden Arteriolen, den Vasa afferentes, der Niere. Diese kleinsten Gefäße gehen schließlich in gewundene Gefäßknäuel, die Glomeruli, über. In diesen wird aus dem Blutplasma der Primärharn abgefiltert. Über die abführenden Arteriolen, die Vasa efferentes, fließt das Blut aus den Glomeruli in die Vasa recta ab (vgl. Behrends et al., 2016, pp. 295–298).

Die Bowman-Kapsel, welche den filtrierte Primärharn aufnimmt, geht schließlich in den proximalen Tubulus über, in dem bereits ein Großteil der Rückresorption stattfindet (vgl. Huppelsberg and Walter, 2013, pp. 18, 169).

Der proximale Tubulus bildet in der Nierenrinde zunächst ein Konvolut, weshalb dieser Abschnitt auch als Pars convoluta bezeichnet wird, und zieht dann als gerader Teil von der Nierenrinde ins Nierenmark, den man als Pars recta bezeichnet. Dieser gerade verlaufende Teil des proximalen Tubulus stellt den Ursprung einer U-förmigen („haarnadelförmigen“) Tubulusschleife, der sog. Henle-Schleife dar (vgl. Behrends et al., 2016, p. 304).

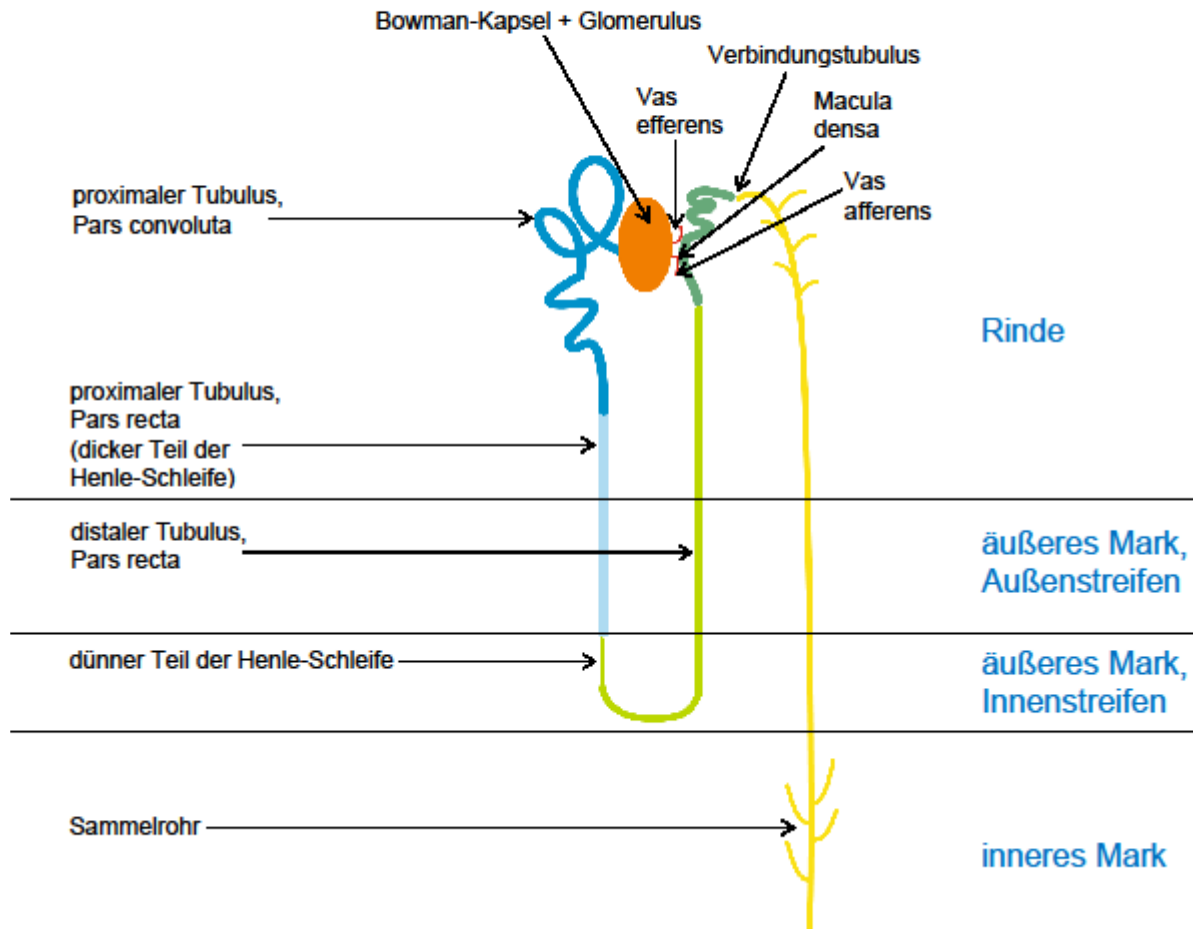
Der proximale Tubulus geht in den sog. dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleife über. Dieser dünne absteigende Teil der Henle-Schleife zieht vom Nierenmark als dünner aufsteigender Teil der Henle-Schleife sowie sich daran anschließend als dicker aufsteigender Teil der Henle-Schleife in die Nierenrinde zurück (vgl. Huppelsberg and Walter, 2013, p. 169).

Der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife, welcher bereits zum distalen Tubulus gezählt (vgl. Ackermann, 2012, p. 355) und auch als Pars recta bezeichnet wird, läuft anschließend zu seinem jeweiligen Ursprungsglomerulus in der Nierenrinde zurück, welchen er berührt und dabei die sog. Macula densa bildet (vgl. Klinke et al., 2009, p. 338).

Der distale Tubulus setzt sich dann im distalen Konvolut, der sog. Pars convoluta, fort. Der Verbindungstubulus schließlich verbindet das Nephron und das Sammelrohrsystem miteinander (vgl. Behrends et al., 2016, p. 304).

Das Sammelrohr, in dem mehrere Nephrone münden und welches von der Nierenrinde in Richtung Papillenspitze zieht, geht an der Nierenpapille schließlich in das Nierenbecken über.





**Abbildung 1:** Nephron und Sammelrohrsystem

(Quelle: Abb. nach: Behrends, Bischofberger, Deutzmann, Ehmke, Frings, Grissmer, Hoth, Kurtz, Leipziger, Müller, Pedain, Rettig, Wagner, Wischmeyer. Duale Reihe Physiologie. Thieme, 2016, S. 305)

## 1.2 Osmolaritätsgradient und Osmoprotektion

Für den Aufbau eines osmotischen Konzentrationsgradienten in der Niere sind im Wesentlichen vier Faktoren entscheidend. Eine wichtige Rolle spielt das Gegenstromprinzip des Harnflusses durch die haarnadelartige Anordnung der Henle-Schleife. Dadurch können umso mehr Osmolyte im Nierenmark angereichert werden, je länger die Schleife ist. Ebenso findet sich dieses Gegenstromsystem in Bezug auf den Blutfluss durch das Nierenmark. Durch die ebenfalls haarnadelförmige Anordnung der Vasa recta mit entgegengesetzter Fließrichtung in Nierenmark und Papille wird

sichergestellt, dass Osmolyte (NaCl und Harnstoff) nicht ausgewaschen werden und im Interstitium verbleiben.

Des Weiteren spielt die Zirkulation des Harnstoffs zwischen dem dünnen aufsteigendem Teil der Henle-Schleife und dem papillärem Sammelrohr über spezielle Harnstofftransportsysteme, welche wiederum über ADH in die Zellen des medullären Sammelrohrs eingebaut werden können, eine wichtige Rolle für den Aufbau des Osmolaritätsgradienten (vgl. Behrends et al., 2016, p. 317). Bevor der Harnstoff, als Stoffwechselendprodukt, über die Nieren endgültig ausgeschieden wird, trägt er, neben NaCl, zu ca. 50% zur Aufrechterhaltung der Hyperosmolarität im Interstitium bei (vgl. Huppelsberg and Walter, 2013, pp. 176, 177).

Der letzte Faktor, der für den Aufbau des Osmolaritätsgradienten wichtig ist, ist die Salzresorption. Im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife kann kein Wasser rückresorbiert werden, jedoch ist eine Resorption von NaCl aus dem Tubuluslumen möglich. Über den  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC2) werden Ionen aus dem Tubuluslumen in das Interstitium befördert und sichern somit im umliegenden Interstitium eine hohe Osmolarität (vgl. Huppelsberg and Walter, 2013, pp. 169, 177). Mit Hilfe dieses Osmolaritätsgradienten kann der Blutfluss schematisch wie folgt skizziert werden: Harn tritt mit 290 mosmol/l aus dem proximalen Tubulus in den dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleife ein, der haarnadelförmig durch das Interstitium zieht. Da der dünne absteigende Teil der Henle-Schleife nur für Wasser durchlässig ist, nimmt die Konzentration des Harns, welcher im Tubulussystem verbleibt, zu.

Der konzentrierte Harn gelangt dann in den dicken, aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, welcher undurchlässig für Wasser, aber permeabel für NaCl ist. In diesem aufsteigenden Teil werden NaCl und Ionen mit Hilfe des dort lokalisierten  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$  - Cotransporters aus dem Tubuluslumen in das Interstitium verlagert, ohne dass Wasser folgen kann. Infolgedessen nimmt die Osmolarität im Tubuluslumen ab, wohingegen die Osmolarität im Interstitium ansteigt. Durch diesen Gegenstrommechanismus kann in der Nähe der Papille eine Osmolarität von bis zu 1300 mosmol/l erzeugt werden (vgl. Behrends et al., 2016, p. 305; Brandes et al., 2019, p. 412; Huppelsberg and Walter, 2013, pp. 177, 178).

Die hohe Osmolarität im renalen Interstitium, insbesondere in der Papille, erfordert eine Anpassung renaler Zellen, um sich vor Wasserentzug und somit vor einem Funktionsverlust bzw. vor Apoptose schützen zu können.

Schwankungen in den Natrium- und Harnstoffkonzentrationen können die Struktur und die Funktion der Nierenzellen stark beeinflussen (Casali et al., 2018).

Somit stellen die hohen NaCl-Konzentrationen, die zu einer Beeinflussung des Zytoskeletts (Di Ciano et al., 2002), zu DNA-Doppelstrangbrüchen sowie zu einer Beeinträchtigung der DNA-Reparatur (Dmitrieva et al., 2004) und zu einer Vermehrung reaktiver Sauerstoffspezies (Zhang et al., 2004) führen können, eine Herausforderung für diese Zellen dar. Die Niere verfügt dazu über osmoprotektive Maßnahmen.

### 1.3 Die NFAT – Familie

Die NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-Familie ist eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, welche aus vier Calcium-regulierten Isoformen (NFAT1-4) besteht. Diese wurden als erstes in T-Lymphozyten, welche die Expression von Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-2-Rezeptoren fördern, beschrieben. NFAT3 stellt dabei allerdings eine Ausnahme dar, da dieser nicht in den T-Zellen exprimiert wird (Lee et al., 2018). Auch NFAT5, welcher als tonicity-responsive enhancer-binding protein (TonEBP) bezeichnet wird, unterscheidet sich von den anderen Transkriptionsfaktoren, da er nicht auf Calcium reagiert, sondern bei osmotischem Stress in den Zellkern translozieren und osmoprotektive Faktoren fördern kann (Mognol et al., 2016).

*Tabelle 1 NFAT-Familie der Transkriptionsfaktoren*

*NFAT, nuclear factor of activated T-cells; TonEBP, tonicity-responsive enhancer-binding protein*

<b>NFAT</b>	<b>Regulation durch</b>
NFAT1	Calcium – Calcineurin
NFAT2	Calcium – Calcineurin
NFAT3	Calcium – Calcineurin
NFAT4	Calcium – Calcineurin
NFAT5	TonEBP und OREBP

*(Tabelle 1 frei modifiziert nach „Table 1 NFAT family of transcription factors (nature.com)“)*

Neben der zentralen Rolle in der T-Zell-Aktivierung, wo sie die Genexpression während der Zellaktivierung und -differenzierung kontrollieren, werden die NFAT-Proteine auch in vielen Zellen und Geweben exprimiert und regulieren Gene, die im Zellzyklus, an der Apoptose, der Angiogenese und der Metastasierung beteiligt sind (Mognol et al., 2016).

Des Weiteren haben die NFAT-Proteine eine schwache DNA-Bindungs­kapazität und kooperieren häufig mit anderen Transkriptionsfaktoren. Bei Krebs wird die Expression von Faktoren des NFAT-Signalwegs gehemmt (Mognol et al., 2016).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NFAT auch in der Modulierung der Immunantwort eine wichtige Rolle spielt, indem er zahlreiche Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren in Immunzellen reguliert (Vaeth and Feske, 2018).

NFAT-Proteine werden sowohl innerhalb des Immunsystems in B-Zellen, Mastzellen, Natural-Killer-Zellen (Lyakh et al., 1997) als auch in Nicht-Immunzellen, wie Knorpelzellen, Adipozyten, Pankreas-, Brust- und Herzzellen exprimiert (Mognol et al., 2016).

Mitglieder der NFAT-Familie nehmen auch Einfluss auf die Embryogenese und die Differenzierung des Nierensystems (Yi et al., 2010), die kardiovaskuläre und die Skelettmuskelentwicklung (Alfieri et al., 2007; Schulz and Yutzey, 2003) und beeinflussen das Nervensystem, indem sie am Axonwachstum, in der neuronalen Plastizität und am Überleben neuronaler Zellen, involviert sind (Lyakh et al., 1997; Vihma et al., 2016).

Des Weiteren konnte dargestellt werden, dass hohe extrazelluläre Glucosekonzentrationen den NFAT in zerebralen Arterien, der Aorta und im Endothel retinaler Mikrogefäße aktivieren und NFAT somit vermutlich an der Entstehung der diabetischen Retinopathie beteiligt ist (Zetterqvist et al., 2015).

Neuere Studien zeigen zudem den Einfluss der NFAT-Signalwege bei Autoimmunerkrankungen. So spielt NFAT bei der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis, bei der NFAT in hohem Niveau in der Synovia exprimiert wird und beim systemischen Lupus erythematodes, bei dem die NFAT-Achse in den T- und B-Zellen abnorm aktiviert wird, eine entscheidende Rolle (Park et al., 2020). Außerdem nimmt NFAT einen Einfluss bei der chronisch-inflammatorischen Hauterkrankung Psoriasis und bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, bei der es zu einer fehlerhaften Aktivierung des NFAT kommt (Park et al., 2020).

Angesichts der wichtigen Rolle des NFAT-Signalwegs in der T-Zell-Funktion, gilt NFAT seit langem als attraktiver Therapieansatz zur Kontrolle von Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungen (Lee et al., 2018).

Mittlerweile ist die Inhibition des  $\text{Ca}^{2+}$ -Calcineurin-NFAT-Signalwegs mittels Cyclosporin A und Tacrolimus eine etablierte Behandlungsoption bei der rheumatoiden Arthritis, bei der Lupusnephritis, als Komplikation des systemischen Lupus

erythematodes und bei der Psoriasis, wenn die Patienten unzureichend auf das Zytostatikum Methotrexat ansprechen (Park et al., 2020).

### 1.3.1 Struktur und Funktionen von NFAT5

NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells type 5), in der Literatur auch als TonEBP (tonicity-responsive enhancer-binding protein) oder OREBP (osmotic response element-binding protein) bezeichnet, ist ein Mitglied der NFAT/Rel-Familie der Transkriptionsfaktoren und stellt einen wichtigen osmoprotektiven Faktor in der Niere dar.

Daneben zeigt sich, dass NFAT5 eine zentrale Rolle in der Regulierung des Blutdrucks und in der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis, des Diabetes mellitus Typ 1 oder der Multiplen Sklerose, spielt (Cheung and Ko, 2013; N. Lee et al., 2019). Des Weiteren ist NFAT5 auch mit verschiedenen Tumoren, wie Brustkrebs, hepatozellulärem Karzinom, Lungenkrebs, Kolonkarzinom, Nierenzellkarzinom und Melanom assoziiert (Amara et al., 2016; Guo and Jin, 2015; J. H. Lee et al., 2019; N. Lee et al., 2019).

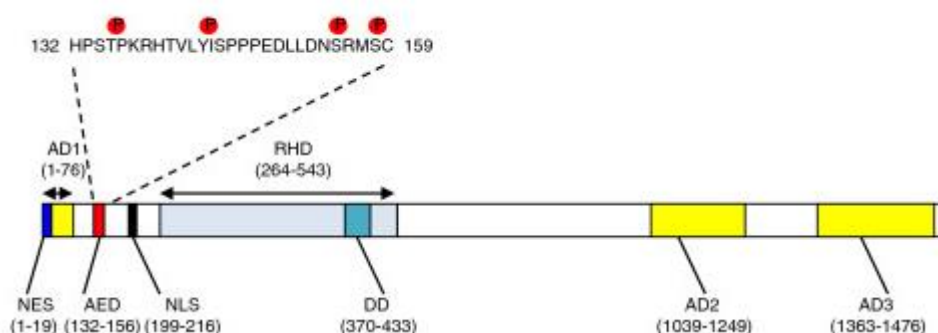
Neuere Studien beschreiben zudem eine protektive Rolle von NFAT5 bei Hypoxie bzw. die Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) bei Sauerstoffmangel.

Es ist naheliegend, dass NFAT5 die Apoptose, welche durch Hypoxie induziert wird, verhindert (Serman et al., 2019).

Das humane NFAT5-Gen ist auf dem Chromosom 16q22.1 lokalisiert, das Homolog der Maus wurde auf dem Chromosom 8D gefunden (N. Lee et al., 2019).

Im Moment sind vier menschliche Isoformen (Isoformen a bis d) des NFAT5 bekannt. Die DNA-Bindungsdomäne von NFAT5 weist Sequenzhomologie zur Rel-Homologiedomäne auf, weshalb alle NFAT-Proteine und NF-kappaB zur Rel-Familie gezählt werden. Im Gegensatz zu NFAT1-4, die als Monomer vorliegen, liegt NFAT5 als konstitutives Dimer vor. Diese Dimerisierung ist essenziell für die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität. Ein weiterer Aspekt, der den NFAT5 von den Isoformen der NFAT-Familie unterscheidet, ist das Fehlen der Calcineurin-Bindungsdomäne und das Fehlen der strukturellen Domäne für die Formierung kooperativer Komplexe mit Fos und Jun.

Im Hinblick auf die Struktur von NFAT5 ist zu erwähnen, dass der Transkriptionsfaktor nukleäre Exportsignale (NES, Aminosäuren 1-19), ein zweiteiliges Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal, NLS, Aminosäuren 199-216), eine auxiliäre Exportdomäne (AED, Aminosäuren 132-156), eine Dimerisierungsdomäne (DD, Aminosäuren 370-433) in der Rel-Homologiedomäne (RHD) und Transaktivierungsdomänen (AD) am N- (AD1, Aminosäuren 1-76) und am C-terminalen-Ende (AD2, Aminosäuren 1039-1249 und AD3, Aminosäuren 1363-1476) aufweist (Cheung and Ko, 2013; López-Rodríguez et al., 2001; Tong et al., 2006).



**Abbildung 2:** Gesamtstruktur des humanen NFAT5-Proteins

(Quelle frei modifiziert nach: PubMed Central, Figure 2: J Mol Signal. 2013; 8: 5. Published online 2013 Apr 23. doi: 10.1186/1750-2187-8-5 (nih.gov))

Der nukleäre Import von OREBP/TonEBP geschieht somit über das Kernlokalisierungssignal (nuclear localization signal), wohingegen, unter isotonen Bedingungen, der nukleäre Export über eine CRM1- (chromosomal region maintenance 1, Exportin 1 (XPO1)) abhängige, Leucin-reiche nukleäre Exportsequenz (NES), welche im N-Terminus gelegen ist, reguliert wird (Tong et al., 2006).

Das NFAT5-Transkript wird in verschiedenen menschlichen Geweben, wie Niere, Gehirn, Herz, Thymus, Lunge und Skelettmuskel exprimiert (N. Lee et al., 2019).

NFAT5 wird bi-direktional reguliert: Hochregulation bei Hypertonizität und Runterregulation bei Hypotonizität. Somit spielt, im Hinblick auf den Aktivierungsmechanismus von NFAT5, die Hypertonizität die entscheidende Rolle (Lee et al., 2002). Wenn Zellen einem hypertonen Medium ausgesetzt sind, wird NFAT5 in den Nukleus transloziert, wo er an Zielgene bindet und die Aktivität der Transaktivierungsdomäne vergrößert (Serman et al., 2019). Unter hyperosmolarem

Stress kann NFAT5 an seinen 216 Serin, 15 Thyrosin oder 111 Threoninresten phosphoryliert werden. Über verschiedene Methoden konnte bereits herausgefunden werden, dass die Phosphorylierung von NFAT5 an Tyrosin 143, Threonin 135, Serin 155 und 158 stattfinden kann und diese somit eine entscheidende Rolle in der Regulation der NFAT5-Aktivität spielen (Burg et al., 2007; Zhou, 2016).

In der Literatur wird zudem kontrovers darüber diskutiert, ob Nucleoporin 88 (Nup88), Komponente des Kernporenkomplexes in der nukleären Membran, eine Rolle in der Aktivierung von NFAT5 spielt (Cheung and Ko, 2013). So berichtet eine Studie darüber, dass das Protein Nup88 in den Sammelrohrzellen der inneren Medulla hochreguliert wird, damit NFAT5 bei hypertonem Stress in den Zellkern verlagert werden kann (Andres-Hernando et al., 2008).

Andere Berichte schreiben jedoch, dass Nucleoporin 88 keine Rolle in der Aktivierung von NFAT5 spielt (Cheung and Ko, 2013; Izumi et al., 2012).

### 1.3.2 Rolle von NFAT5 in der Niere

NFAT5 ist ein wichtiger osmoprotektiver Faktor in der Niere. Um die Harnkonzentrierung zu gewährleisten ist in der Niere ein Osmolaritätsgradient aufgebaut, der, wie im Kapitel 1.2 bereits erwähnt, an der Nierenrinde ca. 290 mosmol/l und an der Papillenspitze bis zu 1300 mosmol/l betragen kann und der insbesondere die Zellen des Nierenmarks vor besondere Herausforderungen stellt.

Damit diese Zellen den hypertonen Bedingungen dennoch standhalten können und wieder ein Gleichgewichtszustand hergestellt werden kann, werden die intrazellulären Elektrolyte schrittweise durch ungeladene, kleine organische Osmolyte ersetzt (Cheung and Ko, 2013).

Dabei fördert NFAT5 die Transkription verschiedener Gene, wie die Aldose-Reduktase (AR), Betain-Transporter (BGT1), Natrium-Myoinositol-Cotransporter (SMIT) und Natrium/Chlorid-abhängige Taurin-Transporter (TAUT). Außerdem ist NFAT5 mitverantwortlich für die hypertone Induktion des osmotic stress protein 94 (Osp94) und des Hitzeschockproteins HSP70, welches als molekulares Chaperon für das Überleben der Zellen unter hypertonem Stress essenziell ist. Die Expression dieser Zielgene führt anschließend zu einer Akkumulation der organischen Osmolyte Sorbitol, Myoinositol, Betain, Taurin und Glycerophosphocholin, die der Zelle bei der

Kompensation des extrazellulären osmotischen Gradienten helfen und sie an den hypertonen Stress anpassen (Andres-Hernando et al., 2008; Cheung and Ko, 2013). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Anstieg der Osmolyte den osmotischen Druck an der Zellwand vermindert und die Zellen vor hypertone Stress schützt.

Des Weiteren reguliert NFAT5 die Expression der Harnstofftransporter (urea transporter, UT-A), der Aquaporin-1-Kanäle (AQP-1) und der Aquaporin-2-Kanäle (AQP-2) (Cheung and Ko, 2013; Lee et al., 2006).

Somit ist NFAT5 ein bedeutender Regulator der Urinkonzentration, da er die Transkription von Aquaporin-2 direkt stimuliert und dies zur Wasserpermeabilität des Sammelrohrs führt, unabhängig des Neurohypophysenhormons Vasopressin. Über die Stimulierung der Harnstofftransporter (UT-A1 und UT-A3) wird die Harnstoffpermeabilität im medullärem Sammelrohr sichergestellt (Lee et al., 2006).

Die Nieren-spezifischen CIC-K1 Chlorid-Kanäle und deren funktionelle Untereinheit Barttin werden ebenfalls durch NFAT5 reguliert (Küper et al., 2015).

Darüber hinaus reguliert NFAT5 die Expression des Nieren-spezifischen Ubiquitin-Ligase-Gens RNF183 unter hypertonen Bedingungen in medullären Sammelrohrzellen hoch. Dies deutet darauf hin, dass RNF183 überwiegend im normalen Nierenmark exprimiert wird, wobei NFAT5 die transkriptionelle Aktivität von RNF183 stimuliert und RNF183 somit renale, medulläre Zellen vor einer Hypertonizität-induzierten Apoptose schützt (Maeoka et al., 2018).

### 1.3.3 Bedeutung von NFAT5 für die Nierenentwicklung

NFAT5 spielt eine wichtige Rolle in der renalen Entwicklung. Globale NFAT5-Knockout-Mäuse weisen aufgrund ihrer beeinträchtigten Nieren- und Herzentwicklung eine hohe perinatale Letalität auf (Küper et al., 2015). Homozygote NFAT5 Null (NFAT5<sup>-/-</sup>)-Mäuseembryonen entwickeln sich nicht normal und sterben bereits am Tag 14,5 der embryonalen Entwicklung (E14.5) (Mak et al., 2011). NFAT5 Null (NFAT5<sup>-/-</sup>)-Mäuseembryonen weisen periphere Ödeme und eine abnormale Nieren- und Herzentwicklung auf (Mak et al., 2011).

Der Großteil der geborenen NFAT5 Null-Mäuse sterben allerdings um den postnatalen Tag 10, während nur 3,4% der erwarteten Anzahl nach dem postnatalen Tag 21 noch lebt (López-Rodríguez et al., 2004).



Die überlebenden NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen zum Zeitpunkt der Geburt keine offensichtlichen Abnormitäten, jedoch weisen die Mäuse, die bis ins Erwachsenenalter überleben, eine Gedeihstörung auf und ihr Gewicht beträgt ungefähr die Hälfte der Wildtyp-Wurfgeschwister (López-Rodríguez et al., 2004).

NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse weisen neben einem zunehmenden Wachstumsrückstand auch eine beeinträchtigte Immunantwort (Küper et al., 2015) auf. Im Hinblick auf die Nierendefekte zeigen diese NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse eine fortschreitende und tiefgreifende Atrophie der Nierenmedulla einhergehend mit einer beeinträchtigten Nierenfunktion, wie einer gestörten Aktivierung von osmoprotektiven Genen (López-Rodríguez et al., 2004). So weisen drei Wochen alte NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Nierenhypoplasie und eine veränderte Morphologie der Nierenmedulla auf. Während bei normalen Nieren der Außen- und Innenstreifen der Medulla deutlich voneinander abgegrenzt ist, ist diese Abgrenzung bei NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäusen, die zudem eine höhere Zelldichte aufweisen, nicht genau definiert (López-Rodríguez et al., 2004). Des Weiteren ist die normale Architektur der äußeren Medulla der NFAT5<sup>-/-</sup>-Nieren gestört. Zudem zeigen die Nieren der NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse ein Fehlen der kompletten Papille und eine Vergrößerung des Nierenbeckens. Weiterhin existiert in den Mutanten-Mäusen im Innenstreifen der äußeren Medulla keine klare Abgrenzung zwischen den Gefäßbündeln, den umgebenden Henle-Schleifen und den Sammelrohren (López-Rodríguez et al., 2004).

#### **1.4 Nierenfibrose**

Eine Fibrose ist definiert als übermäßiges Wachstum, Verhärtung und/oder Vernarbung von verschiedenen Geweben. Zurückzuführen ist dies auf eine übermäßige Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten einschließlich Kollagen. Eine Fibrose stellt dabei das Endresultat einer chronisch-inflammatorischen Reaktion dar, welche durch verschiedene Stimuli einschließlich persistierender Infektionen, Autoimmunreaktionen, allergischen Reaktionen, chemischen Schäden, Strahlung und Gewebeverletzungen, induziert wurde. Eine Fibrose entsteht typischerweise aus einer chronischen Inflammation, die als Immunantwort seit mehreren Monaten besteht und in welcher Entzündung, Gewebeveränderungen und Reparaturprozesse zeitgleich auftreten (Wynn, 2008).

Ein wichtiger zellulärer Mediator der Fibrose sind die Myofibroblasten, die, wenn sie aktiviert werden, als vorrangige Kollagen produzierende Zellen dienen. Myofibroblasten werden aus verschiedensten Quellen, wie residenten mesenchymalen Zellen, epithelialen und endothelialen Zellen und Bindegewebszellen erzeugt und durch eine Vielzahl von Mechanismen, wie parakrinen Signalen, autokrinen Faktoren und Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPS, pathogen-associated molecular patterns) aktiviert. Als bedeutende Regulatoren der Fibrose wurden Zytokine (IL-13, IL-21, TGF- $\beta$ 1), Chemokine (MCP-1, MIP-1 $\beta$ ), Angiogenesefaktoren (VEGF), Wachstumsfaktoren (PDGF), Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs), Akute-Phase-Proteine (SAP), Caspasen und Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (ANG II) identifiziert. Diese Regulatoren werden auch als potentielle Ziele von antifibrotischen Medikamenten untersucht (Wynn, 2008).

Im nachfolgenden Abschnitt wird speziell auf die Nierenfibrose, welche einen zuverlässigen Indikator für die Prognose und einen entscheidenden Bestimmungsfaktor für die Niereninsuffizienz darstellt, eingegangen. Die Nierenfibrose, insbesondere die tubulointerstitielle Fibrose, ist gemeinsames Endergebnis meist aller progredienter chronischer Nierenerkrankungen (Liu, 2011).

Die chronische Nierenerkrankung wird dabei über die Nierenfunktion definiert (siehe Tabelle 2: GFR-Stadien der chronischen Nierenerkrankung).

*Tabelle 2 GFR-Stadien der chronischen Nierenerkrankung*

<b>GFR-Stadium</b>	<b>GFR (ml/min/1.73m<sup>2</sup>)</b>	<b>Bezeichnung</b>
G1	≥ 90	Normal oder hoch*
G2	60-89	Leichtgradig eingeschränkt*
G3a	45-59	Leicht- bis mäßiggradig eingeschränkt
G3b	30-44	Mäßig- bis hochgradig eingeschränkt
G4	15-29	Hochgradig eingeschränkt
G5	<15	Terminale Niereninsuffizienz

\* im Vergleich zu Jungerwachsenen, GFR, glomeruläre Filtrationsrate, Cave: in Abwesenheit von Anhaltspunkten für Nierenschaden, entsprechen GFR-Stadien G1 und G2 nicht der Definition für das Vorliegen einer Nierenerkrankung

(Quelle: 053-048I\_S3\_Versorgung-von-Patienten-mit-nicht-dialysepflichtiger-Niereninsuffizienz\_\_2020-01.pdf (awmf.org))

Der Begriff der chronischen Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD) bezieht sich sowohl auf die Nierenfunktion als auch auf Abweichungen der Struktur oder Funktion der Nieren (eGFR und neuerdings: Albuminurie), welche mindestens drei Monate andauern und die Gesundheit des Patienten beeinflussen.

Die chronische Nierenerkrankung (CKD-Stadien 3-5), die in der deutschen Bevölkerung über 18 Jahren und vergleichbaren Industriestaaten eine geschätzte Prävalenz von bis ca. 10% hat, weist bei Frauen eine höhere Prävalenz als bei Männern auf (Weckmann et al., 2019).

Zur Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung (chronic kidney disease, CKD) tragen neben Infektionen auch Xenobiotika, Toxine, mechanische Obstruktionen, Immunkomplexe, die von Autoimmunerkrankungen oder chronischen Infektionen resultieren, und Erbkrankheiten bei. Die häufigsten Ursachen der CKD in entwickelten Ländern, sind jedoch Diabetes mellitus Typ 2 und die ischämische/hypertensive Nephropathie. Die CKD ist durch die Ablagerung von pathologischer fibrillärer Matrix in den Raum zwischen Tubuli und peritubulären Kapillaren charakterisiert. Diese pathologische Matrix enthält neben fibrillärem Kollagen I und III auch Bestandteile der normalen Basalmembran wie Kollagen IV und V, Fibronectin, Laminin, Perlecan und Heparan. Wenn die chronische Nierenerkrankung voranschreitet, dehnt sich die fibrotische Matrix aus und die Nephrone sowie ihre versorgenden Kapillaren gehen verloren. Die Konsequenzen, die sich daraus ergeben, sind ein vermindertes Nierenvolumen und eine abnehmende Durchblutung (Duffield, 2014).

Des Weiteren führt die überproportionale Ablagerung von Kollagen, neben der Aufdehnung der intratubulären Zwischenräume, auch zu einer Zerstörung der renalen Mikroarchitektur. Ein weiteres daraus resultierendes Problem stellt die Ausdünnung von peritubulären Kapillaren dar, was zu einer tubulärzellulären Hypoxie führt. Die Hypoxie wiederum kann profibrotische Mechanismen fördern, wodurch ein Circulus vitiosus resultiert, der wahrscheinlich zur Automatisierung der Fibroseentwicklung beiträgt (Schmitt, 2012).

Diese fibrotischen Veränderungen können zum einen im Glomerulus auftreten, was als Glomerulosklerose bezeichnet wird. Zum anderen können auch Arteriolen von der Fibrose betroffen sein, was man Arteriosklerose nennt. Dabei kommt es zum Verlust der Autoregulation des Blutflusses und letztendlich zu einer verminderten Perfusion. Neuere Belege aus Tiermodellen mit Nierenerkrankungen zeigen, dass Fibrose und

Fibrogenese als wesentlicher Verstärker für die Progression einer chronischen Nierenerkrankung gelten. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass Perizyten/perivaskuläre Zellen der peritubulären Nierenkapillaren bei einer CKD zu Matrix-bildenden Zellen werden (Duffield, 2014).

Die Fibrogenese bezeichnet eine Ablagerung pathologischer Matrix durch Zellen. Jedoch lassen neue Studien vermuten, dass der chronische, fibrogene, zelluläre Prozess selbst schädlich für das Nephron und das umgebende Gefäßsystem ist, unabhängig von der Ablagerung pathologischer Matrix. Bei CKD tauchen Myofibroblasten im Interstitium, im Mesangium, um Arteriolen und erkrankte Glomeruli auf (Duffield, 2014).

Ungeachtet der Ursachen handelt es sich bei der Nierenfibrogenese um einen dynamischen und konvergierenden Prozess, der aus vier überlappenden Phasen besteht: Priming, Activation, Execution und Progression. In der ersten, sog. Priming-Phase, kommt es nach einer erlittenen Schädigung zu einer Inflammation, die einen wesentlichen Bestandteil der Wirtsabwehr darstellt. Jedoch bildet die chronische Entzündung die größte Antriebskraft in der Entwicklung fibrotischer Erkrankungen.

Die Inflammation löst dabei die Fibrogenese aus und triggert die Aktivierung und Ausdehnung der Matrix-produzierenden Zellen, wie der interstitiellen Fibroblasten und Perizyten, der tubulären epithelialen und endothelialen Zellen und der Fibrozyten. Diese Matrix-produzierenden Zellen stellen einen mehrkomponentigen Integrin-assoziierten Proteinkomplex zusammen, der verschiedene fibrogenetische Signale integriert und die Produktion der Matrix-Komponenten sowie deren extrazelluläre Anordnung organisiert (Liu, 2011).

Multiple zelluläre und molekulare Ereignisse, wie eine tubuläre Atrophie, mikrovaskuläre Rarefizierungen und Gewebhypoxie fördern die Narbenbildung und sorgen für eine krankhafte Progression bis hin zum Nierenversagen im Endstadium (Liu, 2011).

Zum jetzigen Zeitpunkt existiert keine antifibrotische Therapie zur Behandlung einer Nierenfibrose, jedoch gibt es in der Forschung vereinzelt Behandlungsansätze.

