

Aus dem Lehrstuhl für Physiologie I
Prof. Dr. Wolf Hayo Castrop
der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Adenininduzierte Nierenschädigungen in Mäusen: Bedeutung, Expressionsstärke und Lokalisation von LCN2 und Kim1.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Pascal Nafz
2024

Aus dem Lehrstuhl für Physiologie I
Prof. Dr. Wolf Hayo Castrop
der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Adenininduzierte Nierenschädigungen in Mäusen: Bedeutung, Expressionsstärke und Lokalisation von LCN2 und Kim1.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Pascal Nafz
2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Charlotte Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rudolf Fuchshofer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Struktureller Aufbau der Niere	7
1.1.1	Proximaler Tubulus	8
1.1.2	Intermediärtubulus	9
1.1.3	Distaler Tubulus	10
1.1.3.1	Pars recta	10
1.1.3.2	Pars convoluta	11
1.1.3.3	Verbindungstubulus	11
1.1.4	Sammelrohr	11
1.2	Nierenfibrose	12
1.3	Adenin-induzierte Nierenfibrose	12
1.3.1	Geschlechtsspezifische Unterschiede	13
1.3.2	Extrarenale Organveränderungen	13
1.4	Renale Schädigungsmarker	14
1.4.1	Lipocalin-2	14
1.4.1.1	Struktur des LCN2-Proteins	14
1.4.1.2	LCN2-Expression in gesundem Gewebe	14
1.4.1.3	LCN2 beim akuten Nierenschaden	15
1.4.1.4	LCN2 bei chronischen Nierenerkrankungen	15
1.4.2	Kidney Injury Molecule-1	16
1.4.2.1	Struktur des KIM1-Proteins	16
1.4.2.2	KIM1 in gesundem Gewebe	17
1.4.2.3	KIM1 beim akuten Nierenschaden	17
1.4.2.4	KIM1 bei chronischen Nierenerkrankungen	17
1.5	Ziel der Arbeit	19
2	Materialien und Methoden	20
2.1	Materialien	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3	Chemikalien, Enzyme, Kits	23
2.1.4	Puffer und Lösungen	24
2.1.5	Primer	25
2.1.6	Antikörper	26
2.1.6.1	Primäre Antikörper	26
2.1.6.2	Sekundäre Antikörper	26
2.1.7	Sonden für in-Situ Hybridisierung	27

2.1.8	Software und Internetdienste	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Versuchstiere	28
2.2.1.1	Mauslinien und Haltungsbedingungen:	28
2.2.1.2	Kontrollbedingungen	28
2.2.1.3	Adenin-induzierte Nierenfibrose	28
2.2.1.4	Sammlung von Spontanurin	28
2.2.1.5	glomeruläre Filtrationsrate (GFR)-Messung	28
2.2.1.6	Blutentnahme	29
2.2.2	Retrograde arterielle Perfusion	29
2.2.3	Einbettung in Paraffin	30
2.2.4	Paraffinschnitte	30
2.2.5	Immunfluoreszenzfärbung	30
2.2.6	In-situ Hybridisierung	31
2.2.7	ELISA	31
2.2.8	Osmolaritätsmessung	32
2.2.9	Natrium- und Kaliummessung	32
2.2.10	Quantifizierung der mRNA-Expression in verschiedenen Organen . .	32
2.2.10.1	RNA-Isolierung	32
2.2.10.2	Reverse Transkription	33
2.2.10.3	Quantitative Realtime PCR	33
2.2.11	Mikroskopische Aufnahmen	33
2.2.12	Statistische Auswertung	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Expression von LCN2 unter basalen Bedingungen	35
3.1.1	LCN2-Expression in verschiedenen Organen	35
3.1.2	Renale LCN2-Expression	36
3.2	Expression von KIM1 unter basalen Bedingungen	38
3.2.1	KIM1-Expression in verschiedenen Organen	38
3.2.2	Renale KIM1-Expression	38
3.3	Adenin-induzierte Nierenfibrose	41
3.3.1	Auswirkungen der Adeninfütterung auf die renale LCN2-Expression	44
3.3.2	Auswirkungen der Adeninfütterung auf die LCN2-Expression in der Leber und der Lunge	53
3.3.3	Auswirkungen der Adeninfütterung auf die renale KIM1-Expression	55
3.3.4	Koexpression von LCN2 mit KIM1	62

4	Diskussion	63
4.1	Basale Expression von LCN2	63
4.2	Basale Expression von KIM1	64
4.3	Adenin-induzierte Nierenfibrose	65
4.3.1	Auswirkungen der Adeninfütterung auf die renale LCN2-Expression	67
4.3.2	Auswirkungen der Adeninfütterung auf die LCN2-Expression in der Leber und der Lunge	72
4.3.3	Aussagekraft der LCN2-Expression hinsichtlich renaler Schädigungen	73
4.3.4	Auswirkungen der Adeninfütterung auf die renale KIM1-Expression	74
4.3.5	Aussagekraft der KIM1-Expression hinsichtlich renaler Schädigungen	79
4.3.6	Koexpression von LCN2 mit KIM1	80
5	Zusammenfassung	81
6	Literaturverzeichnis	83

Abkürzungen

ADH Vasopressin

AKI akute Nierenschädigung

ANCA Anti-neutrophil cytoplasmatic antibody

AQP2 Aquaporin 2

CKD chronische Nierenerkrankung

CTX carboxyterminale Kollagen-Crosslinks

DHA Dihydroxyadenin

eGFR estimated glomerular filtration rate

EPO Erythropoetin

GFR glomeruläre Filtrationsrate

KG Körpergewicht

KIM1 Kidney Injury Molecule-1

LCN2 Lipocalin-2

MMP9 Matrixmetalloproteinase 9

NCC NaCl-Cotransporter

NGAL Neutrophil gelatinase associated lipocalin

NKCC2 Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter 2

NO Stickstoffmonoxid

PINP Prokollagen-Typ-I-N-terminales Propeptid

PTH Parathormon

RAAS Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

RT Raumtemperatur

SEM Standardfehler des Mittelwerts

1 Einleitung

Die Niere ist eines der wichtigsten Ausscheidungsorgane für wasserlösliche Stoffwechselprodukte. Sie übernimmt eine zentrale Rolle in der Regulation des Elektrolyt- sowie Wasserhaushaltes und wirkt maßgeblich an der Homöostase des Säure-Basen-Haushaltes mit. Durch ihre endokrine Funktion ist die Niere über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) substanziell an der Kontrolle des Blutdrucks beteiligt. Weiterhin beeinflusst die Niere über die Ausschüttung von Erythropoetin (EPO) die Blutbildung [99].

1.1 Struktureller Aufbau der Niere

Der anatomische Aufbau einzelner Bereiche der Niere orientiert sich eng an den jeweiligen Funktionen. An dieser Stelle soll der Aufbau der Niere lediglich grob umrissen werden.

In den Glomeruli findet die Produktion des Primärharns statt. Dieser gelangt anschließend in den proximalen Tubulus, welcher die höchste Transportkapazität des Tubulussystems besitzt. Dieser kann in drei Segmente weiter unterteilt werden, welche sich in ihrer Funktion sowie dem Zellaufbau unterscheiden. An den proximalen Tubulus schließt sich der dünne Teil der Henle-Schleife an, welcher nur eine geringe Transportleistung besitzt und bis ins innere Mark hineinreicht. Der dünne Teil der Henle-Schleife bildet im inneren Mark eine Schleife und steigt dann im Mark auf. Er geht in den distalen Tubulus über, welcher zunächst im Mark weiter aufsteigt und in der Rinde einen Kontakt mit dem Gefäßpol des zugehörigen Glomerulus ausbildet. Dort befindet sich die Macula densa, welche eine wichtige Rolle für das tubuloglomeruläre Feedback spielt. Der distale Tubulus mündet in einen Verbindungstubulus, der ihn mit einem Sammelrohr verbindet. Die Sammelrohre leiten den Harn bis zur Papillenspitze, von wo aus er in das Kelchsystem und anschließend in die ableitenden Harnwege gelangt. In den Sammelrohren wird die Osmolarität des Urins eingestellt. Durch die Anordnung der Tubuli können verschiedene Bereiche des Nierenparenchyms unterschieden werden. Die Rinden-Mark-Grenze zeichnet sich durch den Übergang von gewundenen zu geraden Anteilen der proximalen Tubuli aus und kann mikroskopisch anhand der Lage juxtamedullärer Glomeruli lokalisiert werden. Das äußere Mark wird in einen Außenstreifen und einen Innenstreifen unterteilt, die Grenze bildet der Wechsel von proximalem Tubulus zu Intermediärtubulus. Die Grenze zwischen innerem und äußeren Mark wird schließlich durch den Übergang vom Intermediärtubulus zum distalen Tubulus gekennzeichnet [80][99]. Die einzelnen Nephronabschnitte erfüllen verschiedene Aufgaben und unterscheiden sich dementsprechend durch die Expression typischer Transporter [11]. Dies soll im Folgenden ausführlicher dargelegt werden.

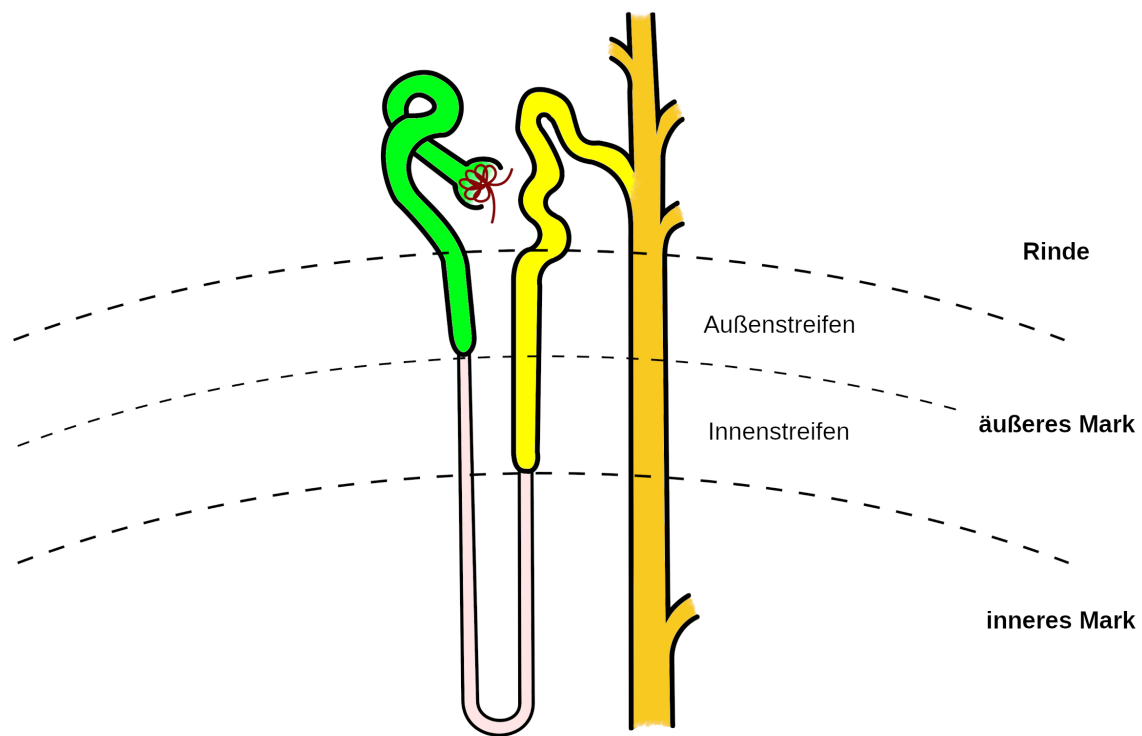


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines juxtamedullären Nephrons; Der Primärharn wird im Glomerulus (rot) gebildet, gelangt dann in den proximalen Tubulus (grün) und über den Intermediärtubulus (rosa) in den distalen Tubulus (gelb), dieser mündet in ein Sammelrohr (orange).

1.1.1 Proximaler Tubulus

Der proximale Tubulus ist für die Resorption von 60 % – 70 % des filtrierten Wassers sowie Kochsalzes verantwortlich. Einen noch größeren Anteil übernimmt er bei der Resorption von Bicarbonat, Glucose, Phosphat und Aminosäuren. Jedoch steht die Resorption von Wasser und von osmotisch aktiven Substanzen aus dem Harn etwa im Gleichgewicht, sodass es im Verlauf des proximalen Tubulus nur zu geringen Änderungen der Harnosmolarität kommt. Die treibende Kraft ist hierbei für fast alle Resorptionsprozesse die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase. Diese baut durch den aktiven Transport von Natriumionen aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum einen Natriumgradienten und zugleich ein nach innen gerichtetes negatives Membranpotential auf. Dies ist die treibende Kraft für viele Na^+ -abhängige sowie Na^+ -unabhängige Transportprozesse und spielt folglich eine entscheidende Rolle für die Resorptions- und Sekretionsleistung des proximalen Tubulus [25].

Als Markerprotein für den proximalen Tubulus ist Megalin etabliert. Dabei handelt es sich

um ein Transmembranprotein, welches unter anderem an der Endozytose von Proteinen und Medikamenten beteiligt ist [74].

Da Bicarbonat einen Großteil der im Blut vorhandenen Pufferbasen ausmacht, kommt der Resorption von Bikarbonat eine große Bedeutung bei der Homöostase des Säure-Basen-Haushaltes zu [9]. Jedoch macht die direkte Resorption von HCO_3^- nur einen geringen Anteil an der Gesamtbikarbonatresorption aus [30]. Quantitativ am bedeutsamsten ist der Na^+/H^+ -Antiporter, welcher im Austausch gegen Natriumionen H^+ in das Tubuluslumen sezerniert. Im Lumen reagieren HCO_3^- und H^+ katalysiert durch eine membranständige Carboanhydrase zu H_2CO_3 , welches anschließend zu CO_2 und Wasser weiter reagiert. Das CO_2 diffundiert in die Zelle, wo der beschriebene Prozess in umgekehrter Richtung stattfindet [103]. Das resorbierte HCO_3^- wird basolateral über einen $\text{Na}^+-3\text{HCO}_3^-$ -Symporter mithilfe des Membranpotentials gegen den chemischen Gradienten aus der Zelle transportiert [12]. Die Sekretion von H^+ im proximalen Tubulus dient nicht allein der Resorption von HCO_3^- , sondern auch der Ausscheidung von überschüssigem H^+ . Eine wichtige Rolle dabei spielen ebenso der Ammoniak- sowie der Phosphatpuffer im Urin [25].

Wie viele andere Stoffe wird auch Glukose Na^+ -abhängig im proximalen Tubulus resorbiert. Dafür existieren zwei verschiedene Symporter, welche sich in ihrer Glukoseaffinität unterscheiden. Der SGLT2 (sodium glucose cotransporter 2) ist im Bürstensaum des S1- und S2-Segments lokalisiert und transportiert ein Natriumion pro Glukosemolekül. Er ist für den Großteil der Glukoseresorption verantwortlich, kann aber keine hohen Gradienten erzeugen. Dem gegenüber steht der SGLT1, welcher vor allem im S3-Segment exprimiert wird. Durch den Symport von zwei Natriumionen pro Glukosemolekül besitzt er eine höhere Affinität zu Glukose und damit auch eine höhere Konzentrationsfähigkeit [53]. Durch die Positionierung der Transporter in den verschiedenen Segmenten wird dadurch eine effektive Glukose-Aufnahme sichergestellt, bei der unter Normalbedingungen weniger als 1 % der filtrierten Glukose im Harn verbleibt [131].

Da insgesamt mehr positive Ladungen als negative aus dem Tubuluslumen transportiert werden, entsteht ein leicht negatives lumbales Potential. Außerdem steigt durch die Resorption von HCO_3^- , während Wasser dem osmotischen Druck entsprechend transzellulär über Aquaporine und parazellulär über die tight junctions aus dem Harn resorbiert wird, die Cl^- -Konzentration im Harn an [108]. Das elektrochemische Potential sowie das entstehende Konzentrationsgefälle zwischen Harn- und Blut- Cl^- -Konzentration fördern die parazelluläre Diffusion von Chlorid aus dem Tubuluslumen ins Blut [25].

1.1.2 Intermediärtubulus

Die Intermediärtubuli sind sehr variabel ausgebildet. Während bei Nephronen mit langer Henle-Schleife der deszendierende Ast des Intermediärtubulus bis in das innere Mark hinein reicht und sich dann ein aszendierender Ast anschließt, welcher die Verbindung zum dis-

talen Tubulus herstellt, geht bei kurzschleifigen Nephronen der deszendierende Ast nach einem kurzen Zwischensegment direkt in den distalen Tubulus über [95]. Funktionell bestehen große Unterschiede zwischen den einzelnen Abschnitten des Intermediärtubulus. Beispielshalber besitzen die in der inneren Medulla gelegenen Segmente der absteigenden Henle-Schleife eine geringere Permeabilität für Na^+ als jene, die sich in der äußeren Medulla befinden [62].

1.1.3 Distaler Tubulus

Direkt auf den Intermediärtubulus folgt der distale Tubulus. Dieser kann in eine Pars recta und eine Pars convoluta unterteilt werden. Die Pars recta beginnt im Innenstreifen der äußeren Medulla und steigt bis in die Rinde auf. Dort trifft sie auf den Gefäßpol des zugehörigen Glomerulus, wo spezielle Epithelzellen die Macula densa bilden. In einem variablen Abstand stromabwärts der Macula densa beginnt die Pars convoluta mit einem abrupten Übergang von Natrium-Kalium-2Chlorid-Cotransporter 2 (NKCC2) exprimierendem Epithel zu Zellen, welche einen Thiazid-sensitiven NaCl-Cotransporter (NCC) exprimieren [89].

1.1.3.1 Pars recta

Die Pars recta resorbiert etwa 30 % des filtrierten NaCl, jedoch ohne Wasser aus dem Harn zu resorbieren [3]. Ein dafür besonders wichtiger Transporter ist der NKCC2, welcher von den Zellen des medullären und des kortikalen Abschnittes der Pars recta sowie der Macula densa in großen Mengen exprimiert wird [16]. Deshalb eignet sich der NKCC2 als guter Marker für die Pars recta des distalen Tubulus. Das resorbierte Na^+ wird basolateral über Na^+/K^+ -ATPasen aus den Zellen transportiert. Dabei wird ein elektrochemischer Gradient aufgebaut, der die Energie für die Aktivität des NKCC2 liefert [17]. Cl^- verlässt die Zellen über basolaterale K^+-Cl^- -Cotransporter [90] und Cl^- -Kanäle [69]. Ein Teil des resorbierten K^+ rezirkuliert über apikale Kaliumkanäle, was für die Aktivität des NKCC2 wichtig ist, da die luminale K^+ -Konzentration limitierend wirkt [43]. Insgesamt werden dadurch mehr negative als positive Ladungen aus dem Harn resorbiert. Auf diese Weise resultiert ein Lumen-positives Potential. Da die tight junctions in der Pars recta zwar wasserdicht, aber durchlässig für Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} sind, fördert das transepitheliale Potential die Resorption von Na^+ , Ca^{2+} und Mg^{2+} [26].

Da NaCl resorbiert wird ohne dabei Wasser zu resorbieren, erhöht die Pars recta die Osmolarität im Interstitium. Dies spielt eine wichtige Rolle für die Gegenstrommultiplikation und die Wasserresorption in den Sammelrohren. Eine verringerte Funktion des NKCC2 resultiert daher in einer Hyponatriämie, einem Verlust der Urinkonzentrationsfähigkeit, niedrigem Blutdruck und weiteren Symptomen, welche unter dem Bartter-Syndrom be-

kannt sind [120].

Des Weiteren kann der NKCC2 anstelle eines Kaliumions auch ein Ammoniumion, aufgrund des ähnlichen Ionenradius, resorbieren [5]. Basolateral verlässt NH_4^+ die Zellen vor allem über einen Na^+/H^+ -Antiporter, welcher auch als $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ -Antiporter arbeiten kann. Dadurch wird im Nierenmark NH_4^+ angereichert, was der Ausscheidung von NH_4^+ und damit der H^+ -Ausscheidung dient [13]. Die Pars recta bildet außerdem die Macula densa aus, welche eine besondere Funktion für die renale Autoregulation übernimmt [21].

1.1.3.2 Pars convoluta

Im Gegensatz zur Pars recta findet die NaCl-Resorption im distalen Konvolut mithilfe des Thiazid-sensitiven NCC statt. Des Weiteren ist die Pars convoluta an der Ca^{2+} -Resorption beteiligt. Hierfür wird unter anderem Calbindin exprimiert, dieses kann als Marker für das distale Konvolut verwendet werden [123].

1.1.3.3 Verbindungstubulus

Der Verbindungstubulus verbindet den distalen Tubulus mit dem Sammelrohr. Gemeinsam mit dem späten Segment des distalen Konvolutes und dem kortikalen Sammelrohr bildet er das Aldosteron-sensitive distale Nephron [83].

1.1.4 Sammelrohr

Zwar findet der Großteil der Resorptionsprozesse in den proximaleren Abschnitten des Nephrons statt, dennoch kommt dem Sammelrohr eine bedeutende Aufgabe für die finale Zusammensetzung des Urins zu. Durch eine strenge hormonelle Kontrolle der Transportprozesse im Sammelrohr können Resorption und Sekretion entsprechend den aktuellen Bedürfnissen angepasst werden [102]. Ein dafür wichtiger Mechanismus ist der Einbau von Aquaporin 2 (AQP2) in die apikale Membran der Hauptzellen in Abhängigkeit von Vasopressin (ADH). Die basolaterale Membran der Hauptzellen ist mit Aquaporinen ausgestattet, sodass der Einbau von AQP2 in die apikale Membran zu einer Wasser-Resorption entsprechend des osmotischen Druckes führt [94]. Dieser Mechanismus findet auch in den Verbindungstubuli statt, weshalb sich AQP2 zur Darstellung der Sammelrohre und Verbindungstubuli eignet [35].

1.2 Nierenfibrose

Die Nierenfibrose ist eine typische Folge von chronisch-progressiven Nierenerkrankungen, wie der diabetischen Nephropathie oder der IgA-Nephritis [18]. Sie kann aber auch infolge von akuten Parenchymschäden nach einer tubulointerstitiellen Nephritis [64] oder nach toxischen Nierenschäden [127] auftreten. Im Allgemeinen wird die Nierenfibrose definiert als exzessive, pathologische Vermehrung der extrazellulären Matrix, welche glomerulär, tubulointerstitiell und perivaskulär auftreten kann. Hierbei besteht ein enger Zusammenhang zwischen Inflammation und Fibrose, welcher sich auch im histologischen Bild nachvollziehen lässt. Des Weiteren kommt es häufig zu einer Atrophie betroffener Tubuli und zu einer peritubulären Gefäßrarifizierung. Die Vermehrung der extramedullären Matrix sowie der Verlust von Kapillaren sind Faktoren, welche eine chronische Hypoxie im renalen Interstitium begünstigen, wodurch bei fortgeschrittenem Schaden eine weitere Fibrose des Gewebes begünstigt wird [78]. Das histologische Bild einer Nierenfibrose ist abhängig von der Ursache der Fibrose und kann stark variieren [18].

1.3 Adenin-induzierte Nierenfibrose

Das Modell der Adenin-induzierten Nierenfibrose ist ein etabliertes Modell um Nierenfibrosen auslösen und analysieren zu können. Die Ergebnisse sind gut reproduzierbar und das Modell ist einfach in der Anwendung. Das von von Yokowaza et al. entwickelte Modell der Adenin-induzierten Nierenfibrose [140] basiert auf dem Mechanismus, dass bei der oralen Einnahme großer Mengen Adenin, Adenin zu Dihydroxyadenin (DHA) metabolisiert wird. Dieses ist schwer wasserlöslich, weshalb sich das DHA in Form von Kristallen im luminalen Bereich des proximalen Tubulus ablagert [73]. Die Ablagerung der DHA-Kristalle führt dabei zu einer Entzündungsreaktion mit Schwellung und Deformierung des Nierengewebes. Neben einer tubulointerstitiellen Fibrose konnten vier Wochen nach Adeningabe auch zystische Veränderungen des Nierengewebes beobachtet werden [107]. Jia et al. beschrieben dilatierte sowie atrophische Tubuli, peritubuläre Leukozyten Infiltrate (insbesondere neutrophile Granulozyten) und interstitielle sowie peritubuläre Ödeme als Zeichen einer vor allem tubulointerstitiellen Schädigung. Außerdem wurden Kalzifizierungen der tubulären Strukturen, Mikroabszesse im Nierengewebe und teilweise erweiterte Bowman'sche Räume beobachtet [63].

Des Weiteren haben bereits mehrere Studien Veränderungen der Nierenfunktionsparameter unter Adeningabe gezeigt. So konnte beispielsweise ein signifikanter Anstieg des Plasmakreatininspiegels [45] sowie ein Abfall der Kreatininclearance [2] festgestellt werden. Ähnlich zu Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen wurde auch ein sekundärer Hyperparathyreoidismus und eine Hyperphosphatämie bei signifikant erhöhter Phosphatausscheidung über den Urin festgestellt [136].

1.3.1 Geschlechtsspezifische Unterschiede

Diwan et al. beschrieben bei der Gabe von Adenin geschlechtsspezifische Unterschiede. So trat bei weiblichen Ratten ein deutlich geringerer Anstieg des Kreatininspiegels sowie Kaliumspiegels im Plasma im Vergleich zu männlichen Versuchstieren auf. Ebenso konnten histologisch Unterschiede in der Ausprägung der Nierenatrophie, der Fibrose und der Entzündung festgestellt werden. Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren wurde ein Anstieg des Blutdrucks, eine kardiale Fibrose und eine ventrikuläre Steifheit beobachtet [29]. Östrogen steht im Verdacht für die geschlechtsspezifischen Unterschiede mit verantwortlich zu sein. So verursacht Östriol in physiologischen Konzentrationen eine Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) [126], wodurch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und das Fortschreiten von Nierenschädigungen beeinflusst werden kann [28]. Daher muss bei der Auswertung von Versuchsergebnissen das Geschlecht der Versuchstiere besonders berücksichtigt werden. Die folgende Arbeit konzentriert sich deshalb auf die Ergebnisse der männlichen Versuchstiere.

1.3.2 Extrarenale Organveränderungen

In Untersuchungen zeigte sich, dass sich die Auswirkungen der Adeningabe nicht allein auf die Niere beschränken. So konnte eine erhöhte Proliferationsrate in der Schilddrüse nach dem Ki67-Index, bei gleichzeitiger Erhöhung der Parathormon (PTH)-Spiegel festgestellt werden. Anzeichen einer Schilddrüsenhypertrophie wurden nicht geschildert. Des Weiteren wurden Veränderungen des Knochenstoffwechsels beobachtet. Neben einer Zunahme der trabekulären Knochenstrukturen wurde eine Verfettung des Knochenmarks beobachtet. Verschiedene Biomarker des Knochenstoffwechsels (unter anderem eine Erhöhung des Prokollagen-Typ-I-N-terminalen Propeptids (PINP) und eine Verringerung von carboxyterminalen Kollagen-Crosslinks (CTX)) wiesen auf eine erhöhte Knochenneubildung, Störungen der Knochenmineralisierung und eine verringerte Knochenresorption hin [107]. In Langzeitversuchen (Applikation einer 0,15 %-igen Adenin-Diät über 20 Wochen) konnten kardiale Veränderungen, wie eine Verringerung der Ejektionsfraktion, Fibrosierungen und eine Erhöhung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht, entsprechend eines renokardialen Syndroms festgestellt werden [70]. Um Einflüsse auf die Experimente durch Veränderungen in diesen Organen detektieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit neben der Niere unter anderem auch das Herz und die Lunge untersucht.

1.4 Renale Schädigungsmarker

Zum besseren Verständnis und zur besseren Diagnostik von Nierenschäden werden neue Schädigungsmarker gesucht, welche sensibler und spezifischer als Kreatinin sein sollen. Insbesondere Lipocalin-2 (LCN2)[22] und Kidney Injury Molecule-1 (KIM1)[116] werden in dem Zusammenhang immer wieder im wissenschaftlichen Diskurs genannt und sollen deshalb in dieser Arbeit näher untersucht werden.

1.4.1 Lipocalin-2

LCN2 auch bekannt als Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) ist ein 24 kDa schweres Glykoprotein, welches von vielen Organen sezerniert wird. Es dient dabei der Abwehr bakterieller Infektionen und wird bei vielen Erkrankungen, unter anderem auch bei bestimmten Malignomen, vermehrt exprimiert. LCN2 besitzt eine hohe Affinität zu bakteriellen Siderophoren (Eisen-bindende Proteine), wodurch es den Bakterien den Zugang zu Eisen verwehrt und damit einen bakteriostatischen Effekt ausübt [22].

1.4.1.1 Struktur des LCN2-Proteins

Das LCN2-Protein ist mit einer hydrophoben Bindungstasche ausgestattet, welche besonders gut kleine hydrophobe Liganden bindet, weshalb eine Aufgabe im Transport kleiner hydrophober Moleküle vermutet wurde [24]. Neuere Ergebnisse ergaben, dass die Bindungstasche von LCN2 groß genug ist um auch Makromoleküle wie Proteine zu binden. Dies liefert eine mögliche Antwort darauf, wie LCN2 beispielsweise mit Siderophoren interagiert [41]. Außerdem interagiert das LCN2-Protein über einen Cystein-Rest mit der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP9), mit welcher es eine Disulfidbrücke ausbilden kann. Dadurch schützt LCN2 die MMP9 vor der Degradation. Bei der MMP9 handelt es sich um eine Gelatinase, welche von neutrophilen Granulozyten sezerniert wird und verschiedene Bestandteile der extrazellulären Matrix sowie der Basalmembran abbaut [128].

1.4.1.2 LCN2-Expression in gesundem Gewebe

In **adultem menschlichen Gewebe** wird LCN2 als Bestandteil der Granula von neutrophilen Granulozyten synthetisiert [71]. Des Weiteren konnten verschiedene Forschergruppen LCN2 in zahlreichen Organen nachweisen. Dabei wurden besonders hohe LCN2-Konzentrationen in der Lunge, der Trachea, in Metamyelozyten-reichen Regionen des Knochenmarks, im duktalem Epithel der Brust, in der Prostata und im Colon gefunden [122][118][129].

Bei der **Maus** wird LCN2 in den Chondrozyten der Proliferationszone und der hypertrophen Zone der Wachstumsplatte sowie in den Chondrozyten des Gelenkknorpels exprimiert [98]. Zyklus-abhängig kann auch im Epithel und den Drüsen des Uterus LCN2

nachgewiesen werden [52]. Weiterhin wurde LCN2-mRNA in der Leber, der Milz, den Hoden sowie der Lunge gefunden. Auch in der Niere 10-Tage-alter Mäuse wurde LCN2 exprimiert, jedoch konnte keine Expression in den Nieren adulter Tiere festgestellt werden. Insgesamt wurde ein kontinuierlicher Rückgang der Expression mit zunehmendem Alter der Tiere beobachtet. Bei 75-Tage-alten Mäusen konnte keine LCN2-Expression mehr nachgewiesen werden [37].

1.4.1.3 LCN2 beim akuten Nierenschaden

Eine akute Nierenschädigung (AKI) kann durch einen kardiogenen Schock [39], durch Immunsuppressiva und andere nephrotoxische Substanzen [116] sowie tubulointerstitielle Nephritiden [64] und viele weitere Ursachen ausgelöst werden. Die AKI ist assoziiert mit erhöhter Morbidität und Mortalität sowie durch den Übergang in eine chronische Nierenerkrankung mit einem verschlechterten Langzeit-Outcome [8].

Nach ischämischen oder toxischen Nierenschäden wird LCN2 beim Menschen vermehrt exprimiert. Ebenso konnte bei Mäusen und Ratten ein Anstieg der LCN2-mRNA- sowie LCN2-Protein-Konzentration in Ischämie-Reperfusion-Versuchen an der Niere und bei toxisch-induzierten Nierenschäden mittels Cisplatin festgestellt werden [84]. LCN2 wird dabei apikal sowie basolateral vom Tubulusepithel sezerniert [113]. In der gesunden Niere wird das LCN2-Protein vom Glomerulus filtriert und anschließend vom proximalen Tubulus Megalin-abhängig resorbiert [56]. Durch eine Schädigung des proximalen Tubulus nimmt die Resorptionsfähigkeit ab, sodass es zu einer Ausscheidung von LCN2-Protein über den Urin kommt [50]. Bei der AKI scheint LCN2 eine renoprotektive Wirkung zu entfalten [87].

Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen der LCN2-Konzentration im Urin und dem Langzeit-Outcome bei hospitalisierten Patienten mit AKI [121]. Dabei stellte sich heraus, dass LCN2 bereits bei einem geringen Abfall der GFR vermehrt exprimiert wird, während klassische Marker wie der Kreatinin-Spiegel im Blut noch keine Veränderungen aufwiesen, womit sich LCN2 als sensibler Marker bei der AKI erwies [101]. Bei subklinischer AKI, einer strukturellen Nierenschädigung ohne Anstieg des Serum-Kreatinin-Spiegels, ist eine hohe LCN2-Konzentration mit einer höheren Mortalität vergesellschaftet [86].

1.4.1.4 LCN2 bei chronischen Nierenerkrankungen

Charakteristisch für chronische Nierenerkrankungen (CKD) ist meist der Verlust funktioneller Nephrone und eine progressive Zerstörung des Nierenparenchyms. Dies führt zu einem kompensatorischen Wachstum der verbliebenen Nephrone [68]. In einigen Fällen kann es dabei zu einem pathologischen Umbau kommen, was zu Nierenschädigungen und langfristig zu einem terminalen Nierenversagen führen kann [51]. Der genaue Mechanis-

mus für die Progression der CKD ist bisher nur ansatzweise verstanden.

Neuere Untersuchungen weisen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von LCN2 und dem Verlauf einer CKD hin. Viau et al. zeigten, dass LCN2 an der Kontrolle des Wachstums von Nierentubuli sowie Nierenzysten beteiligt ist. Durch Inaktivierung des LCN2-Gens in Mäusen konnte eine verminderte Proliferation von Tubulusepithelzellen sowie eine stark verringerte Zystenbildung beobachtet werden. Dies lässt einen Einfluss von LCN2 auf das Zellwachstum und die Zellteilung in der Niere vermuten [133]. Diese Vermutung unterstützen auch anderen Studienergebnisse. So konnte eine verbesserte Regeneration der Tubuli nach einem ischämischen Nierenschaden durch die Infusion von LCN2 beobachtet werden [87]. Beim Menschen konnte eine Assoziation zwischen hohen LCN2-Spiegeln im Serum und Urin mit einem stärkeren Zystenwachstum hergestellt werden [10].

Des Weiteren wird LCN2 als Antwort auf tubulointerstitielle Schäden exprimiert, welche sowohl beim akuten Nierenschaden als auch bei einer CKD auftreten [75]. In einer Studie an Kindern mit CKD im 2.-4. Stadium konnte eine indirekte Proportionalität zwischen den LCN2-Spiegeln im Plasma und der GFR nachgewiesen werden [85].

1.4.2 Kidney Injury Molecule-1

KIM1 auch bekannt als HAVCR1 (Hepatitis A virus cellular receptor 1) und TIM1 (T-cell immunoglobulin mucin receptor 1) wurde erstmalig als zellulärer Hepatitis-A-Virus-Rezeptor in den Nieren von Affen von Kaplan beschrieben [66]. Seit der Entdeckung traten jedoch andere Funktionen des Proteins in den Vordergrund. Insbesondere die Bedeutung beim akuten Nierenschaden rückte in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung [116].

1.4.2.1 Struktur des KIM1-Proteins

Das KIM1-Gen kodiert ein Typ-1-Transmembranglykoprotein mit einem Molekulargewicht von 38,7 kDa [58]. Dieses besitzt ein N-terminales Signalpeptid, welches für den Einbau in die Zellmembran verantwortlich zu sein scheint. Jedoch ergaben mehrere Studien, dass basal KIM1 überwiegend zytoplasmatisch vorliegt und erst nach spezifischer Zellaktivierung vermehrt in die Zellmembran eingebaut wird [31][7]. Die extrazelluläre Domäne des Proteins kann mithilfe von Metalloproteasen von der Zelloberfläche abgespalten werden. Das dabei freigesetzte lösliche KIM1-Protein ist höchstwahrscheinlich für den Anstieg von KIM1 im Urin nach einem akuten Nierenschaden verantwortlich [47][58]. Weiterhin ist die extrazelluläre Domäne mit einer Bindungsstelle für Phosphatidylserin ausgestattet, welches während der Apoptose auf der Zelloberfläche exponiert wird [111]. Dadurch können die KIM1-exprimierenden Zellen während eines akuten Schadens apopto-

tische Zellen phagozytieren [27].

Das KIM1-Protein besitzt des Weiteren eine kurze intrazelluläre Domäne, welche im Verdacht steht über Tyrosinkinasen an einer Signaltransduktion beteiligt zu sein [65]. Vom intrazellulären Anteil existieren zwei Spleiß-Produkte KIM1a und KIM1b. KIM1a wird überwiegend in der Leber und KIM1b hauptsächlich in der Niere exprimiert [93].

1.4.2.2 KIM1 in gesundem Gewebe

Die Expression von KIM1 zeichnet sich in gesundem menschlichen Gewebe durch eine hohe Organspezifität aus [33]. Mit Abstand den größten KIM1-Proteingehalt besitzt die Niere. Aktuelle Daten gehen von einer 10-mal höheren Konzentration als in der Mehrheit der anderen Organe aus. Neben der Niere konnten geringe Mengen KIM1 in den Hoden gefunden werden. In anderen Geweben war KIM1 kaum nachweisbar. Insgesamt gibt es zwar viele Gewebe, die KIM1 exprimieren können, jedoch sind die Konzentrationen im gesunden Organismus gering [67].

1.4.2.3 KIM1 beim akuten Nierenschaden

In verschiedenen AKI-Modellen konnte bei Ratten ein Anstieg der KIM1-Expression auf der apikalen Zellmembran im Epithel des proximalen Tubulus infolge eines renalen Schadens beobachtet werden [60]. Studien zeigten, dass die vermehrte Expression von KIM1 nicht nur als Marker für den akuten Nierenschaden eine Rolle spielt, sondern auch ein Zeichen der epithelialen Regeneration ist [58][143]. Dabei ist KIM1 direkt an Prozessen zum Erhalt und der Regeneration der strukturellen und funktionellen Integrität des proximalen Tubulus beteiligt [14]. Des Weiteren befähigt KIM1 die Epithelzellen zur Phagozytose von Apoptosekörpern und Zelldetritus aus dem Tubuluslumen, wobei es die Expression proinflammatorischer Cytokine unterdrückt und dadurch regulatorisch in inflammatorische Prozesse eingreift [61][139]. KIM1 scheint auch durch die Förderung der Zellproliferation und der Migration dedifferenzierter Zellen bei der Ausheilung tubulärer Schäden mit Zellverlust mitzuwirken [146].

1.4.2.4 KIM1 bei chronischen Nierenerkrankungen

KIM1 wird nach toxischen oder ischämischen Schäden von den Zellen des proximalen Tubulus exprimiert [54]. Außerdem erwies sich KIM1 in mehreren Studien als guter prädiktiver Marker für Nierenschäden [48][59]. Da es bei einer CKD häufig zu tubulointerstitiellen Schäden kommt, könnte KIM1 auch als Marker für die CKD geeignet sein [75].

Eine Überexpression von KIM1 in Zellkulturen führte zu einer erhöhten Expression von Chemokinen und Zytokinen, welche mit entzündlichen Reaktionen assoziiert sind [132][77]. Ebenso kann die Interaktion von KIM1 mit ansässigen Leukozyten zu einer vermehrten

Immigration von neutrophilen Granulozyten in das geschädigte Gewebe führen. Wodurch eine Intensivierung der lokalen Entzündung und des Zellschadens ausgelöst werden kann [137]. Durch diesen Mechanismus kann KIM1 unter hypoxischen Bedingungen das Fortschreiten einer CKD beschleunigen und eine interstitielle Fibrose induzieren [55]. In neueren Studien konnte kein genereller Zusammenhang zwischen der KIM1-Konzentration im Urin und bestimmten Nierenfunktionsparametern hergestellt werden. Jedoch wurde eine indirekte Proportionalität zwischen der KIM1-Konzentration im Urin und der GFR bei Lupus-Nephritiden, IgA-Nephritiden und membranösen Nephritiden beobachtet [117]. Eine mögliche Ursache dafür könnte die Abhängigkeit der KIM1-Expression von einem tubulären Schaden sein [15]. Des Weiteren konnte ein Anstieg der KIM1-Konzentration im Urin bei Patienten mit diabetischer Nephropathie bereits bei einem geringen Albuminanstieg im Urin beobachtet werden [112]. Ein eindeutiger Vorteil gegenüber den traditionellen Laborparametern konnte hierbei nicht nachgewiesen werden [42], jedoch könnte ein Anstieg des KIM1-Spiegels im Blut ein geeigneter Marker sein um frühzeitig das Fortschreiten einer Nierenschädigung zu diagnostizieren [96].

1.5 Ziel der Arbeit

Um abschließend aufzuklären, ob und gegebenenfalls welcher genaue Zusammenhang zwischen den verschiedenen Formen der CKD und der KIM1-Expression besteht ist noch viel Forschung notwendig. Ein geeignetes Tiermodell hierfür könnte das Adeninmodell sein. Da jedoch bisher keine ausführlichen Untersuchungen zur KIM1-Expression im Adeninmodell publiziert wurden, sollten mit dieser Arbeit grundlegende Fragen geklärt werden. Zuerst sollte untersucht werden, welche Zellen in der Niere basal KIM1 exprimieren. Anschließend sollte die KIM1-Expression nach der Induktion eines spezifischen Nierenschadens mithilfe des Adeninmodells und nach einer darauffolgenden 3 Wochen andauernden Erholungszeit untersucht werden, um Veränderungen der Expression analysieren zu können.

Des Weiteren war ein Ziel mögliche Zusammenhänge zwischen der KIM1-Expression und der Nierenschädigung zu überprüfen. Hierfür sollten die Nierenfunktion sowie der KIM1-Proteingehalt im Blut und im Plasma kontrolliert werden. Ebenso wurde eine histologische Überprüfung von Zusammenhängen zwischen zellulärem Schaden und KIM1-Expression angestrebt.

Vergleichend sollte die LCN2-Expression in der Niere untersucht werden. Hierbei wurde zuerst die Identifikation der basal-LCN2-exprimierenden Zellen angestrebt. Anschließend sollten Nieren nach Adeningabe und nach einer dreiwöchigen Erholungsphase auf die LCN2-Expression überprüft werden. Ebenso wie bei KIM1 sollte zur Kontrolle von Zusammenhängen zwischen LCN2-Expression und Nierenschaden der Proteingehalt von LCN2 im Blut und im Urin ermittelt werden.

Außerdem sollte sowohl für KIM1 als auch für LCN2 überprüft werden, ob basal, während der Adeninfütterung oder nach der Erholungsphase eine extrarenale Expression stattfindet und in welchem Umfang sich diese gegebenenfalls im Verlauf des Versuches ändert.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Chemidoc TM Touch Imaging System	Biorad, München
Eismaschine	Ultra-Turrax T25, Janke und Kunkel, Staufen
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
Gelelektrophoresesystem	Compact M. Biometra, Göttingen
Glättetisch	HI 1220, Leica, Wetzlar
Heizblöcke	Thermomixer F1.5, Eppendorf, Hamburg Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, Janke und Kunkel, Staufen
Inhalation Device UniVet	Groppler, Deggendorf
Invitrogen TM Qubit TM 3.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isofluran Verdampfer	Datex Ohmeda Isotec 5, Datex Ohmeda, Helsinki, Finnland
Kamera	AxioCam 305 color, Zeiss, Jena AxioCam 506 mono, Zeiss, Jena
Mikroskop	Axio Observer.Z1, Zeiss, Jena
Mikrotom	Rotationsmikrotom RM2165, Leica, Wetzlar Rotationsmikrotom RM2265, Leica, Wetzlar
Mikrowelle	Sharp, Osaka, Japan
Osmomat 030	Gonotec, Berlin
PCR-Geräte	Lightcycler LC480, Roche, Mannheim Labcycler Basic, SensoQuest, Göttingen
Perfusionspumpe	323, Watson Marlow, Wilmington, UK

Gerät	Hersteller
pH-Meter	Hanna Instruments, Vöhringen
Photometer	NanoDrop 1000, Peqlab, Erlangen
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000, Gilson, Middleton, USA
Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim
Präparierbesteck	Fine Science Tools, Heidelberg
Reinwasseranlage	Milli Q Plus PF, Merck Millipore, Darmstadt
RNAscope® Ofen	HybEZ II Oven, Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Silikonkautschuk Gießformen	Roth, Karlsruhe
Taumelschüttler	SU1100, Stözl Medical, Wien
Waagen	Feinwaage ABT 120-5DM, Kern, Balingen-Frommern EMS, Kern, Balingen-Frommern
Wärmeschränk	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Aqualine AL12, Lauda, Lauda-Königshofen
XP Flammphotometer	BWB Technologies, Newbury, UK
Zentrifugen	Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg Haematokrit 210, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen Z300, Hermle, Wehingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Adhäsionsobjektträger Epredia™ SuperFrost Plus™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Adhäsive qPCR Folie	Sarstedt, Nümbrecht
Aspirator tube assemblies for calibrated microcapillary pipettes	Sigma-Aldrich, München
Auslaufpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Combitips advanced 0,1 ml, 0,2 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe

Produkt	Hersteller
Fettstift	ImmEdge™ Pen, Vector Laboratories, Burlingame, USA
Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Gewebe-Einbettkassetten	Roth, Karlsruhe
Glaswaren	Roth, Karlsruhe Schott, Mainz
Hämatokrit-Kapillaren	minicaps® end to end, Na-heparinisiert, 0,5 µl und 5 µl, Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt HK 75 K, Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth
Hämatokrit-Kapillaren-Versiegelungskit	Brand, Wertheim
Insulinspritzen U-100 Insulin	Micro-Fine™, Becton Dickinson, East Rutherford Omnican®, B. Braun, Melsungen
Kanülen	Fine-ject®, Henke Sass Wolf, Tuttlingen Microlance™ 3, Becton Dickinson, East Rutherford
Klingen für Mikrotom	R35, Feather, Osaka, Japan
Latexhandschuhe	Roth, Karlsruhe
LightCycler Multiwell 96	Roche, Mannheim
Objektträger, Super Frost® Plus	Menzel, Braunschweig
Qubit™ assay tubes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Reagiergefäße 0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Spitzen 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1ml mit Filter ohne Filter	Nerbe, Winson Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

Produkt	Hersteller
Adenin-Futter (0,2 %)	Altromin Spezialfutter Gmbh & Co. KG, Lage
Chloroform	Merck, Darmstadt
DAPI (4', 6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, München
Eindeckmedium ProLong Gold	Thermo Scientific, Waltham, USA
Eindeckmedium VectaMount	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut p.A.	Labochem [®] international, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
FITC-Sinistrin	Fresenius Kabi, Bad Homburg
GeneRulerTM 100bp plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRulerTM 1000bp plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glycergel mounting medium (IF)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
GoTaq [®] G2 DNA Polymerase, 5 U/µl	Promega, Mannheim
GoTaq [®] Reaction Buffer Green	Promega, Mannheim
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethan-sulfonsäure	Sigma-Aldrich, München
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isotonische NaCl-Lösung, 0,9 % steril	B.Braun, Melsungen
LightCycler [®] 480 SYBR-Green-Master-PCR Kit	Roche, Mannheim
Methanol p.A.	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
M-MLV Reversetranskriptase, 200 U/µl	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo(dT)15 Primer, 0,5 µg/µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Opal Fluorophore Reagent Packs (Opal 520, Opal 570, Opal 690)	Akoya Biosciences, Marlborough, USA
Paraffin	Sarstedt, Nümbrecht

Produkt	Hersteller
PCR Nukleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Mannheim
Pferdeserum	Gibco, Life technologies, Grand Island, USA
Propan-2-ol puriss. p.A.	Honeywell, Morris Plains, USA
Quantikine [®] ELISA Mouse KIM-1	R&D Systems, Minneapolis, USA
Quantikine [®] ELISA Mouse Lipocalin-2	R&D Systems, Minneapolis, USA
RNAscope [®] H ₂ O ₂ und Protease Plus Reagenzien	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope [®] Multiplex Fluorescent v2 Assay	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope [®] Target Retrieval Reagents	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
RNAscope [®] Waschpuffer	Advanced Cell Diagnostics, Hayward, USA
Roti [®] -Safe GelStain	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
TRIsure [®] -Reagent	Bioline, Luckenwalde
Xylol	Merck, Darmstadt
Xylol (für RNAscope [®])	Honeywell, Morris Plains, USA

2.1.4 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle Puffer und Lösungen mit purifiziertem Trinkwasser (Milli-Q-Wasser) hergestellt.

FITC-Injektionslösung für GFR	
NaCl-Lösung 1 % steril	
FITC-Sinistrin	1 %

HEPES-Puffer für GFR, pH=7,4	
HEPES	0,5 mM

NBF-Lösung für die Perfusion (in-situ Hybridisierung), pH=7,0

Formalin (37-40 % stock solution)	10 %
NaH ₂ PO ₄	33,3 mM
Na ₂ HPO ₄	45,8 mM

Blockierlösung für Immunfluoreszenz

PBS-Otto	
BSA (bovines Serum-Albumin)	0,9 %
Pferde-Serum	10 %

Paraformaldehyd-Lösung für die Perfusion (Immunfluoreszenz), pH=7,4

Dulbecco's PBS	
Paraformaldehyd	3 %

PBS(Phosphate Buffered Saline)-Otto-Puffer, pH=7,4

K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O	10 mM
NaCl	140 mM
KH ₂ PO ₄	2,5 mM

Stammlösung für Immunfluoreszenz

PBS-Otto	
BSA (bovines Serumalbumin)	1 %

2.1.5 Primer

Sämtliche Primer wurden von Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg) hergestellt gemäß der von uns gewünschten Sequenzen. Die Primer wurden als lyophilisierte (gefriergetrocknete) Pulver verschickt und in aufbereitetem Trinkwasser (Milli Q-Wasser) aufgelöst zu einer Endkonzentration von 100 pmol/µl.

Primer für die quantitative Real-Time-PCR:

Gen	Sequenz (5'-3')	Produktlänge in bp
GAPDH	s CAC CAG GGC TGC CAT TTG CA as GCT CCA CCC TTC AAG TGG	294
Kim1	s AAA CCA GAG ATT CCC ACA CG as GTC GTG GGT CTT CCT GTA GC	74
LCN2	s GGA CCA GGG CTG TCG CTA CT as GGT GGC CAC TTG CAC ATT GT	251
RPL32	s TTA AGC GAA ACT GGC GGA AAC as GCT CCA CCC TTC AAG TGG	100

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Goat-anti-LCN2	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:100
Rabbit-anti-Kollagen1	Abcam, Cambridge, UK	1:720

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugation	Hersteller	Verdünnung
Donkey-anti-Goat	Cy3	Dianova, Hamburg	1:400
Donkey-anti-Rabbit	Cy5	Dianova, Hamburg	1:400

2.1.7 Sonden für in-Situ Hybridisierung

Sämtliche Sonden wurden von Advanced Cell Diagnostics (Hayward, USA) für die RNAscope[®]-Methode hergestellt.

Sonde	Bestellnummer
RNAscope [®] α -SMA-C2	319531-C2
RNAscope [®] AQP-2-C3	452411-C3
RNAscope [®] CD31 (Pecam1)-C2	316721-C2
RNAscope [®] Col1a1-C2	319371-C2
RNAscope [®] KIM1-C1	472551
RNAscope [®] LCN2-C1	313971
RNAscope [®] LCN2-C2	313971-C2
RNAscope [®] Megalin (Lrp2)-C2	425881-C2
RNAscope [®] NKCC2 (Slc12a1)-C1	476841
RNAscope [®] NKCC2 (Slc12a1)-C2	476841-C2

2.1.8 Software und Internetdienste

Diese Arbeit wurde mit L^AT_EX Texmaker 5.0.3 geschrieben. Sämtliche Graphen wurden mit GraphPad Prism 5 erstellt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde als Software ZEN blue von Zeiss verwendet. Die Bilder wurden mit ZEN blue und Adobe Photoshop CS5 bearbeitet. Zur Erstellung von schematischen Darstellungen wurde GIMP 2.10.30 verwendet. Für die Internetrecherche wurde PubMed genutzt.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

2.2.1.1 Mauslinien und Haltungsbedingungen:

Alle Tierexperimente wurden gemäß der „National Institutes of Health guidelines for the care and use of animals in research“ durchgeführt. Auf optimale Haltungsbedingungen wurde geachtet (Temperatur: $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit: $(55 \pm 5)\%$, Hell-/Dunkelintervall von 12h, Futter und Leitungswasser ad libitum).

Für die Arbeit wurden ausschließlich C57BL/6-Mäuse verwendet.

Diese werden im Folgenden als Wildtypen bezeichnet.

2.2.1.2 Kontrollbedingungen

Unter Kontrollbedingungen wurden die Mäuse mit Standard-Nagerfutter (0,6 % NaCl, Ssniff, Soest) gefüttert. Die Kontrollbedingungen werden im Folgenden als basale Bedingungen bezeichnet.

2.2.1.3 Adenin-induzierte Nierenfibrose

Zur Beurteilung der Aussagekraft ausgewählter Nierenschädigungsmarker bei akutem Nierenschaden wurde das Modell der Adenin-induzierten Nierenfibrose verwendet. Hierfür wurden die Mäuse über 3 Wochen mit Adenin-haltigem Futter (0,2 %) gefüttert. Anschließend erfolgte entweder direkt die Organentnahme oder die Mäuse wurden für eine dreiwöchige Erholungsphase erneut mit Standardfutter gefüttert. Die Einteilung in die Gruppe mit Erholungsphase oder die Gruppe mit direkter Organentnahme erfolgte zufällig.

2.2.1.4 Sammlung von Spontanurin

Zur Gewinnung von Spontanurin wurden die Mäuse in saubere Kunststoffbehälter gesetzt. Wenn nach 30 min kein Urin gesammelt werden konnte, wurden die Tiere zurück in den Käfig gesetzt und die Prozedur am Folgetag wiederholt. Die Urinsammlung erfolgte jeweils an 3 aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitraum des Versuchs. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.1.5 GFR-Messung

Um die GFR beim wachen Tier zu bestimmen, wurden die Mäuse mittels Isofluran-Anästhesie (ca. 4 %) für 2 min narkotisiert. Im Anschluss wurde den Tieren eine fluoreszierende Lösung (1 %-ige FITC-Sinistrin-Lösung) in den retrobulbären Venenplexus ($3,74\text{ }\mu\text{l/g KG}$) appliziert. Nun wurde zur Verfolgung der Elimination jeweils 3, 7, 10, 15,

35, 55, und 75 Minuten nach Injektion eine Schwanzvenen-Punktion durchgeführt und je ca. 5 μ l Blut in Na^+ -heparinisierte Kapillaren überführt. Das Blut wurde anschließend bei 12 000 rpm für 7 min zentrifugiert. Je 0,5 μ l des Plasmas wurden in je 200 μ l HEPES-Puffer verdünnt und die Fluoreszenz mit dem QubitTM 3.0 Fluorometer gemessen. Zur Berechnung der GFR wurde das Zwei-Kompartiment-Modell genutzt.

2.2.1.6 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte über Punktion der Vena facialis. Hierbei wurden jeweils ca. 300 μ l Blut entnommen und in Na-heparinisierte Kapillaren überführt, die auf einer Seite mit einem Versiegelungskit verschlossen wurden. Diese wurde anschließend bei 12 000 rpm 5 min zentrifugiert und der Hämatokrit bestimmt. Anschließend wurde das Plasma mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Die Blutentnahme erfolgte jeweils am Tag vor der GFR-Messung.

2.2.2 Retrograde arterielle Perfusion

Für die Fixierung des Gewebes wurde eine retrograde arterielle Perfusion durchgeführt. Dafür wurde entweder eine 3 %-ige Paraformaldehyd-Lösung (Immunfluoreszenz) oder eine 10 %-ige NBF-Lösung (in-situ Hybridisierung mit RNAscope[®]) verwendet. Die Mäuse wurden zuerst mit einer Mischung aus Ketamin (80 mg/kg KG) und Xylazin (16 mg/kg KG) narkotisiert. Anschließend wurde der Bauchraum eröffnet und die Aorta abdominalis freipräpariert. Die linke Arteria renalis wurde ligiert, um eine Niere für spätere mRNA-Analysen nutzen zu können. Dann wurde die Aorta distal der Abgänge der beiden Arteriae renales abgeklemmt und kaudal der Klemme eröffnet. Mithilfe eines Gefäßdilators wurde ein Perfusionskatheter in die Aorta eingeführt und mit einer Klemme fixiert. Nun wurde die obere Klemme entfernt und die Vena cava inferior unterhalb des Katheters zum Druckausgleich eröffnet. Danach erfolgte die Perfusion mit einem konstanten Fluss von 13 ml/min zuerst mit 40 ml PBS und anschließend mit 40 ml der entsprechenden Perfusionslösung. Die abgebundene Niere wurde entnommen, in zwei Hälften geschnitten, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert. Die perfundierte Niere wurde ebenso halbiert und dann entweder in der NBF-Lösung (für RNAscope[®]) bei Raumtemperatur (RT) oder in 70 %-igem Methanol bei 4°C (für Immunfluoreszenz) 24-36 h bis zur Einbettung in Paraffin gelagert.

2.2.3 Einbettung in Paraffin

Das perfundierte Gewebe wurde in Einbettkassetten überführt und mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Einbettung mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe:

Dauer, Temperatur	In-situ Hybridisierung	Immunfluoreszenz
2 x 30 min, RT	70 % Ethanol	70 % Methanol
2 x 30 min, RT	80 % Ethanol	80 % Methanol
2 x 30 min, RT	90 % Ethanol	90 % Methanol
2 x 30 min, RT	100 % Ethanol	100 % Methanol
2 x 30 min, RT	100 % Propan-2-ol	100 % Propan-2-ol
1 x 30 min, 45 °C	100 % Propan-2-ol	100 % Propan-2-ol
1 x 30 min, 60 °C	1:1 Propan-2-ol:Paraffin	1:1 Propan-2-ol:Paraffin
2 x 24 h, 60 °C	Paraffin	Paraffin

Die Gewebeproben wurden daraufhin in Silikon-Formen mit Paraffin überführt mit der Schnittfläche nach unten. Das Paraffin wurde über Nacht bei RT ausgehärtet und die Blöcke wurden nach dem Entfernen der Form bei RT gelagert.

2.2.4 Paraffinschnitte

Zum Anfertigen der Schnitte wurden die Paraffinblöcke zuerst mit einer Rasierklinge zugeschnitten. Anschließend wurden mithilfe des Rotationsmikrotoms 5 µm dicke Schnitte angefertigt und in ein Wasserbad (40 °C) überführt um das Gewebe zu entfalten. Nun wurden die Schnitte auf Objektträger aufgetragen und über Nacht bei RT getrocknet.

2.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung wurde zum Proteinnachweis im Gewebe verwendet. Dafür wurde ein primärer Antikörper verwendet, der an spezifische Epitope des gesuchten Proteins bindet. Anschließend wurde der primäre Antikörper mithilfe eines sekundären Antikörpers, der spezifisch mit dem primären reagiert, sichtbar gemacht. Zu diesem Zweck wurden mit Fluorophoren konjugierte sekundäre Antikörper verwendet. Bevor die Färbung beginnen konnte, wurden die Schnitte entparaffiniert und anschließend rehydriert. Hierfür wurde folgende absteigende Alkoholreihe verwendet:

Dauer	Lösung
10 min	100 % Xylol
10 min	100 % Xylol
5 min	100 % Propan-2-ol
5 min	100 % Propan-2-ol
5 min	96 % Propan-2-ol
5 min	80 % Propan-2-ol
5 min	70 % Propan-2-ol

Nun wurden die Objektträger kurz in H₂O geschwenkt und dann 40 min in einer Tris/EDTA-Lösung bei 100 °C gekocht. Nachdem die Objektträger 30 min in der Tris/EDTA-Lösung zum Abkühlen auf RT auf dem Arbeitsplatz standen, wurden die Objektträger 3-mal in PBS-Otto-Puffer für je 5 min gewaschen. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet. Zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde auf die Schnitte nun die Blockierlösung gegeben (10 % Pferde-Serum und 0,9 % BSA in PBS-Otto-Puffer) und die Schnitte wurden für 20 min bei RT auf einen Schüttler (50 rpm) blockiert. Danach wurden die primären Antikörper in der Blockierlösung verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten geschlossenen Kammer. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in der Stammlösung (1 % BSA in PBS-Otto-Puffer) 3-mal für je 5 min gewaschen. Anschließend wurden die sekundären Antikörper, welche in der Stammlösung verdünnt wurden, auf die Schnitte gegeben. Die Schnitte wurden 90 min im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgten 3 Waschungen in PBS-Otto-Puffer für je 5 min. Die Schnitte wurden für 30 s mit DAPI inkubiert. Zum Schluss wurden die Objektträger kurz in PBS-Otto-Puffer gewaschen, dann auf einem Papiertuch trocken geklopft und mit dem Einbettmedium eingedeckelt.

Die Schnitte wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte nach den Angaben bei den Materialien.

2.2.6 In-situ Hybridisierung

Die in-situ Hybridisierung wurde mit dem RNAscope® Multiplex Fluorescent v2 Assay von ACDBio durchgeführt. Es wurde das Standardprotokoll des Herstellers verwendet [134]. Die Methode wurde verwendet um die Expression der mRNA in den Organen zu lokalisieren. Positiv- und Negativkontrollen wurden routinemäßig in den Versuchen eingeschlossen.

2.2.7 ELISA

Die LCN2- und KIM1-Konzentrationen in Urin und Plasma wurden mit Sandwich-ELISAs bestimmt. Hierbei wird das gesuchte Protein durch einen oberflächen-befestigten spezifischen

schen Antikörper gebunden. Nach mehrfachem Waschen wird dann ein Enzym-gekoppelter Antikörper hinzugegeben, der an das gebundene Protein bindet. Nach erneutem mehrfachem Waschen wird eine Substratlösung hinzugefügt, wodurch es zu einer enzymatischen Reaktion kommt, bei der ein farbiges Produkt entsteht. Nach Zugabe einer Stopplösung kann dann anhand der Farbintensität die Konzentration des gesuchten Proteins ermittelt werden. Es wurde der mouse KIM-1 Quantikine ELISA (R&D Systems, catalog MKM100) sowie der mouse LCN-2 Quantikine ELISA (R&D Systems, catalog MLCN20) verwendet. Es wurde das jeweilige Standardprotokoll des Herstellers angewendet.

2.2.8 Osmolaritätsmessung

Die Urinosmolarität wurde über die Gefrierpunktserniedrigung der Lösung bestimmt. Hierfür wurden 5 µl Urin in 45 µl Millipore-Wasser verdünnt und dann mit dem Osmomat 030 vermessen. Der Verdünnungsfaktor wurde anschließend herausgerechnet.

2.2.9 Natrium- und Kaliummessung

Die Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Urin wurden mittels Flammphotometrie bestimmt. Dafür wurde vor der Messung das Flammphotometer mit einer Standardreihe kalibriert (5 Messpunkte, lineare Verdünnung). Anschließend wurden die verdünnten Proben (10 µl Urin in 10 ml Millipore-Wasser) je als Duplikat vermessen.

2.2.10 Quantifizierung der mRNA-Expression in verschiedenen Organen

2.2.10.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte nach der Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode [23]. Hierfür wurden die gefrorenen Organe bzw. Nierenhälften in 1 ml TRIsure® homogenisiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Danach wurde die Lösung auf RT gebracht und es wurde je 200 µl Chloroform hinzugegeben. Nun erfolgte ein Zentrifugationsschritt (30 min bei 4 °C und 13 000 rpm). Vom entstandenen drei-phasigen Gemisch wurde jeweils 500 µl aus der wässrigen Phase entnommen und mit 500 µl Isopropanol (100 %) vermischt. Danach wurden die Proben 10 min zum Fällern der RNA stehen gelassen und dann erneut zentrifugiert (30 min bei 4 °C und 13 000 rpm). Der Überstand wurde abgesaugt und das verbleibende Pellet in 1 ml Ethanol (75 %) gewaschen. Nach 15 min Zentrifugation (4 °C, 12 000 rpm) wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet bei RT getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in je 200 µl Millipore-Wasser resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei −80 °C gelagert.

2.2.10.2 Reverse Transkription

Der RNA-Gehalt der Proben wurde mit dem Nanodrop Photometer bestimmt. Die Messung wurde bei 260 nm und 280 nm durchgeführt und anschließend das Verhältnis ermittelt. Es wurden ausschließlich Proben mit einem Wert über 1,8 weiterverwendet. Für die Synthese der cDNA wurde eine Lösung aus 1 µg RNA, 1 µl Oligo dT15-Primer und Millipore-Wasser (ad 10 µl) hergestellt und zum Binden der Primer für 5 min bei 65 °C in einen Cycler gestellt. Nun wurden die Proben abzentrifugiert, auf Eis gestellt und 10 µl eines Mastermixes (4 µl 5x First Strand Puffer, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl Reverse Transkriptase und 4 µl Millipore-H₂O) hinzugefügt. Danach wurden die Proben 1 h bei 37 °C inkubiert und die reverse Transkriptase durch anschließendes Erhitzen auf 95 °C für 2 min inaktiviert. Die Proben wurden mit 35 µl Millipore-Wasser verdünnt und anschließend bei –20 °C gelagert.

