

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

# **Einfluss extrazellulärer Histone auf die Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen**

## **Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Lukas Stefan Adrian Rath**

München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Siebels

Mitberichterstatter: Prof. Dr. K. Lauber

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Schmolke

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. hum. biol. Julian Marschner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2020

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2016 bis November 2017 in der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV des Klinikums der Universität München durchgeführt.

Betreut wurde diese Dissertation durch Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders.

### **Aus dem Projekt hervorgegangene Veröffentlichungen:**

#### **Publikationen**

Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI.

Nakazawa D, Kumar SV, Marschner J, Desai J, Holderied A, Rath L, Kraft F, Lei Y, Fukasawa Y, Moeckel GW, Angelotti ML, Liapis H, Anders HJ.

J Am Soc Nephrol. 2017 Jun;28(6):1753-1768. doi: 10.1681/ASN.2016080925. Epub 2017 Jan 10.

PMID: 28073931

#### **Vorträge**

ERA-EDTA 2017 Best Poster Präsentationsrunde:

Anti-histone IgG attenuates CKD upon AKI related to postischemic tubular necrosis in mice.

Rath, Lukas; Marschner, Julian; Holderied, Alexander; *et al.*

NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION Volume: 32 Supplement: 3 Meeting Abstract:

MP235 Published: MAY 2017

Nephrologie Fellow's Night 2017:

Therapie der akuten ischämischen Nierenschädigung zur Verbesserung der Langzeitprognose und Identifizierung eines therapeutischen "window of opportunity"

Rath, Lukas

#### **Auszeichnungen**

ERA-EDTA 2017 Best Poster Award in "Experimental AKI session"

### **Rechtliche Grundlage der Tierversuche**

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffe an Versuchstieren wurde darauf geachtet, entsprechend der 3R-Prinzipien (replacement, reduction, refinement) das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt worden (Tierversuchsantrag ROB-55.2-Vet-2532.Vet\_02-14-175).

### **Förderung des Projekts**

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ durch das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der LMU München unterstützt (FöFoLe 2015, Projekt-Nr. 02 – Therapie der Histon-vermittelten Nekroinflammation).

# INHALTSVERZEICHNIS

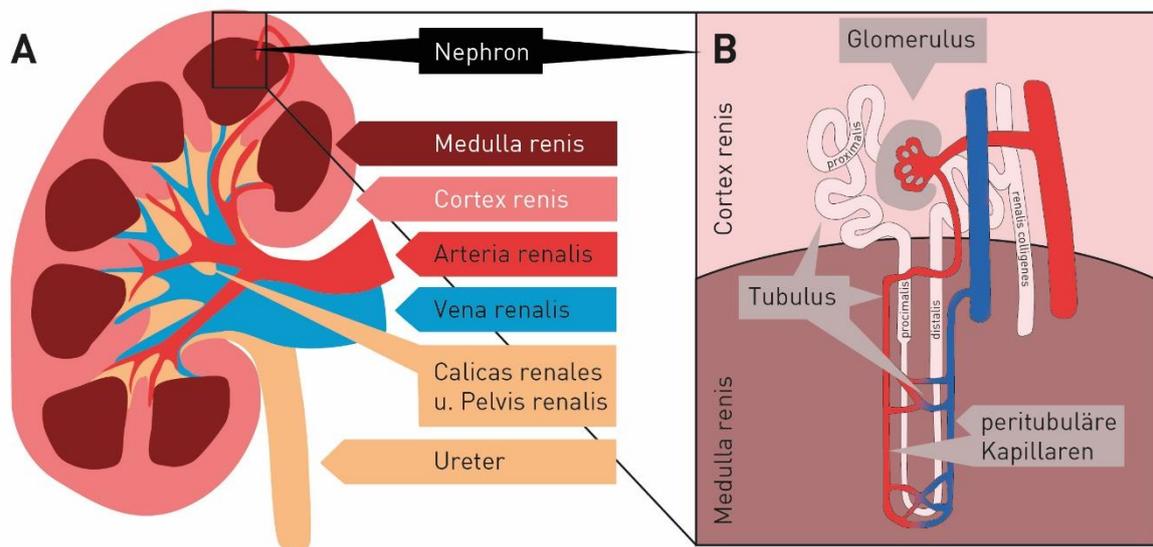
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	ANATOMIE UND FUNKTION DER NIERE.....	1
1.2	AKUTE NIERENSCHÄDIGUNG .....	2
1.3	CHRONISCHES NIERENVERSAGEN .....	4
1.4	PROGRESSION VON AKUTEM ZU CHRONISCHEM NIERENVERSAGEN.....	5
1.5	DIE IMMUNANTWORT UND REGULIERTE NEKROSE BEI AKUTER NIERENSCHÄDIGUNG .....	8
1.5.1	Sterile Entzündung .....	8
1.5.2	Regulierte Nekrose .....	11
1.5.3	Nekroinflammation .....	16
1.6	HISTONE.....	18
1.6.1	Struktur und Funktion der Histone .....	18
1.6.2	Extrazelluläre Histone .....	19
1.7	MOLEKULARE MECHANISMEN DER PROGRESSION VON AKUTEM ZU CHRONISCHEM NIERENVERSAGEN.....	22
1.8	HYPOTHESE .....	28
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>29</b>
2.1	MATERIAL.....	29
2.1.1	Tierversuche .....	29
2.1.2	Zellkultur .....	30
2.1.3	RNA-Expressionsanalyse .....	33
2.1.4	Proteinnachweis .....	35
2.1.5	Histologie .....	35
2.1.6	Software .....	37
2.3	METHODEN.....	37
2.3.1	Experimentelles Design .....	37
2.3.2	Ischämie-Reperfusion-Operation und Organentnahme .....	38
2.3.3	Blutprobenentnahme, i.v.- und i.p.-Injektion .....	40
2.3.4	Plasmakreatinin- und BUN-Messung .....	40
2.3.5	Messung der glomerulären Filtrationsrate bei Mäusen .....	41
2.3.6	RNA-Analyse .....	43
2.3.7	Zytokin-ELISA .....	45
2.3.8	In vitro- Methoden .....	46
2.3.9	BWA3 Hybridomzellen-Kultur und anti-Histon IgG Aufreinigung .....	47
2.3.10	Überprüfung der anti-Histon IgG-Qualität .....	48
2.3.11	Histologie .....	49
2.3.12	Statistische Auswertung .....	53
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>54</b>
3.1	EFFEKTE DER VERZÖGERTEN ZELLTODINHIBITION AUF NIERENSCHÄDIGUNG .....	54
3.1.1	Auswirkung der verzögerten Zelltodinhhibition auf Nierenfunktion .....	54
3.1.2	Auswirkung der verzögerten Zelltodinhhibition auf Nierenmorphologie .....	55
3.2	EINFLUSS DER ISCHÄMIEZEIT AUF EFFEKT DER ZELLTODINHIBITOREN.....	58
3.2.1	Effekt unterschiedlicher Ischämiezeit auf Wirkung der Zelltodinhhibitoren .....	59
3.2.2	Effekt unterschiedlicher Ischämiezeit auf strukturelle Verbesserung durch Zelltodinhhibitoren .....	60
3.3	WENIG HISTONE VERMINDERN PROLIFERATIONSKAPAZITÄT VON HK2-ZELLEN .....	62
3.3.1	Niedrige Konzentrationen von Histonen reduzieren absolute Zellzahl in Proliferation nach Schädigung .....	63
3.3.2	Niedrige Konzentrationen von Histonen fördern G2/M-Zellzyklusarrest .....	66

3.3.3	Niedrige Konzentrationen von Histonen stimulieren Produktion von TGF- $\beta$	67
3.4	VERBESSERUNG DES KURZZEIT-OUTCOMES DURCH ANTI-HISTON IGG	68
3.4.1	Depletion extrazellulärer Histone durch anti-Histon IgG	69
3.4.2	Effekte von anti-Histon IgG auf Nierenfunktion und Entzündung nach IRI	70
3.4.3	Verbesserung des morphologischen Kurzzeitoutcomes durch anti-Histon IgG	72
3.5	EFFEKTE DES ANTI-HISTON IGG UND ZELLTODINHIBITOREN IM MODELL DES UNI-LATERALEN NIERENVERSAGENS	73
3.5.1	Anti-Histon IgG und Zelltodinhhibitoren ohne Effekt auf Nierenfunktion	74
3.5.2	Anti-Histon IgG und Zelltodinhhibitoren ohne Reduktion der Entzündung	75
3.5.3	Morphologische Evaluation des Effekts von anti-Histon IgG und Zelltod-inhibitoren	77
3.6	VERMINDERTE PROGRESSION ZU CHRONISCHEM NIERENVERSAGEN DURCH ANTI-HISTON IGG	80
3.6.1	Verringerung des Nierenfunktionsverlusts durch präemptives anti-Histon IgG	80
3.6.2	Effekt des anti-Histon IgG auf Entzündung im Langzeitoutcome	81
3.6.3	Reduktion des strukturellen Schadens durch präemptive Histonblockade	83
3.7	EFFEKT VON TRICHOSTATIN-A AUF PROGRESSION ZU CHRONISCHEM NIERENVERSAGEN	87
3.7.1	Kontinuierliche Applikation von TSA ohne Auswirkungen auf GFR	87
3.7.2	Trichostatin-A ohne Reduktion von Entzündung und Fibrose	88
3.7.3	Morphologische Effekte der Therapie mit Trichostatin-A	89
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>109</b>
<b>6</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>115</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>126</b>
<b>10</b>	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>127</b>
<b>11</b>	<b>ÜBEREINSTIMMUNGSERKLÄRUNG</b>	<b>128</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie und Funktion der Niere

Die Niere ist für die Homöostase von Wirbeltieren ein fundamental wichtiges Organ. Ihren Beitrag hierfür leistet sie durch verschiedene physiologische Funktionen wie die Regulierung des Wasser- und Elektrolythaushaltes, die Einstellung des Blutdrucks, den Ausgleich des Säure-Base-Haushalts und die Stimulierung der Erythrozytenproduktion. Folglich kann eine Schädigung oder Funktionseinschränkung der Niere zu schweren Erkrankungen mit hoher Mortalität führen.



**Abbildung 1: Aufbau der Niere**

(A) Die Nieren lassen sich makroskopisch in Rinde (Cortex), Mark (Medulla), Nierenkelche (Calices), Nierenbecken (Pelvis) und der Harnleiter (Ureter) unterteilen und werden durch Nierenarterie und -vene mit Blut versorgt. (B) Über die sich verzweigenden intrarenalen Blutgefäße wird das Blut zum Nephron, der Funktionseinheit der Niere, geleitet. Dieses liegt sowohl in Cortex als auch Medulla und besteht aus Glomerulus und Tubulus, der sich nochmals in verschiedene Abschnitte unterscheiden lässt. Modifiziert nach *Marschner*<sup>1</sup>

Anatomisch sind die Nieren paarig angelegte Organe, die beim Menschen und Maus retroperitoneal liegen. Die Blutversorgung wird durch die Nierenarterie und -vene gewährleistet (Abb. 1A). Das ankommende Blut wird über die sich verzweigenden intrarenalen Blutgefäße zur Funktionseinheit der Niere, dem Nephron, geleitet. Ein gesunder Erwachsener hat abhängig von Faktoren wie Alter und ethnischer Zugehörigkeit zwischen 1-

1,4 Millionen Nephrone pro Niere.<sup>2</sup> Das Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen (*Glomerulus*), das den Primärharn filtriert und einem Nierenkanälchen (*Tubulus*), in dem der Primärharn konzentriert und wichtige Moleküle resorbiert werden (Abb. 1B). Der konzentrierte Harn wird dann über die Nierenkelche und – becken in den Harnleiter transportiert (Abb. 1A). Der Tubulus wird anhand histologischer Lage und Funktion in proximalen Tubulus, Überleitungsstück und distalen Tubulus gegliedert.<sup>3</sup> Der proximale Tubulus kann wiederum in die Segmente S1 (erster, geschwungener Abschnitt nach Glomerulus), S2 (Übergang von postglomerulärem zu geradem Anteil) und S3 (ausschließlich gerader proximaler Tubulus) unterteilt werden.<sup>4</sup> Die in dieser Arbeit untersuchten pathophysiologischen Mechanismen der akuten Nierenschädigung spielen sich hauptsächlich im proximalen Tubulus ab.

## **1.2 Akute Nierenschädigung**

Die akute Nierenschädigung (ANS) ist ein schweres, aber unterschätztes Krankheitsbild, was nicht zuletzt an der 2007 erstmals eingeführten und 2012 zuletzt aktualisierten einheitlichen Definition und Diagnosekriterien liegt<sup>5</sup>. Weltweit ist die ANS eine sehr häufige Krankheit. In einer Metaanalyse aus 312 epidemiologischen Studien, die 49 Millionen akut kranke Patienten untersuchten, zeigte sich eine Inzidenz von 21,6% bei Erwachsenen und 33,7% bei Kindern<sup>6</sup>. Anderen Schätzungen zufolge sterben weltweit jährlich ca. 2 Millionen Menschen an akuter Nierenschädigung<sup>5</sup>. Bei Patienten auf Intensivstation erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für eine ANS maßgeblich, je nach Studie zeigte sich eine Inzidenz von 16-67%<sup>7-10</sup>. Diese unterschiedlichen Werte lassen sich vor allem dadurch erklären, dass bis vor kurzem keine einheitliche Definition und Diagnosekriterien der ANS existierten. Nach mehreren Vorarbeiten stellen die 2012 veröffentlichten Leitlinien der KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) die vorerst letzte allgemeine Definition der ANS dar und sehen für eine akute Nierenschädigung eine Diagnose anhand der funktionellen Parameter Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Serumkreatinin und Urinausscheidung vor.<sup>11,12</sup> Abhängig von der Schwere der Nierenschädigung erfolgt eine Einteilung der ANS in 3 Stadien.

## KDIGO-Kriterien für Akute Nierenschädigung

	Serum-Kreatinin	Urinausscheidung
<b>Stadium 1</b>	> 1,5-1,9 x oder > 0,3 mg/dl	<0,5 ml/kg/h über 6-12h
<b>Stadium 2</b>	>2- bis 2,9-fach	<0,5 ml/kg/h über 12h
<b>Stadium 3*</b>	>3-fach oder > 4mg/dl	<0,3 ml/kg/h über 24h oder 12h Anurie

*\* Bei Einleitung einer Nierenersatztherapie gilt Stadium 3 in jedem Fall als erreicht*

### **Abbildung 2 : Einteilung der akuten Nierenschädigung nach KDIGO-Kriterien**

Die Ursachen der ANS lassen sich in die 3 Gruppen der prärenalen, intrarenalen und postrenalen Nierenschädigung einteilen, wobei gerade bei schwer kranken und Intensiv-Patienten der Übergang zwischen den Ursachen fließend und multifaktoriell bedingt sein kann. Die prärenale Genese ist entweder auf einen Volumenmangel (bei z.B. Blutverlust oder Exikkose), eine Beeinträchtigung der Zirkulation (im Rahmen eines Schocks oder Herzversagens) oder auf eine Vasokonstriktion der afferenten Gefäße (z.B. toxisch bedingt bei hepatorenalem Syndrom) zurückzuführen. Gerade bei kardial beeinträchtigten Patienten, herzchirurgischen Eingriffen oder Sepsis erhöht sich das Risiko für eine prärenale Schädigung<sup>5,13,14</sup>. Die postrenale Nierenschädigung entsteht aufgrund von Harnrückstau bei Beeinträchtigungen der Harnleiter, der Blase oder der Harnröhre. Allgemein lassen sich prä- und postrenale Nierenschädigung meist einigermaßen schnell diagnostizieren und therapieren, so dass eine Schädigung des Nierenparenchyms verhindert und die Nierenfunktion erhalten werden kann<sup>5</sup>. Die intrarenale Nierenschädigung wird anhand der betroffenen Strukturen in akute Glomerulonephritis, akute interstitielle Nephritis, akute Tubulusnekrose und akute Vaskulitis eingeteilt. Als häufigste intrarenale Ursache der ANS gilt die akute Tubulusnekrose (ATN), dies kann jedoch nicht abschließend bewiesen werden, da in der Diagnose oft auf eine Biopsie verzichtet wird.<sup>5,15</sup> Die Auslöser einer ATN sind meist entweder renaler Ischämie-Reperfusionsschaden und Sepsis, aber auch toxische Schäden wie Röntgenkontrastmittel, Medikamente, Schwermetalle oder tubuläre Verstopfungen durch z.B. Rhabdomyolyse können eine akute Tubulusnekrose verursachen. Da die akute Tubulusnekrose sowohl der häufigste Auslöser der intrarenalen Nierenschädigung ist, als auch tierexperimentell durch Modelle des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI,

*ischemia-reperfusion-injury*) gut abgebildet werden kann<sup>16</sup>, behandelt die vorliegende Arbeit experimentell die akute Tubulusnekrose.

Trotz eines zunehmend besseren Verständnisses der sehr diversen pathophysiologischen Vorgänge der ANS hat die Therapie wenig Fortschritte gemacht.<sup>5,17,18</sup> Sie setzt sich zusammen aus der möglichst schnellen Beseitigung des jeweiligen Auslösers, seien es renale Minderperfusion, nephrotoxische Substanzen, postrenale Ursachen oder multifaktorielle Ursachen wie Sepsis oder Schock. Weiterhin sind eine adäquate Volumen- und Flüssigkeitssubstitution zur Aufrechterhaltung der renalen Perfusion und ein Ausgleich von Elektrolytdysbalancen und Blutzucker nötig.<sup>5,11</sup> Bei besonders schweren Verläufen ist auch eine Nierenersatztherapie wie Hämodialyse oder –filtration indiziert.<sup>10,19</sup> Dies hat zwar die Letalität der ANS von vormals fast 90% auf mehr als die Hälfte reduziert, jedoch konnte neben diesen therapeutischen Maßnahmen bisher noch für keine medikamentöse Therapie eine nephroprotektive Wirkung bei der ANS nachgewiesen werden, oder Studien zu ihrer Wirksamkeit waren mit erheblichen methodischen Problemen behaftet<sup>5,15,17,20–24</sup>. So wurden auch in den Leitlinien der KDIGO letztendlich keine medikamentösen Therapien zur Therapie oder Prävention der ANS empfohlen.<sup>11</sup>

Insgesamt stellt das akute Nierenversagen also eine große Aufgabe für das Gesundheitssystem dar. Die lange Zeit unterschätzte Inzidenz, die rein auf Funktionsparameter ausgerichtete Diagnose und die sehr begrenzten Therapieoptionen führen zusammen dazu, dass ein akutes Nierenversagen auch in ein chronisches Nierenversagen übergehen kann.

### **1.3 Chronisches Nierenversagen**

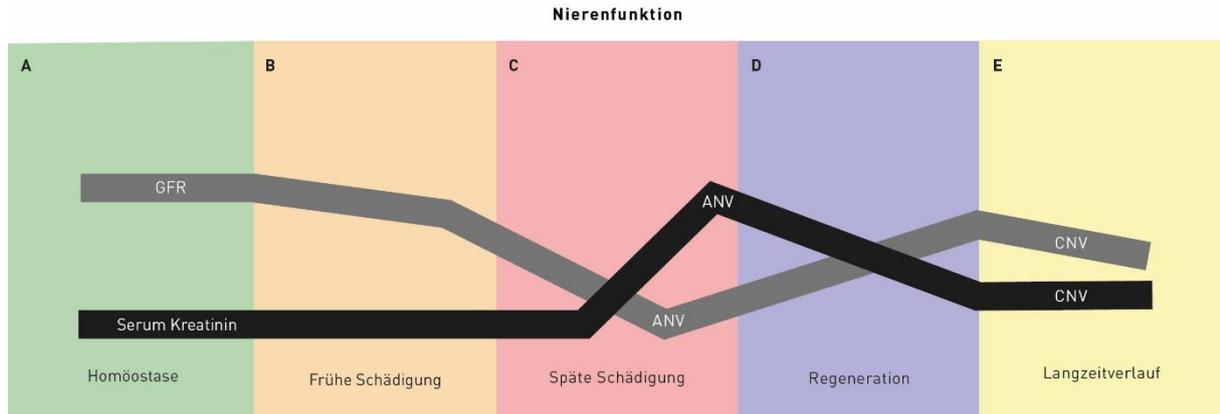
Das akute Nierenversagen stellt sich wie bereits erwähnt als akute Funktionseinschränkung der Niere da. Dauern diese Änderungen der Nierenfunktion und –morphologie länger als 3 Monate an, ist ein chronisches Nierenversagen (CNV) erreicht.<sup>25</sup> Als Diagnoseparameter werden hierbei sowohl die GFR zur Einschätzung des Stadiums, als auch eine mögliche Proteinurie zur Abschätzung der Progression verwendet.<sup>25,26</sup> Das CNV hat weltweit eine hohe Prävalenz, der *International Society of Nephrology* zufolge leiden zwischen 8-10% der Weltbevölkerung an einem CNV (<https://www.theisn.org/fp-tabs-left/691-global-kidney-health-atlas>, Stand 04.09.2019). Die Ursachen dieser Erkrankung sind sehr unterschiedlich,

epidemiologisch gesehen sind jedoch vaskuläre/hypertensive Erkrankungen und der Diabetes mellitus die Hauptursachen, weitere Ursachen stellen primäre Glomerulonephritiden, Systemerkrankungen etc. dar.<sup>27</sup> Dass bei 20% der Patienten die Ursache ihres CNV unbekannt ist, kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass frühere Episoden einer akuten Nierenschädigung zu einer langsamen Progression geführt haben.<sup>28</sup> Eine zunehmende Progression des CNV erhöht die Mortalität exponentiell<sup>29</sup>, so haben Patienten mit einer schwer eingeschränkten Nierenfunktion eine 21-fach erhöhte kardiovaskuläre Sterblichkeit.<sup>30</sup> Zudem kommt es zu einem zunehmenden Verlust der physiologischen Funktionen der Niere und somit zu unter anderem einer Dysregulation des Flüssigkeit- und Elektrolythaushalts, renaler Osteopathie und renaler Anämie.<sup>26</sup> Die Therapieoptionen des CNV sind limitiert, so bieten sich hauptsächlich sekundärpräventive Maßnahmen wie Blutdrucksenkung und Optimierung der antidiabetischen Therapie oder symptomatische Therapien wie eine Senkung der Proteinurie, ein Ausgleich einer metabolischen Azidose oder Vermeidung nephrotoxischer Substanzen an. Bei terminalem Nierenversagen existiert als letzte Option die Nierenersatztherapie durch entweder Dialyse oder Nierentransplantation.<sup>25,26</sup> Diese sind zwar lebenserhaltend, doch gehen mit einer hohen persönlichen und psychischen Belastung der Patienten<sup>31</sup> und einer starken finanziellen sowie logistischen Beanspruchung des jeweiligen Gesundheitssystems einher.<sup>32,33</sup> Das CNV stellt somit ein sehr großes Problem für Patienten und Gesundheitssysteme dar. Da bei mangelnden kausalen Therapiemöglichkeiten vor allem Prävention anzustreben ist und die akute Nierenschädigung ein oft übersehener Risikofaktor für das CNV ist, stellt sich zum einen die Frage des pathophysiologischen Zusammenhangs, zum anderen die Frage einer therapeutischen Inhibition dieser Progression.

#### **1.4 Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen**

Hierfür ist es nötig die pathophysiologischen Vorgänge bei einer akuten Nierenschädigung zu betrachten. Da sich diese Arbeit mit der intrarenalen Schädigungsform der ATN beschäftigt, wird nun auf die Folgen und Auswirkungen der ATN eingegangen. Abhängig von der Schwere der initialen Schädigung kommt es zu einem Abfall der Nierenfunktion und GFR (Abb. 3B), die sich in einem Anstieg der Funktionsparameter Serumkreatinin und Serum-Harnstoff (Abb. 3C) zeigen<sup>34</sup>. Dieser GFR-Abfall ist, abhängig von der Schwere der Erkrankung, meist

reversibel, bei zu starker Nierenschädigung kommt es aber zu bleibenden Einschränkungen der Nierenfunktion (Abb. 3E).<sup>35-37</sup> Hierbei ist jedoch der sogenannte „Kreatinin-blinde“ Bereich zu berücksichtigen, da sich ein sichtbarer Anstieg des Serumkreatinins erst bei einer Einschränkung der GFR über 50% manifestiert.<sup>38</sup> Es ist also möglich, eine leichte akute Nierenschädigung mit tatsächlichem Nephronenverlust zu haben, ohne dass diese sich in den Funktionsparametern relevant niederschlägt (Abb. 3B). Dass sich bei leichter und milder akuter Nierenschädigung die Funktionsparameter meist schnell regenerieren<sup>28,39</sup>, verleitet zu der Annahme, die Nieren besäßen ein hohes Regenerationspotential und könnten sich nach der Erkrankung vollständig erholen. Dieser Annahme stehen allerdings Beobachtungen aus klinischen Studien gegenüber, die ein erhöhtes Risiko der Progredienz in ein chronisches Nierenversagen nach bereits einer milden Episode einer ANS zeigen und die akute Nierenschädigung als Risikofaktor für einen Übergang in ein chronisches Nierenversagen identifizieren.<sup>28,35-37,39-41</sup> So konnten Chawla, *et al.* zeigen, dass das Risiko ein chronisches Nierenversagen zu entwickeln abhängig von der Schwere der akuten Nierenschädigung ist.<sup>42</sup> Hierbei hatten Patienten, die aufgrund der ANS ein Nierenersatzverfahren benötigten, als Hoch-Risiko-Gruppe ein 50x erhöhtes Risiko für eine CKD Stufe 4. Auch Coca *et al.* konnten in einer Metaanalyse von 13 klinischen Studien zu diesem Thema die ANS als Risikofaktor für das chronische Nierenversagen identifizieren.<sup>28</sup> Interessanterweise wiesen Patienten, bei denen bereits vor der ANS die Nierenfunktion reduziert war, ein 2x erhöhtes relatives Risiko für ein CNV auf, während das relative Risiko bei Patienten ohne vorige Einschränkung der Nierenfunktion 10x erhöht war. Beim Blick auf das absolute Risiko für ein chronisches Nierenversagen ergibt sich aber ein intuitiveres Bild, da dieses für Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion ohne ANS (9,8%) und mit ANS (18,4%) deutlich höher ist, als für Patienten ohne Einschränkung der Nierenfunktion ohne ANS (0,4%) und mit ANS (4,6%)<sup>28</sup>.



**Abbildung 3: Verlauf der Nierenfunktionsparameter GFR und Kreatinin bei Akuter Tubulusnekrose**

Kommt es nach anfänglicher Homöostase **(A)** zu einer akuten Tubulusnekrose, sinkt zunächst die renale Filtrationsleistung und entsprechend die GFR **(B)**. Sinkt die GFR unter 50% des Ausgangswertes und somit über den Kreatinin-blinden Bereich hinaus, kommt es zu einem verzögerten Anstieg des Serum-Kreatinins **(C)**. In der Regenerationsphase normalisieren sich die Funktionsparameter aufgrund von Hyperfiltration und struktureller Regeneration wieder **(D)**. Im Langzeitverlauf nach akuter Tubulusnekrose kommt es zu einer Abnahme der Filtrationsleistung und einem zunehmenden Fortschreiten in ein chronisches Nierenversagen **(E)**. Modifiziert nach *Kundert et al.*<sup>43</sup>

Die Annahme, Nieren hätte eine gute strukturelle Regenerationsfähigkeit nach akuter Nierenschädigung, ist also epidemiologisch fragwürdig. Ebenfalls dagegen spricht die Tatsache, dass Patienten nach Uninephrektomie, die also nur noch die Hälfte ihrer ursprünglichen Nephrone zur Verfügung haben, zwar direkt nach der Operation einen GFR-Abfall auf 50% verzeichnen, der sich aber nachfolgend kompensatorisch auf 70-80% des Ausgangswertes regeneriert.<sup>44</sup> Der Verlauf der funktionellen Schädigung korreliert zwar mit der strukturellen, gibt aber nur bei sehr starkem Nephronenverlust eine zuverlässige Aussage über den strukturellen Schaden. So kommt es bei einer akuten Tubulusnekrose namensgebend zu einem Absterben von Zellen<sup>45,46</sup>, vor allem im sauerstoffsensiblen S3-Segment des Tubulus<sup>47</sup>. Die betroffenen Nephrone verlieren ihre Funktion, was sich zeitversetzt in einem Abfall der Gesamt-GFR und einem Anstieg des Serumkreatinins zeigt, und sterben schließlich ab. Da Säugetiere keine neuen Nephrone bilden können<sup>48</sup>, müssen die verbliebenen Nephrone nun die komplette Filtrationsleistung erbringen. Dies stellt für sie eine Überlastung dar, weshalb die Zellen in den überlebenden Nephronen reaktiv hypertrophieren und eine Hyperfiltration entwickeln.<sup>40,49-52</sup> Hierdurch steigt die GFR des einzelnen Nephrons (*single nephron GFR*, SNGFR) stark an und somit schlussendlich auch wieder die Gesamt-GFR, was zunächst zu einer Kompensation der verlorenen Nierenfunktion

führt.<sup>40,50</sup> In den darauffolgenden Tagen und Wochen hypertrophiert das Nephron durch den stark angestiegenen intraglomerulären Druck und die Notwendigkeit mehr primär filtrierte Substanzen rückzuresorbieren, weiter, wodurch auch die SNGFR weiter ansteigt.<sup>53</sup> Dies zeigt sich in einer weiteren Normalisierung der Gesamt-GFR bzw. Serum-Kreatinin bis zu Werten vor ATN. Insgesamt führen diese Vorgänge zu größeren Restnephronen mit erhöhter SNGFR, die wiederum ein Risikofaktor für eine Progression in ein CNV ist.<sup>53,54</sup> Die Überlastung führt auf lange Sicht zu einem langsamen Funktionsverlust der Nephrone, die schließlich atrophieren.<sup>40,49,55,56</sup> Die Mechanismen hierfür sind noch nicht vollends erforscht, aber mögliche Mechanismen sind eine Ausbildung einer sekundären fokalen segmentalen Glomerulosklerose, die dann zu einem Verlust des gesamten Nephrons führt, eine Ischämie durch Ausbildung einer interstitiellen Fibrose und eine chronische Entzündungsreaktion mit Sezernierung proapoptotischer und eventuell pronekrotischer Zytokine.<sup>40,57,58</sup> Im Hinblick auf die gesamte Niere können schwere Episoden einer ANS oder wiederholte leichtere Episoden einer ANS schließlich zu funktionellen Schäden der Niere, Atrophie und Fibrose führen.<sup>36,40</sup> Um diesen epidemiologischen Zusammenhang zu verstehen, ist es nötig die zellulären und molekularen Abläufe einer akuten Nierenschädigung zu betrachten. Dieser Prozess ist ein Zusammenspiel aus initialem Zelltod, darauffolgender steriler Entzündung und letztendlich renaler Fibrose und Defektheilung. Eine wesentliche Rolle bei der sterilen Entzündung spielt vor allem das angeborene Immunsystem.

## **1.5 Die Immunantwort und regulierte Nekrose bei akuter Nierenschädigung**

### **1.5.1 Sterile Entzündung**

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes Abwehrsystem, dessen Aufgabe es ist, den Organismus vor Pathogenen jeglicher Art zu schützen. Es wird grundsätzlich in das von Geburt an konstante „angeborene“ Immunsystem und das variable, zeitlich verzögert arbeitende „erworbene“ Immunsystem unterteilt. Die Aktivierung beider Teile des Immunsystems erzeugt eine Entzündungsreaktion, entfernt dadurch eingetretene Pathogene und baut danach diese Inflammation wieder ab.<sup>59,60</sup>

## **Das angeborene Immunsystem**

Das angeborene Immunsystem ist der erste Verteidigungsmechanismus des Organismus gegen Pathogene. Die Epithelien von Haut, Schleimhäuten und Organen stellen an potentiellen Eintrittspforten erste mechanische und physiologische Barrieren dar und können teilweise durch Sezernierung verschiedener antimikrobieller Peptide schon Mikroorganismen bekämpfen. Eine Erkennung im Organismus befindlicher pathogener Strukturen (*pathogen associated molecular patterns*, sog. PAMPs) findet über eine Vielzahl verschiedener Membranrezeptoren der Immunzellen (*pattern recognition receptors*, sog. PRR) statt.<sup>59</sup> Durch Aktivierung der Immunzellen kommt es zur Aktivierung der zellulären Immunantwort, an der Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, Natürliche Killerzellen und dendritische Zellen beteiligt sind, und der humoralen Immunantwort, die aus der Aktivierung des Komplementsystems und der Sezernierung und Wirkung von Interleukinen und Zytokinen besteht.<sup>61</sup> Die jeweilige Ausprägung der Immunantwort ist dabei von Art und Ort der Schädigung abhängig, das Ziel des angeborenen Immunsystems ist die schnelle Beseitigung sämtlicher Pathogene. Um dies möglichst effizient zu erreichen, gibt es vielfältige Arten der Co-Aktivierung und Kooperation mit dem erworbenen Immunsystem.

## **Das erworbene Immunsystem**

Das adaptive Immunsystem verfügt ebenfalls über eine zelluläre und humorale Immunantwort. Beteiligte Zellen sind hierbei B- und T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die humorale Abwehr geschieht über in B-Zellen produzierte Antikörper. Im Vergleich zum angeborenen Immunsystem hat es die Fähigkeit, nach Kontakt mit unbekanntem Antigenen ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen und bei wiederholter Exposition zu diesen schneller und stärker zu reagieren. Wesentliche Mechanismen sind hierbei die genetische Variabilität der Antigenrezeptoren von B- und T-Lymphozyten und daran angepasste Antikörperproduktion.<sup>59</sup> Das immunologische Gedächtnis des erworbenen Immunsystems reift hauptsächlich in der Postnatalphase, wenn es mit Infektionen durch externe Erreger (extrinsisch) oder mit Mikroben der Darmflora (intrinsisch) in Kontakt kommt und sensibilisiert wird. Die an der adaptiven Immunantwort beteiligten Lymphozyten reifen in primärem (Knochenmark, Thymus), sekundärem (Lymphknoten, Milz) und tertiärem (bei chronischen Infektionen) Lymphgewebe zu differenzierten B- und T-Zellen heran. Kommt es

nun zur Exposition mit einem Pathogen, wird dieses über einen Membranrezeptor (Haupthistokompatibilitätskomplex, MHC) von einer Antigen-präsentierenden Zelle (Dendritische Zelle, Monozyt, B-Zelle) als Antigen präsentiert, was je nach Rezeptorart verschiedene B- und T-Zellen aktiviert.<sup>62</sup> T-Zellen erkennen die Antigene aufgrund ihrer Vielzahl verschiedener T-Zell-Rezeptoren und wirken entweder zytotoxisch (T-Killerzelle) oder immunmodulatorisch (T-Helferzelle)<sup>63</sup>, B-Zellen entwickeln sich nach Antigenpräsentation entweder zu Gedächtniszellen oder zu Plasmazellen, die organabhängig verschiedene Arten von Antikörpern produzieren, welche dann das spezifische Antigen binden können.<sup>64</sup> Ein wichtiger Aspekt des adaptiven Immunsystems ist die Tolerierung von körpereigenen Strukturen, die durch die Selektion unreifer T-Lymphozyten im Thymus stattfindet.<sup>65</sup> Da die Lymphozyten durch diese zentrale Toleranz nicht mit sämtlichen körpereigenen Antigenen in Kontakt treten, wird sie durch die periphere Toleranz ergänzt, bei der in peripheren Organen autoreaktive T-Zellen durch fehlende Ko-Aktivierung, Überstimulation oder Suppression durch regulatorische T-Zellen in die Apoptose geführt werden.<sup>66</sup> Hierdurch ergibt sich eine weitere Funktion des adaptiven Immunsystems, die Erkennung und Eliminierung tumorös entarteter Zellen.<sup>67</sup> Funktionieren die Mechanismen der Toleranzentwicklung jedoch nicht vollständig oder sind körperfremde Antigene den körpereigenen zu ähnlich, kann das adaptive Immunsystem gegen den Körper reagieren und es entstehen Autoimmunerkrankungen. Da es bei einer ANS auch zu einer meist sterilen Entzündungsreaktion kommt, tragen sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem wesentlich zur Pathogenese der ANS, im Verlauf aber auch zur Resolution der Entzündung und Induktion der Gewebeheilung bei.<sup>68,69</sup>

### **Sterile Entzündung**

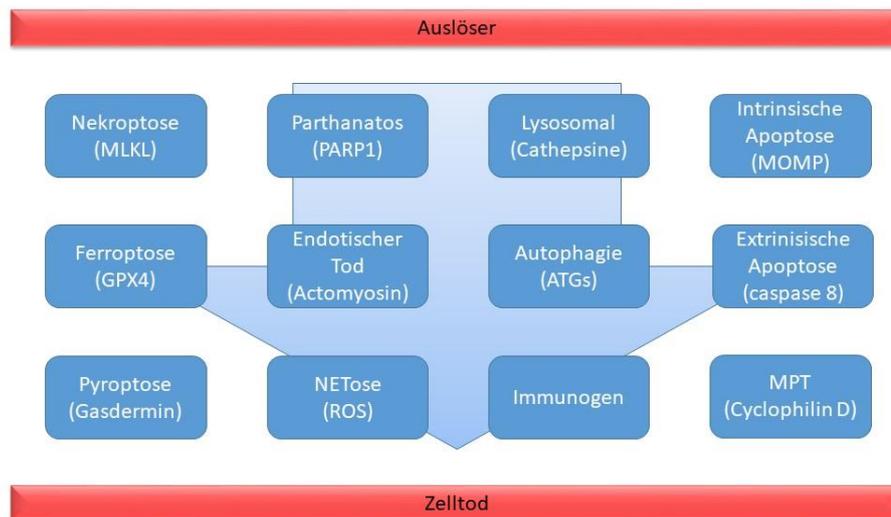
Entzündung ist für die Bekämpfung invasiver Pathogene also essentiell<sup>60</sup>, doch Entzündungsreaktionen entstehen nicht ausschließlich nach Infektionen. 1994 stellte Polly Matzinger erstmals die Hypothese auf, dass das Immunsystem nicht zwischen „eigen“ und „fremd“, sondern zwischen „gefährlich“ und „ungefährlich“ unterscheidet.<sup>70</sup> Hierbei wird alles als „gefährlich“ eingestuft, was zu Gewebeschädigung oder -zerstörung führen kann.<sup>71</sup> Die PRRs erkennen also nicht nur fremde Pathogene als PAMPs, sondern auch körpereigene Moleküle, die als *danger associated molecular patterns* (DAMPs) Gefahr signalisieren.<sup>72</sup> Diese DAMPs sind meist intrazelluläre Moleküle, die in Homöostase wichtige Aufgaben

innerhalb der Zelle ausführen, bei deren Absterben, Rupturierung der Plasmamembran und Freiwerden in den Extrazellularraum jedoch eine Immunreaktion initiieren und fortführen können. Sie können im Zellkern (z.B. Histone, HMGB1, DNA), im Zytosol (z.B. ATP, F-Actin, Urat-Kristalle, S100s, Heat shock protein), im Mitochondrium (z.B. mitochondriale DNA) oder schon im Extrazellularraum lokalisiert sein.<sup>71,73</sup> Kommt es bei schwerer Gewebeschädigung wie Trauma oder Ischämie-Reperfusionsschaden zur Auslösung von verschiedenen Arten der regulierten Nekrose, gelangen sie in den Extrazellularraum und werden dort vom Immunsystem als Zeichen potentieller Gefahr detektiert.<sup>73,74</sup> Eine Initiierung der Immunantwort geschieht dann über drei verschiedene Mechanismen: Erstens werden PRRs wie die toll-like-Rezeptoren (TLRs) aktiviert, die dann über intrazelluläre Signalkaskaden eine Immunantwort auslösen. Zweitens kommt es zur Ausschüttung intrazellulärer Zytokine und Chemokine, die Immunzellen rekrutieren, zytotoxisch wirken und Prostaglandinsynthese anregen. Drittens werden DAMP-spezifische Rezeptoren, die nicht den PRRs angehören, wie z.B. RAGE aktiviert, was unter anderem auch zu einer Ausschüttung proentzündlicher Zytokine führt.<sup>71,73</sup> Trotz unterschiedlicher Stimuli stellt sich die sterile Entzündungsreaktion sehr gleichförmig dar und ist in ihrem Ablauf auch der Entzündung nach Infektion sehr ähnlich. So kommt es zu einer Antwort des angeborenen Immunsystems mit der Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen und einer Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen und einer T-Zell-vermittelten Antwort des adaptiven Immunsystems. Da die sterile Entzündungsreaktion nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden wesentlich zur Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen beiträgt, ist es nötig die verschiedenen Wege der DAMP-Freisetzung, also die verschiedenen Arten der regulierten Nekrose zu beleuchten.

### **1.5.2 Regulierte Nekrose**

Kommt es zu einem Ischämie-Reperfusionsschaden, treten tubuläre Zellen in verschiedene Arten des Zelltodes ein. In dem noch recht neuen Feld der Zelltodforschung konnten in jüngster Zeit unterschiedliche, an verschiedenen Arten der akuten Gewebeschädigung beteiligte Signalwege der regulierten Nekrose identifiziert werden<sup>75-79</sup>. Das Nomenklatur-

Komitee für Zelltod hat 2018 die folgenden 12 Arten des Zelltodes benannt:



**Abbildung 4: Übersicht über die bisher bekannten Signaltransduktionswege des regulierten Zelltodes mit einem spezifischen Element der jeweiligen Signalkaskade.** Modifiziert nach Anders<sup>78</sup>

Für den renalen Ischämie-Reperfusionsschaden konnte bisher ein wesentlicher Beitrag der Nekroptose, der Ferroptose, der Mitochondrial-permeability transition-regulierten Nekrose, der NETose/ETose (*Neutrophil Extracellular Traps*) und der Apoptose ermittelt werden<sup>75-77,80-82</sup>. Diese Erkenntnisse wurden meist durch den Nachweis eines protektiven Effektes durch die Applikation eines mehr oder weniger spezifischen Inhibitors des jeweiligen Zelltod-Signalwegs erreicht.