So konnte in einer Studie demonstriert werden, dass das körpereigene Bone morphogenic protein-7, kurz BMP7, welches ein Mitglied der Transforming-growth factor(TGF)- $\beta$  Superfamilie ist, nierenschützende Eigenschaften und anti-fibrotische Effekte in verschiedenen Modellen für Nierenerkrankungen aufweist (Sugimoto et al., 2012). BMP7 führt dazu, dass schwer geschädigte renale tubuläre epitheliale Zellen

repariert werden, in Verbindung mit der Umkehr chronischer Nierenverletzungen (Zeisberg et al., 2003).

In Bezug darauf wurde eine neue Klasse von Molekülen entworfen, welche als BMP-Agonisten fungieren. Dabei konnte bereits eine therapeutische Wirksamkeit gezeigt werden, wenn ein solcher BMP-Agonist Mäusen mit einer Fibrose oral verabreicht wird (Sugimoto et al., 2012).

In einer neueren Studie konnte das Myofibroblasten-spezifische naked cuticle homologue 2 (NKD2)-Gen als ein Myofibroblasten-spezifisches Ziel bei der menschlichen Nierenfibrose ausfindig gemacht werden. NKD2, welches Myofibroblasten bei einer Nierenfibrose markiert und für die Kollagenexpression verantwortlich ist, gilt somit als ein mögliches Therapieziel in der Behandlung der Nierenfibrose (Kuppe et al., 2021). Im weiteren Verlauf wird es dadurch vielleicht möglich sein, gezielte therapeutische Behandlungsstrategien zu entwickeln, um einer Entzündung der Niere sowie deren Narbenbildung frühzeitig entgegenzuwirken (Uniklinik RWTH Aachen, 2020).

## **1.5 Schädigungsmarker LCN2**

### **1.5.1 Allgemeine Informationen zum Schädigungsmarker LCN2**

Das Gen Lipocalin-2 (LCN2) codiert für das Protein Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) (Lee et al., 2020). NGAL ist ein 25 kDa schweres Glykoprotein mit 178 (Wu et al., 2019) bzw. 198 Aminosäuren (Chakraborty et al., 2012), welches der Lipocalin-Familie zugeordnet wird (Buonafina et al., 2018). Die Lipocalin-Protein-Familie ist eine große Gruppe von kleinen extrazellulären Proteinen, welche durch zahlreiche molekulare Erkennungseigenschaften charakterisiert werden (Flower, 1996) und umfasst eine Klasse von Proteinen, die durch acht  $\beta$ -Stränge charakterisiert werden, die ein  $\beta$ -Fass formieren, welches einen Kelch definiert. Dieser Kelch bindet und transportiert niedermolekulare Moleküle, einschließlich Vitamine, Steroidhormone, Geruchsstoffe und verschiedene sekundäre Metabolite (Du et al., 2015), welche die biologische Aktivität von Lipocalin definieren (Schmidt-Ott et al., 2007).

Bei Menschen stellen die Lipocaline sekretorische Proteine dar, welche im Blutplasma und anderen Körperflüssigkeiten wie Tränen und genitalen Sekreten vorkommen (Schiefner and Skerra, 2015).

Lipocaline können auch eine wichtige Rolle bei Erkrankungen spielen. So steigt beispielsweise bei Patienten mit diabetischer Retinopathie das Konzentrationslevel von LCN1 in der Tränenflüssigkeit mit der Schwere der Erkrankung an, weshalb LCN1 einen Biomarker für die diabetische Retinopathie darstellt (Wang et al., 2016). Daneben sind erhöhte LCN1-Level auch mit dem Sjögren-Syndrom und einer Laser-in-situ-Keratomileusis (LASIK)-induzierter trockener Augenerkrankung assoziiert (Charkoftaki et al., 2019).

Als ein weiteres Beispiel ist das AMBP-Protein (Alpha 1 microglobulin/bikunin precursor) zu nennen, welches als Biomarker einer Proteinurie und als Indikator einer abnehmenden Nierenfunktion dient (Charkoftaki et al., 2019).

Im Folgenden wird nun genauer auf die Bedeutung und die Funktionsweise von Lipocalin-2 (LCN2) eingegangen.

LCN2 wird zum einen in menschlichen Neutrophilen, endothelialen und glatten Muskelzellen, in Kardiomyozyten, in Neuronen (Buonafine et al., 2018) und auch bei gesunden Menschen in geringer Konzentration in der Niere, der Trachea, der Lunge, im Magen und im Kolon exprimiert (Haase and Haase-Fielitz, 2010; Noto et al., 2013). Zum anderen wird LCN2 von Immunzellen, Hepatozyten und Tubuluszellen der Niere in verschiedenen pathologischen Stadien exprimiert und sezerniert (Schmidt-Ott et al., 2007).

Im weiteren Verlauf wird näher auf die Struktur von LCN2 eingegangen.

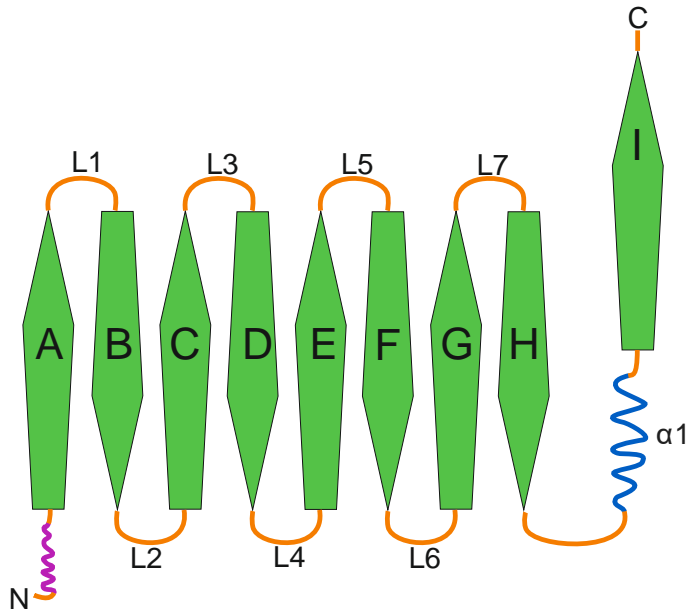
LCN2 wird beim Menschen durch ein Gen, welches auf dem Genlocus 9q34.11 liegt, codiert. Das humane NGAL-Gen hat sieben Exons, die mindestens fünf funktionale Transkripte produzieren, d.h. mRNAs, welche in Proteine translatiert werden. Das Maus-Homolog von NGAL wird durch ein Gen, das auf dem Genlocus 2 27.0 cM liegt, codiert. Dieses LCN2-Gen hat sechs Exons und codiert für zwei funktionale Transkripte (Chakraborty et al., 2012).

Wie die anderen Mitglieder der Lipocalin-Familie besitzt auch LCN2 eine dreidimensionale kelchartige Struktur. Die Bindungsstelle weist zwei Besonderheiten auf, da sie zum einen polar und zum anderen weit genug ist, um bestimmte Proteine zu binden (Buonafine et al., 2018).

Das menschliche Lipocalin-2 existiert als Monomer, als ein 45 kDa schweres Homodimer sowie als ein 135 kDa schweres Heterodimer (Schrezenmeier et al., 2017). Das LCN2-Monomer ist die überwiegende Form, welche von geschädigten distalen Tubulusepithelzellen sezerniert wird, wohingegen das Dimer die vorherrschende Form ist, welche von Neutrophilen abgesondert wird (Haase-Fielitz et al., 2014).

Das humane Lipocalin-2 beinhaltet drei Cysteine, wovon zwei (Cys 76 und 175) an einer intramolekularen Disulfidschleife beteiligt sind, und das dritte Cystein (Cys 87) für die Bildung von Homodimeren oder Heterodimeren zur Verfügung steht (Cramer et al., 2012). Die Anwesenheit von diesem Cystein-Rest an Position 87 erlaubt es dem humanen LCN2 eine Disulfidbrücke mit einem spezifischen Liganden, der Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) auszubilden, wodurch das Protein stabilisiert und dessen Abbau vermindert wird ohne jedoch die Aktivität von LCN2 zu modifizieren (Buonafine et al., 2018).

Das LCN2-Protein bei der Maus besteht nur aus den zwei Cysteinen, welche an den intramolekularen Disulfidschleifen beteiligt sind. Folglich kann Lipocalin-2 bei der Maus weder Homodimere noch Heterodimere, bilden (Cramer et al., 2012).



**Abbildung 3:** Schematische Struktur von Lipocalin

Das charakteristische Merkmal der Lipocaline ist das sog. „Lipocalin fold“, welches aus einer N-terminalen Helix besteht, gefolgt von acht  $\beta$ -Faltblättern (A-I), die in anti-paralleler Orientierung angeordnet sind. Das achte  $\beta$ -Faltblatt ist mit einer  $\alpha$ -Helix (in der Abbildung mit „ $\alpha 1$ “ gekennzeichnet) verbunden. Die  $\alpha$ -Helix wiederum hängt mit einem C-terminalen  $\beta$ -Faltblatt zusammen. Die  $\beta$ -Faltblätter sind durch Schleifen miteinander verbunden (L1-L7). Dabei bilden die Schleifen L1, L3, L5 und L7 das

*offene Ende des Moleküls, d.h. die Öffnung für die Ligandenbindungsstelle von LCN2 (Chakraborty et al., 2012).*

(Quelle frei modifiziert nach: <https://portlandpress.com/clinsci/article/132/9/909/72048/More-than-a-simple-biomarker-the-role-of-NGAL-in> (Buonafine et al., 2018))

Im Hinblick auf die Funktion von LCN2 ist zu erwähnen, dass das Protein verschiedene Entzündungsprozesse vermittelt, indem es Makrophagen an der Produktion von Interleukin-10 (IL10) hindert (Charkoftaki et al., 2019) und zudem eine wichtige Rolle bei einer Stammfettsucht sowie bei der Insulinresistenz spielt (Singh et al., 2017).

LCN2 ist außerdem ein Siderophor-Eisen-bindendes Protein (Schmidt-Ott et al., 2007) und somit an der Regulation des intrarenalen Eisenstoffwechsels beteiligt (Haase and Haase-Fielitz, 2010).

Neben seinen antimikrobiellen Effekten fungiert LCN2 auch als Wachstums- und Differenzierungsfaktor in multiplen Zelltypen (Schmidt-Ott et al., 2007), vermindert proapoptotische Prozesse und hemmt die Entstehung neuer Blutgefäße. (Haase and Haase-Fielitz, 2010).

LCN2 ist auch an der Nierenentwicklung beteiligt und wird als Biomarker für akute und chronische Nierenerkrankungen verwendet (Charkoftaki et al., 2019). Dabei spielt die Proteaseresistenz, die das Molekül stabilisiert, eine wichtige Rolle für die Nachweisbarkeit von LCN2 im Urin (Haase and Haase-Fielitz, 2010; Mishra et al., 2003).

Es ist bekannt, dass LCN2 bei Menschen und Nagetieren nach einem renalen tubulären Schaden massiv hochreguliert wird. Aufgrund des sehr schnellen Auftretens von LCN2 nach einer renalen tubulären Schädigung im Urin und im Serum ist es als früher Biomarker eines Nierenversagens nützlich. Des Weiteren ist LCN2 womöglich an der Limitierung eines Nierenschadens beteiligt (Schmidt-Ott et al., 2007).

Die Produktion von LCN2 in den Epithelzellen der Niere nimmt während einer Nierenverletzung deutlich zu. Innerhalb weniger Stunden nach ischämischer, septischer oder toxischer renaler Schädigung kann dieser Anstieg von LCN2 sowohl im Plasma als auch im Urin nachgewiesen werden, wobei dies vom Grad und der Dauer der Noxe abhängig ist (Haase and Haase-Fielitz, 2010).

Folglich sind, für eine frühe Diagnose eines akuten Nierenversagens, sowohl Urin- als auch Plasma/Serum-Spiegel von LCN2 nützlich, weshalb das LCN2-Level ein hilfreicher Marker ist, um den Beginn einer Nierenersatztherapie oder die Krankenhaussterblichkeit frühzeitig vorherzusagen. Infolgedessen hat LCN2 als



renaler Biomarker sowohl eine diagnostische als auch eine prognostische Relevanz (Haase et al., 2009).

Jedoch kann die Messung von Plasma-LCN2 durch verschiedene Faktoren, wie chronischen Nierenerkrankungen, chronischer Hypertension, systemischen Infektionen, entzündlichen Zuständen und durch Malignität beeinträchtigt werden. Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung korreliert das LCN2-Level mit der Schwere des Nierenschadens (Adiyanti and Loho, 2012).

Daneben ist die LCN2-Expression bei akuter schwerwiegender Peritonitis, bei zystischer Fibrose, bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD), bei Asthma und bei Patienten mit einem Lungenemphysem erhöht. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis können in der Synovialflüssigkeit ebenfalls höhere LCN2-Konzentrationen festgestellt werden. Bei Frauen mit Hypertension können auch erhöhte LCN2-Spiegel im Plasma gesehen werden, welche mit dem diastolischen Blutdruck korrelieren. In ähnlicher Weise ist die LCN2-Konzentration bei Patienten mit einer akuten zerebralen ischämischen Attacke erhöht (Xu and Venge, 2000).

Darüber hinaus scheint LCN2 auch bei Patienten mit Nierensteinen vermehrt exprimiert zu werden (Hui et al., 2020).

### 1.5.2 LCN2 – Lokalisation in der Niere

LCN2 wird in einer normalen, gesunden Niere im distalen Tubulus, im medullärem Sammelrohr (Mori et al., 2005) und im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife synthetisiert (Schrezenmeier et al., 2017), durch die Glomeruli frei filtriert und anschließend im proximalen Tubulus vollständig reabsorbiert (Wu et al., 2019). Die Reabsorption im proximalen Tubulus findet über Megalin- und andere Rezeptoren mittels Endozytose statt (Haase and Haase-Fielitz, 2010).

Megalin stellt damit einen der beiden Rezeptoren für LCN2 dar. Megalin gehört zur Familie der Low-density Lipoprotein-Rezeptoren und bindet an verschiedene Lipocaline. Jedoch ist seine Affinität zu LCN2 höher als für andere Lipocaline (Buonafine et al., 2018).

Als weiterer LCN2-Rezeptor ist der 24p3-Rezeptor (24p3R) bekannt. Dieser ist ein endozytotischer Rezeptor mit einer starken Affinität zu LCN2, wodurch LCN2 in Zellen eintreten und die intrazelluläre Eisenkonzentration modulieren kann (Buonafine et al., 2018).

In seltenen Fällen konnten auch glomeruläre parietale Epithelzellen, jedoch keine anderen glomerulären Zellen, als Syntheseort für LCN2 identifiziert werden wohingegen proximale Tubuluszellen in einer gesunden Niere kein LCN2 produzieren. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass nahezu 50% der kortikalen Tubuluszellen, einschließlich der proximalen Tubuluszellen, bei ischämischem oder nephrotoxischem Nierenschaden, LCN2 exprimieren (Mori et al., 2005). Neben der drastischen Anreicherung von LCN2 in 50% der kortikalen Nierentubuli bei Patienten mit einer manifesten akuten Nierenschädigung, kommt es vor allem im distalen Tubulus zu einem massiven Anstieg von LCN2 (Haase and Haase-Fielitz, 2010). Eine LCN2-Ausscheidung im Urin kommt vor, wenn ein proximaler, tubulärer Schaden die LCN2-Reabsorption stört oder eine Steigerung der LCN2-Synthese bewirkt. Genetische Expressionsstudien zu einer akuten Nierenschädigung zeigen einen schnellen und massiven Anstieg der NGAL mRNA (bis zu 1000-fach) im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im Sammelrohr. Die sich daraus ergebende LCN2-Synthese im distalen Nephron und die Sekretion im Urin scheinen den größten Beitrag zur Anwesenheit von LCN2 im Urin zu leisten. Außerdem kann eine akute Nierenschädigung auch einen signifikanten Anstieg der NGAL mRNA Expression in einigen Organen, insbesondere in der Leber und der Lunge, bewirken. Zudem führt eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) aufgrund einer akuten Nierenschädigung zu einem Rückgang der LCN2-Clearance, wodurch LCN2 in der systemischen Zirkulation akkumuliert (Adiyanti and Loho, 2012).

### 1.5.3 Befunde zur Funktion von LCN2 in der Niere

Über die Funktion von LCN2 in der Niere ist nach derzeitigem Stand der Wissenschaft nur sehr wenig bekannt. So könnte die Expression von LCN2 im Sammelrohr für die dortige Proteinaufnahme mittels Endozytose verantwortlich sein, wobei die genaue Funktion nach wie vor unklar bleibt (Probst et al., 2019).

Außerdem induziert LCN2 die Apoptose, indem es die Caspase-3 aktiviert und reguliert die Expression von inflammatorischen Genen in Nierenzellen hoch (Pawar et al., 2012).

Eine Analyse von Lipocalin-2-defizienten Mäusen (LCN2<sup>-/-</sup>) zeigte einen Zelltod bei IL-3-Entzug und eine normale Nierenentwicklung (Berger et al., 2006).

Jedoch sind diese genetisch modifizierten Mäuse, denen beide Kopien des LCN2-Gens fehlen, empfindlicher gegenüber einigen Gram-negativen Bakterien und sterben schneller an einer Sepsis als Wildtyp-Mäuse (Schmidt-Ott et al., 2007).

Neutrophile Granulozyten von LCN2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen signifikant weniger bakteriostatische Aktivität im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen. Des Weiteren konnte in einem Mausmodell für ein schweres Nierenversagen kein signifikanter Unterschied zwischen LCN2-Knockout-Mäusen und ihren Wurfgeschwistern gefunden werden. In dieser Studie wurden die Nieren in Wildtyp- und LCN2<sup>-/-</sup>-Embryonen vom Embryonaltag 10.5 bis zum Embryonaltag 12.5 analysiert, wobei drei Embryonen eines jeden Genotyps auf eine mögliche Verzögerung in der Nierenentwicklung oder auf irgendeine andere beobachtbare Nierenanomalie untersucht wurden. Jedoch konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und LCN2<sup>-/-</sup>-Embryonen festgestellt werden. Somit konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass eine Lipocalin-2-Defizienz eine Nierenschädigung nach einem ischämischen Reperfusionsschaden nicht erhöht. Es konnte dargelegt werden, dass der Serum-Kreatinin- und der Blut-Harnstoff-Stickstoff-Spiegel, der Anteil apoptotischer Tubuli und der histologische Schaden in der Niere 24 Stunden nach der Reperfusion keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp- und LCN2<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigte.

Als Zusammenfassung dieser Studie kann somit festgehalten werden, dass ein Mangel an endogenem Lipocalin-2 die Schwere einer ischämischen Nierenschädigung nicht verstärkt (Berger et al., 2006).

Im Gegensatz dazu belegt eine andere Studie, dass eine LCN2-Defizienz die Anfälligkeit für eine ischämische akute Nierenschädigung in Mäusen verstärkt.

Ein adoptiver Transfer von LCN2-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen von LCN2 Knockout-Mäusen zu CD4<sup>+</sup> Knockout- oder Wildtyp-Mäusen führte zu einer schlechteren Nierenfunktion als der Transfer von Wildtyp CD4<sup>+</sup> T-Zellen. In vitro zeigte ein renaler ischämischer Reperfusionsschaden (IRI) eine vermehrte IFN- $\gamma$  Produktion in LCN2-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Niere und Milz im Vergleich zum Wildtyp. In Bezug auf die Anzahl der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Niere konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen festgestellt werden. Jedoch zeigten die LCN2-Knockout-Mäuse eine signifikant niedrigere Anzahl renaler regulatorischer T-Zellen als die Wildtyp-Mäuse (Lee et al., 2020). Außerdem konnte bei den LCN2-Knockout-Mäusen eine geringere Anzahl proliferierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen (CD4+Ki67+) in der Niere nachgewiesen werden.

Zudem wurde eine signifikant niedrigere Anzahl von CD62L<sup>+</sup> Zellen in LCN2-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten festgestellt, wohingegen in der Anzahl der CD44<sup>+</sup> oder CD69<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen kein signifikanter Unterschied beobachtet wurde.

Diese Abnahme der regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) bei LCN2-Knockout-Mäusen könnte das schlechte Outcome erklären, da diese regulatorischen T-Zellen vor einer akuten Nierenschädigung schützen.

Translationale Daten für eine ischämische Nierenschädigung bei Menschen zeigen ebenfalls diese Hochregulation von LCN2 in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Niere.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass ein Mangel an LCN2 eine schlechtere Nierenfunktion nach einem IRI induziert als im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. So ist das Serumkreatinin-Level 24 Stunden nach einem IRI bei LCN2-Knockout-Mäusen signifikant höher als bei Wildtyp-Mäusen. Dabei konnte bei der histologischen Beurteilung eine Tendenz für einen höheren Anteil nekrotischer Tubuli in der äußeren Medulla von LCN2-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gesehen werden (Lee et al., 2020).

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor NFAT5 (nuclear factor of activated T-cells) wird als osmoprotektives Protein beschrieben. Aufgrund dieser Funktion kommt NFAT5 in der Niere eine besondere Rolle zu, da die Zellen des Nierenmarks permanent hohen und variablen Konzentrationen von Natrium und Harnstoff im Interstitium ausgesetzt sind. Erhöhte interstitielle Natriumkonzentrationen wirken zytotoxisch, da die Zellen zunächst über einen Wasserausstrom und einer intrazellulären Konzentrierung der Elektrolyte den osmotischen Ausgleich anstreben. Dieser hyperosmolare Stress führt zu einer Aktivierung von NFAT5, was sowohl eine erhöhte Transkription von NFAT5 als auch die verstärkte NFAT5-Proteinexpression bedeutet. NFAT5 wird in den Kern transloziert und führt zu einer verstärkten Expression osmoprotektiver Gene, die zur zellulären Akkumulation von schützenden organischen Osmolyten, wie Sorbitol oder Betain in Zellen des Nierenmarks führen. Zudem spielt NFAT5 für den Mechanismus der Harnkonzentrierung eine wichtige Rolle, indem es die Expression von Aquaporin 1 und 2, des Harnstoff-Transporter UT-A sowie die für die Natriumretention wichtige SGK-1 (Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1) erhöht. Dabei wird NFAT5 – seinen Funktionen entsprechend – mit höchster Abundanz von den Zellen der inneren Medulla exprimiert.

In Vorarbeiten konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Charlotte Wagner bereits zeigen, dass die Deletion von NFAT5 im renalen Stromazellkompartiment von Mäusen zu einer verminderten Harnosmolarität bereits unter basalen Bedingungen führt, während die glomeruläre Filtrationsrate und die Bestimmung der Retentionsparameter Plasma-Kreatinin und Plasma-Harnstoff keine Unterschiede zu den wildtypischen Kontrollen zeigen. Diese ersten Befunde weisen darauf hin, dass durch die NFAT5 Deletion die kortikalen Funktionsprozesse wenig beeinflusst werden, die funktionalen Mechanismen, insbesondere im inneren Mark der Niere, aber gestört sein könnten.

In dieser Arbeit soll deswegen mit Hilfe eines Mausmodells, in dem NFAT5 bereits in der embryonalen Phase im Stromazellkompartiment der Niere, aus dem die glatten Gefäßmuskelzellen, Mesangialzellen, Reninzellen und interstitielle Zellen hervorgehen, fehlt (NFAT5 fl/fl FoxD1<sup>Cre+</sup>), die Bedeutung einer NFAT5 Deletion, vor allem in den interstitiellen Zellen, für die Entwicklung und die Funktion der gesunden Niere und in der fibrotischen Niere analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Chemidoc™ Touch Imaging System	Biorad, München
Computer	Dell, Intel Core i7, NVIDIA GeForce GTX1080 8 GB
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen
Feuchtekkammer	Gies, Niederaula
Filtersets Cy2-Filter TRITC-Filter Cy5-Filter DAPI-Filter	Filter set 38 HE, Zeiss, Jena Filter set 43, Zeiss, Jena Filter set 50, Zeiss, Jena Filter set 49, Zeiss, Jena
Fluoreszenzlampe	Colibri 7, Zeiss Jena
Gelelektrophorese-System	Compact M, Biometra, Göttingen
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel, Staufen
Kamera	AxioCam 305, Zeiss, Jena
Magnetrührer (IKA-Combimag RCT)	IKA, Staufen im Breisgau
Mikroskope	Axio Observer.Z1, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2265, Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp, Osaka
Multipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Nano drop 1000 (Spectrophotometer)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR-Geräte	Lightcycler LC480, Roche, Mannheim
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow, Wilmington, England
Photometer	NanoDrop 1000, Peqlab, Erlangen
Pipetten	Pipetman P2, P10, Gilson, Middleton, USA Finnpipette Thermo Labsystems (5-50µl, 20-200µl, 200-1000µl), Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts

Reinwasseranlage	MilliQ Plus PF, Millipore, Schwalbach
RNAscope® Wärmeofen	HybEZ Oven, Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Schüttler (Shaker Dos-10L)	neoLab, Heidelberg
Steamer, Typ 3216	Braun, Neu-Isenburg
Thermoblockcycler	Fast Gene Ultra Cycler Gradient, Nippon Genetics, Düren
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tisch-pH-Meter (pH 50 set)	Roth, Karlsruhe
Vortexgeräte	Genie 2, Scientific Industries
Wärmeschrank	Memmert, Schwabach
Waage (sartorius-Waage 1502)	IKA, Darmstadt
Wasserbad	Aqualine AL12, Lauda, Lauda-Königshofen
Wasserstrahlpumpe	
Zentrifugen	Kühlzentrifuge, VWR, Radnor, USA Zentrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg Tischzentrifuge, neoLab, Heidelberg Plattenzentrifuge, Hermle Z300

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Einmalwiegeschalen	Roth, Karlsruhe
Faltenfilter (Sartorius)	Fisher Scientific, Waltham, USA
Fettstift, ImmEdge Pen (bei ISH), Fettstift, Liquid Blocker, PAP-Pen-Mini, Liquid-Repellent Slide Marker Pen (bei IF und Siriusrot-Färbung)	Vector Laboratories, Burlingame, USA Science Services, München
Feuchtekammer	Gies, Niederaula
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Glas-Pasteur-Pipetten 150mm	VWR, Radnor, USA
Handschuhe	Roth, Karlsruhe

Mikrotom-Klingen	Feather Microome Blade (Stainless Steel) R35
Multiwellplatten 96er	Sarstedt, Nümbrecht
Multiply® - Pro Gefäß 0,2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel, Braunschweig
Paraffin	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm (Nescofilm)	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße 13 ml, 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 50 ml (Cellstar Tubes)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reagiergefäße 2 ml	Nerbe plus, Winsen
Reagiergefäß 1,5 ml braun	Sarstedt, Nümbrecht
Stabpipette (serological Pipette) 10 ml, 20 ml	Nerbe plus, Winsen
Stabpipette 25mL (Cellstar)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe

### 2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Agarose	Nippon Genetics, Düren
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase A	Roche, Mannheim
DNA Längenstandard 100bp plus DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
DPX Mountant for histology	Sigma Life Science, St. Louis, USA
Dulbecco's PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eindeckmedium ProLong Gold	Thermo Scientific, Waltham, USA
Essigsäure 99,8%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol (Rotipuran ® ≥99,8%, p.a.)	Roth, Karlsruhe
Fast Green FCF	Kremer Pigmente GmbH, Aichstetten



First-Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Glycergel mounting medium (IF)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Horse serum	Gibco, Life technologies, Grand Island, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol p.a.	Fisher Chemical, Loughborough, UK
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Lightcycler® 480 SYBR Green Master PCR Kit	Roche, Mannheim
Midori Green advance DNA Stain	Nippon Genetics, Düren
M-MLV Reverse Transkriptase, 200 U/μl	Promega, Mannheim
NaCl	VWR, Radnor, USA
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH 1N	Merck, Darmstadt
Oligo(dT) <sub>15</sub> Primer, 0,5 μg/μl	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe
Paraplast-Plus Paraffin	Roth, Karlsruhe
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Mannheim
Pikrinsäure-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNAscope® H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> & Protease Plus Reagenzien	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Multiplex Fluorescent Detection Reagents	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Multiplex TSA Buffer	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Target Retrieval Reagenzien	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope® Waschpuffer (50x)	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Sirius Red (Direct Red 80)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TriFast	VWR, Radnor, USA
Opal Fluorophore Reagent Packs (Opal 570, Opal 690)	Akoya Biosciences, Marlborough, USA
Xylol	Honeywell, Morris Plains, USA

### 2.1.4 Primer

#### Primer für die quantitative Realtime-PCR:

Die Primer für die quantitative Realtime-PCR wurden von der Firma Biomers (Ulm) in der gewünschten Nukleotidsequenz synthetisiert und als lyophilisiertes (gefriergetrocknetes) Pulver, in einer Kartusche, geliefert. Durch Lösen in Millipore-Wasser wurden die Primer auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.

<b>Gen</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
asma	s	ACTGGGACGACATGGAAAAG
	as	CATCTCCAGAGTCCAGCACA
AQP-1	s	GCTGTCATGTACATCATCGCCCAG
	as	AGGTCATTGCGGCCAAGTGA
AQP-2	s	CTGGCTGTCAATGCTCTCCAC
	as	TTGTCACTGCGGCGCTCATC
Col1a1	s	CTGACGCATGGCCAAGAAGA
	as	ATACCTCGGGTTTCCACGTC
Col3a1	s	GGTGGTTTTTCAGTTCAGCTATGG
	as	CTGGAAAGAAGTCTGAGGAATG
Cx37	s	CACGAAGGGACCACGACGCCCGCCC
	as	TTCTTGGATGCAGAGCTGTTGGG
Cx40	s	CCTGCTGGAAAGAAGTAGA
	as	TCTCCGGAGCTGTTCTTTA
Cx43	s	TCCTGGGTACAAGCTGGTCACTGG
	as	GCTGCTGGCTCTGCTGGAAGG
Cx45	s	GAACTTGATGATCCGGGTGCTTAT
	as	ATGGGGGTTGTTTTGGTGATGGTA
CX3CR1	s	AAGTTCCTTCCCATCTGCT
	as	CAAATTCTCTAGATCCAGTTCAGG
CX3C-Ligand	s	CACCTCGGCATGACGAAAT
	as	TTGTCCACCCGCTTCTCAA
Fibronectin	s	ACACGGTTTTCCATTACGCCAT
	as	AATGACCACTGCCAAAGCCCAA

F4/80	s	CTTTGGCTATGGGCTTCCAGT
	as	GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG
GAPDH	s	CACCAGGGCTGCCATTTGCA
	as	GCTCCACCCTTCAAGTGG
LCN2	s	GGACCAGGGCTGTCGCTACT
	as	GGTGGCCACTTGCACATTGT
NFAT 5 kuerper	s	AACATTGGACAGCCAAAAGG
	as	GCAACACCACTGGTTCATTA
NKCC2	s	GCCTCTCCTGGATTGTAGGAGAA
	as	CTAAGCTCCGGGAAATCAGGTA
PDGFR $\beta$	s	AGAAGCGGCCATGAATCAGG
	as	TCACTCGGCACGGAATTGTC
Renin	s	ATGAAGGGGGTGTCTGTGGGGTC
	as	ATGTCGGGGAGGGTGGGCACCTG
RPL32	s	TTAAGCGAAACTGGCGGAAAC
	as	TTGTTGCTCCATAACCGATG

Primer für die Genotypisierungen:

Konstrukt	Primer	Sequenz (5' → 3')
NFAT lox	s	GTAACCATGATTAGTCTTTTAGCTTTATG
	as	GTTCTGAGAATCCAAAGCACAAAC

### 2.1.5 Antikörper

#### Primäre Antikörper

Name	Hersteller	Verdünnung
Rabbit-anti-Collagen I	Abcam, Cambridge, UK	1:400
Mouse-anti-Glattmuskelaktin ( $\alpha$ -SMA)	Abcam, Cambridge, UK	1:400

#### Sekundäre Antikörper

Name	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
Donkey-Anti-Rabbit IgG	Cy3	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-Anti-Mouse IgG	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400

### 2.1.6 Sonden für in-situ Hybridisierung

Alle Sonden wurden von dem Unternehmen *Advanced Cell Diagnostics* (Hayward, USA) für die RNAscope® Anwendung bezogen.

Es wurden dabei nur Mus musculus Sonden verwendet.

<b>Gen und Sonden</b>	<b>Proben Bezeichnung</b>	<b>Bestellnummer</b>
$\alpha$ -SMA-C1 (Acta2)	alpha smooth muscle actin	319531
AQP1-C2	Aquaporin 1	504741-C2
AQP2-C2 & C3	Aquaporin 2	452411
Calb1-C1	Calbindin	428431
CD31-C2 (Pecam1)	cluster of differentiation CD31	316721
Col1a1-C1	Fibrosemarker	319371
F4/80-C1 (ADGRE-1)	cell surface glycoprotein	460651
Fibronectin-C1 (FN-1)	Fibrosemarker	316951
LCN2-C1 & C2	Lipocalin 2	313971
Megalin (Lrp2)-C2	Megalin (prox. Tubulus)	425881-C2
NKCC2 (Slc12a1 )-C1	Na-K-Cl symporter	476841
Pdgfrb C2 & C3	platelet derived growth factor receptor beta	411381

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien für Puffer und Lösungen in Reinstwasser (MilliQ-Wasser) gelöst.

#### Fixierlösung für Perfusion, pH 7,4, filtriert (für Immunfluoreszenz)

<b>Substanz</b>	<b>Volumenanteil</b>
Dulbecco's PBS	
Paraformaldehyd	3 %

Fixierlösung für Perfusion, pH 7,0, gefiltert (für in-situ-Hybridisierung)

Substanz	Volumen bzw. Gewicht pro 100 ml
Formalin 37%	10 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (monobasic)	0,4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (dibasic)	0,65 g

➔ + 90 ml Milli-Q-Wasser

PBS (Phosphate Buffered Saline) – „Otto“ – Puffer, pH 7,4, Ansatz für 2 l

Substanz	Gewicht	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	4,56 g	} Lösung A: auf 1,5 l auffüllen
NaCl	16,36 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8 g (10-fach konzentriert)	} Lösung B: auf 0,5 l auffüllen, damit Lösung A auf pH 7,4 titrieren

Blockierlösung für Immunfluoreszenz, gefiltert

Substanz	Prozentanteil
PBS-Otto	
BSA (bovines Serum-Albumin)	1 %
Horse serum	10 %

Waschpuffer für mRNA-scope, Ansatz für 3 l

RNAscope® Waschpuffer (50x) wurde vor Verwendung 15 min im Wasserbad-Granulat erwärmt.

Substanz	Volumen
Milli-Q-Wasser	2940 ml
RNAscope® Waschpuffer (50x)	60 ml

Target Retrieval für mRNA-scope, Ansatz für 200 ml

Substanz	Volumen
Milli-Q-Wasser	180 ml
RNAscope® Target Retrieval	20 ml

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer, pH 8,5

Substanz	Molare Masse
Tris	40 mM
Essigsäure	20 mM
EDTA	1 mM

Agarosegel

Substanz	Volumenanteil
1x TAE	
Agarose	2 %
Midori Green Stain	0,02 ‰

NaOH (für gDNA-Extraktion)

Substanz	Molare Masse
NaOH	25 mM

Tris-HCl, pH 8,0 (für gDNA-Extraktion)

Substanz	Molare Masse
Tris-HCl	1 M

2.1.8 Software und Internetdienste

Die gesamte Arbeit wurde mit *Microsoft Office 2016* geschrieben. Für die Fluoreszenzmikroskopie diente die Software *ZEN blue* von Zeiss. Als Bearbeitungsprogramm für die Bilder wurden *ZEN blue* und *Adobe Photoshop CS5 (64 Bit)* verwendet. Zum Erstellen von Abbildungen wurde das Programm *CorelDRAW 2020 (64 Bit)* eingesetzt. Die gezeigten Graphen wurden mit Hilfe des Programms *GraphPad Prism 5* erstellt. Zur Internetrecherche diente *PubMed* von *NCBI (The National Center for Biotechnology Information)*. Zum Zitieren wurde die *Zotero* Software (Version 5.0) verwendet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere

#### 2.2.1.1 Verwendete Mauslinien

Alle Tierexperimente wurden entsprechend den Vorgaben des „National Institutes of Health guidelines for the care and use of animals in research“ durchgeführt und von den lokalen Tierschutzbehörden genehmigt. Gemäß dieser Vorschriften wurde auf die Einhaltung der folgenden Parameter geachtet: Raumtemperatur (RT)  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , relative Luftfeuchtigkeit  $55\% \pm 5\%$ , 12-stündiges Hell-Dunkelintervall, Futter und Wasser ad libitum.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mauslinie FoxD1<sup>Cre+</sup> x NFAT5 flfl verwendet. Dazu wurden Mäuse, die unter der Kontrolle des FoxD1-Promotors die Cre-Rekombinase exprimieren, mit einer Mauslinie mit gefloxtem NFAT5 Gen (NFAT5 flfl) verpaart.