2.2.10.3 Quantitative Realtime PCR

Für die Quantitative Realtime PCR wurde der LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit verwendet. Es wurde zu 1 µl der jeweiligen Probe 9 µl eines Ansatzes aus 5 µl LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 0,5 µl sense-Primer (10 pmol), 0,5 µl antisense-Primer (10 pmol) und 3,3 µl Millipore-Wasser gegeben und für 2 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Zur Aktivierung wurden die Proben 10 min auf 95 °C erhitzt. Dann wurden 50 Amplifikationszyklen (bestehend aus 15 s Denaturierung bei 95 °C, 20 s Annealing bei 62 °C und 20 s Elongation bei 72 °C) durchgeführt. Zum Schluss wurden die Proben langsam von 60 °C auf 95 °C erhitzt und eine Schmelzkurve erstellt, um die Reinheit des amplifizierten Produktes zu überprüfen.

2.2.11 Mikroskopische Aufnahmen

Sämtliche mikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe des Axio Observer.Z1 Mikroskops, ausgestattet mit motorisierter Objektauflage und Schwarz-Weiß-CCD-Kamera (AxioCam 506 mono), durchgeführt. Es wurde die ZEN blue (2012) Software von Zeiss verwendet. Die Fluorophore wurden unter Nutzung von entsprechenden Filtern mit Licht der jeweils optimalen Wellenlänge angeregt und das entstandene Emissionslicht aufgenommen. Die verschiedenen Kanäle wurden getrennt voneinander aufgenommen und anschließend zusammengeführt.

Fluorophor	Anregung in nm	Emission in nm
Cy2	450-490	500-550
Cy5	625-655	665-715
DAPI	335-383	420-470
TRITC	533-558	570-640

2.2.12 Statistische Auswertung

Die ermittelten Messwerte wurden jeweils als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt, sofern es nicht anders angegeben wird. Unter Verwendung des Student's t-Test wurde auf signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen getestet. Werte mit $p \leq 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von LCN2 unter basalen Bedingungen

3.1.1 LCN2-Expression in verschiedenen Organen

Da bereits verschiedene Expressionsorte für LCN2 neben der Niere beschrieben wurden [135][144][145], wurde zunächst die mRNA-Expression mittels qPCR in diversen Organen von Mäusen beider Geschlechter untersucht. Ein Unterschied in der Expression zwischen männlichen und weiblichen Tieren konnte nicht festgestellt werden. Es fiel auf, dass LCN2 unter basalen Bedingungen vor allem in der Lunge und der Leber exprimiert wird. In der Niere hingegen konnte kaum eine Expression nachgewiesen werden. Die mittlere mRNA-Abundanz in der Niere war dabei fast 14-mal kleiner als in der Lunge. In den anderen Organen lag die mRNA-Expression basal nahe dem Detektionsminimum (Abbildung 3.1).

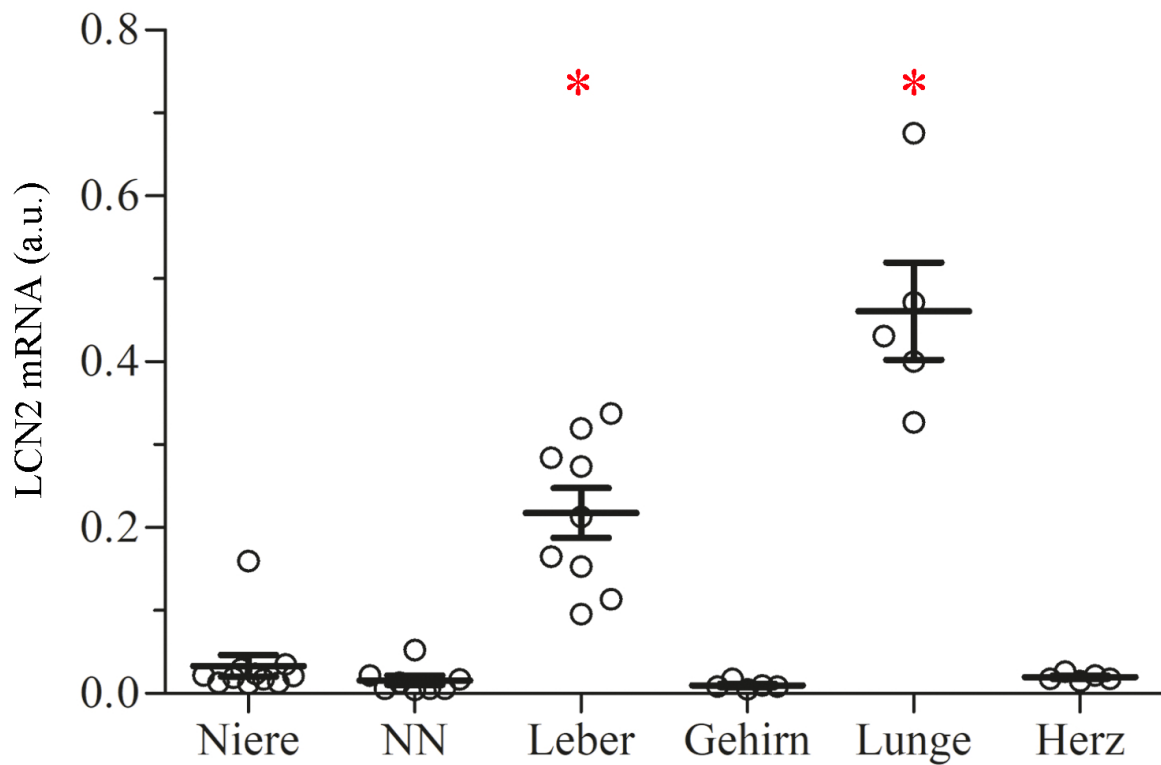


Abbildung 3.1: LCN2-mRNA-Abundanz in Niere, Nebenniere (NN), Leber, Gehirn, Lunge und Herz unter basalen Bedingungen; dargestellt mit Mittelwert und SEM; * = signifikanter Unterschied zur Abundanz in der Niere ($p \leq 0,01$); $n \geq 5$.

3.1.2 Renale LCN2-Expression

Hinsichtlich der renalen LCN2-Expression lieferte die RNA-Visualisierung mit Hilfe der RNAscope[®]-Methode einen sehr ähnlichen Befund. Da in Übersichtsschnitten ganzer Nieren basal die Signale nur schwer detektiert werden konnte, wurden hier Detailansichten gewählt. In diesen konnte dargestellt werden, dass LCN2 basal vor allem in den Aquaporin-2-positiven Epithelzellen der Sammelrohre exprimiert wurde (Abbildung 3.2, B). Jedoch konnte auch in einigen NKCC2-positiven Epithelzellen des distalen Tubulus eine LCN2-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.2, A). Insgesamt kann gesagt werden, dass unter Kontrollbedingungen LCN2 in der Niere überwiegend in der Papille und dem Innenstreifen des äußeren Marks exprimiert wurde.

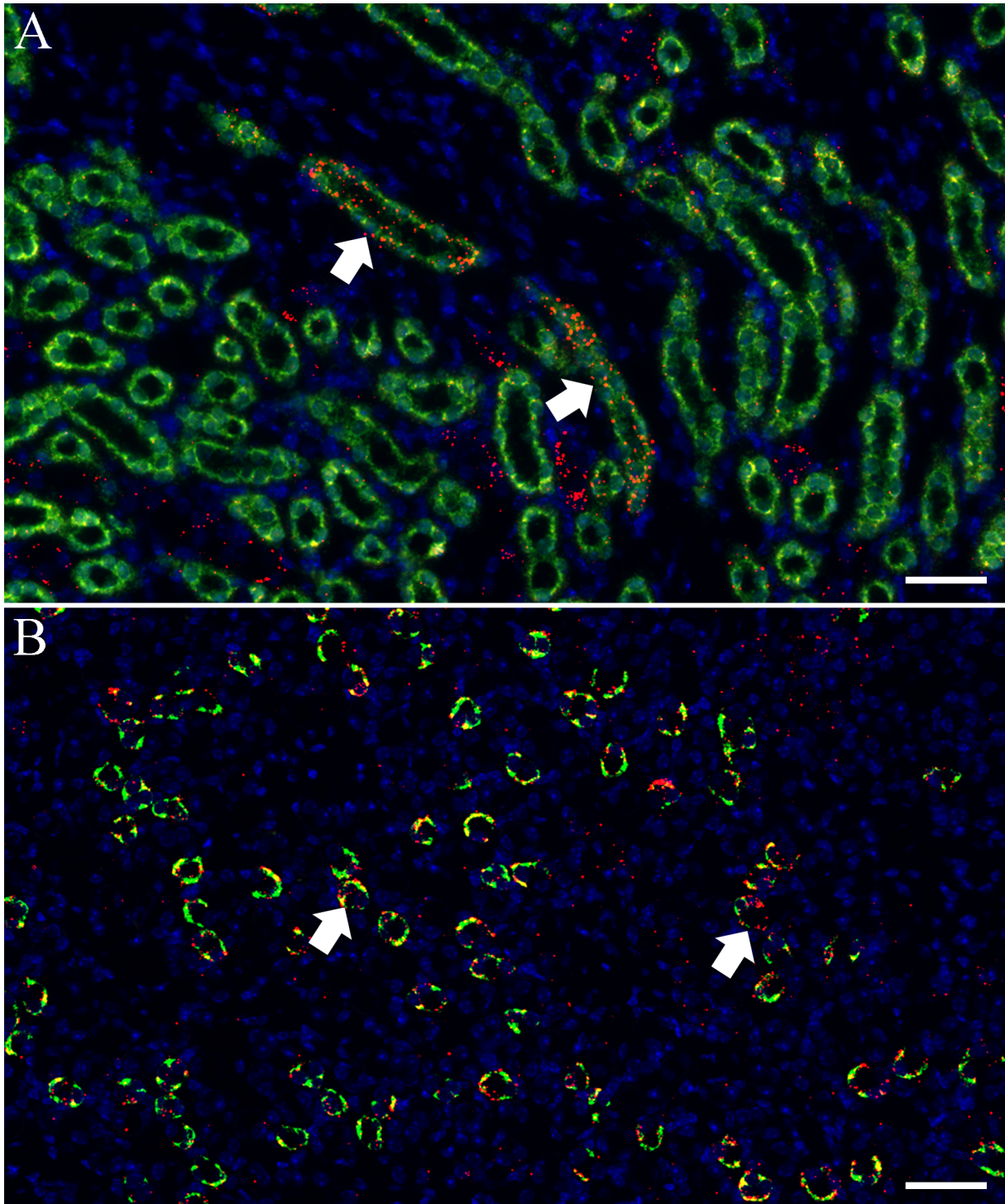


Abbildung 3.2: Kolokalisierung von LCN2 (rot) mit NKCC2 (A, grün) und AQP2 (B, grün) dargestellt mittels in-situ-Hybridisierung; im Innenstreifen der äußeren Medulla (A) liegt LCN2 nur im geringen Umfang kolokalisiert mit NKCC2 vor, teilweise konnten jedoch Tubuli mit Koexpression gefunden werden (Pfeile); eine vergleichsweise starke Expression von LCN2 zeigte sich in den AQP2-positiven Sammelrohren (Pfeile) der Papille und den papillennahen Bereichen der äußeren Medulla (B); Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzbalken = 50 μ m.

genauer gesagt das S3-Segment des proximalen Tubulus, handelte. Hingegen konnte eine Koexpression mit NKCC2 nicht nachgewiesen werden. Im Kortex und in der Papille war keine KIM1-mRNA detektierbar (Abbildung 3.4).

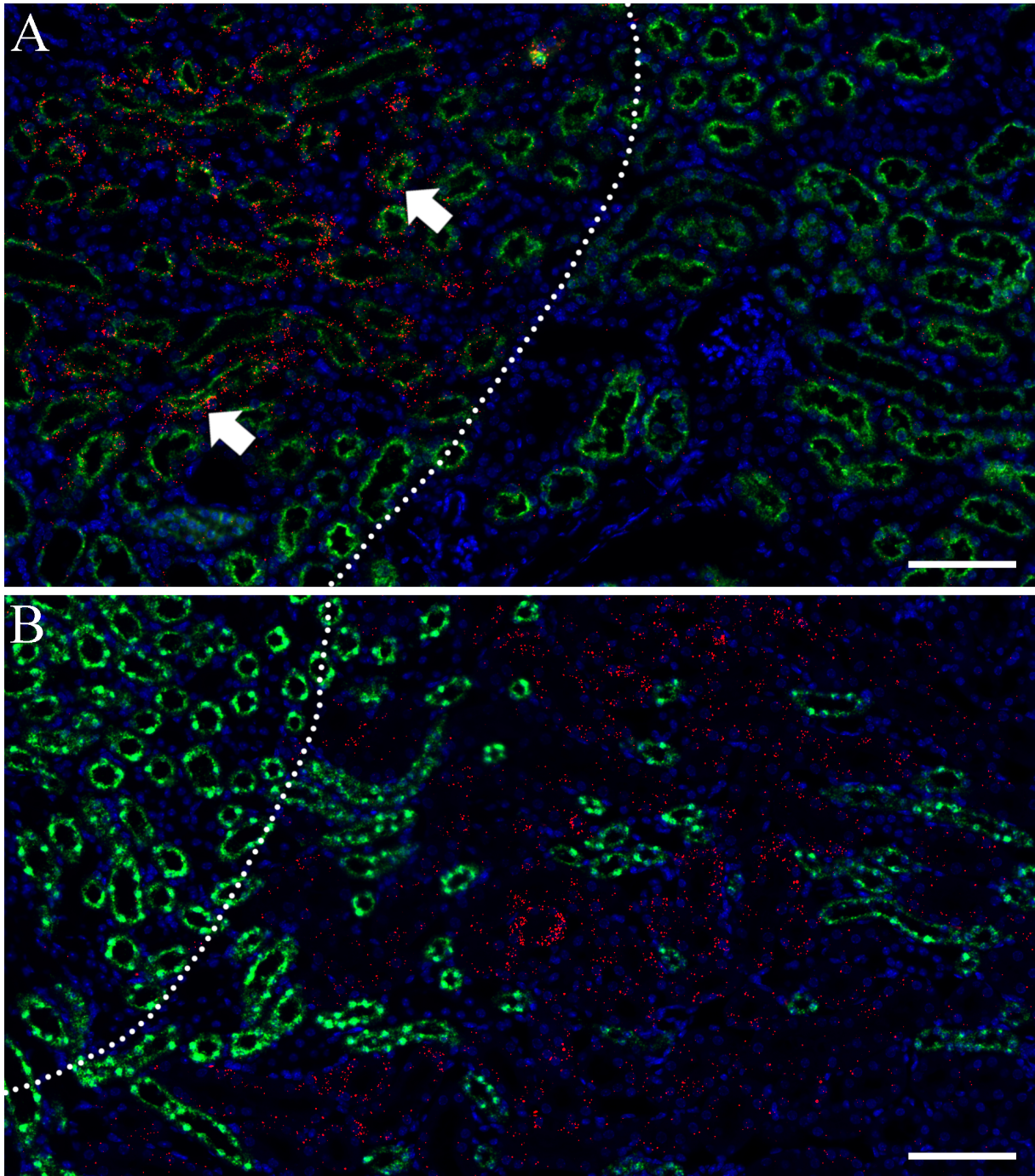


Abbildung 3.4: Kolokalisierung von KIM1 (rot) mit Megalin (A, grün) und NKCC2 (B, grün) dargestellt mittels in-situ-Hybridisierung; KIM1-mRNA lag im äußeren Mark (A) mit Megalin kolokalisiert vor (Pfeile), in der Rinde war KIM1 nur spurenhaf nachweisbar, die gepunktete Linie markiert die Rinden-Mark-Grenze; eine Koexpression von KIM1 mit NKCC2 konnte nicht nachgewiesen werden (B), die gepunktete Linie kennzeichnet hier die Grenze zwischen Innen- und Außenstreifen der äußeren Medulla; Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzbalken = 100 μ m.

3.3 Adenin-induzierte Nierenfibrose

Als Modell für die Induktion eines chronischen Nierenschadens wurde die Adenin-induzierte Nierenfibrose gewählt. Dazu wurden männliche Mäuse in einem Alter von 91 Tagen für drei Wochen mit adeninhaltigem Futter gefüttert. Bei einem Teil der Mäuse wurde anschließend eine 3-wöchige Erholungsphase angeschlossen, um beobachten zu können, welche Veränderungen nach Entfernen des schädigenden Stimulus auftreten. Es wurde vor dem Beginn der Adeninfütterung die GFR gemessen und im Verlauf des Experiments erfolgte wöchentlich eine GFR-Messung. Um die Ergebnisse der GFR zwischen den einzelnen Messungen vergleichen zu können, wurde die GFR auf 100 g Körpergewicht (KG) normiert. Die mittlere GFR betrug basal $1200 \mu\text{l}/\text{min} * 100 \text{ gKG}$. Im Verlauf konnte ein starker Abfall der GFR innerhalb der 3 Wochen unter Adeningabe beobachtet werden. Die stärkste Senkung der GFR erfolgte hierbei innerhalb der ersten Woche mit einem mittleren Abfall der GFR um $700 \mu\text{l}/\text{min} * 100 \text{ gKG}$. In den beiden folgenden Wochen wurde die Abnahme kleiner. So fiel die mittlere GFR in der zweiten Woche um 160 und in der dritten Woche nur noch um $77 \mu\text{l}/\text{min} * 100 \text{ gKG}$. In der 3. Woche erreichte die GFR ihr Minimum mit durchschnittlich $266 \mu\text{l}/\text{min} * 100 \text{ gKG}$.

In der ersten Erholungswoche stieg im Vergleich zur Vorwoche die mittlere GFR um etwa $270 \mu\text{l}/\text{min} * 100 \text{ gKG}$ an, in der 2. um ca. 94 und in der dritten um ungefähr $42 \mu\text{l}/\text{min} * 100 \text{ gKG}$. Die GFR lag am Ende des Versuches mit durchschnittlich $673 \mu\text{l}/\text{min} * 100 \text{ gKG}$ etwa 45 % niedriger als die basale GFR (Abbildung 3.5, oben links).

Bei der Untersuchung der Urinosmolarität fiel auf, dass die Osmolarität von einem mittleren basalen Wert von ca. 1700 mOsmol/l bereits in der ersten Woche auf einen mittleren Wert von 640 mOsmol/l abfiel und sich in den folgenden 2 Wochen die Osmolarität nur noch geringfügig änderte. Auch in den anschließenden 3 Wochen der Erholung war keine signifikante Änderung der Osmolarität mehr zu beobachten (Abbildung 3.5, oben rechts).

Die Kalium- und Natriumkonzentrationen im Urin spiegeln den Verlauf der Urinosmolarität wieder. Auch die mittlere Kaliumkonzentration fällt in der ersten Versuchswoche stark ab. So beläuft sich die mittlere Kaliumkonzentration nach einer Woche Adeninfütterung auf ca. 40 % des Ausgangswertes (zum Vergleich: bei der Osmolarität konnte in der ersten Woche ein Abfall auf ca. 38 % des Ausgangswertes beobachtet werden). In den folgenden Wochen blieb die Kaliumkonzentration relativ stabil. Die Mittelwerte bleiben dabei in einem Bereich zwischen 95 und 120 mMol/l . Auch die Natriumkonzentration erfuhr in der ersten Woche den stärksten Abfall und blieb dann auf einem niedrigen Niveau bis zum Ende der Untersuchung (Abbildung 3.5, mitte links und rechts).

Bei der Messung des KGs konnte während der Zufütterung von Adenin im Mittel ein wöchentlicher Gewichtsverlust von 1,1 g je Woche beobachtet werden. So fiel das mittlere Gewicht von basal 26,9 g auf 23,6 g in der 3. Woche des Versuches. In der ersten Erho-

lungswoche erfolgte eine schnelle Gewichtszunahme, diese betrug durchschnittlich 4 g, was einer Zunahme um 17 % entspricht. Danach nahm das Gewicht um durchschnittlich 0,5-1 g pro Woche zu. Das Endgewicht lag im Mittel bei 29 g (3.5, unten links).

Der mittlere Hämatokrit lag basal etwa bei einem Wert von 51,5 %. In der ersten Versuchswoche konnte keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden. Erst in der 2. Woche kam es zu einem Abfall auf etwa 46,6 %. Auch in den beiden folgenden Wochen gab es eine ähnliche Senkung, welche zwischen 3 und 4 % lag. In der fünften und der sechsten Versuchswoche konnte keine signifikante Veränderung des Hämatokrits mehr nachgewiesen werden. Die Änderung des Hämatokrits trat also etwa eine Woche zur Adeninfütterung verzögert auf. Der mittlere Hämatokrit lag am Ende der Messung bei circa 39 % (3.5, unten rechts).

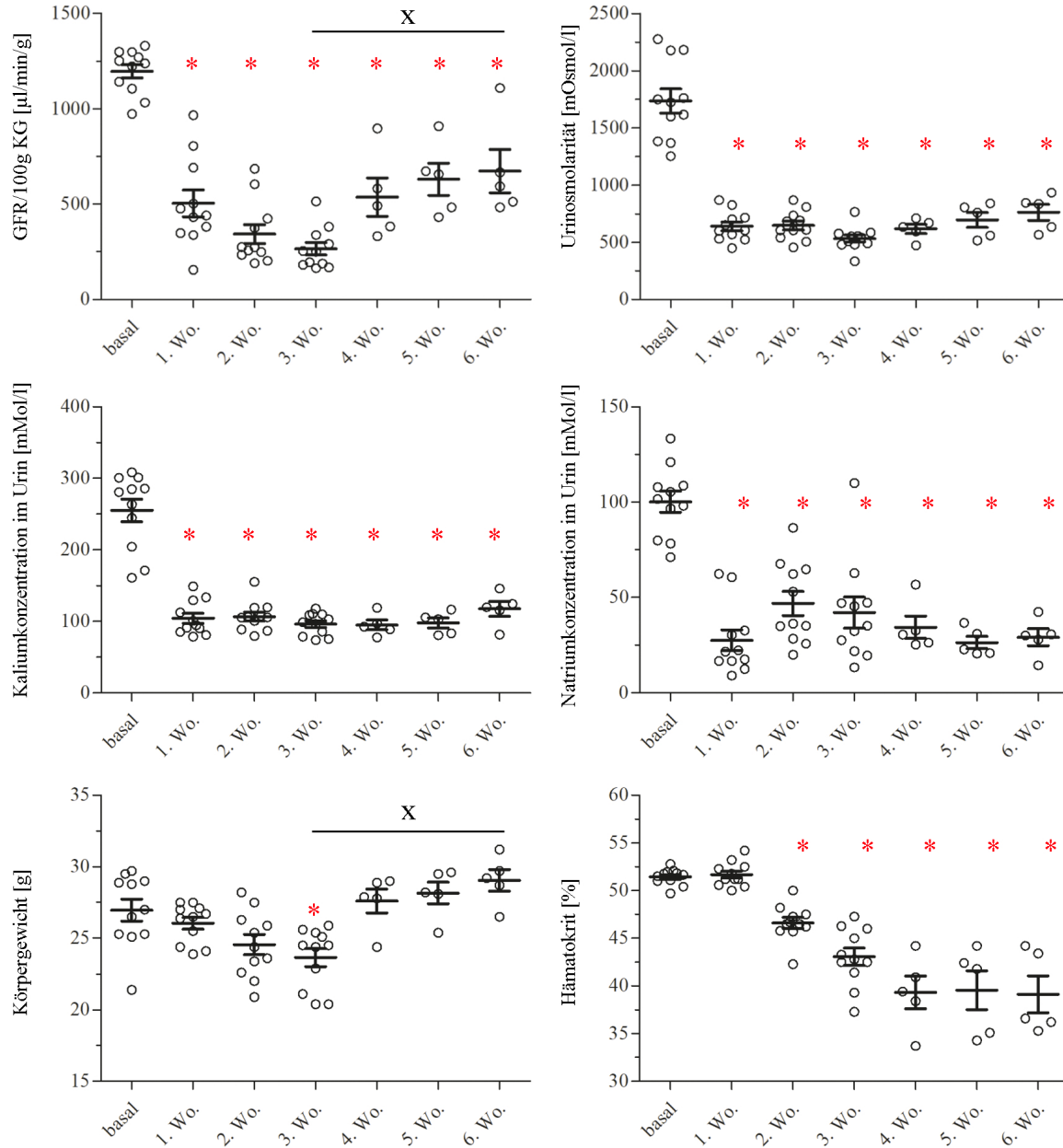


Abbildung 3.5: Darstellung von GFR, Urinosmolarität, Kalium- und Natriumkonzentration im Urin, KG und Hämatokrit im Verlauf; nach 3 Wochen Adeningabe folgten 3 Wochen Erholung (4., 5. und 6. Woche); dargestellt mit Mittelwert und SEM; x = signifikanter Unterschied zwischen den Messungen nach 3 Wochen Adenin und 3 Wochen Adenin + 3 Wochen ($p \leq 0,01$), * = signifikanter Unterschied zur basalen Messung ($p \leq 0,01$); $n_{\text{bis einschließlich 3. Woche}}=11$, $n_{\text{4. bis 6. Woche}}=5$.

3.3.1 Auswirkungen der Adeninfütterung auf die renale LCN2-Expression

Während basal nahezu keine LCN2-mRNA in der Niere nachweisbar war, konnte nach 3 Wochen Adenin ein signifikanter Anstieg der LCN2-Expression auf das 195-fache detektiert werden. Nach der 3-wöchigen Erholungsphase war die LCN2-Expression um mehr als 90 % zurückgegangen. Zwischen der basalen Messung und der Messung nach 3 Wochen Erholung lag kein signifikanter Unterschied vor (Abbildung 3.6).

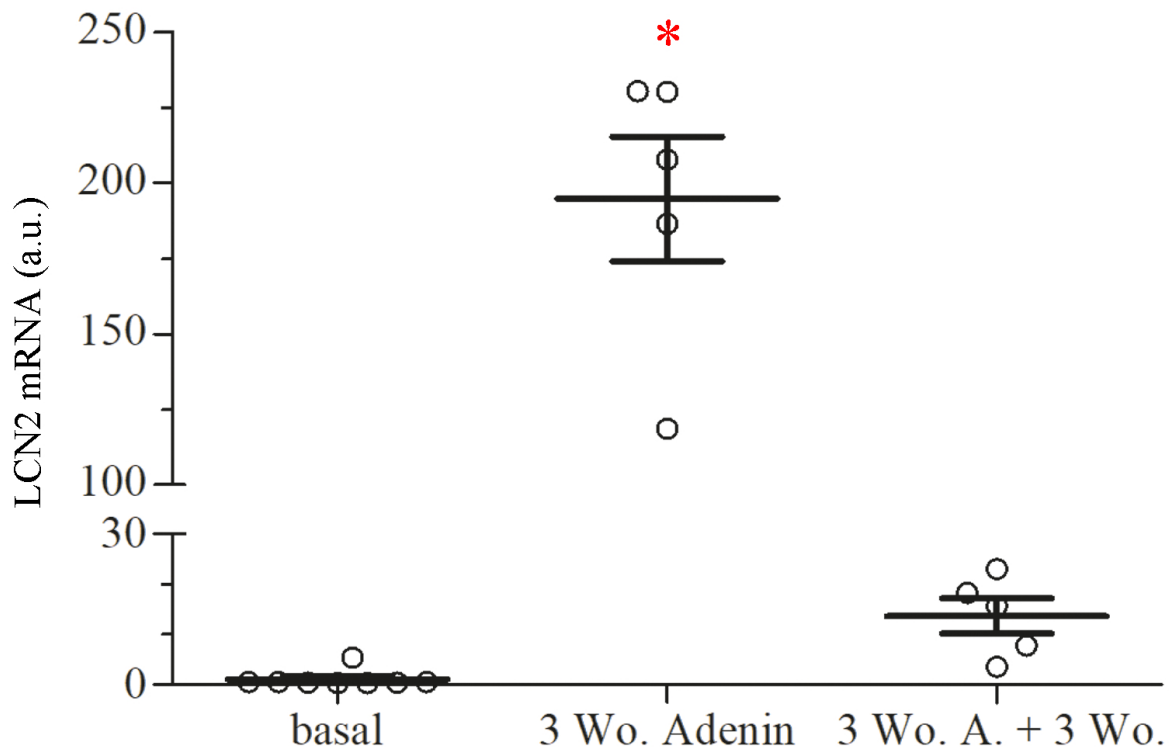


Abbildung 3.6: LCN2-mRNA im Verhältnis zur GAPDH-mRNA in der Niere basal, nach 3 Wochen Adenin und nach 3 Wochen Adenin + 3 Wochen Erholung (3 Wo. A. + 3 Wo.); dargestellt mit Mittelwert und SEM; * = nach 3 Wochen Adenin war die LCN2-mRNA in der Niere im Vergleich zur basalen Messung sowie zu der Messung nach 3 Wo. A. + 3 Wo. signifikant erhöht ($p \leq 0,01$); $n_{\text{basal}}=8$, $n_{\text{3 Wochen}}=5$, $n_{\text{3+3 Wochen}}=5$.

Diese Beobachtung konnte auch beim Nachweis der mRNA mittels in-situ-Hybridisierung bestätigt werden. Während basal nur eine geringe Menge an LCN2-mRNA nachweisbar war (Abbildung 3.7, links oben), konnte nach drei Wochen Adenin ein starkes Signal gefunden werden. Auffällig war jedoch die ungleiche Verteilung der Expression im Nierengewebe. Es wechselten sich Streifen mit starker und Streifen mit geringer LCN2-Expression ab. LCN2 wurde nach drei Wochen Adeningabe von der Rinde bis hin zur Nierenpapille exprimiert (Abbildung 3.7, Mitte oben). Nach einer dreiwöchigen Erholung verschwand das Signal größtenteils. Es blieben jedoch einige Segmente in der Niere bestehen, in denen LCN2 weiterhin exprimiert wurde. Diese Segmente wurden vor allem im Bereich der Rinde

und der Papille nachgewiesen. Die Niere wies nach drei Wochen Erholung morphologische Auffälligkeiten wie Einziehungen der Oberfläche und destruierte Tubuli im Schnittbild auf (Abbildung 3.7, rechts oben).

Es wurde eine Kohybridisierung mit Kollagen 1 als Fibrosemarker durchgeführt. Basal waren geringe Mengen an Kollagen-1-mRNA in der Niere nachweisbar. Kollagen 1 wurde vor allem im Umfeld großer Gefäße exprimiert (Abbildung 3.7, mittlere Reihe links). Nach drei Wochen Adenin stieg die Kollagen-1-Expression stark an. Dabei entsprachen die Kollagen-1-exprimierenden Areale den Bereichen, in denen nach drei Wochen Adenin LCN2 vermehrt exprimiert wurde (Abbildung 3.7, mittlere Reihe Mitte und Mitte unten). Ebenso wie die LCN2-Expression nahm auch die Kollagen-1-Expression nach dreiwöchiger Adeningabe und drei Wochen Erholung stark ab. Jedoch wurde Kollagen vor allem in der Rinde und in geringen Mengen im äußeren Mark exprimiert. Die betroffenen Bereiche in der Rinde und dem äußeren Mark deckten sich mit den LCN2-exprimierenden Arealen. Dagegen konnte in der Papille nach drei Wochen Adenin und drei Wochen Erholung kaum noch Kollagen-1-mRNA nachgewiesen werden, während die LCN2-Expression in der Papille erhöht blieb (Abbildung 3.7, mittlere Reihe rechts und rechts unten).