## Apoptose

Die Apoptose ist die am längsten bekannte und daher am besten erforschteste Art des Zelltodes. Sie ist eine Caspase-abhängige Form des Zelltodes und bewirkt einen durch Caspasen ausgeführten Abbau des Zytoskeletts, eine Fragmentierung der Mitochondrien und letztendlich eine Aufteilung der Zelle in kleine Vesikel, die anschließend phagozytiert werden<sup>75</sup>. Im Gegensatz zu den anderen Formen des Zelltodes führt sie also nicht zu einer Ruptur der Plasmamembran und somit zur Freisetzung potentiell autoimmunogener Zellbestandteile. Sie kann durch verschiedene Wege initiiert werden: Im intrinsischen Weg führt der Zellstress direkt zu einer Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran (POMP), im extrinsischen Weg wird dies über eine Aktivierung des membranständigen

„death receptors“, was dann zu einer Aktivierung der Caspase 8 führt, erreicht. Zusätzlich kann auch eine Schädigung des endoplasmatischen Retikulums durch Signaltransduktion via  $Ca^{2+}$  zu einer POMP führen<sup>83</sup>. Diese erhöhte Permeabilität führt dann wieder zur Freisetzung porapoptotischer Faktoren wie cytochrom c. Die Rolle der Apoptose im renalen Ischämie-Reperfusionsschaden ist noch nicht abschließend geklärt. So konnten *Wei et al.* nachweisen, dass ein Knockout zentraler Apoptose-Proteine im proximalen Tubulus Mäuse vor IRI schützt<sup>84</sup>. Jedoch konnten Linkermann, *et al.* keinen protektiven Effekt des pan-Caspase Inhibitors zVAD im renalen Ischämie-Reperusionsmodell zeigen<sup>85</sup>.

### **Nekroptose**

Die Nekroptose ist eine Caspase-unabhängige Form des regulierten Zelltodes, die evolutionär bedingt der Abwehr Caspase-inhibierender Viren diene, da sie befallenen Zellen ermöglichte abzusterben.<sup>76</sup> Da sie im Gegensatz zur Apoptose zu einer Ruptur der Plasmamembran und somit zu einem Freiwerden intrazellulärer Bestandteile führt, ist sie eine immunogene Form des Zelltodes.<sup>86</sup> Die Signalkaskade wird durch verschiedene Auslöser wie  $TNF\alpha$ , Interferone, LPS oder DAMPs aktiviert, die über die entsprechenden Rezeptoren zu einer Rekrutierung von RIPK1 und RIPK3 (receptor-interacting protein kinase 1/3) führen. RIPK1 und RIPK3 bilden zusammen dann das Nekrosom, in dem zuerst RIPK1 die Pseudokinase MLKL (mixed lineage kinase domain-like pseudokinase) phosphoryliert, wodurch diese in das Nekrosom aufgenommen wird um anschließend von RIPK3 nochmals phosphoryliert wird. Die darauffolgende Homotrimerisierung von MLKL führt zu einer Einlagerung von MLKL in sämtliche Membranen der Zellorganellen wie auch der Plasmamembran, was letztlich Porenformation und Zellyse induziert.<sup>75,78,86</sup> Da MLKL der Haupteffektor der Nekroptose ist, zeigen *Mkl1-knockout* Mäuse im renalen IRI-Modell eine abgemilderte Schädigung.<sup>87</sup> Gleiches kann für *Ripk3*-defiziente Mäuse beobachtet werden<sup>80</sup>, und auch *Ripk1 KD* (kinase dead – inaktivierte Kinaseaktivität bei erhaltener Struktur) oder mit dem allosterischen Kinaseinhibitor Necrostatin 1 (Nec1) behandelte Mäuse weisen eine reduzierte Schädigung beim renalen Ischämie-Reperfusionsschaden auf.<sup>80</sup> Dazu zeigt die Applikation Nec1 und die Defizienz von *Ripk3* oder *Mkl1* in anderen Modellen der akuten Nierenschädigung ebenfalls eine protektive Wirkung.<sup>78</sup> Aufgrund dieser Ergebnisse und der nachgewiesenen Immunogenität der Nekroptose, die wiederum zu Zelltod führt, stellt diese

also einen potentiell potenten Zielmechanismus zum Schutz vor der akuten Nierenschädigung dar.<sup>83</sup>

### **Ferroptose**

Die Ferroptose ist eine ebenfalls nicht-apoptotische Form des Zelltodes, die vor allem im Rahmen von Ischämie-Reperfusionsschaden, Neurodegeneration und Krebs vorkommt.<sup>88</sup> Hierbei kommt es in den Mitochondrien der betroffenen Zellen zu einer massiven Eisen-abhängigen Lipidperoxidation und Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die letztendlich zu einer Plasmamembranruptur führen, wobei der genaue Mechanismus hierfür noch nicht anschließend geklärt ist.<sup>89</sup> Es handelt sich also auch bei der Ferroptose um eine immunogene Form des Zelltodes, bei der es durch die Plasmamembranruptur zu einer DAMP-Freisetzung kommt. Eine zentrale Rolle in der Ferroptose nimmt die Glutathionperoxidase-4 (GPX-4) ein, da sie das einzige Enzym ist, das effektiv die Bildung der ROS und die Aufnahme von Eisen herabregulieren kann. Folglich führt die Inhibierung von GPX-4 zu ferroptotischem Zelltod.<sup>89</sup> Die Hemmung der Lipidperoxidation durch Ferrostatine wie Ferrostatin-1 oder 16-86 zeigte jedoch bei 40 minütiger renaler IRI einen stark protektiven Effekt auf Nierenfunktion und -struktur.<sup>77</sup> Da renale Tubuluszellen aufgrund ihrer starken Sauerstoffsensibilität besonders anfällig für Ferroptose sind, stellt diese vermutlich eine der Hauptursachen für den renalen Zelltod, Nephronenverlust und funktionelle und strukturelle Schäden nach IRI dar.<sup>76</sup>

### **Mitochondrial permeability transition – induced regulierte Nekrose (MPT-RN)**

Bei der MPT-RN steht die „Mitochondrial Permeability Transition“-Pore der Mitochondrien, die sowohl die innere als auch die äußere mitochondriale Membran durchspannt, im Vordergrund, die im geschlossenen Zustand eine reguläre Funktion der Mitochondrien gewährleistet.<sup>75,90,91</sup> Bei ihrer Öffnung kommt es jedoch zu einem plötzlichen Elektrolytaustausch zwischen dem Zytosol und dem Mitochondrium und darauffolgend zum Absterben der Zelle, was durch Freiwerden intrazellulärer Bestandteile zu immunogenem Zelltod führt. Die genauen molekularen Mechanismen hierfür sind noch nicht bekannt, jedoch stellt das Matrixprotein Cyclophilin D (CypD) den Hauptregulator für die Öffnung dar.<sup>91</sup> Dementsprechend konnten bei *CypD*-defizienten Mäusen eine starke Abschwächung des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens gezeigt werden.<sup>80,92</sup> Des Weiteren konnte eine

Inhibierung der MPT-RN durch Substanzen wie Cyclosporin A oder Sanghiferin *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden, wodurch sie einerseits abgemilderte Schäden nach renaler IRI bewirken<sup>80</sup>, aber auch kardiale Ischämie-Reperfusionsschäden abschwächen.<sup>90</sup> Aufgrund der bereits vorhandenen Zulassung von Cyclosporin A konnten in einer klinischen Studie bereits eine signifikante Verringerung des Infarktareals bei Patienten mit STEMI (ST-Hebungsinfarkt, engl. *ST-elevated myocardial infarction*) durch Behandlung mit CysA gezeigt werden.<sup>93</sup>

### **Neutrophil Extracellular Traps (NETose) und Extracellular Traps (ETose)**

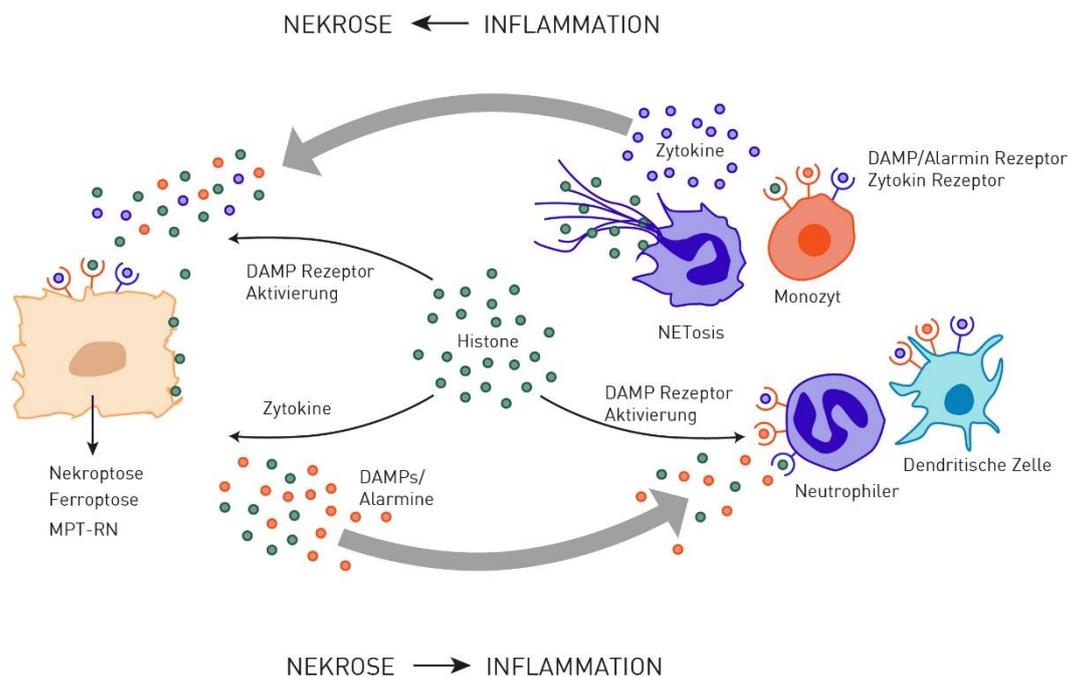
Lange Zeit dachte man, dass Neutrophile Granulozyten ihre Hauptfunktion in der angeborenen Immunantwort, die Elimination von Pathogenen, dadurch ausüben, dass sie phagozytierte Vesikel mit Vesikeln voller lytischer Proteasen verschmelzen oder degranulieren. 2004 entdeckte die Arbeitsgruppe von Arturo Zychlinski, dass ein weiterer Mechanismus der Ausstoß von Chromatin mit nukleären, granulären und zytoplasmatischen Komponenten ist, die Pathogene wie eine Art Netz belegen und damit immobilisieren und abtöten.<sup>94</sup> Die NETose wird durch unterschiedliche Stimuli wie proentzündliche Zytokine (z.B. TNF $\alpha$ , IL8), die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies, die Aktivierung von TLR2 und TLR4, das Komplementsystem, Urat- oder Cholesterolkristalle, Immunkomplexe oder Autoantikörper ausgelöst.<sup>94-96</sup> Die anschließende Dekondensation und Auswurf des nukleären Chromatins zur Formierung eines NET kann bis zu 6h dauern und führt abhängig von der Art der Aktivierung zum Tod des neutrophilen Granulozyten.<sup>95,97</sup> Die Bedeckung von Pathogenen durch NETs führt zu einer Fixierung, einer weiteren Aktivierung von Inflammation und durch die direkte Zytotoxizität nukleärer Bestandteile wie Histone zu einem Absterben des Pathogens.<sup>96,98</sup> Die NETs stellen die am besten untersuchte Art der Extracellular Traps dar, doch konnten vergleichbare Mechanismen auch bei Makrophagen, Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen Granulozyten beobachtet werden.<sup>99-102</sup> NETs tragen wesentlich zu renalen Pathologien wie entzündlichen Nierenerkrankungen, Akuter Nierenschädigung, systemischem Lupus erythemathodes, ANCA-assoziiertes Vasculitis und rheumatoider Arthritis bei.<sup>96</sup> Experimentell zeigte eine Inhibition der NETose durch die Inhibition des Enzyms PAD einen protektiven Effekt bei renalem Ischämie-Reperfusionsschaden und experimenteller Glomerulonephritis.<sup>82,103</sup> Beide Arbeiten identifizierten das Freiwerden extrazellulärer Histone als relevanten Pathomechanismus der

NETose, da diese einerseits eine erhebliche Zytotoxizität aufweisen, andererseits durch verschiedene Signalwege proentzündlich wirken können. Dementsprechend reduzierte eine direkte Neutralisation extrazellulärer Histone in beiden Modellen die NET-induzierte Schädigung signifikant.

Des Weiteren existiert ein Zusammenhang zwischen Nekrose und Entzündung. Regulierter Zelltod löst durch die Freisetzung von DAMPs eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems und somit eine sterile Entzündungsreaktion aus. Diese kann durch Aktivierung regulierter Nekrose oder freigesetzte Histone wiederum Zelltod verursachen. Dieser pathophysiologische Vorgang wird Nekroinflammation genannt und kann sich als Kreislauf selbst erhalten und sogar verstärken.<sup>79</sup>

### **1.5.3 Nekroinflammation**

Das Konzept der Nekroinflammation beschreibt eine sich selbst verstärkende Feedback-Schleife aus regulierter Nekrose und steriler Inflammation.<sup>79,83</sup> Regulierte Nekrose führt durch die Ruptur der Plasmamembran zur Freisetzung intrazellulärer Bestandteile in den Extrazellularraum.<sup>76</sup> Diese werden dort von verschiedenen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie TLRs und NLRs als DAMPs registriert und lösen durch die Freisetzung proentzündlicher Botenstoffe eine sterile Entzündungsreaktion aus.<sup>71</sup> Dadurch freigesetzte Zytokine verstärken einerseits die Immunantwort, können aber auch wiederum regulierte Nekrose auslösen (Abb. 5). Das Zytokin TNF $\alpha$  kann sowohl Nekroptose als auch NETose auslösen, IFN- $\gamma$  kann Nekroptose induzieren und IL-8 NETose.<sup>79</sup> Zudem werden durch nekrotische Zellen und NETs Histone in den Extrazellularraum freigesetzt, die sowohl Zelltod als auch Entzündung hervorrufen und somit eine zentrale Rolle in der Nekroinflammation einnehmen (Abb. 5).<sup>104,105</sup>



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Nekroinflammation**

Bei einer akuten Tubulusnekrose sterben zunächst Tubuluszellen durch verschiedene Arten der regulierten Nekrose wie Nekroptose, Ferroptose und MPT-RN ab. Dabei kommt es durch Freisetzung von DAMPs wie Histonen und Alarminen zu einer sterilen Entzündungsreaktion des angeborenen Immunsystems mit einer Rekrutierung von Immunzellen wie Neutrophilen oder Monozyten, zur Sekretion von Zytokinen wie  $TNF\alpha$ ,  $IFN\gamma$  oder  $IL8$  und zur Bildung von NETs. Die Zytokine können wiederum regulierte Nekrose induzieren und auch die durch NETs oder abgestorbene Tubuluszellen freigesetzten Histone führen zu Zelltod und weiterer Entzündung. Sie spielen dadurch eine zentrale Rolle in der Nekroinflammation. Modifiziert nach *Mulay et al.*<sup>79</sup>

Der so entstehende Teufelskreis kann sich potenziell selbst verstärken und abhängig von der Stärke des initialen Schadens zu Organversagen, Sepsis und bis zum Tod führen.<sup>83,106</sup> Im renalen Ischämie-Reperfusionsschaden wurde zudem nicht nur Zelltod und Entzündung in der Niere nachgewiesen, sondern auch eine Ausschwemmung von DAMPs und NETs in die venöse Zirkulation und auf diesem Wege in andere Organe, wo sie dort ebenfalls nekroinflammatorische Prozesse in Gang setzen (*remote tissue injury*).<sup>82</sup> Diese selbsterhaltende und sogar selbstverstärkende Feedbackschleife bietet nun verschiedene Ansatzpunkte, um sie abzuschwächen oder ganz zu unterbrechen. So lassen sich sowohl Zelltod als auch sterile Entzündung durch jeweilige Inhibitoren wie Nec-1s, Ferrostatin, Cyclosporin, Cortisone, Infliximab etc. pharmakologisch inhibieren.<sup>77,85,107</sup> Bedenkt man hierbei die klinische Situation einer akuten Nierenschädigung mit meist verzögerter

Diagnose, bietet die fortlaufende Feedback-Schleife auch die Möglichkeit einer verzögerten therapeutischen Intervention, um kontinuierlichen Zelltod und Entzündung zu verhindern. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die therapeutische Potenz der präemptiven Therapie größer als die der verzögerten sein muss, da durch sie der initiale und somit der größte Schaden adressiert werden kann. Für die verzögerte Intervention ist es ebenfalls nötig ein therapeutisches Zeitfenster zu identifizieren, innerhalb dessen noch eine Wirkung erzielt werden kann. Studien von Lech, *et al.* zur Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen zeigten einen protektiven Effekt durch Reduktion der sterilen Entzündung mit Pentraxin-3 für bis zu 6h nach Schädigung.<sup>108</sup> Da bei IRI regulierte Nekrose der Entzündung vorausgeht, ist davon auszugehen, dass das therapeutische Zeitfenster einer verzögerten Zelltod-inhibition ähnlich bis geringer ausfällt. Zudem nehmen in der Nekroinflammation Histone eine zentrale Rolle ein (Abb. 5), da sie nach Freisetzung in den Extrazellularraum sowohl zytotoxisch als auch proentzündlich wirken und somit diesen Teufelskreis massiv verstärken können.<sup>79</sup> Eine Neutralisation dieser Histone bietet somit die Möglichkeit die beiden zentralen Pathomechanismen der Nekroinflammation gleichzeitig therapeutisch anzugehen.

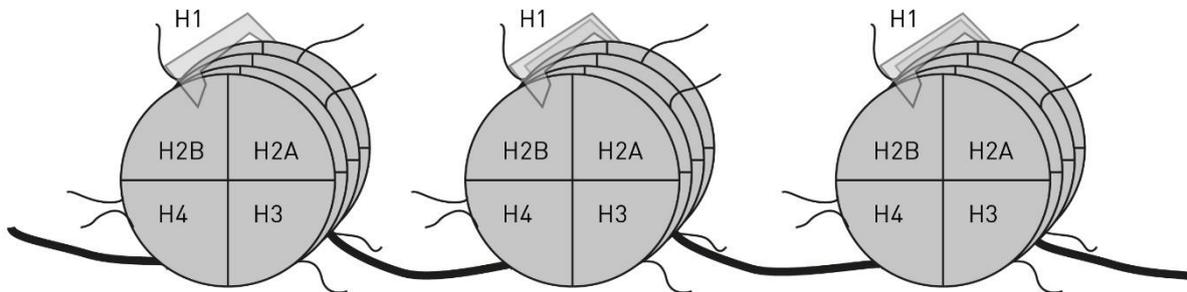
## **1.6 Histone**

Histone sind innerhalb des Zellkerns wichtige Strukturelemente der DNA und durch verschiedene postranslationale Modifikationen auch an der Gentranskription beteiligt. Es existieren 5 Arten von Histonen: H2A, H2B, H3 und H4, bekannt als sogenannte „core“-Histone und H1, bekannt als „linker“-Histon. Gelangen diese durch die oben beschriebenen Arten der Nekrose in den Extrazellularraum, üben sie dort sowohl zytotoxische als auch immunstimulatorische Effekte aus. Dadurch tragen sie zur Entwicklung und Exazerbation vieler Krankheitsbilder bei, wobei eine Neutralisierung extrazellulärer Histone bereits in mehreren Krankheitsmodellen therapeutische Effekte gezeigt hat.

### **1.6.1 Struktur und Funktion der Histone**

In allen eukaryotischen Zellen ist das Chromatin in Nukleosomen organisiert, DNA-Abschnitten von 147 Basenpaaren Länge, die jeweils um ein Histon-Oktamer gewickelt sind und mit anderen Nukleosomen über sogenannte linker-DNAs, freie DNA-Abschnitte von ca.

50 Basenpaaren Länge, verbunden sind.<sup>109,110</sup> Ein Histon-Oktamer besteht aus je zwei Kopien der „core“-Histone H2A, H2B, H3 und H4, während die linker-DNA durch die H1-Histone außerhalb des Nukleosoms stabilisiert wird.<sup>109,110</sup>



**Abbildung 6: Aufbau eines Nukleosoms und Histonoktamers**

Je zwei Kopien der „core“-Histone bilden zusammen ein Histonoktamer, das von einem „linker“-Histon H1 flankiert wird. Die DNA ist um die Histone aufgewickelt und bildet im Verbund mit ihnen ein Nukleosom. Modifiziert nach *Kumar*<sup>111</sup>

Histone bestehen aus einer globulären Domäne und daraus hervorgehenden N-terminalen Ausläufern, sind durch deren große Anteile an basischen Aminosäuren wie Arginin und Lysin stark positiv geladen und binden dadurch kovalent an die negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats.<sup>112</sup> An diesen N-terminalen Enden finden auch die posttranslationalen Modifikationen der Histone wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung statt, die in der Gen-Transkription und -Regulierung eine wichtige Rolle spielen.<sup>110,113,114</sup> Denn durch die dynamische strukturelle Organisation des Chromatins durch DNA, Histone und weitere Proteine, tragen diese Histon-Modifikationen erheblich zu einer gesteigerten Komplexität der in einem DNA-Abschnitt kodierten Information bei.<sup>113,114</sup> Die Rolle der Histone in der Epigenetik wird klinisch dadurch interessant, dass verschiedene posttranslationale Modifikationsmuster mit gewissen Krankheiten zusammenhängen.<sup>115</sup>

## 1.6.2 Extrazelluläre Histone

Kommt es nun durch bei 1.5.2 beschriebene Mechanismen des Zelltodes zu einem Transfer der Histone in den Extrazellularraum, üben sie dort zytotoxische und proentzündliche Funktionen aus.

## Direkte Zytotoxizität

Der zytotoxische Effekt der Histone ist schon seit 1958 bekannt, als Hirsch, *et al.* feststellten, dass Histone einen starken bakteriziden Effekt auf *Escherichia coli*, *Staphylokokkus aureus* und weitere Bakterienstämme haben.<sup>116</sup> Weitere *in vitro* Untersuchungen zeigen ebenfalls eine hohe Zytotoxizität von Histonen bei verschiedensten Zellreihen.<sup>117–120</sup> *In vivo* verläuft eine i.v.-Injektion von Histonen bei Mäusen durch rapide auftretende mikrovaskuläre Schädigungen in der Lunge innerhalb weniger Minuten tödlich<sup>118</sup>, und auch eine Injektionen von Histonen in die Nierenarterie von Mäusen führte zu mikrovaskulären Schäden und renalen Nekrosen.<sup>121</sup> Hierfür sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Die positive Ladung der Histone führt bei negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembranen zu einer Bildung von Poren, die dann Zytolyse induzieren.<sup>122,123</sup> Zudem gelangen sie durch bereits bestehende Kanäle in der Membran ins Zellinnere und verursachen dort einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom und eine Depolarisation der Zelle.<sup>119</sup> Weiterhin binden extrazelluläre Histone unspezifisch an DNA und RNA fremder Zellen und führen so zu einem Erliegen des Stoffwechsels und deren Tod.<sup>117</sup>

## Proentzündliche Wirkung

Neben der Zytotoxizität wirken Histone auch über verschiedene Signalwege proentzündlich.<sup>120</sup> Werden sie in den Extrazellularraum freigesetzt, werden sie von *toll-like Rezeptoren* als DAMPs und somit als Gefahrensignale erkannt und setzen eine heterogene Immunantwort in Gang. Xu, *et al.* konnten zeigen, dass die i.v. Injektion subletaler Dosen Histone zu einer Aktivierung der TLR2- und TLR4-Signalwege und somit zu erhöhten Spiegeln von TNF $\alpha$ , IL6 und IL10 führt, *Tlr4-knockout*-Mäuse waren hiervor geschützt.<sup>124</sup> Auch Allam, *et al.* wiesen eine über Tlr2 und Tlr4 vermittelte renale Entzündung nach Injektion von Histonen in die Nierenarterie auf.<sup>121</sup> In beiden Studien führte eine Neutralisierung der extrazellulären Histone zu einer Reduzierung der Entzündung. Huang, *et al.* konnten nachweisen, dass *Tlr9-knockout* Mäuse vor Histon-vermitteltem Ischämie-Reperfusionsschaden geschützt wurden<sup>125</sup>, was allerdings auch durch eine Aktivierung von Tlr9 durch das ebenfalls potente DAMP DNA durch *in vivo* zirkulierenden Histon-DNA-Komplexen verursacht sein könnte.<sup>121</sup> Zudem aktivieren extrazelluläre Histone über weitere PRRs das NLRP3-Inflammasom (NOD-like Rezeptor Protein 3), eine zytosolische Plattform,

die verschiedene Gefahrensignale zur Freisetzung proentzündlicher Zytokine wie IL1 $\beta$  integriert, und führen so zu Entzündung.<sup>126</sup> Auch eine Formierung von NETs durch die Stimulation mit Histonen wurde bereits berichtet.<sup>82,95</sup> Zusätzlich wirken extrazelluläre Histone durch die Aktivierung von Thrombozyten prokoagulatorisch und verhindern durch die Stabilisierung extrazellulärer DNA deren Degradation und tragen somit zu Autoimmunität bei.<sup>104,105,120,127</sup>

### **Extrazelluläre Histone als therapeutisches Target**

Diese vielfältigen Pathomechanismen manifestieren sich darin, dass Histone eine große Rolle bei Pathologien diverser Organsysteme spielen. So konnte bereits ein pathophysiologischer Beitrag zu verschiedenen Krankheitsmodellen des Hirns, Herzens, Lungen, Leber, Pankreas, Niere und Sepsis gezeigt werden.<sup>81,104,105,118,124,125,127</sup> Aufgrund dieser pathophysiologischen Relevanz stellt sich die Rationale der therapeutischen Adressierung der Histone. Dies kann auf drei verschiedene Wege geschehen: Die Verhinderung der Transition in den Extrazellulärraum (Inhibierung der verschiedenen Arten des Zelltods, der NETose etc.<sup>75,80,82</sup>), die Neutralisierung der sich bereits extrazellulär aufhaltenden Histone (Bindung der Histone durch Substanzen wie Heparin, aktiviertes Protein C oder einen spezifischen Antikörper<sup>82,103,118,121,124</sup>), oder Inhibition nachfolgender proentzündlicher Signalkaskaden (TLR-spezifische Antikörper etc.<sup>124,125</sup>). Da ersteres und letzteres einerseits unspezifisch für Histone, andererseits klinisch schwer umsetzbar ist, konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die Neutralisation extrazellulärer Histone. Aktiviertes Protein C und Heparin stellen potente Inhibitoren Histon-vermittelter Zytotoxizität und Entzündung *in vitro* und *in vivo* dar, es bleibt aber fraglich ob beide Substanzen ausschließlich Histon-spezifisch wirken.<sup>103,118,121</sup> Zudem wurde aPC gerade erst die Zulassung für den klinischen Gebrauch entzogen und die antikoagulatorische Wirkung von Heparin gestaltet die Anwendbarkeit von Heparin im IRI-Modell als sehr schwierig. Die nachgewiesene Spezifität für Histone und die gute Anwendbarkeit bei IRI führten deswegen zu einer Verwendung eines Histon-neutralisierenden Antikörpers in der vorliegenden Studie.

Dieser monoklonale Antikörper (anti-Histon IgG), 1993 erstmals von *Monestier et al.* beschrieben und getestet, wurde von BWA3-Hybridomzellen gewonnen und bindet spezifisch an die Histone H2A und H4, die auch zu großen Teilen für die

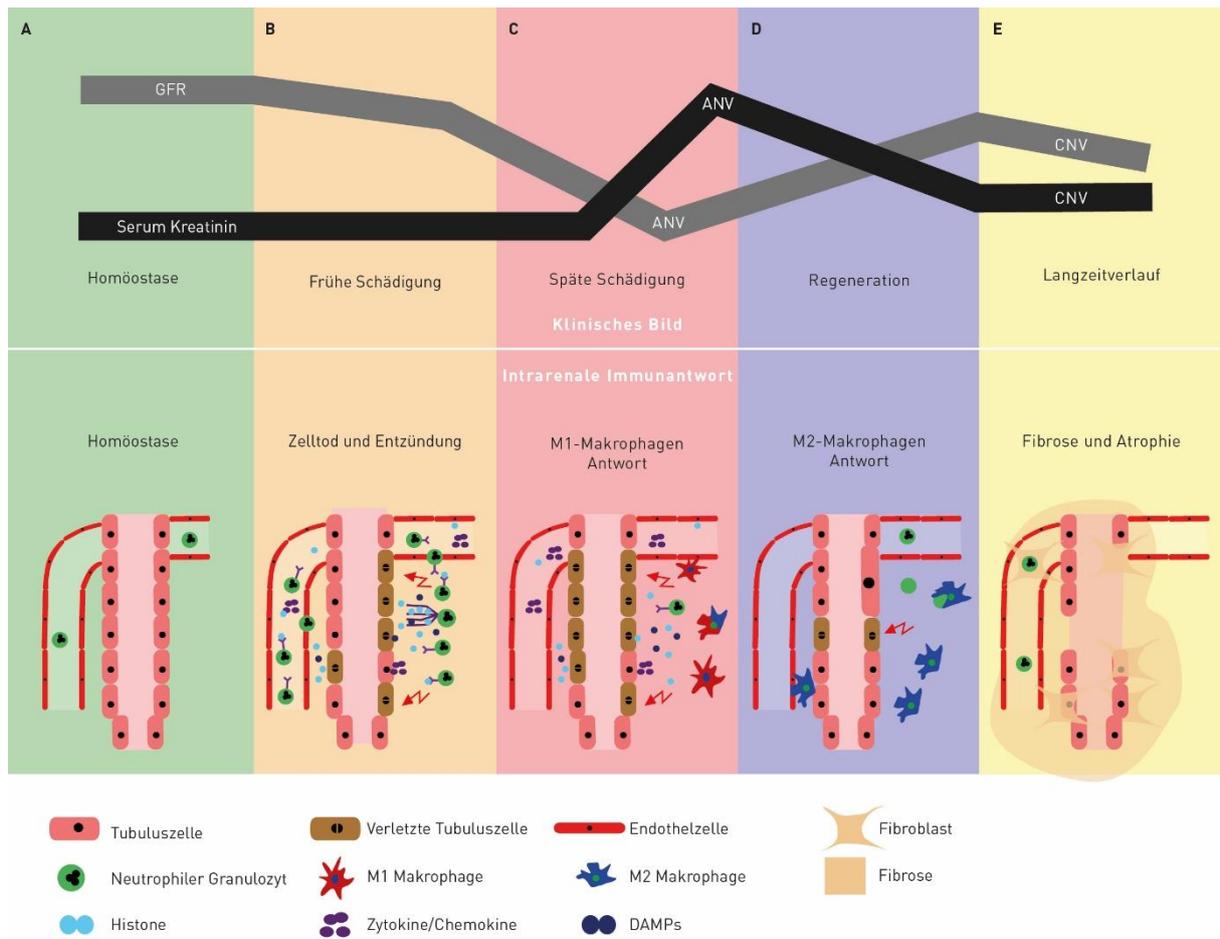
pathophysiologischen Wirkungen verantwortlich sind.<sup>104,127,128</sup> *In vitro* zeigte der BWA3-Antikörper eine deutliche Reduzierung der Histon-vermittelten Zytotoxizität in verschiedenen Zelllinien.<sup>82,103,117,121,124,125</sup> *In vivo* reduzierte eine Applikation des anti-Histon IgG die Mortalität von Mäusen bei schwerer Sepsis und zeigte einen starken protektiven Effekt in Modellen des akuten Nieren-, Leber- und Lungenversagens.<sup>82,103,118,121,125</sup>

Die vielfältigen, an der Entstehung von akutem und chronischem Nierenversagen beteiligten Faktoren des Immunsystems werfen nun die Frage nach ihrem Zusammenwirken in der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen und einer potentiellen Inhibierung dieser molekularen Prozesse auf.

## **1.7 Molekulare Mechanismen der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen**

Da in der vorliegenden Arbeit der renale Ischämie-Reperfusionsschaden als Modell für die akute Tubulusnekrose verwendet wurde, wird im folgenden Abschnitt ausschließlich auf die molekularen Abläufe nach IRI eingegangen.

Eine IRI-bedingten Schädigung führt zunächst zu einer Unterbrechung des renalen Blutflusses und somit der Sauerstoffzufuhr, darauffolgend zu einer Reperfusion und somit auch beginnender Einschwemmung von Entzündungszellen.<sup>129</sup> Es kommt also in der frühen Schädigungsphase zu renaler Hypoxie, die besonders in den stark Sauerstoff-abhängigen Tubuluszellen des S3-Segments zu reguliertem und unreguliertem Zelltod führen (Abb. 7B).<sup>45,47</sup> Als Arten der regulierten Nekrose wurden im renalen Ischämie-Reperfusionsschaden Nekroptose, Ferroptose, MPT-RN, Apoptose der Tubuluszellen und NETose/ETose der Immunzellen wie Neutrophilen und Makrophagen identifiziert.<sup>77,80,82,84,92</sup>



**Abbildung 7: Molekularer Ablauf einer akuten Tubulusnekrose und darauffolgender steriler Entzündungsreaktion**

Der obere Teil der Abbildung stellt den bereits beschriebenen Verlauf der Nierenfunktionsparameter nach Schädigung dar. Der untere Teil der Grafik zeigt den Ablauf der Tubulusnekrose und nachfolgenden sterilen Entzündungsreaktion. In der Homöostase besteht die Niere aus strukturell und funktionell gesundes Nierenparenchym, in den Gefäßen zirkulieren Neutrophile Granulozyten (A). In der frühen Schädigungsphase sterben Tubuluszellen durch regulierte Nekrose ab, setzen DAMPs und proentzündliche Zytokine frei und durch Infiltration von Neutrophilen eine Entzündungsreaktion in Gang, die wiederum das renale Gewebe schädigt. Aufgrund der strukturellen Schädigung nimmt die Nierenfunktion und so auch die GFR ab (B). In der späten Schädigungsphase infiltrieren Monozyten, die sich im vorherrschenden entzündlichen Milieu zu M1-Makrophagen differenzieren und die Entzündung fortführen. Parallel erreicht die GFR einen Tiefst- und das Serumkreatinin einen Höchstwert (C). Der Makrophagen-Switch von M1 zu M2 signalisiert die Resolution der Entzündung und den Beginn der Regenerationsphase. M2-Makrophagen fördern ein anti-entzündliches Milieu, die Entfernung geschädigter Zellen und Zellteile und die Hypertrophie und -plasie der verbliebenen Tubuluszellen zu einem funktionellen und strukturellen Ersatz der abgestorbenen Zellen. Folglich fängt die Nierenfunktion an, sich zu erholen (D). Im Langzeitverlauf kommt es durch Infiltration von Fibroblasten und Sezernierung von Komponenten der Extrazellulärmatrix zu Fibrose und somit räumlichen Stabilisierung des verbliebenen Nephrons (E). Die in geringem Maße stattfindende „echte“ Regeneration ist hier nicht dargestellt. Modifiziert nach Kundert et al.<sup>43</sup>

Der Beitrag unregulierter Nekrose durch z.B. mechanisches Trauma wird hierfür als sehr gering eingeschätzt. Bis auf die Apoptose führen alle diese Arten der regulierten Nekrose zu einer Ruptur der Plasmamembran und somit zu einer Freisetzung intrazellulärer Bestandteile

nach extrazellulär. Dort werden sie von PRRs und TLRs als DAMPs und Alarmine erkannt und rufen eine sterile Entzündungsreaktion hervor (Abb. 7B).<sup>130,131</sup> Eine Aktivierung von PRRs und TLRs durch DAMPs führt zu einer Aktivierung von Makrophagen und Neutrophilen, einer Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen und einer T-Zell-vermittelten Antwort des adaptiven Immunsystems.<sup>71,73</sup> Die ersten nach Schädigung infiltrierenden Immunzellen sind Neutrophile Granulozyten und natürliche Killer T-Zellen, wobei erstere bereits nach 30 Minuten in den peritubulären Kapillaren erscheinen.<sup>43,132</sup> Die in der sterilen Entzündungsreaktion sezernierten proentzündlichen Zytokine führen wiederum zu Zelltod, so können z.B. TNF $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  Nekroptose und NETose induzieren<sup>75,86,133</sup>. Die so entstehende Nekroinflammation führt Schädigung und Entzündung fort und kann sie auch verstärken.<sup>76,79</sup>

Unter den DAMPs spielen Histone eine besondere Rolle, da sie starke direkt zytotoxische Wirkung und durch Aktivierung von TLR2/4 und des NLRP3-Inflammasoms proentzündliche Eigenschaften aufweisen.<sup>104,105,127</sup> Dementsprechend tragen sie zu verschiedenen Modellen der akuten Organschädigung wie auch dem renalen Ischämie-Reperfusionsschaden wesentlich bei.<sup>81,82,103,118,121</sup> Die durch extrazelluläre Histone vermittelte Schädigung geschieht vor allem in der frühen Schädigungsphase der ATN innerhalb der ersten Stunden nach IRI, da hier die meisten Tubuluszellen durch regulierte Nekrose absterben und auch die bereits nach 30 Minuten infiltrierenden Neutrophilen beginnen, durch NETose Histone freizusetzen.<sup>43</sup>

Die späte Schädigungsphase der ATN ist durch die Infiltration verschiedener Immunzellen wie Monozyten charakterisiert, die sich dann abhängig vom Mikromilieu zunächst in proentzündliche M1-Makrophagen umwandeln, welche die Entzündungsreaktion durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL1 fortführen und weiter zu renaler Schädigung beitragen (Abb. 7C).<sup>132,134–136</sup> Schwächt sich die sterile Entzündung mit der Zeit ab und ändert sich somit das Mikromilieu, polarisieren sich die Makrophagen zu M2-Makrophagen um, die über die Sekretion von IL-1R2, IL-10 und TGF $\beta$  zu einer Resolution der Entzündung führen (Abb. 7D).<sup>136–138</sup> Der Makrophagenphänotyp ist also abhängig vom molekularen Milieu, was wiederum von nekrotischen Zellen und der Reaktion des angeborenen und erworbenen Immunsystems abhängt, die molekularen Mechanismen

hierfür sind noch nicht gänzlich verstanden.<sup>136</sup> Da das Phänomen des Makrophagenswitches größtenteils *in vitro* und somit in deutlich reduzierter Komplexität dieses Mikromilieus untersucht wurde, besteht die Möglichkeit, dass sich die Phänotypen *in vivo* eher fließend darstellen und verändern lassen.<sup>43</sup> Insgesamt beeinflusst die Polarisation der Makrophagen die Progression der akuten Nierenschädigung also wesentlich, dementsprechend wirkt sich die Verhinderung des M1-M2-Switches und somit des Beginns der Wiederherstellungsphase negativ auf das renale Langzeitprognose aus.<sup>139</sup> Desweiteren kommt es in der späten Schädigungsphase durch das proentzündliche Milieu zu kontinuierlicher Nekroinflammation und somit zu weiterer Nekrose und Inflammation, die sich selbstverstärkend bis zu einem Organversagen, Sepsis oder Tod exazerbieren kann.<sup>83</sup>

Eine Abschwächung der sterilen Entzündung ist also die Bedingung für die anschließende Wiederherstellungsphase, in der das renale Gewebe strukturell und funktionell regeneriert.<sup>140,141</sup> Dies kann auf verschiedene Wege geschehen: Im Gegensatz zur regulierten Nekrose ist die Apoptose von Immunzellen ein antientzündlicher Prozess, der die Regeneration von Epithel anstößt.<sup>142</sup> In der Niere ansässige mononukleäre Phagozyten phagozytieren einerseits die Bestandteile nekrotischer Zellen, andererseits auch apoptotische Zellen, was sie zu einer Sekretion von TGF $\beta$  und IL-10 anregt.<sup>143</sup> M2-Makrophagen tragen durch die Sekretion antientzündlicher Zytokine und Wachstumsfaktoren ebenfalls zu einer Beendigung der Entzündung bei (Abb. 7D).<sup>144,145</sup> Auch die Aktivierung von TLRs durch DAMPs spielt eine Rolle, da hierbei zwar initial das innate Immunsystem stimuliert wird, aber auch immunregulatorische Zytokine wie IL-22 sezerniert werden.<sup>146</sup> IL-22 wirkt pro-regenerativ und pro-proliferativ und sorgt somit für die Instandhaltung des Epithels.<sup>147,148</sup>

In der Wiederherstellung der Nierenfunktion und –struktur spielt auch die Aktivierung des Zellzyklus der verbleibenden Tubuluszellen eine wichtige Rolle. Direkt nach der Schädigung treten die differenzierten Tubuluszellen in abnorme Zellzyklen ein, die Endoreplikationszyklen oder Endozyklen genannt werden.<sup>52</sup> Durch sie kommt es zu einer Steigerung von Größe und Funktion, die sich in Zellhypertrophie und Hyperfiltration der betroffenen Nephrone äußert.<sup>52</sup> Die Neuentstehung abgestorbener Tubuluszellen durch die Teilung verbleibender Zellen ist jedoch ein seltener Vorgang, der ausschließlich von renalen

Progenitorzellen im S3-Segment des proximalen Tubulus und im aufsteigenden Teil der Henle-Schleife durchgeführt wird.<sup>52,149,150</sup> Insgesamt werden durch echte Regeneration in der geschädigten Niere maximal 50% der nekrotischen Zellen wiederhergestellt.<sup>52,149</sup> Treten jedoch bereits differenzierte Tubuluszellen während der Schädigungsphase in den Zellzyklus ein, kann dies zu weiterem Zellverlust führen, entsprechend zeigt die Verhinderung der Progression des Zellzyklus nach ATN einen protektiven Effekt.<sup>151,152</sup> Eine medikamentöse Stimulation der Regeneration nach ATN sollte also möglichst die renalen Progenitorzellen adressieren. Die beiden Histon-Deacetylaseinhibitoren Trichostatin-A (TSA) und 4-Phenylbutyrat (4-PBA) zeigten sowohl eine Expansion der renalen Progenitorzell-Population beim Zebrafisch<sup>153</sup> als auch eine verbesserte funktionelle und strukturelle Regeneration und reduzierte Fibrose im Langzeitoutcome nach ATN in der Maus.<sup>52,154</sup>

Zeitgleich zur Regeneration treten mesenchymale Gewebeheilung und Fibrose auf, die die Aufgabe haben, die restlichen Nephrone bis zur vollständigen Regeneration durch Extrazellulärmatrix räumlich zu stabilisieren (Abb. 7E).<sup>43</sup> Die Sekretion epithelialer, vaskulärer und fibrotischer Wachstumsfaktoren stimuliert zelluläres Wachstum und Produktion von Extrazellulärmatrix bis zur Wiederherstellung des Epithels, bleibt diese jedoch aus, kommt es zu mesenchymaler Gewebeveränderung und Fibrose.<sup>155–157</sup> Hierbei wird von M2-Makrophagen und Fibrozyten der *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sezerniert, der als Hauptregulator der Fibrose eine zentrale Rolle spielt.<sup>156–158</sup> Auch geschädigte Tubuluszellen, die Endozyklen durchlaufen oder aber in einem G2/M-Zellzyklusarrest verweilen, sezernieren diverse profibrotische Faktoren wie TGF- $\beta$ .<sup>52,159</sup> Insgesamt kann unregulierte interstitielle Fibrose zu verminderter Vaskularisation, weiterer tubulärer Ischämie und Atrophie und schließlich verminderter Nierenfunktion führen.<sup>155,157,160</sup> Risikofaktoren für unregulierte Fibrose sind unter anderem chronisch persistierende Entzündung, wiederholte Gewebeschädigung und andauernde Infektionen.<sup>157</sup>

Will man nun in die Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen therapeutisch intervenieren, muss man die verschiedenen Phasen einer akuten Tubulusnekrose mit dem klinischen Alltag vereinen. Der ausgeprägteste therapeutische Effekt ist hierbei von einer präemptiven Histonneutralisation und Zelltod inhibition zu erwarten, da hierbei jeweils der größte Anteil des initialen Zelltods und der Histonfreisetzung, die die Nekroinflammation

und somit Organschädigung in Gang setzen, verhindert werden können. Da eine ANS aber klinisch selten präemptiv, jedoch meistens stark verzögert erkannt und somit therapiert werden kann, hat die Untersuchung der verzögerten Therapie eine hohe klinische Relevanz. Der entsprechende Ansatzpunkt ist ebenfalls der fortlaufende Schädigungsmechanismus der Nekroinflammation, dessen Haupttreiber extrazelluläre Histone und regulierter Zelltod auch verzögert therapiert werden können. Hierbei muss auch ein therapeutisches Zeitfenster identifiziert werden, in dem noch eine Wirksamkeit der Intervention gegeben ist. Entsprechend der Phasen einer akuten Nierenschädigung stellt die Unterstützung der kontinuierlich ablaufenden parenchymalen Regeneration einen weiteren therapeutischen Ansatzpunkt dar, die Substanz Trichostatin-A zeigte hierfür bereits vielversprechende Effekte.