#### 2.2.1.2 Genotypisierungen

Die Genotypisierung der verwendeten Tiere erfolgte mittels PCR. Die Isolierung der DNA aus Gewebeproben erfolgte nach folgendem Schema:

Zunächst wurde das Gewebe für 1 h in 100  $\mu\text{l}$  NaOH (25 mM) bei  $96^{\circ}\text{C}$  im Thermocycler verdaut und gevortext. Anschließend wurde der Verdau mit 10  $\mu\text{l}$  Tris-HCl (1 M, pH 8) gestoppt. Im letzten Schritt wurden die Proben für 6 min bei 10.000 Umdrehungen/min zentrifugiert.

Für die nachfolgende PCR wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  der gewonnenen DNA und 23  $\mu\text{l}$  des folgenden Mastermix verwendet:

PCR-Reaktionsansatz	Volumen für 1 Probe
Puffer (GoTaq buffer green)	5 $\mu\text{l}$
Primer (je 10 pmol/ $\mu\text{l}$ )	Je 1 $\mu\text{l}$
dNTP-Mix (2,5 mM)	2 $\mu\text{l}$
GoTaq-Polymerase	0,3 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	13,7 $\mu\text{l}$

Für die Amplifizierung wurde folgendes Protokoll verwendet:

	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Aktivierung	94°C	5 min	
Denaturierung	94°C	30 s	30 Zyklen
Annealing	59°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Elongation	72°C	5 min	
Lagerung	15°C	∞	

Um die PCR analysieren zu können, wurden je 12 µl des PCR-Gemisches auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Im 1xTAE-Puffer wurden die einzelnen DNA-Fragmente bei 120 V der Größe nach aufgetrennt. Der Abgleich erfolgte mit Positiv- und Negativkontrollen.

### 2.2.1.3 Induzierte Nierenfibrose

Es wurden zwei verschiedene Modelle zur Induktion einer Nierenfibrose verwendet. Zum einen handelte es sich um eine Adenin-induzierte Nephropathie und zum anderen um eine unilaterale Ureterobstruktion (UUO) für 5 Tage.

Die Nieren aus beiden Modellen wurden für in-situ-Hybridisierungen mit 10%-iger NBF-Lösung, für immunhistochemische Analysen mit 3%-igem Paraformaldehyd mittels retrograder arterieller Perfusion fixiert und in Paraffin eingebettet.

Die fertigen Nierenpräparate wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 2.2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden von den, in Paraffin eingebetteten Nieren, Gewebeschnitte mit einer Dicke von 5 µm hergestellt. Diese einzelnen Schnitte wurden anschließend für die vollständige Entfaltung in ein 42°C warmes Wasserbad überführt und mittels eines Pinsels auf einen Objektträger gezogen. Je nachdem, ob im Anschluss eine in-situ-Hybridisierung (ISH) oder eine Immunfluoreszenz (IF) erfolgte, wurden auf einen Objektträger jeweils zwei (Siriusrot-Färbung), zwei oder drei (ISH) bzw. drei (IF) Schnitte gezogen. Die so erstellten Objektträger wurden über Nacht bei RT getrocknet.



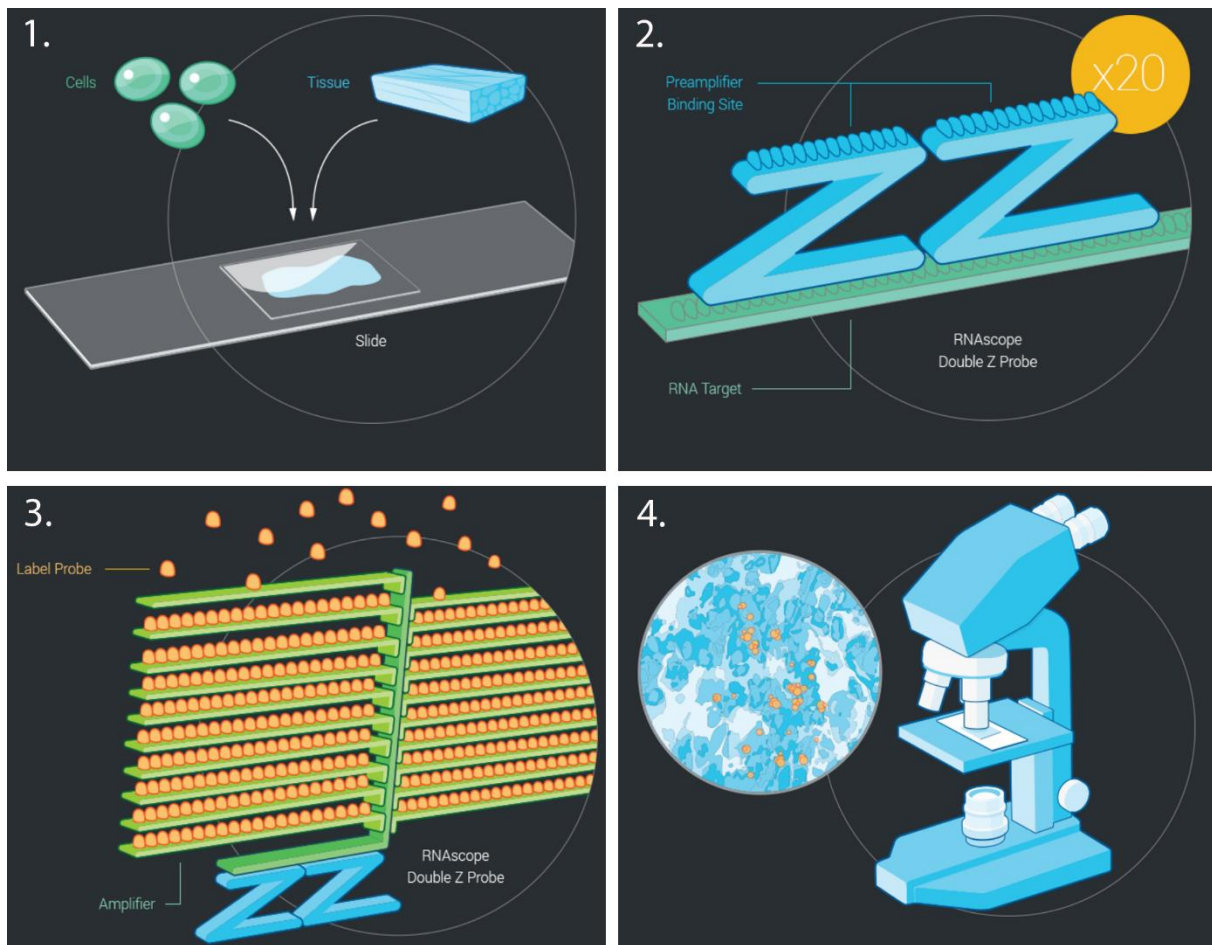
### 2.2.3 Färbetechniken

#### 2.2.3.1 In-situ-Hybridisierung

Die in-situ-Hybridisierung ist eine molekularbiologische Methode mit Hilfe derer sich Nukleinsäuren, also DNA oder wie im vorliegenden Fall RNA, in der Zelle am histologischen Präparat („in situ“) nachweisen lassen. Dabei bindet eine künstlich hergestellte Sonde über Basenpaarungen an die nachzuweisende Nukleinsäure. Dadurch kann DNA oder RNA in intakten Zellen zielgenau detektiert werden.

Die Durchführung der in-situ-Hybridisierung erfolgte im vorliegenden Fall mit dem RNAscope® Multiplex Fluorescent Assay von ACD.

Dabei lässt sich die in-situ-Hybridisierung in vier Phasen unterteilen (siehe Abbildung 4: RNAscope in-situ-Hybridisierung – Arbeitsablauf). Zuerst werden in der Permeabilisierungsphase Gewebeschnitte oder Zellen auf einem Objektträger fixiert und mit RNAscope® H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, RNAscope® Protease Plus und RNAscope® Target Retrieval vorbereitet. Im nächsten Schritt erfolgt die Hybridisierung, indem die RNAscope Sonden (mit ~ 20 Ziel-spezifischen Doppel-Z-Sonden) mit den Ziel RNA-Molekülen hybridisieren. In der Phase der Signalverstärkung (Amplifizierung) werden mittels der RNAscope® Detection Reagents die Hybridisierungssignale über eine sequenzielle Hybridisierung verstärkt. In einem letzten Schritt kann jedes punktförmige Signal, welches ein einzelnes getestetes Ziel-RNA-Molekül repräsentiert, mit einem Mikroskop visualisiert und veranschaulicht werden.



**Abbildung 4:** RNAscope in-situ-Hybridisierung – Arbeitsablauf

1. Permeabilisierung, 2. Hybridisierung, 3. Amplifizierung, 4. Visualisierung

(Quelle frei modifiziert nach: <https://acdbio.com/science/how-it-works>)

Im Folgenden wird nun der genaue Arbeitsablauf der in-situ-Hybridisierung erklärt.

Die über Nacht bei RT getrockneten Nieren-Paraffinschnitte wurden am Tag 1 zunächst für 1 h im Brutschrank bei 60°C inkubiert.

Für die anschließende Entparaffinierung wurden jeweils zwei Glasküvetten mit Xylol und 100% Ethanol vorbereitet. Die Objektträger wurden dann bei RT für 2 x 5 min in Xylol und für 2 x 1 min in 100% Ethanol getaucht.

Anschließend wurden die Objektträger für 5 min bei RT getrocknet. Danach wurden die Nierenschnitte mit ein bis zwei Tropfen RNAscope® Hydrogenperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bedeckt und für weitere 10 min bei RT inkubiert.

Im Anschluss daran wurden die Schnitte 2-3x in Millipore-Wasser getaucht, in Millipore-Wasser für ca. 10 s auf 100°C akklimatisiert und für 15 min in RNAscope® Target-Retrieval-Lösung gekocht. Danach wurden die Objektträger 3-4x in Millipore-Wasser und 3-4x in 100% Ethanol getaucht.

Nach einer Trocknungsphase von 5 min bei RT wurden die Nierenschnitte mit ausreichendem Abstand zum Präparat mit dem Fettstift umrandet und über Nacht bei RT getrocknet.

Zudem wurden am Tag 1 auch die entsprechenden Sonden vorbereitet. Dazu wurden die Sonden 1:50 miteinander verdünnt, nachdem sie 10 min im Wasserbad erwärmt wurden. Pro Nierenschnitt wurde hierfür mit einem Volumen von 30 µl gerechnet und zusätzlich für alle Präparate 30 µl als Reserve eingerechnet.

Zu Beginn des 2. Tages wurden die Schnitte mit RNAscope® Protease Plus beträufelt und im RNAscope® Wärmeofen für 30 min bei 40°C inkubiert und anschließend jeweils 3-4x in zwei Plastikkuvetten, welche mit Milli-Q-Wasser gefüllt waren, eingetaucht. Nach dem Bedecken der Schnitte mit der jeweiligen Hybridisierungssonde (diese wurden vor Verwendung 10 min im Wasserbad erwärmt), wurden sie für 2h bei 40°C im RNAscope® Wärmeofen inkubiert und dann für 2x2 min im RNAscope® Waschpuffer gewaschen. Die Waschschriffe, in denen die Nierenschnitte jeweils zweimal für 2 min im RNAscope® Waschpuffer gewaschen wurden, erfolgten dabei zwischen jedem Arbeitsschritt. Ebenso blieb auch die Temperatur des Wärmeofens während der gesamten Zeit bei 40°C.

Die anschließende Amplifizierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Für die nachfolgenden Amplifizierungsschritte wurden alle Substanzen aus dem RNAscope® Multiplex Fluorescent Detection Reagents-Kit der Firma Advanced Cell Diagnostics (ACDBio) verwendet. Zunächst wurde von diesem Kit AMP 1 auf alle Schnitte gegeben, für 30 min bei 40°C im Wärmeofen inkubiert und danach gewaschen. Nachdem dieselben Schritte mit AMP 2 erfolgten, wurde AMP 3 auf alle Nierenschnitte geträufelt, dieses Mal jedoch nur für 15 min in den Heizofen gestellt und anschließend wieder gewaschen. Im Anschluss daran wurde, für die Entwicklung des C1-Signals, zuerst HRP-C1 auf die Schnitte aufgetragen, diese für 15 min in den Ofen gegeben und wieder gewaschen. Dann wurde das erste Fluorochrom (Opal 570), welches zum RNAscope® Multiplex TSA Buffer 1:750 verdünnt wurde, auf alle Präparate aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min im Wärmeofen, wurden die Schnitte wiederum im Waschpuffer für 2x2 min gewaschen, wobei die Präparate vor Licht geschützt wurden. Danach wurde der HRP-Blocker auf die Schnitte gegeben, diese für 15 min im Wärmeofen inkubiert und anschließend wieder gewaschen.

Die Entwicklung der C2- bzw. C3-Signale erfolgte nach gleichem Schema, wobei dafür HRP-C2 bzw. HRP-C3 (je nachdem, ob das C2- oder C3-Signal entwickelt wurde) und

das zweite Fluorochrom (Opal 690), welches ebenfalls zum RNAscope® Multiplex TSA Buffer 1:750 verdünnt wurde, auf alle Objektträger aufgetragen wurde. Die jeweiligen Waschschriffe, die Dauer der Inkubation mit dem zweiten Fluorochrom sowie des HRP-Blockers blieben dabei gleich.

Die Darstellung der Zellkerne am Ende der in-situ-Hybridisierung erfolgte mittels einer DAPI-Lösung, welche im Kit der Firma ACDBio mitgeliefert wurde (Wang et al., 2012). Nach dem Eindecken der Objektträger mit dem Eindeckmedium ProLong Gold der Firma Thermo Scientific wurden die Objektträger kühl gelagert.

### 2.2.3.2 Immunhistochemische Färbung

Durch die immunhistochemische Färbung können antigene Strukturen mittels markierter Antikörper sichtbar gemacht werden. Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz beruht darauf, dass der primäre Antikörper an das zu detektierende Antigen im Gewebeschnitt bindet. Wenn im nächsten Schritt der sekundäre Antikörper hinzugegeben wird, bindet dieser an den Fc-Teil des ersten Antikörpers. Da dieser sekundäre Antikörper mit einem signalemittierenden Fluorophor gekoppelt ist, kann dieser Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe von Licht entsprechender Wellenlänge angeregt und somit der Antigen-Antikörper-Komplex dargestellt werden.

Am Tag 1 wurden die Objektträger zunächst nach folgenden Schritten entparaffiniert, da überschüssiges Paraffin die nachfolgende Immunreaktion beeinträchtigen kann:

Lösung	Dauer
Xylol I	15 min
Xylol II	15 min
Isopropanol absolut	1 min
Isopropanol 96%	Jeweils mehrmaliges, kurzes Tauchen bis zum Verschwinden der Schlieren
Isopropanol 80%	
Isopropanol 70%	
Destilliertes Wasser	

Im Anschluss daran wurden die Objektträger dreimal für jeweils 5 min in PBS-Otto gewaschen und auf einen Schüttler (rpm 80) gestellt.

Nachdem die überschüssige Waschlösung abgegossen und die Objektträger abgeklopft wurden, wurden diese in eine Feuchtkammer überführt und die

Nierenschnitte mit ausreichendem Abstand zum Präparat mit einem Fettstift umrandet. Im Anschluss daran wurde auf jeden Nierenschnitt eine Blockierlösung (bestehend aus PBS-Otto, 1% BSA und 10% Horse-Serum) gegeben und für 20 min schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Blockierlösung mit Hilfe der Wasserstrahlpumpe von zwei der drei Nierenschnitte abgesaugt, wobei der eine Schnitt, der nicht abgesaugt wurde, als Negativkontrolle diente.

Die primären Antikörper, welche in der Blockierlösung entsprechend verdünnt wurden, wurden anschließend auf alle Schnitte mit Ausnahme der Negativkontrolle aufgetragen und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Die Negativkontrolle enthält folglich nur die Blockierlösung und keinen primären Antikörper.

Am Tag 2 wurden die Objektträger wieder abgesaugt und danach dreimal für jeweils 5 min mit der Blockierlösung schüttelnd gewaschen. Um eine Kristallbildung zu vermeiden, wurden die sekundären Antikörper vor der Verwendung für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nachdem die sekundären Antikörper in der Blockierlösung entsprechend verdünnt wurden, wurden diese wiederum für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die sekundären Antikörper auf allen Schnitten verteilt und für 90 min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Danach wurden die Präparate lichtgeschützt dreimal für 15 min schüttelnd in PBS-Otto gewaschen.

Zum Abschluss wurden die Objektträger mit dem Glycergel Mounting Medium der Firma Dako Cytomation eingedeckelt.

### 2.2.3.3 Fast-Green-Siriusrot-Färbung

Die Siriusrot-Färbung ist eine Färbetechnik, mit Hilfe derer das Gesamtkollagen in Geweben quantifiziert werden kann. Diese Methode beruht auf einer Reaktion des Farbstoffes Siriusrot mit den Seitenketten des Kollagens, wodurch kollagenes Bindegewebe bei der Durchlichtmikroskopie rot und anderes Gewebe grün dargestellt wird. In einem ersten Schritt wurden die Objektträger mit den 5 µm-Nierenschnitten nach folgenden Schritten entparaffiniert:

<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
Xylol I	15 min
Xylol II	15 min

Isopropanol absolut	1 min
Isopropanol 96%	Jeweils mehrmaliges, kurzes Tauchen bis zum Verschwinden der Schlieren
Isopropanol 80%	
Isopropanol 70%	
Destilliertes Wasser	

In einem zweiten Schritt wurden die Objektträger in Feuchtkammern überführt und die Nierenschnitte mit ausreichendem Abstand zum Präparat mit einem Fettstift umrandet. Dann wurde die Fast-Green-Siriusrot-Lösung (0,1% Siriusrot und 0,1% Fast Green in gesättigter Pikrinlösung) auf die Schnitte getropft und diese bei geschlossener Feuchtkammer für 60 min inkubiert.

Nach der einstündigen Inkubation wurden die Präparate mit der Fast-Green-Siriusrot-Lösung zunächst kurz in H<sub>2</sub>O gewaschen und in die 0,5%-ige Essigsäure überführt. Im Anschluss wurden die Präparate für zweimal 5 min in Isopropanol absolut gewaschen. Anschließend wurden die Präparate zweimal für 5 min in Xylol gegeben und mit DPX Mountant for histology eingedeckelt.

Die Objektträger mit den Nierenschnitten wurden bei RT über Nacht unter dem Abzug getrocknet, bevor sie am nächsten Tag mittels der Durchlichtmikroskopie betrachtet wurden.

#### 2.2.4 Mikroskopie

Alle Aufnahmen der Nierenpräparate wurden mit Hilfe des Zeiss Axio Observer.Z1-Mikroskops und der zugehörigen Software ZEN 3.1 (blue edition) von Zeiss erstellt. Beim Mikroskopieren der Präparate wurden mit Hilfe der Software ZEN 3.1 (blue edition) die einzelnen Kanäle mit unterschiedlichen Farben angefärbt und zu einem Gesamtbild zusammengefügt.

Die Übersichtsaufnahmen wurden dabei mit dem 20er-Objektiv mittels der automatischen Kachelfunktion von ZEN 3.1 erstellt. Die Präparate wurden automatisch in Kacheln unterteilt und, um eine ausreichende Schärfe der Fotos zu gewährleisten, manuell mit einzelnen sog. Stützpunkten versehen. Nach dem Starten der Aufnahme wurden die Fotos automatisch zusammengesetzt. Um am Ende noch schärfere Fotos zu bekommen, wurden die entstandenen Bilder noch mit der Stitching-Funktion automatisch überarbeitet.

Die fertiggestellten Fotos wurden anschließend in Bezug auf Helligkeit, Kontrast und Signalstärke noch manuell angepasst.

Die Detailaufnahmen wurden zum überwiegenden Teil mit dem ApoTome.2 von Zeiss erstellt.

### 2.2.5 Messung der Genexpression in Wildtyp- und NFAT5-Knockout-Nieren

Um die Folgen des Knockouts (ko bzw. KO) darstellen zu können, wurde mRNA von Wildtyp (wt)- und NFAT5-Knockout-Nieren isoliert, in cDNA umgeschrieben und der Gehalt an RNA mit Hilfe einer quantitativen Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction (quantitative Echtzeit-PCR, kurz: qPCR) bestimmt.

Dabei legen die verwendeten Primer den Bereich fest, welcher im Rahmen der qPCR quantifiziert und vermessen wird.

#### 2.2.5.1 Isolation der renalen mRNA

Die Isolation der RNA aus gefrorenen Nierenhälften basiert auf der von *Chomczynski und Sacchi* 1987 entwickelten Guanidinium-Phenol-Chloroform-Methode.

In einem ersten Schritt wurden die auf -80°C eingefrorenen Nierenhälften zum Transport ins entsprechende Labor in flüssigen Stickstoff überführt und mit einem Ultra-Turrax Mixer in 1 ml TriFast für ca. 30 s homogenisiert und auf Eis gesetzt. Durch das im Trizol enthaltene Phenol werden Proteine und DNA gelöst, wohingegen die RNA in der wässrigen Phase verbleibt.

Der Ultra-Turrax Mixer wurde zwischen dem Homogenisieren der verschiedenen Nierenhälften immer mit Milli-Q-Wasser gesäubert, um eine Verunreinigung zu vermeiden.

Die homogenisierten Organe wurden für 5 min bei RT inkubiert und anschließend mit 1/5 des Gesamtvolumens an Chloroform (= 200 µl) schonend invertiert, um die DNA nicht zu zerstören. Das Gemisch wurde dann für 20 min bei 4°C und mit 13.000 U/min zentrifugiert.

Nach diesem Schritt bildete sich ein Mehrphasengemisch aus einer roten, DNA-haltigen Phenolphase, einer weißen, proteinhaltigen Interphase und einem wässrigen, RNA-haltigen Überstand, welcher abpipettiert werden konnte. Für die anschließende Fällung der RNA wurde 500 µl Isopropanol 100% zugegeben, die Proben kurz gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss daran wurden die

Proben für 30 min bei 4°C und mit 13.000 U/min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte der restliche Überstand verworfen werden, sodass ein glasiges RNA-Pellet zurückblieb. Dieses Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol bei RT gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation mit 13.000 U/min bei 4°C für 5 min konnte der Überstand erneut verworfen, das Pellet für 10 min bei RT getrocknet und abschließend in bis zu 200 µl Milli-Q-Wasser gelöst und gevortext werden. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Pellet bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.5.2 Synthese der cDNA

Mit Hilfe des Nanodrop-Photometers wurde der RNA-Gehalt der Proben bestimmt. Aus dem Quotienten der optischen Dichte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm wurde jeweils die Qualität der isolierten RNA gemessen und nur RNA mit einem Quotienten über 1,8 für die reverse Transkription verwendet.

Dabei wurde die isolierte RNA mittels des Enzyms reverse Transkriptase in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Da dieses Enzym in der Lage ist eine RNA als Matrize zu verwenden, nutzt man diese Eigenschaft, um anhand dieser RNA-Matrize einen RNA-DNA-Hybridstrang herzustellen. Der Vorteil, der sich daraus ergibt ist eine deutlich stabilere Form, kein Verlust relevanter Informationen und eine Analyse mittels PCR-Techniken.

Dafür wurde ein bestimmtes Volumen an RNA eingesetzt, welches 1 µg entsprach und auf ein Gesamtvolumen von 9 µl mit Milli-Q-Wasser aufgefüllt.

Anschließend wurde für die Transkription der mRNA, die einen Poly-A-Schwanz aufweist, jeweils 1 µl Oligo-dT-Primer hinzugefügt, da diese selektiv an die Poly-A-Schwänze der mRNA binden.

Zur cDNA-Synthese wurde folglich in der entsprechenden Reihenfolge Milli-Q-Wasser (ad 10 µl), 1 µl Oligo-dT-Primer und jeweils 1 µg der isolierten RNA pipettiert und für 5 min bei 65°C im Thermoblockcycler inkubiert.

Im Anschluss daran wurden je 10 µl des folgenden RT-Mixes hinzugegeben:

<b>Chemikalie</b>	<b>Volumen (µl)</b>
Millipore-Q-Wasser	1
dNTP (2,5 mM)	4
5 x Puffer	4
Reverse Transkriptase	1



Die Proben wurden für die cDNA-Synthese zunächst für 1 h bei 37°C im Thermoblockcycler inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wurden die Proben anschließend für 2 min auf 95°C erhitzt.

Die erhaltene cDNA wurde abschließend mit 35 µl Milli-Q-Wasser verdünnt und bis zur qPCR bei -20°C gelagert.

### 2.2.5.3 Quantitative Realtime-PCR

Die Quantifizierung der mRNA wurde am LightCycler 480-Gerät unter Verwendung des LightCycler® 480 SYBR Green Master Mix Kits von Roche durchgeführt. Dabei erfolgte bei der quantitativen Polymerasekettenreaktion (qPCR) nach jedem Zyklus eine photometrische Bestimmung der entstandenen DNA-Menge. Diese wurde hierbei indirekt bestimmt, indem der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, welcher mit hoher Affinität an doppelsträngige DNA bindet, gemessen wurde.

In die 96-Wellplatten wurden die cDNA-Proben inklusive der zugehörigen Standardverdünnungsreihen mit 1:10, 1:100 und 1:1000 pipettiert.

In jedes Well wurde pro Probe 1 µl cDNA und 9 µl des folgenden PCR-Master-Mixes pipettiert:

Chemikalie	Volumen (µl)
LightCycler® 480 SYBR Green Master	5
Milli-Q-Wasser	3
Primer-Mix (sense + antisense)	1

Anschließend wurde die Well-Platte für 2 min bei 2500 U/min zentrifugiert und anschließend für die Messung in den Light Cyclyer gestellt.

Phase	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
Pre-Inkubation	1	95°C	10 min
Denaturierung	45	95°C	15 s
Annealing		58°C	15 s
Elongation		72°C	20 s

Nach jedem Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen und am Ende aller Zyklen wurde die Schmelzkurve der amplifizierten DNA bestimmt.

Als Housekeeper-Gen wurde entweder GAPDH oder RPL32 als nicht mitregulierte Kontrollgene verwendet.

### 2.2.6 Statistische Analysen

Sofern nicht anders angegeben, wurden die ermittelten Messwerte jeweils als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe des ANOVA und des Student's t-Test berechnet. Statistiken mit der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant bezeichnet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Expression von NFAT5 im FoxD1-Kompartiment der Niere

Im Kapitel 1.3.2 wurde NFAT5 bereits als ein wichtiger osmoprotektiver Faktor in der Niere beschrieben. In einem ersten Schritt wurde zunächst durch Co-Hybridisierung mit nierenzellspezifischen Markern die NFAT5 Expression exakt spezifischen Nierenstrukturen zugewiesen. Diese Lokalisationsstudien wurden dabei zunächst an Wildtyp-Mäusen unter basalen Bedingungen durchgeführt. Die genauen Expressionsorte von NFAT5 im FoxD1-Kompartiment unter basalen Bedingungen der Wildtyp-Niere wurden anschließend mit Mausnieren, denen der NFAT5 im FoxD1-Kompartiment fehlt, verglichen.

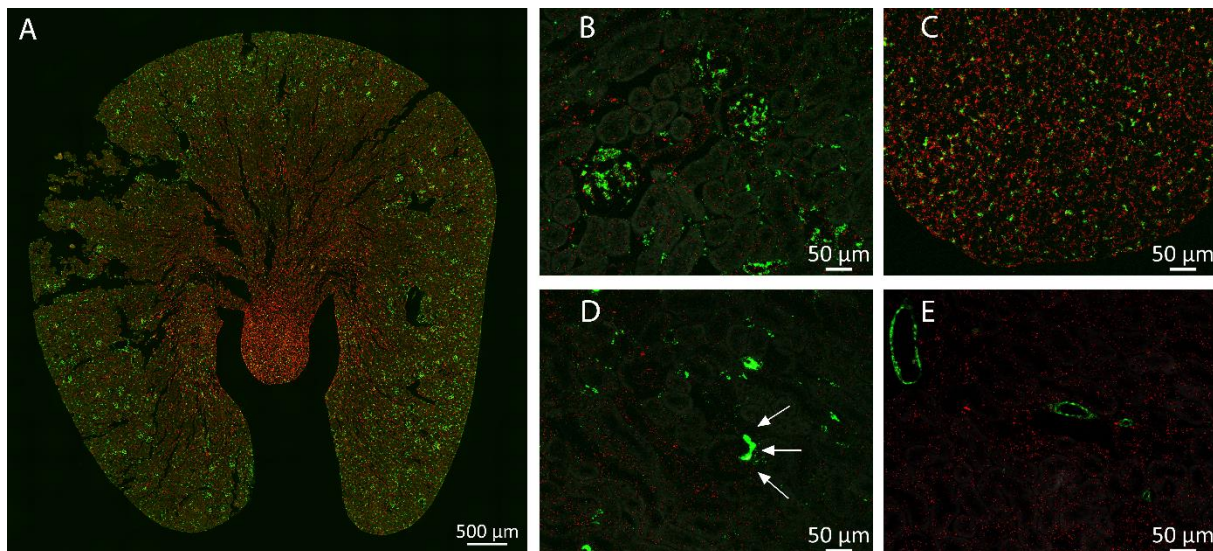
Um einen ersten Eindruck über die Verteilung von NFAT5 in der Wildtyp-Niere zu bekommen, wurden Übersichtsaufnahmen von wildtypischen Nierenschnitten angefertigt (**Abb. 5 A**). Dabei konnte ein Gradient von NFAT5 gesehen werden, welcher vom Cortex, über die äußere Medulla bis hin zur Papille deutlich zunimmt.

Mit Hilfe von PDGFR $\beta$  als Marker für Mesangialzellen in den Glomeruli bzw. als Marker für interstitielle Zellen konnte eine Kolo-kalisation von NFAT5 mit PDGFR $\beta$  gefunden werden. Es zeigte sich sowohl in den Mesangialzellen der Glomeruli (**Abb. 5 B**) als auch in den interstitiellen Zellen der Papille (**Abb. 5 C**) eine Überlagerung von NFAT5 mit PDGFR $\beta$ . Daraus lässt sich schlussfolgern, dass NFAT5 in den PDGFR $\beta$ -positiven Zellen der Niere exprimiert wird.

Als weiterer möglicher Expressionsort von NFAT5 wurden juxtaglomeruläre Zellen, die das Hormon Renin bilden, betrachtet. Dafür wurden Nierenschnitte von Wildtyp-Mäusen mit der Sondenkombination aus NFAT5 und Renin hybridisiert. Dabei zeigte sich eine geringe Expression von NFAT5 in Reninzellen (**Abb. 5 D**).

Des Weiteren wurde mittels  $\alpha$ -SMA eine mögliche Expression von NFAT5 in glatten Muskelzellen überprüft. Jedoch konnte keine Korrelation zwischen  $\alpha$ -SMA und NFAT5 in NFAT5 flfl Tieren nachgewiesen werden (**Abb. 5 E**). Somit kommt der Transkriptionsfaktor in den glatten Muskelzellen der wildtypischen Nieren nicht vor.

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Bildtafel (**Abb. 5**) festhalten, dass NFAT5 in allen Zellen des FoxD1-Kompartiments, mit Ausnahme der glatten Muskelzellen, vorkommt.



**Abbildung 5:** Darstellung der Expression von NFAT5 in wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Nieren mittels mRNA-scope-Technik. NFAT5 zeigt in der Übersichtsaufnahme eine deutliche Zunahme in der Papille der Wildtyp-Niere (Abb. 5 A: NFAT5 rot, PDGFR $\beta$  grün dargestellt). Nachweis des Vorkommens von NFAT5 in den Detailaufnahmen in PDGFR $\beta$ -positiven Mesangiumzellen der Glomeruli (Abb. 5 B: NFAT5 rot, PDGFR $\beta$  grün dargestellt), in PDGFR $\beta$ -positiven interstitiellen Zellen der Papille (Abb. 5 C: NFAT5 rot, PDGFR $\beta$  grün dargestellt) und in Renin bildenden (weiße Pfeile in Abb. 5 D) juxtaglomerulären Zellen (Abb. 5 D: NFAT5 rot, Renin grün dargestellt). Jedoch kein Nachweis von NFAT5 in glatten Muskelzellen (Abb. 5 E: NFAT5 rot,  $\alpha$ -SMA grün dargestellt).

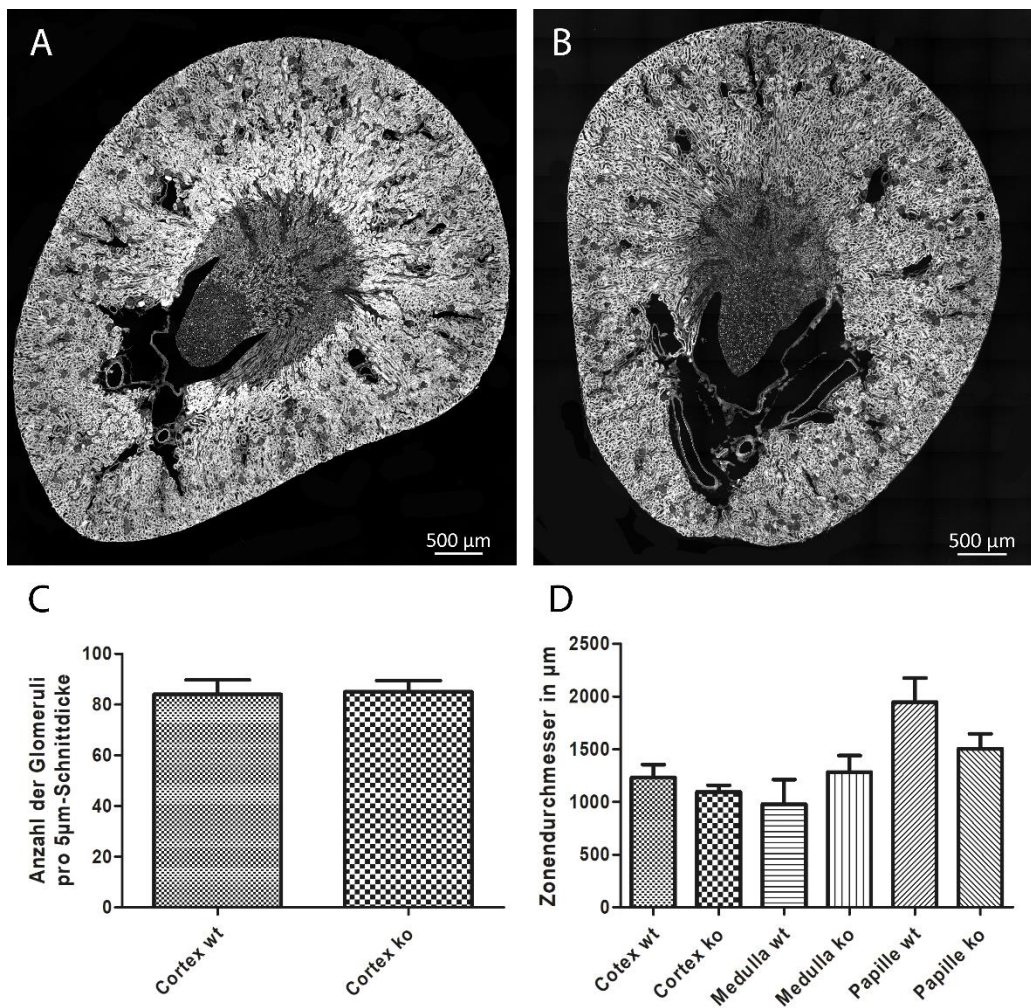
### **3.2 Auswirkungen der Deletion von NFAT5 im Stromakompartiment auf die Nierenentwicklung**

Mäuse mit einer globalen Deletion von NFAT5 weisen morphologische und funktionelle Veränderungen in der Niere auf. Um zu überprüfen, ob Zellen, die sich aus FoxD1-positiven Stromazellen entwickeln, für diese Entwicklungsdefekte verantwortlich sind, wurde die renale Entwicklung in FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Mäusen untersucht.