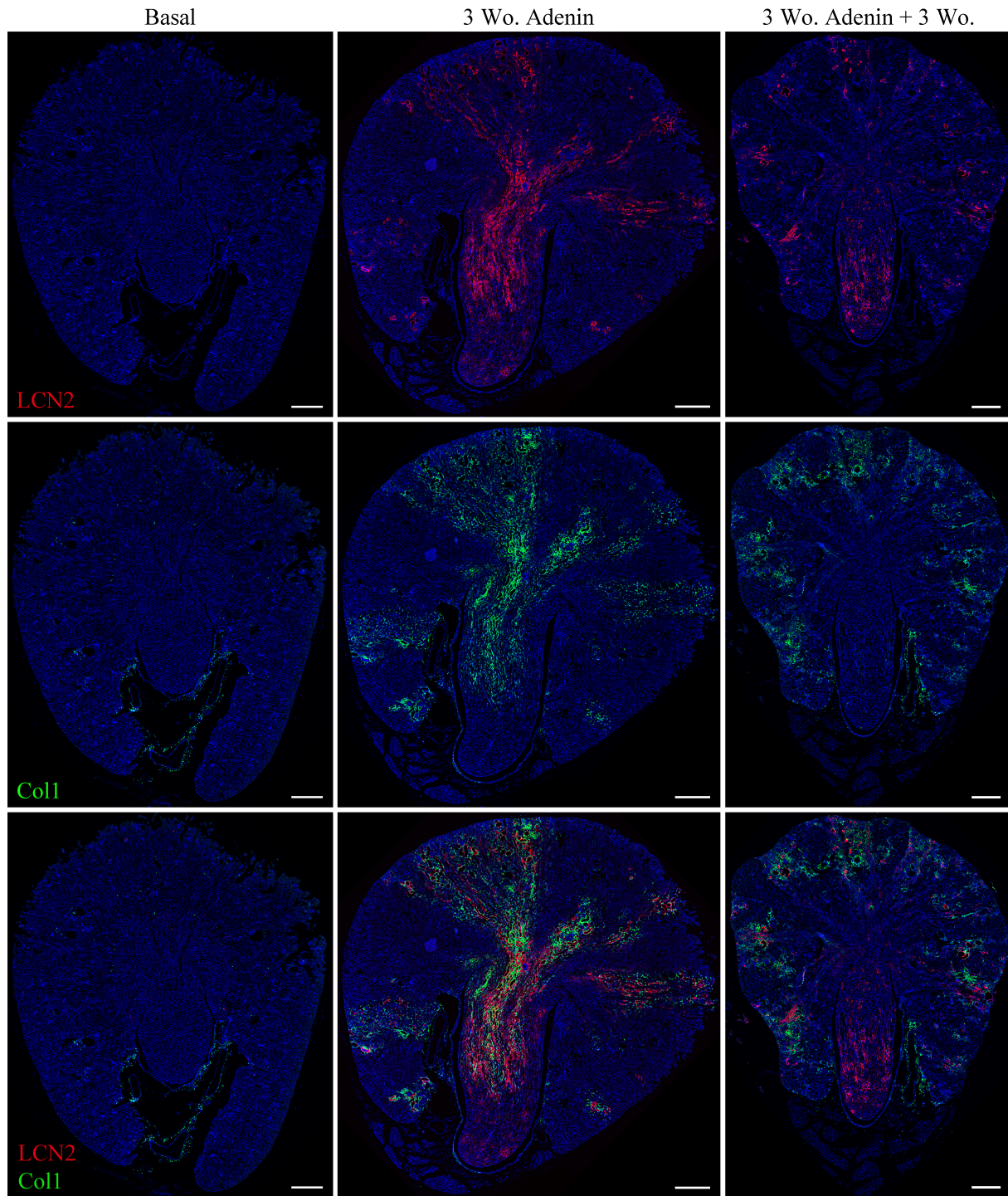


Abbildung 3.7: LCN2- (rot) und Kollagen-1-Expression (grün) basal (links), nach 3 Wochen Adenin (mittlere Spalte) und nach 3 Wochen Adenin + 3 Wochen Erholung (rechts) dargestellt mittels in-situ-Hybridisierung; es fiel eine starke LCN2- (oben) sowie Kollagen-1-Expression (mittlere Zeile) nach 3 Wochen auf mit anschließendem Rückgang der Expression; LCN2 und Kollagen 1 wurden nach 3 Wochen Adenin überwiegend in den gleichen Arealen exprimiert, nach der Erholung blieb die LCN2- im Gegensatz zur Kollagen-1-Expression in der Papille erhöht, beide Marker wurden weiterhin im Kortex exprimiert (unten); Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzbalken = 500 μm .

Um mehr Informationen darüber zu erhalten, inwiefern die LCN2-Expression im Zusammenhang mit dem Fortschreiten der Nierenschädigung steht, wurde die GFR im Verlauf ermittelt und mit den Ergebnissen der Proteinmessung in Urin und Plasma derselben Maus verglichen. Zur besseren Darstellung vom Verhältnis der Schädigung und des Anstiegs der Expression, wurden 2 männliche Tiere ausgewählt, welche sehr unterschiedlich stark auf die Adeningabe reagierten. Beispielhaft wurde der GFR-Verlauf eines Tieres (Maus 1) mit starker Reaktion auf die Zugabe von Adenin dargestellt. Ausgehend von einer mittleren basalen GFR von $1142 \mu\text{l}/\text{min} * 100\text{gKG}$ sank die GFR nach 3 Wochen Adeninfütterung auf einen Wert von $196 \mu\text{l}/\text{min} * 100\text{gKG}$. Nach den 3 Wochen Erholung betrug die GFR $513 \mu\text{l}/\text{min} * 100\text{gKG}$. Dem wurde ein Tier (Maus 2) gegenübergestellt, welches nur einen geringfügigen Schaden durch das Adeninfutter erfuhr. Dieses startete mit einer ähnlichen GFR wie Maus 1 ($1223 \mu\text{l}/\text{min} * 100\text{gKG}$), die GFR fiel jedoch deutlich weniger stark ab und erreichte ein Minimum von $514 \mu\text{l}/\text{min} * 100\text{gKG}$ nach 3 Wochen Adenin. Danach erholte sich die Nierenfunktion weitestgehend und erreichte mit $1110 \mu\text{l}/\text{min} * 100\text{gKG}$ einen Wert nahe dem Ausgangswert.

Die Bestimmung der LCN2-Proteinkonzentration ergab unter basalen Bedingungen im Mittel 250 ng/ml im Plasma und $26,7 \text{ ng/ml}$ im Urin. Bei Maus 1 stieg die Plasma-LCN2-Konzentration in den ersten beiden Wochen deutlich an und erreichte in der 2. Woche des Experiments mit 2620 ng/ml das 100-fache des basalen Wertes. Parallel dazu erreichte die GFR in derselben Woche ihr Minimum. Trotz weiterer Adeningabe konnte bei diesem Tier kein weiterer Anstieg der LCN2-Konzentration im Plasma detektiert werden. Im Gegenteil war sogar eine Abnahme auf 1700 ng/ml in der dritten Versuchswoche zu beobachten. Bei der GFR-Messung war keine Verschlechterung festzustellen. Während der drei-wöchigen Erholungsphase konnte eine kontinuierliche Abnahme der LCN2-Konzentration detektiert werden. Die GFR nahm zeitgleich stetig zu. Am Ende des Experiments lag die LCN2-Konzentration im Plasma bei 444 ng/ml .

Der LCN2-Gehalt im Urin zeigte einen ähnlichen Verlauf, jedoch auf einem niedrigeren Level. Der Anstieg der Proteinkonzentration verlief etwas verzögert, sodass das Maximum mit 800 ng/ml erst in der 3. Versuchswoche erreicht wurde. In den drei Wochen der Erholung sank die LCN2-Konzentration des Urins wieder ab und näherte sich dem basalen Wert wieder an. Die Endkonzentration betrug 63 ng/ml und unterschied sich somit nicht nennenswert vom basalen Wert von 29 ng/ml .

Bei Maus 2 stieg der LCN2-Gehalt des Plasmas in der ersten Woche auf das 2,5-fache des Ausgangswertes an (494 ng/ml) und fiel anschließend trotz weiterer Adeningabe stetig ab. Bereits nach zwei Wochen Erholung lag die LCN2-Konzentration im Plasma wieder im basalen Bereich. Der GFR-Verlauf passt gut zu den Messungen der LCN2-Konzentration.

Im Urin konnte eine geringe Zunahme des LCN2-Gehaltes beobachtet werden, welche bis zur 2. Woche anhielt. In der dritten Woche nahm die LCN2-Konzentration deutlich ab. Anschließend stieg in der vierten Woche die LCN2-Konzentration erneut an und erreichte mit 204 ng/ml ihr Maximum. In den beiden folgenden Wochen nahm der LCN2-Gehalt wieder ab und erreichte mit einer Endkonzentration von 31 ng/ml den basalen Bereich (Abbildung 3.8).

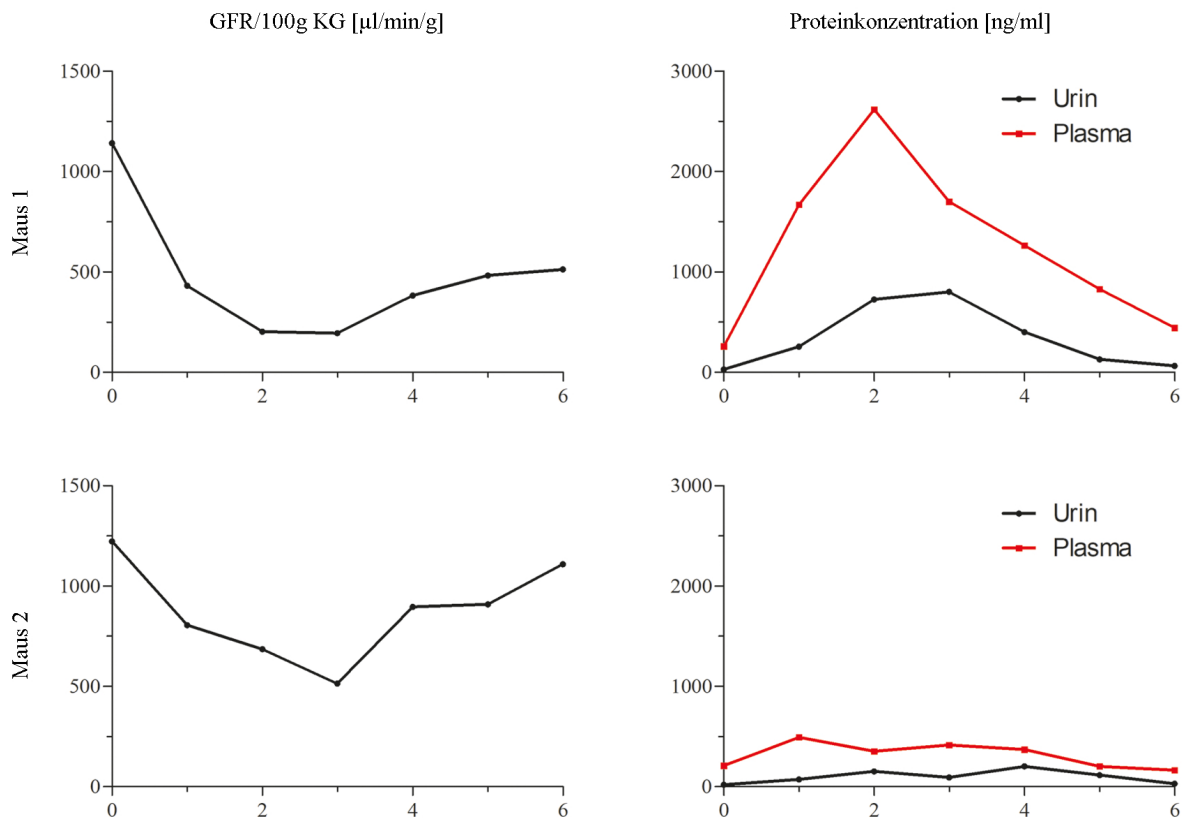


Abbildung 3.8: Gegenüberstellung der GFR (links) und der Proteinkonzentration von LCN2 im Urin und Plasma (rechts); 0 = basal, in Woche 1-3 erfolgte die Adeningabe, die Wochen 4-6 dienten der Erholung; für die GFR wurden 2 basale Werte verwendet und jeweils der Mittelwert dargestellt.

Um die Expressionsorte von LCN2 nach Adenin-induzierter Nephropathie genauer lokalisieren zu können, wurden weitere Kohybridisierungen von LCN2 mit spezifischen Tubulusmarkern angefertigt. Die in-situ-Hybridisierung zeigte, dass LCN2 basal im Bereich des Innenstreifens der äußeren Medulla und in der Papille exprimiert wurde (Abbildung 3.2). Nach drei Wochen Adenin fiel neben einem starken Anstieg der Expression in den AQP2-positiven Zellen der Sammelrohre und den NKCC2-positiven Zellen der distalen Tubuli auch eine Ausweitung der LCN2-Expression bis in kapselnahe Bereiche der Rinde

auf. Nach dreiwöchiger Erholung konnten immer noch LCN2-positive Tubuli in der Rinde dargestellt werden. Auch nach drei Wochen Erholung war die LCN2-Expression höher als basal (Abbildung 3.7).

Eine Koexpression von LCN2 und Megalin konnte weder basal, noch nach dreiwöchiger Adeningabe, noch nach drei Wochen Erholung nachgewiesen werden. Es fiel eine Abnahme der Megalin-Expression nach drei Wochen Adenin insbesondere in der Umgebung LCN2-positiver Tubuli auf. Nach drei Wochen Erholung nahm die Megalin-Expression wieder zu, jedoch blieben Segmente mit erniedrigter Megalin-Expression (Abbildung 3.9, oben).

Bereits basal konnte eine Koexpression von NKCC2 mit LCN2 nachgewiesen werden (Abbildung 3.2, A). Die Menge der Tubuli, welche sowohl NKCC2 als auch LCN2 exprimierten, schien jedoch nach drei Wochen Adeningabe erheblich zuzunehmen. Auch nach den zusätzlichen drei Wochen der Erholung waren noch viele NKCC2-positive Tubuli zu finden, in denen auch LCN2-mRNA nachweisbar war (Abbildung 3.9, Mitte).

Während LCN2 basal überwiegend in AQP2-positiven Sammelrohren detektiert wurde (Abbildung 3.2, B), konnten nach dreiwöchiger Adeningabe nur wenige Sammelrohre dargestellt werden, in denen sowohl LCN2 als auch AQP2 exprimiert wurde. Zwar nahm die Expression von LCN2 in der Papille und im Innenstreifen der äußeren Medulla stark zu, jedoch gab es einen starken Rückgang der AQP2-Expression. Auch nach den drei Erholungswochen gab es nur wenige Sammelrohre, welche sowohl AQP2- als auch LCN2-mRNA enthielten. Im Vergleich zum Befund nach drei Wochen Adenin stieg die AQP2-Expression an, sie blieb jedoch auf einem deutlich niedrigeren Niveau als in der basalen Niere. Zeitgleich kam es zu einer Abnahme der LCN2-Expression, sodass am Ende des Experiments kaum noch eine Koexpression von LCN2 und AQP2 nachweisbar war (Abbildung 3.9, unten).

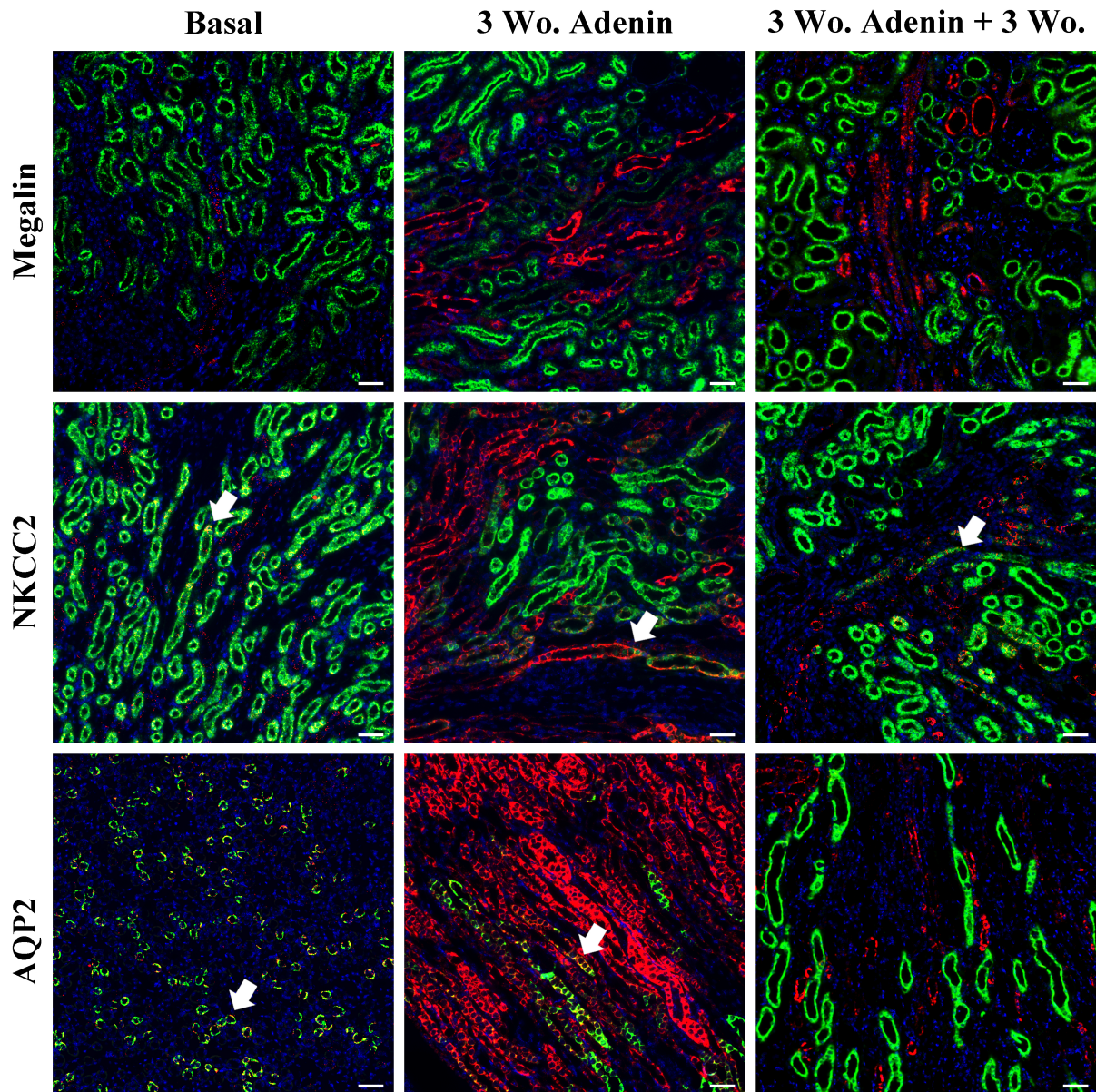


Abbildung 3.9: LCN2-Expression (rot) basal (linke Spalte), nach 3 Wochen Adenin (mittlere Spalte) und nach 3 Wochen Adenin + 3 Wochen Erholung (rechte Spalte) dargestellt mittels in-situ-Hybridisierung; in der oberen Reihe Kohybridisierung mit Megalin (grün), in der 2. Reihe mit NKCC2 (grün), in der 3. mit AQP2 (grün), Pfeile markieren Koexpression; Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzbalken = 50 μ m.

Um zu überprüfen, ob die in der Niere exprimierte LCN2-mRNA auch in Proteine übersetzt wurde, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zur Verdeutlichung des Nierenschadens wurde als Fibrosemarker Kollagen 1 mit angefärbt. Basal konnte nur eine geringe Menge an LCN2- und Kollagen 1-Protein detektiert werden (Abbildung 3.10, linke Spalte).

Nach drei Wochen Adeninfütterung zeigte sich eine deutliche Zunahme des LCN2-Proteins in der Niere. Dieses wies eine sehr ähnliche Verteilung auf, wie sie bereits in in-situ-

Hybridisierungen für die LCN2-mRNA festgestellt werden konnte (Abbildung 3.7). In der Übersicht konnten streifenartige Regionen mit hoher Dichte an LCN2-positiven Tubuli detektiert werden, welche sich mit Regionen mit niedriger Dichte abwechselten. Die Regionen mit hoher LCN2-Konzentration entsprachen den Bereichen in denen auch Kollagen 1 vermehrt nachgewiesen wurde. LCN2 konnte vom Kortex bis zur Papille in allen Zonen des Organs nachgewiesen werden. Hierbei fiel eine besonders hohe Menge an LCN2-Protein in der Rinde und der äußeren Medulla auf. Die LCN2-Ablagerungen fanden sich im Epithel der Tubuli und der Sammelrohre. In der Übersicht konnte nach dreiwöchiger Adeningabe bereits ein Anstieg der Kollagen-1-Expression dargestellt werden. Kollagen 1 wurde vor allem in der Papille detektiert (Abbildung 3.10, mittlere Spalte).

Am Ende der dreiwöchigen Erholungsphase fiel einerseits ein starker Rückgang der Dichte LCN2-positiver Tubuli andererseits eine deutliche Steigerung der Kollagen-1-Proteinablagerung auf. LCN2 ließ sich vor allem in der Rinde und im äußeren Mark nachweisen. Im Innenstreifen der äußeren Medulla und der Papille stellte sich hingegen ein besonders starker Rückgang der Proteinmenge dar. Kollagen 1 konnte von der Papille bis hin zur Rinde in allen Abschnitten nachgewiesen werden. Bei der Verteilung von Kollagen 1 fiel auf, dass es sowohl Bereiche ohne Proteinablagerung, Bereiche mit mittlerer sowie Abschnitte mit besonders starker Proteinablagerung gab. Die Bereiche mit mittlerer bis starker Proteinablagerung deckten sich in der Rinde und dem äußeren Mark mit denen, welche noch vermehrt LCN2-Protein enthielten. Die Abschnitte mit besonders hoher Kollagen-1-Dichte imponierten durch destruierte Tubuli (Abbildung 3.10, rechte Spalte).

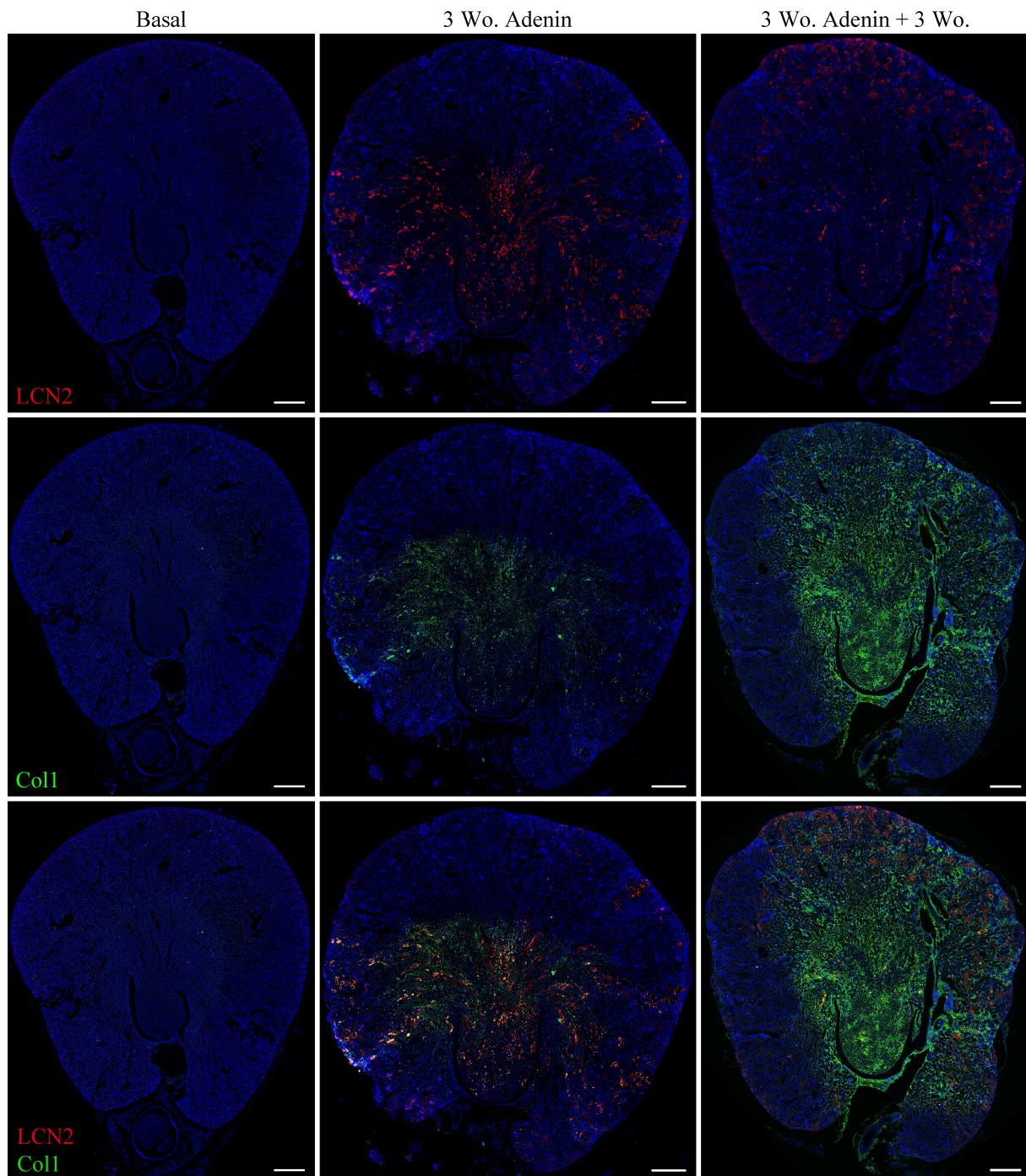


Abbildung 3.10: LCN2-Proteinfärbung am Nierenschnitt mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung; Kofärbung von LCN2 (rot) mit Kollagen 1 (grün); oben: LCN2; mittlere Reihe: Kollagen 1; unten: LCN2 mit Kollagen 1; basal waren kaum LCN2 und Kollagen 1 nachweisbar (linke Spalte); nach 3 Wochen stieg der LCN2-Gehalt stark an, auch Kollagen 1 wurde vermehrt exprimiert (mittlere Spalte); nach der Erholungszeit von 3 Wochen wurde ein Rückgang der LCN2-Expression, bei zeitgleichem Anstieg der Kollagen-1-Expression, detektiert (rechte Spalte); Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzballen = 500 μm .

Bei stärkerer Vergroerung konnte beobachtet werden, dass bereits nach drei Wochen Adenin Kollagen 1 vermehrt produziert wurde. Weiterhin konnte LCN2-Protein in den Tubuluszellen nachgewiesen werden, welches in den apikalen Bereichen der Tubulusepithelzellen vermehrt detektiert werden konnte (Abbildung 3.11, A). Nach drei Wochen der Erholung konnte eine deutlich intensivierte interstitielle Ablagerung von Kollagen 1 beobachtet werden. Die Menge an LCN2 nahm hingegen ab (Abbildung 3.11, B).

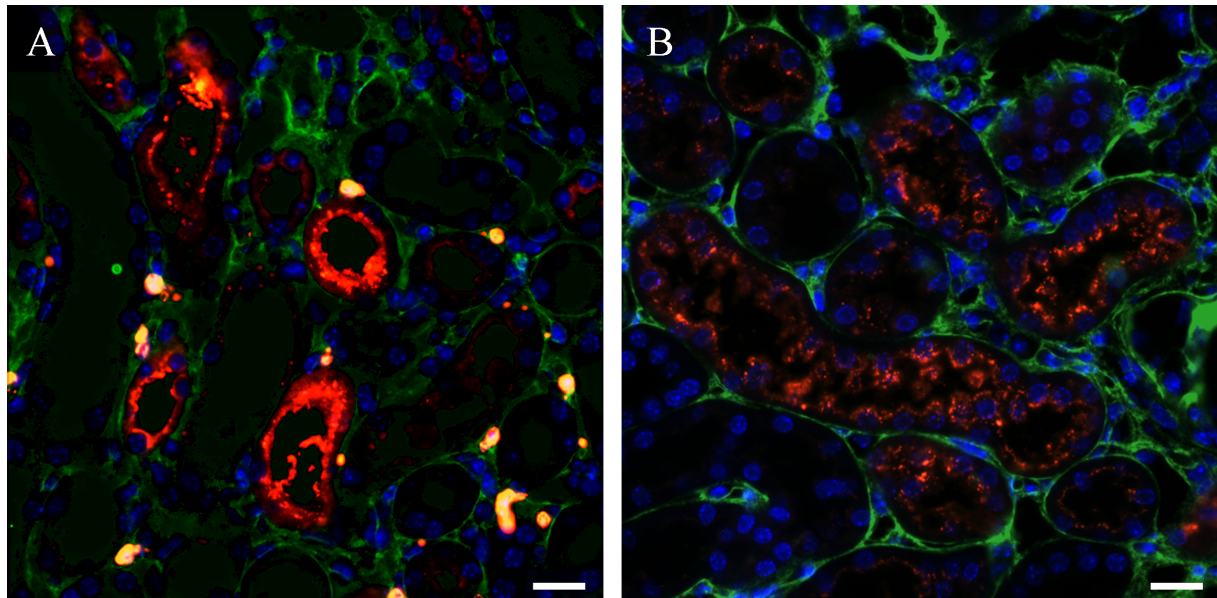


Abbildung 3.11: LCN2-Proteinfärbung am Nierenschnitt mithilfe von Immunfluoreszenzfärbung; Kofrbung von LCN2 (rot) mit Kollagen 1 (grün); die Detailbilder zeigen die Veränderung der Expression in der äußeren Medulla nach 3 Wochen Adenin (A) und 3 Wochen Adenin + 3 Wochen Erholung (B); Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzbalken = 20 μ m.

3.3.2 Auswirkungen der Adeninfütterung auf die LCN2-Expression in der Leber und der Lunge

Da unter Kontrollbedingungen in der Lunge und der Leber LCN2-mRNA nachweisbar war (Abbildung 3.1), wurden Schnitte aus der Leber und der Lunge basal, nach drei Wochen Adenin sowie nach zusätzlichen drei Wochen der Erholung mithilfe der RNAscope[®]-Methode untersucht, um mögliche Änderungen der Expression im Versuchsverlauf detektieren zu können. Es wurde für die Lunge eine Kohybridisierung mit Kollagen 1 als Fibrosemarker und für die Leber eine Kohybridisierung mit CD31 zur Darstellung von Endothelzellen gewählt.

Die LCN2-Expression in den Leberschnitten konnte in einzelnen Hepatozyten oder kleinen Gruppen aus drei bis fünf Hepatozyten detektiert werden. Dabei konnte keine eindeutige Zuordnung zu den funktionellen Zonen der Leber erfolgen. Die LCN2 positiven Hepa-

tozyten befinden sich sowohl in der direkten Umgebung der Periportalfelder als auch in der Umgebung der Zentralvenen. Eine Häufung in einem bestimmten Gebiet konnte nicht festgestellt. Des Weiteren konnte keine Veränderung der LCN2-mRNA-Expression im Versuchsverlauf in der Leber nachgewiesen werden (Abbildung 3.12, oben).

In der Lunge konnten mit der RNAscope®-Methode interindividuell deutliche Unterschiede in der Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.1). Deshalb wurde versucht möglichst repräsentative Schnitte darzustellen. LCN2-mRNA konnte in der Lunge einerseits in Zellen des respiratorischen Epithels gefunden werden. Diese lagen meist in Gruppen von ≥ 10 Zellen vor und kleideten kleine Wandabschnitte der Bronchioli aus. Andererseits konnten interstitielle Zellen gefunden werden, welche, meist verstreut liegend, LCN2 exprimierten. Ebenso wie bei der Leber konnte keine Veränderung der LCN2-Expression im zeitlichen Verlauf des Versuches festgestellt werden (Abbildung 3.12, unten).

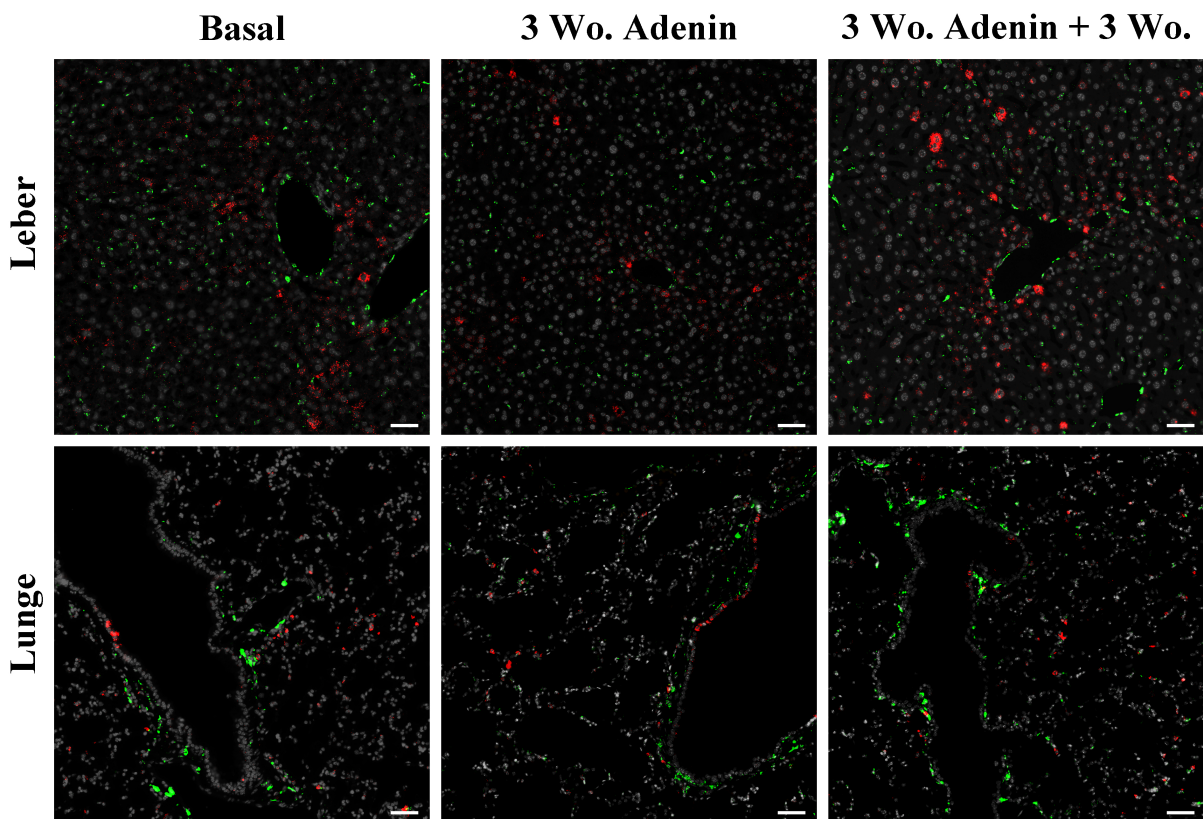


Abbildung 3.12: LCN2-mRNA (rot) in der Leber und der Lunge; links = basal, Mitte = 3 Wochen Adenin, rechts = 3 Wochen Adenin + 3 Wochen Erholung; oben = Leberschnitte mit einer Kohybridisierung von CD31 (grün), unten = Lungenschnitte mit einer Kohybridisierung von Kollagen 1 (grün); Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (grau); Referenzbalken = 50 μm .