## 1.8 Hypothese

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Abhängigkeit der verschiedenen Phasen der akuten Nierenschädigung durch Inhibition von Zelltod, Neutralisierung extrazellulärer Histone und Stimulation parenchymaler Regeneration nach Schädigung die Progression von akuter in eine chronische Nierenschädigung abzuschwächen und dabei das therapeutische Zeitfenster für eine verzögerte Therapie zu identifizieren. Hierbei wurden folgende Hypothesen vertreten:

- A) Ein großer Anteil des initialen Schadens nach renaler IRI wird durch Zelltod vermittelt, folglich wirkt im Einklang mit der Nekroinflammation die präemptive und die verzögerte Inhibition des Zelltodes in Kurzzeit- und Langzeitprognose protektiv.
- B) Nach renaler IRI werden kontinuierlich zytotoxische und proentzündliche Histone freigesetzt, dadurch wirkt die präemptive und verzögerte Neutralisation extrazellulärer Histone hierbei sowohl in Kurzzeit- als auch Langzeitprognose protektiv.
- C) Die kontinuierliche Stimulation der Regeneration durch Trichostatin A nach renaler IRI zeigt einen protektiven Effekt in der Langzeitprognose.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Tierversuche

##### *Tiere*

C57BL/6N-Wildtyp (männlich)

Charles River, Sulzfeld, D

Alle Mäuse wurden in Polypropylen-Käfigen in Standardbedingungen bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  Raumtemperatur und 12h Licht-/Dunkelheitszyklus gehalten. Die standardmäßige chow-Futter (sniff, Soest, Deutschland) und Wasser waren für die Tiere zu jedem Zeitpunkt der Haltung und Experimente verfügbar. Die Käfige und Zubehör, das Nistmaterial, das Wasser und das Futter wurden vor Gebrauch autoklaviert. Alle Aspekte der Tierhaltung und -behandlung wurden durch die *Regierung von Oberbayern* genehmigt.

##### *Ischämie-Reperfusion-Operation*

Octagon 20Advance Brüter

Brinsea, Weston, UK

Kleintier-OP-Tisch M12511

Medax, Neumünster, D

Thermo USB Temperaturlaufzeichnungsgerät

Physitemp Instruments, Clifton, USA

ret-3-iso type T thermocouple Temperaturfühler

Physitemp Instruments, Clifton, USA

Infrarotlampe R95E

Philips, Hamburg, D

OP-Besteck (chirurgische Pinzetten, Scheren)

Miltex, Rietheim-Weiltheim, D

5-0 Vicryl Faden resorbierbar

Johnson&Johnson, Diegem, B

5-0 Ethibond\*Excel Faden nicht resorbierbar

Johnson&Johnson, Diegem, B

Yasargil Aneurysma Clips

Aesculap, Melsungen, D

Double Bayonet Clip Applier

Aesculap, Melsungen, D

Isotonische Kochsalzlösung

Fresenius Kabi, Bad Homburg, D

Medetomidin (=Dormitor)

Vetoquinol, Ismaning, D

Midazolam (=Dormicum)

Roche, Mannheim, D

Fentanyl

Hexal, Holzkirchen, D

Atipamezol (=Antisedan)

ProVet AG, Lyssach, D

Flumazenil (=Anexate)

Roche, Mannheim, D

Naloxon	Ratiopharm, Ulm, D
Necrostatin-1s	Biovision, Milpitas, USA
Ferrostatin-1	CalBiochem, Darmstadt, D
Cyclosporin	Novartis, Nürnberg, D
Bepanthen	Bayer, Leverkusen, D

### ***GFR-Messung***

„NIC-Kidney“-GFR-Messgerät	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, D
„NIC-Kidney“-Akkus+ Ladegeräte	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, D
FITC- Sinistrin	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
„NIC-Kidney patch“ Lichtdurchlässige Klebefolie	Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim, D

### ***Narkose und Organentnahme***

Isofluran CP	CP-Pharma, Burgdorf, D
Einbettkassetten	NeoLab, Heidelberg, D
Model 100 Isofluran Vaporizer	SurgiVet, Norwell, USA
Maus-Narkosekammer	SurgiVet, Norwell, USA

### ***Kreatinin-/BUN-Messung***

Creatinine FS Kit	DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, D
BUN FS Kit	DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, D

## **2.1.2 Zellkultur**

### ***Zelllinien***

#### *HK-2 Zellen*

Für *in vitro*- Experimente zu tubulärer Schädigung HK-2 Zellen, die von ATCC erworben wurden, verwendet. Diese wurden erstmals durch Michael J. Ryan hergestellt, indem aus

einem menschlichen Nierenkortex isolierte primäre Tubulusepithelzellen (PTCs) einem rekombinanten Retrovirus, der die HPV 16-Gene E6/E7 enthielt, exponiert wurden. Sowohl Phänotyp (diverse spezifische Oberflächenmarker) als auch Funktion (spezifische Transportfunktionen und Kanäle) sind in hohem Maße übereinstimmend mit PTCs. Durch PCR konnte die Präsenz der HPV16-Gene E6/E7 im Genom der HK-2 Zellen nachgewiesen werden<sup>161</sup>.

### *BWA3 Hybridomzellen*

Die BWA3-Hybridomzellen zur Herstellung von anti-Histon-IgG wurden dankenswerterweise von der Firma Immunomedics (Morris Plains, NJ, USA) zur Verfügung gestellt. Hierfür isolierten Prof. Monestier und seine Arbeitsgruppe spezifische anti-Histon IgG produzierende Splenozyten von autoimmunen Mäusen des Stammes NZBxNZW/F1 und fusionierten diese mit nicht sezernierenden Plasmazytomzellen der Art SP2/0. Um die spezifische Antikörperproduktion zu überprüfen wurde der Zellkulturüberstand der Hybridomzellen mit verschiedenen Histonen (H2A, H2B, H3, H4) aus bovinem Thymus inkubiert und die Antigen-Antikörperreaktion durch einen *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert. Mit Hilfe von Affinitätschromatographie konnten Monestier, *et al.* nachweisen, dass aus BWA3 Hybridomzellen gewonnenes anti-Histon-IgG vor allem spezifisch für die Histon-Unterarten H2A und H4 ist<sup>128</sup>. Der besseren Verständlichkeit halber wird der BWA3-Antikörper in dieser Arbeit allerdings als anti-Histon-IgG (aHis) bezeichnet.

### **Geräte**

Steril Card Hood Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA
UV-Licht	Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen, D
Vakuumfiltration 150 „rapid“-Filtermax	TPP, Trasadingen, CH
Wasserbad HI 1210	Leica Microsysteme, Wetzlar, D
Kryovials	A Laboratories, Eastleigh, UK
CoolCell Einfrierboxen	Biocision, Larkspur, USA
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe, D
6-Well-Platten (Zellkulturschalen)	TPP, Trasadingen, CH
12-Well-Platten (Zellkulturschalen)	TPP, Trasadingen, CH
24-Well-Platten (Zellkulturschalen)	TPP, Trasadingen, CH

96-Well-Platten (Zellkulturschalen)	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturflasche, 75cm <sup>2</sup> , 150 cm <sup>2</sup> , 300cm <sup>2</sup>	TPP, Trasadingen, CH
Kryovials	A Laboratories, Eastleigh, UK

### **Waagen**

BP 110 S	Sartorius, Göttingen, D
Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH

### **Zentrifugen**

Zentrifuge Heraeus, Minifuge T	VWR Internation, Darmstadt, D
Zentrifuge Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5418 C	Eppendorf, Hamburg, D
Universal 16	Hettich, Bäch, CH
Megafuge 1.0R	Kendro, Langenselbold, D

### **Pipetten**

Serologische Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	BD, Heidelberg, D
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA
Multikanalpipette	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe Pipetus-classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Pipettierhilfe EasyPet 3	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettenspitzen 1 - 1000 µl TypGilson	Peske, Aindling-Arnhofen, D

### **Material**

DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Fetales bovines Serum (FBS)	Summit Biotechnology, Fort Collins, USA
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Trypsine/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EBM Basal Medium 500ml	Lonza Group Ltd, Basel, Ch

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, D
Total Histone	Roche, Mannheim, D
Propidium-Iodid	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Calcein	BD Life Sciences, Heidelberg, D

### ***IgG-Isolation***

LKB Pump P-1	Pharmacia, Uppsala, S
Hi Trap Protein G HP Column	Amersham, Uppsala, S
5l Schottflasche	Duran, Mainz, D
DU530 Spektrophotometer	Beckman Coulter, Krefeld, D
pH-Messstreifen	
CD Hybridoma Medium (1x)	Gibco Life Technologies, Grand Island, USA
Bindungspuffer	20mM Natriumphosphat pH=7,0
Elutionspuffer	0,1M Glyzin-HCl pH=2,7
Neutralisierungspuffer	1M Tris-HCl pH= 9,0
Fetales bovines Serum (ultralow IgG grade)	Aidenbach, D
Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

## **2.1.3 RNA-Expressionsanalyse**

### ***RNA-Isolation***

Nano drop	PEQLAB Biotechnology, Erlangen D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
PureLink RNA Mini Kit	Ambion, Darmstadt, D
RNasin (40 U/ $\mu$ l)	Promega, Mannheim, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
RNase free Spray	Gene Choice, Frederick, USA

### ***MOPS-Gelelektrophorese***

Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
RNA loading buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

10x MOPS – Puffer

83,7g MOPS (MW 209,3g/mol)

13,6g Na-Acetate (MW 136,1 g/mol)

3,7g EDTA (MW 372,24 g/mol)

in 1l Wasser gelöst, pH auf 7 eingestellt

### ***cDNA-Synthese***

Superscript II

Invitrogen, Karlsruhe, D

Linear Acrylamid

Ambion, Darmstadt, D

DTT (0,1M)

Invitrogen, Karlsruhe, D

dNTPs (25nM)

GE Healthcare, München, D

Hexanucleotide

Roche, Mannheim, D

5x First strand Buffer

Invitrogen, Karlsruhe, D

### ***qRT-PCR***

LightCycler 480 Real-Time PCR System

Roche, Basel, CH

Klebefolie

Roche, Basel, CH

LightCycler 480 Multiwell-Platte 96

Roche, Basel, CH

MgCl<sub>2</sub> (25mM)

Fermentas, St. Leon-Rot, D

10x Taq Puffer without detergent

Fermentas, St. Leon-Rot, D

SYBR Green Dye detection

Applied Biosystems, Norwalk, USA

BioStab PCR Optimizer

Bitop, Witten, D

Taq DNA Polymerase

New England BioLabs, Ipswich, USA

### ***Primer***

<b>Gen</b>	<b>Vorwärts-Primer</b>	<b>Rückwärts-Primer</b>
<b>18s</b>	GCAATTATCCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC
<b>KIM-1</b>	TGGTTGCCTCCGTGTCTCT	TCAGCTCGGGAATGCACAA
<b>NGAL</b>	ATGTCACCTCCATCCTGG	GCCACTTGACATTGTAG
<b>IL-6</b>	TGATGCACTTGACAGAAAACA	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
<b>CCL2</b>	GCTACAAGAGGATCACCA	GTCTGGACCCATTCC
<b><math>\alpha</math>SMA</b>	CCCCTGAAGAGCATCGGACA	TGGCGGGGACATTGAAGGT
<b>Clusterin</b>	CAAGTGCCGGGAGATCTTGT	GTCAACCTCTCAGCGACCTG

<b>Collagen</b>	CTGGAGAACCTGGTGCAAAT	CCTCGGAAGCCACTAGGAC
<b>Ficronectin</b>	CGAGGTGACAGAGACCACAA	CTGGAGTCAAGCCAGA
<b>TGFβ</b>	TGGAGCAACATGTGGAACTC	CAGCAGCCGGTTACCAAG

#### 2.1.4 Proteinnachweis

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
ELISA Micoplate Strip Washer ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall, D
Murines TNFalpha ELISA-Set	BioLegend, London, UK
Murines IL6 ELISA-Set	BD, Erembodegem, B
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe, D

#### 2.1.5 Histologie

##### ***Mikroskope***

Lichtmikroskop Leitz DM IL	Leica Microsysteme, Solms, D
Progress CF (CCD-Kamera)	Jenoptik, Jena, D
Lichtmikroskop Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D
Axiocam HR	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, D

##### ***Fixierung und Färbung***

Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München, D
PAS	Bio-Optica, Mailand, I
Xylol	Merck, Darmstadt, D
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt, D
Pertex	Medite, Burgdorf, D
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Uranylacetat (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> UO <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Blei(II)-nitrat	Merck, Darmstadt, D
Methylenblau	Merck, Darmstadt, D

Saccharose	Merck, Darmstadt, D
Aceton	Merck, Darmstadt, D
2-Dodecenylsuccinic acid anhydride (DDSA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Glycid Ether 100 (EPON 812)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Methylnadic anhydride (MNA)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol (MDP 30)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, D
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, D
Glutaraldehyd Grade I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EPON Lösung (50ml)	9,26ml DDSA 24,26ml EPON 812 (Glycid Ether 100) 16,48ml MNA 0,75ml DMP 30
Sörensen – Phosphatpuffer (1000ml)	7,335g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,281g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 1000ml dest. Wasser
Glutaraldehydlösung 6,25%	250ml Glutaraldehyd 25% 750ml Sörensen – Phosphatpuffer

### *Sonstiges*

Mikrotom HM 340E	Microm, Heidelberg, D
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Sicherheitswerkbank Microflow	Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Leukoplast Klebeband	BSN medical, Hamburg, D
BD Spritzen 1ml, 2ml, 5ml	BD, Madrid, E
BD Microlance Injektionsnadeln (20G- 30G)	BD, Drogheda, IR
Rasierklingen	Wilkinson, Solingen, D
Luftreinigungsgerät	Bickford, Wales Center, USA
Einwegküvetten 1,5ml Plastibrand	Brand, Gießen, D
Eppendorf-Gefäße 1,5ml; 2,0 ml	TPP, Trasadingen, CH

Falcons 15ml, 50ml

BD, Heidelberg, D

### **2.1.6 Software**

Office 2016

Microsoft, Redmond, USA

Mendeley

Mendeley, London, GB

GraphPad Prism 5

GraphPad, La Jolla, USA

Inkscape

open source

MPDlab

Mannheim Pharma Diagnostics, Mannheim,  
D

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Experimentelles Design**

Um das therapeutische Fenster der anti-Histon IgG- und Zelltodinhhibitoren-Gabe bei Ischämie-/Reperfusionsschaden (IRI) zu identifizieren, wurden anti-Histon IgG und die Zelltodinhhibitoren als therapeutische Intervention vor und nach der Induktion renaler Ischämie appliziert. Nach Identifikation des therapeutischen Fensters wurde zusätzlich noch die Verbesserung des Langzeit-Outcomes des anti-Histon IgG und Trichostatin-A (TSA) bei renaler Ischämie untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von Histonen und deren Neutralisierung durch anti-Histon IgG auf die Proliferationsfähigkeit von Tubuluszellen untersucht. Zur Durchführung dieser Experimente wurden verschiedene Strategien verfolgt:

a) Applikation von anti-Histon IgG oder Zelltodinhhibitoren nach bilateraler IRI mit Analyse nach 24 h

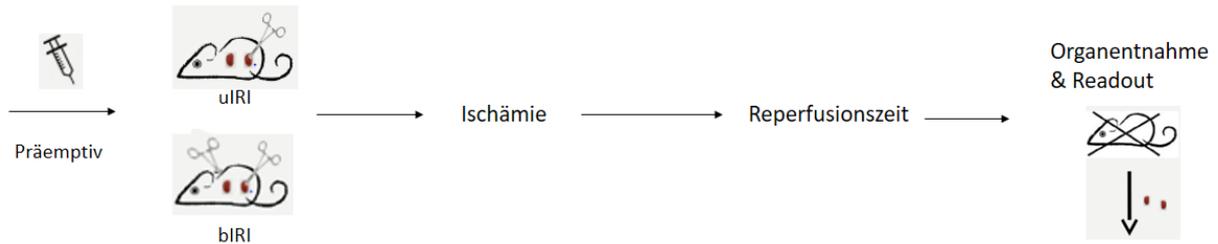
b) Applikation von anti-Histon IgG oder Zelltodinhhibitoren nach unilateraler IRI mit Analyse nach 24 h

c) Applikation von anti-Histon IgG oder TSA nach unilateraler IRI mit Analyse nach 5 Wochen

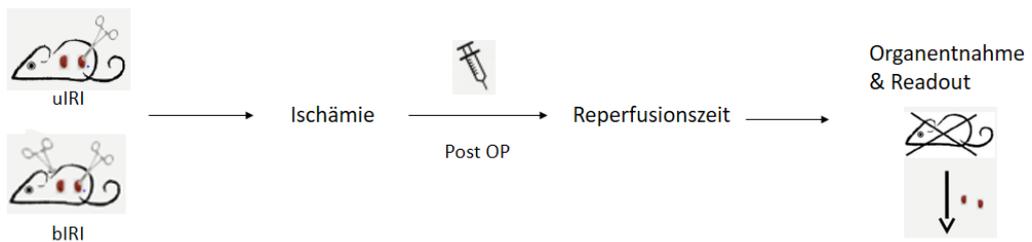
d) Proliferations-, Zellzyklus- und qPCR-Analyse von HK-2 Zellen nach Schädigung durch Histone

Übersicht über die Durchführung der jeweiligen Experimente:

### Präemptive Applikation + IRI



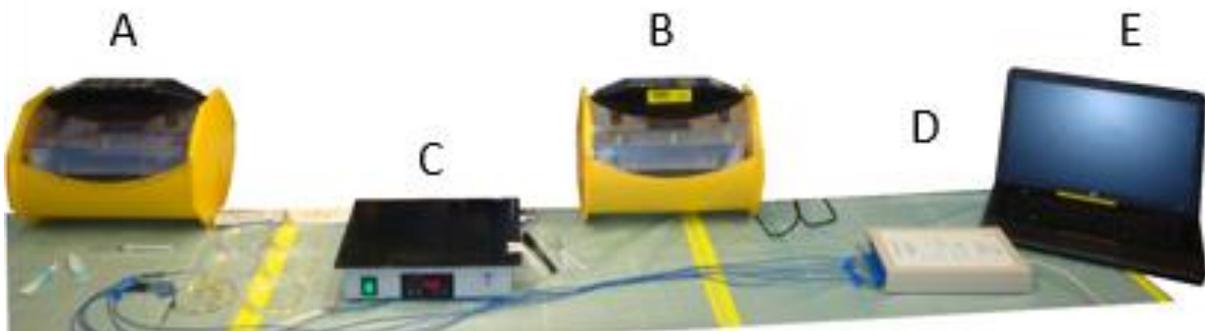
### Postoperative Applikation + IRI



Der operative Eingriff zur Induktion des renalen Ischämie-Reperfusionsschaden wurde nach der hier beschriebenen Methode von Marschner, *et al.* durchgeführt<sup>162</sup>.

## 2.3.2 Ischämie-Reperfusions-Operation und Organentnahme

Im Folgenden wird der Ablauf der unilateralen Ischämie-Reperfusions-Operation (IRI) beschrieben. Der Geräteaufbau ist sowohl bei uni- als auch bilateralen Operation gleich:

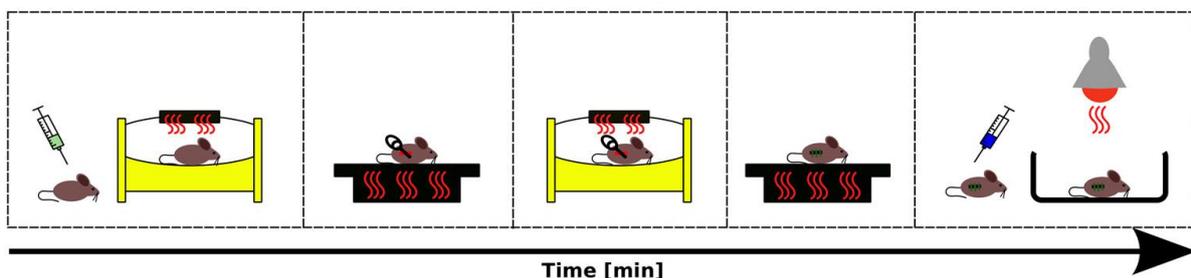


**Abbildung 8: Aufbau des Operationstisches für IRI-Operation**

Die beiden Brüter dienen der prä- und postoperativen Temperaturngabe und sind jeweils unterschiedlich einzustellen (präoperativer Brüter **(A)**: 37,0°C und postoperativer Brüter **(B)**: 38,0°C), der beheizbare Operationstisch **(C)** auf 42°C. Mit den Temperatursonden und dem Thermo USB Temperatureaufzeichnungsgerät **(D)** ist es möglich die Körpertemperatur der Mäuse zu jeder Zeit am Laptop **(E)** zu überwachen. Abbildung modifiziert nach <sup>162</sup>

Zu Beginn der Operation wurde die Maus mit 100 µl einer Mischung aus 3 Narkosekomponenten (Medetomidin 0,5 mg/kg, Midazolam 5 mg/kg, Fentanyl 0,05 mg/kg) i.p. anästhesiert, die rektale Temperatursonde angebracht und die Augen mit Bepanthen benetzt um sie vor Austrocknung zu schützen. Nachdem die Maus eine tiefe Sedierung erreicht und die Körpertemperatur der Maus nun über mehrere Minuten konstant über 37,5 °C war, konnte man mit der Operation beginnen.

Nach Rasur der benötigten Stelle unterhalb des Rippenbogens wurde durch einen Flankenschnitt die Bauchhöhle eröffnet und die Niere konnte mithilfe einer Pinzette mobilisiert und der Gefäßstiel anschließend durch eine Aneurysmaklemme abgeklemmt werden. Die resultierende Ischämie konnte durch ein Erblassen der Niere beurteilt werden. Um die Niere vor Austrocknung zu schützen wurde sie darauffolgend wieder in den Bauchraum reponiert, so dass nur der Griff der Klemme sichtbar blieb. Da Schwankungen der Körpertemperatur auch Schwankungen der renalen Schädigung bedeuteten, wurde die Maus nun für die Ischämiezeit in den postoperativen Brüter transferiert. Die in diesen Versuchen gewählte Ischämiezeit betrug 25, 30 oder 35 Minuten für unilaterale und bilaterale IRI. Nach Ablauf der Ischämiezeit wurde die Klemme entfernt, die folgende Reperfusion zeigte sich durch einen Farbwechsel zur ursprünglichen Farbe. Ein eventueller perioperativer Flüssigkeitsverlust wurde durch die i.p. Gabe von 500 µl Kochsalzlösung ausgeglichen, anschließend wurden die Wunden mit resorbierbaren Fäden für Peritoneum und Haut verschlossen. Die Antagonisierung der Anästhesie erfolgte durch i.p. Injektion von 200 µl einer Antagonistenmischung aus 3 Komponenten (Atipamezol 2,5 mg/kg, Flumazenil 0,5 mg/kg, Naloxon 1,2 mg/kg).



**Abbildung 9: Ablauf der IRI-Operation**

Nach initialer Anästhesie erfolgt eine Temperaturkontrolle mittels rektaler Sonde in einem Brüter bei ca. 37,5°C. Nach Erreichen konstanter Körpertemperatur wird die Niere per Flankenschnitt freigelegt und der Hilus abgeklemmt, anschließend wird erneut die Temperatur in einem Brüter bei ca. 38,5°C gehalten. Bei Ablauf der entsprechenden Ischämiezeit wird die Klemme entfernt und die Narkose antagonisiert. Abbildung modifiziert nach Marschner, *et al.*<sup>162</sup>

Zur Schmerzkontrolle wurde unmittelbar postoperativ, 12 h, 24 h, 36 h und 48 h postoperativ 0.05 mg/kg Buprenorphin s.c. appliziert. Die Experimente wurden nach 24 h (bilateral) und 5 Wochen (unilateral) beendet, indem durch Isofluran-Narkose und anschließende zervikale Dislokation die Mäuse euthanasiert und die Organe entnommen wurden. Die postischämischen und kontralateralen Nieren wurden entnommen, entkapselt und gedrittelt. Der mittlere Teil der Niere wurde für 24 h in 4% Formalin gelagert, der obere Nierenpol wurde in RNAlater eingefroren, der untere Nierenpol wurde für die Proteinextraktion in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **2.3.3 Blutprobenentnahme, i.v.- und i.p.-Injektion**

Die Mäuse wurden mit einer Isoflurannarkose mit 2,5% Isofluran und 2 l/h O<sub>2</sub> vorübergehend narkotisiert. Für die Blutprobenentnahme wurde anschließend ca. 500 µl Blut mithilfe einer Mikrolanzette aus der *Vena facialis* entnommen. Das Blut wurde in Eppendorfgläsern gesammelt die jeweils 10 µl 0,5 M EDTA pro 200 µl Blut enthielten und anschließend bei 12000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Plasmaüberstand anschließend abgenommen und bei -20 °C gelagert. Um eine i.v.-Injektion durchzuführen, wurde bei der narkotisierten Maus ebenfalls die *V. facialis* mit einer 30 G-Kanüle punktiert und die jeweilige Substanz mit Hilfe einer Spritze appliziert. Für eine i.p.-Injektion wurde die nicht narkotisierte Maus mit einer Hand an der Haut zwischen den Schulterblättern gegriffen und mit derselben Hand der Schwanz fixiert, um so eine Bewegungsunfähigkeit der Maus zu erreichen. Die Bauchhaut und Muskelschicht der fixierten Maus wurden nun mit einer 30 G-Kanüle durchstoßen und die gewünschte Substanz mit Hilfe einer Spritze appliziert.

### **2.3.4 Plasmakreatinin- und BUN-Messung**

Die Plasmakreatininwerte wurden durch die *Jaffé-Reaktion* mithilfe eines Creatinine FS Kits (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Deutschland) bestimmt. Gemäß der Anleitung wurden entsprechenden Verdünnungen des mitgelieferten Standards erstellt und die Reagenzien im benötigten Verhältnis 4(Reagenz 1): 1(Reagenz 2) gemischt. Anschließend wurden jeweils 10µl der jeweiligen Standard-Verdünnungen und der unverdünnten Plasmaproben in eine 96well-Platte gegeben. Nach Zugabe des vorbereiteten Reagenz wurde das Gemisch für 1

min bei Raumtemperatur inkubiert bevor in einem ELISA-Photometer die Absorption bei  $\lambda=492$  nm 1 min (t1) und 3 min (t2) nach Zugabe des Reagenzgemisches gemessen wurde. Die Veränderung der Absorption ( $\Delta T$ ) wurde berechnet als:

$$\Delta T = [(T2-T1) \text{ Probe oder Standard} - (T2-T1) \text{ blank}]$$

Der Kreatiningehalt der einzelnen Probe wurde dann berechnet als:

$$\text{Kreatinin [mg/dl]} = \Delta T \text{ Probe} / \Delta T \text{ Standard} \times \text{Konzentration Standard [mg/dl]}$$

Die Plasma-Stickstoff-Harnstoff-Konzentrationen (BUN, *blood urea nitrogen*) wurden mithilfe eines Urea FS Kits (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Deutschland) bestimmt. Auch hier wurden gemäß der Anleitung die entsprechenden Verdünnungen des mitgelieferten Standards erstellt und die Reagenzien im benötigten Verhältnis 4(Reagenz 1): 1(Reagenz 2) gemischt. Dann wurden jeweils 2 $\mu$ l der Standardverdünnungen und Proben in eine 96Well-Platte aufgetragen. Nach Zugabe der vorbereiteten Reagenz wurde das Gemisch für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor in einem ELISA-Photometer die Absorption bei  $\lambda=360$ nm 1 min (T1) und 2 min (T2) nach Zugabe des Reagenzgemisches gemessen wurde. Die Veränderung der Absorption wurde berechnet als:

$$\Delta T = [(T1-T2) \text{ Probe oder Standard} - (T1-T2) \text{ blank}]$$

Der BUN-Gehalt der einzelnen Proben wurde berechnet als:

$$\text{BUN [mg/dl]} = \Delta T \text{ Probe} / \Delta T \text{ Standard} \times \text{Konzentration Standard [mg/dl]}$$

### 2.3.5 Messung der glomerulären Filtrationsrate bei Mäusen

Die Messung der GFR bei Mäusen wurde mithilfe des Geräts „NIC-Kidney“ durchgeführt. Dieser auf der Haut angebrachte Imager emittiert Licht mit einem Exzitationsmaximum von 470 nm und detektiert transkutan durch eine Photodiode fluoreszierendes Licht mit einem Emissionsmaximum von 525 nm. So kann nach i.v. Applikation des markierten Polysaccharids FITC-Sinistrin die Eliminationskinetik dieses rein renal eliminierten Farbstoffes in den Hautgefäßen gemessen werden.

Um eine optimale Anbringung des Geräts und damit Ablauf der Messung zu gewährleisten, musste die Maus in einer Narkosekammer mit Isofluran vorübergehend narkotisiert und die Haare mit einer Rasierklinge im Nacken- und Rückenbereich vollständig entfernt werden. Danach wurde das angeschaltete Gerät mit Batterie auf der freirasierten Stelle im Rücken-

/Nackebereich der Maus angebracht. Es wurde nun für ca. 15 Minuten ein Hintergrundwert der Fluoreszenz gemessen. Danach wurde die Maus erneut in Isofluran-Kurzzeitnarkose gelegt und es wurden 120 mg/kg Körpergewicht FITC-Sinistrin i.v. in die Schwanzvene appliziert. Für die Dauer der Messung (ca. 90 Minuten) wurden durch Haltung der wachen Mäuse in einzelnen Käfigen sichergestellt, dass weder Maus noch Imager Schaden erlitten. In dieser Messzeit detektierte das Messgerät nun die Eliminationskinetik des Tracers, der renal ausgeschieden wird und somit einen Rückschluss auf die GFR zulässt. Zur Beendigung der Messung wurde die Maus noch einmal mit Isofluran narkotisiert, das Gerät abgenommen und abschließend noch das Körpergewicht der Maus bestimmt. Die Analyse der Daten erfolgte nach Verbindung des „NIC-Kidney“ mit einem PC durch die ebenfalls von der Firma bereitgestellte Software „MPDlab“, die aus der Eliminationskurve die Plasma-Halbwertszeit des FITC-Sinistrins im Blut der Maus bestimmen kann. Aus dieser Halbwertszeit und dem Körpergewicht der Maus kann mithilfe eines empirisch ermittelten Umrechnungsfaktors gemäß folgender Formel die GFR [ $\mu\text{l}/\text{min}$ ] berechnet werden:

$$\text{GFR } [\mu\text{l}/\text{min}] = (14616,8 [\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g KG}] / t_{1/2}[\text{min}]) * \text{Körpergewicht [g]}/100$$



**Abbildung 10: Darstellung einer typischen Absorptionskurve einer 7 Wochen alten und gesunden männlichen C57BL/6N Maus**

Die rote Kurve gibt den Verlauf der gemessenen Fluoreszenz wieder. Die anfängliche und letzte Spitze kommen jeweils durch Umgebungslicht bei Montage bzw. Abnahme des NIC-Kidney zustande. Nach einer ca. 5minütigen Messung der baseline-Fluoreszenz, wird nach Injektion von FITC-Sinistrin ein starker Anstieg der Absorption mit Spitze ca. 8 Minuten nach Injektion registriert. In den folgenden 90 Minuten wird FITC-Sinistrin glomerulär filtriert, renal ausgeschieden und die abnehmende Fluoreszenz gemessen. So lässt sich nach Festlegung der initialen Fluoreszenz-Baseline (horizontale Linie) und zwei Referenzpunkten in Ausscheidungskinetik (vertikale Linien) mithilfe der Software MPDlab die Halbwertszeit des FITC-Sinistrin und durch o.g. Formel die murine GFR während dieser Zeit berechnen.

### **2.3.6 RNA-Analyse**

#### ***RNA-Isolation***

Ein Nierenpol wurde sofort nach Organentnahme mit einem Skalpell zerkleinert und in -20°C in RNA-later gefroren. Die RNA-Isolation wurde mit dem RNA-Isolationskit von Ambion (Ambion, CA, USA) basierend auf der Methode von Chomzynski und Sacchi <sup>163</sup> durchgeführt. Um die Zersetzung der RNA durch RNAsen zu verhindern wurde durchgehend an einem mit RNase-free-Spray intensiv gereinigten Arbeitsplatz gearbeitet. Zuerst wurde das bereits zerkleinerte Gewebe in 600 µl Lysispuffer gemischt mit 6 µl β-Mercaptoethanol überführt und anschließend mit einem Ultra-Turrax Homogenisator für 30 s auf Stufe 4 homogenisiert. Das Lysat wurde dann für 5 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert und 350 µl des Überstands in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dort wurden 350 µl 70%iger Ethanol zugegeben und die Lösung gründlich gevortext bis man die Ausfällung der RNA beobachten konnte. Die gewonnenen 700 µl Lösung wurden nun auf RNA-Mini-Säulen pipettiert und für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert, wobei die RNA durch die Membran in der Säule aufgefangen wurde und der Überstand verworfen werden konnte. Um nun das Ethanol auszuwaschen und die Reinheit der RNA zu erhöhen wurde sie zuerst mit Waschpuffer 1 (350 µl) gewaschen, dann DNA-Kontamination durch einen 15-minütigen DNase-Verdau (Qiagen) beseitigt, und anschließend nochmals mit Waschpuffer 1 (350 µl) und 2x Waschpuffer 2 (500 µl) gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation der Säulen bei 10000 rpm für 2 min und die anschließende Überführung der Säulen in sterile Eppendorfgefäße. Zu der verbleibenden RNA wurden nun 32 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und nach 2 min Inkubationszeit für 2 min bei 10000 rpm zentrifugiert, wodurch die RNA in die Eppendorfgefäße ausgewaschen wurde. Die Menge an isolierter RNA wurde im Anschluss gemessen und die aufgereinigte RNA konnte nun bei -20°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

#### ***Messung der Konzentration und Reinheit der RNA***

Die isolierten RNA-Proben wurden mithilfe eines „Nano drop“-Gerätes (PEQLAB Biotechnologis GmbH, Erlangen, Deutschland) überprüft. Hierfür wurden 2 µl der unverdünnten Probe auf das Analysemodul aufgetragen und durch das Gerät die

Konzentration und Reinheit der RNA bestimmt. Die Reinheit ergab sich aus dem Verhältnis OD 260nm/OD 280 nm, nur Proben die Werte zwischen 1,8 und 2,2 aufwiesen wurden als verwertbar betrachtet.

### ***Überprüfung der RNA-Integrität***

Die Überprüfung der Integrität der RNA erfolgte mithilfe einer 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS)-Gelelektrophorese. Hierfür wurde ein 1% Agarosegel gegossen, 3 µl RNA-Probe für 15 min mit 17 µl Ethidiumbromid-haltiger Lösung inkubiert. Anschließend wurden 20 µl der Probe in die Kammern des Agarosegels gegeben und die Elektrophorese bei konstanter Spannung (80V) in MOPS-Puffer für 1 h durchgeführt. Das Gel wurde nun in einem Gerät von UV-Licht durchleuchtet und dokumentiert. Bei Proben von guter Qualität waren jeweils die 18s- und 28s-Banden sichtbar, Proben schlechter Qualität zeigten sich durch undeutliche, verschmierte Banden.

### ***cDNA-Synthese***

Die RNA-Proben wurden mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase II (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden die Proben mit DEPC-behandeltem Wasser vermischt, bis sich eine Konzentration von 1µg/ 15 µl ergab. Die verdünnte RNA wurde nun für 10 min bei 65°C linearisiert. Für jede Probe wurde nun ein Mastermix aus 4,5 µl 5x First strand Puffer, 1 µl 0,1 M DTT, 0,45 µl 25mM DTT-Mischung, 0,25 µl Linear-Acrylamid, 0,25 µl Hexanukleotide, 0,5 µl RNAsin und 0,5 µl Reverse Transkriptase II gemischt. Nun wurde zu 15 µl jeder Probe 7,45 µl Mastermix zugegeben und die Proben anschließend in einem Thermomixer für 90 min bei 42 °C inkubiert, wobei die Umschreibung von RNA zu cDNA erfolgte. Diese Reaktion wurde dann durch eine 5-minütige Inkubation bei 85°C beendet und die cDNA-Proben konnten bei -20 °C gelagert werden.

### ***Quantitative real-time PCR***

Mit der *quantitative polymerase chain reaction* (qPCR) lassen sich spezifische Nukleinsäuren amplifizieren wodurch eine Quantifizierung der cDNA ermöglicht wird. Für diese Arbeit wurde das *SYBR Green DYE detection System* verwendet, bei dem sich der Farbstoff SYBRgreen I in die doppelsträngige DNA einlagert und somit einen Fluoreszenzzuwachs bewirkt, der durch den Light Cycler 480 (Roche, Mannheim) detektiert werden kann. Wird nun die Ziel-DNA vermehrt repliziert, kann eine erhöhte Fluoreszenz gemessen werden, was einen Rückschluss auf die cDNA- und somit auch RNA-Ausgangsmenge zulässt. Zur

Vorbereitung dieser Messung wurde zuerst ein SYBR GREEN Mastermix aus 10µl SYBR Green, je 0,6 µl Primer (forward und reverse; 1:10 verdünnt), 0,16 µl Taq-Polymerase und 6,64 µl H<sub>2</sub>O hergestellt. Von dieser Mischung wurden nun je 18 µl in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend jeweils 2 µl der gewünschten 1:10 verdünnten cDNA hinzugefügt. Auf jeder Platte wurde zusätzlich zu den gewünschten Genen noch als Referenz das Housekeeping-Gen 18s-rRNA mituntersucht, indem der Mix mit spezifischen Primern mit den entsprechenden cDNA-Proben vermischt wurde. Dieser Schritt ist nötig um eine Anschließend wurde die Platte mit Folie versiegelt und für 30 s bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert und zur Amplifizierung in den Light Cycler 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) gegeben. Jeder Amplifizierungsschritt bestand aus einer Initiationsphase bei 95 °C, einer Hybridisierungsphase bei 60 °C und einer Amplifizierungsphase bei 72 °C, insgesamt wurden die Schritte 45mal wiederholt und nach jedem Schritt die DNA-Menge durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert. Zum Abschluss musste noch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden um die Primerspezifität zu überprüfen. Bei der schrittweisen Temperatursteigerung von Raumtemperatur bis 95 °C wurden die DNA-Doppelstrangfragmente je nach Länge und ihrem GC-Gehalt jeweils bei einer spezifischen Temperatur denaturiert. Dies ließ sich in der Schmelzkurvenanalyse anhand eines Anstiegs der Fluoreszenzintensität bis zu einem Peak bei der spezifischen Denaturierungstemperatur und anschließendem Abfall der Fluoreszenz ablesen, da SYBR-Green nur mit doppelsträngiger DNA interkaliert. Waren die Schmelzeigenschaften der Primer nun identisch zeichnete sich für jede Schmelzkurve nur ein Peak ab. Zur Analyse der Ergebnisse wurde nun die Expression der Ziel-RNA in Verhältnis zur Expression der 18s-rRNA der jeweiligen Probe gesetzt.