Um morphologische Veränderungen der Niere sehen zu können, wurden Übersichtsaufnahmen von Nierenschnitten der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Tiere und der Kontrolltiere angefertigt (**Abb. 6 A und B**). Die Nieren der Tiere mit NFAT5 Deletion in Stromazellen zeigten dabei eine normale Entwicklung und eine ähnliche Größe wie die Wildtyp-Nieren. Zudem konnten keine makroskopischen Anomalien festgestellt werden, die Papille in den Knockout-Tieren war normal und zeigte keine atrophischen Veränderungen.

Als weiterer Parameter wurde die Entwicklung von Nephronen betrachtet. Dazu wurde in jeweils fünf Nierenschnitten von Knockout- und Wildtyp-Tieren die Anzahl der Glomeruli pro Nierenschnitt ausgezählt. Dabei konnte kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden (**Abb. 6 C**). Letztendlich sollte die renale

Entwicklung durch die quantitative Analyse der Nierenzonen betrachtet werden (**Abb. 6 D**). Dazu wurde die Breite von Cortex, äußerer Medulla und innerer Medulla auf Nierenschnitten von Knockout- und Wildtyp-Mäusen bestimmt. Auch hier zeigte sich bei den  $FoxD1^{Cre+}$ -NFAT5 *fl/fl* Tieren kein Unterschied im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle.



**Abbildung 6:** Dargestellt sind jeweils eine Nieren-Übersichtsaufnahme von  $FoxD1^{Cre+}$ -NFAT5 *fl/fl* Wildtyp- (A) und Knockout-Mäusen (B) mittels Durchlichtaufnahme, sowie die mRNA-Daten zur Anzahl der Glomeruli pro 5 µm Nierenschnitt (C) und zum Zonendurchmesser (D) im Vergleich zwischen Wildtyp- (wt) und Knockout- (ko) Mäusen.

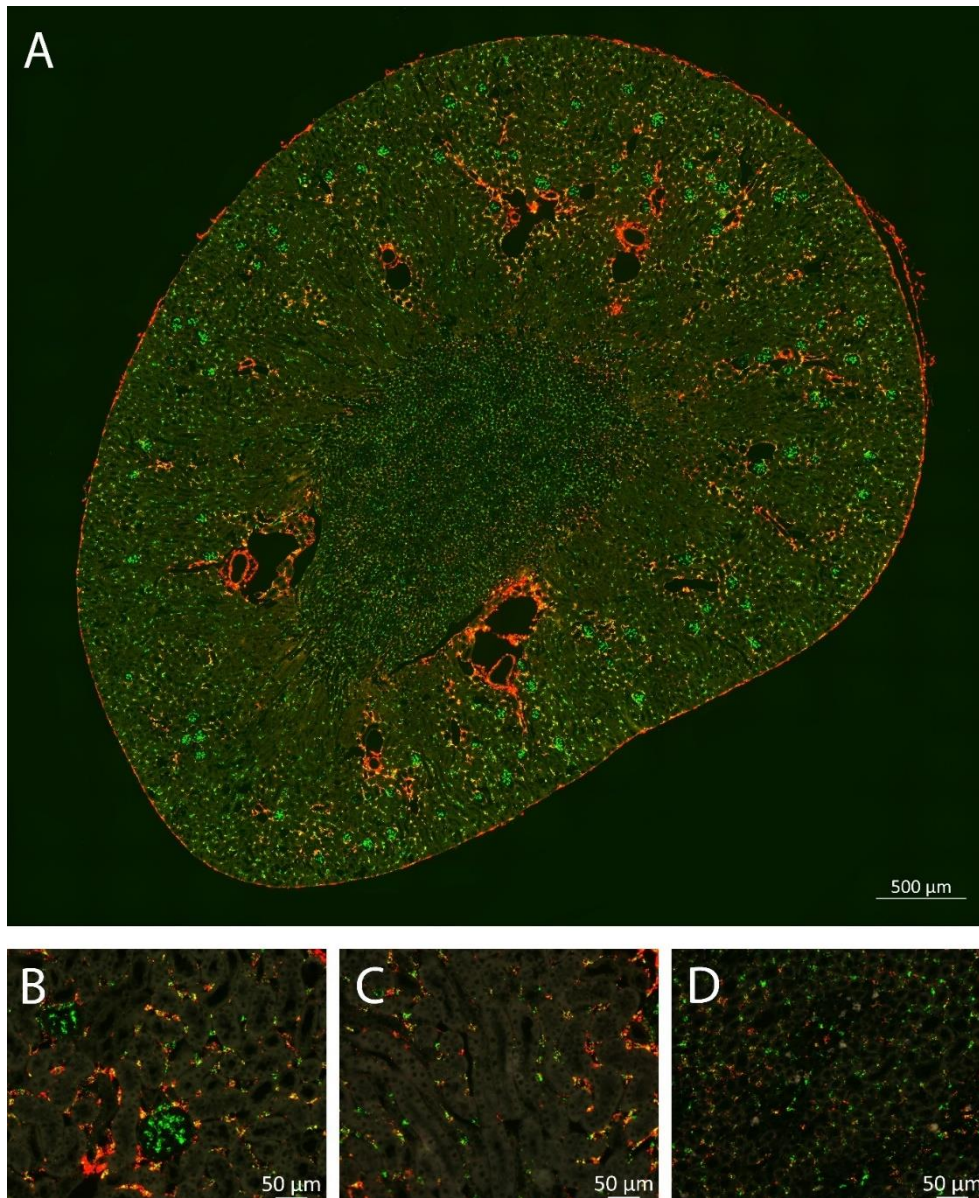
### **3.3 Bedeutung der NFAT5 Deletion für die Expression profibrotischer und proinflammatorischer Gene in basalen Wildtyp- und Knockout-Mäusen**

FoxD1 gilt als Marker für mesenchymale renale Stromazellen, aus denen sich glatte Gefäßmuskelzellen, Reninzellen, Mesangialzellen und interstitielle renale Zellen entwickeln. In den FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Mäusen, in denen der Transkriptionsfaktor NFAT5 in den FoxD1-positiven Zellen gezielt ausgeknockt wurde, fehlt folglich NFAT5 in den obengenannten Zellen. Um zu überprüfen, ob eine NFAT5 Deletion Auswirkungen auf die Expression profibrotischer und proinflammatorischer Gene zeigt, wurde die Expression dieser Gene in basalen Wildtyp- und Knockout-Mäusen miteinander verglichen.

Dazu wurden die 5 µm Nierenschnitte mittels der mRNA-scope-Technik mit unterschiedlichen Sondenkombinationen hybridisiert und die Expression der profibrotischen und proinflammatorischen Gene in basalen Wildtyp- und Knockout-Mäusen bestimmt. Zunächst wurden Übersichts- sowie Detailbilder von unterschiedlichen Fibrosemarkern und proinflammatorischen Genen in PDGFRβ-positiven Zellen erstellt und anschließend mit mRNA-Daten der Realtime-PCR verglichen.

Als Fibrosemarker wurde Col1a1 mit PDGFRβ als Marker für Mesangialzellen und interstitielle renale Zellen in Wildtyp- und Knockout-Nieren mittels mRNA-scope-Technik hybridisiert.

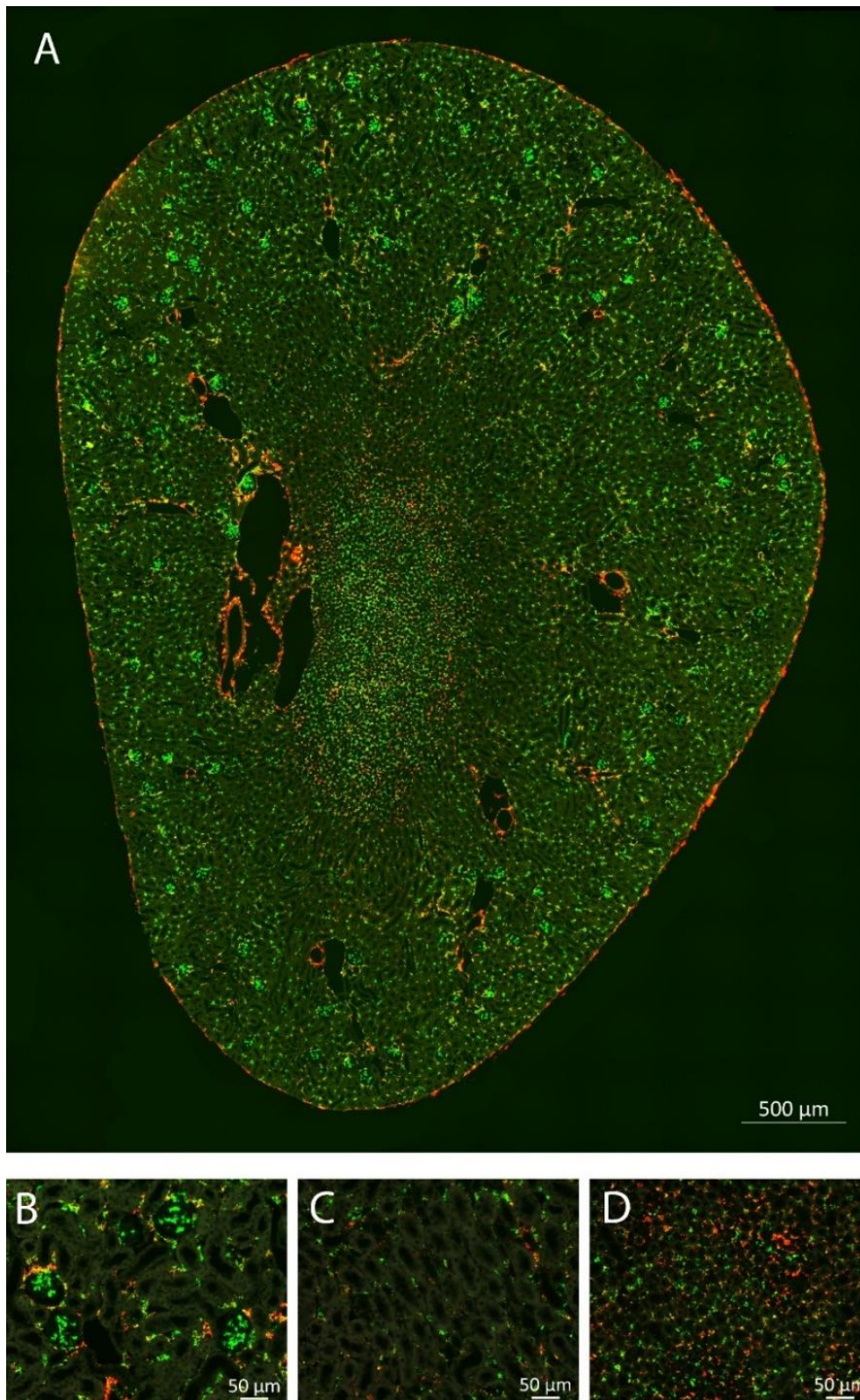
Die wildtypische Mausniere (**Abb. 7**) zeigt dabei ein bekanntes Bild. So kommt Col1a1 sowohl im Cortex, in der äußeren Medulla sowie mit geringer Abundanz in der Papille vor. Bereits am Übersichtsbild lässt sich Col1a1 vor allem interstitiell und um Gefäße erkennen (**Abb. 7 A**). Bei Betrachtung der Detailbilder zeigt sich, dass Col1a1 zwar im Cortex exprimiert wird, jedoch in den Glomeruli fehlt (**Abb. 7 B**). Aufgrund der Überlagerung von Col1a1 mit PDGFRβ sowohl in der äußeren Medulla als auch in der Papille (**Abb. 7 C und D**) lässt sich die interstitielle Expression von Col1a1 bestätigen.



**Abbildung 7:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. *Col1a1* ist dabei rot und *PDGFRβ* grün dargestellt.

Die *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere zeigt anhand des Übersichtsfotos der mRNA-scope-Technik ein ähnliches Bild wie die wildtypische Niere (**Abb. 8 A**), wobei bereits bei dieser 20-fachen Vergrößerung ein Anstieg von *Col1a1* in der Papille deutlich wird. Dieser Anstieg von *Col1a1* zeigt sich auch im Detailbild der Papille (**Abb. 8 D**). Der Expressionsort von *Col1a1* und *PDGFRβ* unterscheidet sich zwischen der Wildtyp- und der Knockout-Niere nicht. So kommt *Col1a1* in der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere auch in den *PDGFRβ*-positiven interstitiellen Zellen vor. Im Vergleich zur Wildtyp-Niere

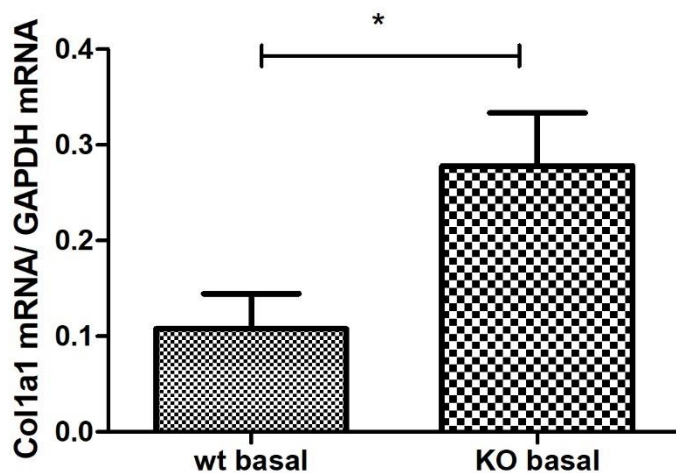
kann weder im Cortex (**Abb. 8 B**) noch in der äußeren Medulla (**Abb. 8 C**) ein Unterschied gesehen werden.



**Abbildung 8:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer  $FoxD1^{Cre+}$ -NFAT5<sup>fl/fl</sup> Niere mittels mRNA-scope-Technik.  $Col1a1$  ist dabei rot und  $PDGFR\beta$  grün dargestellt.



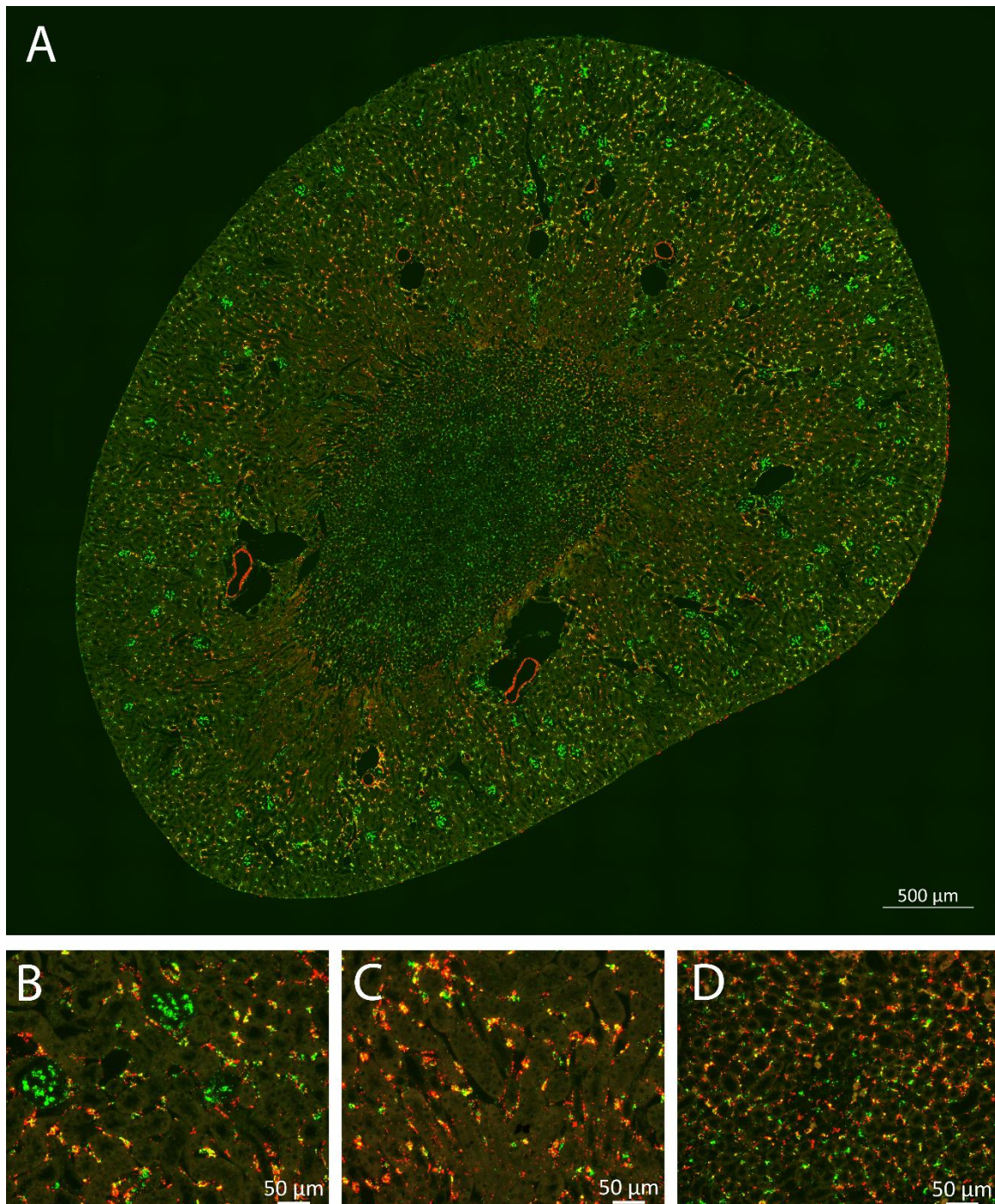
Mittels der quantitativen Realtime-PCR wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der wildtypischen Mausniere und der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere gemessen (**Abb. 9**). So konnte ein Anstieg von Col1a1 um ca. den Faktor 3 in der Knockout-Niere festgestellt werden. Diese vermehrte Expression von Col1a1 in der Knockout-Niere ist somit äquivalent zu den Ergebnissen, die mittels der mRNA-scope-Technik dargestellt wurden.



**Abbildung 9:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich in Bezug auf Col1a1 ein signifikanter Unterschied (\*  $p < 0,05$  stellt eine signifikante Änderung dar) zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

Als weiterer Fibrosemarker wurde Fibronectin betrachtet. Auch hierbei stellte sich die Frage, ob die NFAT5 Deletion Fibronectin als profibrotisches Gen hochreguliert. Fibronectin, welches zu den extrazellulären Matrixkomponenten zählt, wird unter anderem von Fibroblasten, Makrophagen und bestimmten Epithelzellen gebildet. Fibronectin wurde dabei ebenfalls mit PDGFR $\beta$  hybridisiert und in Wildtyp- und Knockout-Nieren miteinander verglichen. Im Übersichtsbild der wildtypischen Mausniere erkennt man bereits, dass Fibronectin vor allem im Cortex sowie in der äußeren Medulla exprimiert wird, wohingegen es, zumindest auf dem Übersichtsbild so scheint, als würde Fibronectin in der Papille nur schwach exprimiert werden (**Abb. 10 A**). Bei Betrachtung der Detailbilder kann diese Kolo-kalisation von Fibronectin und PDGFR $\beta$  sowohl im Cortex (**Abb. 10 B**) als auch in der äußeren Medulla (**Abb. 10 C**) gesehen werden. Eine vereinzelte Kolo-kalisation tritt auch in der Papille auf (**Abb. 10 D**).

Die Kolo-kalisation von Fibronektin und PDGFR $\beta$  lässt darauf schließen, dass Fibronektin in den interstitiellen Zellen des Wildtyps vorkommt.

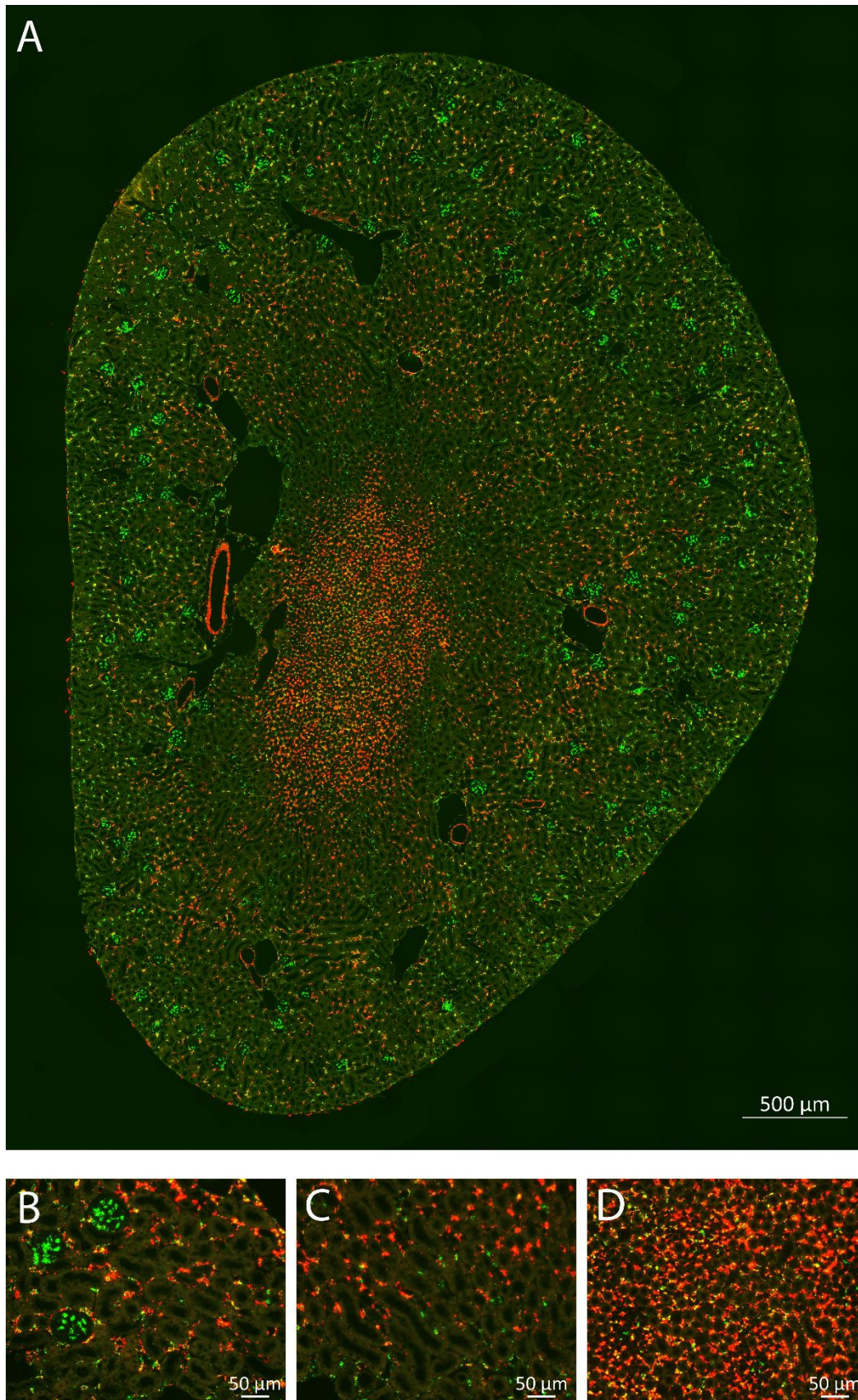


**Abbildung 10:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. Fibronektin ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt.

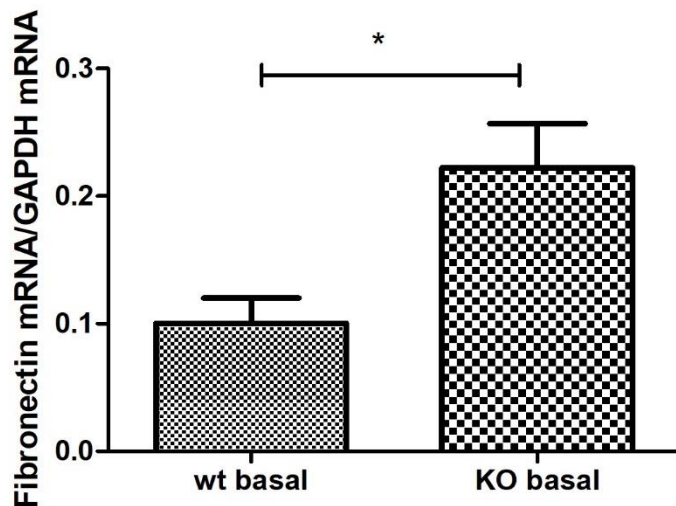
In einem weiteren Schritt wurde diese Wildtyp-Niere mit Fibronectin und PDGFR $\beta$  mit der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere in Bezug auf einen Anstieg des profibrotischen Markers Fibronectin verglichen. Dabei fällt bereits in der Übersichtsaufnahme (**Abb. 11 A**) ein deutlicher Anstieg von Fibronectin in der Papille der Knockout-Niere auf. Im Bereich des Cortex (**Abb. 11 B**) sowie der äußeren Medulla (**Abb. 11 C**) scheint es keinen Unterschied zwischen der Knockout-Niere und der Kontrollniere zu geben. Der Anstieg in der Papille der Knockout-Niere ist auch sehr deutlich im Detailbild der Papille zu sehen (**Abb. 11 D**). Eine Kolo-kalisation von Fibronectin und PDGFR $\beta$  lässt sich auch in der Knockout-Niere erkennen. Folglich erfolgt auch der Anstieg von Fibronectin in der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere in den PDGFR $\beta$ -positiven interstitiellen Zellen.

Ein Unterschied zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere konnte auch mit Hilfe der quantitativen Realtime-PCR belegt werden (**Abb. 12**). Tatsächlich konnte hier ein signifikanter Anstieg von Fibronectin um ca. den Faktor 2 in der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere gefunden werden. Diese vermehrte Anreicherung von Fibronectin in der Knockout-Niere korreliert somit mit den Ergebnissen, welche mit der in-situ-Hybridisierung dargestellt wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Fibronectin sowohl in der basalen Wildtyp-Niere als auch in der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere in den PDGFR $\beta$ -positiven interstitiellen Zellen exprimiert wird. Des Weiteren kommt es in den Nierenpapillen der Knockout-Mäuse zu einem signifikanten Anstieg des Fibrosemarkers Fibronectin.



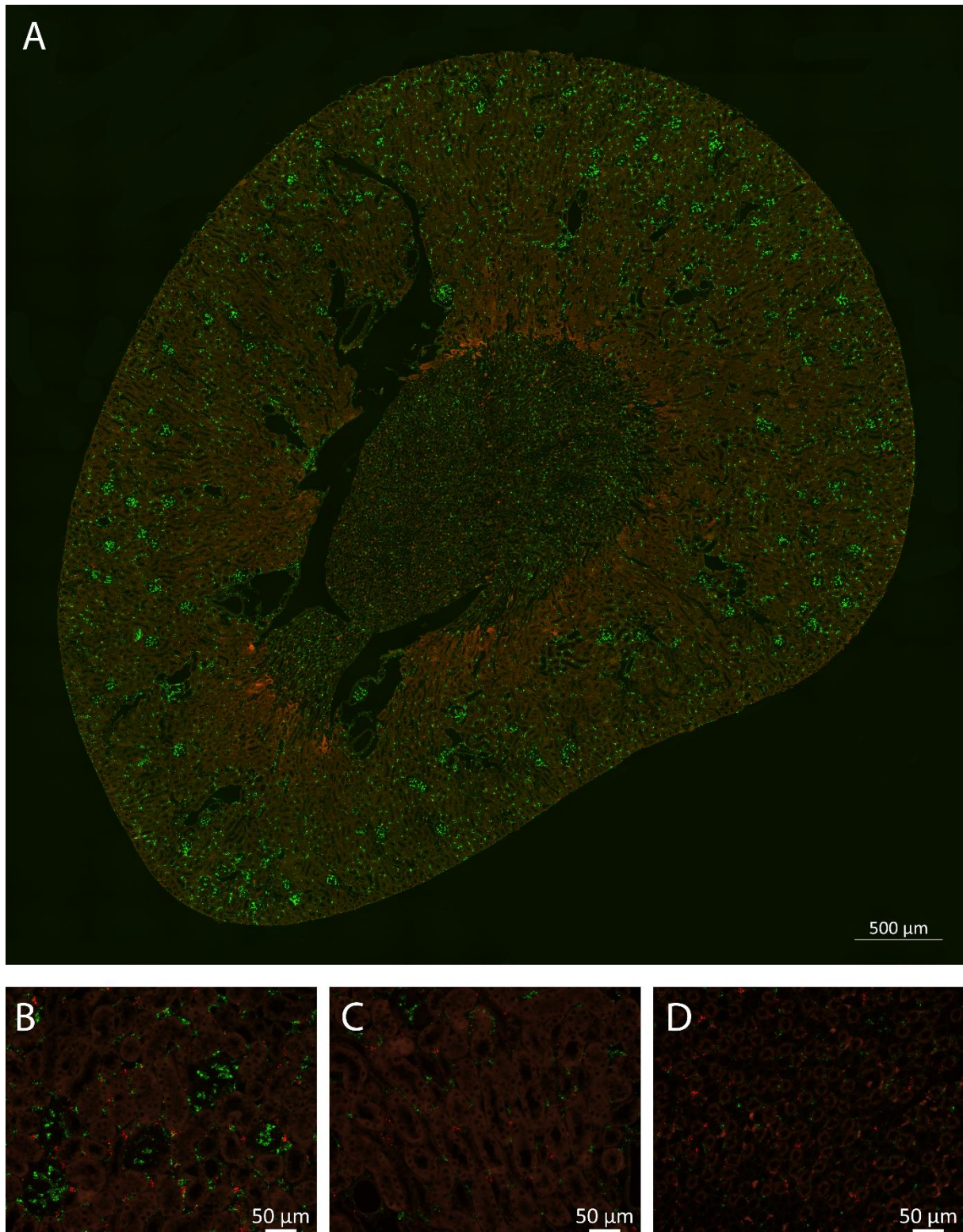
**Abbildung 11:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. Fibronectin ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt.



**Abbildung 12:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich in Bezug auf Fibronectin ein signifikanter Unterschied (\*  $p < 0,05$  stellt eine signifikante Änderung dar) zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

Um feststellen zu können, ob es im Hinblick auf die Expression proinflammatorischer Gene einen Unterschied zwischen der Wildtyp- und der Knockout-Niere gibt, wurde in einem weiteren Versuch das proinflammatorische Gen F4/80 mit PDGFR $\beta$  hybridisiert. Dabei sollte festgestellt werden, ob es in der Knockout-Niere zu einer vermehrten Infiltration von F4/80 positiven Makrophagen kommt. F4/80 stellt nämlich einen spezifischen Marker für Makrophagen der Maus dar.

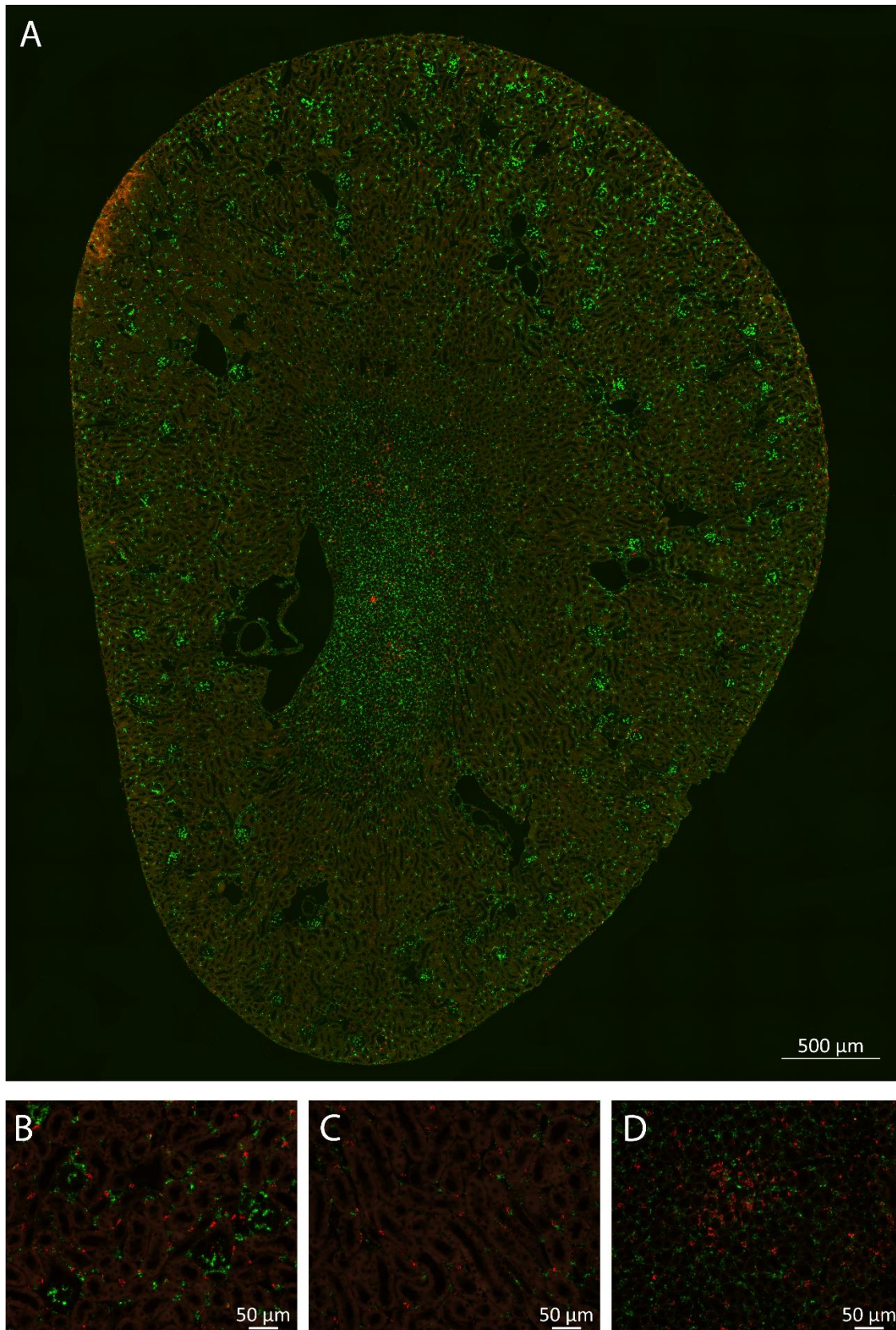
Im Übersichtsbild der wildtypischen Niere fällt auf, dass F4/80 insgesamt nur sehr gering exprimiert ist (**Abb. 13 A**). Zur gleichen Erkenntnis kommt man bei Betrachtung der Detailbilder. So zeigt sich zwar eine geringe Expression von F4/80 positiven Makrophagen im Cortex (**Abb. 13 B**), in der äußeren Medulla (**Abb. 13 C**) und in der Papille (**Abb. 13 C**), eine Überlagerung mit PDGFR $\beta$ -positiven interstitiellen Zellen fehlt jedoch.



**Abbildung 13:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. F4/80 ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt.