3.3.3 Auswirkungen der Adeninfütterung auf die renale KIM1-Expression

Die KIM1-Expression wurde basal, nach drei Wochen Adenin sowie nach dreiwöchiger Adeningabe und anschließender Erholungsphase mittels qPCR analysiert. Hierbei fiel ein starker Anstieg der KIM1-Expression auf das 15,5-fache des basalen Wertes nach drei Wochen Adenin auf. Nach drei Wochen Adenin und dreiwöchiger Erholung lag die KIM1-Expression wieder auf dem basalen Niveau (Abbildung 3.13).

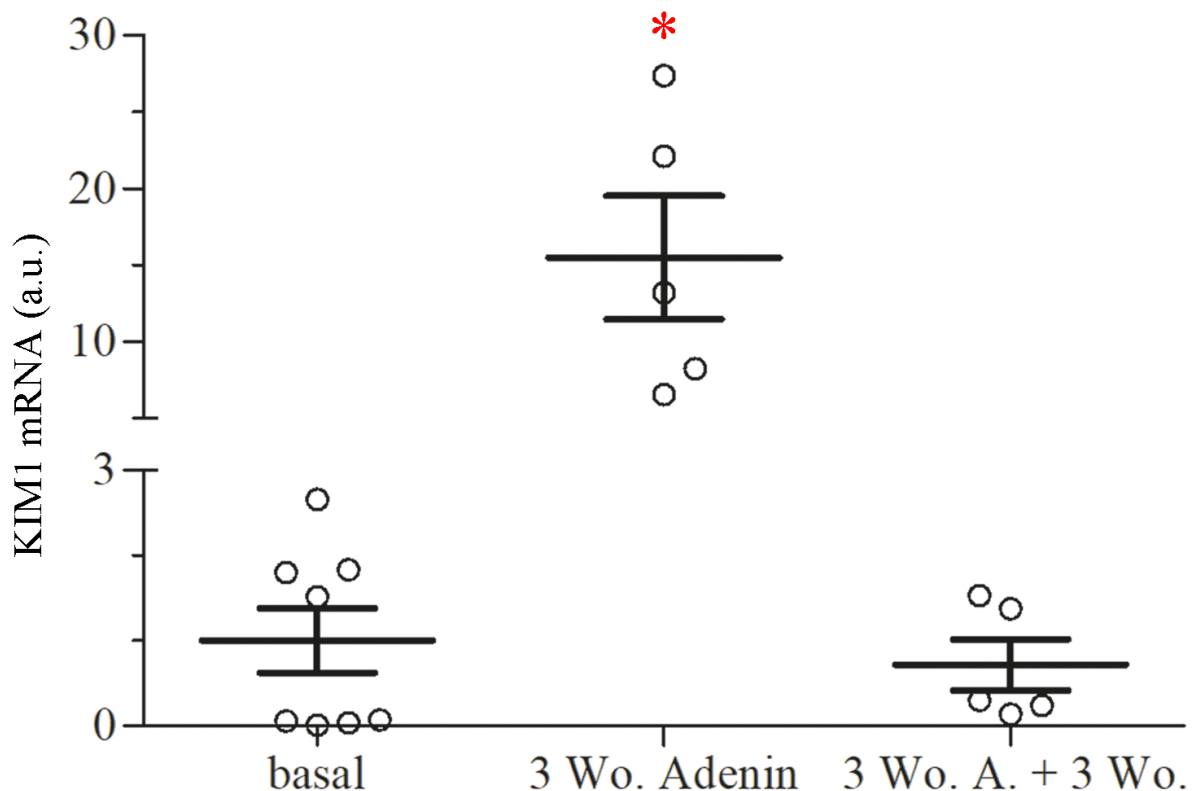


Abbildung 3.13: KIM1-mRNA im Verhältnis zur GAPDH-mRNA in der Niere basal, nach 3 Wochen Adenin sowie nach 3 Wochen Adenin und 3 Wochen Erholung; dargestellt mit Mittelwert und SEM; * = nach 3 Wochen Adenin war die KIM1-mRNA/GAPDH-mRNA in der Niere im Vergleich zur basalen Messung sowie zu der Messung nach 3 Wo. A. + 3 Wo. signifikant erhöht ($p \leq 0,01$); $n_{\text{basal}}=8$, $n_{3 \text{ Wochen}}=5$, $n_{3+3 \text{ Wochen}}=5$.

Diese Beobachtung konnte auch beim Nachweis der mRNA per in-situ-Hybridisierung gemacht werden. Während basal kaum KIM1-mRNA in der Nierenübersicht detektierbar war (Abbildung 3.14, links oben; Details in Abbildung 3.16), zeigte sich nach dreiwöchiger Adeningabe eine deutliche KIM1-mRNA-Expression. Auffällig war jedoch die ungleiche Verteilung der Expression über den Querschnitt der Niere. Während in der Papille und dem inneren Mark keine KIM1-Expression nachgewiesen werden konnte, fanden sich in der Rinde und besonders in der äußeren Medulla größere Mengen an KIM1-mRNA (Abbildung 3.14, Mitte oben). Nach zusätzlichen drei Wochen der Erholung konnten nur noch

geringe Mengen an KIM1-mRNA nachgewiesen werden. Diese stellten sich vor allem im Bereich der äußeren Medulla und den tiefen Rindenbereichen dar. Hierbei fielen vor allem die S3-Segmente der proximalen Tubuli durch eine noch erhöhte KIM1-Expression auf (Abbildung 3.14, rechts oben).

Es wurde eine Kohybridisierung mit Kollagen 1 als Fibrosemarker durchgeführt. Basal waren geringe Mengen an Kollagen-1-mRNA in der Niere nachweisbar. Kollagen 1 wurde vor allem im Umfeld großer Gefäße exprimiert (Abbildung 3.14, mittlere Reihe links). Nach drei Wochen Adenin stieg die Kollagen-1-Expression stark an. Dabei entsprachen die Kollagen-1-exprimierenden Bereiche der Rinde und des Außenstreifens der äußeren Medulla den Bereichen, in denen nach dreiwöchiger Adeningabe KIM1 exprimiert wurde (Abbildung 3.14; mittlere Reihe Mitte und Mitte unten). Ebenso wie die KIM1-Expression nahm auch die Kollagen-1-Expression nach drei Wochen Adenin und drei Wochen Erholung stark ab. Die Kollagen-1-exprimierenden Bereiche in der Rinde und dem Außenstreifen des äußeren Marks deckten sich mit den KIM-exprimierenden Segmenten (Abbildung 3.14, mittlere Reihe rechts und rechts unten).

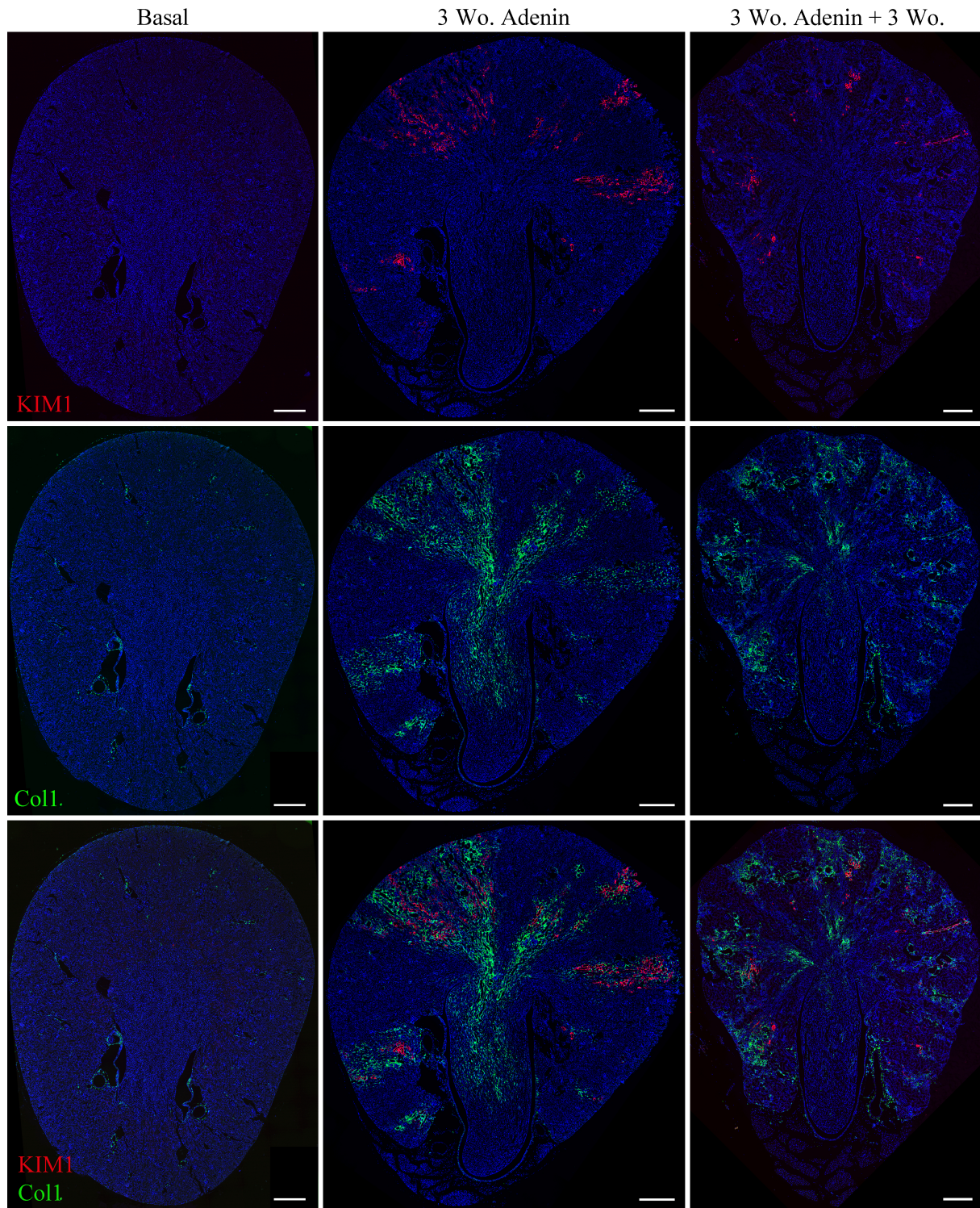


Abbildung 3.14: KIM1- (rot) und Kollagen-1-Expression (grün) basal (links), nach 3 Wochen Adenin (mittlere Spalte) und nach 3 Wochen Adenin + 3 Wochen Erholung (rechts) dargestellt mittels in-situ-Hybridisierung; es fiel eine starke KIM1-Expression nach 3 Wochen auf mit anschließendem Rückgang der Expression (oben); die Kollagen-1-Expression stieg nach 3 Wochen Adenin an und fiel dann wieder ab (mittlere Reihe); KIM1 wurde vor allem in Kollagen-1-exprimierenden Arealen exprimiert (unten); Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzbalken = 500 µm.

Ebenso wie bei LCN2 wurden die Ergebnisse der KIM1-Proteinmessung im Plasma sowie Urin den entsprechenden GFR-Werten gegenübergestellt. Es wurden die Werte der selben Tiere wie bei LCN2 dargestellt. Die beiden Tiere wurden aufgrund ihrer sich stark in der Intensität unterscheidenden Reaktion auf die Adeningabe ausgewählt. Bereits in Abbildung 3.5 wird ersichtlich, dass die GFR in den Wochen der Adeningabe abnahm, wobei die Abnahme nach und nach geringer wurde. Anschließend nahm die GFR während der dreiwöchigen Erholung wieder zu und näherte sich dabei langsam einer End-GFR an, welche unter der Anfangs-GFR lag.

Betrachtet man die Proteinmessung bei Maus 1 und 2 für KIM1 fällt als erstes ins Auge, dass im Urin basal KIM1 nachweisbar war (zwischen 0,05 und 0,5 ng/ml), während im Plasma die KIM1-Konzentration basal unterhalb der Nachweisgrenze lag. Im Gegensatz zu LCN2 konnten bei KIM1 deutlich höhere Konzentrationen im Urin als im Plasma nachgewiesen werden. Bei Maus 1 betrug die KIM1-Konzentration im Urin basal 0,5 ng/ml. Diese stieg in den ersten beiden Wochen steil an und erreichte in der 2. Woche des Experiments ihr Maximum mit 36,1 ng/ml. Dementsprechend erreichte auch die GFR ihr Minimum in dieser Woche. Bereits in der dritten Versuchswoche war ein leichter Abfall der Konzentration zu beobachten, während sich die GFR im Vergleich zur Vorwoche kaum änderte. In der 4. und 5. Versuchswoche nahm der KIM1-Gehalt des Urins stark ab und erreichte schon in der 5. Woche basale Werte. Im Plasma wurde nach einer Woche Adenin ein KIM1-Gehalt von 2 ng/ml erreicht. Bereits in der 3. Versuchswoche nahm die Konzentration um 25 % im Vergleich zur 1. Woche ab. Während der Erholungsphase konnte ein relativ schneller Rückgang beobachtet werden. Die Endkonzentration betrug 0,1 ng/ml.

Bei Maus 2 wurde im Urin eine Ausgangskonzentration von 0,05 ng/ml gemessen. Trotz starkem Abfall der GFR um knapp 35 % in der ersten Woche konnte kein Anstieg der KIM1-Konzentration beobachtet werden. In der 2. und 3. Woche wurde ein Anstieg des KIM1-Gehaltes detektiert. Es wurde dabei ein Maximum von 2,2 ng/ml erreicht, welches damit deutlich unter dem Maximum von Maus 1 lag (36,1 ng/ml). In der vierten und fünften Woche des Versuchs sank die KIM1-Konzentration wieder ab. In der 5. Woche wurde noch ein leicht erhöhter Wert detektiert (0,14 ng/ml). In der letzten Woche konnten keine erhöhten Werte mehr festgestellt werden. Signifikante Veränderungen der Plasma-KIM1-Konzentration konnten bei Maus 2 nicht nachgewiesen werden. Im gesamten Versuchsverlauf wurden im Plasma Konzentrationen zwischen 0,065 und 0,045 ng/ml detektiert (Abbildung 3.15).

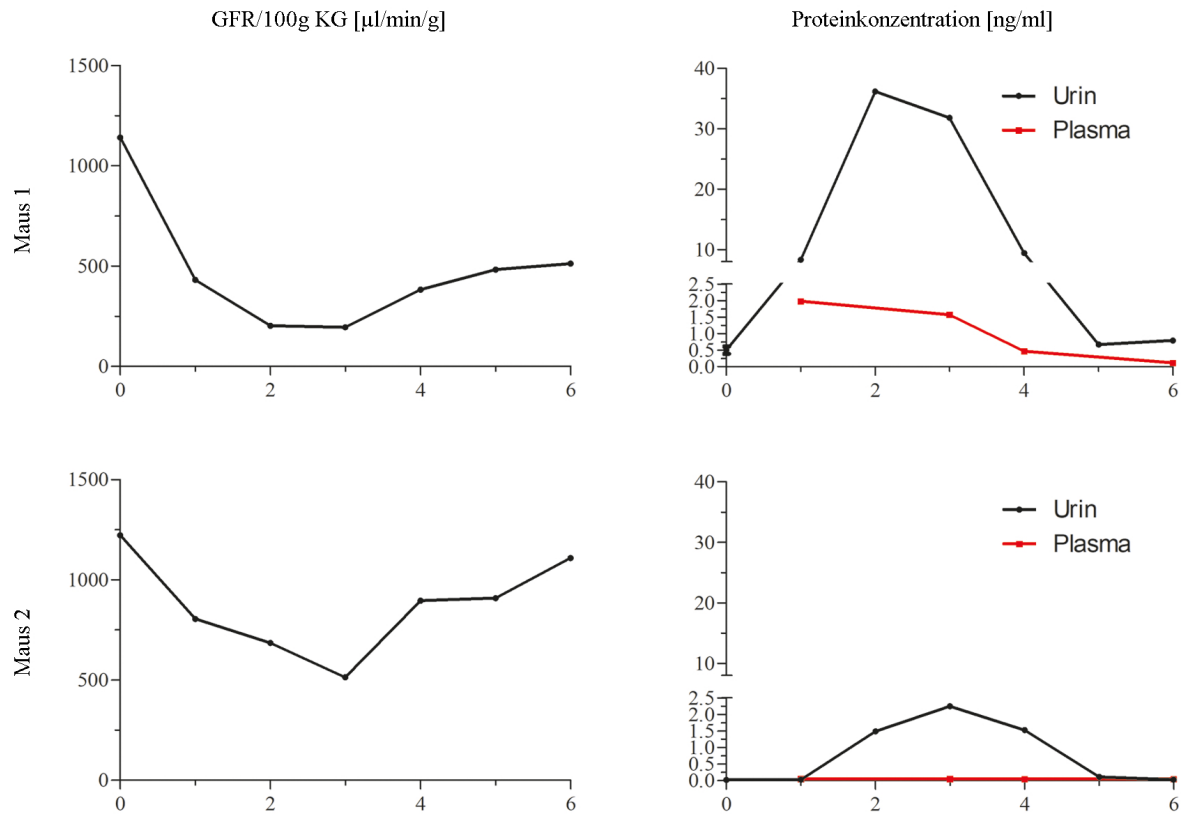


Abbildung 3.15: KIM1-Protein-Nachweis mittels ELISA in Urin und Plasma dargestellt im zeitlichen Verlauf; 0 = basal, in Woche 1-3 erfolgte die Adeningabe, Woche 4-6 dienten der Erholung; Darstellung von 2 Tieren: links GFR-Verlauf, rechts Protein-Messung der entsprechenden Maus; für die GFR wurden 2 basale Werte verwendet und der Mittelwert dargestellt; im Plasma konnte basal mithilfe des ELISAs aufgrund der geringen Konzentration kein Protein nachgewiesen werden.

Zur Identifizierung der KIM1 exprimierenden Zellen in der Niere wurden verschiedene Kohybridisierungen von KIM1 mit spezifischen Tubulusmarkern angefertigt. Die in-situ-Hybridisierungen zeigten, dass KIM1 unter Kontrollbedingungen in der äußeren Medulla und der Rinde exprimiert wurde. Im inneren Mark und in der Papille konnte KIM1 nicht nachgewiesen werden. Die unter Kontrollbedingungen nachweisbare KIM1-mRNA wurde in Megalin-positiven Tubulusepithelzellen nachgewiesen. Diese befanden sich überwiegend im Bereich des äußeren Marks und zu einem geringen Anteil in tiefen Rindenbereichen. Eine Koexpression mit NKCC2 oder AQP2 konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 3.16, links).

Nach drei Wochen Adeninfütterung konnte eine starke Zunahme der KIM1-Expression beobachtet werden. Jedoch konnte KIM1 auch nach der dreiwöchigen Adeningabe nur in

der Rinde und dem äußeren Mark nachgewiesen werden. Eine Koexpression mit Megalin konnte dargestellt werden. Hingegen lag keine Koexpression mit NKCC2 oder AQP2 vor (Abbildung 3.16, Mitte).

Nach den drei Wochen der Erholung stellte sich ein starker Rückgang der KIM1-mRNA dar. Während die Expression von Megalin, NKCC2 und AQP2 im Vergleich zur Situation nach 3 Wochen Adenin wieder leicht zunahm, fielen vereinzelt Tubuli auf, welche lediglich KIM1, jedoch keine typischen funktionellen Marker exprimierten. Eine Koexpression von KIM1 konnte auch nach der Erholungsphase nur mit Megalin bestätigt werden (Abbildung 3.16, rechts). Insgesamt blieb bis zum Ende der Beobachtung die KIM1-Expression leicht erhöht.

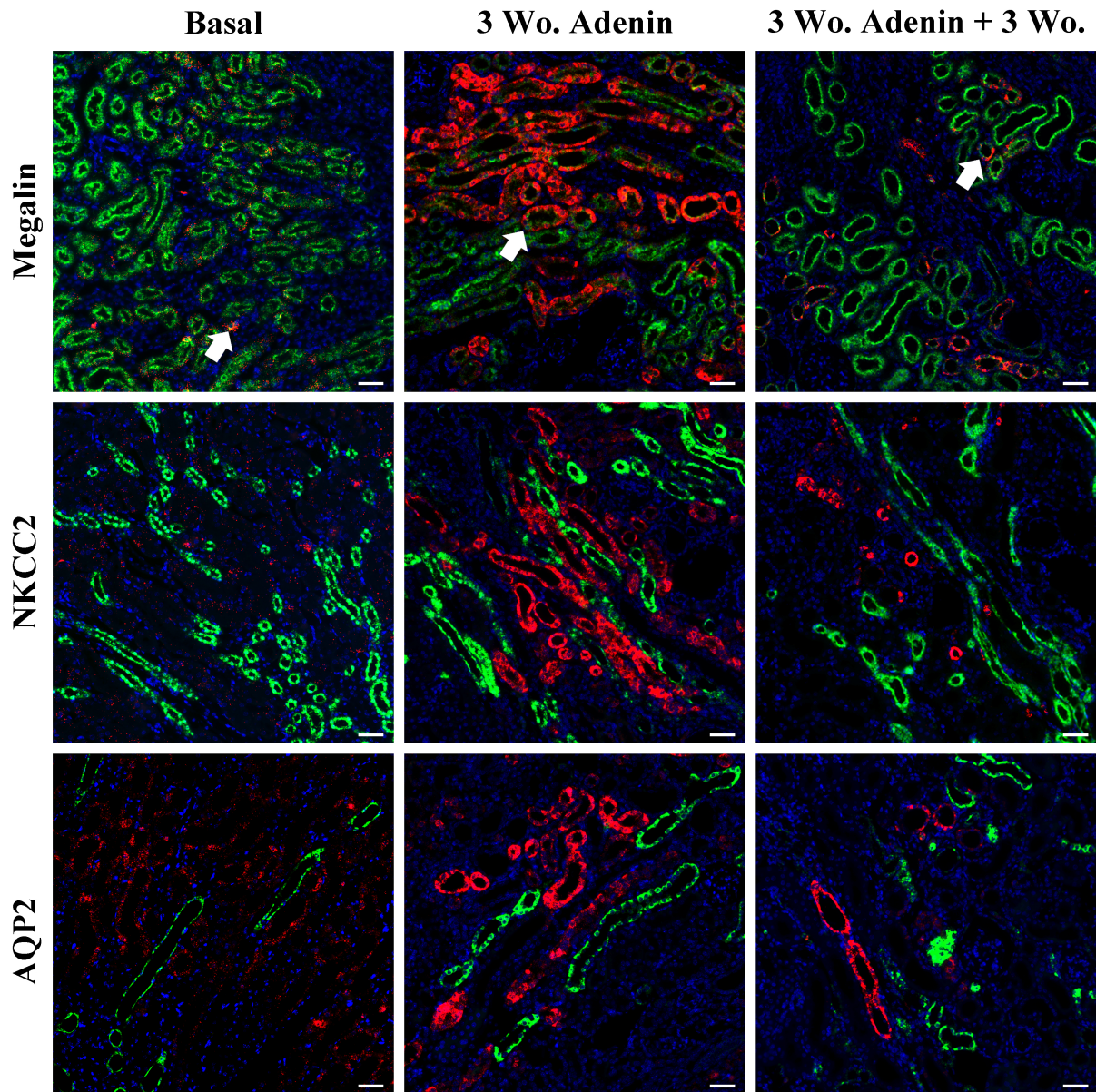


Abbildung 3.16: KIM1-Expression (rot) basal (linke Spalte), nach 3 Wochen Adenin (mittlere Spalte) und nach 3 Wochen Adenin + 3 Wochen Erholung (rechte Spalte) dargestellt mittels in-situ-Hybridisierung; in der oberen Reihe Kohybridisierung mit Megalin (grün), in der 2. Reihe mit NKCC2 (grün), in der 3. mit AQP2(grün); dargestellt sind Detailaufnahmen aus dem äußeren Mark und der Rinde, Pfeile markieren Koexpression; Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzbalken = 50 μ m.

3.3.4 Koexpression von LCN2 mit KIM1

In Kohybridisierungen von LCN2 mit KIM1 konnten Tubulusabschnitte gefunden werden, welche KIM1 und LCN2 exprimierten. Diese befanden sich im Bereich der Rinde und dem äußeren Mark. Es wurde versucht die betroffenen Tubulusabschnitte mithilfe von Kohybridisierungen mit verschiedenen spezifischen Tubulusmarkern (verwendet wurden Megalin, NKCC2, AQP2 und SGLT1) genauer identifizieren zu können. Dies gelang jedoch nicht, da die betroffenen Tubulusabschnitte keine spezifischen Tubulusmarker exprimierten. Tubuli, die KIM1 und LCN2 koexprimierten, stellten sich vor allem nach drei Wochen Adeningabe dar (Abbildung 3.17).

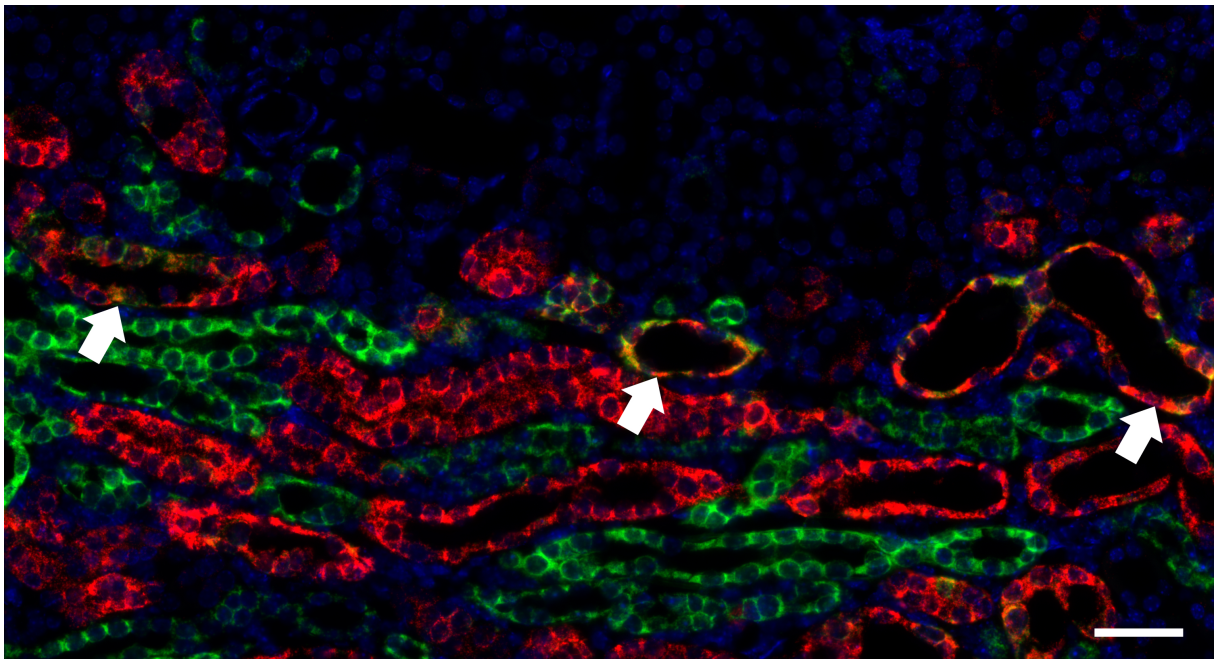


Abbildung 3.17: Koexpression von KIM1 (rot) und LCN2 (grün) dargestellt mittels in-situ-Hybridisierung; Ausschnitt aus dem Grenzbereich zwischen äußerem Mark und Rinde nach 3 Wochen Adenin; Pfeile zeigen Tubuli mit Koexpression von LCN2 und KIM1; Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau); Referenzbalken = 50 μ m.

4 Diskussion

In verschiedenen Studien erwiesen sich sowohl LCN2 [84] als auch KIM1 [60] als vielversprechende Biomarker für den akuten Nierenschaden. Bei der CKD könnte die Expression von LCN2 bei der Begrenzung des tubulären Schadens mitwirken. Welche genaue Rolle LCN2 bei renalen Schäden spielt, ist jedoch noch ungeklärt [114]. Ebenso steht auch ein eindeutiger Nachweis eines Zusammenhangs zwischen der KIM1-Expression und einer CKD noch aus [117]. Das Modell der Adenin-induzierten Nierenfibrose ist geeignet um einen chronischen Nierenschaden zu imitieren und könnte daher ein geeignetes Modell zur weiteren Untersuchung von KIM1 und LCN2 darstellen. Insbesondere der Zusammenhang zwischen der Stärke des Nierenschadens und der Expression von KIM1 und LCN2 wurde untersucht. Da bereits einige Studien über die LCN2-Expression im Adeninmodell existieren [19], konnten die Ergebnisse der Experimente zum Teil verglichen werden. Um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse zu vermeiden wurde zuerst die basale Expression von LCN2 sowie KIM1 untersucht.

4.1 Basale Expression von LCN2

Bei der Gabe von Adenin kann es auch zu extrarenalen Organveränderungen kommen. Die Adenindiät kann unter anderem zu fibrotischen Veränderungen im Herzen führen [70], was womöglich mit einer gesteigerten LCN2-Expression einhergehen könnte. Folglich wurde zusätzlich auch das Herz mit untersucht. Des Weiteren wurde LCN2-mRNA in vielen verschiedenen Organen der Maus nachgewiesen. Insbesondere in der Lunge und der Leber zeigten Studien eine hohe LCN2-Expression bei der 21 Tage alten Maus. Rojas et al. führten auch Untersuchungen an Organen älterer Tiere durch. Dabei untersuchten sie zwar die Leber, jedoch wurde die Lunge nicht weiter betrachtet. Hierbei konnte auch noch nach dem 65. Lebensstag LCN2-mRNA in der Leber nachgewiesen werden [37]. Daher wurde in dieser Studie neben der Niere auch die Leber und die Lunge bezüglich ihrer LCN2-Abundanz untersucht. Laut Studien exprimiert die Niere adulter Mäuse basal nur geringe Mengen LCN2. Deshalb wurden um die LCN2-mRNA-Abundanz in der Niere noch besser einordnen zu können auch die Nebenniere und das Gehirn - Organe mit geringer beziehungsweise nicht nachweisbarer basaler LCN2-Expression [37] - auf ihre LCN2-mRNA-Expression überprüft.

Der LCN2-mRNA-Nachweis mittels qPCR bestätigte die Ergebnisse früherer Studien. Die mRNA-Expression in den Nieren 70 Tage alter Mäuse lag nahe dem Detektionsminimum und unterschied sich nicht signifikant von der LCN2-Expression im Herz, den Nebennieren oder dem Gehirn. Des Weiteren wurde eine hohe LCN2-Expression in der Leber sowie der

Lunge beobachtet (Abbildung 3.1), was mit den Ergebnissen von Rojas et al. übereinstimmt [37].