### **2.3.7 Zytokin-ELISA**

Sämtliche Zytokinspiegel in den Plasmaproben wurden mithilfe von ELISA Kits gemäß den Anweisungen der Hersteller gemessen. Dazu wurden zuerst „Maxi-sorp“-Platten mit *capture*-Antikörper und *coating*-Puffer bedeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und unspezifische Bindungen mit 2% BSA-Lösung für 1 h blockiert. Anschließend wurden Standard, Proben und blank-Proben in den benötigten Mengen in den Wells verteilt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Platten 5mal mit Waschpuffer gewaschen und dann der Meerrettichperoxidase (HRP, *horse raddish peroxidase*)-konjugierte sekundäre Antikörper, der zuvor in mit 0,09% Natriumazid gepufferter Proteinbasen-Lösung verdünnt wurde, in die Wells hinzugegeben und für 1 h inkubiert. Die Platten wurden dann 7mal mit Waschpuffer gewaschen und mit jeweils 100 µl des Chromogens TMB für 30 min in Dunkelheit inkubiert. In dieser Zeit setzt das Enzym HRP das Chromogen TMB um was zu einer Farbveränderung hin zur Farbe „blau“ führt. Die Reaktion wurde dann durch Zugabe von 100 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Darauf folgend wurde dann die Absorption bei λ=450 nm (entsprechend der Farbe „gelb“) gemessen und im Vergleich mit dem Farbumschlag der Standardreihe konnte somit die Antigenkonzentration bestimmt werden.

### **2.3.8 In vitro- Methoden**

#### ***Allgemeine Kulturbedingungen***

Die Kultivierung der BWA3-Hybridomzellen und HK-2 Zellen erfolgte unter Standardbedingungen in einem Inkubator bei 37°C Temperatur und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt der Luft. Um sterile Bedingungen bei der Arbeit mit den Zellkulturen zu gewährleisten, wurden sämtliche Arbeiten in einer Sterilbank durchgeführt, wo ein laminarer Luftstrom, ein Filter und die kurzzeitige Bestrahlung mit UV-Licht vor Arbeitsbeginn eine keimfreie Umgebung garantierten. Zusätzlich wurden sämtliche Materialien und Geräte vor Benutzung mit 70%-igem Ethanol desinfiziert.

#### ***Einfrieren und Auftauen und Zellen***

Bei sehr frühen Passagen wurden die Zellen unter Standardbedingungen zunächst expandiert und danach eingefroren um spätere Experimente mit gleichen Ausgangszellen durchführen zu können. Um die Zellen einzufrieren wurden sie zunächst mit 1,5mM Trypsin/EDTA von der Schale abgelöst und dann mit 1000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet vorsichtig in Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Auf jedes Kryoröhrchen wurden nun 5-10 Millionen Zellen in Suspension verteilt und zunächst 1 h bei -20 °C und dann über Nacht bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden sämtliche Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um die Zellen bei Bedarf wieder aufzutauen wurde das entsprechende Kryoröhrchen aus dem Flüssigstickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Dann wurden die Zellen in 5 ml normalem Wachstumsmedium (DMEM+10% FCS+10%P/S) suspendiert und für 5-7 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann entfernt und die Zellen in frischem Wachstumsmedium in einer Zellkulturplatte kultiviert. Das Medium wurde nochmals nach 24 h gewechselt.

### ***Zellkultur***

HK-2 Zellen und wurden gemäß der Standardverfahren kultiviert. Die Zellen wurden wie eingangs beschrieben aufgetaut und anschließend in 150 cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen in Wachstumsmedium (DMEM+ 10%FBS+ 1%P/S) kultiviert. Die Zellen konnten nun bis zur Konfluenz wachsen, wobei alle 2 Tage das Medium gewechselt wurde. Bei 80-90 %iger Konfluenz der Zellen wurden sie zuerst von der Platte gelöst, indem 2 ml 1,5mM Trypsin/EDTA zugegeben wurde und für 2-3 Minuten inkubiert wurde. Nach der Ablösung wurde das Trypsin durch die Zugabe von Medium neutralisiert und die Suspension wurde dann bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstand wurde das Zellpellet anschließend in Wachstums medium resuspendiert und die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die benötigte Zellzahl konnte nun für Experimente oder weitere Kultur verwendet werden.

### ***Calcein-Färbung***

Um in Experimenten die jeweils überlebenden Zellen sichtbar zu machen, wurden diese mit Hilfe des Fluorescein-Derivats Calcein angefärbt. Hierfür wurden jedem Well einer 6-Well-Platte jeweils 20 µl des gelösten Farbstoffes hinzugefügt und die Zellen dann nach 5 Minuten Einwirkzeit unter einem Fluoreszenz-Mikroskop begutachtet.

### **2.3.9 BWA3 Hybridomzellen-Kultur und anti-Histon IgG Aufreinigung**

Anti-Histon IgG wurde aus dem Zellkulturüberstand von monoklonalen BWA-3 Hybridomzellen isoliert. Zuerst wurden in flüssigem Stickstoff eingefrorene BWA-3 Hybridomzellen aufgetaut und darauffolgend in normalem Wachstumsmedium (DMEM) mit 10% FBS und 1% Pencillin/Streptomycin bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann

mittels Zentrifugation gesammelt und in spezifischem CD Hybridoma Medium mit 5% ultra low IgG Serum, 1% Penicillin/Streptomycin und 2 mM Glutamin in Zellkulturflaschen kultiviert<sup>128</sup>. Die Zellen konnten nun bis zur Konfluenz wachsen und sezernierten dabei anti-Histon IgG in den Überstand. Nach 6-8 Tagen wurden die Zellen und der Zelldebris abzentrifugiert und das Antikörperhaltige Medium zur vollständigen Aufreinigung durch 0,22 µm Membranen gefiltert und schließlich bei 4 °C in Schott-Flaschen gelagert. Die Aufreinigung und Konzentration des Anti-Histon-Antikörpers geschah mithilfe von „high trap protein GHP“-Säulen. Zur Aktivierung wurden die Säulen mit 20 mM Natriumphosphat-Puffer (pH= 7,0) gespült, anschließend wurde der gereinigte Hybridomzell-Überstand durch die Säule geführt. Während des Durchlaufs binden die Antikörper an die „Protein GHP“-Säule und konzentrieren sich dort. Um den gebundenen Antikörper zu eluieren wurde die Säule mit 0,1 M Glyzin Hydrochlorid-Puffer (pH=2,7) perfundiert, die Lösung in 2 ml Eppendorfgefäßen gesammelt und der saure pH mit geeigneter Menge 1 M Tris-HCl Puffer (pH=9,0) auf 7 neutralisiert. Die Konzentration des so gewonnenen Antikörpers kann nun in einem Spektrophotometer durch die Messung der Absorption (optische Dichte OD) an der Wellenlänge 280 nm quantifiziert werden. Die endgültige Antikörperkonzentration in der Einheit [mg/ml] erhielt man für jedes Eppendorfgefäß durch Multiplikation des Absorptionswerts mit dem empirischen Faktor 0,7<sup>111</sup>. Die Antikörperlösung wurde nun bei -20 °C gelagert.

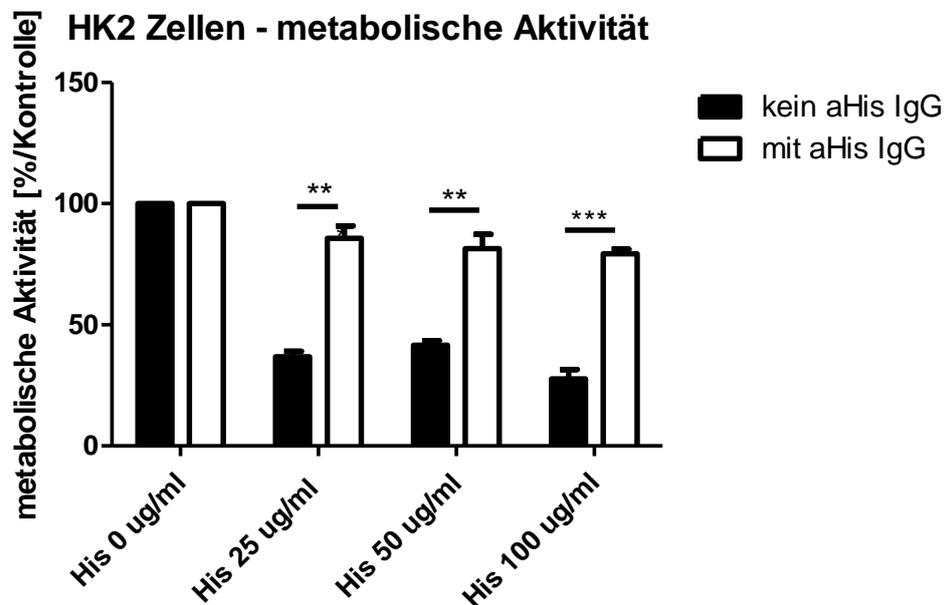
### **2.3.10 Überprüfung der anti-Histon IgG-Qualität**

Die Qualität und Wirksamkeit des BWA3-Antikörpers wurden mithilfe eines Histon-induzierten Zytotoxizitätsassays und eines nicht-kompetitiven ELISA überprüft.

#### ***Histon-induzierter Zytotoxizitätsassay***

Hierfür wurden  $1 \times 10^5$  HK2-Zellen in einer 96-Well-Platte gesät und über Nacht inkubiert. Waren nun alle Zellen adhärirt, so wurden verschiedene Konzentrationen an Histonen zu den Zellen hinzugefügt, die ebenfalls jeweils mit oder ohne dem Histon-neutralisierenden Antikörper inkubiert wurden. Nach 24 h wurde dann die Zytotoxizität der Histone und die protektive Wirkung des anti-Histon IgG mithilfe eines MTT-Assays gemessen. Hierfür wurden in jedes Well 15 µl MTT-Farbstoff gegeben und die Zellen dann 4-6h bei 37 °C inkubiert. In

dieser Zeit prozessierten die lebenden Zellen den Farbstoff in gefärbte Formazan-Kristalle, die dann durch Zugabe von jeweils 100  $\mu\text{l}$  Stop-Lösung dissoziiert wurden. Der hierbei stattfindende Farbumschlag kann nun in einem Photometer bei  $\lambda=570\text{ nm}$  gemessen werden, die detektierte Farbe ist direkt proportional zu der Anzahl an lebenden Zellen.



**Abbildung 11: Zellviabilitätsassay (MTT) zur Überprüfung der anti-Histon IgG-Bindungskapazität und Wirkung**

HK2-Zellen wurden zunächst 24 h inkubiert, anschließend wurden entsprechend 0  $\mu\text{g/ml}$ , 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  Histone mit oder ohne anti-Histon IgG (100  $\mu\text{g/ml}$ ) hinzugefügt und für weitere 24 h inkubiert. Die Zellviabilität wurde dann mittels MTT-Assay und Absorptionsmessung bei 570nm im ELISA Reader gemessen. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus je 3 Wells aus 3 verschiedenen Experimenten  $\pm$  SEM dar. \* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$  gegenüber Kontrollen.

### 2.3.11 Histologie

Sämtliche histologischen Färbungen wurden freundlicherweise von Frau Janina Mandelbaum und Herrn Dan Draganovici durchgeführt, denen ich dafür großen Dank aussprechen möchte.

#### **Färbungen**

Zur histologischen Analyse der Proben wurden diese in Paraffin eingebettet und daraus Schnitte gefertigt. Dazu wurde der mittlere Teil jeder Niere zunächst für 24 h in 4% Formalin fixiert und dann in einem Paraffin-Einbettautomaten in einer ansteigenden Alkoholreihe und Xylen dehydriert und anschließend in flüssiges Paraffin eingebettet. Aus den erstarrten

Blöcken wurden dann 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf spezielle mit 3-Aminopropyltriethylsilan (APES) beschichtete Objektträger übertragen. Nach 12 h Trocknung bei 37 °C wurden die Schnitte mit Xylen (3x5 min) entparaffiniert, anschließend in 100% Ethanol (3x3 min), 95% Ethanol (2x3 min), 70% Ethanol (1x3 min) entparaffinisiert und destilliertem Wasser (2x5 min) rehydriert.

### **Periodic Acid Schiff (PAS)-Reaktion**

Die Färbung der Schnitte mit der PAS-Reaktion diente der Darstellung der Tubulusschädigungen der Nieren. In dieser Färbungsmethode können Kohlenhydrate mithilfe der Reaktion von Perjodsäure und der Schiffschen Reagenz nachgewiesen werden. Hierfür wurden die rehydrierten Schnitte in Perjodsäure (2% in destilliertem Wasser) inkubiert und anschließend in destilliertem Wasser (1x/min) gewaschen. Dann wurden die Schnitte für 20 min mit Schiffscher Reagenz inkubiert, danach für 7 min mit Wasser gewaschen und dann mit Hämatoxylin (1x2 min) gefärbt. Die Schnitte wurden im Anschluss 5 min in Wasser gewaschen und nach Tauchen in 90 % Ethanol getrocknet und mit einem Deckglas abgedichtet.

### **Immunhistochemische Färbung**

Hierfür wurden die, wie oben beschrieben, rehydrierten Schnitte in einer Mischung aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Methanol (20 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 180 ml Methanol) für 20 min im Dunklen inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blocken, und anschließend mit PBS gewaschen (2x5 min). Für die Demaskierung des Antigens wurden die Schnitte in Demaskierungslösung (3 ml Antigen-Demaskierungslösung+ 300 ml destilliertes Wasser) getaucht und für 10 min in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Darauffolgend wurden die Schnitte für 20 min auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 0,1 M PBS gewaschen. Um auch das endogene Biotin zu blocken, wurden die Schnitte für 15 min mit einem Tropfen Avidin und danach für 15 min mit Biotin inkubiert, anschließend wurden sie in PBS gewaschen (2x5 min). Darauf folgte eine Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern (anti-Neutrophilen, anti-aSMA, anti-CD45 jeweils 1:400) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in PBS (2x5 min) wurden die Schnitte für 30 min mit sekundärem biotinylierten Antikörper (1:300) inkubiert und im Anschluss wieder in PBS gewaschen (2x5 min). Dann wurde ABC-Substratlösung hinzugegeben und die Schnitte für 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach

erneuter Waschung in PBS wurde mit Methylgrün gegengefärbt und die überflüssige Farbe anschließend mit Ethanol (96%) und Xylol ausgewaschen und nach erfolgter Trocknung mit VectaMount eingedeckt.

### ***Histopathologische Evaluationen***

#### *PAS-Färbung*

Die PAS-gefärbten Schnitte wurden zur semi-quantitativen Auswertung der Tubulusschäden verwendet. Diese wurden bei 200x Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop mithilfe des „tubular injury scores“ bestimmt, der sich aus folgenden Kriterien zusammensetzt: Tubuluszellnekrose, Infiltration von Entzündungszellen, Dilatation des Tubuluslumens und luminale Zylinderformation. Nun wurde bei jeder Maus ein PAS-Schnitt bei 200x Vergrößerung für 5 zufällig selektierte Ausschnitte des kortikomedullären Übergangs anhand der für jedes Kriterium prozentual betroffenen Fläche analysiert und für jede Kategorie ein Scorewert  $\pm$  SEM dargestellt.

#### *Semiquantitative Evaluation der restlichen Färbungen*

Die semiquantitative Analyse wurde mithilfe der Programme GIMP (GNU Image Manipulation Program) und Image J durchgeführt. Zuerst wurde ein lichtmikroskopisches Bild in je nach Färbung entsprechender Größe aufgenommen. Die Gewebefläche wurde mithilfe von GIMP frei Hand ausgeschnitten. Die Parenchymfläche wurde in der Software ImageJ entsättigt und der Schwarz-Weiß-Schwellenwert mit der „threshold“-Funktion soweit verschoben, bis sich nur die in der jeweiligen Färbung angefärbten Zellen schwarz darstellten. Ihr Anteil an der Gesamtfläche wurde dann mit der „measure“-Funktion bestimmt. Anschließend wurde der Schwarz-Weiß-Schwellenwert so erhöht, dass sich die komplette Parenchymfläche schwarz darstellte, diese Fläche wurde als Referenzwert erneut gemessen. Aus dem Verhältnis von Zellfläche und Referenzfläche ergab sich dann der Prozentwert der für die jeweilige Färbung positive Fläche.

#### *Immunhistochemische Färbung für Neutrophile Granulozyten*

Um die Infiltration der neutrophilen Granulozyten zu quantifizieren, wurde pro Schnitt in jeweils 10 Ausschnitten mit der höchsten Zelldichte, in „high power fields“ (HPF, der durch

das Mikroskop sichtbare Ausschnitt eines Präparats) die Anzahl der immunhistochemisch angefärbten Neutrophilen bestimmt. Die Ergebnisse einer Gruppe wurden gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  SEM für die einzelnen Gruppen dargestellt.

#### *Immunhistochemische Färbung für CD45*

Um die unspezifische Infiltration von Immunzellen mit Hilfe der CD45-Färbung zu quantifizieren, wurde pro Schnitt in jeweils 10 Ausschnitten mit der höchsten Zelldichte, sog. „high power fields“ (hpf) die Anzahl der immunhistochemisch angefärbten Immunzellen bestimmt. Die Ergebnisse einer Gruppe wurden gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  SEM für die einzelnen Gruppen dargestellt.

#### *Immunhistochemische Färbung für $\alpha$ SMA*

Die Analyse der Fibrosierung der Nieren nach Schädigung wurde unter anderem mit der  $\alpha$ SMA-Färbung ( $\alpha$ -smooth muscle actin) durchgeführt. Hierfür wurden pro Schnitt in jeweils 5 Ausschnitten des kortikomedullären Übergangs der Anteil der  $\alpha$ SMA-positiven und somit fibrosierten Fläche bestimmt, die Ergebnisse einer Gruppe gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  SEM für die einzelnen Gruppen dargestellt.

#### *Masson-Trichrom-Färbung*

Die Analyse der Fibrosierung der Nieren nach Schädigung wurde unter anderem mit der Masson-Trichrom-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden pro Schnitt in jeweils 5 Ausschnitten des kortikomedullären Übergangs der Anteil der Masson-Trichrom-positiven und somit fibrosierten Fläche (blau, gesundes Gewebe in rot) bestimmt, die Ergebnisse einer Gruppe gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  SEM für die einzelnen Gruppen dargestellt.

#### *Calcein-Färbung*

Um die Zellviabilität nach Schädigung zu quantifizieren, wurden die jeweils überlebenden HK-2 Zellen mit Calcein grün angefärbt und anschließend unter einem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Hierfür wurden pro Well 2 Bilder in 50x Vergrößerung aufgenommen um somit möglichst das ganze Well darzustellen. In den Aufnahmen wurden anschließend

mit Hilfe der oben beschriebenen Funktion bestimmt und ausgezählt, die Ergebnisse einer Gruppe gemittelt und als Mittelwert  $\pm$  SEM für die einzelnen Gruppen dargestellt.

### **2.3.12 Statistische Auswertung**

Die hier präsentierten Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM gezeigt. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde one-way ANOVA mit post-hoc Test verwendet, zuvor wurde die Anwendbarkeit durch Shapiro-Wilk-Test (Überprüfung der Normalverteilung der Testwerte) und Levene-Test (Überprüfung auf Gleichheit der Varianzen) sichergestellt. Für den Vergleich einzelner Gruppen wurde der gepaarte Student's t-test verwendet, zuvor wurde ebenfalls die Anwendbarkeit durch Shapiro-Wilk-Test sichergestellt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistische Signifikanz angesehen. Alle Berechnungen und Graphen wurden mithilfe der Software „GraphPad Prism“ (GraphPad, CA, USA) erstellt.

### 3 Ergebnisse

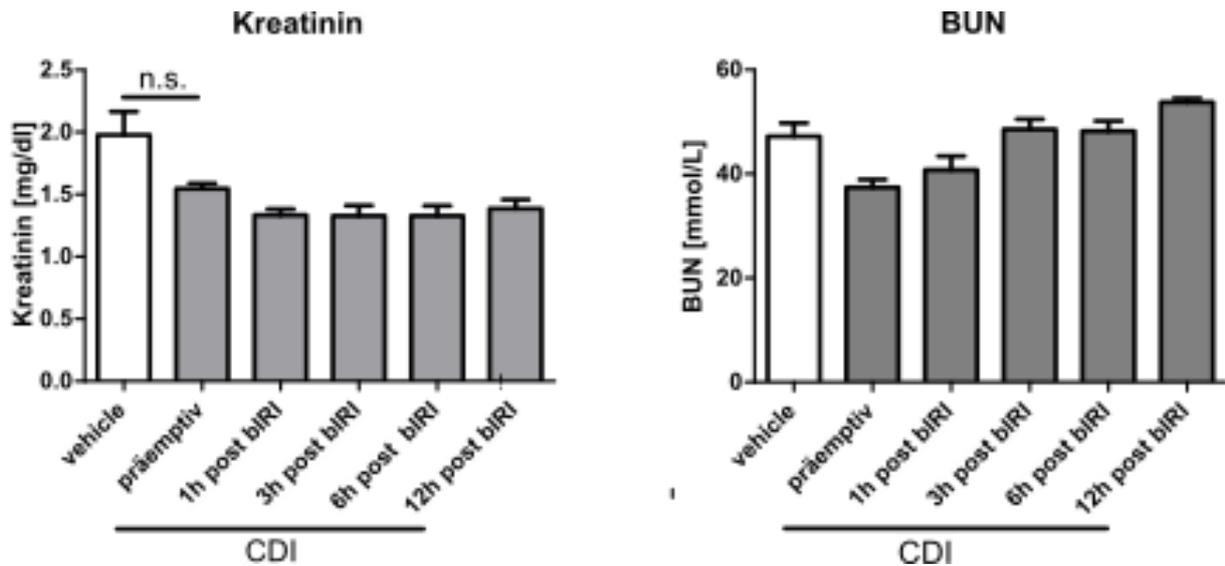
#### 3.1 Effekte der verzögerten Zelltod inhibition auf Nierenschädigung

Die präemptive Applikation der Zelltod inhibitory Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2 mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. zeigt starke Verbesserung der Nierenfunktion und -struktur 24 h nach ischämischer Nierenschädigung durch IRI.<sup>77,80</sup> Im Einklang mit dem Konzept der Nekroinflammation wurde deswegen C57BL/6N Mäusen für 35 min beide Nierenarterien abgeklemmt und die verschiedenen Zelltod inhibitory präemptiv und 1 h, 3 h, 6 h und 12 h nach IRI appliziert, um ein eventuelles therapeutisches Zeitfenster für die Zelltodblockade zu identifizieren. Blut- und Organentnahme erfolgte jeweils nach 24h.



##### 3.1.1 Auswirkung der verzögerten Zelltod inhibition auf Nierenfunktion

Zur Evaluation der Nierenfunktion 24 h nach der akuten Nierenschädigung wurde aus dem Plasma der Mäuse die Kreatinin- und Harnstoffwerte (BUN=Blood Urea Nitrogen) mithilfe der jeweiligen enzymatischen Reaktionen bestimmt. Das Kreatinin zeigt einen Abfall um ca. 0,5 mg/dl in allen Behandlungsgruppen, allerdings erreicht der Unterschied wegen großer interindividueller Schwankungen in der Kontrollgruppe nur einen Trend. Der Harnstoff ist in den Gruppen mit präemptiver und 1 h post IRI-Applikation ebenfalls um 15 bzw. 10 mmol/l erniedrigt, der Unterschied gibt jedoch auch hier nur einen Trend wieder.



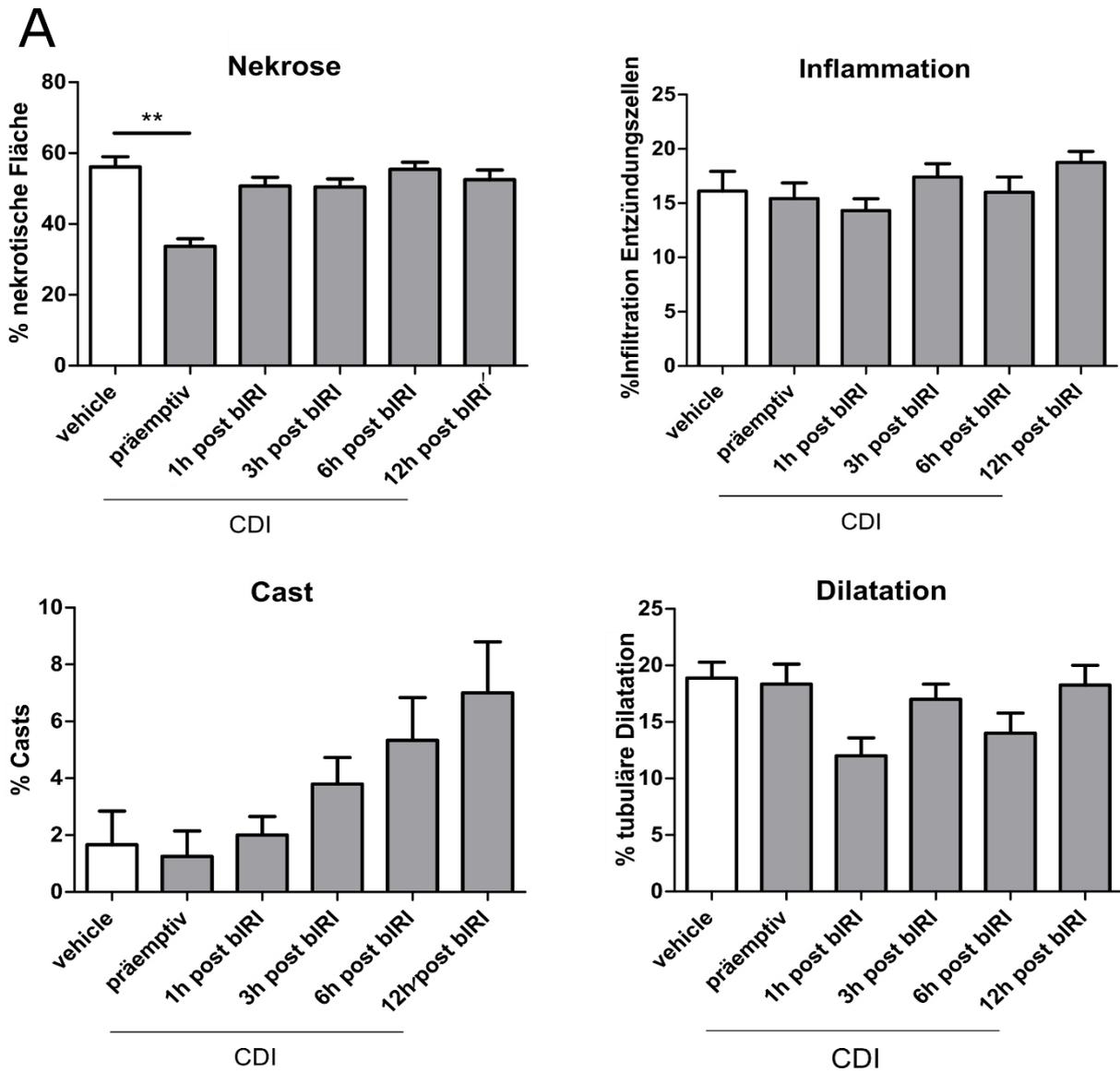
**Abbildung 12: Verzögerte Applikation von Zelltodinhhibitoren ohne Effekt auf Nierenfunktionsparameter nach bilateraler IRI**

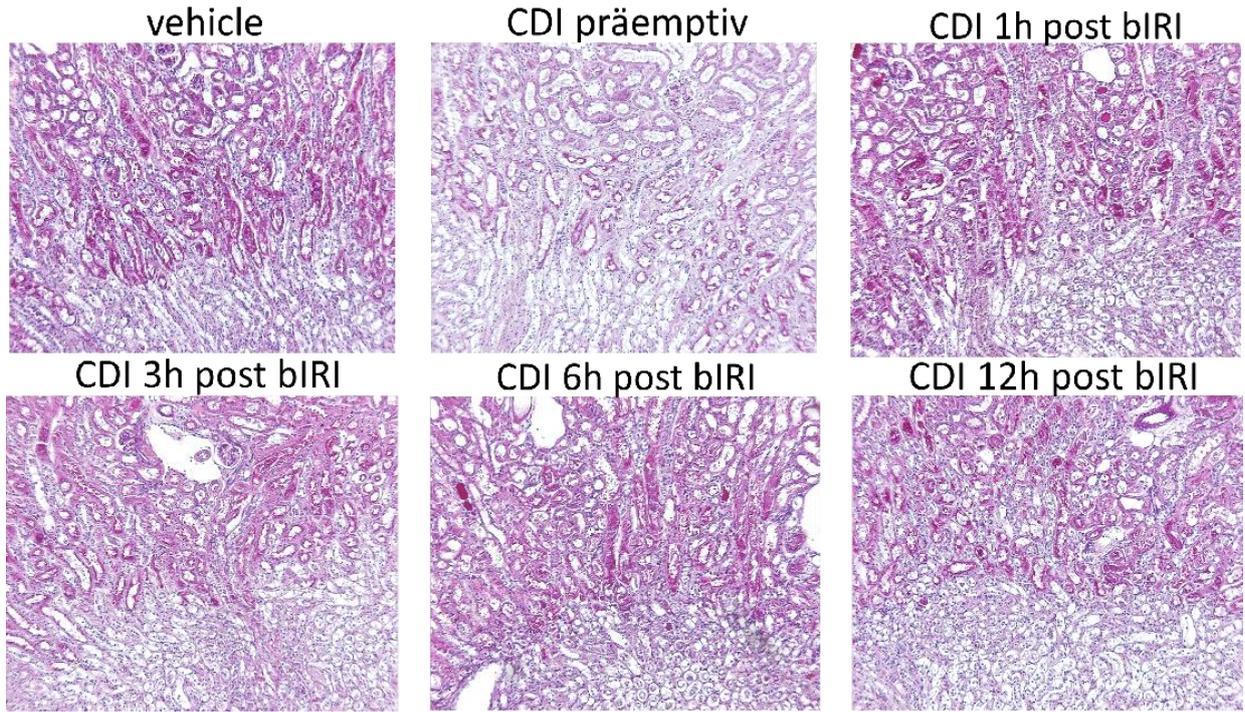
An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde bilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde präemptiv und 1 h, 3 h, 6 h und 12 h nach IRI Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von PBS i.p., DMSO i.v. (vehicle). Die Blutentnahme erfolgte nach 24 h. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe  $\pm$  SEM dar.

### 3.1.2 Auswirkung der verzögerten Zelltodinhhibition auf Nierenmorphologie

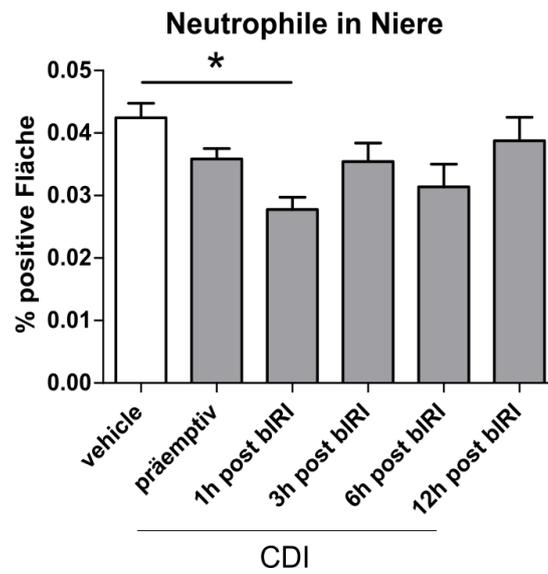
Zur morphologischen Evaluation der zeitversetzten Therapie wurden die 24 h nach IRI entnommenen Nieren mit einer PAS- und Neutrophilenfärbung gefärbt. Die Evaluation der PAS-Färbung (A) ergab eine signifikante Verringerung ( $p < 0,01$ ) der tubulären Nekrose von 60% auf 40% bei präemptiver Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe, dieser Effekt hob sich allerdings in den Gruppen mit verzögerter Gabe wieder auf. Ebenso konnten die Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe in den Kategorien Inflammation und tubuläre Dilatation aufweisen, wo die Werte bei ca. 20 % lagen. Die Zylinderformation stieg in den Behandlungsgruppen von 1 % bei präemptiver Gabe kontinuierlich auf 8 % bei 12 h post IRI-Gabe, wobei sie in der Kontrollgruppe 2 % betrug. Die quantitative Analyse der Neutrophileninfiltration ergab eine signifikante Verringerung der positiven Fläche von 4 % auf 2,5 % in der 1 h ( $p < 0,05$ ) verzögerten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, gleichbedeutend mit einer 40 %-igen Verringerung der Neutrophileninvasion. Die restlichen Behandlungsgruppen zeigten jedoch aufgrund

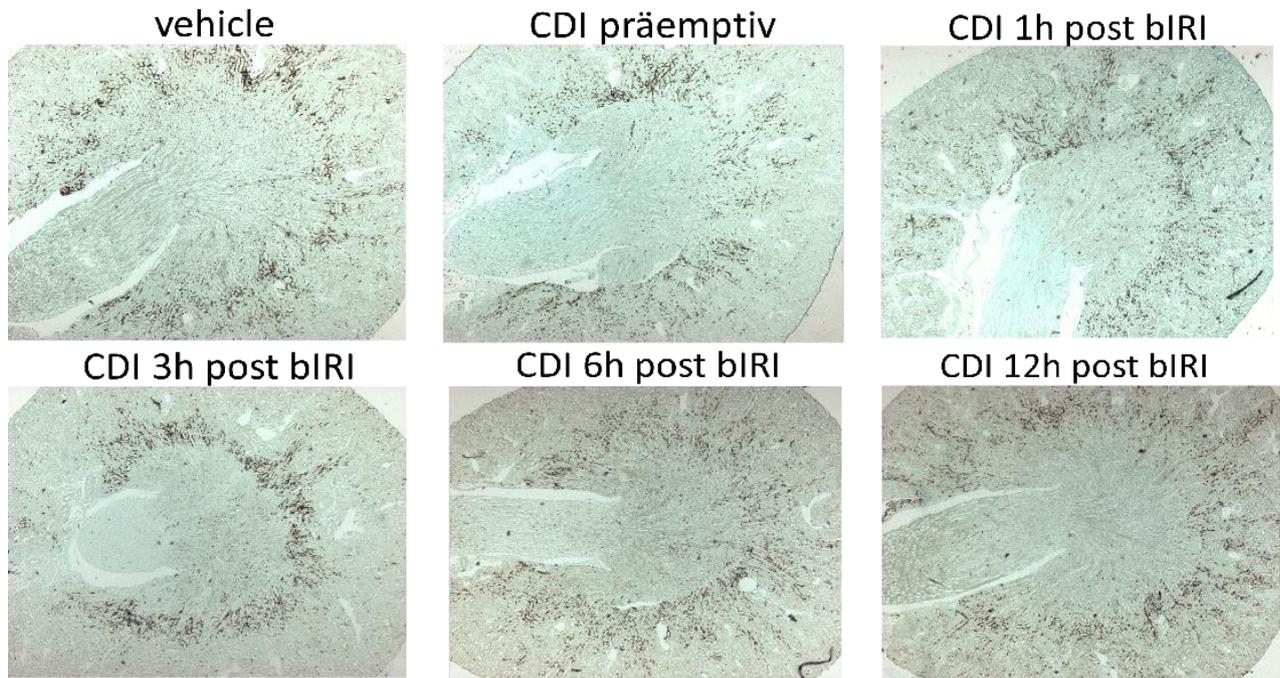
interindividueller Schwankungen keine signifikante Verringerung der Infiltration. Insgesamt ergab sich also keine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion, jedoch eine leichte signifikante Abschwächung der strukturellen Nierenschädigung durch CDI-Applikation.





**B**





**Abbildung 13: Histologische Evaluation des Effekts der Zelltodinhhibitoren nach bilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde bilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde präemptiv und 1 h, 3 h, 6 h und 12 h nach IRI Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von PBS i.p., DMSO i.v. (vehicle). Die Organentnahme erfolgte nach 24 h.

**A.** PAS-Färbung ischämischer Niere, semiquantitative Analyse der Parameter Nekrose, Inflammation, Cast-Formierung und tubuläre Dilatation nach Methode

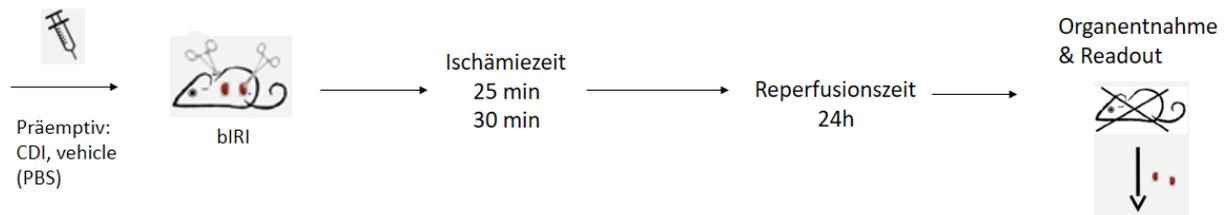
**B.** Färbung neutrophiler Granulozyten in ischämischer Niere. Quantitative Analyse der Neutrophileninfiltration nach Methode

Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe  $\pm$  SEM dar. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  gegenüber Kontrollen.

### 3.2 Einfluss der Ischämiezeit auf Effekt der Zelltodinhhibitoren

Da die in den vorigen Experimenten erreichte Reduzierung der funktionellen und strukturellen Nierenschädigung deutlich geringer ausfiel als in der Literatur beschrieben<sup>77,85,87</sup> (Schadensreduktion um ca. 75% bei präemptiver Gabe), wurde bei der Analyse methodischer Unterschiede in der Durchführung der IRI-Operation eine unterschiedliche Ischämiestärke durch konstant hohe Körperkerntemperatur (37,5-38,5°C) in der eigenen Durchführung als wahrscheinlichster und potenziell schwerwiegendster Faktor identifiziert. Um die durch die konstant hohe Temperatur entstandene stärkere Inflammation auszugleichen, wurden nun bei gleichem Experimentaufbau die Nierenarterien von C57BL/6N Mäusen für jeweils 25 oder 30 min abgeklemmt, wobei bei jeweils einer

Gruppe pro Ischämiezeit die Zelltodinhibitoren Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. präemptiv appliziert wurden. Die Blut- und Organentnahme erfolgte ebenfalls 24h nach IRI.



### 3.2.1 Effekt unterschiedlicher Ischämiezeit auf Wirkung der Zelltodinhibitoren

Hierfür wurde aus dem Plasma der Mäuse, das jeweils 24h nach IRI gewonnen wurde, die Kreatinin-Konzentration bestimmt. Hier zeigte sich in den Kontrollgruppen bei 25 bzw. 30 min Ischämiezeit ein Kreatininwert von 2,2 bzw. 2,5 mg/dl, der jeweils durch die präemptive Applikation der Zelltodinhibitoren signifikant um 0,5 mg/dl ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,05$ ) verringert wurde. Das Ausmaß der Verbesserung der Nierenfunktion erreicht aber ebenfalls nicht die in der Literatur beschriebenen Werte.