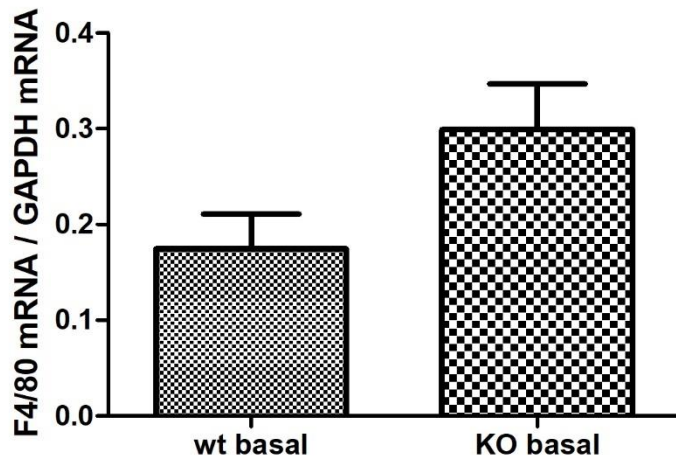
Bei Betrachtung der Übersichtsaufnahme der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere fällt zunächst kein signifikanter Unterschied zur Kontrollniere auf (**Abb. 14 A**). Wenn man allerdings die Detailbilder näher betrachtet, kann man einen leichten Anstieg F4/80 positiver Makrophagen in der Papille erkennen (**Abb. 14 D**). Im Bereich des Cortex (**Abb. 14 B**) und der äußeren Medulla (**Abb. 14 C**) der Knockout-Niere gibt es keine Unterschiede zur Kontrollniere. Zudem fehlt auch in der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere eine Überlagerung PDGFR $\beta$ -positiver interstitieller Zellen und F4/80. Folglich lässt sich festhalten, dass die NFAT5 Deletion in renalen Stromazellen zu keiner vermehrten Infiltration mit Makrophagen führt.

Die Erkenntnisse der mRNA-scope-Technik werden zusätzlich durch die Ergebnisse der quantitativen Realtime-PCR bestätigt. So konnte auch hier kein signifikanter Unterschied, lediglich eine tendenzielle Erhöhung, zwischen der Expression von F4/80 in der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere und der Kontrollniere gefunden werden (**Abb. 15**).



**Abbildung 14:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5<sup>fl/fl</sup>* Niere mittels mRNA-scope-Technik. F4/80 ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt.

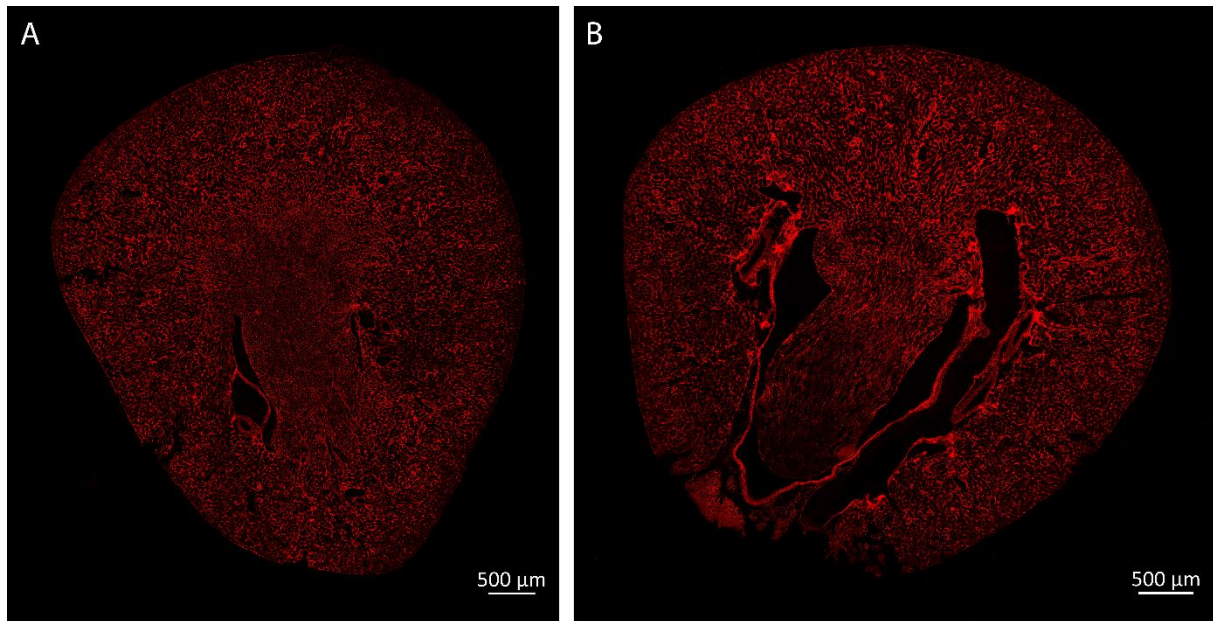




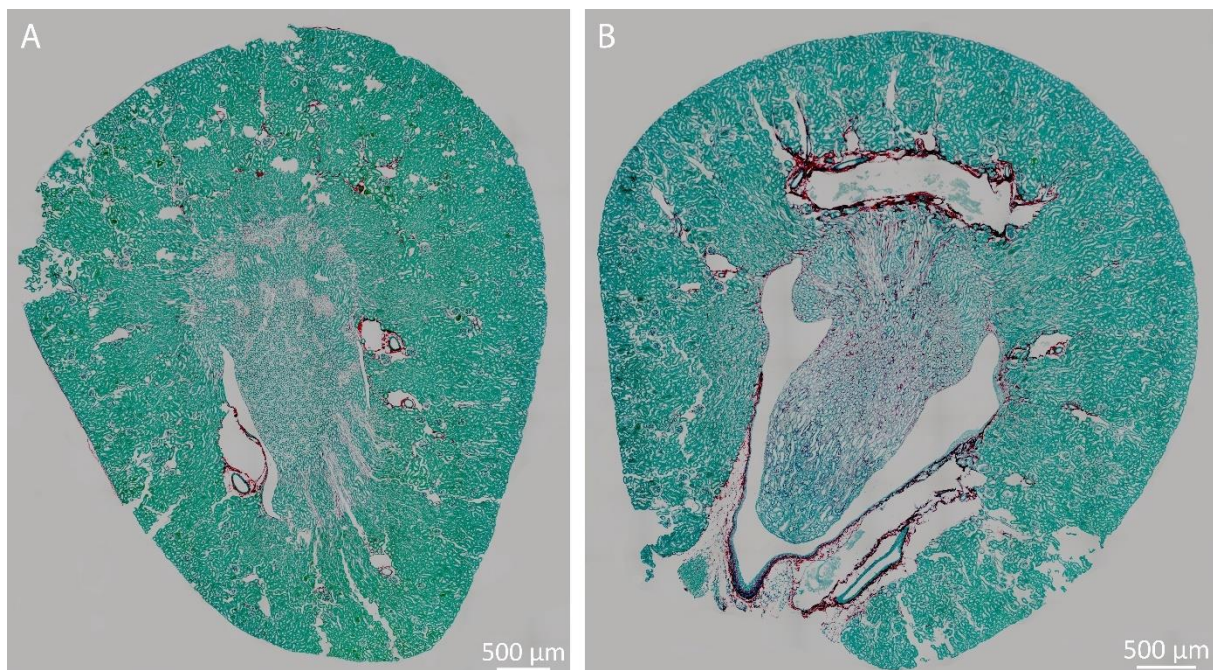
**Abbildung 15:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich zwar eine minimale Erhöhung von F4/80 in der basalen Knockout-Niere erkennen, ein signifikanter Unterschied in Bezug auf F4/80 zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere konnte jedoch nicht festgestellt werden. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

Um den signifikanten Anstieg der Col1a1 mRNA Expression in der wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere und der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere noch deutlicher zu belegen, wurde zusätzlich zu den oben dargestellten mRNA-scope-Aufnahmen und der quantitativen Realtime-PCR die Proteinexpression mittels immunhistochemischer Färbung von Col1a1 sowie eine Fast-Green-Siriusrot-Färbung durchgeführt. Es konnte auch hier ein Anstieg von Col1a1 in der Knockout-Niere (**Abb. 16 B**) im Vergleich zur wildtypischen Kontrollniere gezeigt werden (**Abb. 16 A**).

In einem weiteren Versuch wurden 5 µm dicke Nierenschnitte einer wildtypischen- und einer Knockout-Niere mittels einer Fast-Green-Siriusrot-Färbung untersucht. Mit Hilfe der Siriusrot-Färbung kann das Gesamtkollagen in Geweben quantifiziert werden. Wie im Methodenteil bereits erklärt, beruht diese Methode auf einer Reaktion des Farbstoffes Siriusrot mit den Seitenketten des Kollagens, wodurch kollagenes Bindegewebe bei der Durchlichtmikroskopie rot und anderes Gewebe grün dargestellt wird. Dafür wurden wiederum Übersichtsaufnahmen einer Wildtyp-Niere (**Abb. 17 A**) und einer Knockout-Niere (**Abb. 17 B**) miteinander verglichen. Auch hier konnte der deutliche Anstieg der Gesamtkollagenabundanz, vor allem in der Papille der Knockout-Niere, gefunden werden. Mit diesen beiden Versuchen konnte eine Erhöhung von Kollagenen in der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere auch auf Proteinebene nachgewiesen werden.



**Abbildung 16:** Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen einer wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere (A) und einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere (B) mittels immunhistochemischer Färbung. Als primärer Antikörper wurde hierbei Col1a1 (rot dargestellt) verwendet. Es zeigt sich ein Anstieg von Col1a1 in der Knockout-Niere.



**Abbildung 17:** Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen einer wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere (A) und einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere (B) mittels einer Fast-Green-Siriusrot-Färbung. Dabei stellt sich kollagenes Bindegewebe rot und anderes Gewebe grün dar. Es zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg von Gesamtkollagen, vor allem in der Papille der Knockout-Niere.

Als Zusammenfassung lässt sich festhalten, dass die Expression profibrotischer Gene wie Col1a1 und Fibronectin bei den FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Mäusen signifikant ansteigen. Das bedeutet, dass bei einer Deletion von NFAT5 die Fibrosemarker in der Niere hochreguliert werden. Warum das Fehlen von NFAT5 jedoch zur Erhöhung von Col1a1 und Fibronectin führt, muss durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

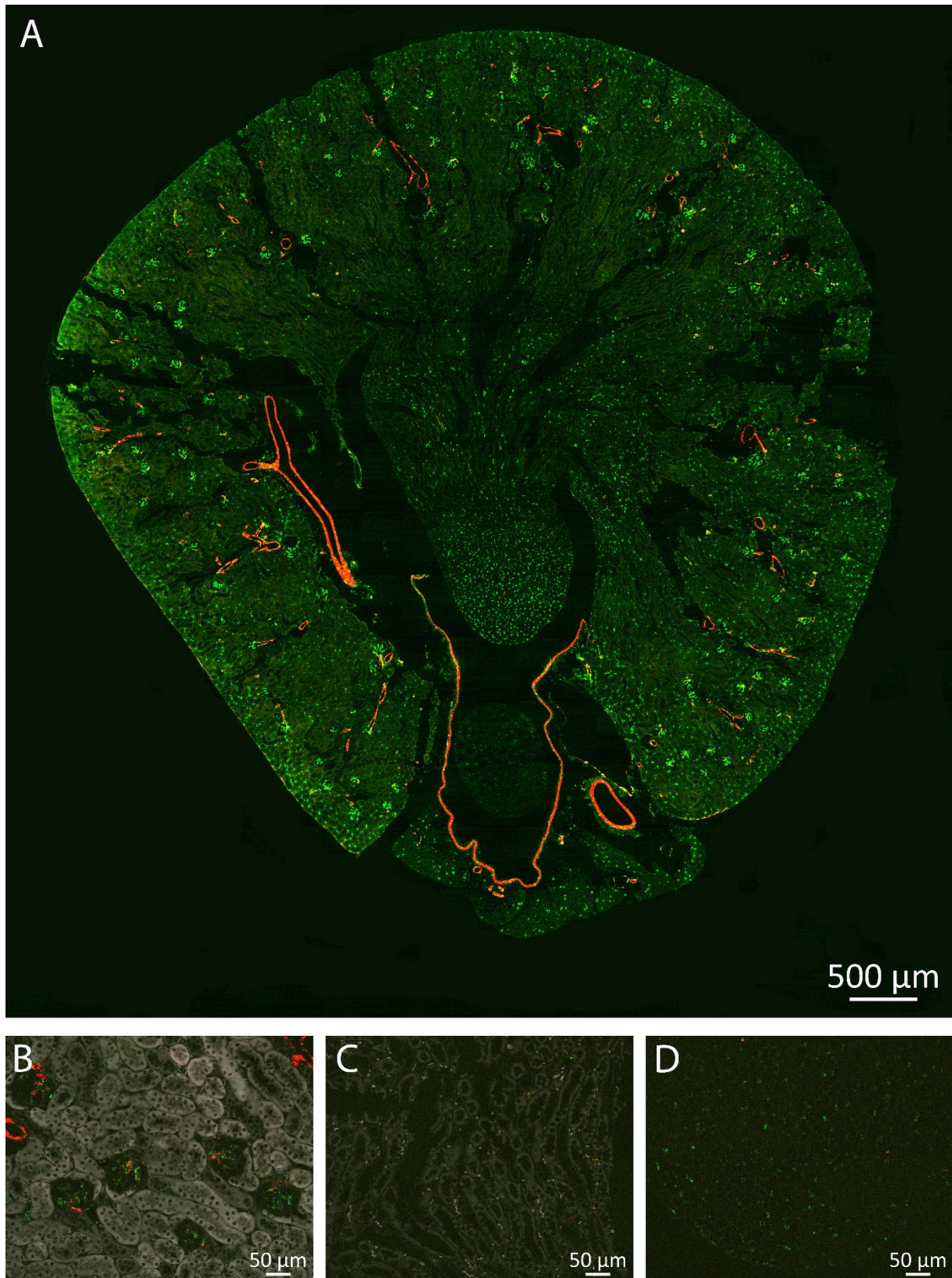
Im Hinblick auf die Expression proinflammatorischer Gene wie F4/80 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Wildtyp-Niere und der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere gezeigt werden.

### **3.4 Bedeutung der NFAT5 Deletion für die Entwicklung von Myofibroblasten in basalen Wildtyp- und Knockout-Mäusen**

Weiterhin stellte sich die Frage, ob eine Deletion des Transkriptionsfaktors NFAT5 Auswirkungen auf die Entwicklung von Myofibroblasten hat. Myofibroblasten sind kontraktile Zellen, die Bestandteile der Extrazellulärmatrix synthetisieren und bei der Wundheilung extrazelluläre Kollagenfasern produzieren. Ihre Aktivierung spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer Fibrose. Deswegen sollte untersucht werden, ob es bei Mäusen, bei denen der NFAT5 in interstitiellen Fibroblasten deletiert ist, im Vergleich zum Wildtyp, zu einer vermehrten Bildung von Myofibroblasten und infolgedessen zu einer Fibrose kommt.

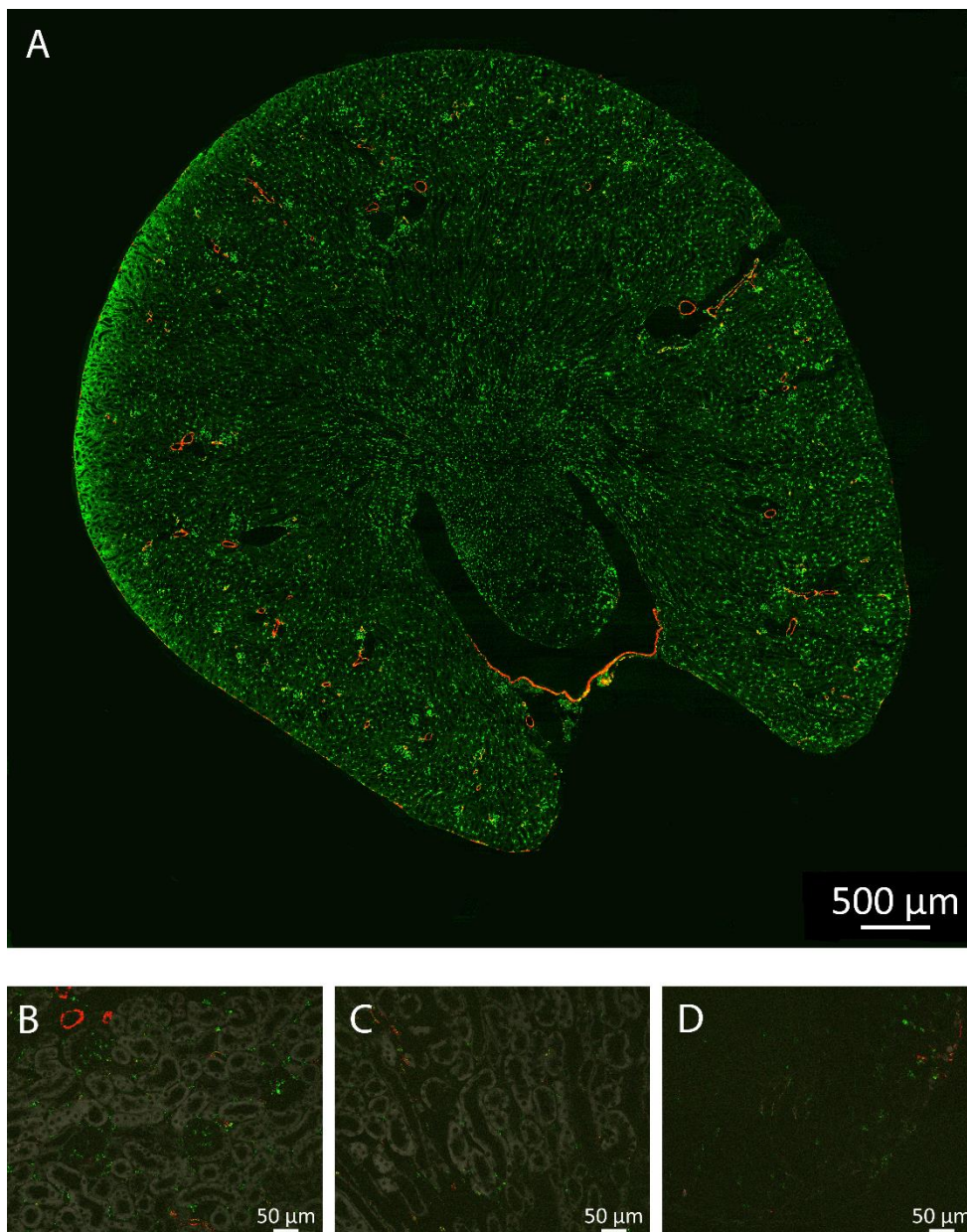
Um dies herauszufinden, wurden wiederum 5 µm dicke Nierenschnitte von Wildtyp- und Knockout-Mäusen mit der mRNA-scope-Technik analysiert. Dabei wurde als Sondenkombination alpha smooth muscle actin (Abkürzungen: α-SMA, asma) mit PDGFRβ hybridisiert.

Im Übersichtsbild der Wildtyp-Niere lässt sich α-SMA in den Gefäßen bzw. in glatten Muskelzellen erkennen (**Abb. 18 A**). Zudem kommt α-SMA in den Glomeruli vor, wo es zum Teil mit PDGFRβ-positiven Zellen korreliert (**Abb. 18 B**). In der äußeren Medulla (**Abb. 18 C**) sowie in der Papille (**Abb. 18 D**) der Wildtyp-Niere fehlt α-SMA allerdings.



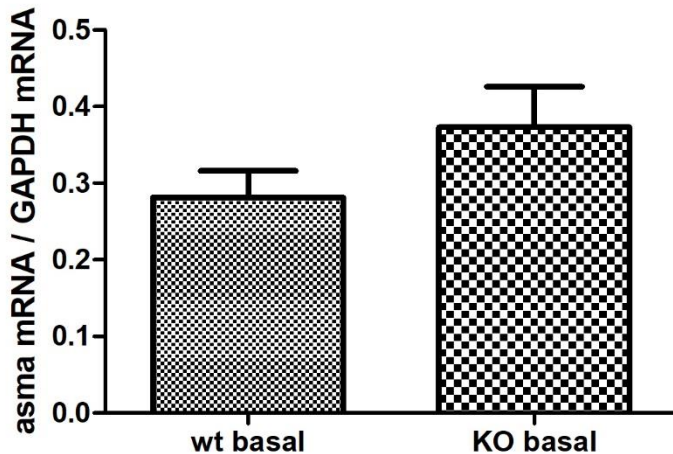
**Abbildung 18:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer wildtypischen *NFAT5 f/f1* Niere mittels mRNA-scope-Technik.  $\alpha$ -SMA ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt.

Bei Betrachtung der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere fällt in der Übersichtsaufnahme kein Unterschied zur wildtypischen Kontrollniere auf (**Abb. 19 A**). Auch hier erkennt man eine Expression von  $\alpha$ -SMA in den Gefäßen bzw. in den glatten Muskelzellen. Die Expression im Cortex bzw. in den Glomeruli der Knockout-Niere stellt sich ähnlich wie in der Wildtyp-Niere dar (**Abb. 19 B**). Zudem kann auch in der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere keine Anreicherung von  $\alpha$ -SMA in der äußeren Medulla (**Abb. 19 C**) und in der Papille (**Abb. 19 D**) gesehen werden.



**Abbildung 19:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik.  $\alpha$ -SMA ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt.

Zum selben Ergebnis kam man auch durch die Auswertung der Light Cycler-Daten der quantitativen Realtime-PCR. Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp-Nieren und den FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Nieren gefunden werden (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich zwar eine minimale Erhöhung von  $\alpha$ -SMA in der basalen Knockout-Niere erkennen, ein signifikanter Unterschied in Bezug auf  $\alpha$ -SMA zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere konnte jedoch nicht festgestellt werden. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass sowohl die mRNA-scope-Analyse als auch die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen im Hinblick auf die Expression von  $\alpha$ -SMA zeigen. Das wiederum bedeutet, dass es weder in der Wildtyp- noch in der Knockout-Niere Anzeichen für eine verstärkte Myofibroblastenbildung gibt.

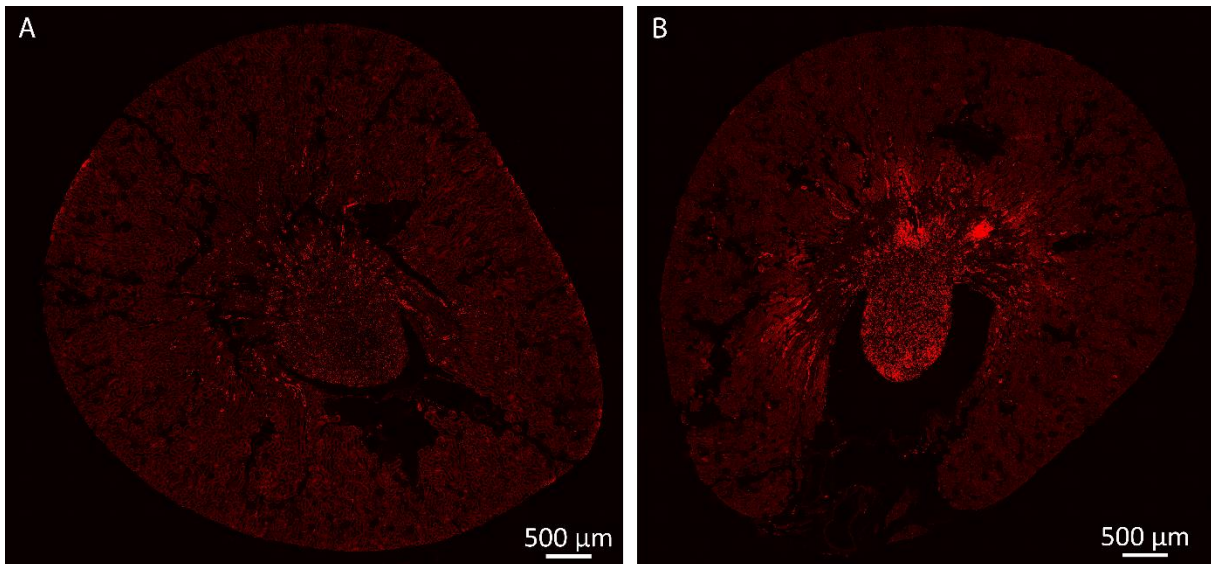
### **3.5 Expression des Schädigungsmarkers LCN2**

Mäuse mit einer globalen Deletion von NFAT5 weisen morphologische und funktionelle Veränderungen in der Niere auf. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass FoxD1<sup>Cre+</sup>-Zellen, in denen der Transkriptionsfaktor NFAT5 deletiert ist, verstärkt Fibrosemarker exprimieren. Deshalb sollte in einem ersten Schritt die Expression des Schädigungsmarkers LCN2 in der Niere genauer untersucht werden. Um die Expression von LCN2 vergleichen zu können, wurden Übersichtsaufnahmen von Nierenschnitten der FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Tiere und der Kontrolltiere angefertigt (**Abb. 21**). Die Nieren der Wildtypiere zeigten dabei eine nur geringe Expression des Schädigungsmarkers LCN2. Dieser trat hierbei zu einem geringen Teil in der äußeren Medulla und der Papille auf (**Abb. 21 A**).

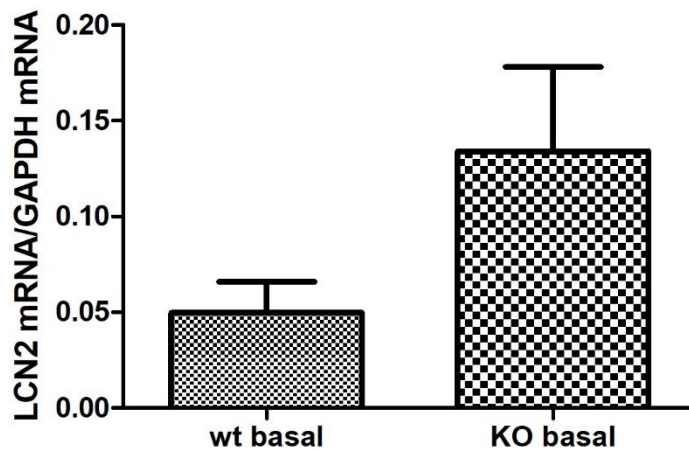
Im Vergleich dazu konnte bei den Tieren mit der NFAT5 Deletion in den FoxD1<sup>Cre+</sup>-Zellen ein deutlicher Anstieg des Schädigungsmarkers LCN2 in der äußeren Medulla und der Papille festgestellt werden (**Abb. 21 B**).

Zum selben Ergebnis kam man bei Betrachtung der mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR. Hierbei konnte ebenfalls ein deutlicher Anstieg des Schädigungsmarkers LCN2 in den FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Nieren gesehen werden (**Abb. 22**).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Schädigungsmarker LCN2 unter basalen Bedingungen in den FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Tieren deutlich stärker exprimiert wird als in den Wildtypieren.



**Abbildung 21:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5<sup>fl/fl</sup>* Niere (B) mittels mRNA-scope-Technik. Der Schädigungsmarker LCN2 ist dabei rot dargestellt.



**Abbildung 22:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich ein deutlicher Anstieg des Schädigungsmarkers LCN2 in der basalen Knockout-Niere erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

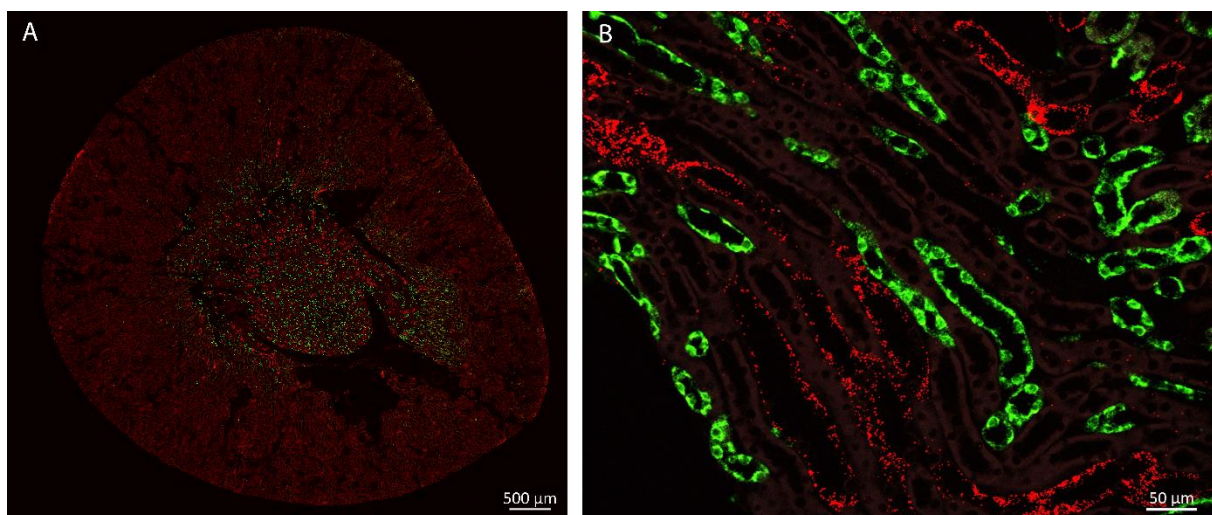


### 3.6 Zellspezifische Zuordnung der Expression von LCN2

Nachdem festgestellt wurde, dass der Schädigungsmarker LCN2 unter basalen Bedingungen bei FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Tieren deutlich stärker exprimiert wird als bei Wildtyp-Tieren, wurde in einem weiteren Schritt die genaue Expression von LCN2 untersucht. Dabei wurden mittels der mRNA-scope-Technik Co-Hybridisierungen von LCN2 mit unterschiedlichen nierenzellspezifischen Markern sowohl in Wildtyp-Nieren als auch in FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Nieren durchgeführt.

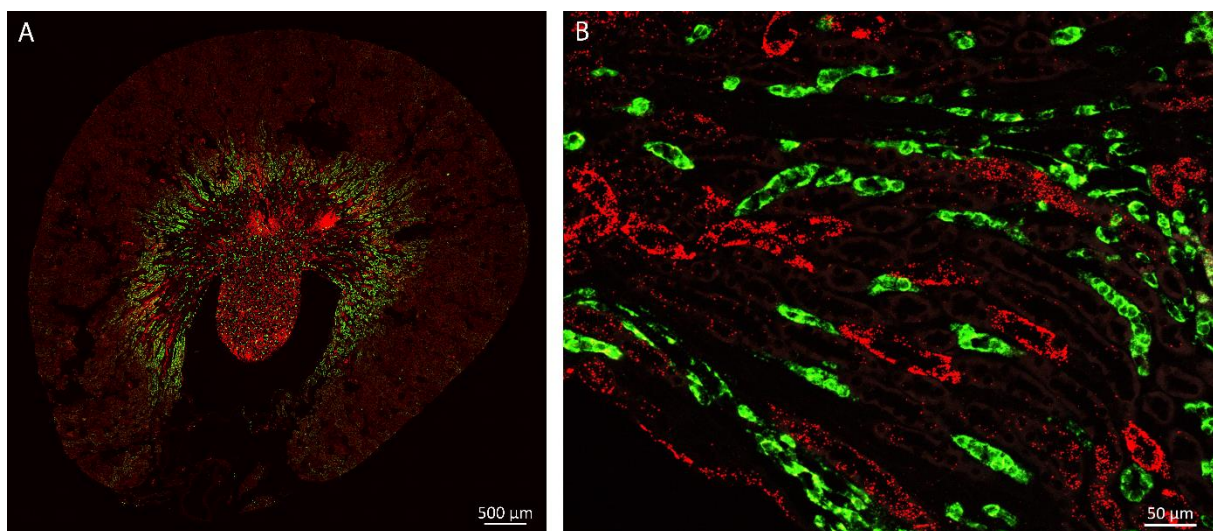
Zunächst wurden die tubulären Strukturen genauer betrachtet. Dafür erfolgte eine Co-Hybridisierung des Schädigungsmarkers LCN2 mit Aquaporin-1 (AQP-1), das als Marker für die dünne, absteigende Henle-Schleife gilt.

Das Übersichtsbild des Wildtyps (**Abb. 23 A**) zeigt ein Auftreten von LCN2 in der äußeren Medulla sowie in der Papille. AQP-1 tritt ebenfalls in den gleichen Kompartimenten der Niere und dabei in der dünnen absteigenden Henle-Schleife auf. Bei Betrachtung des Detailbildes aus dem Bereich der äußeren Medulla (**Abb. 23 B**) fällt allerdings auf, dass keine Kolo-kalisation zwischen AQP-1 und LCN2 existiert. Zudem zeigt AQP-1 in den dargestellten Abbildungen keine punktuelle Expression, da die Expression in einzelnen Zellen sehr hoch ist.



**Abbildung 23:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und AQP-1 grün dargestellt. AQP-1 zeigt aufgrund der sehr hohen Expression in den einzelnen Zellen keine punktuelle Expression.

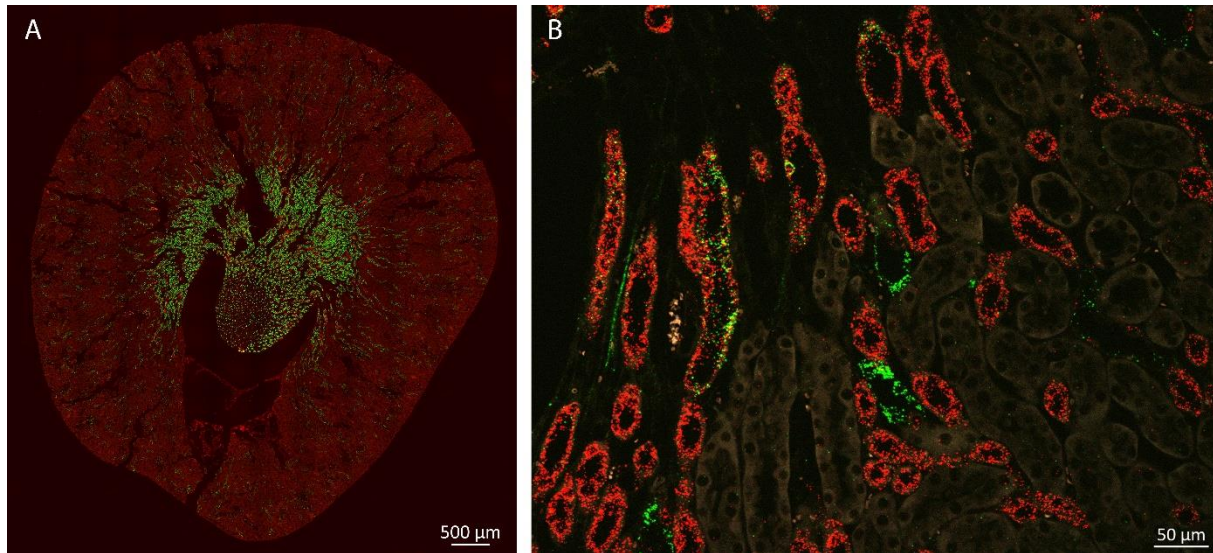
Auf dem Übersichtsbild der  $FoxD1^{Cre+}$ -NFAT5 fl/fl Niere erkennt man einen deutlichen Anstieg des Schädigungsmarkers LCN2, vor allem in der Papille (**Abb. 24 A**) und eine leichte Zunahme von AQP-1. Das Detailbild der Knockout-Niere zeigt ebenfalls einen Ausschnitt der äußeren Medulla und stellt sich ähnlich dem Wildtyp dar. So lässt sich auch im Knockout keine Kolokalisation von LCN2 und AQP-1 erkennen (**Abb. 24 B**). Zusammenfassend lässt sich folglich feststellen, dass, wie in Kapitel 3.5 bereits dargestellt, der Schädigungsmarker LCN2 unter basalen Bedingungen in den  $FoxD1^{Cre+}$ -NFAT5 fl/fl Tieren deutlich stärker exprimiert wird als in den Wildtyptieren. Mit Hilfe der mRNA-scope-Technik konnte jedoch gezeigt werden, dass LCN2 und AQP-1 nicht kolokalisieren. Folglich wird LCN2 unter basalen Bedingungen weder in der Wildtyp- noch in der Knockout-Niere in der dünnen absteigenden Henle-Schleife exprimiert.



**Abbildung 24:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer  $FoxD1^{Cre+}$ -NFAT5 fl/fl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und AQP-1 grün dargestellt.