Weiterhin wurde die Expression von LCN2 in der Niere genauer lokalisiert um Veränderungen durch die Gabe von Adenin in den histologischen Einzelheiten beschreiben zu können. Han et al. beobachteten in gesunden Nieren von Ratten eine schwache LCN2-mRNA-Expression in den Epithelzellen der distalen Tubuli und der medullären Sammelrohre [46]. Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte bei Mäusen basal kongruent dazu eine LCN2-Expression in distalen Tubuli und in Sammelrohren nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die LCN2-Expression basal überwiegend im Innenstreifen des äußeren Markes sowie der inneren Medulla lokalisiert war (Abbildung 3.2). Diese Verteilung konnte durch Kohybridisierungen mit typischen Markern - Megalin für den proximalen Tubulus, NKCC2 für den distalen Tubulus und AQP2 für die Sammelrohre - gezeigt werden.

4.2 Basale Expression von KIM1

Um die Nierenspezifität von KIM1 bei der Maus zu überprüfen wurden zusätzlich zur Niere diverse Organe mit untersucht. Es wurden dieselben Organe wie für LCN2 verwendet um die basale LCN2- und KIM1-Expression vergleichen zu können.

In der Leber, dem Gehirn, der Lunge und dem Herz lag die KIM1-Expression nahe dem Detektionsminimum. Die KIM1-Expression in der Niere unterschied sich im Vergleich zu den anderen Organen um einen Faktor von 50 und mehr. Daher ist von einer hohen Organspezifität der KIM1-Expression auszugehen. Diese Befunde passen gut zu den Ergebnissen von Feigelsstock et al., die mithilfe von Northern Blots die Expression von KIM1 in verschiedenen Geweben des gesunden Menschen untersuchten. Dabei beobachtete die Arbeitsgruppe, dass KIM1 zwar in geringen Mengen in allen von ihnen untersuchten Organen - dazu gehörte unter anderem der Thymus, die Milz, der Dünndarm und die Lunge - nachweisbar war, jedoch wurden sehr viel größere Mengen an KIM1 in der Niere gefunden [34]. Andere Studien kamen bei der Untersuchung von menschlichem Gewebe zu geringeren Unterschieden, welche sich etwa auf einen Faktor von 10 beliefen [67]. Als wahrscheinlichste Ursache hierfür sind Spezies spezifische Unterschiede anzunehmen. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die KIM1-mRNA-Abundanz in den Nieren stark schwankt, sodass zwei Gruppen unterschieden werden konnten. Eine Gruppe mit hoher KIM1-Expression mit einem Mittelwert für die KIM1-mRNA von 0,86 und eine zweite Gruppe mit einem Mittelwert von 0,026. Selbst der Mittelwert von 0,026 war noch mehr als doppelt so hoch als die Mittelwerte in den anderen Geweben. Bei der späteren Untersuchung der KIM1-Expression nach 3 Wochen Adeningabe fiel auf, dass zwar der Unterschied in den basalen Messungen getrennt betrachtet groß erscheint, aber sich die beobachteten Schwankungen auf einem niedrigen Niveau bewegen. Ein möglicher Grund

für diese Schwankungen könnten leichte Schäden des Epithels sein, welche bei lokalen Entzündungsreaktionen auftreten können.

Medic et al. färbten mittels Immunhistochemie KIM1-Protein in der Niere gesunder Ratten an, dabei konnten sie, im Gegensatz zu ischämisch geschädigten Nieren, keine Immunreaktion für KIM1 nachweisen [82]. Da jedoch Studien ergaben, dass bereits basal in der Niere KIM1-mRNA vorhanden ist [34], wurde versucht diese genau zu lokalisieren um die Veränderungen der Expression und gegebenenfalls der Expressionsorte von KIM1 nach der Gabe von Adenin identifizieren zu können. Mithilfe der RNAscope®-Methode gelang es bereits in der gesunden Niere KIM1-RNA sichtbar zu machen. Dabei fiel auf, dass die KIM1-Expression überwiegend auf das S3-Segment des proximalen Tubulus beschränkt war.

4.3 Adenin-induzierte Nierenfibrose

Zur Induktion des Nierenschadens wurde ein etabliertes Modell der Adenin-induzierten Nierenfibrose verwendet. Unterschiede in der Ausprägung des Nierenschadens basierend auf dem unterschiedlichen Fressverhalten sind möglich. Da jedoch ein Ziel der Arbeit die Untersuchung von LCN2 und KIM1 bezüglich ihrer Aussagekraft über Nierenschäden im Adenin-Modell war, eigneten sich unterschiedlich starke Reaktionen der Mäuse sogar um feststellen zu können, ob die Expression der Marker auch mit der Stärke des Schadens zusammenhängt. Um die Mäuse auch noch drei Wochen nach der Schädigung beobachten zu können wurde die Adenin-Gabe im Gegensatz zu anderen Studien [63][125] auf drei Wochen beschränkt.

Zur Kontrolle des Nierenschadens wurden neben der abschließenden mikroskopischen Beurteilung verschiedene Parameter vermessen. Die GFR wurde als Hauptparameter für den Nierenschaden bestimmt. Es konnte ein schneller Abfall der mittleren GFR um 78 % während der Adeningabe festgestellt werden. Nach der dreiwöchigen Erholung lag die durchschnittliche GFR bei 55 % der basalen GFR. Dieses Ergebnis weist auf eine irreversible Schädigung von Nierengewebe hin und ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Fuchs et al. [36].

Yokozawa und Kollegen beobachteten bei der Fütterung von Ratten mit 0,75 %-igem Adenin-Futter nach einer Woche einen Anstieg des mittleren Urinvolumens um 62 % im Vergleich zur Kontrollgruppe. Währenddessen stieg die Wasseraufnahme nur um 16 % an, sodass die vermehrte Urinausscheidung nicht allein auf eine gesteigerte Wasseraufnahme zurückgeführt werden konnte und von einer Hyperfiltration auszugehen war [140]. Da es durch den Anstieg der GFR infolge einer glomerulären Hyperfiltration zu einer Unterschätzung des renalen Schadens kommen könnte, wurde zusätzlich zur GFR-Messung auch die Osmolarität des Urins und die Natrium- sowie Kaliumkonzentration des Urins

bestimmt. Bereits nach einer Woche fiel unter Adeningabe die Urinosmolarität um 62 % ab und änderte sich dann bis zum Ende der Messungen nicht mehr signifikant. Ein ähnlicher Verlauf wurde auch bei der Natrium- und der Kaliumkonzentration des Urins beobachtet. Daher war von einer glomerulären Hyperfiltration auszugehen, sodass der tatsächliche Nierenschaden höher lag, als es die GFR vermuten ließ.

Ebenso wie bereits in anderen Studien beschrieben [63], kam es zu einer Abnahme des durchschnittlichen Körpergewichtes der Mäuse. Ein Grund für die beobachtete Gewichtsabnahme könnte eine verringerte Nahrungsaufnahme während der Fütterung mit Adeninhaltigem Futter sein wie sie unter anderem von Sueyoshi et al. beschrieben wird [124]. Um eine bessere Beurteilbarkeit zu gewährleisten wurde daher die GFR mit dem Körpergewicht ins Verhältnis gesetzt.

Ein Abfall des Hämatokrits bis hin zur Anämie ist ein Zeichen einer chronischen Nierenerkrankung und beeinflusst sowohl Morbidität als auch Mortalität [119]. Auch im Adenin-Modell konnten verschiedene Arbeitsgruppen einen Abfall des Hämatokrits beobachten. Ali et al. stellten nach einer vierwöchigen 0,75 %-igen Adenindiät bei Ratten einen Abfall des mittleren Hämatokrits um 10,2 % im Vergleich zur Kontrollgruppe fest [2]. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Rahman und Kollegen bei der vierwöchigen täglichen oralen Gabe von 50 mg/kgKG Adenin bei Mäusen. Sie konnten einen signifikanten Abfall des Hämatokrits um 13,1 % im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachten. Des Weiteren berichteten sie von einem weiteren Abfall in der ersten Woche nach der Adeningabe. Danach blieb in ihrem Experiment der Hämatokrit bis zum Ende der Beobachtung erniedrigt, jedoch stieg er in den Erholungswochen tendenziell leicht an [107].

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte ebenso eine Abnahme des Hämatokrits während der Adeningabe beobachtet werden. Die basalen Messungen ergaben mit einem mittleren Hämatokrit von 51,5 % ähnliche Werte wie die Messungen anderer Forschungsgruppen [107]. Des Weiteren konnte erst in der 2. Woche der Adenin-Gabe eine Abnahme des Hämatokrits detektiert werden. Insgesamt konnte ein Abfall um 12,5 % festgestellt werden. Die Verringerung des Hämatokrits hielt noch bis eine Woche nach der Adeningabe an. Danach änderte sich der Hämatokrit nicht mehr signifikant. Damit stimmen diese Ergebnisse mit denen von Rahman und Kollegen überein. Der von ihnen beobachtete leichte Anstieg erfolgte erst langfristig in einer Erholungszeit von 5 Wochen [107] und betrifft demnach nicht den in der vorliegenden Studie überwachten Zeitraum. Des Weiteren wurden die Blutabnahmen von der genannten Forschungsgruppe während des Erholungszeitraumes in einem zeitlichen Abstand von mindestens 14 Tagen durchgeführt. Hingegen wurden bei dieser Arbeit einmal pro Woche sowohl Blut abgenommen als auch eine GFR-Messung durchgeführt. Dadurch kann ein Defizit in der Blutbildung schnellere und stärkere Auswirkungen auf den Hämatokrit haben.

4.3.1 Auswirkungen der Adeninfütterung auf die renale LCN2-Expression

Die Expression von LCN2-mRNA kann nach einem Nierenschaden um ein vielfaches ansteigen. Dabei ist der Anstieg abhängig von der Art der Schädigung. So beobachteten beispielsweise Mori et. al. bei einer ischämisch-induzierten akuten Tubulusnekrose eine Vertausendfachung der LCN2-Konzentration in der Niere 24 Stunden nach der Reperfusion [88]. Im Adeninmodell konnte bei den durchgeführten Untersuchungen nach dreiwöchiger Adeningabe ein Anstieg der renalen Expression auf das 195-fache der basalen LCN2-Expression nachgewiesen werden. Pulskens und Kollegen beobachteten ebenso einen starken Anstieg der LCN2-Expression während der Fütterung von Mäusen mit Adenin-haltigem Futter [104]. Des Weiteren konnten Studien eine Abhängigkeit der LCN2-Expression von der Stärke der Schädigung belegen [109], womit auch Unterschiede zwischen einzelnen Versuchsreihen bei gleichem Versuchsaufbau erklärt werden können.

Um LCN2 als möglichen Marker für Nierenschäden beurteilen zu können, ist es von Interesse den zeitlichen Zusammenhang zwischen Schädigung und LCN2-Expression zu analysieren. Nachdem die LCN2-Expression unter Adeningabe stark angestiegen war, konnte in dieser Studie ein rascher Abfall der LCN2-Expression innerhalb der drei Wochen der Erholung beobachtet werden. Die LCN2-Expression lag zwar nach den drei Wochen Erholung beim 14-fachen der basalen Expression, jedoch sank sie in der Niere nach dem Erholungszeitraum um mehr als 90 % im Vergleich zur Expression nach drei Wochen Adeningabe. Diese Ergebnisse lassen einen engen zeitlichen Zusammenhang zwischen der LCN2-Expression und der akuten Schädigung vermuten. Dieser Zusammenhang wurde bereits in verschiedenen Tierversuchen untersucht, die ebenfalls einen starken Abfall der LCN2-Expression nach der Schädigung dokumentieren konnten und eine bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes erhöhte LCN2-Expression feststellten [100]. Um beurteilen zu können, ob die LCN2-Expression nach einem Nierenschaden dauerhaft erhöht bleibt oder nach einem ausreichend langem Erholungsintervall wieder basale Werte erreicht, sind weitere Studien notwendig.

Bei der mikroskopischen Lokalisation der LCN2-exprimierenden Zellen konnte festgestellt werden, dass innerhalb der drei Wochen der Adeningabe eine Ausweitung der LCN2-exprimierenden Tubulusabschnitte stattgefunden hatte. Während basal vor allem in der Papille und im Innenstreifen der äußeren Medulla LCN2 exprimiert wurde, konnten nach dreiwöchiger Adeningabe selbst in kapselnahen Bereichen LCN2-exprimierende Zellen gefunden werden. Betroffen waren Zellen des distalen Tubulus sowie des Sammelrohrs. Auch Paragas et al. beobachteten nach einem akuten Nierenschaden eine intensive LCN2-Expression in der aufsteigenden dicken Henle-Schleife, im distalen Konvolut sowie in den Sammelrohren. Ebenso konnten sie keine LCN2-Expression in den proximalen Tubuli nachweisen [100].

Nach weiteren drei Wochen der Erholung konnte in dieser Studie ein starker Rückgang der LCN2-Expression festgestellt werden. Vor allem in der Rinde und in der Papillenspitze blieb die LCN2-Expression erhöht. Die weiterhin erhöhte LCN2-Expression in der Rinde könnte mit dem Wirkmechanismus der Adenin-induzierten Nierenfibrose an sich zusammenhängen, bei der insbesondere proximale Tubulusabschnitte geschädigt werden [73]. Der Grund für die LCN2-Anreicherung in der Papillenspitze könnte mit der schlechteren Versorgung mit Sauerstoff zusammenhängen, da dadurch einerseits hypoxische Schäden im Zuge eines akuten Schadens wahrscheinlicher sind [32], andererseits Erholungsprozesse negativ beeinflusst werden können [81]. Das Gewebe wies typische morphologische Veränderungen auf. Insbesondere Einziehungen und destruierte sowie dilatierte Tubuli konnten beobachtet werden. Diese Beobachtungen sind kongruent mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, die das Modell der Adenin-induzierten Nephropathie verwendeten [63][141].

Die vermehrte Expression von Kollagen I und III gilt als ein früher Mechanismus in der Entwicklung einer Nierenfibrose [38]. Deshalb wurde eine Kohybridisierung von LCN2 mit Kollagen I durchgeführt. Kollagen I wird in der gesunden Niere von Mäusen vor allem im Interstitium und im Bereich von Gefäßen exprimiert [91]. Diese Beobachtung konnte bei den durchgeführten Untersuchungen bestätigt werden. Nach dreiwöchiger Adeningabe kam es vor allem tubulointerstiell zu einem starken Anstieg der Kollagen-I-mRNA-Expression, was sich mit den Ergebnissen anderer Studien zur Adenin-induzierten Nierenfibrose deckt [107]. Nach drei Wochen Erholung sank die Kollagen-I-mRNA-Expression stark ab, blieb aber insbesondere in der Rinde im Vergleich zur basalen Expression deutlich erhöht. Da der fibrotische Umbau eines Gewebes nach einem akuten Schaden eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt [148], bleibt auch die Kollagen-I-mRNA-Expression abhängig von der Schwere des Schadens einige Zeit erhöht, was die Kollagen-I-mRNA-Anreicherung trotz der drei Wochen Erholung erklärt. Des Weiteren werden bei der Adenin-induzierten Nierenfibrose proximale Tubulusabschnitte besonders geschädigt [73], was die verstärkte Kollagen-I-mRNA-Expression in der Rinde erklären kann.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die LCN2-mRNA-Expression nach drei Wochen Adenin in den selben Bereichen erhöht war wie die Kollagen-I-mRNA-Expression. Dabei fiel auf, dass in der Umgebung LCN2-positiver geschädigter Tubuli auch vermehrt Kollagen-I-mRNA-exprimierende interstitielle Zellen vorzufinden waren. Da es sich bei Kollagen I um einen etablierten Fibrosemarker handelt [38], legt diese Beobachtung nahe, dass die LCN2-mRNA-Expression in den geschädigten Bereichen der Niere stattfand. Nach drei Wochen Adenin und drei Wochen Erholung lag die Kollagen-I-mRNA in LCN2-positiven Bereichen der Niere vor, jedoch wurde LCN2 zusätzlich in größeren Mengen in der Papille exprimiert ohne Vorliegen einer vergleichbaren Kollagen-I-mRNA-Expression. Mori et al. beschrieben einen regenerativen Effekt von LCN2 [87]. Da es sich bei der Nie-

renfibrose um eine Defektheilung handelt [148], könnte es sich bei den Regionen, welche lediglich LCN2 exprimieren, um schwächer geschädigte Bereiche handeln, in denen eine Regeneration stattfindet. Bestärkt wird diese Vermutung dadurch, dass bei der Adenin-induzierten Nierenfibrose vor allem proximale Tubulusabschnitte geschädigt werden [73] und es sich bei den Kollagen-I-negativen und LCN2-positiven Bereichen um Teile der Nierenpapille handelt. Für eine klare Aussage wären jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

Um die LCN2-exprimierenden Zellen der Niere während des akuten Nierenschadens zu lokalisieren führten Paragas und Kollegen in-situ-Hybridisierungen durch. Hierfür verwendeten sie ein Ischämie-Reperfusions-Modell bei dem mithilfe einer Obstruktion der Arteria renalis für 15 Minuten ein Nierenschaden induziert wurde. Die Nieren wurden 24 Stunden nach der Schädigung entnommen. Die Arbeitsgruppe beobachtete eine LCN2-RNA-Expression in der dicken aufsteigenden Henle-Schleife, in den Macula-densa-Zellen, in den Schaltzellen der Sammelrohre und in einem etwas geringerem Umfang im distalen Konvolut. Im proximalen Tubulus konnte keine LCN2-RNA nachgewiesen werden [100].

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten nach dreiwöchiger Adeningabe ein sehr ähnliches Bild. Es konnte eine LCN2-Expression im gesamten distalen Tubulus und in den Schaltzellen der Sammelrohre nachgewiesen werden. Im proximalen Tubulus wurde keine LCN2-Expression gefunden. Zusätzlich konnte in den Hauptzellen der Sammelrohre LCN2-RNA dargestellt werden. Im Gegensatz zum Ischämie-Reperfusions-Versuch von Paragas et al. [100] trat die LCN2-Expression im Adeninversuch nicht gleichmäßig über die Niere verteilt auf, sondern in Streifen mit starker LCN2-Expression und Streifen mit kaum Expression. Dieser Unterschied könnte durch den andersartigen Schädigungsmechanismus verursacht sein, da beim Abklemmen der Arteria renalis das gesamte Organe ischämisch geschädigt wird. Des Weiteren konnte eine Akzentuierung der LCN2-Expression in der inneren Medulla beobachtet werden, wie sie auch von Paragas und Kollegen bei der Behandlung mit Lipid A beobachtet wurde [100].

In immunhistochemischen Nachweisen in gesunden menschlichen Nieren wiesen Mori et al. eine schwache LCN2-Expression im Epithel der distalen Tubuli und der Sammelrohre nach. Jedoch konnten sie keine LCN2-Expression im proximalen Tubulus beobachten. Nach ischämischer oder toxischer Schädigung der Niere beschrieb die Arbeitsgruppe eine LCN2-Expression in der Hälfte der kortikalen Tubuli darunter auch proximale Tubuli [87]. Auch bei Mäusen wurde in Ischämie-Reperfusions-Versuchen ein Anstieg der LCN2-Konzentration in den kortikalen Tubuli immunhistochemisch nachgewiesen [44].

In der Niere von Mäusen konnte basal kaum LCN2-Protein nachgewiesen werden. Nur vereinzelt konnte LCN2 in den papillären Sammelrohren angefärbt werden. Nach drei Wochen Adenin wurde eine starke Zunahme der LCN2-Konzentration sowohl in der Rinde als auch im Mark beobachtet. Eine Anreicherung von LCN2-Protein im proximalen

Tubulus konnte nicht belegt werden. Zwar konnte keine LCN2-mRNA in den proximalen Tubuli nachgewiesen werden, da jedoch der proximale Tubulus in der Lage ist LCN2-Protein zu endozytieren [138], wäre eine Anreicherung möglich. Ein Grund dafür, dass keine LCN2-Anreicherung im proximalen Tubulus beobachtet werden konnte, könnte in der starken Schädigung der proximalen Tubuli liegen, welche durch die Schädigung auch einen Funktionsverlust erfuhren. Nach drei Wochen Adenin und drei Wochen Erholung fiel ein starker Rückgang der LCN2-Konzentration in der Niere auf. In der Rinde und dem äußeren Mark blieb die LCN2-Konzentration erhöht.

An Ratten wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, bei denen während der Adenin-Gabe die Plasma- sowie die Urin-LCN2-Konzentration gemessen wurde. Gil et al. verabreichten Ratten für vier Wochen Adenin-haltiges Futter (0,75 %) und anschließend für vier Wochen Standardfutter. Dabei konnten sie einen Zusammenhang zwischen der LCN2-Konzentration im Serum und der renalen Schädigung feststellen, welche sie mit der Messung des Kreatinin- sowie Harnstoffspiegels im Serum kontrollierten [40].

Die Ergebnisse der LCN2-Proteinspiegel-Messungen im Plasma stimmten mit den Ergebnissen von Gil et al. zum Verlauf der LCN2-Proteinkonzentration im Serum weitgehend überein. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen dem GFR-Abfall und dem LCN2-Proteinspiegel im Plasma festgestellt werden.

Bei der Untersuchung der LCN2-Konzentration konnten Schreiber et al. in einem Modell der Anti-neutrophil cytoplasmatic antibody (ANCA)-Vaskulitis im Verlauf der assoziierten Glomerulonephritis einen Anstieg der LCN2-Konzentration im Urin beobachten. Während der Remissionsphase beobachtete die Arbeitsgruppe einen Abfall der LCN2-Konzentration, diese blieb jedoch im gesamten Untersuchungszeitraum im Vergleich zu den basalen Werten erhöht. [115].

Die durchgeführten Experimente zeigten, dass auch im Adeninmodell die LCN2-Konzentration im Urin während der Schädigung ansteigt und in der Erholungsphase wieder abfällt. Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen dem Abfall der GFR und dem Anstieg der LCN2-Konzentration im Urin festgestellt werden. Auch im Adeninmodell blieb die LCN2-Konzentration während der Erholungsphase erhöht. Ob auch langfristig infolge eines irreversiblen Schadens von einer Erhöhung der LCN2-Konzentration im Vergleich zu gesunden Mäusen auszugehen ist, bleibt unklar, jedoch legen die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sowie anderer Studien [40] nahe, dass nicht von einer dauerhaften Erhöhung der LCN2-Konzentration trotz bleibenden Nierenschadens auszugehen ist.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass der Anstieg der LCN2-Konzentration sowohl im Blut als auch im Urin in einem engen zeitlichen Zusammenhang mit der Adeningabe und der GFR-Veränderung zu stehen scheint. Zwar stieg die LCN2-Konzentration im Urin prozentual gesehen stärker an als im Blut, jedoch eignet sich der LCN2-Nachweis im Urin

nicht gut um geringe Schäden zu detektieren, da andere Studien deutlich höhere basale LCN2-Konzentrationen im Urin feststellen konnten [115] und somit ein kleiner Anstieg, wie er beispielsweise bei Maus 2 beobachtet wurde (Abbildung 3.15), leicht übersehen werden kann.

Ebenso wie die Kollagen-1-mRNA konnte basal nur wenig Kollagen-1-Protein in der Niere nachgewiesen werden, welches insbesondere im Bereich der größeren Gefäße lokalisiert war. Diese Beobachtung wird auch durch andere Studien bestätigt [91]. Rahman et al. beobachteten infolge der Adeninfütterung bei Mäusen die Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose. Auch noch nach Absetzen des Adeninfutters konnte die Arbeitsgruppe eine weitere deutliche Vermehrung der Kollagen-Ablagerung feststellen. Neben der tubulointerstitiellen Ablagerung von Kollagen wurde eine vermehrte periglomeruläre Bindegewebsvermehrung beschrieben [107]. Im Zuge der Untersuchungen konnte nach drei Wochen Adenin insbesondere in der Papille ein Anstieg der Kollagen-I-Expression nachgewiesen werden, aber auch in der Rinde und dem äußeren Mark wurde vermehrt Kollagen I abgelagert. Ein Grund für die papillenbetonte Produktion könnte die geringere Regenerationsfähigkeit aufgrund der schlechteren Versorgung mit Sauerstoff sein [81]. Beim Kollagen-I-Proteinnachweis konnte eine solche papillenbetonte Verteilung nach drei Wochen Adeningabe nicht beobachtet werden. Da mRNA noch in Proteine übersetzt werden muss, könnte dieser Unterschied an der zeitlichen Verzögerung der Proteinablagerung liegen. Nach weiteren drei Wochen der Erholung konnte eine deutliche Zunahme der Kollagen-I-Proteinablagerung in der Niere beobachtet werden. Dabei konnte, wie bei Rahman et al. [107], nicht nur eine tubulointerstitielle Fibrose sondern auch eine Kollagen-I-Ablagerung im periglomerulären Bereich beobachtet werden. Weiterhin war auffällig, dass die Ablagerungen von Kollagen-I-Protein in den drei Wochen der Erholung zunahmen, während die Menge der Kollagen-I-mRNA in den drei Wochen nach der Adeningabe abnahm. Dieses Phänomen kann damit begründet werden, dass die mRNA schnell abgebaut wird, während die Proteine nicht eliminiert werden und sich dadurch anreichern.

Außerdem konnte innerhalb der Tubulusepithelzellen apikal eine vermehrte Anreicherung von LCN2-Protein beobachtet werden. Diese lag sowohl nach drei Wochen Adenin als auch nach drei Wochen Adenin und dreiwöchiger Erholung vor. Die apikale Ablagerung von LCN2-Protein könnte auf eine sekretorische Aktivität der Epithelzellen hinweisen.

4.3.2 Auswirkungen der Adeninfütterung auf die LCN2-Expression in der Leber und der Lunge

Da bei der basalen LCN2-mRNA-Messung in der Lunge und in der Leber im Vergleich zur Niere eine signifikant höhere LCN2-Abundanz nachgewiesen werden konnte, wurden in diesen Organen in-situ-Hybridisierungen durchgeführt um Veränderungen der LCN2-Expression während der Adeninfütterung feststellen zu können.

Nemmar et al. beobachteten im Adeninmodell in der Lunge eine Infiltration von Leukozyten in Alveolen und Bronchialwände. Des Weiteren stellten sie Gewebeschäden und fibrotische Veränderungen in der Lunge fest [92]. In den Lungenschnitten fielen mit der RNAscope®-Methode basal, nach drei Wochen Adeningabe und nach drei Wochen Erholung starke interindividuelle Unterschiede sowohl bei der LCN2- als auch der Kollagen-1-Expression auf. Sowohl LCN2 als auch Kollagen-I sind an einer Vielzahl von entzündlichen Prozessen beteiligt, bei welchen sie vermehrt exprimiert werden [22][76]. Dies kann die Beurteilung der Expression erschweren. Bei den Untersuchungen wurde darauf geachtet möglichst repräsentative Lungenschnitte zu präsentieren. Die von Nemmar und Kollegen [92] beobachteten Veränderungen in der Lunge konnten in dieser Studie nicht festgestellt werden. Dies könnte unter anderem dadurch bedingt sein, dass die Adeninfütterung (0,2 %) nur für drei anstelle von vier Wochen erfolgte. Außerdem verwendeten Nemmar et al. im Gegensatz zur vorliegenden Studie HsdOla:TO-Mäuse. Weiterhin konnte kein Anstieg der LCN2-Expression in der Lunge beobachtet werden.

In der Leber konnten basal hohe LCN2-Konzentrationen nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte in Studien ein Zusammenhang zwischen der LCN2-Konzentration und dem Fortschreiten eines chronischen Leberversagens beobachtet werden [79][4]. Daher war es wichtig, mögliche Schäden in der Leber auszuschließen, um keine Verfälschung der Plasma- und Urin-LCN2-Konzentrationen zu übersehen. Zur besseren Beurteilung wurde CD31 verwendet. Dabei handelt es sich um einen etablierten Marker für Endothelzellen, der in den Gefäßen der Glisson-Trias, den Lebersinusoiden sowie den Zentralvenen exprimiert wird [105]. Im Versuchsverlauf konnte keine Änderung der CD31-Expression in der Leber festgestellt werden, weshalb ein Endothelschaden unwahrscheinlich ist. Yoshikawa et al. machten bei der Untersuchung von gesundem Lebergewebe von Ratten die Hepatozyten als Hauptquelle der LCN2-Expression in der Leber aus. Des Weiteren konnten sie beobachten, dass die LCN2-exprimierenden Hepatozyten vereinzelt oder in kleinen Gruppen auftraten [142]. Diese Beobachtungen konnte bei den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden. Weiterhin konnte keine Veränderung der LCN2-Expression nach der Adeningabe festgestellt werden. Ebenso wurde soweit beurteilbar keine Schädigung des Leberparenchyms beobachtet. Daher ist eine Schädigung der Leber im Zuge des verwendeten Versuchsaufbaus unwahrscheinlich.

4.3.3 Aussagekraft der LCN2-Expression hinsichtlich renaler Schädigungen

In der Lunge und der Leber trat basal eine hohe LCN2-Expression auf, jedoch konnte kein Anstieg der LCN2-Expression während des Experiments festgestellt werden. Bei Mäusen in einem Alter von über 70 Tagen konnte in anderen Studien lediglich in Organen größere LCN2-Mengen nachgewiesen werden, welche auch in der vorliegenden Studie untersucht wurden [37]. Außerdem wurden bislang im Adeninmodell keine größeren Schäden in Organen festgestellt, die bei den durchgeführten Experimenten nicht berücksichtigt wurden. Daher ist anzunehmen, dass der beobachtete Anstieg der Plasma- sowie Urin-LCN2-Konzentrationen auf die Schädigungen in der Niere zurückzuführen sind. Bekräftigt wird diese Annahme dadurch, dass der Anstieg der LCN2-Konzentration sowohl im Urin als auch im Plasma in einem engen zeitlichen Zusammenhang mit dem Abfall der GFR stand. Da die LCN2-Konzentration während der akuten Schädigung schnell ansteigt, aber auch nach der Schädigung innerhalb weniger Wochen wieder abfällt, eignet sie sich gut um mithilfe regelmäßiger Messungen den Verlauf des Nierenschadens im Adeninmodell abzubilden. Bei größeren Schäden eignen sich sowohl die Urin- als auch die Plasma-LCN2-Konzentration um eine renale Schädigung zu überwachen. Hingegen ist die LCN2-Messung im Plasma bei geringen Schäden, bei denen es nach einer Erholungsphase zu einer nahezu vollständigen Normalisierung der GFR kommt, deutlich besser als die Bestimmung aus dem Urin geeignet. Im Plasma konnte selbst bei kleinen Veränderungen der GFR ein deutlicher Anstieg der LCN2-Konzentration beobachtet werden, sodass eine Unterscheidung von basalen Werten gut möglich ist. Der basale LCN2-Gehalt des Urins ist jedoch starken Schwankungen unterworfen, demzufolge können insbesondere kleine Veränderungen der LCN2-Konzentration leicht übersehen werden.

Problematisch ist jedoch, dass die LCN2-Expression bei vielen verschiedenen Erkrankungen ansteigen kann und dadurch Ergebnisse massiv verfälscht werden können. Bei den durchgeführten Versuchen konnten keine extrarenalen Schäden festgestellt werden, sodass die LCN2-Expression im Adeninmodell auf eine Schädigung der Niere zurückzuführen war. Bei Untersuchungen am Menschen sollte jedoch auf mögliche extrarenale Schäden geachtet werden.

Da in der Niere lediglich eine LCN2-Expression im distalen Tubulus und in den Sammelrohren nachgewiesen werden konnte, wäre es möglich, dass der Anstieg der LCN2-Expression abhängig davon ist, welche Tubulusabschnitte geschädigt werden. Andere Studien kamen jedoch auch zu dem Ergebnis, dass LCN2 in der gesunden Niere nahezu vollständig durch den proximalen Tubulus resorbiert wird und erst eine Schädigung der proximalen Tubuli zu einem Anstieg der LCN2-Konzentration im Urin führt [50]. An sich wäre auch ein Abschätzen des Schädigungsmusters innerhalb der Niere mithilfe des Verhältnisses zwischen Plasma- und Urin-LCN2-Konzentration denkbar. Bislang sind die genauen Mechanismen der Sekretion von LCN2 in den Urin und ins Blut noch nicht voll-

ständig geklärt. Ebenso sind die Signalkaskaden, welche eine LCN2-Expression auslösen, noch größtenteils unbekannt. Weitere Untersuchungen diesbetreffend könnten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Funktion von LCN2 bei der renalen Schädigung liefern und könnten helfen verschiedene Erkrankungen anhand der Abhängigkeit der Expression von bestimmten Signalwegen zu unterscheiden.

4.3.4 Auswirkungen der Adeninfütterung auf die renale KIM1-Expression

KIM1 könnte ein potentieller Biomarker für chronische Nierenerkrankungen sein. Vielversprechende Ergebnisse über die Aussagekraft von KIM1 bei chronischen Nierenerkrankungen ergaben beispielsweise Untersuchungen bei Patienten mit beginnender diabetischer Nephropathie [112], jedoch konnte kein genereller Zusammenhang zwischen der KIM1-Expression und chronischen Nierenerkrankungen bestätigt werden [117]. Daher ist es wichtig die KIM1-Expression beim chronischen Nierenschaden genauer zu untersuchen um besser beurteilen zu können bei welchen Erkrankungen KIM1 als Biomarker geeignet sein kann.