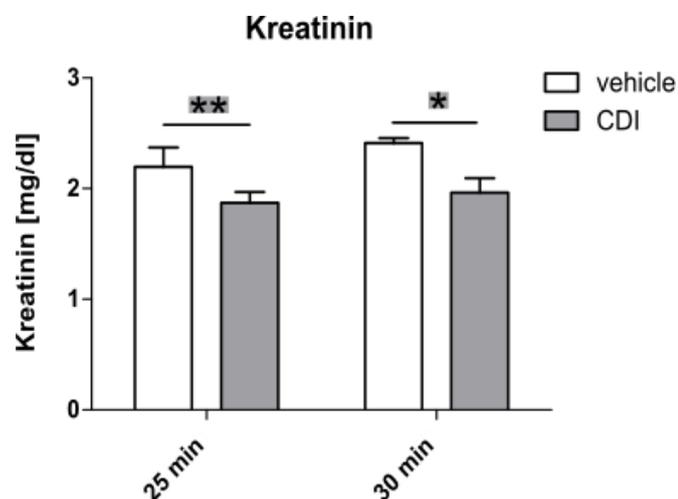


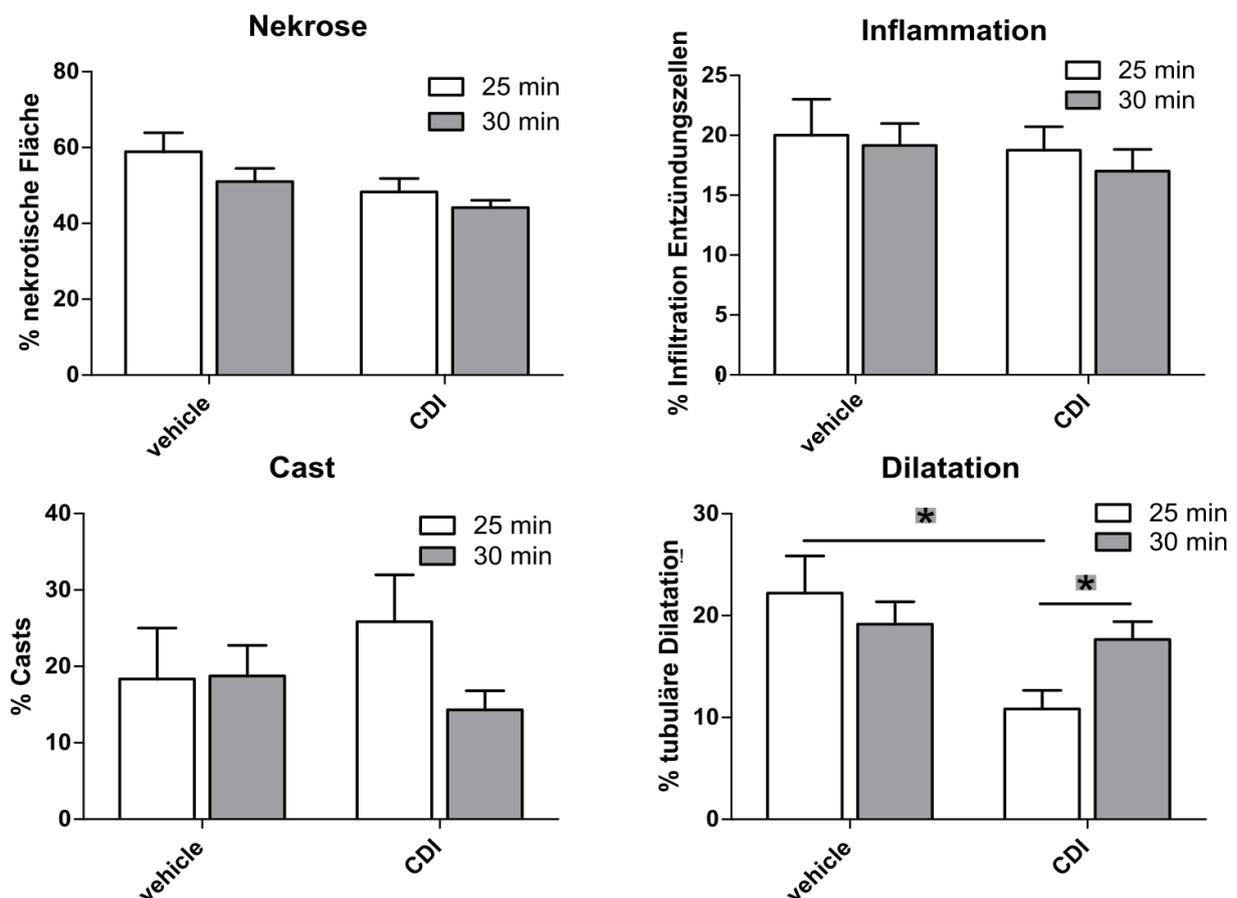
Abbildung 14: Titration der Ischämiezeit zur Differenzierung des Effekts der Zelltodinhibitoren

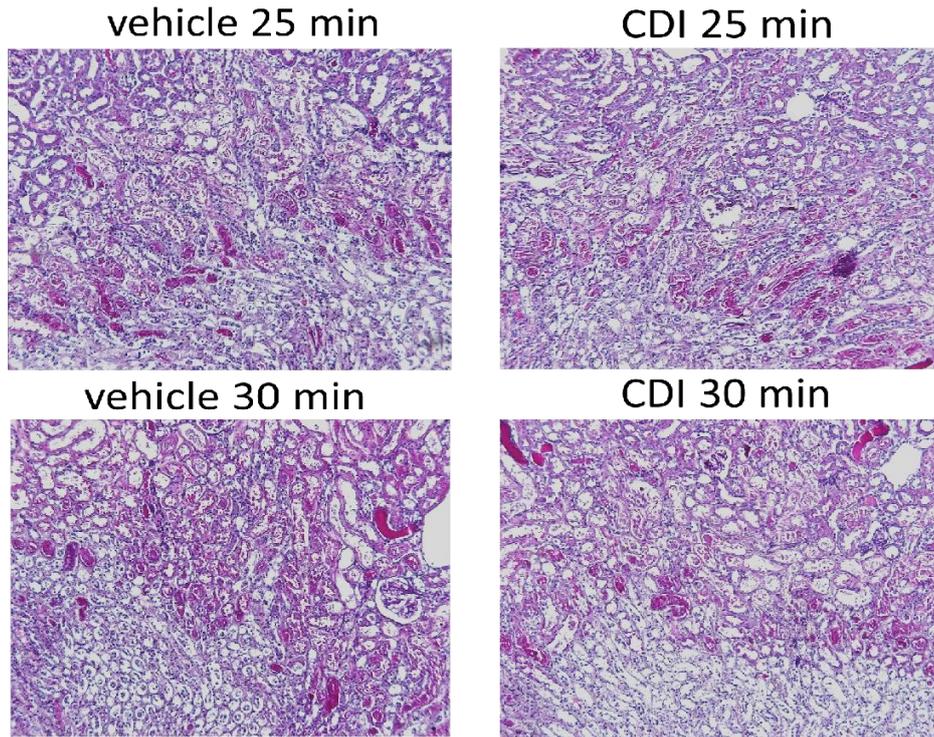
An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde bilaterale IRI mit Ischämiezeit 25 und 30 min durchgeführt. Den Mäusen wurde 1 h vor IRI Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von PBS i.p., DMSO i.v. (vehicle). Die Blutentnahme erfolgte nach 24 h. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe  $\pm$  SEM dar. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  gegenüber Kontrollen.

### 3.2.2 Effekt unterschiedlicher Ischämiezeit auf strukturelle Verbesserung durch Zelltodinhibitoren

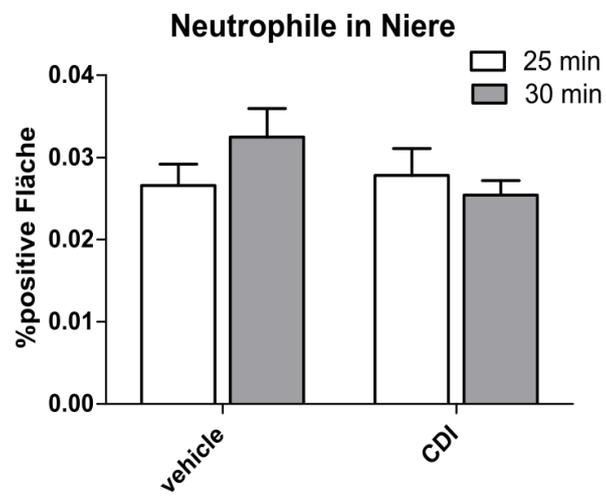
Zur morphologischen Evaluation des Einflusses der Ischämiezeit wurden die 24 h nach IRI entnommenen Nieren wiederum mit PAS- und Neutrophilenfärbung gefärbt. Die semiquantitative Analyse der PAS-Färbung (A) ergab in den 3 Kategorien Nekrose, Inflammation, Zylinderformation keine signifikante strukturelle Verbesserung durch die Applikation der Zelltodinhibitoren. Lediglich die tubuläre Dilatation konnte bei 25-minütiger Ischämiezeit signifikant ( $p < 0,05$ ) um 50% gegenüber der Kontrollgruppe verringert werden. In der quantitativen Analyse der Neutrophileninfiltration (B) konnte ebenfalls weder bei 25 min noch 30 min eine signifikante Verringerung der Neutrophilenrekrutierung in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden. Bei zusammenfassender Betrachtung des Einflusses der präemptiven Applikation zu verschiedenen Ischämiezeiten und der verzögerten Applikation nach 35 min bilateraler IRI auf das funktionelle und strukturelle Ergebnis, kann darauf geschlossen werden, dass in diesem experimentellen Aufbau eine verzögerte Therapie der akuten Nierenschädigung durch Zelltodinhibitoren im Sinne der Nekroinflammation nicht erfolgreich ist.

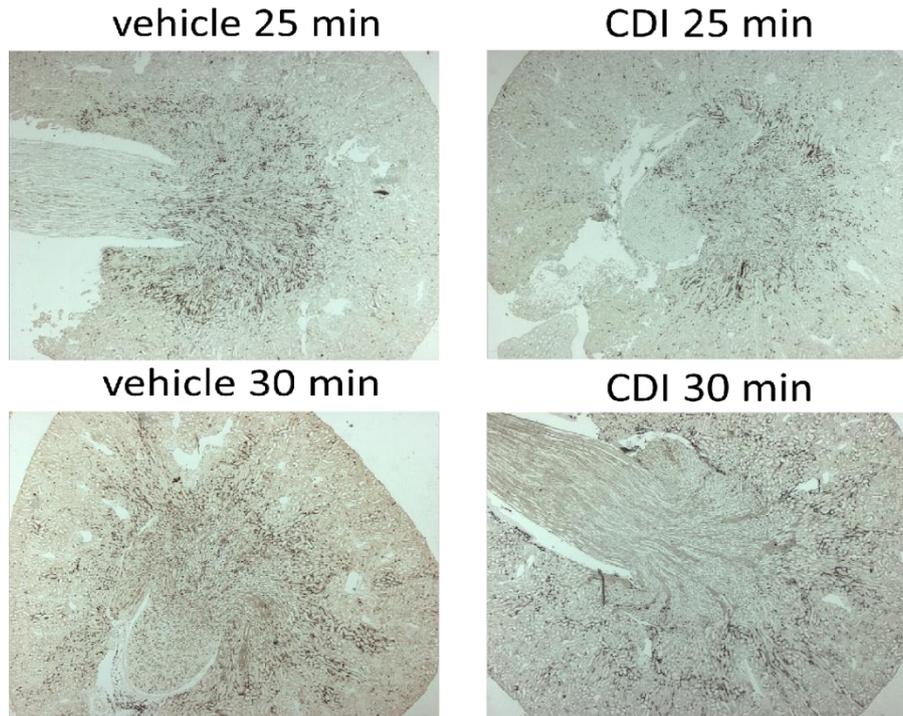
A





**B**





**Abbildung 15: Histologische Evaluation der Titration der Ischämiezeit**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde bilaterale IRI mit Ischämiezeit 25 und 30 min durchgeführt. Den Mäusen wurde 1 h vor IRI Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von PBS i.p., DMSO i.v. (vehicle). Die Blutentnahme erfolgte nach 24 h.

**A.** PAS-Färbung ischämischer Niere, semiquantitative Analyse der Parameter Nekrose, Inflammation, Cast-Formierung und tubuläre Dilatation nach Methode 2.3.11

**B.** Färbung Neutrophiler Granulozyten in ischämischer Niere. Quantitative Analyse der Neutrophileninfiltration nach Methode

Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe  $\pm$  SEM dar. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  gegenüber Kontrollen.

### 3.3 Wenig Histone vermindern Proliferationskapazität von HK2-Zellen

Da die Blockade der verschiedenen Zelltod-Signalwege nicht den erwarteten Erfolg gezeigt, richtete sich der Fokus im Folgenden auf ein weiteres Schlüssel-molekül im Konzept der Nekroinflammation, die extrazellulären Histone. Die direkt zytotoxische Wirkung extrazellulärer Histone ist allgemein bekannt<sup>104</sup>, allerdings werden in Publikationen Konzentrationen zwischen 10-100  $\mu\text{g/ml}$  an Histonen verwendet<sup>82,103,123</sup>. Da der Anteil über die Zeit nach IRI absterbender Zellen und folglich die Konzentration freiwerdender Histone deutlich geringer ist, wurde zunächst an HK-2 Zellen der Einfluss von Histonen in niedriger Konzentration 0,1-1,0  $\mu\text{g/ml}$  untersucht. Dafür wurde der folgende Versuchsaufbau

verwendet, um einen Ischämie-Reperfusionsschaden mit darauffolgender Histon-Freisetzung in der Zellkultur zu simulieren:

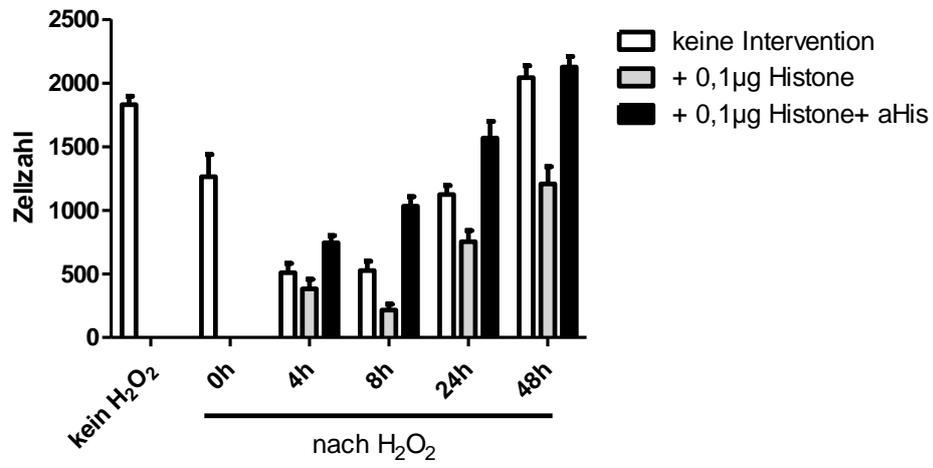
Für diese Experimente wurden HK-2 Zellen nach den hier beschriebenen Methoden kultiviert. Für die Proliferationsanalyse wurden  $1 \times 10^5$  HK-2 Zellen pro Well in normalem Wachstumsmedium (DMEM+ 10%FBS+1%P/S) in einer 96-Well-Platte über Nacht inkubiert, 24h später das Medium zu DMEM (-) FBS (-) P/S gewechselt und die Zellen mit  $1 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 3h stimuliert so dass geringes Zellsterben einsetzte. Daraufhin wurde das Medium wieder zu Wachstumsmedium gewechselt und verschiedene Konzentrationen an Histonen, die zum Teil mit  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  anti-Histon IgG präinkubiert waren, zu den Zellen hinzugefügt. Nach 24h wurden die lebenden Zellen die Zellen mit Calcein-Färbung gefärbt und die Zellzahl als auch die Calcein-positive Fläche bestimmt. Anschließend wurde das gleiche Experiment dosisangepasst mehrmals für  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well durchgeführt um einerseits mRNA-Levels profibrotischer Gene zu untersuchen, andererseits durch eine Färbung mit Propidiumjodid den Zellzyklus der HK-2 Zellen auf einen G2/M-Phasenarrest zu untersuchen.

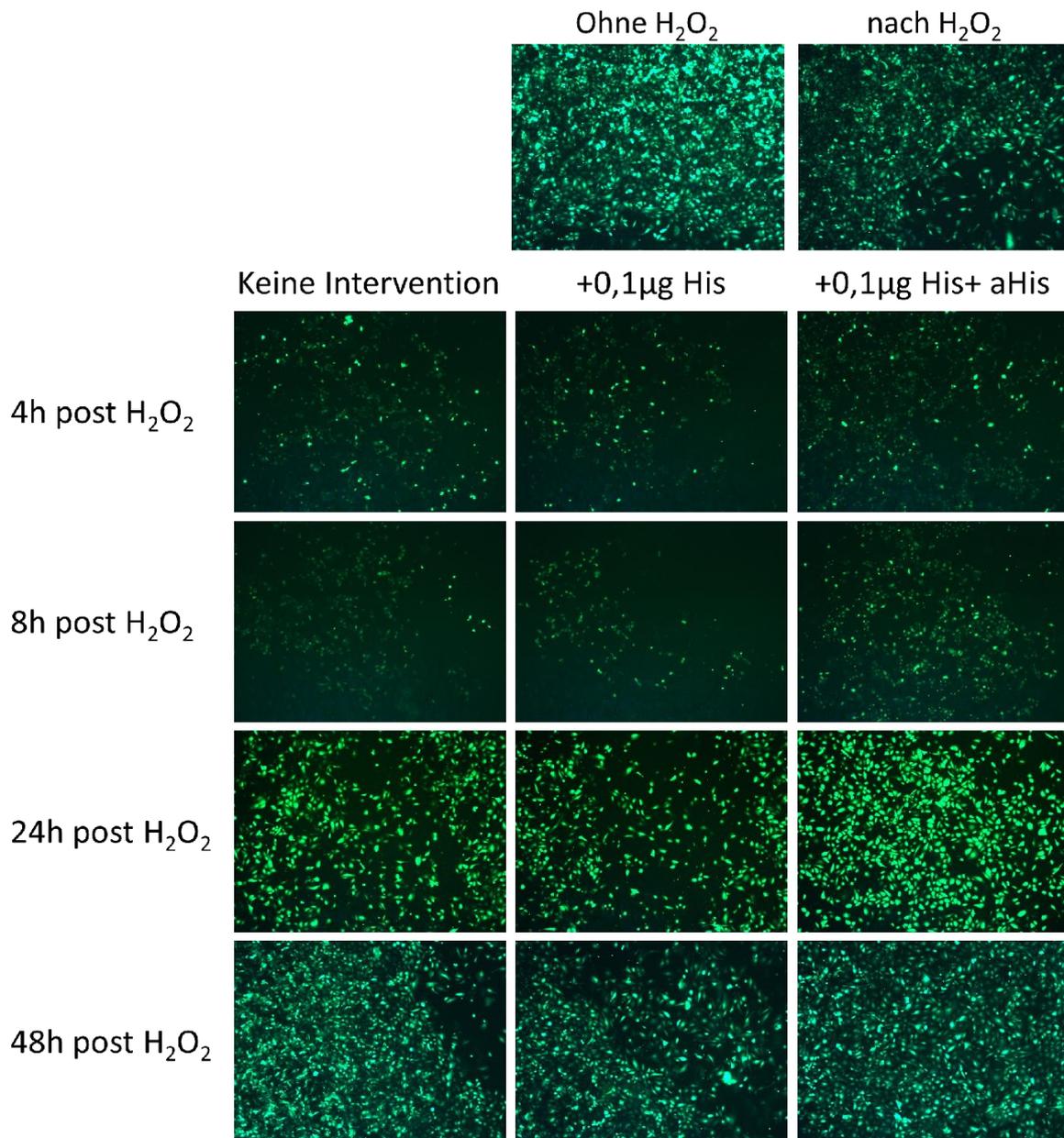
### **3.3.1 Niedrige Konzentrationen von Histonen reduzieren absolute Zellzahl in**

#### **Proliferation nach Schädigung**

Um den Einfluss der Histone auf die absolute Zellzahl zu quantifizieren, wurden HK-2 Zellen zuerst 1 h mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert, anschließend wurde das Medium erneuert und entweder PBS (Kontrollgruppe),  $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$  Histone oder  $0,1 \mu\text{g}/\text{ml}$  Histone und anti-Histon IgG hinzugegeben. Der zeitliche Verlauf wurde dann durch eine Färbung mit Calcein nach 0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h ermittelt. Die quantitative Analyse ergab einen Abfall der Zellzahl um 75% mit Minimum bei 4-8 h in allen Gruppen, gefolgt von einem Anstieg bis zu 48 h. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Kontrollgruppe und die Gruppe, in der die Wirkung der extrazellulären Histone durch anti-Histon IgG neutralisiert wurde, wieder den Ausgangswert unstimulierter Zellen erreicht, die Gruppe mit niedrig konzentrierten Histonen zeigte hier eine signifikante Verringerung der Zellzahl um 40% (jeweils  $p < 0,05$ ). Das Wachstum von HK-2 Zellen nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Schädigung wurde also durch die Präsenz extrazellulärer Histone verringert.

### Calcein-Färbung



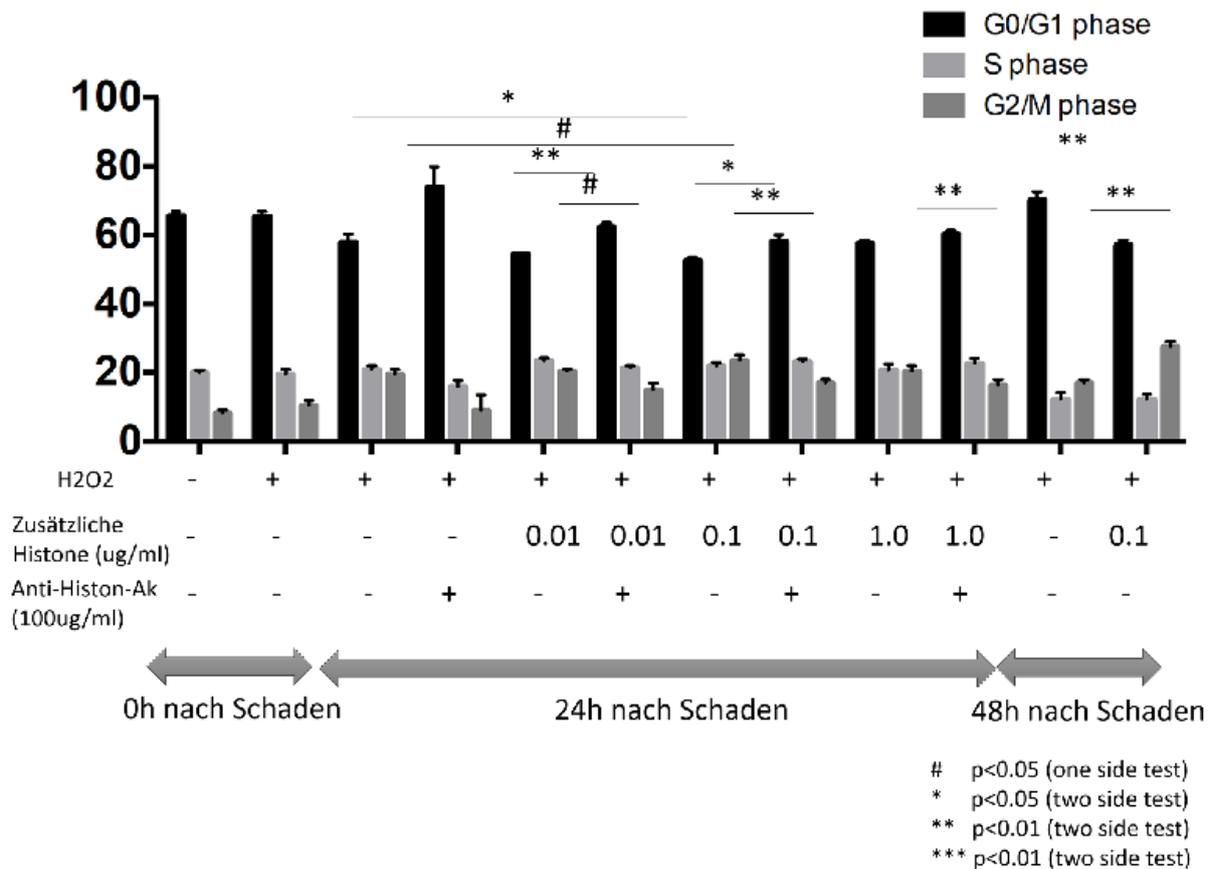


**Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Zellzahl von HK-2 Zellen nach Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Histonen und anti-Histon IgG durch Calcein-Färbung**

HK-2 Zellen wurden entsprechend der oben beschriebenen Experimentaufbaus mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Histonen (0,1µg/ml) und anti-Histon IgG (100µg/ml) stimuliert. Anschließend wurden die stimulierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten 4 h, 8 h, 24 h und 48 h nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gabe mit Calcein angefärbt und in einem Immunfluoreszenz-Mikroskop bei 100x Vergrößerung analysiert. Die quantitative Analyse der Zellzahl erfolgte durch die in 2.3.11 beschriebene Methode. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus je 3 Wells aus 3 verschiedenen Experimenten ± SEM dar. \*p<0,05 gegenüber Kontrollen.

### 3.3.2 Niedrige Konzentrationen von Histonen fördern G2/M-Zellzyklusarrest

Die Regulation des Zellzyklus hat eminente Wichtigkeit in der Proliferation und Regeneration von Zellen.<sup>164,165</sup> Die G2/M-Phase hat hierbei die Funktion der Inhibierung der Mitose, folglich sind Zellen in der G2/M-Phase nicht mehr fähig sich zu teilen.<sup>156,159,166</sup> Des Weiteren wurde gezeigt, dass Gewebe mit einem erhöhten Anteil an Zellen in der G2/M-Phase zu einer stärkeren Fibrosierung neigen<sup>159</sup>. Um den Einfluss niedrig konzentrierter Histone auf den Zellzyklus von HK-2 Zellen nach IRI zu analysieren wurden die Zellen in 2.3.2 beschriebenen experimentellen Aufbau nach 0 h, 24 h, 48 h mit Propidium-Iodid gefärbt und in einem Durchflusszytometer untersucht. Hier zeigte sich nach 24 h eine Erhöhung des Anteils von Zellen in G2/M-Phase um 10% in der Gruppe mit 0,1µg/ml Histone im Vergleich Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ), die zusätzliche Gabe des anti-Histon IgG hob diesen Effekt wieder auf ( $p > 0,01$ ). Nach 48h zeigte sich nach zusätzlicher Stimulation mit Histonen ebenfalls eine Erhöhung des Anteils der Zellen in G2/M-Phase von 20% auf 35% ( $p < 0,01$ ). Zusammenfassend fördert also die zusätzliche Stimulation mit niedrig dosierten Histonen nach Schädigung den Verbleib der HK-2 Zellen in der G2/M-Phase.



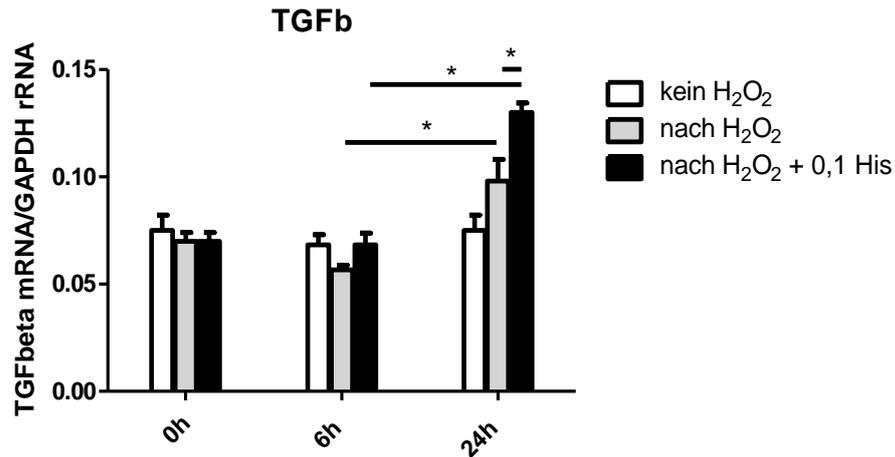
**Abbildung 17: Zellzyklus-Analyse von HK-2 Zellen im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Histonen**

HK-2 Zellen wurden entsprechend dem oben beschriebenen Experimentaufbaus mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Histonen (0,1µg/ml) und anti-Histon IgG (100µg/ml) stimuliert. Anschließend wurden die stimulierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gabe mit Ethanol fixiert, mit Propidiumiodid angefärbt und in einem Durchflusszytometer auf Zellzyklusphasen untersucht. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus je 3 Wells aus 3 verschiedenen Experimenten ± SEM dar.

#p<0,05 (einseitiger t-Test); \*p<0,05 \*\*p<0,01 (doppelseitiger t-Test) gegenüber Kontrollen.

### 3.3.3 Niedrige Konzentrationen von Histonen stimulieren Produktion von TGF-β

Der *Transforming Growth Factor Beta* (TGF-β) ist ein zentraler Regulator der Fibrose.<sup>167158</sup> Da ein Zusammenhang zwischen G2/M-Zellzyklusarrest und Fibrose besteht, wurde in oben genanntem Experimentaufbau auch die TGF-β mRNA-Expression mittels quantitativer RT-PCR ermittelt, hierfür wurde nach 6 h und 24 h RNA isoliert. Hier zeigt sich 24 h nach Schädigung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine signifikante Erhöhung der TGF-β mRNA-Expression im Vergleich zu 6 h (p<0,05), dieser Effekt wird durch zusätzliche Stimulation mit 0,1 µg/ml Histonen verdoppelt. Insgesamt erhöht diese zusätzliche Stimulation die TGF-β Expression signifikant (p<0,05) im Vergleich zu bloßer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stimulation.

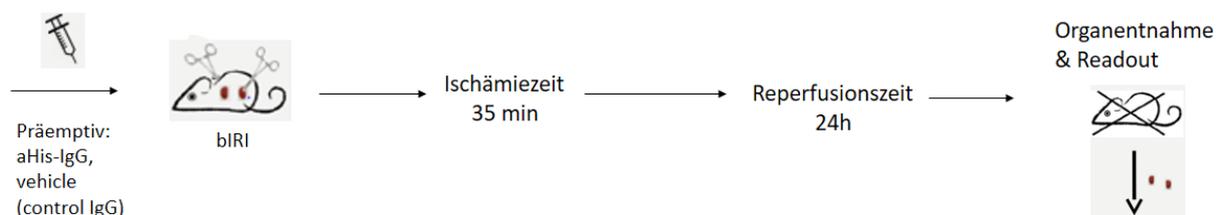


**Abbildung 18: Expression von TGFβ durch HK-2 Zellen im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Histonen**

Expression von TGFβ in HK-2 Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h, 24 h nach Stimulation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit oder ohne Histone (0,1mg/ml) im Experimentaufbau wie oben beschrieben. Bestimmung der mRNA-Expression von TGFβ durch quantitative RT-PCR in Relation mRNA/GAPDH rRNA. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus je 3 Wells aus 3 verschiedenen Experimenten ± SEM dar. \*p<0,05 gegenüber Kontrollen

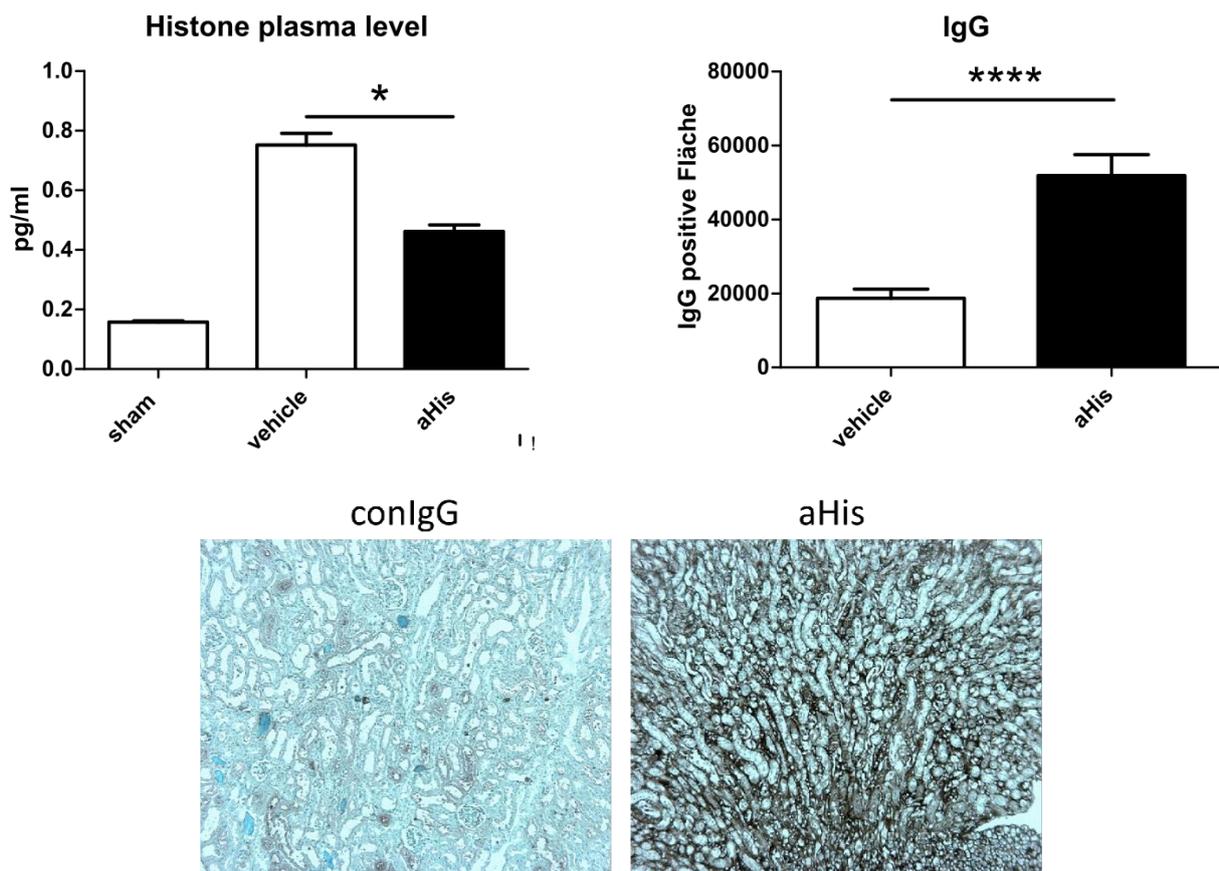
### 3.4 Verbesserung des Kurzzeit-Outcomes durch anti-Histon IgG

Die Applikation von anti-Histon IgG zeigte bereits in verschiedenen Krankheitsmodellen positive Effekte<sup>111,118</sup>, auch für IRI wurden positive Ergebnisse auf das Kurzzeitoutcome beschrieben.<sup>82,121</sup> Um diese Effekte zu spezifizieren, wurden C57BL/6N Mäusen für 35 min beidseits die Nierenarterien abgeklemmt, wobei einer Gruppe präemptiv unspezifisches Maus-IgG (Kontrollgruppe, vehicle), der anderen Gruppe nach der unter 2.3.9. beschriebenen Methode hergestelltes anti-Histon IgG i.p. appliziert wurde. Die Organ- und Blutentnahme erfolgte jeweils nach 24h.



### 3.4.1 Depletion extrazellulärer Histone durch anti-Histon IgG

Da die spezifische Wirkung des durch die Methode von Monestier, *et al.*<sup>128</sup> anti-Histon IgG in der Bindung von Histonen besteht, bestand die Rationale die Depletion der durch Zelltod freiwerdenden Histone im Plasma der Mäuse zu überprüfen. Dies geschah mit Hilfe eines Histon H2/H4-spezifischen ELISAs aus dem nach 24 h nach IRI gewonnenen Plasma. Dieser zeigte eine signifikante Depletion zirkulierender Histone durch den Antikörper ( $p < 0,05$ ). Dass sich das anti-Histon IgG primär in der Niere deponiert, um die dort durch Zelltod freiwerdenden Histone zu binden, wurde durch eine unspezifische IgG-Färbung der 24 h nach IRI entnommenen Nieren untersucht. Hier zeigte sich eine stark vermehrte Ablagerung von IgG in der anti-Histon IgG- Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,0001$ ). Es konnte somit sowohl eine Ablagerung des Antikörpers am antizipierten Wirkort als auch eine Histon-depletierende Wirkung gezeigt werden.



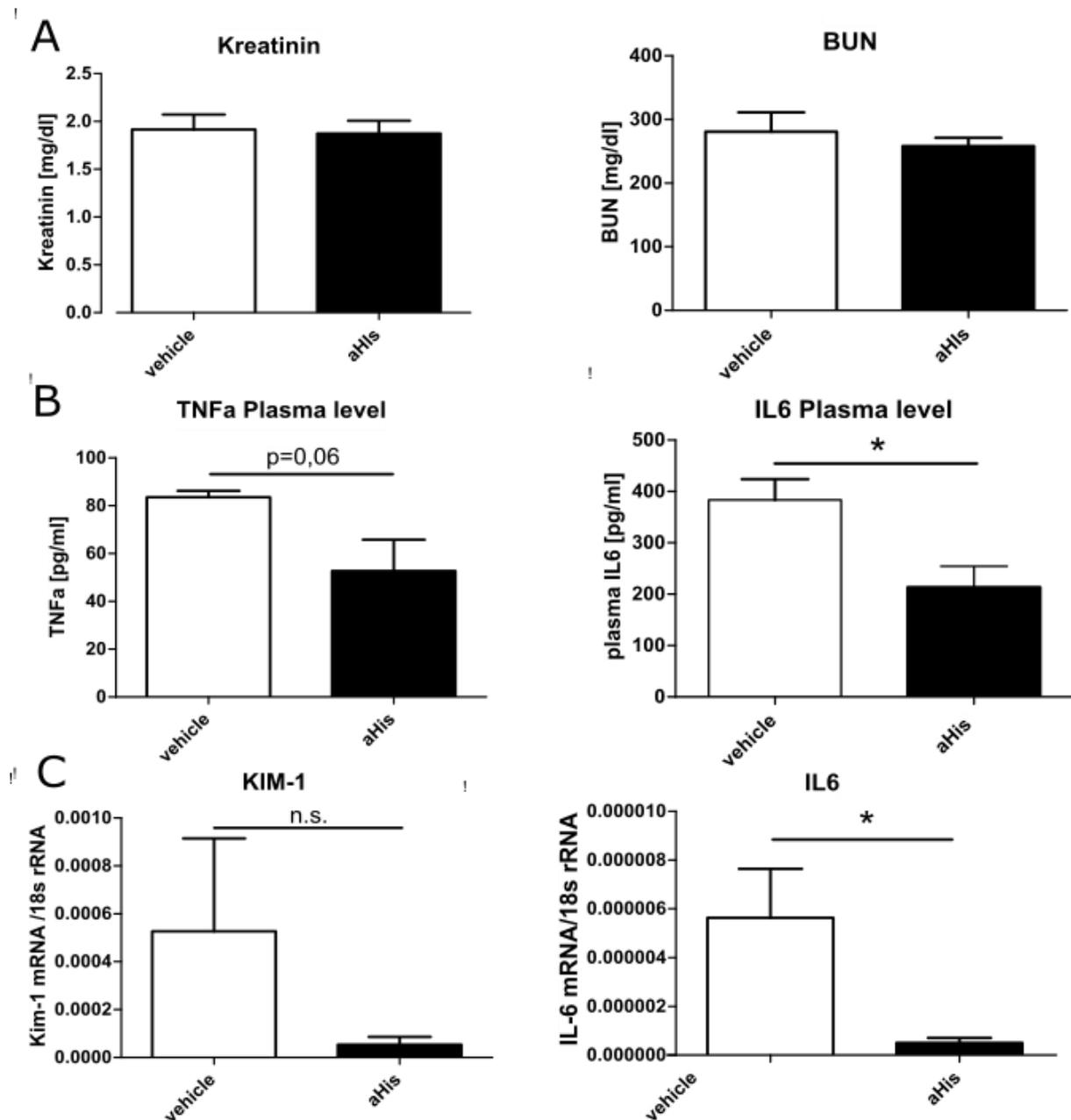
**Abbildung 19: Depletion extrazellulärer Histone durch anti-Histon IgG nach bilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde bilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde 1 h vor IRI anti-Histon IgG (500µg/25 g KG) i.p. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle). Die Blut- und Organentnahme erfolgte nach 24 h. Die Bestimmung der im Plasma zirkulierenden Histone erfolgte mittels ELISA. Die quantitative Analyse der IgG-Deposition erfolgte

an für unspezifisches IgG gefärbten Nieren nach Methode. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe aus 2 Experimenten  $\pm$  SEM dar. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  gegenüber Kontrollen.

### **3.4.2 Effekte von anti-Histon IgG auf Nierenfunktion und Entzündung nach IRI**

Um nun die Effekte der Depletion extrazellulärer Histone zu spezifizieren, wurde einerseits die Nierenfunktion, andererseits die Sekretion und mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmarker betrachtet. Zur Analyse der Funktion wurden Kreatinin- und BUN- Level im Plasma mit Hilfe der jeweiligen Reaktion gemessen (A), hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Die Bestimmung der Plasma-Level der Entzündungsmarker TNF $\alpha$  und IL-6 erfolgte durch ELISAs aus dem 24 h nach IRI gewonnen Plasma (B), wobei hier die Applikation des anti-Histon IgG eine Verringerung der IL-6-Konzentration ( $p < 0,05$ ) und eine nicht signifikante Verringerung der TNF $\alpha$ -Konzentration ( $p = 0,06$ ) bewirkte. Zur Analyse der mRNA-Expression des Nierenschädigungsmarkers KIM-1 und wiederum IL-6 wurde nach RNA-Isolation der ischämischen Nieren eine quantitative RT-PCR durchgeführt (C). Dabei konnte eine signifikante Verringerung der IL-6-Expression ( $p < 0,05$ ) gezeigt werden, die Verringerung der KIM-1-Expression konnte durch hohe Schwankungen in der Kontrollgruppe nicht als signifikant herausgestellt werden. Somit konnte zwar keine funktionelle Verbesserung, jedoch eine Reduzierung der Entzündung durch anti-Histon IgG nach IRI gezeigt werden.



**Abbildung 20: Einfluss der Applikation von anti-Histon IgG auf Nierenfunktions- und Entzündungsparameter nach bilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde bilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde 1 h vor IRI anti-Histon IgG (500µg/25g KG) i.p. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle). Die Blut- und Organentnahme erfolgte nach 24 h.