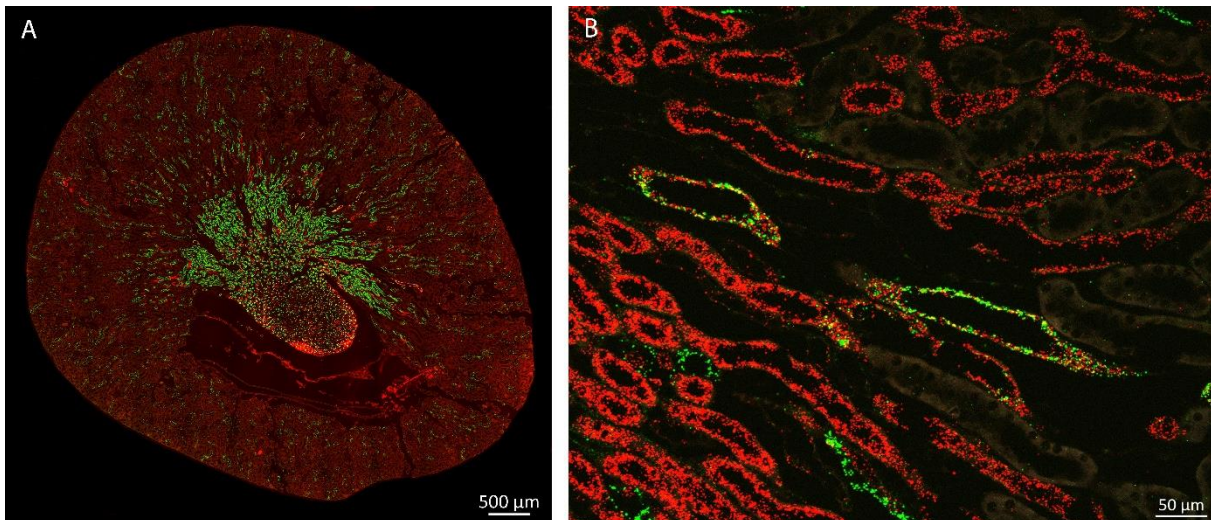
Als weitere tubuläre Struktur wurde die dünne aufsteigende Henle-Schleife betrachtet. Dafür erfolgte eine in-situ-Hybridisierung von CLCNKa, welcher als Marker für diesen Abschnitt der Niere gilt, mit dem Schädigungsmarker LCN2. CLCNKa ist dabei der Genort, der für Chloride Voltage-Gated Channel Ka codiert. Bereits auf dem Übersichtsbild der wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere lässt sich eine Expression von CLCNKa zu einem geringen Teil im Cortex, in der äußeren Medulla und in der Papille und dabei innerhalb der dünnen aufsteigenden Henle-Schleife erkennen (**Abb. 25 A**). Der Schädigungsmarker LCN2 tritt im Wildtyp nur in geringer Konzentration in der

äußeren Medulla sowie in der Papille auf. Das Detailbild der wildtypischen Niere zeigt eine Überlagerung von CLCNKa mit LCN2 (**Abb. 25 B**). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass LCN2 in der dünnen aufsteigenden Henle-Schleife exprimiert wird.



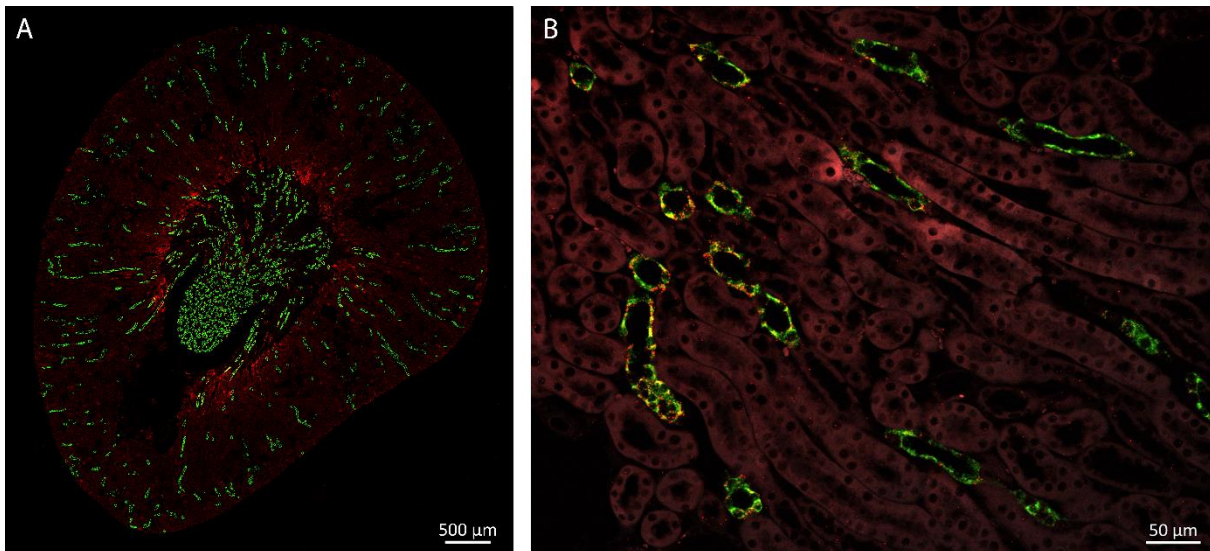
**Abbildung 25:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und CLCNKa grün dargestellt.

Bei Betrachtung des Übersichtsbildes der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere fällt ein leichter Anstieg des Markers für die dünne aufsteigende Henle-Schleife auf. So wird CLCNKa in der Knockout-Niere vor allem in der äußeren und der inneren Medulla exprimiert (**Abb. 26 A**). Der Schädigungsmarker LCN2 steigt in der Knockout-Niere bekanntermaßen an. Bereits an der Übersichtsaufnahme lässt sich eine Kolokalisation von CLCNKa und LCN2 vermuten. Diese Vermutung wird anhand des Detailbildes der äußeren Medulla bestätigt (**Abb. 26 B**). Folglich kommt der Schädigungsmarker LCN2 sowohl in der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere als auch in der wildtypischen Kontrollnieren in der dünnen aufsteigenden Henle-Schleife vor.



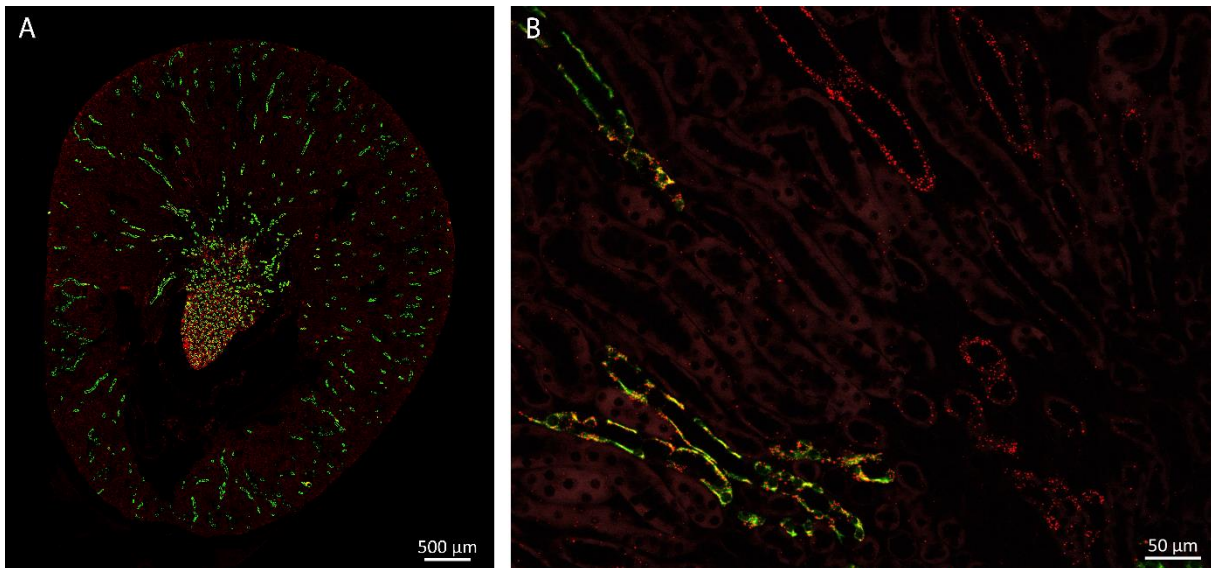
**Abbildung 26:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und CLCNKa grün dargestellt.

Um weitere tubuläre Strukturen darzustellen, wurde eine Co-Hybridisierung von LCN2 mit Aquaporin-2 (AQP-2) sowohl im Wildtyp als auch im Knockout durchgeführt. Dabei sollte mit AQP-2, als Marker für Sammelrohre, überprüft werden, ob der Schädigungsmarker LCN2 in den Sammelrohren exprimiert wird. Wie bei der anderen Sondenkombination konnte auch bei diesem mRNA-scope eine Expression von LCN2 in der Wildtyp-Niere in der äußeren Medulla sowie in der Papille gezeigt werden (**Abb. 27 A**). Das Übersichtsbild zeigt zudem ein deutliches Auftreten von AQP-2 im Cortex, der äußeren Medulla sowie eine deutliche Zunahme in der Papille. Bei Betrachtung des Detailbildes der wildtypischen Niere ist eine deutliche Überlagerung von LCN2 mit AQP-2 zu erkennen (**Abb. 27 B**). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass LCN2 unter basalen Bedingungen in der wildtypischen Niere im Sammelrohr exprimiert wird.



**Abbildung 27:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und AQP-2 grün dargestellt.

Auf dem Übersichtsbild der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere erkennt man wiederum einen deutlichen Anstieg des Schädigungsmarkers LCN2. In der Knockout-Niere kommt es zu einer deutlichen Hochregulation von LCN2 vor allem in der Papille (**Abb. 28 A**). Außerdem kommt es in der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere im Vergleich zur wildtypischen Kontrollniere zu einem leichten Rückgang von AQP-2. Bei Betrachtung des Detailbildes der äußeren Medulla der Knockout-Niere zeigt sich dasselbe Ergebnis wie bei der wildtypischen Kontrollniere. So kann auch hier eine deutliche Kolokalisation von LCN2 und AQP-2 gesehen werden (**Abb. 28 B**). Dies wiederum belegt das Vorkommen von LCN2 in den Sammelrohren der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Nieren. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass LCN2 zum einen in der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere deutlich stärker exprimiert ist als in der Kontrollniere. Zum anderen wird der Schädigungsmarker LCN2 unter basalen Bedingungen in den Sammelrohren exprimiert.



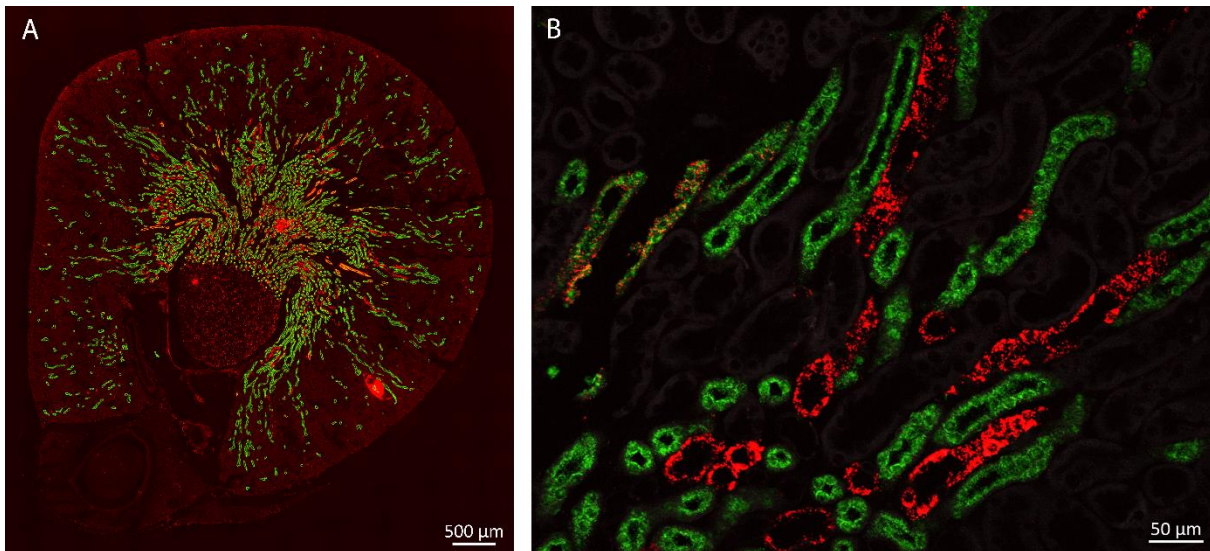
**Abbildung 28:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5<sup>fl/fl</sup>* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und AQP-2 grün dargestellt.

Als weitere tubuläre Struktur und als möglicher Expressionsort von LCN2 wurde der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife näher betrachtet.

Mit Hilfe des  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporters (NKCC2) als Marker für den dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife wurde überprüft, ob es im mRNA-scope eine Kolo-kalisation von LCN2 mit NKCC2 gibt und ob LCN2 somit in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife vorkommt.

Die Übersichtsaufnahme der Wildtyp-Niere zeigt, wie bei den drei anderen Sondenkombinationen mit LCN2 und AQP-1 bzw. AQP-2 und LCN2 mit CLCNKa, das gleiche Expressionsmuster des Schädigungsmarkers LCN2, der auch hier in der äußeren Medulla sowie in der Papille vorkommt (**Abb. 29 A**). NKCC2 tritt zu einem geringen Teil im Cortex, jedoch vermehrt in der äußeren und der inneren Medulla im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife auf.

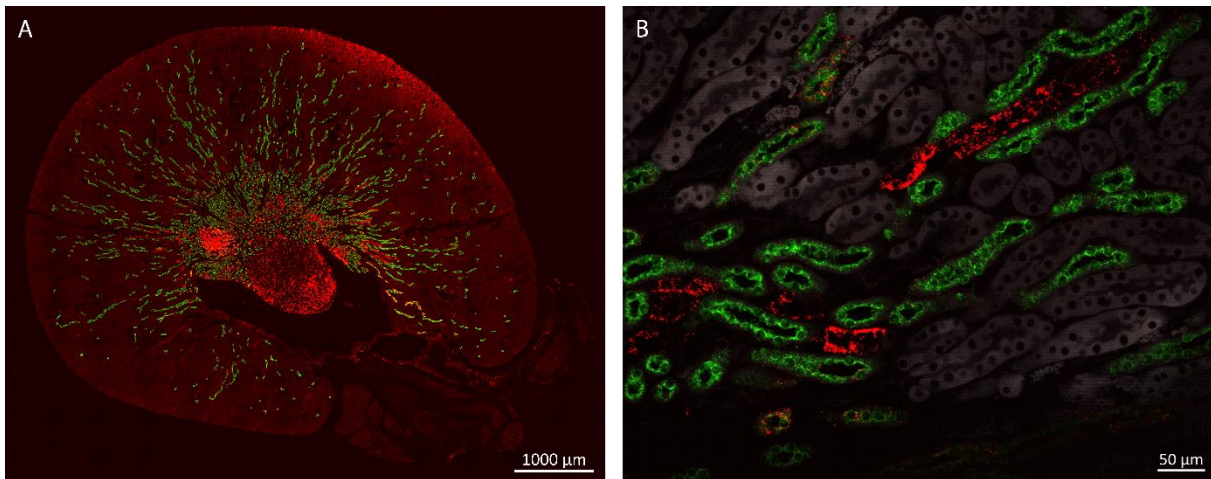
Bei Betrachtung der Detailaufnahme aus dem Bereich der äußeren Medulla fällt eine geringe Kolo-kalisation von LCN2 mit NKCC2 auf (**Abb. 29 B**).



**Abbildung 29:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und NKCC2 grün dargestellt.

Das Übersichtsbild der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere zeigt von der Expression des NKCC2 ein ähnliches Bild wie die wildtypische Kontrollniere. So kommt auch hier der Marker für den dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife zu einem geringen Teil im Cortex vor und nimmt im Bereich der äußeren und inneren Medulla zu. Die Expression des Schädigungsmarkers LCN2 steigt auch in dieser Knockout-Niere im Bereich der Papille wieder deutlich an (**Abb. 30 A**). Zudem kann auch auf dem Detailbild der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere eine geringe Überlagerung von LCN2 und NKCC2 gesehen werden (**Abb. 30 B**).

Zusammenfassend zeigt sich, wie zu erwarten, ein deutlicher Anstieg des Schädigungsmarkers LCN2 in der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere. Außerdem gibt es eine geringe Kolo-kalisation von LCN2 mit NKCC2, was darauf schließen lässt, dass der Schädigungsmarker LCN2 unter basalen Bedingungen geringfügig in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife exprimiert wird.



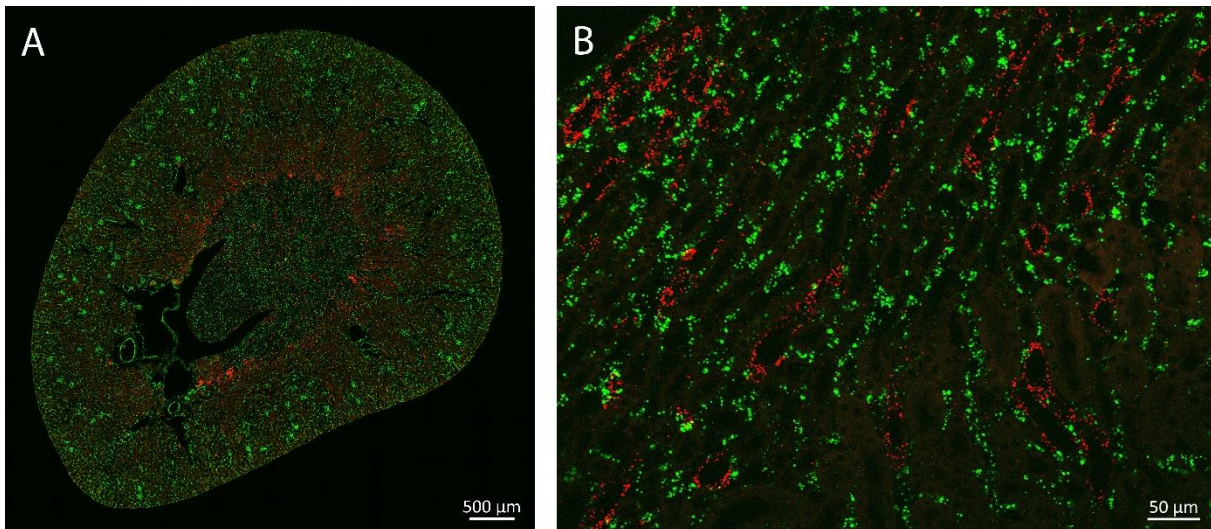
**Abbildung 30:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und NKCC2 grün dargestellt.

Weiterhin wurde die Expression des Schädigungsmarkers LCN2 in vaskulären und mesenchymalen Strukturen genauer betrachtet. Dafür erfolgte eine Co-Hybridisierung von LCN2 mit dem Protein Cluster of differentiation 31 (CD31), welches auch als Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1) bezeichnet wird, um eine mögliche Expression von LCN2 im Endothel, in den Kapillarschlingen oder in den Vasa recta darzustellen.

Auf dem Übersichtsbild der Wildtyp-Niere erkennt man, wie zu erwarten war, eine geringe Expression des Schädigungsmarkers LCN2 in der äußeren Medulla sowie in der Papille (**Abb. 31 A**). CD31 gilt als Marker für das Endothel, die Kapillarschlingen und die Vasa recta und färbt dementsprechend diese Strukturen an.

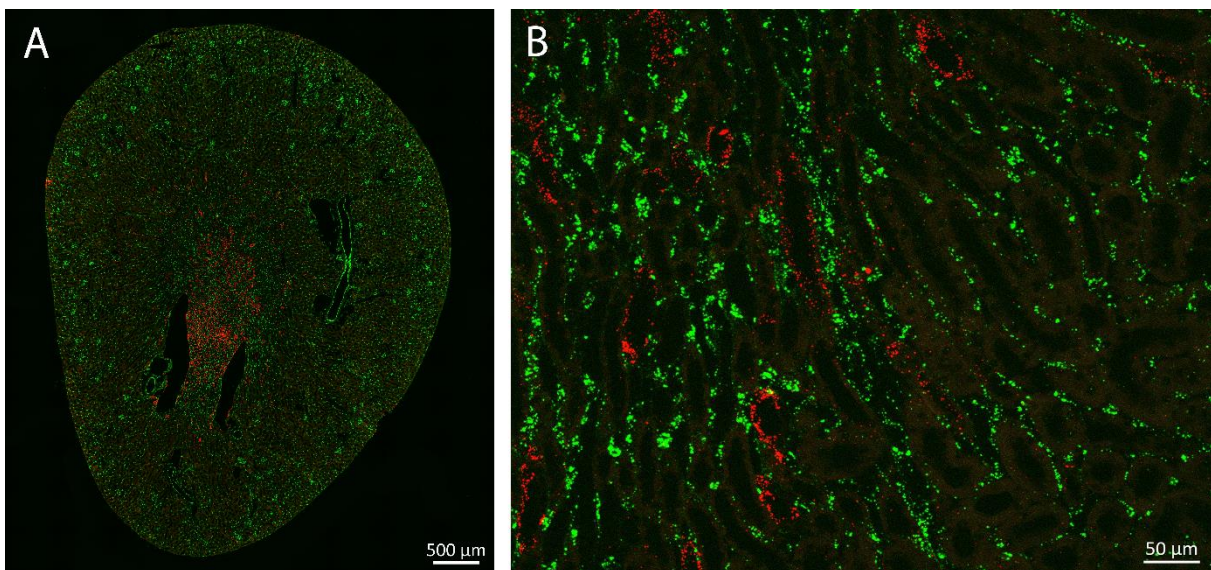
Im Detailbild der wildtypischen Niere aus dem Bereich der äußeren Medulla wird zwar sowohl LCN2 als auch CD31 exprimiert, jedoch zeigt sich keine Überlagerung von LCN2 mit CD31 (**Abb. 31 B**).





**Abbildung 31:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und CD31 grün dargestellt.

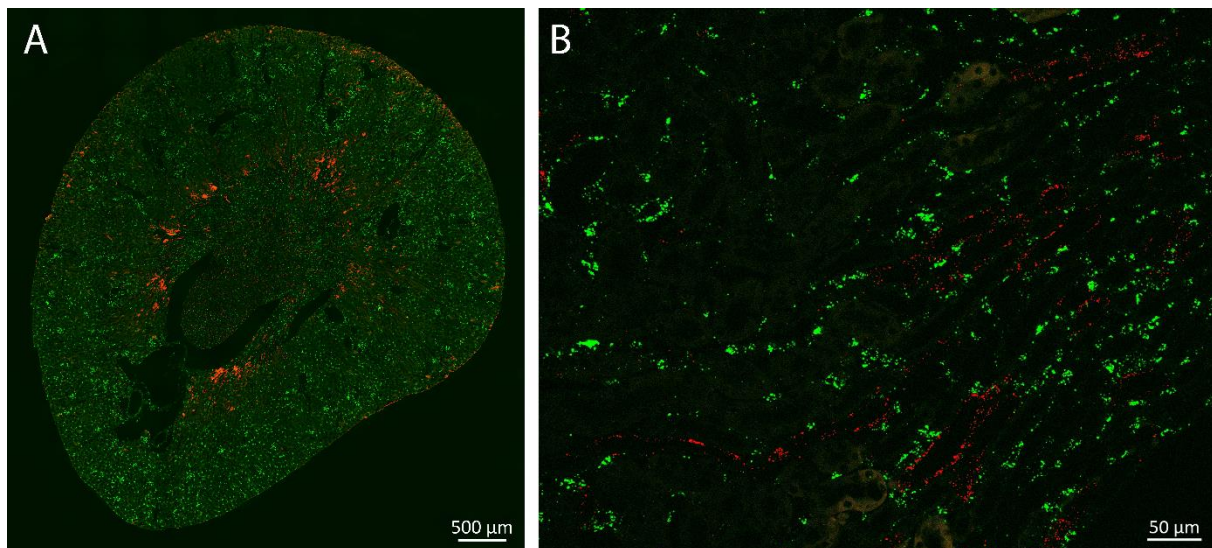
Das Übersichtsbild der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere zeigt bei der Darstellung des Schädigungsmarkers LCN2 ein ähnliches Bild, wie es bereits bei den anderen Sondenkombinationen gesehen wurde. So konnte auch hier wiederum ein deutlicher Anstieg von LCN2 in der Papille des Knockouts dargestellt werden (**Abb. 32 A**). Die Expression des Markers CD31 stellt sich dabei auf gleiche Weise wie im Wildtyp dar. Zudem fehlt auch im Detailbild der Knockout-Niere im Bereich der äußeren Medulla eine Überlagerung von LCN2 mit CD31 (**Abb. 32 B**).



**Abbildung 32:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und CD31 grün dargestellt.

Als weiterer möglicher Expressionsort des Schädigungsmarkers LCN2 wurde das Interstitium und das Mesangium untersucht. Dafür erfolgte mit Hilfe der mRNA-scope-Technik eine Co-Hybridisierung von LCN2 mit dem Platelet derived growth factor receptor beta (PDGFR $\beta$ ), welcher als Marker für interstitielle und mesangiale Zellen gilt.

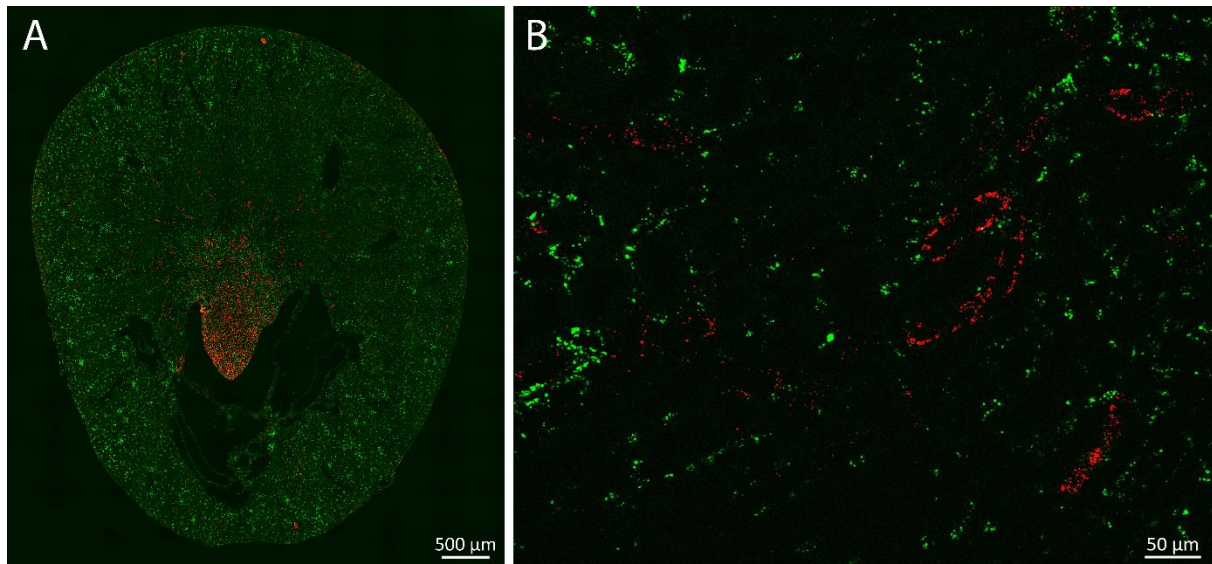
Anhand der Übersichtsaufnahme der Wildtyp-Niere zeigt sich eine Expression des Schädigungsmarkers LCN2 in der äußeren Medulla sowie in der Papille (**Abb. 33 A**). PDGFR $\beta$  wird dabei im Cortex in den mesangialen Zellen und im Interstitium exprimiert. Das Detailbild der wildtypischen Niere im Bereich der äußeren Medulla zeigt keine Kolo-kalisation von LCN2 mit PDGFR $\beta$  (**Abb. 33 B**).



**Abbildung 33:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen *NFAT5 fl/fl* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt.

Bei Betrachtung des Übersichtsbildes der *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl* Niere zeigt sich wiederum ein ähnliches Bild. So kommt es in der Knockout-Niere zu einem deutlichen Anstieg des Schädigungsmarkers LCN2 in der Papille, wobei die Expression von PDGFR $\beta$  stagniert (**Abb. 34 A**). Im Detailbild der Knockout-Niere, welches aus dem Bereich der äußeren Medulla stammt, ist, wie in der Kontrollniere, keine Überlagerung von LCN2 mit PDGFR $\beta$  erkennbar (**Abb. 34 B**).

Als Zusammenfassung lässt sich somit feststellen, dass der Schädigungsmarker LCN2 unter basalen Bedingungen weder in der Wildtyp- noch in der Knockout-Niere in vaskulären oder mesenchymalen Strukturen vorkommt.



**Abbildung 34:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer *FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5<sup>fl/fl</sup>* Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt.

### **3.7 Die Rolle von NFAT5 für die Progression einer Nierenfibrose**

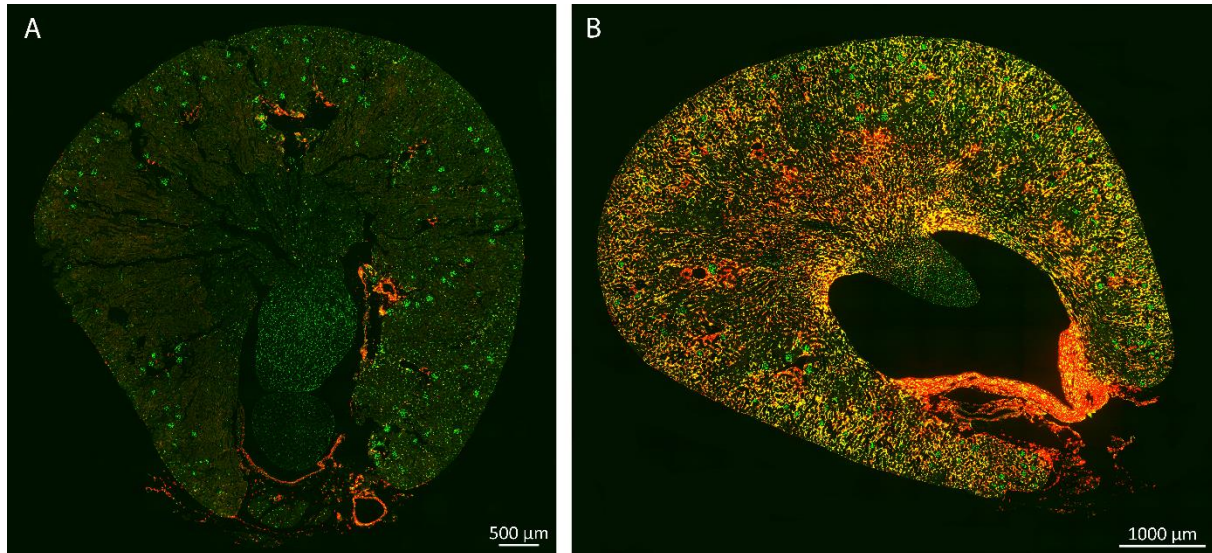
Da die Deletion von NFAT5 in interstitiellen – PDGFRβ-positiven – Zellen bereits zu einer Erhöhung der profibrotischen Faktoren führt, stellte sich die Frage, welchen Einfluss die NFAT5 Deletion in diesen Zellen auf den Verlauf einer experimentell herbeigeführten Fibrose hat. Dazu wurde der Ureter der linken Niere über fünf Tage ligiert, wohingegen die rechte Niere in ihrem ursprünglichen Zustand belassen wurde. Im Folgenden wird die nicht-ligierte Niere als kontralaterale (CL-) Niere und die ligierte Niere als UUO-Niere bezeichnet.

Zunächst wurden für diese Versuche wiederum 5 µm Nierenschnitte mittels der mRNA-scope-Technik mit jeweils zwei unterschiedlichen Sondenkombinationen hybridisiert, um anschließend die kontralaterale Niere mit der ligierten Niere im Hinblick auf die Expression unterschiedlicher Gene zu vergleichen. Außerdem wurden die gefundenen Ergebnisse im Anschluss mit mRNA-Daten der Realtime-PCR verglichen.

Als profibrotisches Gen wurde *Col1a1a* unter basalen Bedingungen in CL- und UUO-Nieren miteinander verglichen.

Auf dem Übersichtsbild der CL-Niere fällt eine typische Anreicherung von Kollagen und PDGFRβ auf. So lässt sich *Col1a1* vor allem interstitiell und um Gefäße lokalisieren, PDGFRβ vorwiegend in Mesangialzellen und ebenfalls in interstitiellen renalen Zellen erkennen (**Abb. 35 A**). Auf dem Übersichtsbild der UUO-Niere sieht man einen sehr deutlichen Anstieg von *Col1a1* sowie eine deutliche Kolo-kalisation mit PDGFRβ (**Abb.**

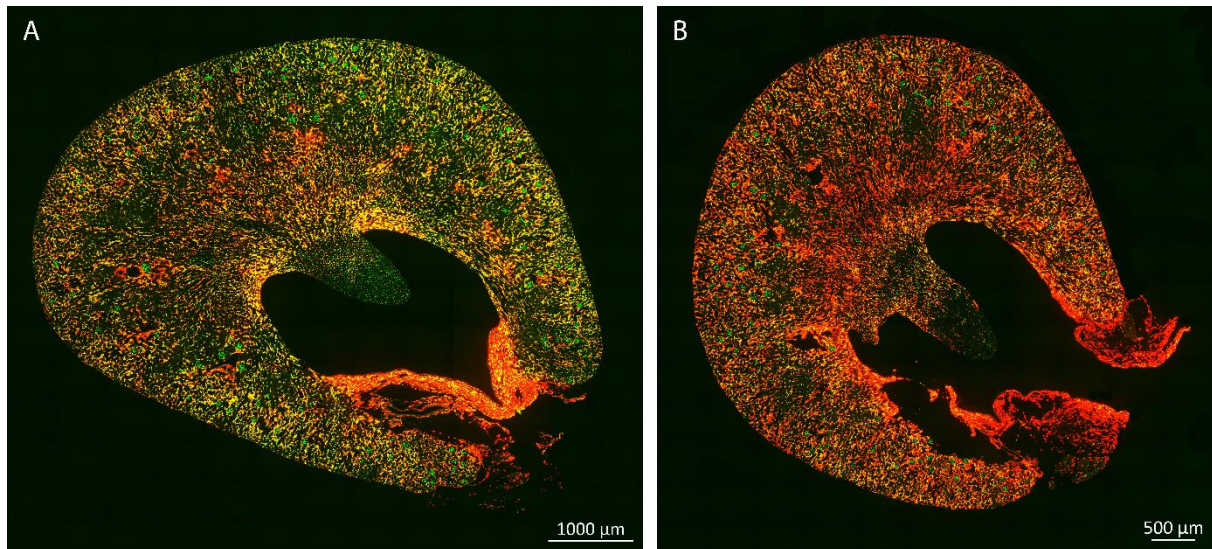
**35 B).** Zusammenfassend lässt sich folglich feststellen, dass die ligierte Niere schwer geschädigt ist, wohingegen die CL-Niere im Prinzip wie eine basale, wildtypische NFAT5 flfl Niere aussieht.



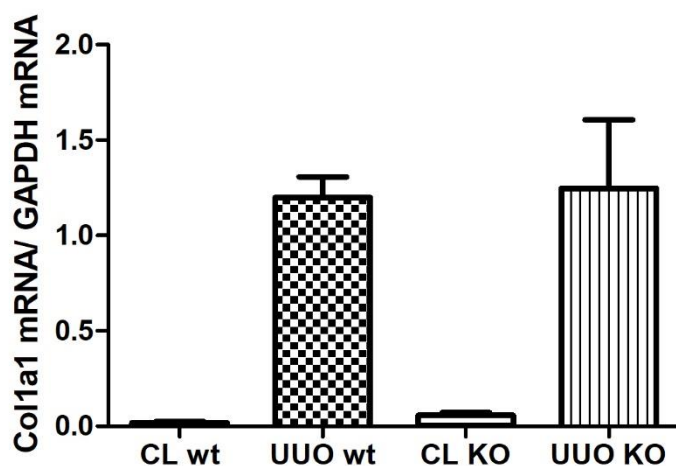
**Abbildung 35:** Übersichtsaufnahme der *Col1a1* Expression in einer CL-Niere (A) sowie in einer UUO-Niere (B) einer wildtypischen NFAT5 flfl Maus mittels mRNA-scope-Technik. *Col1a1* ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt.