Im Ischämie-Reperfusionsmodell beobachteten Ajay et al. bei Ratten einen maximalen Anstieg der KIM1-mRNA-Abundanz in der Nierenrinde nach 24 Stunden auf das 125-fache und im Mark nach 6 Stunden auf das 60-fache des basalen Wertes [1]. Im Adeninmodell konnte nur ein deutlich geringerer Anstieg der Abundanz nach dreiwöchiger Adeningabe auf das 15,5-fache des basalen Wertes festgestellt werden. In den folgenden drei Wochen der Erholung konnte ein Rückgang auf basale Werte beobachtet werden. Der in dieser Studie gemessene Anstieg der KIM1-Abundanz war damit deutlich niedriger als beim Ischämie-Reperfusionsmodell. Der geringere Anstieg könnte dabei darauf zurückgeführt werden, dass es bei den verschiedenen Modellen zu einer verschieden stark ausgeprägten Nierenschädigung kommt. Zudem könnten speziesspezifische Unterschiede einen Einfluss auf die Ergebnisse haben, da von Ajay et al. Ratten anstatt Mäuse untersucht wurden.

Des Weiteren konnte eine starke Schwankung der KIM1-Abundanz nach drei Wochen Adeningabe festgestellt werden. Auch bei der Untersuchung größerer Gruppen von Tieren aus dem gleichen Versuchsaufbau konnten diese Schwankungen beobachtet werden. Diese könnten mit der Schwere der Nierenschädigung zusammenhängen, da bei der Auswertung der GFR ebenso starke Schwankungen nach drei Wochen Adeningabe detektiert werden konnten.

Bei der histologischen Untersuchung konnte in der gesunden Niere kaum KIM1-mRNA nachgewiesen werden. Diese Beobachtung machten auch Cai et al. bei der immunhistochemischen Untersuchung menschlicher Nieren [20]. Nach dreiwöchiger Adeningabe zeigte sich eine deutliche Zunahme der KIM1-Expression in der Rinde und dem Außenstreifen des äußeren Marks. Hingegen konnten Ichimura und Kollegen in einem Ischämie-Reperfusions-Versuch bei Ratten 48 Stunden nach der Ischämie lediglich im Außenstreifen der äußeren

Medulla und in den Markstrahlen KIM1-exprimierende Zellen nachweisen, jedoch nicht in anderen Tubulusabschnitten, die Pars convoluta des proximalen Tubulus mit eingeschlossen [57]. Basal wurde vor allem im S3-Segment des proximalen Tubulus KIM1 exprimiert und nach drei Wochen Adenin konnte eine Betonung der KIM1-Expression im Bereich des Außenstreifens der äußeren Medulla und in den tiefen Rindenbereichen beobachtet werden. Die unterschiedliche Stärke und Verteilung der KIM1-Expression könnte durch die Art und Schwere des jeweiligen verursachten Schadens der verwendeten Modelle begründet sein. Da die in dieser Studie beobachtete KIM1-Expression mit einer erhöhten Kollagen-1-Expression in den betroffenen Bereichen einherging, scheint die KIM1-Expression nach dreiwöchiger Adeningabe die Nierenschädigung im Bereich der Rinde und dem Außenstreifen des äußeren Marks wiederzuspiegeln.

Insgesamt weisen sowohl die Befunde der qPCR als auch der in-situ-Hybridisierung auf einen schnellen Rückgang der KIM1-Expression nach der akuten Schädigung hin. Ein schneller Rückgang der KIM1-Expression wurde auch von Ko und Kollegen in Nieren von Mäusen innerhalb der ersten vier Wochen nach ischämischem Schaden festgestellt. Sie konnten am Ende der Beobachtung leicht erhöhte Werte für die KIM1-Expression mithilfe einer qPCR messen [72]. Da in der vorliegenden Studie in allen mittels der in-situ-Hybridisierung untersuchten Nieren eine leicht erhöhte KIM1-Expression nach dreiwöchiger Adeningabe und drei Wochen Erholung beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass die KIM1-Expression auch nach dem Ende der Schädigung für einen Zeitraum erhöht bleibt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Kollagen-1-Expression in den drei Wochen der Erholung weniger stark als die KIM1-Expression zurück ging und trotz des Abfalls noch deutlich erhöht blieb. KIM1 scheint also in einem engeren zeitlichen Zusammenhang mit dem akuten Schadensstimulus zu stehen als Kollagen 1, welches auch an wichtigen Aufgaben bei der langfristigen Entwicklung einer Fibrose beteiligt ist [38].

Um den Zusammenhang zwischen der KIM1-Expression und der Veränderung der GFR zu überprüfen, wurde die KIM1-Konzentration im Urin und im Plasma gemessen. Im Urin konnte ein mittlerer Anstieg der KIM1-Protein-Konzentration nach drei Wochen Adeninfütterung auf das 64-fache des basalen Mittelwertes beobachtet werden. Dabei fiel jedoch auf, dass sich zwei Gruppen bildeten mit stark unterschiedlicher KIM1-Konzentration im Urin. Während bei der einen Gruppe lediglich Werte zwischen 1 und 5 ng/ml bei einem Abfall der GFR zwischen 55 und 75 % erreicht wurden, konnte bei den anderen Mäusen Werte zwischen 30 und 35 ng/ml und ein Abfall der GFR zwischen 80 und 90 % beobachtet werden. Einen ähnlichen Befund ergaben auch Untersuchungen in Ischämie-Reperusionsmodellen. So stellten Vaidya und Kollegen 24 Stunden nach Ischämie bei einer Ischämiezeit von 10 min einen Anstieg der KIM1-Konzentration auf 5 ng/ml fest, während nach 20-, 30- und 45-minütiger Ischämiezeit nach 24 Stunden Werte zwischen 25 und 35 ng/ml beobachtet wurden [130]. Es scheint also einen kritischen Punkt zu geben ab dem die KIM1-

Konzentration rasant zunimmt. Dennoch eignet sich die KIM1-Konzentration im Urin auch dafür geringere Schäden anzuzeigen, da es selbst beim geringsten in der vorliegenden Studie beobachteten Anstieg der KIM1-Konzentration zu einer Verfünffachung des basalen Wertes kam.

Entgegen der Erwartungen stieg die KIM1-Konzentration im Mittel nicht bis zur 3. Woche der Adeningabe an, sondern erreichte bereits in der 2. Woche ihr Maximum. Die GFR sank jedoch auch noch während der dritten Woche der Adeningabe, wenn auch schwächer, weiter ab. In anderen Studien wurde ebenso beobachtet, dass die KIM1-Konzentration im Urin nicht im direkten Zusammenhang mit der GFR steht [117]. Auch die Ischämie-Reperusionsversuche von Vaidya et al. zeigten, dass ab einer Ischämiezeit von 20 min kein signifikant größerer Anstieg der KIM1-Konzentration nach 24 Stunden im Urin bei längerer Ischämiedauer erfolgte [130]. Es könnte also eine Schädigungsintensität geben, ab der die KIM1-Expression nicht weiter ansteigt, was beispielsweise durch eine vermehrte Apoptose betroffener Zellen ausgelöst werden könnte. Andererseits konnte beobachtet werden, dass in der dritten Woche der Adeningabe die GFR durchschnittlich deutlich schwächer abfiel als in den beiden Wochen davor, sodass auch das ein Grund für den leichten Abfall der KIM1-Konzentration im Urin sein könnte.

Nach dreiwöchiger Erholung konnte ein starker Rückgang der KIM1-Konzentration im Urin beobachtet werden. Selbst bei den Mäusen bei denen die KIM1-Konzentration nach drei Wochen Adeningabe auf über 30 ng/ml anstieg, konnten nach der Erholung nur noch Werte unter 1 ng/ml nachgewiesen werden. Die Ausscheidung von KIM1-Protein findet also nur in der akuten Schädigungsphase in größeren Mengen statt, was die Beurteilung der Nierenfunktion während der Erholungsphase mithilfe der KIM1-Konzentration im Urin erschwert.

Im Plasma lag die KIM1-Konzentration deutlich unter dem KIM1-Gehalt des Urins. Basal gelang der KIM1-Nachweis im Plasma nicht, da die KIM1-Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Assays lag, welche vom Hersteller mit einem Wert zwischen 0,22 und 2,18 pg/ml angegeben wird. Dementgegen konnten in anderen Studien bei gesunden Mäusen deutlich höhere KIM1-Konzentrationen im Plasma festgestellt werden [110]. Eine Ursache dafür, dass basal kein KIM1-Protein im Plasma nachgewiesen werden konnte, könnte sein, dass die in dieser Studie untersuchten Mäuse zwei bis vier Wochen älter waren als die, welche Sabbisetti et al. [110] verwendeten. Des Weiteren wurden im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe keine BALB/C-Mäuse, sondern C57BL/6-Mäuse verwendet.

Die gemessene Maximalkonzentration im Plasma lag mit 2 ng/ml weit unter dem im Urin gemessenen Maximalwert mit 56 ng/ml. Diese Beobachtung kann auch durch andere Studien bestätigt werden. Selbst nach siebentägiger einseitiger Ureterobstruktion bei Mäusen konnten Sabbisetti und Kollegen nur einen Anstieg der KIM1-Konzentration im Plasma

auf Werte zwischen 0,1 und 0,15 ng/ml feststellen [110]. Auffällig ist auch, dass bei den Mäusen mit geringeren Schäden (GFR-Abfall von 55 bis 75 %) keine oder kaum eine Veränderung der Plasma-KIM1-Konzentration zu beobachten war. Nur bei schweren Nierenschäden (GFR-Abfall zwischen 80 und 90 %) konnte ein Anstieg der KIM1-Konzentration im Plasma beobachtet werden, welche dann auf niedrigem Niveau einen ähnlichen Verlauf wie die KIM1-Konzentration im Urin annahm.

Die Ursache für die deutlich niedrigeren KIM1-Spiegel im Plasma im Vergleich zum Urin könnte darin liegen, dass die extrazelluläre Domäne von KIM1 mithilfe von Matrixmetalloproteinasen von der Zelloberfläche abgetrennt werden und damit das lösliche KIM1 direkt in den Urin gelangen kann [6].

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass die KIM1-Konzentration im Plasma deutlich niedriger war und auch weniger stark anstieg als im Urin. Vor allem bei gering ausgeprägten Schäden, wie sie bei Maus 2 beobachtet werden konnten, ist die KIM1-Konzentration im Plasma kein guter Marker um eine Nierenschädigung zu detektieren. Als Nebentbefund fiel auf, dass es bei Mäusen mit geringer basaler KIM1-Expression auch zu einem geringeren Anstieg der KIM1-Konzentration kam. Für valide Aussagen müssten an dieser Stelle jedoch noch mehr Mäuse untersucht werden.

In gesunden Nieren konnten Ichimura et al. kaum KIM1-mRNA über in-situ-Hybridisierungen nachweisen [57]. Immunhistochemisch konnten Ichimura und Kollegen in einer anderen Studie basal kein KIM1-Protein in der Niere detektieren [60]. Es ist also davon auszugehen, dass basal nur geringe Mengen an KIM1 in der Niere exprimiert werden. In den durchgeführten Untersuchungen konnte ebenso basal nur eine geringe KIM1-mRNA-Expression in der Niere festgestellt werden. Lediglich im S3-Segment des proximalen Tubulus ließ sich KIM1-mRNA nachweisen. Alle anderen Tubulussegmente, das S1- und S2-Segment des proximalen Tubulus eingeschlossen, exprimierten basal kein KIM1.

Eine erhöhte KIM1-Expression steht im Zusammenhang mit der Schädigung des proximalen Tubulus sowohl bei der akuten Nierenschädigung als auch bei verschiedenen chronischen Nierenerkrankungen [49][54]. Untersuchungen der KIM1-Expression mittels Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierung ergaben jedoch sehr unterschiedliche Ergebnisse. Ichimura und Kollegen stellten in Ischämie-Reperfusionsversuchen eine erhöhte KIM1-Expression in den proximalen Tubuli im Außenstreifen der äußeren Medulla und in den Markstrahlen der Rinde fest. In allen anderen Tubulusabschnitten konnten sie hingegen keine KIM1-mRNA nachweisen. Zusätzlich beobachteten sie einen Verlust des Bürstensaums, ein abgeflachtes Epithel und Zelldetritus in den Tubuli [57]. Dementgegen konnte Zhao et al. bei Ratten im Verlauf der diabetischen Glomerulopathie KIM1-Ablagerung bei 20 Wochen alten Ratten im parietalen Blatt der Bowman-Kapsel, in den Glomerulusschlingen und in den Epithelzellen des proximalen Tubulus nachweisen [147]. Bei der Induktion eines Nierenschadens mithilfe von Cisplatin beobachteten Nozaki et

al. bei Mäusen initial lediglich eine geringe Expression von KIM1 in den proximalen Tubuli der äußeren Medulla. Bereits drei Tage nach der Cisplatin-Gabe kam es zu einem deutlichen Anstieg der Expression. Die Arbeitsgruppe wies KIM1 in vielen Tubuli der geschädigten äußeren Medulla nach [97]. Diese Ergebnisse legen einerseits nahe, dass KIM1 besonders in den distaleren Abschnitten des proximalen Tubulus exprimiert wird. Andererseits zeigen sie auch, dass die KIM1-Expression stark variiert abhängig von der Schädigungsursache.

Nach drei Wochen Adenin konnte ein starker Anstieg der KIM1-Expression im gesamten proximalen Tubulus beobachtet werden. In allen anderen Tubulusabschnitten konnte keine KIM1-mRNA nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte auch keine KIM1-Expression im parietalen Blatt der Bowman-Kapsel oder in den Glomerulusschlingen festgestellt werden, wie sie von Zhao et al. beschrieben wurden [147], was wahrscheinlich mit der unterschiedlichen Schädigungsursache zusammenhängt. Während die diabetische Nephropathie mit einem glomerulären Schaden mit Verdickung der glomerulären Basalmembran und knotigen Veränderungen im Mesangium einhergeht [106], kommt es bei der Adenin-induzierten Nierenfibrose primär zu einer tubulären Schädigung, welche im proximalen Tubulus besonders akzentuiert ist [73]. Zwar wurden in einigen Studien auch gewisse Schäden im Bereich der Glomeruli im Adeninmodell beobachtet [107], jedoch reichten diese Schäden anscheinend nicht aus um eine KIM1-Expression zu induzieren.

Auffällig ist, dass in einigen Studien zur Cisplatin-induzierten chronischen Nierenerkrankung lediglich in bestimmten Abschnitten des proximalen Tubulus eine KIM1-Protein-Expression infolge einer Schädigung nachgewiesen werden konnte [97], in anderen hingegen im gesamten proximalen Tubulus KIM1 festgestellt wurde [127]. Eine Ursache dafür könnte sein, dass bei leichteren Nierenschäden nur schwer geschädigte Tubulussegmente durch eine erhöhte KIM1-Expression auffielen. Die Intensität der Schädigung durch die dreiwöchige Adeningabe hätte demnach in der vorliegenden Studie ausgereicht um eine KIM1-Expression im gesamten proximalen Tubulus zu induzieren. Ob bei kürzerer Adeningabe oder geringerer Adenin-Konzentration im Futter nur bestimmte Segmente des proximalen Tubulus geschädigt werden würden, bleibt ungeklärt.

In den drei Wochen der Erholung konnte ein starker Rückgang der KIM1-Expression beobachtet werden. Dabei blieb die KIM1-Expression insbesondere in tiefen Bereichen der Rinde und im Außenstreifen der äußeren Medulla erhöht, was darauf hinweist, dass in diesen Bereichen der Schaden größer war als in anderen Abschnitten. Dies könnte mit den anatomischen Bedingungen zusammenhängen, durch die medullären Anteile des proximalen Tubulus schlechter als die kortikalen Abschnitte versorgt werden. Des Weiteren konnten vereinzelt Tubuli beobachtet werden, welche lediglich KIM1 jedoch keinen anderen der untersuchten funktionellen Marker exprimierten. Da festgestellt werden konnte, dass die Expression von Megalin, NKCC2 und AQP2 bei zunehmender Schädigung des

Gewebes abnahm, ist davon auszugehen, dass es sich dabei um besonders stark geschädigte Tubuli handelte.

4.3.5 Aussagekraft der KIM1-Expression hinsichtlich renaler Schädigungen

In dieser Studie konnte keine KIM1-Expression außerhalb der Niere nachgewiesen werden. Andere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, dass die KIM1-Expression in der Niere 10-mal höher ist als in den meisten anderen Organen [67]. Es ist also von einer hohen Organspezifität von KIM1 auszugehen.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der KIM1-Konzentration im Urin oder im Plasma und der GFR konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso konnten auch andere Arbeitsgruppen keinen direkten Zusammenhang zwischen der KIM1-Expression und der estimated glomerular filtration rate (eGFR) feststellen [117]. Jedoch schien die KIM1-Konzentration im Urin in den ersten beiden Wochen der Adenin-Gabe in einem Zusammenhang mit der GFR und damit auch mit der Nierenschädigung zu stehen. Selbst bei kleineren Schäden stieg die KIM1-Konzentration im Urin stark an und wies damit eine hohe Sensitivität für Nierenschäden innerhalb des Adeninmodells auf.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die KIM1-Konzentration im Urin innerhalb der drei Wochen der Erholung schnell abfiel und nach drei Wochen die KIM1-Konzentration nicht mehr signifikant erhöht war im Vergleich zu den basalen Werten. Somit konnte auch ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen der Proteinablagerung und renalen Schäden beobachtet werden. Daher könnte KIM1 ein nützlicher Biomarker sein um auch bei wiederholten Schädigungen einen neuen Schaden zu detektieren.

Interessant wäre eine Untersuchung der KIM1-Konzentration bei einer längerfristigeren Adeningabe mit einem Adenin-ärmeren Futter um zu kontrollieren, ob auch bei längeranhaltender geringer Schädigung noch ein Zusammenhang zwischen GFR und KIM1-Konzentration nachweisbar ist.

Die KIM1-Konzentration im Plasma eignete sich nur sehr bedingt um renale Schäden zu identifizieren. Nur bei schweren Nierenschäden mit einem Abfall der GFR um mehr als 80 % konnte im Plasma ein eindeutiger Anstieg des KIM1-Gehaltes festgestellt werden. Geringere Schäden führten nicht zu einer signifikanten Änderung der KIM1-Konzentration im Plasma und würden somit unerkant bleiben.

Des Weiteren konnte nur in Epithelzellen des proximalen Tubulus eine KIM1-Expression nachgewiesen werden. Daher könnte es sein, dass Schäden am distalen Tubulus oder an den Sammelrohren nicht durch einen Anstieg der KIM1-Expression detektiert werden können.

4.3.6 Koexpression von LCN2 mit KIM1

LCN2 konnte in Sammelrohren und in distalen Tubuli nachgewiesen werden. In Kohybridisierungen von LCN2 mit Megalin, einem funktionellen Marker des proximalen Tubulus [74], konnte keine Koexpression festgestellt werden.

KIM1 konnte lediglich im proximalen Tubulus nachgewiesen werden. Diese Beobachtung machten auch andere Arbeitsgruppen [49][54][20].

Daher wurde erwartet, dass keine Kolo-kalisierung von LCN2 und KIM1 in Kohybridisierungen nachweisbar wären. Zwar konnte größtenteils die Expression von KIM1 und LCN2 klar voneinander abgegrenzt werden, jedoch konnten entgegen der Erwartungen auch wenige Tubuli nachgewiesen werden, welche KIM1 und LCN2 koexprimierten. Alle Versuche diese Tubuli einzuordnen mithilfe funktioneller Marker wie Megalin, SGLT1, NKCC2 oder AQP2 scheiterten. Da die beobachteten Tubuli keine der untersuchten funktionellen Marker exprimierten ist davon auszugehen, dass es sich um besonders stark geschädigte Tubuli handelte. Aufgrund der anatomischen Lage dieser Tubuli im Bereich des äußeren Markes und der Rinde handelte es sich dabei vermutlich um proximale oder distale Tubuli. Daher wurde wahrscheinlich entweder KIM1 von einigen distalen Tubuli oder LCN2 von ein paar proximalen Tubuli exprimiert. Abschließend ist jedoch zu betonen, dass KIM1 und LCN2 weitgehend voneinander verschiedene Expressionssorte vorweisen.

5 Zusammenfassung

Bei KIM1 und LCN2 handelt es sich um zwei Proteine, deren Funktion bisher nur teilweise verstanden ist. In den letzten Jahrzehnten trat insbesondere ihre Bedeutung als Biomarker für renale Schädigungen in den Vordergrund. Beim akuten Nierenschaden lieferten viele Studien sehr vielversprechende Ergebnisse. Der Ablauf der renalen Schädigung bei chronischen Nierenerkrankungen unterscheidet sich zum Teil erheblich vom Verlauf beim akuten Schaden. Daher wären auch Untersuchungen eines möglichen Zusammenhangs der beiden Marker mit der Schwere des Schadens im Zuge der CKD notwendig. Hierbei stellte sich LCN2 als vielversprechender Marker heraus. Ein allgemeiner Zusammenhang der KIM1-Expression mit chronischen Nierenerkrankungen konnte nicht nachgewiesen werden. Da jedoch bei bestimmten Arten der CKD ein Zusammenhang zwischen der KIM1-Expression und der GFR und anderen Nierenfunktionsparametern zu bestehen scheint, sind weiterführende Untersuchungen von KIM1 sinnvoll. Hierfür werden auch Tiermodelle benötigt um die KIM1-Expression genauer untersuchen zu können. Das Adeninmodell ist ein etabliertes Modell zur Induktion einer CKD, welches aufgrund seiner relativ einfachen Durchführung gut reproduzierbar ist. Ob die KIM1-Expression im Adeninmodell im Zusammenhang mit der renalen Schädigung steht, war bislang unklar.

Die Induktion eines Nierenschadens mittels Adenin führte zu einem Anstieg der KIM1-Expression in den proximalen Tubuli. Dabei war die Expression jedoch nur segmentär erhöht. Kohybridisierungen mit Kollagen 1 und histologische Untersuchungen des Gewebes ergaben, dass es sich um die geschädigten Nierenabschnitte handelte. Der Vergleich mit früheren Untersuchungen an akut ischämisch oder toxisch geschädigten Nieren zeigte nur geringfügige Unterschiede. In der Erholungsphase nahm die KIM1-Expression schnell ab und lag nach drei Wochen nur noch leicht über dem basalen Mittel. Die KIM1-Expression scheint daher in einem engen zeitlichen Zusammenhang mit der Nierenschädigung im Adeninmodell zu stehen.

Des Weiteren konnte während der Beobachtung keine extrarenale KIM1-Produktion festgestellt werden. Daher ist von einer hohen Nierenspezifität von KIM1 auszugehen.

Ein eindeutiger Zusammenhang der KIM1-Protein-Konzentrationen im Urin und im Plasma mit der GFR konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch eignete sich die KIM1-Konzentration im Urin gut um eine Schädigung der Niere anzuzeigen. Der KIM1-Gehalt im Plasma eignet sich nur schlecht zur Beurteilung des Nierenschadens im Adeninmodell.

Auch die LCN2-Expression nahm während der Adeningabe stark zu und erreichte nach den drei Wochen der Erholung wieder nahezu die basalen Werte. Die LCN2-Konzentrationen im Urin und im Plasma scheinen mit der GFR assoziiert zu sein. Sowohl Plasma- als

auch Urin-Konzentration spiegeln den renalen Schaden wider. In der Niere wird LCN2 im distalen Tubulus und in den Sammelrohren exprimiert. Eine Anreicherung von LCN2-Protein im proximalen Tubulus konnte nicht beobachtet werden. Weiterhin konnte keine Erhöhung der extrarenalen LCN2-Expression festgestellt werden.

Letzten Endes spiegeln beide Marker die renale Schädigung im Adeninmodell wider. Während LCN2 in einem engeren Zusammenhang mit der GFR zu stehen scheint, ist der prozentuale Anstieg der Proteinexpression bei KIM1 deutlich höher. Des Weiteren ist KIM1 relativ Nieren-spezifisch, hingegen wird LCN2 in hohen Mengen auch extrarenal exprimiert. Um LCN2 oder KIM1 gezielt als Biomarker in der Diagnostik von Nierenschäden nutzen zu können, werden weitere Studien nötig sein.

6 Literaturverzeichnis

- [1] A. K. Ajay, T. M. Kim, V. Ramirez-Gonzalez, P. J. Park, D. A. Frank, and V. S. Vaidya. A bioinformatics approach identifies signal transducer and activator of transcription-3 and checkpoint kinase 1 as upstream regulators of kidney injury molecule-1 after kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 25(1):105–118, Jan 2014.
- [2] B. H. Ali, M. Al Za’abi, A. Ramkumar, J. Yasin, and A. Nemmar. Anemia in adenine-induced chronic renal failure and the influence of treatment with gum acacia thereon. *Physiol Res*, 63(3):351–358, 2014.
- [3] G. R. Ares, P. S. Caceres, and P. A. Ortiz. Molecular regulation of NKCC2 in the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301(6):F1143–1159, Dec 2011.
- [4] X. Ariza, I. Graupera, M. Coll, E. Solà, R. Barreto, E. García, R. Moreira, C. Elia, M. Morales-Ruiz, M. Llopis, P. Huelin, C. Solé, N. Fabrellas, E. Weiss, F. Nevens, A. Gerbes, J. Trebicka, F. Saliba, C. Fondevila, V. Hernández-Gea, J. Fernández, M. Bernardi, V. Arroyo, W. Jiménez, C. Deulofeu, M. Pavesi, P. Angeli, R. Jalan, R. Moreau, P. Sancho-Bru, and P. Ginès. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a biomarker of acute-on-chronic liver failure and prognosis in cirrhosis. *J Hepatol*, 65(1):57–65, 07 2016.
- [5] A. Attmane-Elakeb, D. B. Mount, V. Sibella, C. Vernimmen, S. C. Hebert, and M. Bichara. Stimulation by in vivo and in vitro metabolic acidosis of expression of rBSC-1, the $\text{Na}^+/\text{K}^+(\text{NH}_4^+)/2\text{Cl}^-$ cotransporter of the rat medullary thick ascending limb. *J Biol Chem*, 273(50):33681–33691, Dec 1998.
- [6] V. Bailly, Z. Zhang, W. Meier, R. Cate, M. Sanicola, and J. V. Bonventre. Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem*, 277(42):39739–39748, Oct 2002.
- [7] S. Balasubramanian, S. K. Kota, V. K. Kuchroo, B. D. Humphreys, and T. B. Strom. TIM family proteins promote the lysosomal degradation of the nuclear receptor NUR77. *Sci Signal*, 5(254):ra90, Dec 2012.
- [8] A. Bihorac, S. Yavas, S. Subbiah, C. E. Hobson, J. D. Schold, A. Gabrielli, A. J. Layon, and M. S. Segal. Long-term risk of mortality and acute kidney injury during hospitalization after major surgery. *Ann Surg*, 249(5):851–858, May 2009.
- [9] I. A. Bobulescu and O. W. Moe. Na^+/H^+ exchangers in renal regulation of acid-base balance. *Semin Nephrol*, 26(5):334–344, Sep 2006.
- [10] D. Bolignano, G. Coppolino, S. Campo, C. Aloisi, G. Nicocia, N. Frisina, and M. Buemi. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Am J Nephrol*, 27(4):373–378, 2007.
- [11] W. Boron and E. Boulpaep. *Medical Physiology: A Cellular And Molecular Approach*, page 743. 2005.
- [12] W. F. Boron and E. L. Boulpaep. Intracellular pH regulation in the renal proximal

- tubule of the salamander. Basolateral HCO₃⁻ transport. *J Gen Physiol*, 81(1):53–94, Jan 1983.
- [13] S. Bourgeois, L. V. Meer, B. Wootla, M. Bloch-Faure, R. Chambrey, G. E. Shull, L. R. Gawenis, and P. Houillier. NHE4 is critical for the renal handling of ammonia in rodents. *J Clin Invest*, 120(6):1895–1904, Jun 2010.
 - [14] C. R. Brooks, M. Y. Yeung, Y. S. Brooks, H. Chen, T. Ichimura, J. M. Henderson, and J. V. Bonventre. KIM-1-/TIM-1-mediated phagocytosis links ATG5-/ULK1-dependent clearance of apoptotic cells to antigen presentation. *EMBO J*, 34(19):2441–2464, Oct 2015.
 - [15] M. Y. Brovko, A. A. Pulin, T. Y. Kustova, V. I. Sholomova, O. A. Loshkareva, M. V. Taranova, and L. V. Kozlovskaya. [Significance of the determination of urinary excretion of kidney injury molecule-1 (KIM-1) in the assessment of the activity and prognosis of chronic glomerulonephritis]. *Ter Arkh*, 88(6):51–57, 2016.
 - [16] M. Burg, L. Stoner, J. Cardinal, and N. Green. Furosemide effect on isolated perfused tubules. *Am J Physiol*, 225(1):119–124, Jul 1973.
 - [17] M. B. Burg. Tubular chloride transport and the mode of action of some diuretics. *Kidney Int*, 9(2):189–197, Feb 1976.
 - [18] R. D. Bülow and P. Boor. Extracellular Matrix in Kidney Fibrosis: More Than Just a Scaffold. *J Histochem Cytochem*, 67(9):643–661, 09 2019.
 - [19] H. Cai, J. Wang, Y. Luo, F. Wang, G. He, G. Zhou, and X. Peng. *Lindera aggregata* intervenes adenine-induced chronic kidney disease by mediating metabolism and TGF-beta/Smad signaling pathway. *Biomed Pharmacother*, 134:111098, Feb 2021.
 - [20] J. Cai, X. Jiao, W. Luo, J. Chen, X. Xu, Y. Fang, X. Ding, and X. Yu. Kidney injury molecule-1 expression predicts structural damage and outcome in histological acute tubular injury. *Ren Fail*, 41(1):80–87, Nov 2019.
 - [21] M. Carlström, C. S. Wilcox, and W. J. Arendshorst. Renal autoregulation in health and disease. *Physiol Rev*, 95(2):405–511, Apr 2015.
 - [22] S. Chakraborty, S. Kaur, S. Guha, and S. K. Batra. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1826(1):129–169, Aug 2012.
 - [23] P. Chomczynski and N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162(1):156–159, Apr 1987.
 - [24] S. T. Chu, H. J. Lin, H. L. Huang, and Y. H. Chen. The hydrophobic pocket of 24p3 protein from mouse uterine luminal fluid: fatty acid and retinol binding activity and predicted structural similarity to lipocalins. *J Pept Res*, 52(5):390–397, Nov 1998.
 - [25] N. P. Curthoys and O. W. Moe. Proximal tubule function and response to acidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(9):1627–1638, Sep 2014.
 - [26] C. de Rouffignac and G. Quamme. Renal magnesium handling and its hormonal

- control. *Physiol Rev*, 74(2):305–322, Apr 1994.
- [27] R. H. DeKruyff, X. Bu, A. Ballesteros, C. Santiago, Y. L. Chim, H. H. Lee, P. Kariola, M. Pichavant, G. G. Kaplan, D. T. Umetsu, G. J. Freeman, and J. M. Casasnovas. T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol*, 184(4):1918–1930, Feb 2010.
 - [28] V. Diwan, A. Mistry, G. Gobe, and L. Brown. Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 68(2):197–207, 2013.
 - [29] V. Diwan, D. Small, K. Kauter, G. C. Gobe, and L. Brown. Gender differences in adenine-induced chronic kidney disease and cardiovascular complications in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 307(11):F1169–1178, Dec 2014.
 - [30] T. D. DuBose, L. R. Pucacco, D. W. Seldin, N. W. Carter, and J. P. Kokko. Micro-electrode determination of pH and PCO₂ in rat proximal tubule after benzolamide: evidence for hydrogen ion secretion. *Kidney Int*, 15(6):624–629, Jun 1979.
 - [31] M. Echbarthi, M. Zonca, R. Mellwig, Y. Schwab, G. Kaplan, R. H. DeKruyff, P. Roda-Navarro, and J. M. Casasnovas. Distinct Trafficking of Cell Surface and Endosomal TIM-1 to the Immune Synapse. *Traffic*, 16(11):1193–1207, Nov 2015.
 - [32] R. G. Evans, J. A. Smith, C. Wright, B. S. Gardiner, D. W. Smith, and A. D. Cochrane. Urinary oxygen tension: a clinical window on the health of the renal medulla? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 306(1):45–50, Jan 2014.
 - [33] D. Feigelson, P. Thompson, P. Mattoo, Y. Zhang, and G. G. Kaplan. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol*, 72(8):6621–6628, Aug 1998.
 - [34] D. Feigelson, P. Thompson, P. Mattoo, Y. Zhang, and G. G. Kaplan. The human homolog of HAVcr-1 codes for a hepatitis A virus cellular receptor. *J Virol*, 72(8):6621–6628, Aug 1998.
 - [35] R. A. Fenton and M. A. Knepper. Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev*, 87(4):1083–1112, Oct 2007.
 - [36] M. A. A. Fuchs, K. A. E. Broeker, J. Schrankl, N. Burzlaff, C. Willam, C. Wagner, and A. Kurtz. Inhibition of transforming growth factor beta1 signaling in resident interstitial cells attenuates profibrotic gene expression and preserves erythropoietin production during experimental kidney fibrosis in mice. *Kidney Int*, 100(1):122–137, Jul 2021.
 - [37] E. Garay-Rojas, M. Harper, S. Hraba-Renevey, and M. Kress. An apparent autocrine mechanism amplifies the dexamethasone- and retinoic acid-induced expression of mouse lipocalin-encoding gene 24p3. *Gene*, 170(2):173–180, May 1996.
 - [38] F. Genovese, A. A. Manresa, D. J. Leeming, M. A. Karsdal, and P. Boor. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair*, 7(1):4, Mar 2014.