**A.** Kreatinin- und BUN-Konzentration 24 h nach IRI.

**B.** Bestimmung der Plasmalevel von TNFα und IL-6 mittels kompetitivem ELISA

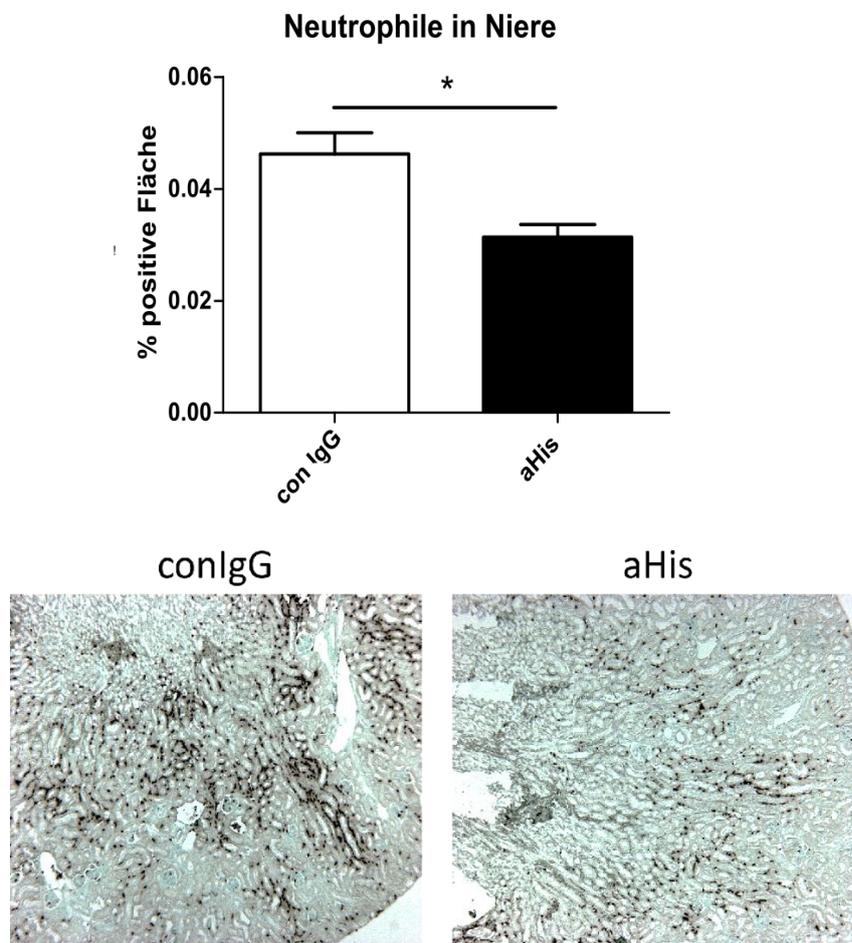
**C.** Bestimmung der mRNA-Expression von KIM-1 und IL-6 durch quantitative RT-PCR in Relation mRNA/18s rRNA

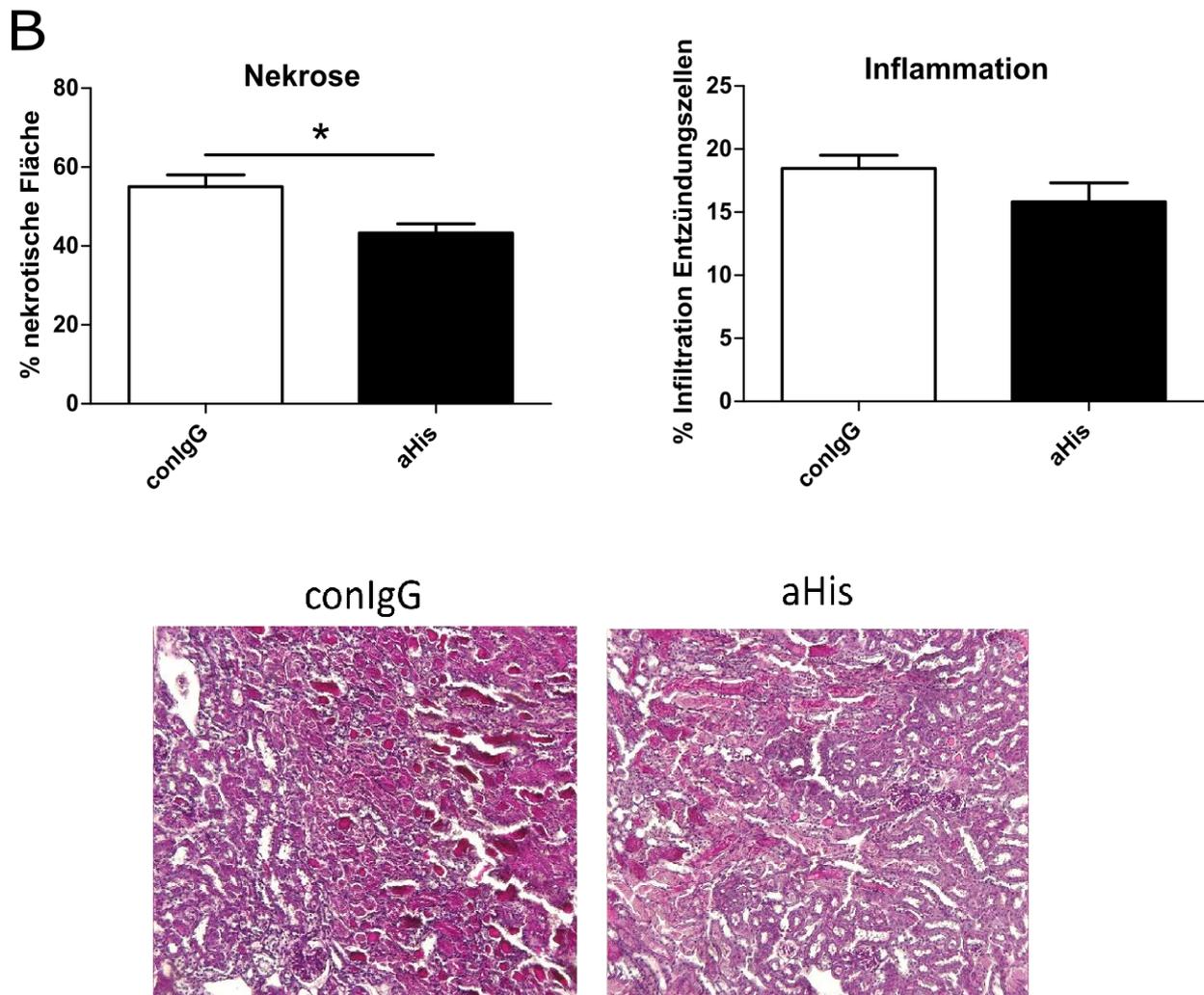
Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe aus 2 Experimenten ± SEM dar. \*p<0,05 gegenüber Kontrollen.

### 3.4.3 Verbesserung des morphologischen Kurzzeitoutcomes durch anti-Histon IgG

Die Analyse der strukturellen Effekte durch anti-Histon IgG erfolgte durch eine PAS- und Neutrophilenfärbung der nach 24 h entnommenen Nieren. Die quantitative Analyse der Neutrophileninfiltration zeigte eine Verringerung der Invasion in der Behandlungsgruppe um 40% ( $p < 0,05$ ). In der semiquantitativen Analyse der PAS-Färbung konnte eine signifikante Verringerung der nekrotischen Fläche um 15% ( $p < 0,05$ ) nachgewiesen werden, die präemptive Applikation von aHis IgG reduzierte also die strukturelle Nierenschädigung nach bIRI.

A





**Abbildung 21: Histologischer Effekt der Applikation von anti-Histon IgG nach bilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde bilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde 1 h vor IRI anti-Histon IgG (500µg/25g KG) i.p. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle). Die Blut- und Organentnahme erfolgte nach 24 h.

**A.** Färbung Neutrophiler Granulozyten in ischämischer Niere. Quantitative Analyse der Neutrophileninfiltration nach Methode 2.3.11

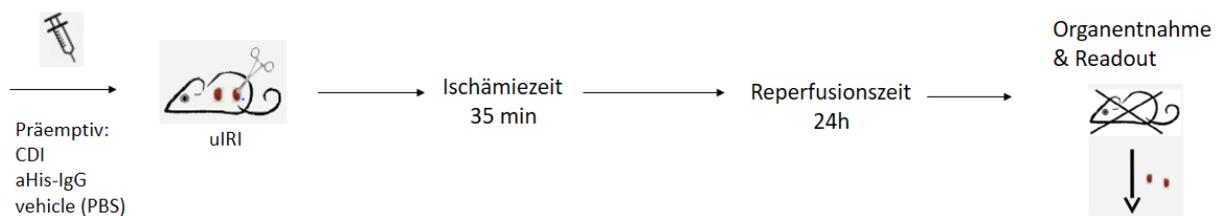
**B.** PAS-Färbung ischämischer Niere. Semiquantitative Analyse der Parameter Nekrose und Inflammation nach Methode 2.3.11

Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe aus 2 Experimenten ± SEM dar. \*p<0,05 gegenüber Kontrollen.

### 3.5 Effekte des anti-Histon IgG und Zelltodinhibitoren im Modell des unilateralen Nierenversagens

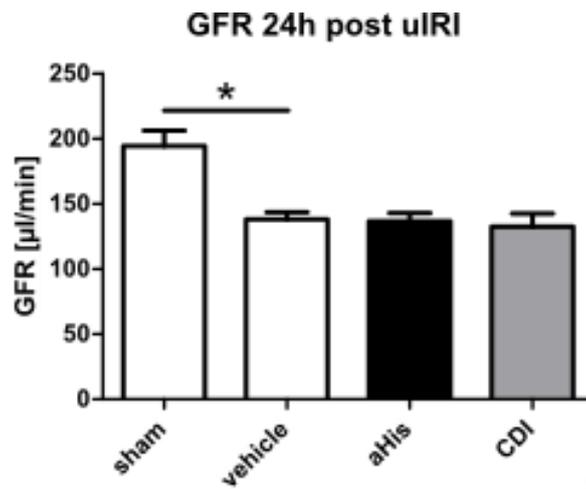
Da das Ziel dieser Studie in der Untersuchung der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen lag, musste nun aus Praktikabilitätsgründen das experimentelle Modell von bilateraler zu unilateraler IRI gewechselt werden. Da C57BL/6N-Mäuse klinisch relevante bilaterale Ischämie-Reperfusion nicht länger als 3 Tage<sup>80</sup>, ein starkes einseitiges

Nierenversagen aber weit mehr als die für die Überprüfung der Chronifizierung benötigten 5 Wochen, wurden zunächst die therapeutischen Effekte des anti-Histon IgG und der Zelltodinhhibitoren im Modell des unilateralen Nierenversagens nach 24 h untersucht. Hierfür wurde C57BL/6-Mäusen einseitig die linke Nierenarterie für 35 min abgeklemmt, präemptiv erfolgte eine Applikation von PBS i.p. (Kontrollgruppe, vehicle), anti-Histon IgG (500µg/25gKG) i.p. oder Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v.. Die Messung der GFR und die Organentnahme erfolgten jeweils 24h nach IRI.



### 3.5.1 Anti-Histon IgG und Zelltodinhhibitoren ohne Effekt auf Nierenfunktion

Die Messung der GFR erfolgte mittels des in 2.3.7 beschriebenen Verfahrens 24 h nach IRI, um die Nierenfunktion möglichst präzise zu messen, auch sind bei unilateraler Ischämie keine Schwankungen des Serumkreatinins oder BUN zu erwarten. Hier zeigt sich eine gute Praktikabilität des Modells, was durch eine signifikante Verminderung der GFR um 60 µl/min ( $p < 0,05$ ) in der vehicle-Gruppe im Vergleich zur sham-Gruppe, die nur einen Flankenschnitt erhalten hatte, bewiesen wird. Allerdings zeigt die Behandlung sowohl mit anti-Histon IgG als auch mit den Zelltodinhhibitoren keinerlei Änderung der GFR im Vergleich zur vehicle-Gruppe und somit auch keinerlei Verbesserung des funktionellen Kurzzeitoutcomes nach IRI.

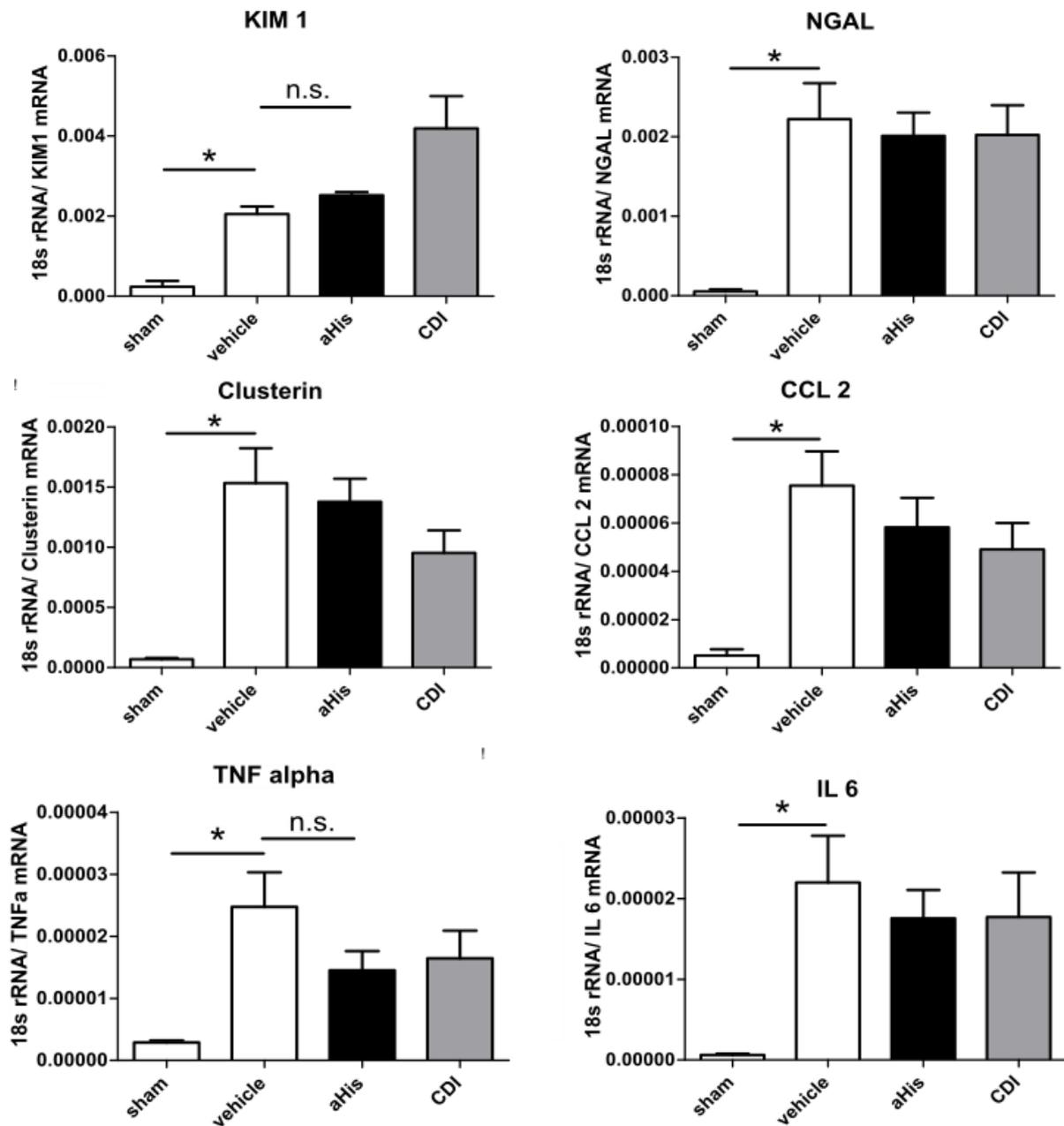


**Abbildung 22: Einfluss der Applikation von anti-Histon IgG und Zelltodinhibitoren auf GFR 24h nach unilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde 1h vor IRI anti-Histon IgG (500µg/25g KG) i.p. oder Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v.appliziert. Die GFR-Messung nach Methode erfolgte nach 24 h, als Kontrolle dienten eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe ± SEM dar. \* $p < 0,05$  gegenüber Kontrollen.

### 3.5.2 Anti-Histon IgG und Zelltodinhibitoren ohne Reduktion der Entzündung

Wie im Konzept der Nekroinflammation zu erwarten und in Punkt 3.4.2 beschrieben, verringert die präemptive Applikation von anti-Histon IgG die Entzündung nach bilateralem Nierenversagen. Um selbiges im Modell der unilateralen IRI zu untersuchen, wurde jeweils RNA aus den ischämischen Nieren isoliert und die mRNA-Expression verschiedener Gene untersucht. Es konnte weder für die Behandlung mit anti-Histon IgG noch mit Zelltodinhibitoren Verringerungen der Expression des Nierenschädigungsmarkers KIM-1, der Entzündungsmarker NGAL, Clusterin, CCL2 und der proinflammatorischen Zytokine TNF alpha und IL6 nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich die Expression jedes Markers in der vehicle-Gruppe gegenüber der sham-Gruppe signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ), so dass auch hier von einem grundsätzlich funktionierenden Modell ausgegangen werden kann.



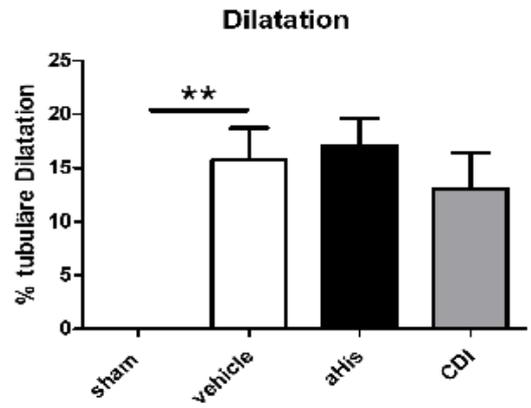
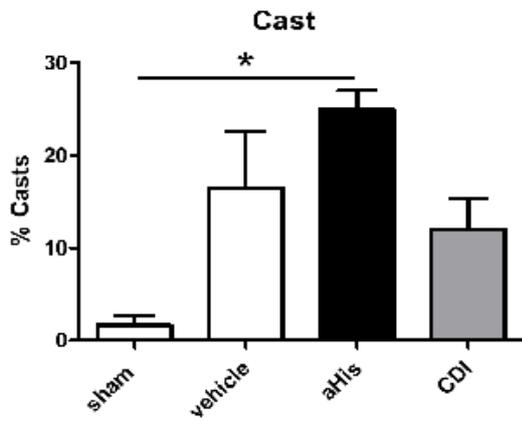
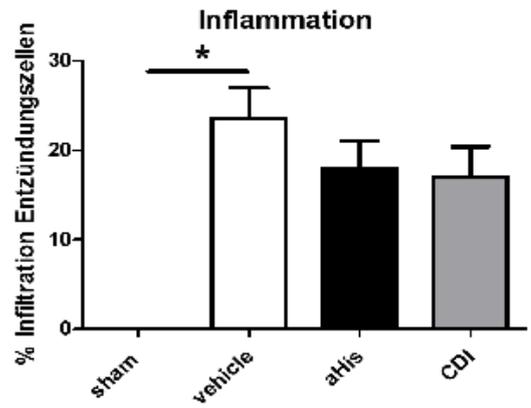
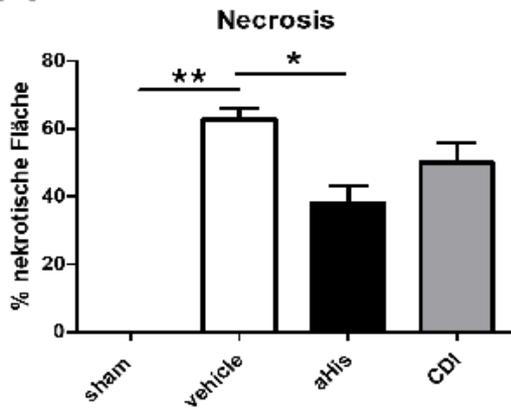
**Abbildung 23: Auswirkung der Applikation von anti-Histon IgG und Zelltodinhibitoren auf Expression verschiedener Gene 24h nach unilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde 1 h vor IRI anti-Histon IgG (500 µg/25 g KG) i.p. oder Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2 mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die Organentnahme erfolgte nach 24 h. Die mRNA-Expression von KIM 1, NGAL, Clusterin, TNFa, IL 6 und CCL 2 erfolgte mittels quantitativer RT-PCR jeweils in Relation mRNA/18s rRNA. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe ± SEM dar. \*p<0,05 gegenüber Kontrollen.

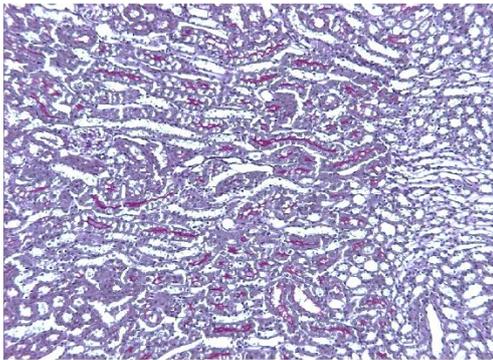
### **3.5.3 Morphologische Evaluation des Effekts von anti-Histon IgG und Zelltod-inhibitoren**

Da die Therapie mit anti-Histon IgG im Modell des bilateralen Nierenversagens eine Reduzierung der Nekrose und Neutrophileninfiltration zeigte, wurde dieser Effekt der Therapie mit anti-Histon IgG oder den Zelltodinhibitoren im Modell des unilateralen Nierenversagens ebenfalls untersucht. Hierfür wurden jeweils die 24 h nach IRI entnommenen ischämischen Nieren mit PAS- und Neutrophilenfärbung gefärbt. Die semiquantitative Analyse der PAS-Färbung (A) ergab eine signifikante Verringerung der Nekrose in der mit dem Antikörper behandelten Gruppe ( $p < 0,05$ ), jedoch nicht in der Zelltodinhibitoren-Gruppe. Die Parameter Inflammation, Cast-Formation und tubuläre Dilatation wurden allerdings durch keine Intervention reduziert, auch die quantitative Analyse der Neutrophileninfiltration (B) ergab keine signifikante Reduzierung der Invasion durch beide Interventionen. Allerdings zeigte sich in allen untersuchten morphologischen Parametern ein signifikanter Unterschied zwischen sham- und vehicle-Gruppe. Zusammenfassend konnte der im bilateralen Nierenversagen gezeigte protektive Effekt der anti-Histon IgG-Gabe und der Zelltodinhibitoren vermutlich aufgrund des in unilateraler IRI insgesamt geringeren Schadens nicht reproduziert werden.

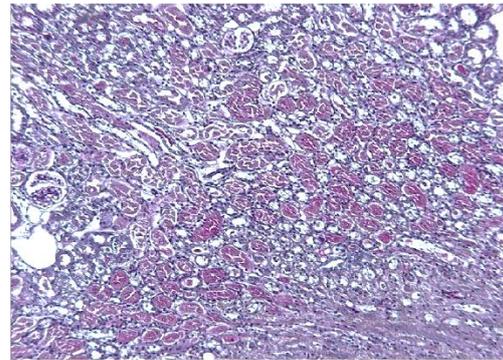
**A**



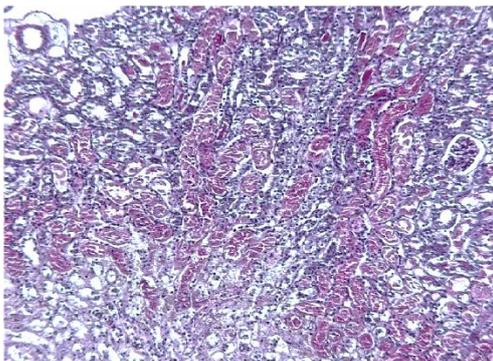
sham



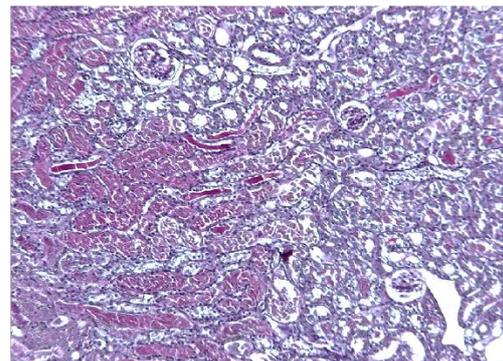
vehicle

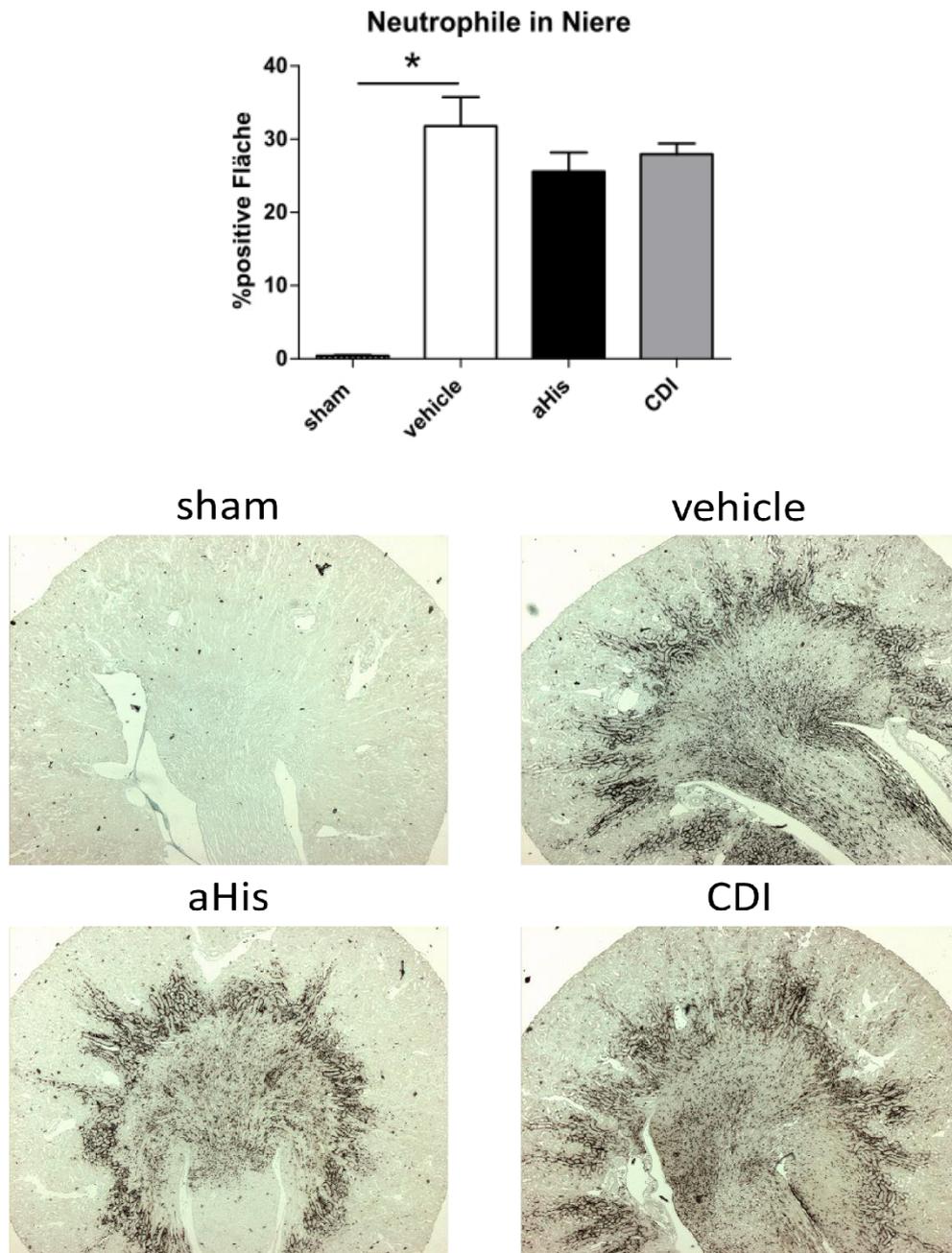


aHis



CDI



**B**

**Abbildung 24: Histologische Evaluation der Applikation von anti-Histon IgG und Zelltodinhibitoren 24h nach unilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde 1h vor IRI anti-Histon IgG (500 µg/25 g KG) i.p. oder Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p., Ferrostatin-1 (2 mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die Organentnahme erfolgte nach 24 h.

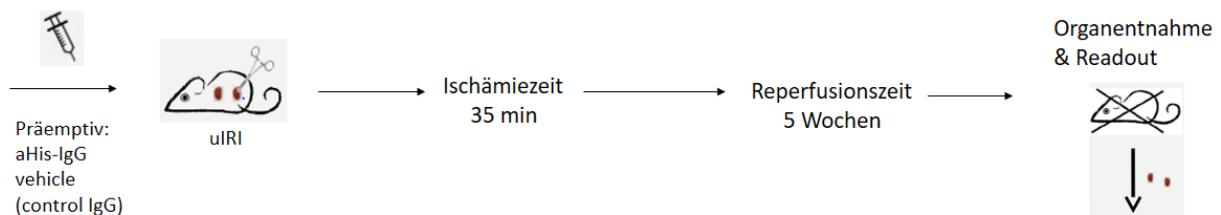
**A.** PAS-Färbung ischämischer Nieren. Semiquantitative Analyse nach Methode

**B.** Färbung Neutrophiler Granulozyten in ischämischer Niere. Quantitative Analyse der Neutrophileninfiltration nach Methode

Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe ± SEM dar. \* $p < 0,05$  gegenüber Kontrollen.

### 3.6 Verminderte Progression zu chronischem Nierenversagen durch anti-Histon IgG

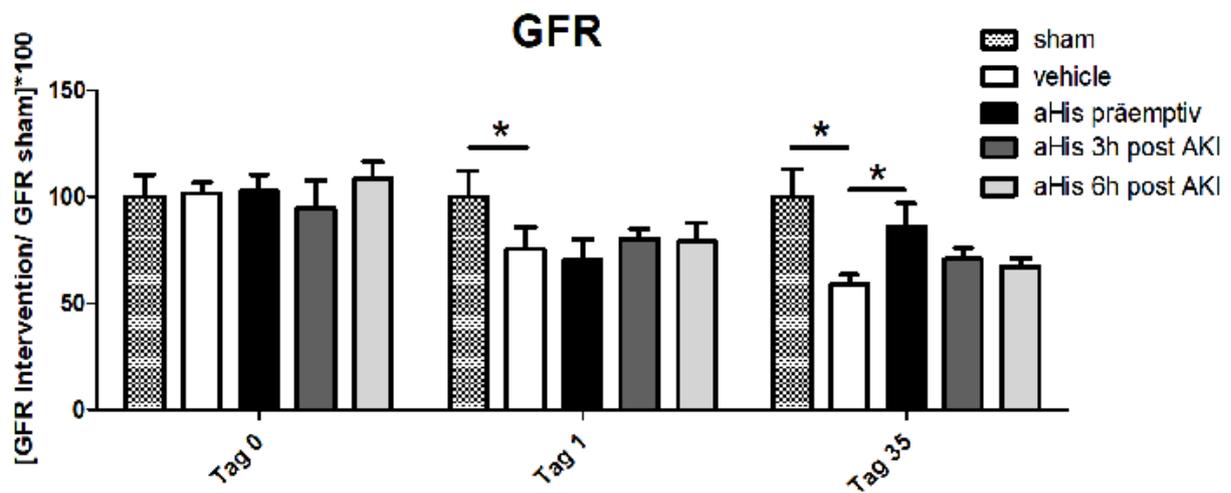
Da die Therapie mit anti-Histon IgG zusammenfassend sowohl Nierenstruktur als auch die Entzündung im Kurzzeitoutcome stärker verbessert hat als die Therapie mit den Zelltodinhibitoren, wurde diese Intervention nun auf ihre Wirkung auf die Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen untersucht. Hierbei wurde auch die auf dem Konzept der Nekroinflammation und klinisch-praktischer Überlegung beruhende Idee der verzögerten Applikation integriert. In experimenteller Ausführung wurden hierbei C57BL/6 Mäusen jeweils einseitig die Nierenarterie für 35 min abgeklemmt. Die Applikation des anti-Histon IgG (500µg/25g KG) i.p. erfolgte präemptiv, 3 h und 6 h nach IRI an jeweils 5 Mäusen, als Kontrollgruppen fungierten eine Gruppe die nur einen Flankenschnitt erhielt (sham) und eine die vor IRI unspezifisches Maus IgG (500µ/25g KG) i.p. erhielt (vehicle). Die Entnahme der Nieren und letzte Messung der GFR erfolgte 35 Tage nach IRI.



#### 3.6.1 Verringerung des Nierenfunktionsverlusts durch präemptives anti-Histon IgG

Die kontinuierliche Evaluation der Nierenfunktion erfolgte durch transkutane GFR-Messung nach 2.3.7 zu den Zeitpunkten vor IRI und 1 d, 7 d, 14 d, 21 d, 35 d nach IRI. In der jeweils auf die GFR der sham-Gruppe normalisierten Darstellung zeigte sich, nach ursprünglicher GFR von ca. 100% vor IRI in allen Gruppen, 24 h postoperativ ein ca. 30%iger GFR-Abfall in allen Gruppen mit Ischämie. An den darauffolgenden Zeitpunkten 7 d, 14 d, 21 d kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der GFR in den IRI-Gruppen, während der in der Gruppe mit präemptiver anti-Histon IgG-Applikation etwas schwächer ausfiel. An Tag 35 nach IRI zeigt sich nun ein Abfall der GFR der vehicle-Gruppe auf 50% und der 3 h und 6 h verzögerten Applikation auf ca. 60% des Wertes der sham-Gruppe (keine statistische Signifikanz). Die präemptive Therapie erhöht die GFR auf 80% des Referenzwertes und weist somit eine Verbesserung der GFR um 30% im Vergleich zur vehicle-Gruppe auf ( $p < 0,05$ ). Somit erhält

die präemptive, nicht jedoch die verzögerte Applikation des anti-Histon IgG die Nierenfunktion 5 Wochen nach unilateralem Nierenversagen.



GFR [ $\mu$ /min]	sham		vehicle		aHis präemptiv		aHis 3h post ATN		aHis 6h post ATN	
	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD	Mittelwert	SD
Tag 0	205	28.95971	236	17.37774	236	17.37774	205.3464413	28.95971193	220	11.7422002
Tag 1	194.512	23.80552	138.136	10.9237	136.862	18.58085	166	9.020201	153	17.57731
Tag 7	247.6125	41.31734	147.27	22.69859	194.3975	32.76656				
Tag 14	343.015	43.38243	211.978	33.49797	227.9267	36.18734				
Tag 21	341.2425	39.88896	196.46	12.73108	237.1062	52.33767				
Tag 35	308.1475	39.89568	182.1825	13.82522	263.9233	34.60046	218	15.81301	207	12.05291

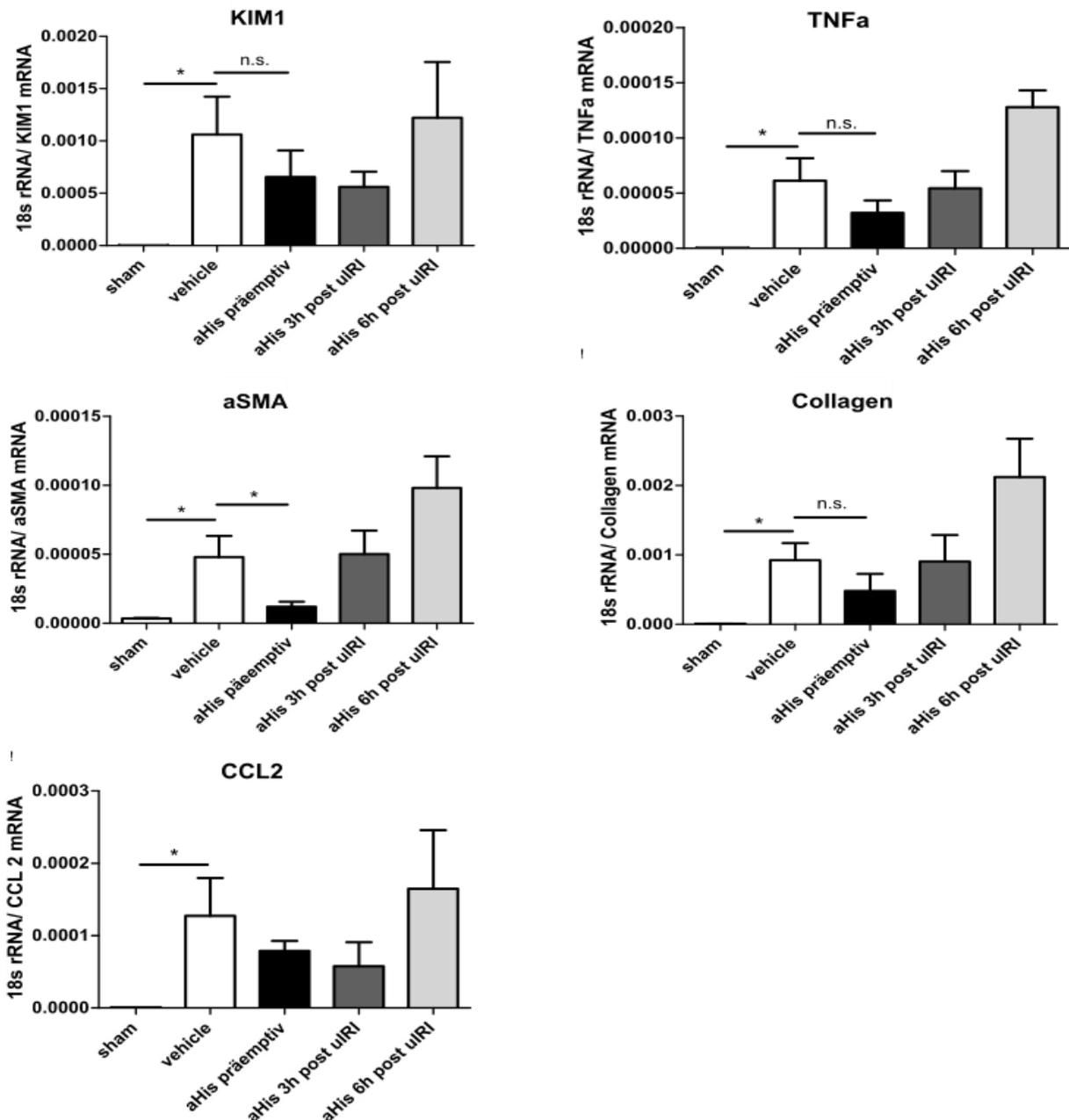
**Abbildung 25: Effekte präemptiver und verzögerter Applikation von anti-Histon IgG 5 Wochen nach unilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde anti-Histon IgG (500  $\mu$ g/25 g KG) i.p. zu verschiedenen Zeiten vor und nach IRI appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die GFR-Messung nach Methode erfolgte zu den aufgeführten Zeitpunkten. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe aus zwei unterschiedlichen Experimenten  $\pm$  SEM dar. \* $p$ <0,05 gegenüber Kontrollen.

### 3.6.2 Effekt des anti-Histon IgG auf Entzündung im Langzeitoutcome

Um die Auswirkung der Therapie mit anti-Histon IgG auf die mRNA-Expression verschiedener Nierenschädigungs- und Entzündungsmarker zu untersuchen, wurde aus den jeweils ischämischen Nieren 5 Wochen nach IRI RNA isoliert und eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Bei der mRNA-Expression der Nierenschädigungsmarkern KIM-1 und Entzündungsmarkern TNF alpha und CCL2 zeigte sich keine signifikante Reduktion durch die Interventionen im Vergleich zur vehicle-Gruppe. Die Expression des profibrotischen Gens  $\alpha$ SMA wurde durch die präemptive Therapie signifikant reduziert ( $p$ <0,05), allerdings zeigte

die verzögerte Therapie keine Reduktion. Bei allen Genen zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Expression durch IRI ( $p < 0,05$ ). Somit konnte im Langzeitoutcome keine Verringerung der Entzündung durch anti-Histon IgG, jedoch eine verminderte Expression profibrotischer Gene durch präemptive Histonblockade beobachtet werden.



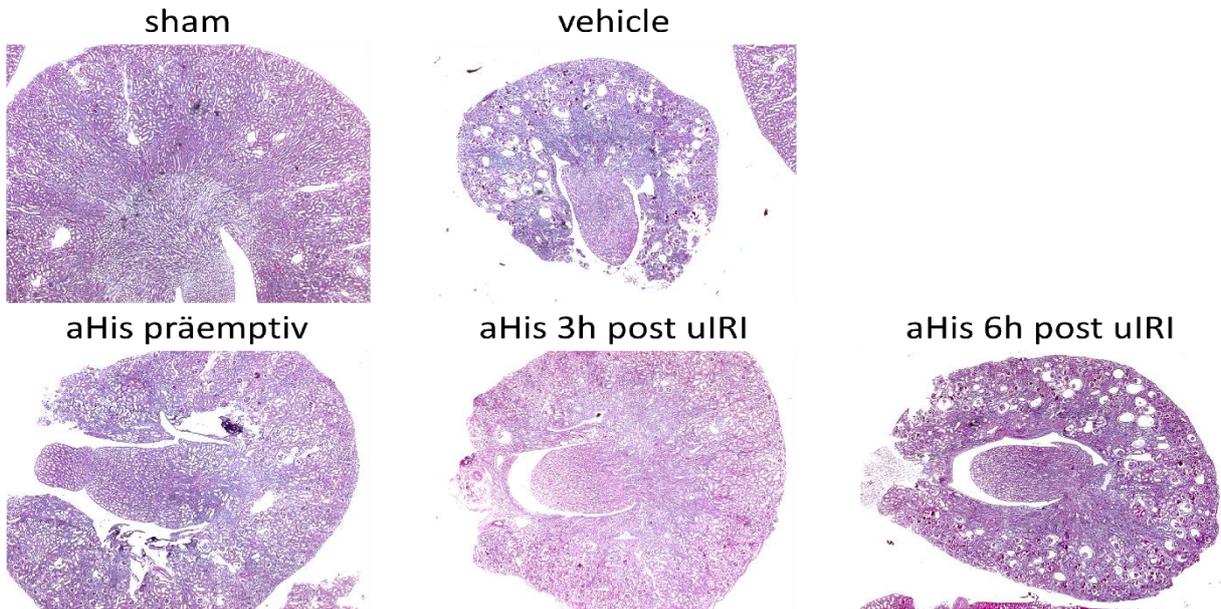
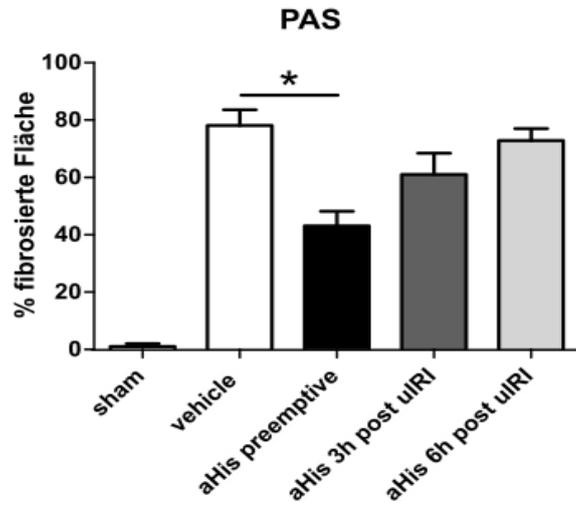
**Abbildung 26: Reduktion der Expression von pro-inflammatorischen/-fibrotischen Genen nach Applikation von anti-Histon IgG**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde anti-Histon IgG (500  $\mu$ g/25 g KG) i.p zu verschiedenen Zeiten vor und nach IRI appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die Organentnahme erfolgte nach 5 Wochen. Die mRNA-Expression KIM 1, TNF $\alpha$ , CCL2, aSMA, Collagen wurde mittels quantitativer RT-PCR in Relation mRNA/18s-rRNA bestimmt. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe aus zwei unterschiedlichen Experimenten  $\pm$  SEM dar. \* $p < 0,05$  gegenüber Kontrollen.