In einem nächsten Schritt wurde die Expression des profibrotischen Gens *Col1a1* in der ligierten UUO-Niere von Wildtyp- und Knockout-Tieren miteinander verglichen. Dabei stellte sich die Frage, ob die NFAT5 Deletion bei den UUO-Knockout-Nieren den Verlauf einer Nierenfibrose beeinflusst.

Die beiden Übersichtsaufnahmen zeigen, in Bezug auf den profibrotischen Marker *Col1a1*, keinen Unterschied zwischen der wildtypischen UUO-Niere (**Abb. 36 A**) und der ligierten Knockout-Niere (**Abb. 36 B**). Zum selben Ergebnis kommt man bei Auswertung der Light Cycler-Daten der quantitativen Realtime-PCR. Auch hier wird deutlich, dass es keinen Unterschied in der *Col1a1* Expression zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren, die eine Ureterobstruktion erhielten, gibt (**Abb. 37**).



**Abbildung 36:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer UUU-Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer UUU-Knockout-Niere (B) mittels mRNA-scope-Technik. Col1a1 ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt.

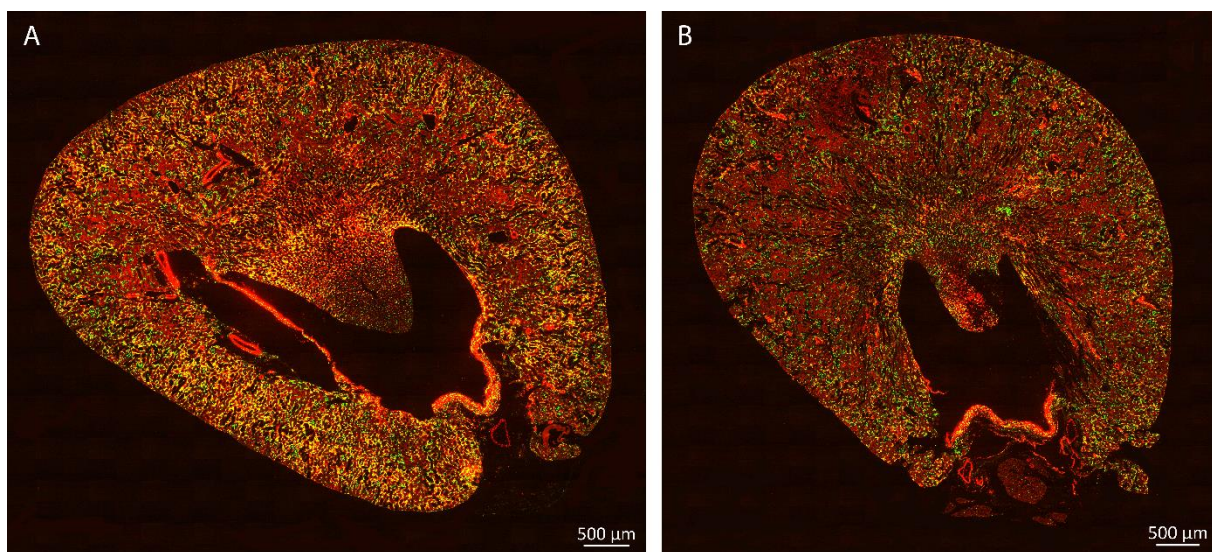


**Abbildung 37:** mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der kontralateralen Wildtyp-Niere (CL wt), der ligierten Wildtyp-Niere (UUU wt), sowie der kontralateralen Knockout-Niere (CL KO) und der ligierten Knockout-Niere (UUU KO). Dabei lässt sich in Bezug auf Col1a1 kein signifikanter Unterschied zwischen der ligierten Wildtyp- und der ligierten Knockout-Niere erkennen. Zwischen den CL wt- bzw. den CL KO- und den entsprechenden UUU wt- bzw. UUU KO-Nieren lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

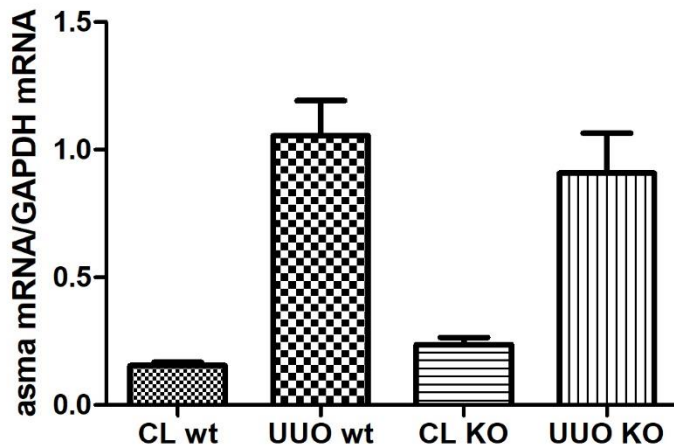
Des Weiteren stellte sich die Frage, ob eine Deletion des Transkriptionsfaktors NFAT5 Auswirkungen auf die Entwicklung von Myofibroblasten hat. Die Aktivierung der Myofibroblasten spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer Fibrose. Deswegen sollte untersucht werden, ob ligierte Mauseieren von Knockout-Mäusen, eine vermehrte Bildung von Myofibroblasten aufweisen. Dafür erfolgte ein mRNA-scope der mit alpha smooth muscle actin (Abkürzungen:  $\alpha$ -SMA, asma) gefärbten 5  $\mu$ m Nierenschnitte. Dabei zeigte sich im Hinblick auf die Expression der

Myofibroblasten, die mittels des Markers  $\alpha$ -SMA angefärbt wurden, kein Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout. So zeigt das Übersichtsbild der wildtypischen UUO-Niere (**Abb. 38 A**) eine ähnliche Expression der Myofibroblasten wie das Übersichtsbild der UUO-Knockout-Niere (**Abb. 38 B**).

Zur gleichen Aussage führt die Betrachtung der mRNA-Daten. Hierbei kann ebenfalls kein signifikanter Unterschied von  $\alpha$ -SMA und folglich von Myofibroblasten zwischen den UUO-Wildtyp-Nieren und den UUO-Knockout-Nieren festgestellt werden (**Abb. 39**). Zwischen den CL-Wildtyp- bzw. den CL-Knockout-Nieren und den entsprechenden UUO-Wildtyp- bzw. UUO-Knockout-Nieren gibt es bei Betrachtung der mRNA-Daten einen deutlichen Unterschied. Die unilaterale Ureterobstruktion führt dabei zu einem starken Anstieg der  $\alpha$ -SMA Expression in UUO-Wildtyp- und UUO-Knockout-Nieren, wobei die Expression von  $\alpha$ -SMA in CL-Wildtyp- und CL-Knockout-Nieren nicht unterschiedlich ist.



**Abbildung 38:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Knockout-Niere (B) mittels mRNA-scope-Technik.  $\alpha$ -SMA ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt.



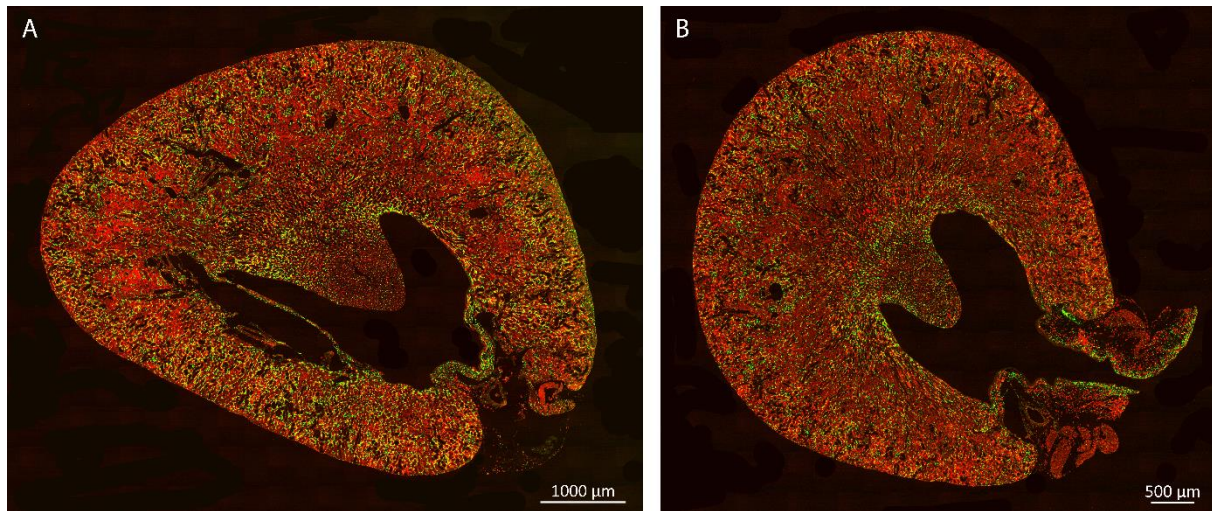
**Abbildung 39:** mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der kontralateralen Wildtyp-Niere (CL wt), der ligierten Wildtyp-Niere (UUO wt), sowie der kontralateralen Knockout-Niere (CL KO) und der ligierten Knockout-Niere (UUO KO). Dabei lässt sich in Bezug auf  $\alpha$ -SMA kein signifikanter Unterschied zwischen der ligierten Wildtyp- und der ligierten Knockout-Niere erkennen. Zwischen den CL wt- bzw. den CL KO- und den entsprechenden UUO wt- bzw. UUO KO-Nieren lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

In einem weiteren Versuch wurde das proinflammatorische Gen F4/80 auf Unterschiede in der wildtypischen UUO-Niere und der UUO-Knockout-Niere untersucht und überprüft, ob es in der ligierten Knockout-Niere zu einer vermehrten Infiltration von F4/80 positiven Makrophagen kommt. F4/80 gilt dabei als spezifischer Marker für Makrophagen der Maus.

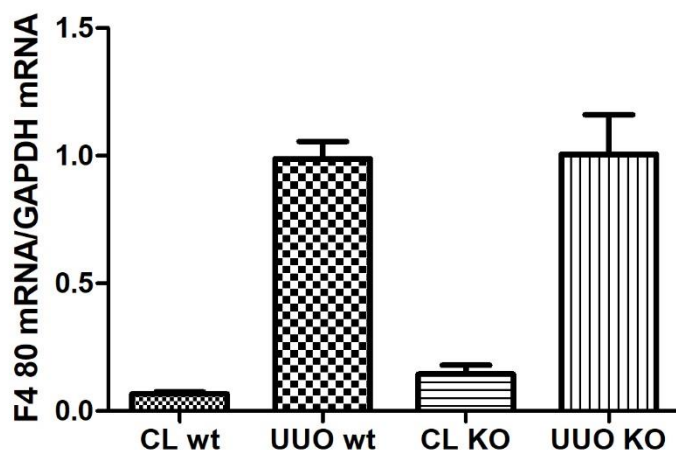
Der Vergleich der Übersichtsaufnahmen der wildtypischen UUO-Niere (**Abb. 40 A**) zeigt dabei, im Hinblick auf F4/80, keinen Unterschied zur UUO-Knockout-Niere (**Abb. 40 B**). Dies wiederum zeigt, dass es in der UUO-Knockout-Niere zu keiner vermehrten Einwanderung von F4/80 positiven Makrophagen kommt.

Zudem wird diese Aussage durch die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR bestätigt. Hier erkennt man zwischen den UUO-Wildtyp- und den UUO-Knockout-Nieren eine nahezu identische Expression des proinflammatorischen Gens F4/80 (**Abb. 41**).

Bei Betrachtung der mRNA-Daten wird jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den CL-Wildtyp- bzw. den CL-Knockout-Nieren und den entsprechenden UUO-Wildtyp- bzw. UUO-Knockout-Nieren deutlich. Somit zeigt sich, dass die unilaterale Ureterobstruktion zu einem starken Anstieg der F4/80 Expression in UUO-Wildtyp- und UUO-Knockout-Nieren führt. Die Expression von F4/80 in CL-Wildtyp- und CL-Knockout-Nieren stellt sich jedoch nicht unterschiedlich dar.



**Abbildung 40:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Knockout-Niere (B) mittels mRNA-scope-Technik. F4/80 ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt.

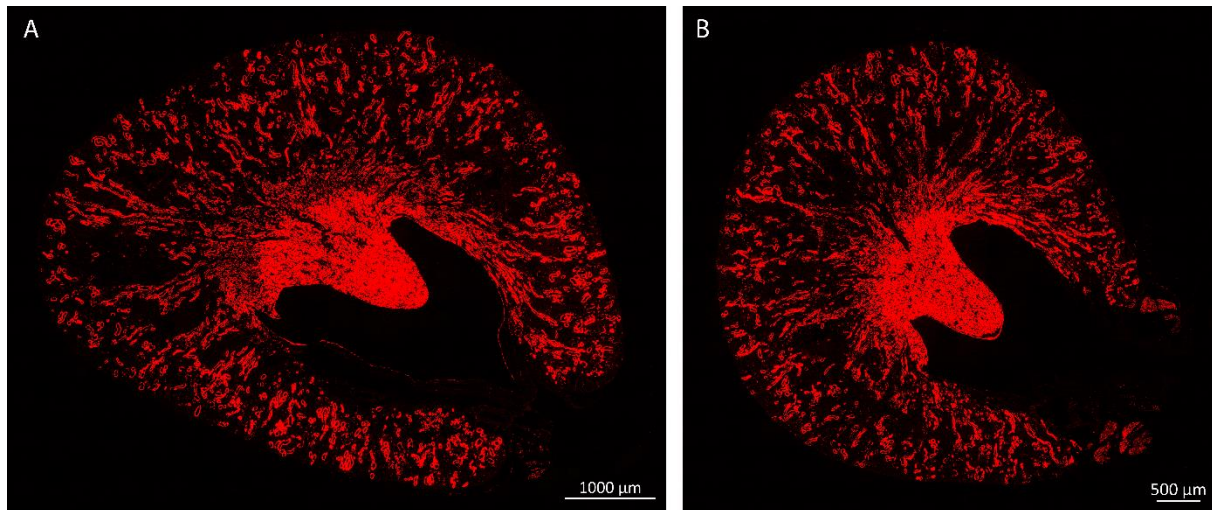


**Abbildung 41:** mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der kontralateralen Wildtyp-Niere (CL wt), der ligierten Wildtyp-Niere (UUO wt), sowie der kontralateralen Knockout-Niere (CL KO) und der ligierten Knockout-Niere (UUO KO). Dabei lässt sich in Bezug auf F4/80 kein signifikanter Unterschied zwischen der ligierten Wildtyp- und der ligierten Knockout-Niere erkennen. Zwischen den CL wt- bzw. den CL KO- und den entsprechenden UUO wt- bzw. UUO KO-Nieren lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

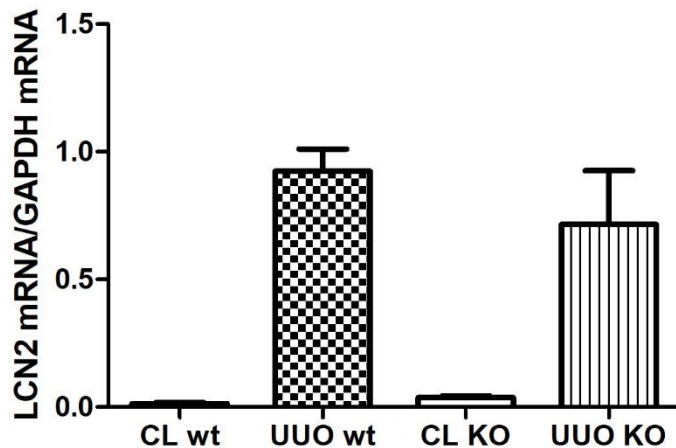
Nachdem, wie oben bereits erwähnt, festgestellt wurde, dass der Schädigungsmarker LCN2 unter basalen Bedingungen bei FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Tieren deutlich stärker exprimiert wird als bei Wildtyp-Tieren, sollte untersucht werden, ob eine Ureterobstruktion bei diesen Knockout-Tieren die Progression der Fibrose verstärkt. Aus diesem Grund wurde die Expression des Schädigungsmarker LCN2 in der UUO-Wildtyp- und der UUO-Knockout-Niere miteinander verglichen. Auch hier stellt sich ein ähnliches Bild dar. So zeigen die Übersichtsaufnahmen der wildtypischen UUO-Niere



(Abb. 42 A) und der ligierten Knockout-Niere (Abb. 42 B) hinsichtlich des Schädigungsmarkers LCN2 keinen Unterschied. Anhand der Übersichtsaufnahmen lässt sich lediglich ein geringer Rückgang des Schädigungsmarkers LCN2 in der UUO-Knockout-Niere vermuten. Diese Vermutung wird durch die Auswertung der mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR bestätigt. Hierbei zeigt sich eine tendenzielle Erniedrigung des Schädigungsmarkers LCN2 zwischen den UUO-Wildtyp- und den UUO-Knockout-Nieren (Abb. 43). Bei Betrachtung der mRNA-Daten zeigt sich ebenfalls, dass die unilaterale Ureterobstruktion zu einem starken Anstieg der LCN2 Expression in UUO-Wildtyp- und UUO-Knockout-Nieren führt. Die Expression von LCN2 in CL-Wildtyp- und CL-Knockout-Nieren stellt sich nicht unterschiedlich dar.



**Abbildung 42:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Knockout-Niere (B) mittels Durchlichtaufnahme. LCN2 ist dabei rot dargestellt.



**Abbildung 43:** mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der kontralateralen Wildtyp-Niere (CL wt), der ligierten Wildtyp-Niere (UUO wt), sowie der kontralateralen Knockout-Niere (CL KO) und der ligierten Knockout-Niere (UUO KO). Dabei lässt sich in Bezug auf LCN2 kein signifikanter Unterschied zwischen der ligierten Wildtyp- und der ligierten Knockout-Niere erkennen. Zwischen den CL wt- bzw. den CL KO- und den entsprechenden UUO wt- bzw. UUO KO-Nieren lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Deletion des Transkriptionsfaktors NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen, wie den glatten Muskelzellen, den Reninzellen, den Mesangialzellen und den interstitiellen renalen Zellen den Verlauf einer Nierenfibrose nicht beeinflusst. Es zeigte sich, dass die UUO-Wildtyp-Nieren, welche den Transkriptionsfaktor NFAT5 normal exprimierten und lediglich eine Ureterobstruktion erhielten, im Vergleich zu den UUO-Knockout-Nieren, welchen jedoch der Transkriptionsfaktor NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen fehlte und ebenfalls eine Ureterobstruktion erhielten, im Hinblick auf profibrotische und proinflammatorische Gene sowie in Bezug auf die Makrophagen und den Schädigungsmarker LCN2 keine Unterschiede aufwiesen. Dies belegt, dass im Schädigungsmodell der Ureterobstruktion, der Verlauf der Nierenfibrose in FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Tieren nicht weiter verstärkt wird.

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des osmoprotektiven Faktors NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen für die Entwicklung der Niere untersucht. Dafür erfolgte zunächst die Lokalisation von NFAT5 in der Niere.

In den Versuchen konnte dargestellt werden, dass NFAT5 in allen renalen Zonen exprimiert wird, wobei in der Medulla die höchste Abundanz von NFAT5 vorherrscht. NFAT5 wird dabei in den Zellen des FoxD1-Kompartiments exprimiert, zeigt aber auch eine hohe Abundanz in den tubulären Segmenten.

Bereits in anderen Arbeiten wurde versucht den Transkriptionsfaktor NFAT5 in der Niere genauer zu lokalisieren.

Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen *Jung H. Cha et al.* 2001, die die Lokalisation von NFAT5 in der Niere mittels in-situ-Hybridisierung und immunhistochemischen Analysen untersuchten. Dabei konnten sie einen ausgeprägten corticomedullären Gradienten für die NFAT5 Expression darstellen (Cha et al., 2001).

In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass der Transkriptionsfaktor NFAT5 im Nierencortex und in den medullären Sammelrohren exprimiert wird (Chua et al., 2015).

In einer Studie aus dem Jahre 2004 wurde die Lokalisation von TonEBP mit verschiedenen tubulären Markern mittels Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierungen untersucht. Vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergrößerte sich die Intensität der TonEBP Immunreaktivität entlang der corticomedullären Achse. Im Außenstreifen der äußeren Medulla zeigte sich eine hohe Signalstärke von TonEBP in den Sammelrohren. Des Weiteren konnte TonEBP auch in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife und im geraden Teil des proximalen Tubulus detektiert werden. Außerdem war die TonEBP Expression in allen Zellen des Innenstreifens der äußeren Medulla und in der inneren Medulla einschließlich der aufsteigenden und absteigenden dünnen Henle-Schleife sowie in den endothelialen Zellen der Gefäßbündel hoch. Mit Ausnahme der endothelialen Zellen der Glomeruli, zeigten alle endothelialen Zellen der Niere eine zunehmende Intensität der TonEBP Immunreaktivität entlang der corticomedullären Achse (Han et al., 2004).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Befunde der Literatur hinsichtlich des corticomedullären Gradienten mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmen. Jedoch wurde die Expression von NFAT5 in Zellen des FoxD1-

Kompartiments und somit in interstitiellen Zellen, glatten Muskelzellen, Mesangialzellen und Reninzellen bislang noch in keiner anderen Arbeit betrachtet. Folglich wurde, mit der vorliegenden Arbeit, zum ersten Mal die Bedeutung von NFAT5 im FoxD1-Kompartiment genauer untersucht.

In Bezug auf die Nierenmorphologie konnte in der vorliegenden Arbeit bei einer Deletion von NFAT5 im Stromakompartiment keine Auswirkung auf die Nierenentwicklung gefunden werden. So zeigten Tiere mit einer NFAT5 Deletion in Stromazellen eine normale Nierenentwicklung, eine ähnliche Größe wie die Wildtyp-Nieren und keine makroskopischen Anomalien.

In einer Studie aus dem Jahre 2004 zeigten NFAT5 Null-Mäuse eine embryonale und perinatale Letalität mit einer inkompletten Penetranz. Die NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse, die überlebten, hatten zum Zeitpunkt der Geburt keine offensichtlichen Abnormitäten, jedoch wiesen die Mäuse, die bis ins Erwachsenenalter überlebten, neben Gedeihstörungen auch Nierendefekte auf. So zeigten diese NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse eine fortschreitende und tiefgreifende Atrophie der Nierenmedulla einhergehend mit einer beeinträchtigten Nierenfunktion, wie einer gestörten Aktivierung von osmoprotektiven Genen. Zudem konnte festgestellt werden, dass drei Wochen alte NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse eine Nierenhypoplasie sowie eine veränderte Morphologie der Nierenmedulla aufwiesen. Außerdem konnte bei NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäusen der Außen- und Innenstreifen der Medulla nicht deutlich voneinander abgegrenzt werden. Die NFAT5<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen zudem eine gestörte Architektur der äußeren Medulla auf. Neben einem Fehlen der kompletten Papille zeigten diese Mäuse auch eine Vergrößerung des Nierenbeckens (López-Rodríguez et al., 2004).

In einer anderen Arbeit aus dem Jahre 2004 wurden transgene NFAT5-Mäuse generiert, die einen dominant negativen NFAT5 exprimieren, um die Konsequenzen einer mangelhaften NFAT5-Aktivität zu untersuchen. Da NFAT5 Null-Mäuse perinatal versterben, wurden transgene Mäuse, die speziell in renalen Sammelrohren eine dominant negative Form von NFAT5 überexprimierten, entwickelt. Die Mäuse zeigten, aufgrund einer reduzierten Expression von Aquaporin AQP-2 und Harnstofftransporter UT-A1 und UT-A2 mRNAs, eine Beeinträchtigung ihrer Urinkonzentrationsmechanismen. So war die Urinosmolalität wie auch die Urinkonzentrationen von Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chlorid-Ionen der transgenen NFAT5-Mäuse signifikant niedriger als bei nicht-transgenen Mäusen. Die Serumsmolalität und die

Harnstoffkonzentration hingegen waren bei den transgenen NFAT5-Mäusen signifikant höher, was auf einen Defekt im Urinkonzentrationsmechanismus zurückzuführen ist.

Des Weiteren kam es bei diesen transgenen NFAT5-Mäusen zu einer ausgeprägten Polyurie und Polydipsie. Fünf Wochen alte Nieren der transgenen NFAT5-Mäuse schienen, mit Ausnahme einer Dilatation der Sammelrohre im Cortex, ziemlich normal zu sein. Jedoch entwickelten diese Mäuse ca. acht Wochen nach der Geburt eine fortschreitende bilaterale Hydronephrose. Diese Nieren zeigten eine Atrophie der renalen Medulla und eine Ausdünnung des Cortex. Nieren mit einer schweren Hydronephrose waren vergrößert und zeigten einen Verlust der medullären Struktur. Nichtsdestotrotz waren diese transgenen NFAT5-Mäuse lebensfähig und fertil, auch wenn sie 15-30% weniger an Gewicht wogen als ihre nicht-transgenen Wurfgeschwister (Lam et al., 2004).

Als Zusammenfassung lässt sich festhalten, dass die globale Deletion und das Ausschalten der NFAT5-Aktivität durch den dominant negativen NFAT5 im Sammelrohr zu beträchtlichen Störungen in der Nierenentwicklung und der Funktion führt. Die Deletion von NFAT5 im FoxD1-Kompartiment ruft jedoch keine entwicklungsbedingten Störungen hervor.

Im Hinblick auf die Expression proinflammatorischer und profibrotischer Faktoren konnte gezeigt werden, dass NFAT5-Knockout-Mäuse unter basalen Bedingungen bereits vermehrt proinflammatorische und profibrotische Faktoren exprimieren. Dafür wurden unterschiedliche Fibrosemarker und proinflammatorische Gene untersucht. So zeigte sich in den FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Nieren ein signifikanter Anstieg des Fibrosemarkers Col1a1 und Fibronectin. Des Weiteren kam es unter basalen Bedingungen in den Knockout-Nieren auch zu einer tendenziellen Erhöhung des proinflammatorischen Gens F4/80. Dies belegt, dass eine Deletion von NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen bereits unter basalen Bedingungen die Fibrosemarker Col1a1 und Fibronectin sowie das proinflammatorische Gen F4/80 ansteigen lässt.

In einer anderen Studie wurden arterielle vaskuläre glatte Muskelzellen einer biomechanischen Dehnung ausgesetzt und mittels Immunfluoreszenz und einer Protein-biochemischen Analyse untersucht. Dabei förderte die Dehnung die Translokation von NFAT5 in den Nukleus binnen 24 Stunden. DNA-Microarrays und ChiP-Analysen identifizierten das Matrixmolekül Tenascin-C als ein bedeutendes

transkriptionelles Ziel von NFAT5 unter diesen Bedingungen, welches die Migration von vaskulären glatten Muskelzellen stimuliert. Somit ist eine biomechanische Dehnung ausreichend, um NFAT5 in vaskulären glatten Muskelzellen zu aktivieren und in diesen die Expression von Tenascin-C zu regulieren (Scherer et al., 2014).

Der Schädigungsmarker LCN2, welcher für das NGAL-Protein codiert, wird als Biomarker für akute und chronische Nierenerkrankungen verwendet (Charkoftaki et al., 2019). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Mäuse eine erhöhte Expression in verschiedenen tubulären Segmenten für NGAL aufweisen. Mittels der mRNA-scope-Technik wurden diese tubulären Strukturen näher betrachtet. Dabei kam es unter basalen Bedingungen in den FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Nieren zu einer deutlichen Expression des Schädigungsmarkers LCN2 in den Sammelrohren. Außerdem konnte eine geringe Expression von LCN2 in der dünnen sowie der dicken aufsteigenden Henle-Schleife festgestellt werden. Der Schädigungsmarker LCN2 wird damit bereits unter basalen Bedingungen vermehrt im distalen Nephron exprimiert.

Die Arbeit von *Probst Stephanie et al.* aus dem Jahre 2019 kam zu einem ähnlichen Ergebnis. So wurde auch hier über eine Expression von NGAL/LCN2-Rezeptoren in den Sammelrohrzellen, einschließlich der kortikalen Sammelrohrzellen, von Nagetieren berichtet. Es wurde vermutet, dass die Expression von LCN2 im Sammelrohr für die dortige Proteinaufnahme mittels Endozytose verantwortlich sein könnte, wobei jedoch die genaue Funktion nach wie vor unklar bleibt. Außerdem wurde festgestellt, dass Hyperosmolarität/-tonizität den LCN2-Rezeptor in Sammelrohrzellen der inneren Medulla kultivierter Mäuse hochreguliert (Probst et al., 2019), was darauf hindeuten könnte, dass LCN2 zu den Zielgenen des Transkriptionsfaktors NFAT5 zählt.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von NFAT5 für die Progression einer Nierenfibrose untersucht. Da zuvor durchgeführte Versuche gezeigt haben, dass die Deletion von NFAT5 in interstitiellen Zellen zu einer Erhöhung der profibrotischen Faktoren führte, wurde in weiteren Versuchen untersucht, welchen Einfluss die NFAT5 Deletion in diesen Zellen auf den Verlauf einer experimentell herbeigeführten Fibrose hat. Dafür wurde mittels einer Ureterligatur eine experimentelle Nierenfibrose erzeugt und überprüft, ob die Progression der Fibrose bei einer mechanischen Ureterobstruktion von NFAT5 abhängig ist. Dabei zeigte sich,

dass die Deletion des Transkriptionsfaktors NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen, wie den glatten Muskelzellen, den Reninzellen, den Mesangialzellen und den interstitiellen renalen Zellen den Verlauf einer Nierenfibrose nicht beeinflusst und folglich keine Konsequenz für die Progression einer Nierenfibrose hat.

In der Literatur liegen bislang keine Befunde zur Rolle von NFAT5 in Bezug auf die Entstehung und die Progression einer Nierenfibrose vor.

## 5. Zusammenfassung

Der *Nuclear factor of activated T-cells type 5* (NFAT5) – in der Literatur auch als OREBP oder TonEBP bezeichnet – stellt einen wichtigen osmoprotektiven Faktor in der Niere dar. Um die Harnkonzentrierung sicherzustellen ist in der Niere ein Osmolaritätsgradient aufgebaut, der an der Nierenrinde ca. 290 mosmol/l und an der Papillenspitze bis zu 1300 mosmol/l betragen kann. Dieser Osmolaritätsgradient stellt insbesondere die Zellen des Nierenmarks vor besondere Herausforderungen. Die hohe hyperosmolare Situation im Interstitium des Nierenmarks, vor allem in der Papille, würde ohne Schutzmechanismen zum massiven Wasserentzug der renalen Zellen und damit zu deren Funktionsverlust/Apoptose führen. Damit diese Zellen den hypertonen Bedingungen dennoch standhalten können, fördert NFAT5 die Transkription verschiedener Gene, wie zum Beispiel die Aldose-Reduktase, Betain-Transporter, Natrium-Myoinositol-Cotransporter und Natrium/Chlorid-abhängige Taurin-Transporter. Somit bedingt NFAT5 eine Erhöhung von osmotisch aktiven Molekülen, wie Sorbitol, Myoinositol, Betain, Taurin und Glycerophosphocholin in renalen Zellen. Dieser Konzentrationsanstieg der Osmolyte vermindert den osmotischen Druck an der Zellwand und schützt die Zellen vor hypertonem Stress. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die globale Deletion von NFAT5 zu schweren renalen Entwicklungsdefekten führt. Da NFAT5 in verschiedenen Zellkompartimenten der Niere exprimiert wird, sollte nun herausgefunden werden, welchen Zellen bei der Entwicklung der Niere diese NFAT5-abhängigen Defekte zuzuordnen sind.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NFAT5 in FoxD1-Stromazellabkömmlingen für die Nierenentwicklung genauer zu erforschen.

Deswegen wurde, mit Hilfe eines Mausmodells, in dem NFAT5 selektiv bereits in der embryonalen Phase im Stromazellkompartiment der Niere, aus dem die glatten Gefäßmuskelzellen, Mesangialzellen, Reninzellen und interstitielle Zellen hervorgehen, fehlt (NFAT5 fl/fl FoxD1<sup>Cre+</sup>), in Bezug auf die Entwicklung und die Funktion der Niere analysiert.

Dafür wurde zunächst die Verteilung von NFAT5 in der wildtypischen Niere untersucht. Es zeigte sich ein Gradient von NFAT5, welcher vom Cortex, über die äußere Medulla



bis hin zur Papille deutlich zunimmt. Dabei wurde festgestellt, dass NFAT5 in allen Zellen des FoxD1-Kompartiments, mit Ausnahme der glatten Muskelzellen, vorkommt. Außerdem wurden die Auswirkungen der Deletion von NFAT5 im Stromakompartiment auf die Nierenentwicklung betrachtet. Um zu überprüfen, ob Zellen, die sich aus FoxD1-positiven Stromazellen entwickeln, für diese Entwicklungsdefekte verantwortlich sind, wurde die renale Entwicklung in FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Mäusen untersucht. Die Nieren der Tiere mit NFAT5 Deletion in Stromazellen zeigten eine normale Entwicklung, eine ähnliche Größe und Anzahl der Glomeruli sowie eine ähnliche Breite von Cortex, äußerer und innerer Medulla wie die Wildtyp-Nieren.

Vorbefunde der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Charlotte Wagner zeigten bereits, dass die Deletion von NFAT5 im renalen Stromazellkompartiment von Mäusen zu einer verminderten Harnosmolarität bereits unter basalen Bedingungen führt, während die glomeruläre Filtrationsrate und die Bestimmung der Retentionsparameter Plasma-Kreatinin und Plasma-Harnstoff keine Unterschiede zu den wildtypischen Kontrollen zeigten. Aus diesem Grund wurde, in der vorliegenden Arbeit, die Expression von profibrotischen und proinflammatorischen Markern sowie die Entwicklung von Myofibroblasten untersucht, da die obengenannten Vorbefunde auf Defekte hinweisen könnten, die vor allem das Nierenmark betreffen.

Dabei wurde bei den FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Mäusen ein signifikanter Anstieg der Expression profibrotischer Gene wie Col1a1 und Fibronectin, vor allem in der Papille, deutlich. Im Hinblick auf die Expression proinflammatorischer Gene wie F4/80 konnte unter basalen Bedingungen kein signifikanter Unterschied, lediglich eine tendenzielle Erhöhung, in den Knockout-Nieren gesehen werden. Zudem zeigten sich weder in der Wildtyp- noch in der Knockout-Niere Anzeichen für eine verstärkte Myofibroblastenbildung.

In weiteren Versuchen wurde die Rolle von NFAT5 für die Progression einer Nierenfibrose mittels einer unilateralen Ureterobstruktion erforscht. Es zeigte sich, dass die Deletion des Transkriptionsfaktors NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen den Verlauf einer experimentell herbeigeführten Nierenfibrose nicht beeinflusst, da die Mäuse, die lediglich eine Ureterobstruktion erhielten im Vergleich zu den Mäusen bei denen zusätzlich zur Ureterligatur NFAT5 in FoxD1-positiven Zellen fehlte, im Hinblick auf profibrotische und proinflammatorische Gene sowie in Bezug auf die Makrophagen und den Schädigungsmarker LCN2 keine Unterschiede aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass das Fehlen von NFAT5 in den interstitiellen Zellen, insbesondere des Nierenmarks, bereits unter basalen Bedingungen zu Fibrose-ähnlichen Veränderungen führt, die offensichtlich die Funktion des Marks beeinflussen, da die Nieren dieser Tiere schlechter Harn konzentrieren können, weshalb folglich die Harnosmolarität vermindert ist. Allerdings hat die Deletion des Transkriptionsfaktors NFAT5 für die Progression einer Nierenfibrose keine wesentliche Bedeutung.