- [39] N. Ghionzoli, C. Sciaccaluga, G. E. Mandoli, G. Vergaro, F. Gentile, F. D’Ascenzi, S. Mondillo, M. Emdin, S. Valente, and M. Cameli. Cardiogenic shock and acute kidney injury: the rule rather than the exception. *Heart Fail Rev*, 26(3):487–496, May 2021.
- [40] A. Gil, V. Brod, H. Awad, S. N. Heyman, Z. Abassi, and V. Frajewicki. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in a triphasic rat model of adenine-induced kidney injury. *Ren Fail*, 38(9):1448–1454, Oct 2016.
- [41] D. H. Goetz, S. T. Willie, R. S. Armen, T. Bratt, N. Borregaard, and R. K. Strong. Ligand preference inferred from the structure of neutrophil gelatinase associated lipocalin. *Biochemistry*, 39(8):1935–1941, Feb 2000.
- [42] T. Gohda, N. Kamei, T. Koshida, M. Kubota, K. Tanaka, Y. Yamashita, E. Adachi, S. Ichikawa, M. Murakoshi, S. Ueda, and Y. Suzuki. Circulating kidney injury molecule-1 as a biomarker of renal parameters in diabetic kidney disease. *J Diabetes Investig*, 11(2):435–440, Mar 2020.
- [43] R. Greger and E. Schlatter. Presence of luminal K⁺, a prerequisite for active NaCl transport in the cortical thick ascending limb of Henle’s loop of rabbit kidney. *Pflügers Arch*, 392(1):92–94, Nov 1981.
- [44] R. Greite, A. Thorenz, R. Chen, M. S. Jang, S. Rong, M. J. Brownstein, S. Tewes, L. Wang, B. Baniassad, T. Kirsch, J. H. Bräsen, R. Lichtinghagen, M. Meier, H. Haller, K. Hueper, and F. Gueler. Renal ischemia-reperfusion injury causes hypertension and renal perfusion impairment in the CD1 mice which promotes progressive renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 314(5):F881–F892, 05 2018.
- [45] Hideto Okada H., Yawata T., Uyama H., Ozono S., Motomiya Y., and Hirao Y. Reversibility of adenine-induced renal failure in rats. *Clinical Experimental Nephrology*, 3(2):82–88, 1999.
- [46] M. Han, Y. Li, M. Liu, Y. Li, and B. Cong. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol*, 13:25, Jun 2012.
- [47] W. K. Han, V. Bailly, R. Abichandani, R. Thadhani, and J. V. Bonventre. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*, 62(1):237–244, Jul 2002.
- [48] W. K. Han, V. Bailly, R. Abichandani, R. Thadhani, and J. V. Bonventre. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int*, 62(1):237–244, Jul 2002.
- [49] W. K. Han, S. S. Waikar, A. Johnson, R. A. Betensky, C. L. Dent, P. Devarajan, and J. V. Bonventre. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int*, 73(7):863–869, Apr 2008.
- [50] K. Helanova, J. Spinar, and J. Parenica. Diagnostic and prognostic utility of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in patients with cardiovascular

- diseases—review. *Kidney Blood Press Res*, 39(6):623–629, 2014.
- [51] T. H. Hostetter. Progression of renal disease and renal hypertrophy. *Annu Rev Physiol*, 57:263–278, 1995.
 - [52] H. L. Huang, S. T. Chu, and Y. H. Chen. Ovarian steroids regulate 24p3 expression in mouse uterus during the natural estrous cycle and the preimplantation period. *J Endocrinol*, 162(1):11–19, Jul 1999.
 - [53] C. S. Hummel, C. Lu, D. D. Loo, B. A. Hirayama, A. A. Voss, and E. M. Wright. Glucose transport by human renal Na⁺/D-glucose cotransporters SGLT1 and SGLT2. *Am J Physiol Cell Physiol*, 300(1):14–21, Jan 2011.
 - [54] B. D. Humphreys, F. Xu, V. Sabbisetti, I. Grgic, S. Movahedi Naini, N. Wang, G. Chen, S. Xiao, D. Patel, J. M. Henderson, T. Ichimura, S. Mou, S. Soeung, A. P. McMahon, V. K. Kuchroo, and J. V. Bonventre. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J Clin Invest*, 123(9):4023–4035, Sep 2013.
 - [55] B. D. Humphreys, F. Xu, V. Sabbisetti, I. Grgic, S. Movahedi Naini, N. Wang, G. Chen, S. Xiao, D. Patel, J. M. Henderson, T. Ichimura, S. Mou, S. Soeung, A. P. McMahon, V. K. Kuchroo, and J. V. Bonventre. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J Clin Invest*, 123(9):4023–4035, Sep 2013.
 - [56] V. Hvidberg, C. Jacobsen, R. K. Strong, J. B. Cowland, S. K. Moestrup, and N. Borregaard. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett*, 579(3):773–777, Jan 2005.
 - [57] T. Ichimura, J. V. Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C. A. Hession, R. L. Cate, and M. Sanicola. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem*, 273(7):4135–4142, Feb 1998.
 - [58] T. Ichimura, J. V. Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C. A. Hession, R. L. Cate, and M. Sanicola. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem*, 273(7):4135–4142, Feb 1998.
 - [59] T. Ichimura, J. V. Bonventre, V. Bailly, H. Wei, C. A. Hession, R. L. Cate, and M. Sanicola. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem*, 273(7):4135–4142, Feb 1998.
 - [60] T. Ichimura, C. C. Hung, S. A. Yang, J. L. Stevens, and J. V. Bonventre. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 286(3):F552–563, Mar 2004.
 - [61] T. Ichimura, E. J. Asseldonk, B. D. Humphreys, L. Gunaratnam, J. S. Duffield, and

- J. V. Bonventre. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest*, 118(5):1657–1668, May 2008.
- [62] M. Imai and K. Yoshitomi. Heterogeneity of the descending thin limb of Henle’s loop. *Kidney Int*, 38(4):687–694, Oct 1990.
- [63] T. Jia, H. Olauson, K. Lindberg, R. Amin, K. Edvardsson, B. Lindholm, G. Andersson, A. Wernerson, Y. Sabbagh, S. Schiavi, and T. E. Larsson. A novel model of adenine-induced tubulointerstitial nephropathy in mice. *BMC Nephrol*, 14:116, May 2013.
- [64] E. Joyce, P. Glasner, S. Ranganathan, and A. Swiatecka-Urban. Tubulointerstitial nephritis: diagnosis, treatment, and monitoring. *Pediatr Nephrol*, 32(4):577–587, 04 2017.
- [65] L. P. Kane. T cell Ig and mucin domain proteins and immunity. *J Immunol*, 184(6):2743–2749, Mar 2010.
- [66] G. Kaplan, A. Totsuka, P. Thompson, T. Akatsuka, Y. Moritsugu, and S. M. Feinstone. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. *EMBO J*, 15(16):4282–4296, Aug 1996.
- [67] T. A. Karmakova, N. S. Sergeeva, K. Y. Kanukoev, B. Y. Alekseev, and A. D. Kaprin. Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1): a Multifunctional Glycoprotein and Biological Marker (Review). *Sovrem Tekhnologii Med*, 13(3):64–78, 2021.
- [68] Z. Khan and M. Pandey. Role of kidney biomarkers of chronic kidney disease: An update. *Saudi J Biol Sci*, 21(4):294–299, Sep 2014.
- [69] S. Kieferle, P. Fong, M. Bens, A. Vandewalle, and T. J. Jentsch. Two highly homologous members of the ClC chloride channel family in both rat and human kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(15):6943–6947, Jul 1994.
- [70] J. E. Kieswich, J. Chen, S. Alliouachene, P. W. Caton, K. McCafferty, C. Thiernemann, and M. M. Yaqoob. A novel model of reno-cardiac syndrome in the C57BL/6 mouse strain. *BMC Nephrol*, 19(1):346, 12 2018.
- [71] L. Kjeldsen, J. B. Cowland, and N. Borregaard. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta*, 1482(1-2):272–283, Oct 2000.
- [72] G. J. Ko, D. N. Grigoryev, D. Linfert, H. R. Jang, T. Watkins, C. Cheadle, L. Racusen, and H. Rabb. Transcriptional analysis of kidneys during repair from AKI reveals possible roles for NGAL and KIM-1 as biomarkers of AKI-to-CKD transition. *Am J Physiol Renal Physiol*, 298(6):F1472–1483, Jun 2010.
- [73] T. Koeda, K. Wakaki, F. Koizumi, T. Yokozawa, and H. Oura. Early changes of proximal tubules in the kidney of adenine-ingesting rats, with special reference to biochemical and electron microscopic studies. *Nihon Jinzo Gakkai Shi*, 30(3):239–246, Mar 1988.

- [74] M. Kukida, H. Sawada, A. Daugherty, and H. S. Lu. Megalin: A bridge connecting kidney, the renin-angiotensin system, and atherosclerosis. *Pharmacol Res*, 151: 104537, 01 2020.
- [75] G. S. Kuncio, E. G. Neilson, and T. Haverty. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int*, 39(3):550–556, Mar 1991.
- [76] J. Leonard-Duke, S. Evans, R. T. Hannan, T. H. Barker, J. H. T. Bates, C. A. Bonham, B. B. Moore, D. E. Kirschner, and S. M. Peirce. Multi-scale models of lung fibrosis. *Matrix Biol*, 91-92:35–50, 09 2020.
- [77] Q. Lin, Y. Chen, J. Lv, H. Zhang, J. Tang, L. Gunaratnam, X. Li, and L. Yang. Kidney injury molecule-1 expression in IgA nephropathy and its correlation with hypoxia and tubulointerstitial inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306(8): F885–895, Apr 2014.
- [78] Y. Liu. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol*, 7 (12):684–696, Oct 2011.
- [79] J. Lu, L. Lin, C. Ye, Q. Tao, M. Cui, S. Zheng, D. Zhu, L. Liu, and Y. Xue. Serum NGAL Is Superior to Cystatin C in Predicting the Prognosis of Acute-on-Chronic Liver Failure. *Ann Hepatol*, 18(1):155–164, 2019.
- [80] R. Lüllmann-Rauch. *Taschenlehrbuch Histologie*, pages 491–516. 2015.
- [81] J. Mason, J. Torhorst, and J. Welsch. Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int*, 26(3):283–293, Sep 1984.
- [82] B. Medic, B. Rovcanin, G. Basta Jovanovic, S. Radojevic-Skodric, and M. Prostran. Kidney Injury Molecule-1 and Cardiovascular Diseases: From Basic Science to Clinical Practice. *Biomed Res Int*, 2015:854070, 2015.
- [83] P. Meneton, J. Loffing, and D. G. Warnock. Sodium and potassium handling by the aldosterone-sensitive distal nephron: the pivotal role of the distal and connecting tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(4):593–601, Oct 2004.
- [84] J. Mishra, Q. Ma, A. Prada, M. Mitsnefes, K. Zahedi, J. Yang, J. Barasch, and P. Devarajan. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 14(10):2534–2543, Oct 2003.
- [85] M. M. Mitsnefes, T. S. Kathman, J. Mishra, J. Kartal, P. R. Khoury, T. L. Nickolas, J. Barasch, and P. Devarajan. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*, 22(1):101–108, Jan 2007.
- [86] D. G. Moledina and C. R. Parikh. Phenotyping of Acute Kidney Injury: Beyond Serum Creatinine. *Semin Nephrol*, 38(1):3–11, 01 2018.
- [87] K. Mori, H. T. Lee, D. Rapoport, I. R. Drexler, K. Foster, J. Yang, K. M. Schmidt-Ott, X. Chen, J. Y. Li, S. Weiss, J. Mishra, F. H. Cheema, G. Markowitz, T. Suganami, K. Sawai, M. Mukoyama, C. Kunis, V. D’Agati, P. Devarajan, and J. Barasch.

- Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 115(3):610–621, Mar 2005.
- [88] K. Mori, H. T. Lee, D. Rapoport, I. R. Drexler, K. Foster, J. Yang, K. M. Schmidt-Ott, X. Chen, J. Y. Li, S. Weiss, J. Mishra, F. H. Cheema, G. Markowitz, T. Suganami, K. Sawai, M. Mukoyama, C. Kunis, V. D’Agati, P. Devarajan, and J. Barasch. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 115(3):610–621, Mar 2005.
- [89] D. B. Mount. Thick ascending limb of the loop of Henle. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(11):1974–1986, Nov 2014.
- [90] D. B. Mount and G. Gamba. Renal potassium-chloride cotransporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10(5):685–691, Sep 2001.
- [91] M. M. Mozes, E. P. Böttinger, T. A. Jacot, and J. B. Kopp. Renal expression of fibrotic matrix proteins and of transforming growth factor-beta (TGF-beta) isoforms in TGF-beta transgenic mice. *J Am Soc Nephrol*, 10(2):271–280, Feb 1999.
- [92] A. Nemmar, T. Karaca, S. Beegam, P. Yuvaraju, J. Yasin, and B. H. Ali. Lung Oxidative Stress, DNA Damage, Apoptosis, and Fibrosis in Adenine-Induced Chronic Kidney Disease in Mice. *Front Physiol*, 8:896, 2017.
- [93] M. Nie, M. S. Bal, Z. Yang, J. Liu, C. Rivera, A. Wenzel, B. B. Beck, K. Sakhaee, D. K. Marciano, and M. T. Wolf. Mucin-1 Increases Renal TRPV5 Activity In Vitro, and Urinary Level Associates with Calcium Nephrolithiasis in Patients. *J Am Soc Nephrol*, 27(11):3447–3458, Nov 2016.
- [94] S. Nielsen, C. L. Chou, D. Marples, E. I. Christensen, B. K. Kishore, and M. A. Knepper. Vasopressin increases water permeability of kidney collecting duct by inducing translocation of aquaporin-CD water channels to plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(4):1013–1017, Feb 1995.
- [95] S. Nielsen, T. Pallone, B. L. Smith, E. I. Christensen, P. Agre, and A. B. Maunsbach. Aquaporin-1 water channels in short and long loop descending thin limbs and in descending vasa recta in rat kidney. *Am J Physiol*, 268(6):1023–1037, Jun 1995.
- [96] N. Nowak, J. Skupien, M. A. Niewczas, M. Yamanouchi, M. Major, S. Croall, A. Smiles, J. H. Warram, J. V. Bonventre, and A. S. Krolewski. Increased plasma kidney injury molecule-1 suggests early progressive renal decline in non-proteinuric patients with type 1 diabetes. *Kidney Int*, 89(2):459–467, Feb 2016.
- [97] Y. Nozaki, D. J. Nikolic-Paterson, H. Yagita, H. Akiba, S. R. Holdsworth, and A. R. Kitching. Tim-1 promotes cisplatin nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301(5):F1098–1104, Nov 2011.
- [98] H. C. Owen, S. J. Roberts, S. F. Ahmed, and C. Farquharson. Dexamethasone-induced expression of the glucocorticoid response gene lipocalin 2 in chondrocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294(6):E1023–1034, Jun 2008.
- [99] H.-C. Pape, A. Kurtz, and S. Silbernagl. *Physiologie*. 2019.

- [100] N. Paragas, A. Qiu, Q. Zhang, B. Samstein, S. X. Deng, K. M. Schmidt-Ott, M. Viltard, W. Yu, C. S. Forster, G. Gong, Y. Liu, R. Kulkarni, K. Mori, A. Kalandadze, A. J. Ratner, P. Devarajan, D. W. Landry, V. D’Agati, C. S. Lin, and J. Barasch. The Ngal reporter mouse detects the response of the kidney to injury in real time. *Nat Med*, 17(2):216–222, Feb 2011.
- [101] E. Parravicini, S. L. Nemerofsky, K. A. Michelson, T. K. Huynh, M. E. Sise, D. A. Bateman, J. M. Lorenz, and J. M. Barasch. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a promising biomarker for late onset culture-positive sepsis in very low birth weight infants. *Pediatr Res*, 67(6):636–640, Jun 2010.
- [102] D. Pearce, R. Soundararajan, C. Trimper, O. B. Kashlan, P. M. Deen, and D. E. Kohan. Collecting duct principal cell transport processes and their regulation. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10(1):135–146, Jan 2015.
- [103] P. A. Preisig, H. E. Ives, E. J. Cragoe, R. J. Alpern, and F. C. Rector. Role of the Na^+/H^+ antiporter in rat proximal tubule bicarbonate absorption. *J Clin Invest*, 80(4):970–978, Oct 1987.
- [104] W. P. Pulskens, M. Verkaik, F. Sheedfar, E. P. van Loon, B. van de Sluis, M. G. Vervloet, J. G. Hoenderop, and R. J. Bindels. Deregulated Renal Calcium and Phosphate Transport during Experimental Kidney Failure. *PLoS One*, 10(11):e0142510, 2015.
- [105] M. P. Pusztaszeri, W. Seelentag, and F. T. Bosman. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem*, 54(4):385–395, Apr 2006.
- [106] C. Qi, X. Mao, Z. Zhang, and H. Wu. Classification and Differential Diagnosis of Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*, 2017:8637138, 2017.
- [107] A. Rahman, D. Yamazaki, A. Sufiun, K. Kitada, H. Hitomi, D. Nakano, and A. Nishiyama. A novel approach to adenine-induced chronic kidney disease associated anemia in rodents. *PLoS One*, 13(2):e0192531, 2018.
- [108] F. C. Rector. Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by the proximal tubule. *Am J Physiol*, 244(5):F461–471, May 1983.
- [109] J. Rysz, A. Gluba-Brzózka, B. Franczyk, Z. Jabłonowski, and A. Ciałkowska-Rysz. Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. *Int J Mol Sci*, 18(8), Aug 2017.
- [110] V. S. Sabbisetti, S. S. Waikar, D. J. Antoine, A. Smiles, C. Wang, A. Ravisankar, K. Ito, S. Sharma, S. Ramadesikan, M. Lee, R. Briskin, P. L. De Jager, T. T. Ngo, M. Radlinski, J. W. Dear, K. B. Park, R. Betensky, A. S. Krolewski, and J. V. Bonventre. Blood kidney injury molecule-1 is a biomarker of acute and chronic kidney injury and predicts progression to ESRD in type I diabetes. *J Am Soc Nephrol*, 25(10):2177–2186, Oct 2014.
- [111] C. Santiago, A. Ballesteros, C. Tami, L. Martínez-Muñoz, G. G. Kaplan, and J. M.

- Casasnovas. Structures of T Cell immunoglobulin mucin receptors 1 and 2 reveal mechanisms for regulation of immune responses by the TIM receptor family. *Immunity*, 26(3):299–310, Mar 2007.
- [112] B. Satirapoj, P. Pooluea, N. Nata, and O. Supasynhdh. Urinary biomarkers of tubular injury to predict renal progression and end stage renal disease in type 2 diabetes mellitus with advanced nephropathy: A prospective cohort study. *J Diabetes Complications*, 33(9):675–681, 09 2019.
- [113] K. M. Schmidt-Ott. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury—where do we stand today? *Nephrol Dial Transplant*, 26(3):762–764, Mar 2011.
- [114] K. M. Schmidt-Ott, K. Mori, J. Y. Li, A. Kalandadze, D. J. Cohen, P. Devarajan, and J. Barasch. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*, 18(2):407–413, Feb 2007.
- [115] A. Schreiber, A. Rousselle, J. Klocke, S. Bachmann, S. Popovic, J. Bontscho, K. M. Schmidt-Ott, V. Siffrin, U. Jerke, M. I. Ashraf, U. Panzer, and R. Kettritz. Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin Protects from ANCA-Induced GN by Inhibiting TH17 Immunity. *J Am Soc Nephrol*, 31(7):1569–1584, 07 2020.
- [116] E. V. Schrezenmeier, J. Barasch, K. Budde, T. Westhoff, and K. M. Schmidt-Ott. Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol (Oxf)*, 219(3):554–572, 03 2017.
- [117] F. S. Seibert, M. Sitz, J. Passfall, M. Haesner, P. Laschinski, M. Buhl, F. Bauer, N. Babel, N. Pagonas, and T. H. Westhoff. Prognostic Value of Urinary Calprotectin, NGAL and KIM-1 in Chronic Kidney Disease. *Kidney Blood Press Res*, 43(4):1255–1262, 2018.
- [118] H. Sethi, P. Srinivasan, G. Marangoni, A. Prachalias, M. Rela, and N. Heaton. Pancreaticoduodenectomy with radical lymphadenectomy is not contraindicated for patients with established chronic liver disease and portal hypertension. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.*, 7(1):82–85, Feb 2008.
- [119] N. Shah, S. Al-Khoury, B. Afzali, A. Covic, A. Roche, J. Marsh, I. C. Macdougall, and D. J. Goldsmith. Posttransplantation anemia in adult renal allograft recipients: prevalence and predictors. *Transplantation*, 81(8):1112–1118, Apr 2006.
- [120] D. B. Simon, F. E. Karet, J. M. Hamdan, A. DiPietro, S. A. Sanjad, and R. P. Lifton. Bartter’s syndrome, hypokalaemic alkalosis with hypercalciuria, is caused by mutations in the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *Nat Genet*, 13(2):183–188, Jun 1996.
- [121] E. Singer, E. V. Schrezenmeier, A. Elger, E. R. Seelow, A. Krannich, F. C. Luft, and K. M. Schmidt-Ott. Urinary NGAL-Positive Acute Kidney Injury and Poor Long-term Outcomes in Hospitalized Patients. *Kidney Int Rep*, 1(3):114–124, Sep 2016.

- [122] S. P. Stoesz, A. Friedl, J. D. Haag, M. J. Lindstrom, G. M. Clark, and M. N. Gould. Heterogeneous expression of the lipocalin NGAL in primary breast cancers. *Int J Cancer*, 79(6):565–572, Dec 1998.
- [123] A. R. Subramanya and D. H. Ellison. Distal convoluted tubule. *Clin J Am Soc Nephrol*, 9(12):2147–2163, Dec 2014.
- [124] M. Sueyoshi, M. Fukunaga, M. Mei, A. Nakajima, G. Tanaka, T. Murase, Y. Narita, S. Hirata, and D. Kadowaki. Effects of lactulose on renal function and gut microbiota in adenine-induced chronic kidney disease rats. *Clin Exp Nephrol*, 23(7):908–919, Jul 2019.
- [125] T. Tanaka, K. Doi, R. Maeda-Mamiya, K. Negishi, D. Portilla, T. Sugaya, T. Fujita, and E. Noiri. Urinary L-type fatty acid-binding protein can reflect renal tubulointerstitial injury. *Am J Pathol*, 174(4):1203–1211, Apr 2009.
- [126] J. Thompson and R. A. Khalil. Gender differences in the regulation of vascular tone. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 30(1-2):1–15, 2003.
- [127] R. Torres, H. Velazquez, J. J. Chang, M. J. Levene, G. Moeckel, G. V. Desir, and R. Safirstein. Three-Dimensional Morphology by Multiphoton Microscopy with Clearing in a Model of Cisplatin-Induced CKD. *J Am Soc Nephrol*, 27(4):1102–1112, Apr 2016.
- [128] S. Triebel, J. Bläser, H. Reinke, and H. Tschesche. A 25 kDa alpha 2-microglobulin-related protein is a component of the 125 kDa form of human gelatinase. *FEBS Lett*, 314(3):386–388, Dec 1992.
- [129] Le Cabec V., Cowland J. B., Calafat J., and Borregaard N. Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophil granules when expressed in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(13):6454–6458, Jun 1996.
- [130] V. S. Vaidya, V. Ramirez, T. Ichimura, N. A. Bobadilla, and J. V. Bonventre. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 290(2):F517–529, Feb 2006.
- [131] V. Vallon, K. A. Platt, R. Cunard, J. Schroth, J. Whaley, S. C. Thomson, H. Kopsell, and T. Rieg. SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*, 22(1):104–112, Jan 2011.
- [132] M. M. van Timmeren, V. S. Vaidya, R. M. van Ree, L. H. Oterdoom, A. P. de Vries, R. O. Gans, H. van Goor, C. A. Stegeman, J. V. Bonventre, and S. J. Bakker. High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of graft loss in renal transplant recipients. *Transplantation*, 84(12):1625–1630, Dec 2007.
- [133] A. Viau, K. El Karoui, D. Laouari, M. Burtin, C. Nguyen, K. Mori, E. Pillebout, T. Berger, T. W. Mak, B. Knebelmann, G. Friedlander, J. Barasch, and F. Terzi. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest*, 120(11):4065–4076, Nov 2010.

- [134] F. Wang, J. Flanagan, N. Su, L. C. Wang, S. Bui, A. Nielson, X. Wu, H. T. Vo, X. J. Ma, and Y. Luo. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 14(1):22–29, Jan 2012.
- [135] Y. Wang, M. Jia, X. Yan, L. Cao, P. J. Barnes, I. M. Adcock, M. Huang, and X. Yao. Increased neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) promotes airway remodelling in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Sci (Lond)*, 131(11):1147–1159, Jun 2017.
- [136] M. Wolf. Forging forward with 10 burning questions on FGF23 in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 21(9):1427–1435, Sep 2010.
- [137] Y. Yamanishi, J. Kitaura, K. Izawa, A. Kaitani, Y. Komeno, M. Nakamura, S. Yamazaki, Y. Enomoto, T. Oki, H. Akiba, T. Abe, T. Komori, Y. Morikawa, H. Kiyonari, T. Takai, K. Okumura, and T. Kitamura. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J Exp Med*, 207(7):1501–1511, Jul 2010.
- [138] J. Yang, K. Mori, J. Y. Li, and J. Barasch. Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285(1):9–18, Jul 2003.
- [139] L. Yang, C. R. Brooks, S. Xiao, V. Sabbisetti, M. Y. Yeung, L. L. Hsiao, T. Ichimura, V. Kuchroo, and J. V. Bonventre. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. *J Clin Invest*, 125(4):1620–1636, Apr 2015.
- [140] T. Yokozawa, H. Oura, and T. Okada. Metabolic effects of dietary purine in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 28(5):519–526, Oct 1982.
- [141] T. Yokozawa, P. D. Zheng, H. Oura, and F. Koizumi. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron*, 44(3):230–234, 1986.
- [142] K. Yoshikawa, M. Iwasa, A. Eguchi, S. Kojima, N. Yoshizawa, M. Tempaku, R. Sugimoto, N. Yamamoto, K. Sugimoto, Y. Kobayashi, H. Hasegawa, and Y. Takei. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin level is a prognostic factor for survival in rat and human chronic liver diseases. *Hepatol Commun*, 1(9):946–956, 11 2017.
- [143] P. L. Zhang, L. I. Rothblum, W. K. Han, T. M. Blasick, S. Potdar, and J. V. Bonventre. Kidney injury molecule-1 expression in transplant biopsies is a sensitive measure of cell injury. *Kidney Int*, 73(5):608–614, Mar 2008.
- [144] P. X. Zhang, F. R. Zhang, J. J. Xie, L. H. Tao, Z. Lü, X. E. Xu, J. Shen, L. Y. Xu, and E. M. Li. Expression of NGAL and NGALR in human embryonic, fetal and normal adult tissues. *Mol Med Rep*, 6(4):716–722, Oct 2012.
- [145] Y. Zhang, Y. Fan, and Z. Mei. NGAL and NGALR overexpression in human hepatocellular carcinoma toward a molecular prognostic classification. *Cancer Epidemiol*, 36(5):e294–299, Oct 2012.
- [146] Z. Zhang and C. X. Cai. Kidney injury molecule-1 (KIM-1) mediates renal epithelial cell repair via ERK MAPK signaling pathway. *Mol Cell Biochem*, 416(1-2):109–116, May 2016.

- [147] X. Zhao, Y. Zhang, L. Li, D. Mann, J. D. Imig, N. Emmett, G. Gibbons, and L. M. Jin. Glomerular expression of kidney injury molecule-1 and podocytopenia in diabetic glomerulopathy. *Am J Nephrol*, 34(3):268–280, 2011.
- [148] A. Zuk and J. V. Bonventre. Acute Kidney Injury. *Annu Rev Med*, 67:293–307, 2016.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all jenen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Armin Kurtz und Frau Prof. Dr. Charlotte Wagner für die Möglichkeit in Ihrem Labor arbeiten und forschen zu dürfen. Ich möchte mich bedanken für die wertvollen Anregungen und Gespräche, die diese Arbeit erst zum Erfolg geführt haben.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Katharina Broecker bedanken, die mir mit vielen Ratschläge und mit großer Geduld zur Seite stand. Ich danke Ihr dafür, dass Sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich mit konstruktiver Kritik stets motiviert und inspiriert hat. Vielen Dank für die Anleitung und Betreuung rundum diese Dissertation.

Ich danke auch Dr. Michaela Fuchs und Dr. Julia Schrankl, die mich mit ihrer Expertise bei technischen sowie praktischen Fragen unterstützt haben.

Vielen Dank auch an Susanne Fink, die mir vor allem in der Anfangsphase meiner Forschungsarbeit viel geholfen hat und mich beim Erlernen der Methoden unterstützt hat. Ich danke für die schönen Momente im Labor, ohne die das Forschen nicht halb so viel Spaß gemacht hätte.

Ohne das Zutun meiner Eltern und Geschwister würde ich heute nicht an der Stelle stehen, wo ich bin. Ich danke Euch von Herzen für eure Begleitung und Unterstützung. Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle meinem Vater Benno danken, der mir mit seinem großen Wissen stets zur Seite stand.

Vielen Dank an alle die mich auf diesem Weg begleitet haben. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Pascal Nafz

Curriculum Vitae

Bismarckplatz 2
93047 Regensburg
✉ Pascal.Nafz@stud.uni-regensburg.de

Persönliche Daten

Geburtstag: 16.11.1999
Geburtsort: Heidelberg

Ausbildung

2023–jetzt **Universität**, Universität Regensburg, katholische Theologie (Magisterstudium)
2019–2023 **Universität**, Universität Regensburg, Humanmedizin Klinikum
Ärztlichen Prüfung (17.11.2023): Gesamtnote gut (1,83)
Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (17.11.2023): 2
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (11.-13.10.2022): 2
2019–2022 **Universität**, Universität Regensburg, katholische Theologie (Magisterstudium)
2017–2019 **Universität**, Universität Regensburg, Humanmedizin Vorklinikum
Physikum: 1,5
2011–2017 **Gymnasium**, Hedwig-Bollhagen-Gymnasium, Velten
Abitur: 1,0
2007–2011 **Grundschule**, Löwenzahn-Grundschule, Velten
2005–2007 **Grundschule**, Kolumbus-Grundschule, Alt-Reinikendorf (Berlin)

Arbeitserfahrung

2021 **Universität Regensburg**, *Institut für Physiologie*, Durchführung der Versuche für meine Dissertation zum Thema „Adenininduzierte Nierenschädigungen in Mäusen: Bedeutung, Expressionsstärke und Lokalisation von LCN2 und Kim1.“
2019–2020 **Charité Berlin**, *Referat für Studienangelegenheiten*, Für die Zulassungsprüfung zum Medizin- und Zahnmedizinstudium (HamNat): Vorbereitung, Durchführung und Ergebnisermittlung für ca. 1000 Teilnehmer/Prüfung

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache	
Englisch	Zweitsprache	3te bis 12te Klasse
Französisch	Zweitsprache	6te bis 12te Klasse
Latein	Latinum	9te bis 12te Klasse
Altgriechisch	Griechisch für Theologen	2 Semester

Die vorliegende Arbeit wurde inspiriert von Herrn Prof. Dr. med. Armin Kurtz und Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner. Die Ausarbeitung erfolgte unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner und Frau Dr. rer. nat. Katharina Broeker im Zeitraum von April 2021 bis Mai 2024 am Institut für Physiologie der Universität Regensburg.

Selbstständigkeitserklärung

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- beziehungsweise Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Pascal Nafz