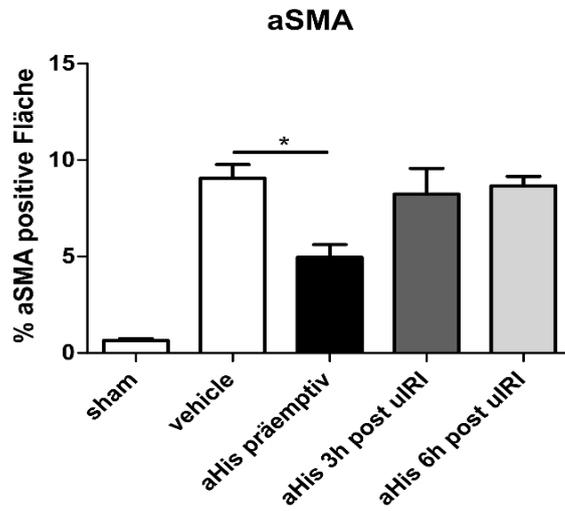
### 3.6.3 Reduktion des strukturellen Schadens durch präemptive Histonblockade

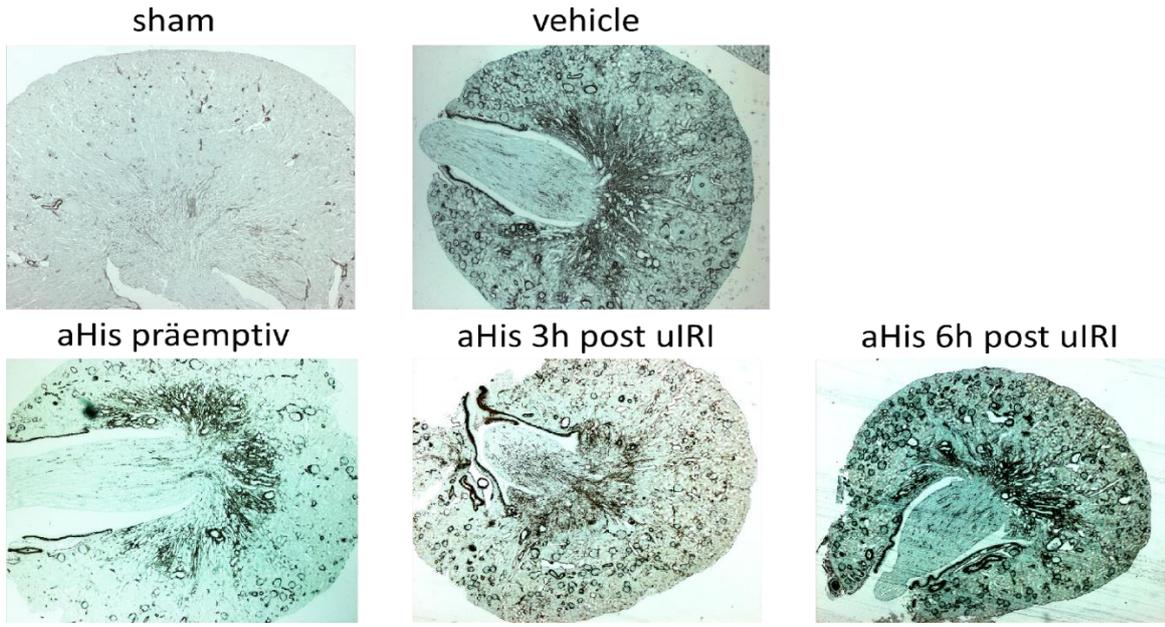
Um die strukturellen Korrelate der verbesserten Nierenfunktion und die Auswirkungen der reduzierten Expression profibrotischer Gene zu untersuchen, wurden die 5 Wochen nach Ischämie entnommenen Nieren für ersteres in PAS-Färbung, für zweiteres in Masson-Trichrom und  $\alpha$ SMA-Färbung gefärbt. Hierbei zeigte sich in der semiquantitativen Analyse der PAS-Färbung (A) eine signifikante Reduktion der fibrotischen Fläche um 50% durch die präemptive anti-Histon IgG-Applikation im Vergleich zu vehicle-Gruppe ( $p < 0,05$ ), die verzögerte Applikation führte ebenfalls zu einer leichten Verringerung der vernarbten Fläche im Vergleich zur vehicle-Gruppe, die allerdings aufgrund hoher interindividueller Schwankungen kein Signifikanzniveau erreichte. Um dieses Ergebnis immunhistochemisch zu bestätigen, wurde eine quantitative Analyse der  $\alpha$ SMA-Deposition durchgeführt (B), bei der eine signifikante Verringerung der  $\alpha$ SMA-Einlagerung um 50% durch die präemptive Therapie im Vergleich zur vehicle-Gruppe festgestellt werden konnte ( $p < 0,05$ ), die verzögerte Therapie zeigte jedoch keinen Effekt. Ein sehr ähnliches Bild zeigte sich in der quantitativen Analyse der Masson-Trichrom-Färbung (C), wo ebenfalls die präemptive Therapie eine 50%ige Verringerung der MT-positiven und somit fibrotischen Fläche im Vergleich zur vehicle-Gruppe bewirkte ( $p < 0,05$ ), die verzögerte Applikation jedoch auch hier keine signifikante Auswirkung hatte. Zuletzt wurde, um die T-Zell-Infiltration der Nieren 5 Wochen nach IRI zu untersuchen, eine CD45-Färbung angefertigt und quantitativ analysiert. Auch hier verringerte die präemptive Histonblockade die Invasion um 50% im Vergleich zur vehicle-Gruppe, die verzögerte Applikation hatte keinen signifikanten Effekt. Zusammenfassend führte die präemptive Applikation von anti-Histon IgG zu einer verminderten Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen im Sinne einer verbesserten Nierenfunktion und abgeschwächten morphologischen Veränderungen wie eine Reduzierung der fibrotischen Fläche und der Einlagerung Kollagen und  $\alpha$ SMA.

A

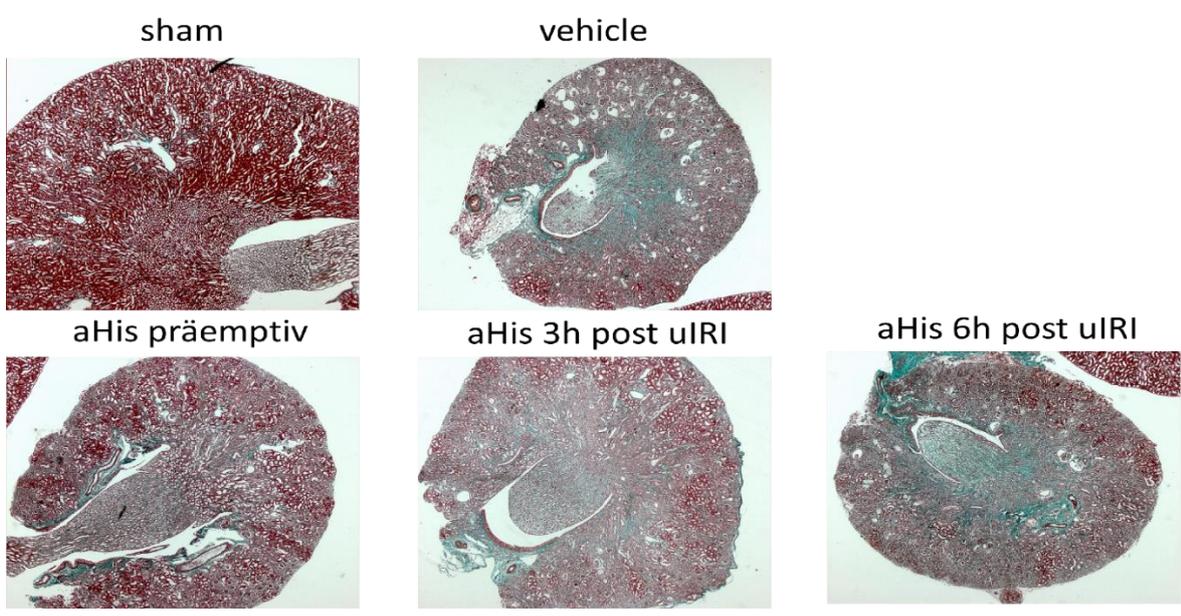
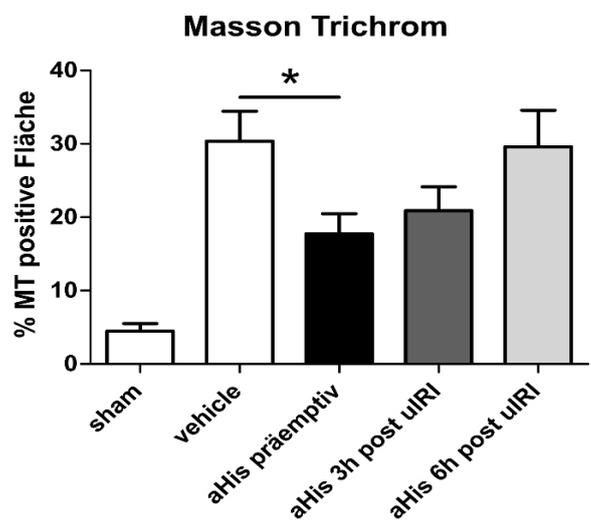


B

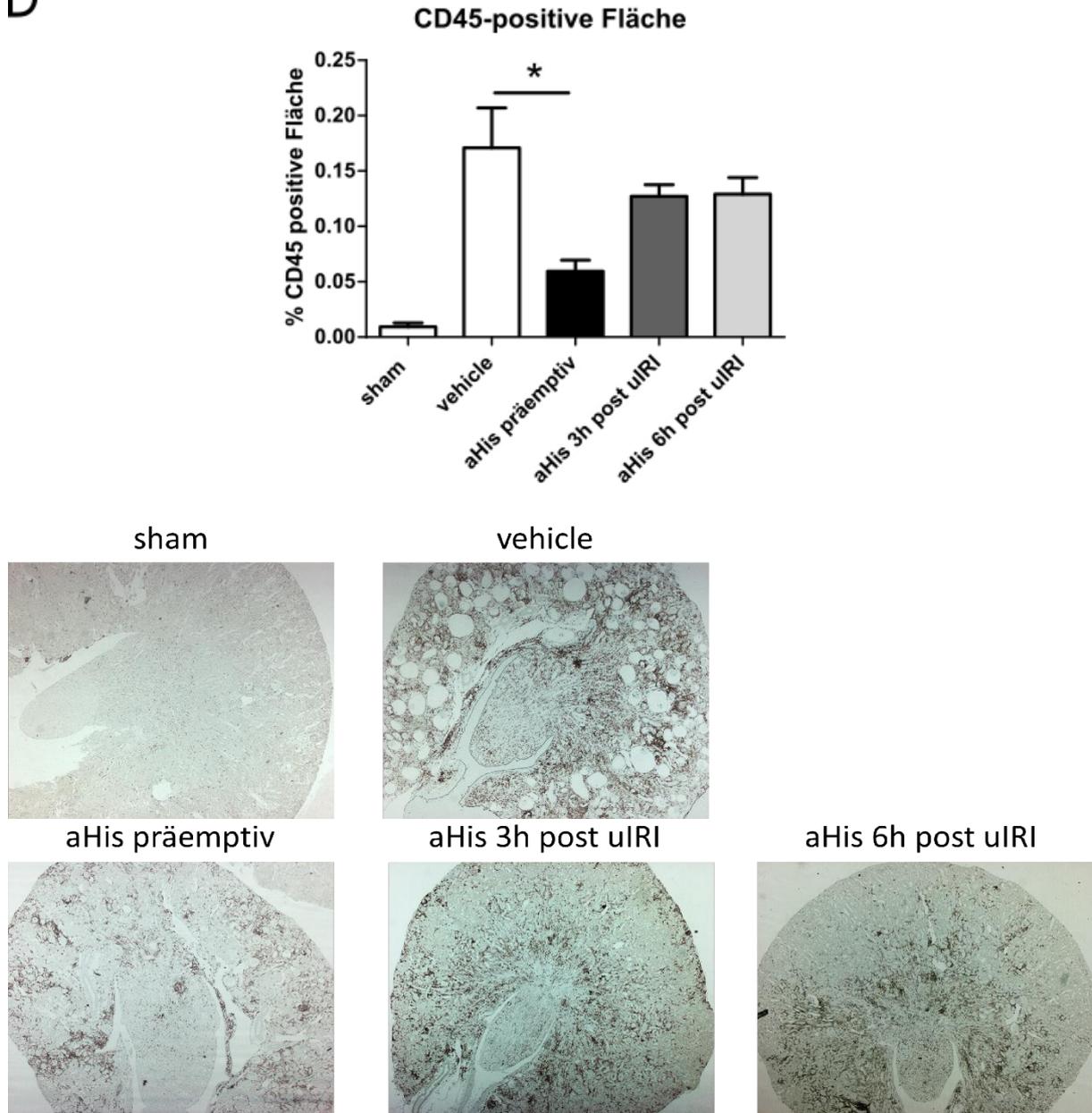




C



D



**Abbildung 27: Einfluss von präemptiver und verzögerter Applikation von anti-Histon IgG auf Nierenfibrose- und atrophie 5 Wochen nach unilateraler IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde anti-Histon IgG (500µg/25g KG) i.p zu verschiedenen Zeiten vor und nach IRI appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von unspezifischem Maus-IgG i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die Organentnahme erfolgte nach 5 Wochen.

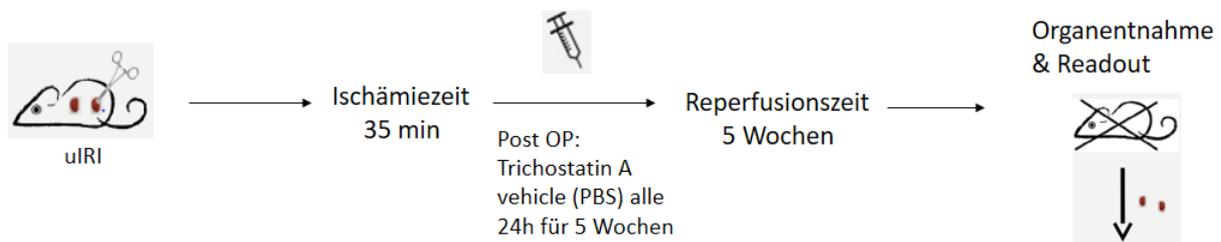
**A.** PAS-Färbung ischämischer Nieren. Semiquantitative Analyse fibrotischer Areale nach Methode  
**B.** aSMA-Färbung ischämischer Nieren. Quantitative Analyse der aSMA-positiven Flächen nach Methode  
**C.** Masson-Trichrom-Färbung ischämischer Nieren. Quantitative Analyse der MT-positiven Fläche nach Methode

**D.** Färbung von T-Zellen mittels CD45-Färbung ischämischer Nieren. Quantitative Analyse der T-Zellinfiltration nach Methode

Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe aus zwei unterschiedlichen Experimenten  $\pm$  SEM dar. \* $p < 0,05$  gegenüber Kontrollen.

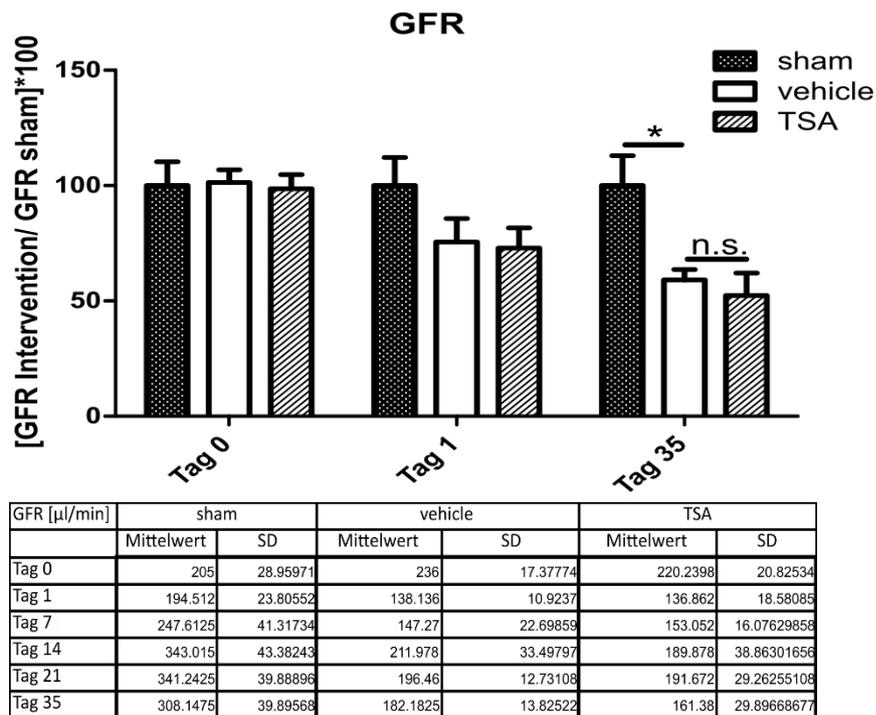
### 3.7 Effekt von Trichostatin-A auf Progression zu chronischem Nierenversagen

Ein weiterer, an der Verringerung der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen beteiligter Mechanismus ist die zelluläre Regeneration. Hierfür zeigte der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin-A in mehreren Tiermodellen für Nierenschädigung bereits ein ausgeprägtes proregeneratives Potenzial.<sup>52,153,168</sup> Da sich das Modell der unilateralen IRI aufgrund der guten zeitlichen Darstellung der Regenerationsphase und der Anwendbarkeit in der Progredienz von ANV zu CNV besonders eignet, wurde die Wirksamkeit von TSA bei der ischämischen Tubulusnekrose untersucht. Hierbei wurden C57BL/6-Mäusen für 35 min jeweils einseitig die Nierenarterie abklemmt. Die Applikation von TSA erfolgte nun täglich mit Beginn 24 h nach IRI für 5 Wochen, als Kontrollgruppen dienten eine Gruppe mit ausschließlich Flankenschnitt (sham) und eine Gruppe die nach IRI tägliche Injektionen von PBS i.p. erhielt (vehicle). Die Organentnahme und letzte Messung der GFR erfolgte 35 Tage nach Operation.



#### 3.7.1 Kontinuierliche Applikation von TSA ohne Auswirkungen auf GFR

Die Messung der GFR erfolgte durch die in 2.3.7 beschriebene Technik zu den Zeitpunkten vor, 1 d, 7 d, 14 d, 21 d und 35d nach IRI. Hierbei zeigte sich in der jeweils auf die sham-Gruppe normalisierten Darstellung, wie schon in 3.6.1, nach 24 h ein initialer Abfall der GFR um ca. 25% in den Gruppen mit Ischämie. Darauf folgend kam es zu einer kontinuierlichen Abnahme der Nierenfunktion bis Tag 35, wobei hier die GFR der vehicle-Gruppe nur noch 50% der sham-Gruppe betrug ( $p < 0,05$ ). Die kontinuierliche Therapie mit Trichostatin-A führte zu keiner Verbesserung der Nierenfunktion, bei ebenfalls einem Verlust der GFR um 50% im Vergleich zur sham-Gruppe.

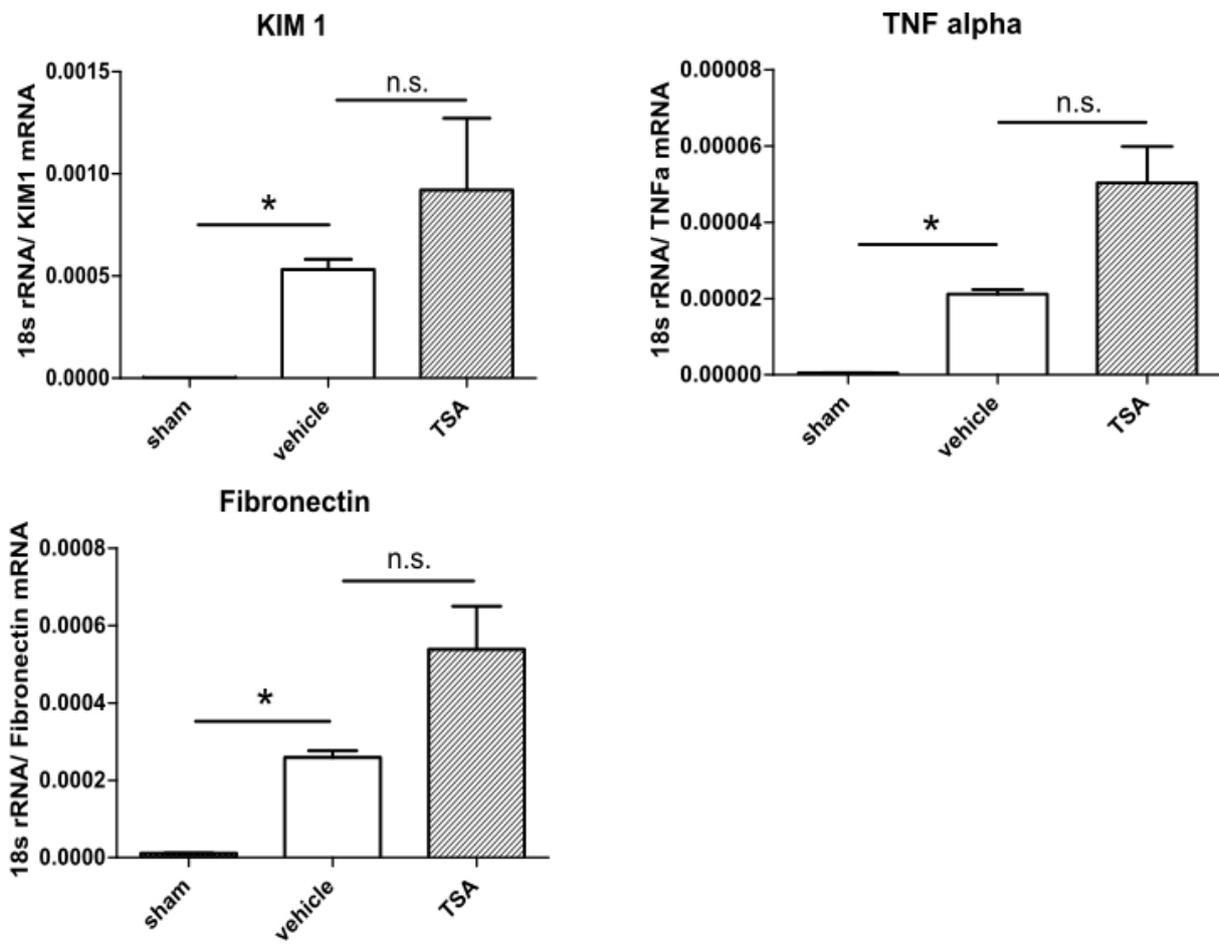


**Abbildung 28: Effekte kontinuierlicher Applikation von TSA auf GFR 5 Wochen nach IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde Trichostatin-A (500μg/25g KG) i.p ab Tag 1 nach IRI 5 Wochen täglich appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von PBS i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die GFR-Messung nach Methode erfolgte zu den aufgeführten Zeitpunkten. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Grupp ± SEM dar. \*p<0,05 gegenüber Kontrollen.

### 3.7.2 Trichostatin-A ohne Reduktion von Entzündung und Fibrose

Die Auswirkung der Trichostatin-A-Therapie auf die Expression verschiedener Gene wurde mittels RNA-Isolation aus den 35d nach Ischämie entnommenen Nieren und anschließender quantitativer RT-PCR durchgeführt. Hierbei konnte die Therapie mit Trichostatin-A weder die Expression des tubulären Schadensmarkers KIM-1, des proinflammatorischen Zytokins TNF alpha und des Fibrosemarkers Fibronectin senken. Jedoch konnte auch hier für jedes Gen eine signifikante Erhöhung der Expression 35 Tage nach Ischämie erzielt werden, indikativ für eine gute Praktikabilität des Modells.



**Abbildung 29: Kontinuierliche Applikation von TSA ohne Reduktion der Expression von Nierenschädigungsmarkern**

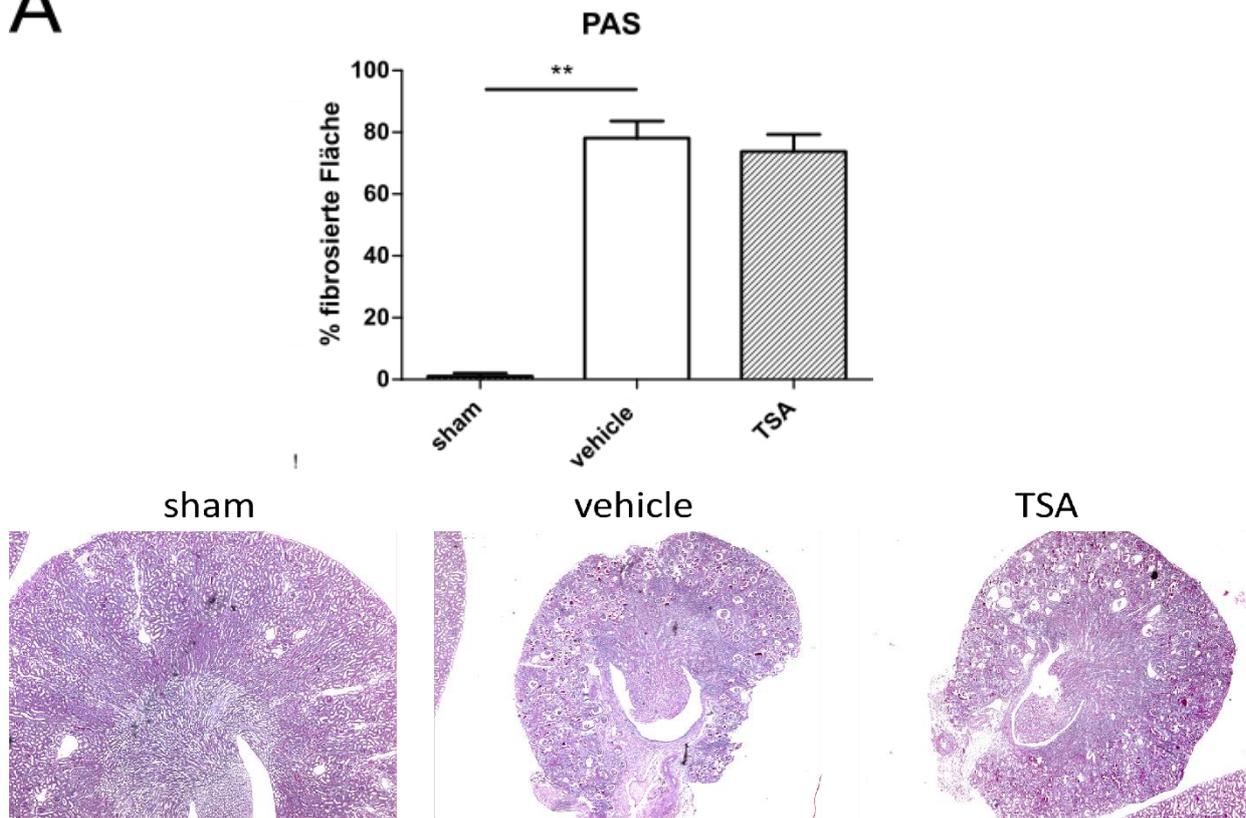
An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde Trichostatin-A (500µg/25g KG) i.p ab Tag 1 nach IRI 5 Wochen täglich appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von PBS i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die Organentnahme erfolgte nach 5 Wochen. Die mRNA-Expression verschiedener Gene wurde mittels quantitativer RT-PCR in Relation mRNA/18s-rRNA bestimmt. Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe ± SEM dar. \*p<0,05 gegenüber Kontrollen.

### 3.7.3 Morphologische Effekte der Therapie mit Trichostatin-A

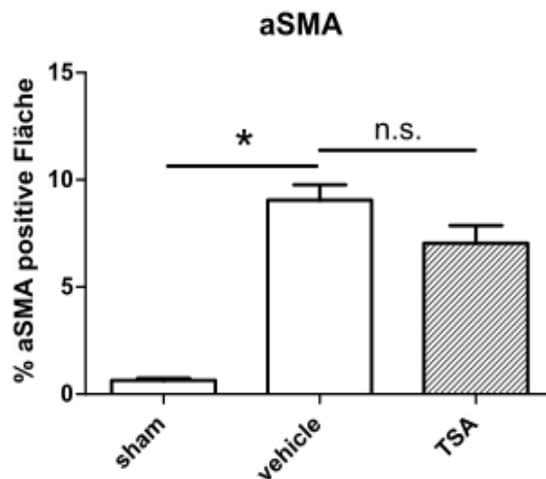
Um die strukturellen Veränderungen der Trichostatin-A-Therapie zu evaluieren, wurden die 5 Wochen nach Ischämie entnommenen Nieren histologisch in PAS-, αSMA-, Masson-Trichrom- und CD45-Färbung untersucht. Die semiquantitative Analyse der PAS-Färbung (A) ergab keine Reduktion der fibrotischen Fläche durch die Intervention, auch die Fibrose-spezifischen Färbungen αSMA (B) und Masson-Trichrom (C) zeigten zwar tendenzielle Verringerungen der Fibrosierung durch TSA-Applikation, allerdings war aufgrund hoher interindividueller Schwankungen in der vehicle-Gruppe keine statistische Signifikanz ermittelbar. Auch in der quantitativen Analyse der T-Zellinfiltration und somit Inflammation

5 Wochen nach IRI führte die TSA-Therapie zu keiner signifikanten Reduktion der Invasion. Es zeigte sich aber in den Analysen aller Färbungen ein signifikanter Anstieg der Fibrosierung oder Entzündung zwischen sham- und vehicle- Gruppe ( $p < 0,01$ ). Die kontinuierliche Therapie führte somit zu weder struktureller noch funktioneller Verringerung der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen.

**A**

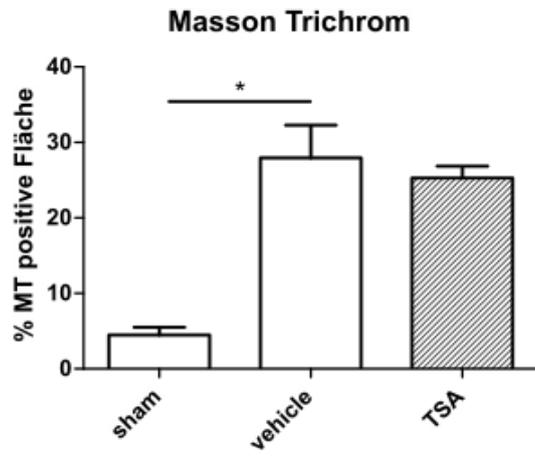


**B**

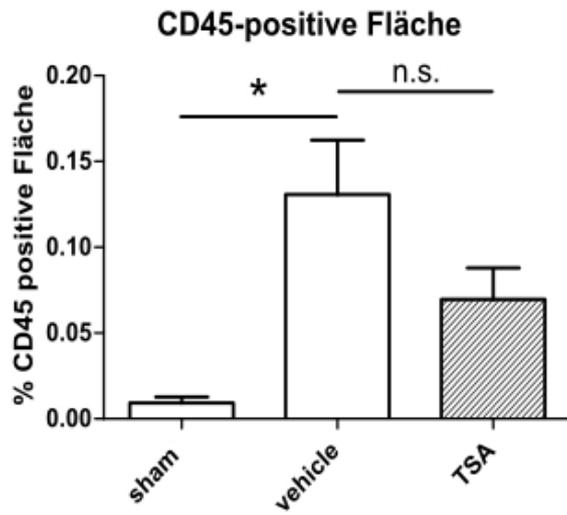




**C**



**D**





**Abbildung 30: Effekte kontinuierlicher Applikation von TSA auf Nierenfibrose und -atrophie 5 Wochen nach IRI**

An je 5 C57BL/6 Mäusen pro Gruppe wurde unilaterale IRI mit Ischämiezeit 35 min durchgeführt. Den Mäusen wurde Trichostatin-A (500µg/25g KG) i.p ab Tag 1 nach IRI 5 Wochen täglich appliziert, als Kontrolle diente eine Injektion von PBS i.p. (vehicle) und ein Flankenschnitt ohne Ischämie (sham). Die Organentnahme erfolgte nach 5 Wochen.

- A.** PAS-Färbung ischämischer Nieren. Semiquantitative Analyse fibrotischer Areale nach Methode
- B.** aSMA-Färbung ischämischer Nieren. Quantitative Analyse der aSMA-positiven Flächen nach Methode
- C.** Masson-Trichrom-Färbung ischämischer Nieren. Quantitative Analyse der MT-positiven Fläche nach Methode
- D.** Färbung von T-Zellen mittels CD45-Färbung ischämischer Nieren. Quantitative Analyse der T-Zellinfiltration nach Methode

Die Daten stellen jeweils den Mittelwert aus 5 Mäusen pro Gruppe aus zwei unterschiedlichen Experimenten  $\pm$  SEM dar. \* $p < 0,05$  gegenüber Kontrollen.

## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Abhängigkeit der verschiedenen Phasen des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens durch die Inhibierung des regulierten Zelltodes, die Neutralisierung extrazellulärer Histone oder die Stimulierung der parenchymalen Regeneration die Progression von akuter zu chronischer Niereninsuffizienz abzuschwächen. Dabei sollte das therapeutische Zeitfenster für eine verzögerte Therapie identifiziert werden. Hierfür wurden folgende Hypothesen überprüft:

- A) Im Einklang mit Nekroinflammation schützt präemptive und verzögerte Inhibition von Zelltod vor renalem Funktionsverlust und struktureller Schädigung in der akuten Phase
- B) Präemptive und verzögerte Neutralisation von extrazellulären Histonen reduziert renale Nekroinflammation in der akuten Phase und verringert ihre Folgen auf Funktionsverlust und strukturelle Schädigung in der chronischen Phase
- C) Kontinuierliche Unterstützung renaler Regeneration durch Trichostatin-A verbessert den Erhalt von Nierenfunktion und –struktur in der chronischen Phase

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass A) die präemptive Applikation von Zelltodinhibitoren einen milden, die verzögerte jedoch keinen protektiven Effekt in der akuten Nierenschädigung hatte, B) die präemptive, nicht aber die verzögerte Histonneutralisation die Progression zum chronischen Nierenversagen abschwächte und C) die kontinuierliche Unterstützung renaler Regeneration durch TSA keinen Effekt auf die Langzeitprognose aufwies.

Die Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen stellt ein großes, weil unterschätztes und unterdiagnostiziertes gesundheitliches Problem dar.<sup>40,57,58</sup> Auf molekularer Ebene laufen im renalen Ischämie-Reperfusionsschaden als Modell für die akute Nierenschädigung verschiedene Phasen des Zelltodes, der sterilen Entzündung und der Regeneration in zeitlicher Abfolge ab und führen zu einer strukturellen Defektheilung.<sup>43</sup> Der pathophysiologische Zusammenhang zwischen Zelltod und steriler Inflammation, auch als „Nekroinflammation“ bezeichnet, ist etabliert<sup>79,83,106,169</sup> und wurde in verschiedenen Modellen der Organschädigung nachgewiesen und als therapeutisches Ziel verwendet. So

konnten Nakazawa, *et al.* zeigen, dass im renalen Ischämie-Reperfusionsschadens die Inhibierung des Zelltodes, der NET-Bildung und Neutralisierung extrazellulärer Histone die Schädigung und Entzündungsreaktion in der Niere und auch in entfernten Organen reduzierte.<sup>82</sup> Ferner bewirkte im Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber die Herunterregulierung des DAMPs HMGB-1 sowohl einen protektiven Effekt auf die Leberfunktion, als auch eine Reduzierung der postischämischen Entzündung.<sup>170</sup> Um diesen postulierten Kreislauf nach IRI zu unterbrechen, wurden zunächst die verschiedenen Arten des Zelltodes blockiert. Die Anwendung von Zelltodinhhibitoren findet sich noch nicht im klinischen Gebrauch wieder, jedoch konnten im Tiermodell Ergebnisse zur Abmilderung von akuter Organschädigung und Entzündung erzielt werden. So konnten Linkermann, *et al.* durch die präemptive Blockade der Necroptose durch Nec-1, der Ferroptose durch Ferrostatine und der Mitochondrial-permeability transition-mediated regulated necrosis (MPT-RN) durch Sangliferin A im IRI-Modell eine postischämische Reduktion des Serumkreatinins, des Serumharnstoffes und des *tubular injury scores* um 70 % zeigen.<sup>77,80</sup> Auch der Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber konnte durch die Inhibition der Nekroptose funktionell wie histologisch um mehr als 50 % verringert werden.<sup>107</sup> Aufgrund des im Konzept der Nekroinflammation postulierten selbsterhaltenden Feedback-Mechanismus von Zelltod und Entzündung<sup>79</sup> sollte der Effekt der verzögerten Applikation der Zelltodinhhibitoren (CDI) Necrostatin-1 (1,65 mg/kg) i.p. gegen die Nekroptose, Ferrostatin-1 gegen die Ferroptose (2 mg/kg) i.p. und Cyclosporin A (10 mg/kg) i.v. gegen die MPT-RN nach bilateraler Nierenschädigung wegen der experimentellen Praktikabilität zunächst im Kurzzeit-Outcome nach 24h bestimmt werden, um ein mögliches therapeutisches Zeitfenster nach IRI zu identifizieren. Die Zeitpunkte der Intervention wurden anhand von Vorarbeiten zur Charakterisierung der Schädigungs- und Entzündungsphasen nach IRI durch Franziska Kraft aus unserer Arbeitsgruppe (unveröffentlicht) auf 1 h, 3 h, 6 h und 12 h festgelegt. Die resultierende, im Vergleich zu genannten Publikationen nur sehr gering ausfallende Verbesserung von Nierenfunktion und struktureller Nierenschädigung (Abb. 12,13) könnte durch unterschiedliche Durchführung der IRI-Operation in beiden Arbeitsgruppen begründet liegen. Die Arbeitsgruppe von Dr. Linkermann legte die Nierenhili nicht durch einen Flankenschnitt, sondern durch eine mediane Laparatomie frei, wodurch mehr intrabdominelle Organe freilagen und dementsprechend Körpertemperatur abgegeben wurde.<sup>77,80</sup> Zudem wurde die Körpertemperatur der Mäuse intra- und perioperativ bei 36-37

°C gehalten, wohingegen die in dieser Arbeit angewandte Methode nach Marschner, *et al.*<sup>162</sup> eine Körpertemperatur von 36,5 - 38,5 °C bei Temperaturmessung durch eine rektale Sonde anstrebt. Da eine erhöhte Temperatur zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führt, kann eine erhöhte Körpertemperatur somit im durchgeführten Modell eine vergleichsweise höhere Nierenschädigung bedeuten. Dass diese durch eine identische Dosis der Zelltodinhhibitoren nicht im gleichen Maß abgeschwächt wird, stellt eine potentielle Erklärung dieser Ergebnisse dar.

Um diese Unterschiede auszugleichen und die Schädigung zu reduzieren, wurde die Ischämiezeit auf 30 bzw. 25 min reduziert, auch da eine intraoperative Reduzierung der Körpertemperatur eine komplexe Umstellung der Methode erfordert hätte. Der durch diese Titration gezeigte signifikante Erhalt der Nierenfunktion nach 24h Reperfusion um 0,4 mg/dl Kreatinin durch präemptive CDI-Applikation (Abb. 14) entsprach aber ebenfalls nicht den in der Literatur gezeigten Werten von ca. 1,5 mg/dl Kreatinin-Reduktion<sup>80</sup>. Auch die histologische Auswertung ergab keinen signifikant verbesserten Strukturerhalt durch CDI-Applikation (Abb. 15) Da in Anwendung dieser IRI-Methode eine weitere Reduktion der Ischämiezeit auf unter 20 min bilateral zu einer schnellen selbstständigen *restitutio ad integrum* der Nierenfunktion führt<sup>16,171</sup>, erschien das in unserer Arbeitsgruppe etablierte IRI-Modell somit untauglich zur genauen Wirkungsanalyse der Zelltodinhhibitoren. Da in verschiedenen Versuchsaufbauten keine ausreichende Wirkung der präemptiven Zelltodinhhibition nachgewiesen werden konnte, ist anzunehmen, dass diese nur unter sehr spezifischen Bedingungen wirksam ist. So berichteten auch Linkermann, *et al.* von einem sehr kleinen Zeitfenster von 15-30 Minuten vor Schädigung für die präemptive Applikation der Zelltodinhhibitoren um eine ausreichend große Wirkung zu erhalten.<sup>172</sup> Dadurch ist eine Effektivität dieser Therapie im klinischen Gebrauch mit sämtlichen damit einhergehenden Einflussfaktoren als sehr gering einzuschätzen. Aus diesen Gründen wurde der Versuch einer verzögerten Therapie des bilateralen Nierenversagens mit Zelltodinhhibitoren im IRI-Modell nicht weiterverfolgt.