## 6. Literaturverzeichnis

- Ackermann, H., 2012. ALLEX - Alles fürs Examen: Das Kompendium für die 2. ÄP, 1st ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Adiyanti, S.S., Loho, T., 2012. Acute Kidney Injury (AKI) Biomarker. *Acta Med Indones* 44, 10.
- Alfieri, C.M., Evans-Anderson, H.J., Yutzey, K.E., 2007. Developmental regulation of the mouse IGF-I exon 1 promoter region by calcineurin activation of NFAT in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 292, C1887–C1894. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00506.2006>
- Amara, S., Alotaibi, D., Tiriveedhi, V., 2016. NFAT5/STAT3 interaction mediates synergism of high salt with IL-17 towards induction of VEGF-A expression in breast cancer cells. *Oncol Lett* 12, 933–943. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4713>
- Andres-Hernando, A., Lanaspa, M.A., Rivard, C.J., Berl, T., 2008. Nucleoporin 88 (Nup88) Is Regulated by Hypertonic Stress in Kidney Cells to Retain the Transcription Factor Tonicity Enhancer-binding Protein (TonEBP) in the Nucleus. *J Biol Chem* 283, 25082–25090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802381200>
- Behrends, J.C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C., Wischmeyer, E., 2016. *Duale Reihe - Physiologie*, 3rd ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Berger, T., Togawa, A., Duncan, G.S., Elia, A.J., You-Ten, A., Wakeham, A., Fong, H.E.H., Cheung, C.C., Mak, T.W., 2006. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1834–1839. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510847103>
- Brandes, R., Lang, F., Schmidt, R.F., 2019. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 32nd ed. Springer-Verlag, Berlin.
- Buonafina, M., Martinez-Martinez, E., Jaisser, F., 2018. More than a simple biomarker: the role of NGAL in cardiovascular and renal diseases. *Clinical Science* 132, 909–923. <https://doi.org/10.1042/CS20171592>
- Burg, M.B., Ferraris, J.D., Dmitrieva, N.I., 2007. Cellular Response to Hyperosmotic Stresses. *Physiological Reviews* 87, 1441–1474. <https://doi.org/10.1152/physrev.00056.2006>
- Casali, C.I., Erjavec, L.C., Fernández-Tome, M.D.C., 2018. Sequential and synchronized hypertonicity-induced activation of Rel-family transcription factors is required for osmoprotection in renal cells. *Heliyon* 4, e01072. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01072>
- Cha, J.H., Woo, S.K., Han, K.H., Kim, Y.H., Handler, J.S., Kim, J., Kwon, H.M., 2001. Hydration Status Affects Nuclear Distribution of Transcription Factor Tonicity Responsive Enhancer Binding Protein in Rat Kidney. *J Am Soc Nephrol* 10.
- Chakraborty, S., Kaur, S., Guha, S., Batra, S.K., 2012. The Multifaceted Roles of Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL) In Inflammation and Cancer. *Biochim Biophys Acta* 1826, 129–169. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.008>

- Charkoftaki, G., Wang, Y., McAndrews, M., Bruford, E.A., Thompson, D.C., Vasiliou, V., Nebert, D.W., 2019. Update on the human and mouse lipocalin (LCN) gene family, including evidence the mouse Mup cluster is result of an “evolutionary bloom.” *Hum Genomics* 13. <https://doi.org/10.1186/s40246-019-0191-9>
- Cheung, C.Y., Ko, B.C., 2013. NFAT5 in cellular adaptation to hypertonic stress – regulations and functional significance. *J Mol Signal* 8, 5. <https://doi.org/10.1186/1750-2187-8-5>
- Chua, O.W.H., Wong, K.K.L., Ko, B.C., Chung, S.K., Chow, B.K.C., Lee, L.T.O., 2015. Role of nuclear factor of activated T-cells 5 in regulating hypertonic-mediated secretin receptor expression in kidney collecting duct cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 922–932. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.12.009>
- Cramer, E.P., Glenthøj, A., Häger, M., Juncker-Jensen, A., Engelholm, L.H., Santoni-Rugiu, E., Lund, L.R., Laerum, O.D., Cowland, J.B., Borregaard, N., 2012. No Effect of NGAL/lipocalin-2 on Aggressiveness of Cancer in the MMTV-PyMT/FVB/N Mouse Model for Breast Cancer. *PLOS ONE* 7, e39646. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039646>
- Di Ciano, C., Nie, Z., Szászi, K., Lewis, A., Uruno, T., Zhan, X., Rotstein, O.D., Mak, A., Kapus, A., 2002. Osmotic stress-induced remodeling of the cortical cytoskeleton. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 283, C850–C865. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00018.2002>
- Dmitrieva, N.I., Cai, Q., Burg, M.B., 2004. Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2317–2322. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308463100>
- Du, Z.-P., Wu, B.-L., Wu, X., Lin, X.-H., Qiu, X.-Y., Zhan, X.-F., Wang, S.-H., Shen, J.-H., Zheng, C.-P., Wu, Z.-Y., Xu, L.-Y., Wang, D., Li, E.-M., 2015. A systematic analysis of human lipocalin family and its expression in esophageal carcinoma. *Scientific Reports* 5, 12010. <https://doi.org/10.1038/srep12010>
- Duffield, J.S., 2014. Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis. *J Clin Invest* 124, 2299–2306. <https://doi.org/10.1172/JCI72267>
- Flower, D.R., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 318, 1–14.
- Guo, K., Jin, F., 2015. NFAT5 promotes proliferation and migration of lung adenocarcinoma cells in part through regulating AQP5 expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 465, 644–649. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.08.078>
- Haase, M., Bellomo, R., Devarajan, P., Schlattmann, P., Haase-Fielitz, A., 2009. Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *American Journal of Kidney Diseases* 54, 1012–1024. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2009.07.020>
- Haase, M., Haase-Fielitz, A., 2010. Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) für akute Nierenschädigung: das renale Troponin? / Neutrophil gelatinase-associated lipocalin for acute kidney injury – the renal troponin? *Journal of Laboratory Medicine* 34, 67–75. <https://doi.org/10.1515/jlm.2010.012>
- Haase-Fielitz, A., Haase, M., Devarajan, P., 2014. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem* 51, 335–351. <https://doi.org/10.1177/0004563214521795>

- Han, K.-H., Woo, S.K., Kim, W.-Y., Park, S.-H., Cha, J.-H., Kim, J., Kwon, H.M., 2004. Maturation of TonEBP expression in developing rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 287, F878–F885. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00047.2004>
- Hui, Z., Jiang, Z., Qiao, D., Bo, Z., Qiyuan, K., Shaohua, B., Wenbing, Y., Wei, L., Cheng, L., Shuangning, L., Zhengyi, L., Yingyi, L., 2020. Increased expression of LCN2 formed a positive feedback loop with activation of the ERK pathway in human kidney cells during kidney stone formation. *Scientific Reports* 10, 21287. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75670-w>
- Huppelsberg, J., Walter, K., 2013. *Kurzlehrbuch Physiologie*, 4th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Izumi, Y., Li, J., Villers, C., Hashimoto, K., Burg, M.B., Ferraris, J.D., 2012. Mutations that reduce its specific DNA binding inhibit high NaCl-induced nuclear localization of the osmoprotective transcription factor NFAT5. *Am J Physiol Cell Physiol* 303, C1061–C1069. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00265.2012>
- Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., 2009. *Physiologie*, 6th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Küper, C., Beck, F.-X., Neuhofer, W., 2015. Generation of a conditional knockout allele for the NFAT5 gene in mice. *Front Physiol* 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00507>
- Kuppe, C., Ibrahim, M.M., Kranz, J., Zhang, X., Ziegler, S., Perales-Patón, J., Jansen, J., Reimer, K.C., Smith, J.R., Dobie, R., Wilson-Kanamori, J.R., Halder, M., Xu, Y., Kabgani, N., Kaesler, N., Klaus, M., Gernhold, L., Puellas, V.G., Huber, T.B., Boor, P., Menzel, S., Hoogenboezem, R.M., Bindels, E.M.J., Steffens, J., Floege, J., Schneider, R.K., Saez-Rodriguez, J., Henderson, N.C., Kramann, R., 2021. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature* 589, 281–286. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2941-1>
- Lam, A.K.M., Ko, B.C.B., Tam, S., Morris, R., Yang, J.Y., Chung, S.K., Chung, S.S.M., 2004. Osmotic Response Element-binding Protein (OREBP) Is an Essential Regulator of the Urine Concentrating Mechanism\*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 48048–48054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407224200>
- Lee, H.-W., Kim, W.-Y., Song, H.-K., Yang, C.-W., Han, K.-H., Kwon, H.M., Kim, J., 2006. Sequential expression of NKCC2, TonEBP, aldose reductase, and urea transporter-A in developing mouse kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 292, F269–F277. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00145.2006>
- Lee, J.H., Suh, J.H., Choi, S.Y., Kang, H.J., Lee, H.H., Ye, B.J., Lee, G.R., Jung, S.W., Kim, C.J., Lee-Kwon, W., Park, J., Myung, K., Park, N.H., Kwon, H.M., 2019. Tonicity-responsive enhancer-binding protein promotes hepatocellular carcinogenesis, recurrence and metastasis. *Gut* 68, 347–358. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315348>
- Lee, J.-U., Kim, L.-K., Choi, J.-M., 2018. Revisiting the Concept of Targeting NFAT to Control T Cell Immunity and Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02747>
- Lee, N., Kim, D., Kim, W.-U., 2019. Role of NFAT5 in the Immune System and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00270>
- Lee, S.A., Noel, S., Kurzhagen, J.T., Sadasivam, M., Pierorazio, P.M., Arend, L.J., Hamad, A.R., Rabb, H., 2020. CD4+ T cell-derived NGAL modifies outcome

- from ischemic acute kidney injury. *J Immunol* 204, 586–595. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900677>
- Lee, S.D., Woo, S.K., Kwon, H.M., 2002. Dimerization is required for phosphorylation and DNA binding of TonEBP/NFAT5. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 968–975. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00572-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00572-7)
- Liu, Y., 2011. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 7, 684–696. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2011.149>
- López-Rodríguez, C., Antos, C.L., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Lin, F., Novobrantseva, T.I., Bronson, R.T., Igarashi, P., Rao, A., Olson, E.N., 2004. Loss of NFAT5 results in renal atrophy and lack of tonicity-responsive gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2392–2397. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308703100>
- López-Rodríguez, C., Aramburu, J., Jin, L., Rakeman, A.S., Michino, M., Rao, A., 2001. Bridging the NFAT and NF- $\kappa$ B Families: NFAT5 Dimerization Regulates Cytokine Gene Transcription in Response to Osmotic Stress. *Immunity* 15, 47–58. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00165-0](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00165-0)
- Lyakh, L., Ghosh, P., Rice, N.R., 1997. Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol Cell Biol* 17, 2475–2484.
- Maeoka, Y., Wu, Y., Okamoto, T., Kanemoto, S., Guo, X.P., Saito, A., Asada, R., Matsuhisa, K., Masaki, T., Imaizumi, K., Kaneko, M., 2018. NFAT5 up-regulates expression of the kidney-specific ubiquitin ligase gene Rnf183 under hypertonic conditions in inner-medullary collecting duct cells. *J Biol Chem* 294, 101–115. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002896>
- Mak, M.C., Lam, K.M., Chan, P.K., Lau, Y.B., Tang, W.H., Yeung, P.K.K., Ko, B.C.B., Chung, S.M.S., Chung, S.K., 2011. Embryonic Lethality in Mice Lacking the Nuclear Factor of Activated T Cells 5 Protein Due to Impaired Cardiac Development and Function. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019186>
- Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsnefes, M., Zahedi, K., Yang, J., Barasch, J., Devarajan, P., 2003. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. *JASN* 14, 2534–2543. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000088027.54400.C6>
- Mognol, G.P., Carneiro, F.R.G., Robbs, B.K., Faget, D.V., Viola, J.P.B., 2016. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death Dis* 7, e2199. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.97>
- Mori, K., Lee, H.T., Rapoport, D., Drexler, I.R., Foster, K., Yang, J., Schmidt-Ott, K.M., Chen, X., Li, J.Y., Weiss, S., Mishra, J., Cheema, F.H., Markowitz, G., Suganami, T., Sawai, K., Mukoyama, M., Kunis, C., D'Agati, V., Devarajan, P., Barasch, J., 2005. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* 115, 610–621. <https://doi.org/10.1172/JCI200523056>
- Noto, A., Cibecchini, F., Fanos, V., Mussap, M., 2013. NGAL and Metabolomics: The Single Biomarker to Reveal the Metabolome Alterations in Kidney Injury. *Biomed Res Int* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/612032>
- Park, Y.-J., Yoo, S.-A., Kim, M., Kim, W.-U., 2020. The Role of Calcium–Calcineurin–NFAT Signaling Pathway in Health and Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00195>
- Pawar, R.D., Pitashny, M., Gindea, S., Tieng, A.T., Levine, B., Goilav, B., Campbell, S.R., Xia, Y., Qing, X., Thomas, D., Herlitz, L., Berger, T., Mak, T.W., Putterman,

- C., 2012. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin is Instrumental in the Pathogenesis of Antibody-Mediated Nephritis. *Arthritis Rheum* 64, 1620–1631. <https://doi.org/10.1002/art.33485>
- Probst, S., Scharner, B., McErlean, R., Lee, W.-K., Thévenod, F., 2019. Inverse Regulation of Lipocalin-2/24p3 Receptor/SLC22A17 and Lipocalin-2 Expression by Tonicity, NFAT5/TonEBP and Arginine Vasopressin in Mouse Cortical Collecting Duct Cells mCCD(cl.1): Implications for Osmotolerance. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20215398>
- Scherer, C., Pfisterer, L., Wagner, A.H., Hödebeck, M., Cattaruzza, M., Hecker, M., Korff, T., 2014. Arterial Wall Stress Controls NFAT5 Activity in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Am Heart Assoc* 3. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000626>
- Schiefner, A., Skerra, A., 2015. The Menagerie of Human Lipocalins: A Natural Protein Scaffold for Molecular Recognition of Physiological Compounds. *Acc. Chem. Res.* 48, 976–985. <https://doi.org/10.1021/ar5003973>
- Schmidt-Ott, K.M., Mori, K., Li, J.Y., Kalandadze, A., Cohen, D.J., Devarajan, P., Barasch, J., 2007. Dual Action of Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin. *JASN* 18, 407–413. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006080882>
- Schmitt, R., 2012. Mechanismen der renalen Fibrose | SpringerLink [WWW Document]. URL <https://link.springer.com/article/10.1007/s11560-011-0582-y?shared-article-renderer> (accessed 1.16.21).
- Schrezenmeier, EV., Barasch, J., Budde, K., Westhoff, T., Schmidt-Ott, KM., 2017. Biomarkers in acute kidney injury – pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol (Oxf)* 219, 554–572. <https://doi.org/10.1111/apha.12764>
- Schulz, R.A., Yutzey, K.E., 2003. Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development [WWW Document]. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.10.008>
- Serman, Y., Fuentealba, R.A., Pasten, C., Rocco, J., Ko, B.C.B., Carrión, F., Irrarázabal, C.E., 2019. Emerging new role of NFAT5 in inducible nitric oxide synthase in response to hypoxia in mouse embryonic fibroblast cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 317, C31–C38. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00054.2019>
- Singh, R.G., Pendharkar, S.A., Plank, L.D., Petrov, M.S., 2017. Role of human lipocalin proteins in abdominal obesity after acute pancreatitis. *Peptides* 91, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.03.001>
- Sugimoto, H., LeBleu, V.S., Basukonda, D., Keck, P., Taduri, G., Bechtel, W., Okada, H., Carlson, W., Bey, P., Rusckowski, M., Tampe, B., Tampe, D., Kanasaki, K., Zeisberg, M., Kalluri, R., 2012. Activin–like kinase–3 activity is important for kidney regeneration and reversal of fibrosis. *Nat Med* 18, 396–404. <https://doi.org/10.1038/nm.2629>
- Tong, E.H.Y., Guo, J.-J., Huang, A.-L., Liu, H., Hu, C.-D., Chung, S.S.M., Ko, B.C.B., 2006. Regulation of Nucleocytoplasmic Trafficking of Transcription Factor OREBP/TonEBP/NFAT5. *J. Biol. Chem.* 281, 23870–23879. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602556200>
- Uniklinik RWTH Aachen, 2020. Wegweisende Studie in „Nature“ veröffentlicht: Entschlüsselung des zellulären Ursprungs von Nierenfibrose [WWW Document]. URL <https://www.ukaachen.de/alle-beitraege-aus-news/news/wegweisende-studie-in-nature-veroeffentlicht-entschluesselung-des-zellulaeren-ursprungs-von-nierenfibrose/> (accessed 1.16.21).

- Vaeth, M., Feske, S., 2018. NFAT control of immune function: New Frontiers for an Abiding Trooper. *F1000Res* 7. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13426.1>
- Vihma, H., Luhakooder, M., Pruunsild, P., Timmusk, T., 2016. Regulation of different human NFAT isoforms by neuronal activity. *Journal of Neurochemistry* 137, 394–408. <https://doi.org/10.1111/jnc.13568>
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J., Luo, Y., 2012. RNAscope: A Novel in Situ RNA Analysis Platform for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics* 14, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Wang, J.-C., Ku, H.-Y., Chen, T.-S., Chuang, H.-S., 2016. Detection of low-abundance biomarker lipocalin 1 for diabetic retinopathy using optoelectrokinetic bead-based immunosensing. *Biosensors and Bioelectronics* 89, 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.014>
- Weckmann, G., Chenot, J.-F., Stracke, S., 2019. Versorgung von Patienten mit chronischer nicht-dialysepflichtiger Nierenerkrankung in der Hausarztpraxis, S3-Leitlinie, AWMF-Register-Nr. 053-048 DEGAM-Leitlinie Nr. 22.
- Wu, B., Chen, J., Yang, Y., 2019. Biomarkers of Acute Kidney Injury after Cardiac Surgery: A Narrative Review. *Biomed Res Int* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7298635>
- Wynn, T., 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214, 199–210. <https://doi.org/10.1002/path.2277>
- Xu, S., Venge, P., 2000. Lipocalins as biochemical markers of disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1482, 298–307. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00163-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00163-1)
- Yi, T., Tan, K., Cho, S.-G., Wang, Y., Luo, J., Zhang, W., Li, D., Liu, M., 2010. Regulation of Embryonic Kidney Branching Morphogenesis and Glomerular Development by KISS1 Receptor (Gpr54) through NFAT2- and Sp1-mediated Bmp7 Expression. *J Biol Chem* 285, 17811–17820. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.130740>
- Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., Kalluri, R., 2003. BMP-7 counteracts TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nature Medicine* 9, 964–968. <https://doi.org/10.1038/nm888>
- Zetterqvist, A.V., Blanco, F., Öhman, J., Kotova, O., Berglund, L.M., de Frutos Garcia, S., Al-Naemi, R., Wigren, M., McGuire, P.G., Gonzalez Bosc, L.V., Gomez, M.F., 2015. Nuclear Factor of Activated T Cells Is Activated in the Endothelium of Retinal Microvessels in Diabetic Mice. *J Diabetes Res* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/428473>
- Zhang, Z., Dmitrieva, N.I., Park, J.-H., Levine, R.L., Burg, M.B., 2004. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9491–9496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402961101>
- Zhou, X., 2016. How do kinases contribute to tonicity-dependent regulation of the transcription factor NFAT5? *World J Nephrol* 5, 20–32. <https://doi.org/10.5527/wjn.v5.i1.20>



# 7. Anhang

## 7.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Nephron und Sammelrohrsystem .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Gesamtstruktur des humanen NFAT5-Proteins .....	12
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Struktur von Lipocalin .....	21
<b>Abbildung 4:</b> RNAscope in-situ-Hybridisierung – Arbeitsablauf .....	40
<b>Abbildung 5:</b> Darstellung der Expression von NFAT5 in wildtypischen NFAT5 flfl Nieren mittels mRNA-scope-Technik. NFAT5 zeigt in der Übersichtsaufnahme eine deutliche Zunahme in der Papille der Wildtyp-Niere (Abb. 5 A: NFAT5 rot, PDGFR $\beta$ grün dargestellt). Nachweis des Vorkommens von NFAT5 in den Detailaufnahmen in PDGFR $\beta$ -positiven Mesangiumzellen der Glomeruli (Abb. 5 B: NFAT5 rot, PDGFR $\beta$ grün dargestellt), in PDGFR $\beta$ -positiven interstitiellen Zellen der Papille (Abb. 5 C: NFAT5 rot, PDGFR $\beta$ grün dargestellt) und in Renin bildenden (weiße Pfeile in Abb. 5 D) juxtaglomerulären Zellen (Abb. 5 D: NFAT5 rot, Renin grün dargestellt). Jedoch kein Nachweis von NFAT5 in glatten Muskelzellen (Abb. 5 E: NFAT5 rot, $\alpha$ -SMA grün dargestellt).....	50
<b>Abbildung 6:</b> Dargestellt sind jeweils eine Nieren-Übersichtsaufnahme von FoxD1 <sup>Cre+</sup> -NFAT5 flfl Wildtyp- (A) und Knockout-Mäusen (B) mittels Durchlichtaufnahme, sowie die mRNA-Daten zur Anzahl der Glomeruli pro 5 $\mu$ m Nierenschnitt (C) und zum Zonendurchmesser (D) im Vergleich zwischen Wildtyp- (wt) und Knockout- (ko) Mäusen. ....	51
<b>Abbildung 7:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer wildtypischen NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. Col1a1 ist dabei rot und PDGFR $\beta$ grün dargestellt.....	53
<b>Abbildung 8:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer FoxD1 <sup>Cre+</sup> -NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. Col1a1 ist dabei rot und PDGFR $\beta$ grün dargestellt.....	54
<b>Abbildung 9:</b> Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich	

- in Bezug auf Col1a1 ein signifikanter Unterschied (\*  $p < 0,05$  stellt eine signifikante Änderung dar) zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 55
- Abbildung 10:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer wildtypischen NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. Fibronectin ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt. .... 56
- Abbildung 11:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. Fibronectin ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt. .... 58
- Abbildung 12:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich in Bezug auf Fibronectin ein signifikanter Unterschied (\*  $p < 0,05$  stellt eine signifikante Änderung dar) zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 59
- Abbildung 13:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer wildtypischen NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. F4/80 ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt. .... 60
- Abbildung 14:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. F4/80 ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt. .... 62
- Abbildung 15:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich zwar eine minimale Erhöhung von F4/80 in der basalen Knockout-Niere erkennen, ein signifikanter Unterschied in Bezug auf F4/80 zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere konnte jedoch nicht festgestellt werden. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 63
- Abbildung 16:** Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen einer wildtypischen NFAT5 flfl Niere (A) und einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 flfl Niere (B) mittels

- immunohistochemischer Färbung. Als primärer Antikörper wurde hierbei Col1a1 (rot dargestellt) verwendet. Es zeigt sich ein Anstieg von Col1a1 in der Knockout-Niere. .... 64
- Abbildung 17:** Dargestellt sind Übersichtsaufnahmen einer wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere (A) und einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere (B) mittels einer Fast-Green-Siriusrot-Färbung. Dabei stellt sich kollagenes Bindegewebe rot und anderes Gewebe grün dar. Es zeigt sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg von Gesamtkollagen, vor allem in der Papille der Knockout-Niere. .... 64
- Abbildung 18:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere mittels mRNA-scope-Technik.  $\alpha$ -SMA ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt. .... 66
- Abbildung 19:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie drei dazugehörige Detailbilder des Cortex (B), der äußeren Medulla (C) sowie der Papille (D) einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere mittels mRNA-scope-Technik.  $\alpha$ -SMA ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt. .... 67
- Abbildung 20:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich zwar eine minimale Erhöhung von  $\alpha$ -SMA in der basalen Knockout-Niere erkennen, ein signifikanter Unterschied in Bezug auf  $\alpha$ -SMA zwischen der basalen Wildtyp- und der basalen Knockout-Niere konnte jedoch nicht festgestellt werden. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 68
- Abbildung 21:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere (B) mittels mRNA-scope-Technik. Der Schädigungsmarker LCN2 ist dabei rot dargestellt. .... 70
- Abbildung 22:** Dargestellt sind die mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der basalen Wildtyp- sowie der basalen Knockout-Nieren. Dabei lässt sich ein deutlicher Anstieg des Schädigungsmarkers LCN2 in der basalen Knockout-Niere erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 70
- Abbildung 23:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und AQP-

1 grün dargestellt. AQP-1 zeigt aufgrund der sehr hohen Expression in den einzelnen Zellen keine punktuelle Expression. ....	71
<b>Abbildung 24:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer FoxD1 <sup>Cre+</sup> -NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und AQP-1 grün dargestellt. ....	72
<b>Abbildung 25:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und CLCNKa grün dargestellt. ....	73
<b>Abbildung 26:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer FoxD1 <sup>Cre+</sup> -NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und CLCNKa grün dargestellt. ....	74
<b>Abbildung 27:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und AQP-2 grün dargestellt. ....	75
<b>Abbildung 28:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer FoxD1 <sup>Cre+</sup> -NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und AQP-2 grün dargestellt. ....	76
<b>Abbildung 29:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und NKCC2 grün dargestellt. ....	77
<b>Abbildung 30:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer FoxD1 <sup>Cre+</sup> -NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und NKCC2 grün dargestellt. ....	78
<b>Abbildung 31:</b> Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen NFAT5 flfl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und CD31 grün dargestellt. ....	79

- Abbildung 32:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und CD31 grün dargestellt. .... 79
- Abbildung 33:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer wildtypischen NFAT5 fl/fl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt..... 80
- Abbildung 34:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme (A) sowie das dazugehörige Detailbild der äußeren Medulla (B) einer FoxD1<sup>Cre+</sup>-NFAT5 fl/fl Niere mittels mRNA-scope-Technik. LCN2 ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt. .... 81
- Abbildung 35:** Übersichtsaufnahme der Col1a1 Expression in einer CL-Niere (A) sowie in einer UUO-Niere (B) einer wildtypischen NFAT5 fl/fl Maus mittels mRNA-scope-Technik. Col1a1 ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt. .. 82
- Abbildung 36:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Knockout-Niere (B) mittels mRNA-scope-Technik. Col1a1 ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt. .... 83
- Abbildung 37:** mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der kontralateralen Wildtyp-Niere (CL wt), der ligierten Wildtyp-Niere (UUO wt), sowie der kontralateralen Knockout-Niere (CL KO) und der ligierten Knockout-Niere (UUO KO). Dabei lässt sich in Bezug auf Col1a1 kein signifikanter Unterschied zwischen der ligierten Wildtyp- und der ligierten Knockout-Niere erkennen. Zwischen den CL wt- bzw. den CL KO- und den entsprechenden UUO wt- bzw. UUO KO-Nieren lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 83
- Abbildung 38:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Knockout-Niere (B) mittels mRNA-scope-Technik. α-SMA ist dabei rot und PDGFRβ grün dargestellt. .... 84
- Abbildung 39:** mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der kontralateralen Wildtyp-Niere (CL wt), der ligierten Wildtyp-Niere (UUO wt), sowie der

- kontralateralen Knockout-Niere (CL KO) und der ligierten Knockout-Niere (UUO KO). Dabei lässt sich in Bezug auf  $\alpha$ -SMA kein signifikanter Unterschied zwischen der ligierten Wildtyp- und der ligierten Knockout-Niere erkennen. Zwischen den CL wt- bzw. den CL KO- und den entsprechenden UUO wt- bzw. UUO KO-Nieren lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 85
- Abbildung 40:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Knockout-Niere (B) mittels mRNA-scope-Technik. F4/80 ist dabei rot und PDGFR $\beta$  grün dargestellt. .... 86
- Abbildung 41:** mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der kontralateralen Wildtyp-Niere (CL wt), der ligierten Wildtyp-Niere (UUO wt), sowie der kontralateralen Knockout-Niere (CL KO) und der ligierten Knockout-Niere (UUO KO). Dabei lässt sich in Bezug auf F4/80 kein signifikanter Unterschied zwischen der ligierten Wildtyp- und der ligierten Knockout-Niere erkennen. Zwischen den CL wt- bzw. den CL KO- und den entsprechenden UUO wt- bzw. UUO KO-Nieren lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 86
- Abbildung 42:** Dargestellt sind eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Wildtyp-Niere (A) sowie eine Übersichtsaufnahme einer UUO-Knockout-Niere (B) mittels Durchlichtaufnahme. LCN2 ist dabei rot dargestellt. .... 87
- Abbildung 43:** mRNA-Daten der quantitativen Realtime-PCR der kontralateralen Wildtyp-Niere (CL wt), der ligierten Wildtyp-Niere (UUO wt), sowie der kontralateralen Knockout-Niere (CL KO) und der ligierten Knockout-Niere (UUO KO). Dabei lässt sich in Bezug auf LCN2 kein signifikanter Unterschied zwischen der ligierten Wildtyp- und der ligierten Knockout-Niere erkennen. Zwischen den CL wt- bzw. den CL KO- und den entsprechenden UUO wt- bzw. UUO KO-Nieren lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied erkennen. Als Housekeeper-Gen wurde GAPDH verwendet. .... 88

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden die Kenntnisse chemischer Elementsymbole und Stoffverbindungen, sowie die SI-Maßeinheiten und die, in den Naturwissenschaften und der Medizin gebrauchten Begriffsabkürzungen, als bekannt vorausgesetzt.

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
24p3R	24p3-Rezeptor
$\alpha$ -SMA = asma	alpha-smooth muscle actin = $\alpha$ -Glattmuskelaktin
Abb.	Abbildung
ACD	Advanced Cell Diagnostics
AD	Transaktivierungsdomäne
ADH	Antidiuretisches Hormon
AED	auxiliäre Exportdomäne
altgr.	altgriechisch
AMBP-Protein	alpha 1 microglobulin / bikunin precursor
ANG II	Angiotensin II
ANOVA	Analysis of variance
AQP	Aquaporin
AR	Aldose-Reduktase
as	antisense
BGT	Betain-Transporter
BMP7	bone morphogenic protein-7
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Calb	Calbindin
CD4	Cluster of differentiation 4
CD31	Cluster of differentiation 31
cDNA	komplementäre DNA, complementary DNA
CKD	chronic kidney disease

CIC-K1	Chloride channel protein
CLCNKa	Chloride Voltage-Gated Channel Ka
CL-Niere	kontralaterale Niere
cM	Centimorgan
Col	Kollagen
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
Cre <sup>+</sup>	Cre-Rekombinase
CRM1	chromosomal region maintenance 1
Cx	Connexin
CX3C-Ligand	Fractalkin
CX3CR1	Fractalkin Rezeptor
Cy	Cyanin
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DD	Dimerisierungsdomäne
Dr.	Doktor/-in
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
et al.	Lat.: et alii, deutsch: und andere
F4/80	EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1
Fc-Teil	Fragment Crystallizable region
fl/fl bzw. flfl	flox flox
FoxD1	forkhead box D1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	Genomic DNA
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HSP	Hitzeschockprotein



IF	Immunfluoreszenz
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRI	renaler ischämischer Reperfusionsschaden
ISH	in-situ-Hybridisierung
kDa	Kilodalton
ko bzw. KO	Knockout
LASIK	Laser-in-situ-Keratomileusis
lat.	lateinisch
LCN1	Lipocalin-1
LCN2	Lipocalin-2
lox	locus of X-over P1
MilliQ-Wasser	deionisiertes Wasser
min	Minute
Mio.	Million
MMP-9	Matrix-Metalloproteinase-9
mRNA	messenger ribonucleic acid
NBF	neutral buffered formalin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NES	nukleäres Exportsignal
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NF-kappaB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
NKCC2	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter
NKD2	naked cuticle homologue 2
NLS	nuclear localization signal
Nup88	Nucleoporin 88
OREBP	osmotic response element-binding protein

Osp	osmotic stress protein
p. bzw. pp.	page bzw. pages
p.a.	pro analysi
PAMPS	pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction, Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth factor
PDGFR $\beta$	Platelet derived growth factor receptor beta
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PPARs	peroxisome proliferator-activated receptors
Prof.	Professor/-in
qPCR	quantitative Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction, quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RHD	Rel-Homologiedomäne
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNF	Ring Finger Protein
RPL32	ribosomales Protein L32
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase / Reverse Transkription
s	Sekunde
s	sense
SAP	Serum Amyloid P
SEM	Standardfehler
SGK-1	Serum- und Glukokortikoid-induzierbare Kinase 1
SMIT	Natrium-Myoinositol-Cotransporter
sog.	sogenannt
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Puffer)
TAUT	Taurin-Transporter

TGF	transforming-growth factor
TonEBP	tonicity-responsive enhancer-binding protein
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethylrhodaminisothiozyanat
U/min	Umdrehungen/Minute
UT	Urea transporter
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
wt	Wildtyp
XPO1	Exportin 1

### **7.3 Eidesstattliche Erklärung**

Die vorliegende Arbeit wurde von Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner angeregt und unter Ihrer Aufsicht ausgearbeitet.

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.

Vilshofen an der Donau, den 09.08.2023

---

Marina Vöckl

## 8. Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner bedanken, die mir während meiner Promotion bei Fragen und Problemen stets beratend zur Seite stand und mir alle nötigen Mittel sowie Geräte zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung stellte. Liebe Charlotte, ich möchte mich von ganzem Herzen bei dir für deine großartige Unterstützung bedanken. Dank dir als so erfahrene Professorin, Wissenschaftlerin und Doktormutter konnte ich meine Promotion während des Studiums fertigstellen. Ich bin sehr froh, dass ich bei dir promovieren durfte. Während der gesamten Zeit habe ich mich in deinem Labor immer bestens betreut gefühlt. Vielen herzlichen Dank, dass du dich zu jeder Zeit schnell und unkompliziert um meine Anliegen und Fragen gekümmert hast und dass du dir immer Zeit für mich genommen hast. Vor allem aufgrund deiner hervorragenden Betreuung konnte ich meine Doktorarbeit zügig erstellen.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz dafür, dass er mir eine Promotion an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat. Sehr geehrter Herr Kurtz, vielen Dank für diese Gelegenheit und ihre Expertise beim Auswerten der Mikroskopiebilder. Danke, dass ich an ihrem Lehrstuhl mitarbeiten durfte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern Monika und Josef Vöckl, die mein ganzes Leben darauf bedacht sind, mir stets alle Türen offen zu halten und die mich bei allen meinen Vorhaben unterstützen. Meine liebe Mama, mein lieber Papa, vielen herzlichen Dank, dass ich mich immer auf euch verlassen kann und dass ihr mir stets mit Rat und Tat zur Seite steht. Ohne eure Fürsorge hätte ich meinen Lebensweg so nicht gehen können und wäre heute sicherlich nicht da, wo ich jetzt bin.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meinem lieben Bruder Josef bedanken, der mir immer hilft und mir mit sehr wertvollen Tipps beratend zur Seite steht. Mein lieber Bruder Josef, danke für Alles. Ohne dich hätte ich die gesamte Schul- und Studienzeit nicht in dieser Weise meistern können. Ich bin sehr froh, so einen wundervollen Bruder, wie dich, zu haben.

Ihr habt es in den letzten Jahren nicht immer leicht mit mir gehabt. Meine Launen, vor allem während der Prüfungsphasen, waren sicherlich nicht einfach zu ertragen.

Umso mehr weiß ich mich glücklich zu schätzen, eine so liebevolle und großartige Familie zu haben, in der alle zusammenhalten und sich gegenseitig helfen. Vielen herzlichen Dank, dass ich ein Glied in dieser wunderbaren Familie sein darf.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner technischen Assistentin Ramona Steppan. Liebe Ramona, danke für deine gute Betreuung während der ganzen Zeit. Du hast dich exzellent um mich gekümmert und mir äußerst geduldig alles erklärt und gezeigt, was ich rund um meine Versuche und die Versuchsdurchführungen wissen musste. Es hat mir stets große Freude bereitet, mit dir im Labor zu arbeiten. Dank dir konnte ich mich schnell am Lehrstuhl einarbeiten und bin immer sehr gerne ins Labor gekommen. Ich danke dir für deine großartige Unterstützung und unermüdliche Hilfe.

Ein herzliches Dankeschön auch an die wissenschaftlichen Assistenten Dr. rer. nat. Katharina Broeker, Dr. rer. nat. Michaela Fuchs und Dr. rer. nat. Julia Schrankl. Vielen Dank, dass ich euch sowohl bei wissenschaftlichen als auch bei technischen Fragen jederzeit kontaktieren konnte. Ihr habt mir mit euren Ratschlägen sehr weitergeholfen.

Ein großer Dank gilt abschließend auch allen Menschen, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe, die mir jedoch während der gesamten Zeit ebenfalls beratend zur Seite standen. Vielen Dank dafür.