Da die Inhibition der verschiedenen Arten des Zelltodes insgesamt nur eine geringe Auswirkung auf die akute Nierenschädigung gezeigt hatten, war der nächste Schritt, kombiniert sowohl Entzündung als auch Zelltod zu inhibieren. Bei den verschiedenen Arten des Zelltodes werden intrazelluläre Histone in den Extrazellularraum freigesetzt (Abb. 31 B).

Extrazelluläre Histone sind Mediatoren der Sepsis<sup>118</sup> und wesentlich an der Pathogenese verschiedener Organschädigungen beteiligt<sup>81,121,173,174</sup>. Die hauptsächlichen Mechanismen des Übergangs der Histone in den Extrazellulärraum sind dabei die verschiedenen Arten der regulierten Nekrose und die NETose. Im Extrazellulärraum induzieren sie einerseits aufgrund ihrer positiven Ladung Zytolyse, indem sie mit membrangebundenen Phospholipiden Poren formen, und ermöglichen einen Calcium-Ionen-Einstrom und damit eine Depolarisation der Zelle. Andererseits binden sie unspezifisch an DNA und RNA und wirken zudem über TLR2- und TLR4-Aktivierung als DAMPs.<sup>95,103,104,118</sup> Da diese vielfältigen Funktionen extrazelluläre Histone zu zentralen Mediatoren der Nekroinflammation machen, ist deren Neutralisation durch einen Histon-spezifischen Antikörper ein potenter Ansatzpunkt um diese Feedback-Schleife zu durchbrechen. Ein bisher nicht beachteter, aber für die Untersuchung der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen relevanter Aspekt ihrer Wirkungsweise ist der potentielle Effekt auf die Proliferationskapazität von Zellen nach Schädigung. Die pathophysiologische Überlegung ist hierbei, dass im Konzept der Nekroinflammation nach initial starkem Zellschaden durch Ischämie-Reperfusion mit entsprechend großer Ausschüttung extrazellulärer Histone, Stunden und Tage nach der eigentlichen Organschädigung durch den Zelltod-Entzündungs-Kreislauf kontinuierlich deutlich geringere Mengen Histone freigesetzt werden, die dann auf die renalen Zellen wirken. *In vitro* wirken Histone auf verschiedene renale Zelllinien dosisabhängig zytotoxisch, so konnten Kumar, *et al.* und Allam, *et al.* ab einer Histon-Konzentration von 50 µg/ml eine Reduktion der Zellzahl um mindestens 50 % abhängig von der Zellart zeigen. Dieser Effekt war durch Präinkubation der Histone mit anti-Histon-Antikörper jeweils rückgängig.<sup>111,121</sup> Folglich wurde die Auswirkung auf die Proliferationskapazität durch den in 3.3 beschriebenen Versuchsaufbau untersucht, in dem HK-2 Zellen zuerst durch 1 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorgeschädigt wurden, um IRI zu simulieren, und dann zu den nach Schädigung proliferierenden Zellen Histone in niedriger Konzentration (0,01-1 µg/ml) hinzugegeben wurden. Diese Konzentrationen, die deutlich niedriger als in anderen Publikationen<sup>111,121</sup> (10-100 µg/ml) waren, ergaben sich aus oben genannter Annahme, zudem überwiegt bei hohen Konzentrationen an Histonen die direkte Zytotoxizität. Hierfür konnte 48 h nach Schädigung eine deutlich verringerte reaktive Proliferation der mit Histonen inkubierten HK-2 Zellen um 50 % gezeigt werden, dieser Effekt wurde durch zusätzliche Inkubation mit anti-Histon IgG wieder aufgehoben (Abb. 16). Die Regulation des Zellzyklus ist bei der

Proliferation und Regeneration von Zellen von großer Wichtigkeit. Die G2/M-Phase hat hierbei die Funktion der Inhibierung der Mitose, Zellen in der G2/M-Phase können sich also nicht mehr teilen. Außerdem neigen Gewebe mit einem erhöhten Anteil an Zellen in der G2/M-Phase zu einer stärkeren Fibrosierung<sup>159</sup>. So zeigten Liu, *et al.*, dass HK-2-Zellen 48h nach Hypoxie-induzierter Schädigung sowohl einen erhöhten Anteil an Zellen in der G2/M-Phase, als auch eine stark erhöhte Expression profibrotischer Gene wie TGF- $\beta$  aufweisen.<sup>175</sup> Die Analyse des Zellzyklus der HK-2 Zellen wurde mit Hilfe von Propidium-Jodid-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt<sup>176</sup> und ergab in Gruppen, die mit Histonen inkubiert wurden, einen Anstieg der Zellen in G2/M-Phase, beides reversibel durch anti-Histon IgG (Abb. 17). Zusätzlich konnte nach 24 h eine Hochregulierung des zentralen Fibrose-Mediators TGF- $\beta$  durch extrazelluläre Histone beobachtet werden (Abb. 18). Die Stimulation mit niedrig dosierten Histonen bewirkte somit sowohl eine verminderte Proliferation, als auch eine erhöhte Fraktion von Zellen in der G2/M-Phase und eine vermehrte Expression des Fibrosemarkers TGF- $\beta$ . Diese Ergebnisse sind also indikativ dafür, dass selbst niedrige Konzentrationen von extrazellulären Histonen zumindest in der Zellkultur Auswirkungen auf die Zellproliferation und die reaktive Fibrosierung haben. Da in der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen im Konzept der Nekroinflammation von kontinuierlichem Absterben einer immer geringer werdenden Anzahl renaler Zellen ausgegangen wird, bei der kontinuierlich Histone freigesetzt werden, geben diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass sich eine Neutralisierung extrazellulärer Histone selbst nach stattgehabter Nierenschädigung noch positiv auf das funktionelle und strukturelle Langzeitoutcome auswirken könnte. Allerdings muss hier auf methodische Schwierigkeiten bei Ermittlung der Zellzahl hingewiesen werden, da ein Well nicht jeweils auf ein Bild aufgenommen werden konnte und auch die Zellen nicht komplett normalverteilt wuchsen. Dies wurde aber versucht, durch möglichst gleichmäßiges Säen der Zellen und dreimalige Wiederholung des Experiments auszugleichen. Auch bei der FACS- und RNA-Analyse wich die Zahl der Zellen je Well innerhalb einer Gruppe ab, was zu Auswirkungen auf den Anteil der jeweiligen Zellen oder die Quantität der RNA geführt haben könnte. Dies wurde ebenfalls versucht durch vorsichtige Behandlung der Zellen und dreimaliges Wiederholung des Experiments auszugleichen. Natürlich muss auch aufgrund der künstlichen Bedingungen und der erheblich reduzierten Komplexität die eingeschränkte Übertragbarkeit von Ergebnissen der Zellkultur auf Tierversuche bedacht werden.

Die Neutralisierung extrazellulärer Histone hat sich schon in mehreren murinen Krankheitsmodellen wie Sepsis<sup>118</sup>, Anti-GBM-Glomerulonephritis<sup>111</sup> oder renaler IRI<sup>82,121</sup> als erfolgreich erwiesen. So zeigten Nakazawa, *et al.* 24 h nach 35-minütigem, bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden eine Reduktion des Serum-Kreatinins, eine Verbesserung des *tubular injury scores*, eine verringerte NET-Formierung und einen verringerten Anteil an TUNEL-positiven Zellen.<sup>82</sup> Allam, *et al.* konnten 24 h nach 30-minütiger, bilateraler IRI eine Reduktion der Expression proentzündlicher Gene und der Infiltration von Neutrophilen nachweisen.<sup>121</sup> Da Vorexperimente zeigten, dass extrazelluläre Histone, zusätzlich zu den bereits bekannten Pathomechanismen, in niedriger Konzentration auch einen Einfluss auf Proliferation und reaktiver Fibrose nach Schädigung haben, war der nächste Schritt, den Einfluss extrazellulärer Histone auf die Progression des akuten zum chronischen Nierenversagen zu bestimmen. Hierfür bot es sich an, die Neutralisierung extrazellulärer Histone zunächst nach 24 h, zur Evaluierung des initialen Schadens und protektiven Effekts, und anschließend in der Langzeitprognose nach 35 Tagen zu untersuchen. Aufgrund der größten Spezifität gegenüber den zytotoxischen Histon-Untereinheiten H2 und H4 wurde das nach dem Protokoll von Monestier, *et al.* hergestellte anti-Histon IgG verwendet<sup>128</sup>, auch da sich bei den anderen in der Literatur dafür verwendeten Substanzen wie Heparin oder aktiviertem Protein C<sup>103</sup> bei der IRI-Operation oftmals letale Blutungen einstellten oder diese unspezifischer verschiedene Histone binden. Nachdem präemptive i.p. Applikation des Antikörpers vor bilateraler IRI nach 24 h einerseits eine Depletion im Blut zirkulierender Histone, andererseits eine verstärkte Deposition von IgG in der Niere bewirkte (Abb. 19), konnte davon ausgegangen werden, dass die bei Ischämie-Reperfusionsschaden in der Niere freigesetzten Histone durch anti-Histon IgG effektiv neutralisiert werden. Im Einklang mit der Arbeit von Allam, *et al.*<sup>121</sup> wurden dadurch ebenfalls im Kurzeitergebnis die Expression der Nierenschädigungsmarker und in der histologischen Analyse der tubuläre Schaden und die Neutrophileninfiltration reduziert (Abb. 21), jedoch konnte kein Effekt auf die Nierenfunktionsparameter Serum-Kreatinin und BUN gezeigt werden (Abb. 20). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass sich die Zytotoxizität und proentzündliche Wirkung der extrazellulären Histone erst entfaltet, wenn diese aus den absterbenden Zellen freigesetzt werden (Abb. 31 B). Da dies geschieht, nachdem ein Großteil der Zellen bereits abgestorben ist, wirkt sich die Zytotoxizität der nun freigewordenen Histone zeitverzögert auf eine kleinere Fraktion der vitalen Tubuluszellen aus: Eine Histon-Neutralisierung greift also in den

Teufelskreis von Zelltod und Entzündung erst ein, wenn schon ein Großteil des primären Schadens passiert ist und kann deswegen den initialen Nierenfunktionsverlust nach IRI nicht abmildern. Dass aber die Plasmaspiegel und die Expression der Entzündungsmarker IL-6 und TNF $\alpha$  verringert wurden, kann als Indiz dafür gedeutet werden, dass die einsetzende Eindämmung der Entzündung im Gegenzug einen verbesserten Erhalt der Nierenfunktion und -morphologie in der Langzeitprognose bewirken könnte. Da die Untersuchung der Nierenfunktion anhand der beiden Parameter Serum-Kreatinin und BUN auch die Problematiken des verzögerten Anstiegs des Kreatinins und BUN nach Schädigung und der Messungenauigkeiten aufgrund der auf enzymatischen Reaktionen basierten Messmethoden borgt, bot sich die Rationale der sensitiveren Messung der murinen Nierenfunktion in Kurz- und Langzeitprognose anhand der GFR (beschrieben in Methode 2.3.5). Hierfür war es nötig, vom Modell der bilateralen zur unilateralen IRI zu wechseln, da klinisch relevante bilaterale IRI bei C57BL/6N-Mäusen mit einer erhöhten postoperativen Mortalität einhergeht und die Mäuse nach der hier verwendeten Methode vermutlich nicht länger als 3 Tage überleben würden. Andererseits werden die Mäuse dabei unter so viel systemischen Stress gesetzt, dass die Stress-induzierende Methode der GFR-Messung nicht durchgeführt werden kann. Auch ist die unilaterale IRI das bevorzugte Modell, um das Fortschreiten vom akuten zum chronischen Nierenversagen zu untersuchen, da hier mit geringer Mortalität postoperativer Mortalität konstant Nierenfunktionsverlust, sterile Entzündung und renale Fibrose erzeugt werden kann.<sup>16,108,139,177,178</sup> Da eine Untersuchung dieser Progredienz aber lange, aufwändige und letztendlich auch teure Experimente von 5 Wochen Dauer mit multiplen Stress-induzierenden GFR-Messungen verlangt, war es nötig im Vorfeld die potenteste Intervention im akuten Nierenversagen, also im Outcome nach 24 h, zu ermitteln und diese dann im Anschluss in der Langzeitprognose zu testen.

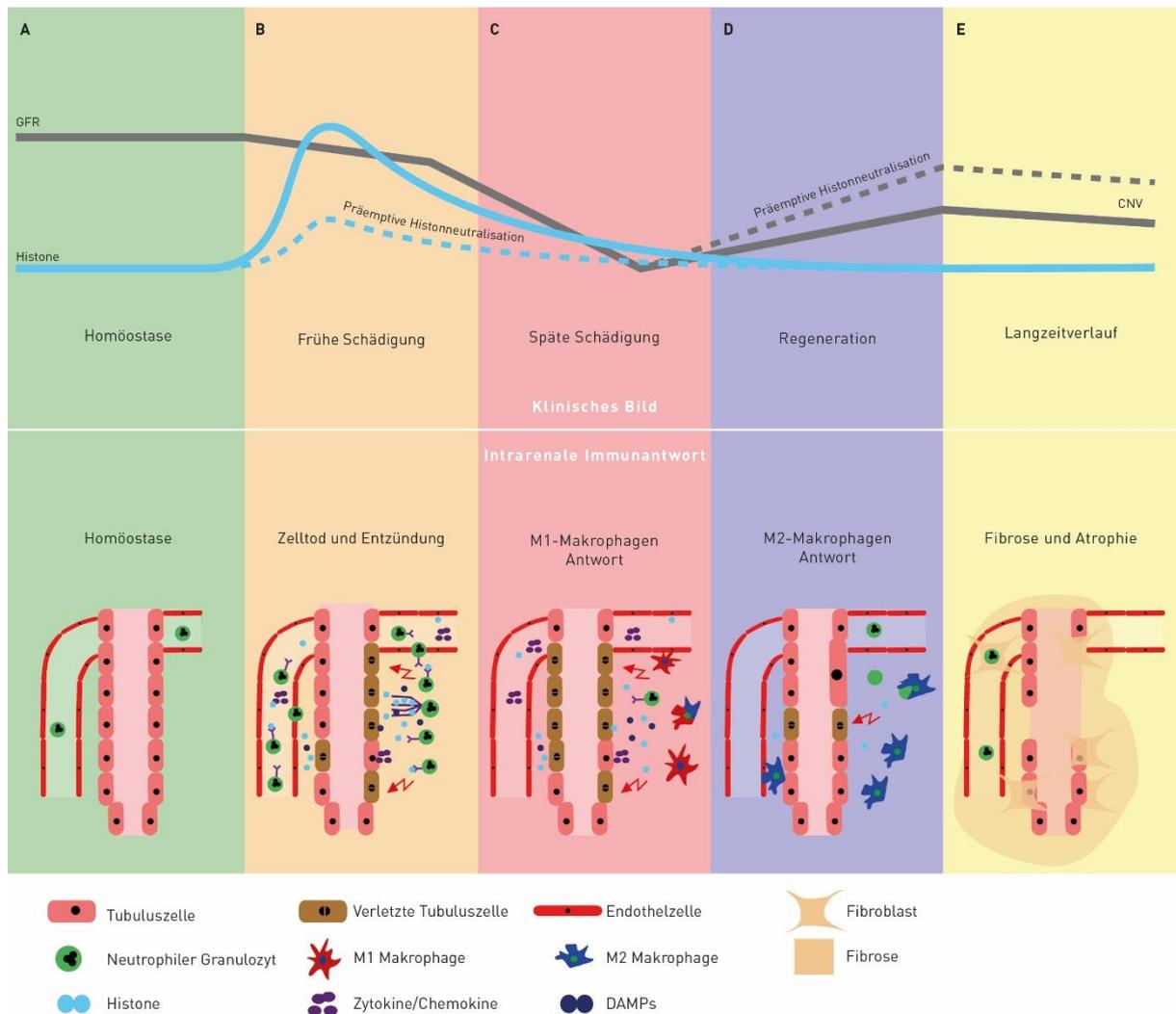
Folglich wurde in dem unter 3.5. aufgeführten Experiment der protektive Effekt der präemptiven Applikation von anti-Histon IgG oder Zelltodinhibitoren im Modell des unilateralen Ischämie-Reperfusionsschaden nach 24h untersucht und anschließend die Potenz beider Interventionen in sämtlichen Experimenten verglichen. In beiden Gruppen ergab sich im Vergleich zur Kontroll-Gruppe keine Verbesserung der GFR (Abb. 22), keine Verringerung der RNA-Expression von Nierenschädigungs- und Entzündungsparametern und eine lediglich trendweise Verringerung der Infiltration von Entzündungszellen, nur der

tubuläre Schaden konnte durch den anti-Histon-Antikörper signifikant reduziert werden. Diese Ergebnisse stellen im Vergleich zur Anwendung bei bilateraler IRI eine verringerte Effektivität beider Substanzen dar, die jedoch für die Zelltodinhibitoren stärker ausfällt. Hierbei muss bedacht werden, dass die Pathophysiologie der unilateralen IRI aufgrund der kompensatorischen Hyperfiltration der kontralateralen Niere noch nicht in allen Einzelheiten verstanden ist<sup>51,179</sup> und die Messung der globalen Nierenfunktion durch die hier angewandte Methode nur die im technischen Rahmen bestmögliche Annäherung an die Funktion der ischämischen Niere darstellt. Des Weiteren ist bei unilateraler Ischämie-Reperfusion der Schaden im Vergleich zur bilateralen IRI sowohl für die Nierenfunktion, als auch für daraus resultierende systemische Auswirkungen des akuten Nierenversagens deutlich geringer.<sup>16</sup> Zelltodinhibitoren haben ihr potentiell wirkoptimales Wirkungsspektrum eher im starken bis sehr starken akuten Nierenversagen, da hierbei wesentlich mehr Zelltod stattfindet, wie sich einerseits anhand ihrer beschriebenen Wirksamkeit im fast letalen Bereich von 40-50 min bilateraler IRI<sup>77</sup>, andererseits an ihrer abnehmenden Effektivität bei 25 und 30 min (3.2) im Vergleich zu 35 min (3.1) argumentieren lässt. Die geringe Wirksamkeit der Histonneutralisation bei unilateraler IRI lässt sich pathophysiologisch dadurch erklären, dass diese ihre Wirkung erst nach dem initialen Absterben der Tubuluszellen und Freisetzung von Histonen entfaltet und somit durch die Halbierung der Schädigung und somit der Histonfreisetzung, im Vergleich zur bilateralen IRI einen initial noch geringeren Einfluss auf Nierenfunktion, -struktur und sterile Entzündung hat. Die Zusammenschau der bisherigen Experimente und die deutlichere Reduktion der Entzündung und Expression von Nierenschädigungsmarkern (Abb. 20) und des histologischen Outcomes (Abb. 21, 22) durch anti-Histon-IgG für die hier angewandte IRI-Methode<sup>162</sup>, als auch die in der Zellkultur gezeigten potentiellen Effekte von niedrig dosierten extrazellulären Histonen auf reaktive Proliferation und Fibrose nach Schädigung, gaben letztendlich den Ausschlag dafür, die Effekte einer Neutralisation extrazellulärer Histone im Langzeitoutcome untersuchen. In diesem Modell konnten Zager, *et al.* und Le Clef, *et al.* 3 bzw. 6 Wochen nach unilateraler IRI eine tubuläre Atrophie, Ischämie-bedingte Fibrosierung und vermehrte Expression von proinflammatorischen wie profibrotischen Genen, vereinbar mit einem chronischem Nierenversagen, zeigen.<sup>177,178</sup> Um diese Entwicklung eines chronischen Nierenversagens nach unilateraler IRI zu verringern, erhielten die Mäuse entweder präemptiv, 3 h oder 6 h nach unilateraler IRI eine anti-Histon IgG i.p. Injektion (500 µg/25 g KG). Somit konnte zum einen das therapeutische Zeitfenster, zum

anderen der Zeitpunkt des größten Einflusses der Histone zum Fortschreiten zum chronischen Nierenversagen gewonnen werden. In der Gruppe mit präemptiver Histonneutralisation zeigte der zeitliche Verlauf der GFR, jeweils im Verhältnis zur GFR der sham-Gruppe, eine zunehmende Verbesserung der Nierenfunktion auf 80 % der gesunden GFR an Tag 35, während die der Kontroll-Gruppe von 70 % an Tag 1 auf 55 % an Tag 35 abfiel, was sich auch in reduzierter Atrophie, Fibrose und Expression profibrotischer Gene widerspiegelte. Die um 3 h verzögerte Applikation des anti-Histon-Antikörpers zeigte eine nur trendweise Verbesserung der GFR, der Fibrose und der profibrotischen Genexpression, während bei der 6 h verzögerten Applikation kein Unterschied zur Kontrollgruppe feststellbar war (Abb. 25,26,27). Der hiermit gezeigte protektive Effekt der präemptiven im Vergleich zur verzögerten Histon-Neutralisation im Langzeitoutcome wirft nun einige Fragen auf: Wie lässt sich der große Unterschied der Effekte bei nur 3 h bzw. 6 h späterer Applikation des Antikörpers erklären, wo doch 6h nach IRI als Zeitpunkt der größten Immunzellinfiltration und somit Entzündung charakterisiert wurde? Wieso zeigt die präemptive Histon-Neutralisation nur eine geringe bzw. gar keine Abmilderung des akuten Nierenversagens, dafür einen starken Effekt auf Funktion und Struktur in der Langzeitprognose?

Mögliche Erklärungen ergeben sich beim Blick auf die Mechanismen des Ischämie-Reperfusionsschadens in der Niere und die Freisetzung der Histone in den Extrazellulärraum. Während Ischämie und Reperfusion sterben renale Tubuluszellen größtenteils im Sauerstoffsensiblen S3-Segment durch die verschiedenen Arten der regulierten Nekrose ab<sup>43,45,47</sup> und setzen dabei sehr schnell eine große Menge Histone frei, die dann ihre zytotoxischen und proentzündlichen Wirkungen entfalten und dabei weitere Zellen zum Absterben bringen und eine Entzündungsreaktion initiieren (Abb. 31 B).<sup>76,79</sup> Da hierbei weniger Zellen nekrotisch werden als durch den initialen Ischämie-Reperfusionsschaden, schwächt sich der "Teufelskreis" aus Zelltod, Entzündung und Histonfreisetzung ab (Abb. 31 C). Durch die präemptive Applikation von anti-Histon IgG können die durch den initialen Ischämie-Reperfusionsschaden freigesetzten Histone sofort neutralisiert werden und somit der größte Anteil des durch extrazelluläre Histone verursachten Schadens verhindert werden (Abb. 31 B, D, E). Eine 3 h oder 6 h verzögerte Histon-Neutralisation geschieht also zu spät, um den größten Anteil des Histon-verursachten Schadens und Entzündung zu reduzieren. Die aus

weiterhin absterbenden Tubuluszellen freigesetzten Histone werden durch verzögerte Intervention aber neutralisiert, so dass sich hierdurch der trendweise Effekt der 3 h- und 6 h-post IRI Gruppen erklären lässt. Dies bedeutet, dass der therapeutisch relevante Anteil des Histon-induzierten Schadens größtenteils innerhalb der ersten 3 h nach IRI stattfindet. Da sich die präemptive Histon-Neutralisation im Kurzzeitverlauf aber nicht positiv auf die Nierenfunktion auswirkt, muss angenommen werden, dass der in der Langzeitprognose funktionserhaltende und antifibrotische Effekt hauptsächlich durch eine Verringerung der Entzündung vermittelt wird. Hierfür sprechen auch die verminderte Expression proentzündlicher Proteine und reduzierte Infiltration neutrophiler Granulozyten nach 24 h. Die Ergebnisse der Zellkultur-Experimente könnten hier auch Ansätze zur Erklärung der reduzierten Fibrose sein, da im zeitlichen Verlauf nur eine sehr geringe Menge Histone freigesetzt wird, die ebenfalls einen Einfluss auf die Fibrosierung haben könnten. Somit stellt sich die Neutralisation extrazellulärer Histone als potente Intervention dar, um nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden die Progression zum chronischen Nierenversagen abzumildern. Überträgt man diese Ergebnisse auf klinische Situationen ergeben sich allerdings folgende Probleme: Da nur die präemptive Applikation von anti-Histon-IgG effektiv war, müsste man Patienten präventiv schon vor einer akuten Nierenschädigung behandeln. Dies ist aber fast ausschließlich bei operativen Eingriffen wie Nierentransplantation, partieller Nephrektomie mit Abklemmen der Nierenarterie oder herzchirurgischen Operationen möglich. Klinisch stellt sich eine Therapie der ANS aber, wie eingangs erwähnt, aufgrund der Diagnose über zeitlich verzögerte und multipel beeinflussbare Funktionsparameter, einer meistens nicht besonders ausgeprägten Symptomatik und einem mangelnden klinischen Bewusstsein für dieses Krankheitsbild als schwierig dar.<sup>34,36,37</sup> Da man somit klinisch oftmals die eigentliche Nierenschädigung und somit den Zeitpunkt für eine präemptive Intervention verpasst und experimentell bisher kein Hinweis auf Wirksamkeit einer verzögerten Therapie von renalem Zelltod und Entzündung gezeigt wurde, besteht die Rationale entsprechend der Phasen der akuten Nierenschädigung durch Unterstützung der Regeneration eine Abmilderung der Progression zu erreichen.



**Abbildung 31: Auswirkung extrazellulärer Histone auf die Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen**

Der untere Teil der Grafik zeigt den Ablauf der intrarenalen Immunantwort nach ATN, wie bereits in Abbildung 7 beschrieben. Der obere Teil der Grafik stellt die zeitliche Dynamik extrazellulärer Histone und deren Einfluss auf die Nierenfunktion nach ATN dar. Nach anfänglicher Homöostase (A) werden durch den initialen Zelltod und Inflammation eine große Menge Histone freigesetzt, die sofort zytotoxisch und proinflammatorisch wirken, dies beginnt die Nierenfunktion zu reduzieren (B). Kontinuierlich stattfindende Nekroinflammation führt zu weiterer Histonefreisetzung, durch die wiederum Nekrose und Inflammation initiiert wird. In zeitlicher Verzögerung erreicht die GFR ihren Tiefpunkt (C). Durch die Resolution der sterilen Entzündungsreaktion werden Nekroinflammation und Histonefreisetzung weiter reduziert und schließlich terminiert. Parallel dazu beginnt die Nierenfunktion sich zu erholen (D). Die lange Zeit andauernde Nekroinflammation und Kontakt mit niedrig konzentrierten Histonen führt zu Defektheilung, Fibrose und zu einer Progression in ein chronisches Nierenversagen (E). Als einzige erfolgreich getestete therapeutische Intervention zeigte die präemptive Histoneutralisation mithilfe des BWA3-Antikörpers eine Reduzierung der extrazellulären Histone und eine Verbesserung der Nierenfunktion im Langzeitoutcome, da durch die Abmilderung des initialen Histon-vermittelten Schadens die nachfolgende Nekroinflammation verringert werden konnte. Modifiziert nach *Kundert et al.*<sup>43</sup>

Die Regenerationsfähigkeit der Niere ist erst in Teilen verstanden. Die Fähigkeit, nach akuten Schädigungsereignissen eine schnelle und meistens komplette Wiederherstellung der Funktion zu erreichen, ist am ehesten durch eine reaktive Hyperfiltration der Restnephronen

zu erklären und nicht generell durch strukturelle Regeneration,<sup>52</sup> hierfür spricht unter anderem die erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine Progredienz in chronisches Nierenversagen.<sup>5,6</sup> Da Säugetiere, im Gegensatz zu Amphibien, keine neuen Nephrone bilden können, ist ihre renale Regenerationskapazität von der Regenerationsfähigkeit der übriggebliebenen Nephrone abhängig.<sup>48,180</sup> Hierbei ist noch nicht abschließend geklärt, ob diese Regeneration durch zelluläre Plastizität, also die Fähigkeit sämtlicher Tubuluszellen zu Dedifferenzierung, Proliferation und Redifferenzierung zur Wiederherstellung eines geschädigten Nephrons, oder nur durch eine kleine Population tubulärer Progenitorzellen, die nach Schädigung proliferieren und differenzieren, abhängt.<sup>149,181,182</sup> Aufgrund neuer Ergebnisse ist von Letzterem auszugehen, so konnten Lazzeri, *et al.* mithilfe von lineage-tracing nachweisen, dass nach akuter Nierenschädigung eine geringe Anzahl tubulärer Progenitorzellen überlebt, expandiert und ganze Nephrone ersetzt, und auch die reaktive Hyperfiltration konnte durch eine Hypertrophie der übrigen Tubuluszellen durch sogenannte Endozyklen, mehrfache unvollständige Zellzyklen, erklärt werden.<sup>52</sup> Ferner wurde durch die kontinuierliche Applikation der Wirkstoffe Trichostatin-A (TSA) oder 4-Phenylbutyrat (4-PBA) eine Verbesserung der funktionellen und strukturellen Regeneration erzielt. Beide Substanzen sind Histon-Deacetylase-Inhibitoren, die noch nicht genau bekannte epigenetische Modifikationen verursachen und dadurch renale Regeneration verstärken. De Groh, *et al.* konnten zeigen, dass 4-PBA und TSA die renale Progenitorzell-Population bei Zebrafischen vergrößern.<sup>153</sup> Eine kontinuierliche Applikation von 4-PBA nach Ischämie-Reperfusionsschaden oder toxischer Nephropathie beschleunigte bei Mäusen und Zebrafischen die funktionelle Wiederherstellung, tubuläre Zellproliferation und reduzierte die tubuläre Atrophie und Fibrose durch Reduzierung der Anzahl von Zellen in der G2/M-Phase.<sup>168</sup> Auch eine kontinuierliche Applikation von TSA zeigte eine verbesserte Funktion, Reduzierung der Fibrose und eine größere Anzahl vitaler Tubuluszellen nach IRI, hierbei wirkt TSA ausschließlich auf Pax2+ Zellen.<sup>52,154</sup> Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde der Effekt einer kontinuierlichen TSA-Therapie nach dem Protokoll von Lazzeri, *et al.* durchgeführt, jedoch konnten keine signifikanten funktionellen und strukturellen Verbesserungen durch die Stimulation der Regeneration erfasst werden (Abb. 28,29,30), trendweise konnte jedoch die Fibrosierung reduziert werden. Die Unterschiede in den Ergebnissen könnten durch Variationen in der Methodik erklärt werden: Die in dieser Arbeit verwendete Ischämiezeit von 35 Minuten, zu der ein protektiver Effekt der Histonneutralisation gezeigt werden

konnte, ist 5-9 Minuten länger als von Lazzeri, *et al.* oder Consentino, *et al.*, hierbei zeigten die Histon-Deacetylase-Inhibitoren jeweils einen milden protektiven Effekt auf Nierenfunktion und -struktur.<sup>52,168</sup> Zudem war bei der hier verwendeten IRI-Methode nach Marschner, *et al.*<sup>162</sup> die murine Körpertemperatur intraoperativ zwischen 36,5-38,5 °C reguliert, in den anderen Publikationen zwischen 36-37 °C, was zu einer stärkeren Inflammation und gemäß dem Konzept der Nekroinflammation auch zu einem größeren Schaden führt. So ist es möglich, dass der durch diese zwei Variablen beeinflusste Schaden zu hoch war, um durch den milden protektiven Effekt des TSA signifikant verbessert zu werden, sodass sich nur eine trendweise Reduzierung der Fibrose, nicht aber eine funktionelle Regeneration zeigte. Dies weist aber auch darauf hin, dass der protektive Effekt der Stimulation der parenchymatösen Regeneration nur unter sehr speziellen Bedingungen erzielt werden kann, die im klinischen Alltag durch das sehr breite Spektrum an Patienten und möglichen Ursachen einer akuten Nierenschädigung nicht häufig gegeben sind.

Insgesamt müssen bei der vorliegenden Arbeit diverse Limitationen berücksichtigt werden, denn die meisten Erkenntnisse wurden durch *in vivo* Experimente an der Maus gewonnen. Diese Art von Experimenten ist zu einem integralen Bestandteil der translationalen Forschung in Feldern wie Immunologie und Nephrologie geworden, doch trotz großer Erfolge ist die Übertragbarkeit der experimentellen Erkenntnisse in die Klinik oft schwierig.<sup>183</sup> Die Schwierigkeiten beginnen damit, dass die Maus, das zur Zeit am Häufigsten verwendete Tiersurrogat für den menschlichen Organismus, sich fundamental von diesem unterscheidet. So weist das murine Genom laut der *Mouse Genome Database* der Jackson-Labore eine nur ca. 25%ige Homologie zum humanen Genom auf.<sup>184</sup> Folglich unterscheidet sich auch das murine Immunsystem deutlich vom humanen, was sich z.B. in unterschiedlichen Immunzellverhältnissen, Immunzellendifferenzierungsmuster, Rezeptorexpressionsmuster, oder Immunglobulin-, Chemokin- und Cytokinsynthese niederschlägt.<sup>185</sup> Erschwert werden die Differenzen beider Immunsysteme zudem dadurch, dass Mäuse ihr Leben lang in möglichst sterilen und gleichförmigen Umweltbedingungen untergebracht sind, was der Situation des menschlichen Immunsystems ebenfalls nicht entspricht und zu Veränderungen in der Immunantwort führen kann.<sup>186</sup> Generell unterscheiden sich Maus und Mensch in Körpergröße, -gewicht, Reproduktion, Grundumsatz, Lebensdauer, Ernährung, Physiologie,

Nierenfunktion etc. grundlegend. Die für translationale Forschung verwendeten Mäuse stammen zudem alle von einem Vorfahren ab, wurden durch Inzucht gezüchtet und unterscheiden sich somit nur durch Spontanmutationen voneinander.<sup>187</sup> Dass in den vorliegenden Experimenten ausschließlich gleichgeschlechtliche, gleichaltrige Mäuse verwendet wurden, schmälert außerdem deren Aussagekraft, da man in klinischer Forschung niemals von einem einzelnen, epidemiologisch nicht repräsentativen Kollektiv auf eine Pathophysiologie einer heterogenen Population schließen würde.<sup>187</sup> Dies schlägt sich unter anderem darin nieder, dass letztendlich nur ca. 4% der in Mausexperimenten erfolgreich getesteten Interventionen Eingang in klinischen Gebrauch finden.<sup>188</sup> Durch *in vivo* Mausexperimente gewonnene Erkenntnisse sind also nur in seltenen Fällen komplett auf die menschliche Biologie übertragbar, stellen aber dennoch im Rahmen des ethisch und finanziell Vertretbaren die beste Annäherung an diese dar. Die vorgelegte Arbeit ist von sämtlichen erwähnten Problematiken betroffen, dementsprechend vorsichtig sollte eine Einordnung der beschriebenen Pathophysiologie und resultierenden Therapie in den humanen Kontext erfolgen.

Auch bei der Untersuchung des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens muss immer bedacht werden, dass die hier betrachtete Art der Nierenschädigung unter artifiziellen Bedingungen stattfindet, die wohl nur bei Nierentransplantationen oder partiellen Nephrektomien mit Abklemmen der Nierengefäße ähnlich sind. Die eingangs erwähnten, im klinischen Alltag üblichen Ursachen einer akuten Tubulusnekrose unterscheiden sich in ihrer Pathogenese teilweise deutlich vom Ischämie-Reperfusionsschaden.<sup>46,189</sup> Es würde sich also anbieten, den Effekt der Neutralisation extrazellulärer Histone im Langzeitoutcome verschiedener Modelle des akuten Nierenversagens zu untersuchen, die folgenden bieten sich hierfür aus verschiedenen Gesichtspunkten an: Die Rhabdomyolyse-induzierte ANS ist einerseits ein etabliertes Modell der Progression zum chronischen Nierenversagen<sup>190</sup>, andererseits wurde hierfür bereits ein protektiver Effekt für antiinflammatorische Therapieansätze gezeigt.<sup>191</sup> In der murinen anti-GBM-Glomerulonephritis zeigte die präemptive Histoneutralisation bereits eine Wirksamkeit 7 Tage nach Schädigung.<sup>103</sup> Die toxische Nephropathie ist aufgrund ihrer Prävalenz und multiplen Auslöser ein klinisch sehr relevantes Krankheitsbild. Zusätzlich bietet sie auch die Möglichkeit einer präemptiven Therapie vor ANS bei zum Beispiel einer Chemotherapie mit Cisplatin. Die Cisplatin-

induzierte Nephropathie stellt dabei auch sowohl mit hoch dosierten Einmal-Injektionen, als auch mit klinisch relevanteren mehrmaligen niedrig-dosierten Injektionen ein etabliertes Modell der Progression vom akuten zum chronischen Nierenversagen dar.<sup>16,192</sup>

In dieser Arbeit wurde die Neutralisation der extrazellulären Histone ausschließlich durch anti-Histon IgG erreicht, jedoch sind hierfür auch andere Substanzen wie Heparin oder aktiviertes Protein C verwendet worden.<sup>103,118</sup> Die Verwendung des in der Zellkultur und in anderen Tiermodellen sehr potenten Neutralisators Heparin ist im Modell des operativen Ischämie-Reperfusionsschadens allerdings mit der Schwierigkeit verbunden, dass dadurch bei der Maus größtenteils letale Blutungen verursacht wurden. Zur Analyse der Wirkung von Heparin bei IRI könnte jedoch das von Wildhagen, *et al.* beschriebene nicht-antikoagulierende Heparin verwendet werden<sup>193</sup>. Aktiviertes Protein C degradiert als Serumprotease extrazelluläre Histone, konnte jedoch in einem systematischen Review von 5 randomisierten klinischen Studien keinen protektiven Effekt bei schwer septischen Patienten zeigen.<sup>194</sup> Rekombinantes aPC hatte jedoch einen positiven Effekt in einem murinen Modell des Schlaganfalls<sup>195</sup> und der anti-GBM-Glomerulonephritis.<sup>103</sup> Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt liegt potentiell im Freisetzungsmechanismus der Histone nach extrazellulär. Aufgrund der starken Histon-Freisetzung während der NETose, zeigte die NETose-Inhibition durch einen PAD-Inhibitor eine Reduktion der Histonfreisetzung und des darauffolgenden Schadens im Modell der bilateralen IRI.<sup>82</sup> Hierfür würde sich ebenfalls eine Therapie des Langzeitoutcomes nach IRI anbieten.

Ferner ist bisher nichts über die Eliminationskinetik des anti-Histon IgG in der Maus bekannt. Die hier verwendete Therapieform der einmaligen Applikation beruhte auf klinischen Erfahrungswerten bei der Verwendung monoklonaler Antikörper wie Rituximab<sup>196</sup>, die nach einmaliger Gabe über Monate einen therapeutischen Plasmaspiegel halten. Da die Messung der anti-Histon IgG Plasmaspiegel technisch nicht möglich war, die Plasmaspiegel der extrazellulären Histone 24 h nach IRI durch den Antikörper depletiert wurden und auch die Herstellung ausreichender Mengen anti-Histon IgG mit großem finanziellem und zeitlichem Aufwand verbunden war, wurde in der vorliegenden Arbeit davon abgesehen, eine kontinuierliche Therapie mit diesem Antikörper nach IRI zu versuchen. Dies würde aber aufgrund der Ergebnisse ebenfalls einen interessanten Ansatz für nachfolgende Experimente bieten.

Die Konzentration extrazellulär zirkulierender Histone korreliert mit der Mortalität von Sepsis-Patienten<sup>197</sup> und der Entwicklung eines Multiorganversagens nach akuten kritischen Erkrankungen.<sup>198</sup> Eine sowohl initiale, als auch kontinuierliche Messung extrazellulärer Histone bei Patienten mit akuter Nierenschädigung könnte somit ebenfalls einen interessanten Einblick in deren pathophysiologische Relevanz beim Menschen und möglichen Zusammenhängen mit der Entwicklung anderer Erkrankungen bringen.

Überträgt man nun die experimentellen Erkenntnisse auf die klinische Situation, ergeben sich verschiedene Implikationen. Für operative Situationen mit renalem Ischämie-Reperfusionsschaden, wie Nierentransplantationen oder partielle Nephrektomien, würden sich präemptive Therapien zur Histonneutralisation anbieten. Da Pharmakokinetik, -dynamik, Wirkungsweise und Nebeneffekte des anti-Histon IgG im Menschen zu diesem Zeitpunkt nach dem Kenntnisstand des Autors noch nicht untersucht sind, müsste dies entweder mithilfe klinischer Studien erörtert oder die Therapie durch bereits für humane Anwendung zugelassene Medikamente wie Heparin oder aPC durchgeführt werden. Der bereits etablierte Gebrauch monoklonaler Antikörper wie Rituximab<sup>196</sup>, Infliximab usw. in der Klinik weist allerdings darauf hin, dass eine klinische Anwendung des anti-Histon IgG prinzipiell möglich wäre.

## 5 Zusammenfassung

Die Progression vom akuten zum chronischen Nierenversagen stellt wegen der überschätzten renalen Regenerationsfähigkeit ein unterschätztes klinisches Problem dar. Auf molekularer Ebene lässt sich dieses Phänomen mithilfe des Konzepts der Nekroinflammation erklären. Eine besondere Rolle spielen hierbei Histone, die, in den Extrazellularraum freigesetzt, sowohl eine ausgeprägte Zytotoxizität als auch proentzündliche Effekte zeigen. Verschiedene Arbeitsgruppen und eigene Vorarbeiten konnten bereits nachweisen, dass extrazelluläre Histone akute Schädigungen von unter anderem Niere, Lunge und Gehirn verursachen und exazerbieren. Des Weiteren zeigte eine Inhibition von Zelltod einen protektiven Effekt in Modellen der akuten Nieren- und Leberschädigung. In dieser Doktorarbeit untersuchten wir die Abschwächung der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen durch Inhibierung des renalen Zelltodes, Neutralisierung extrazellulärer Histone und Stimulierung der renalen Regeneration. Dies wurde mithilfe eines Tiermodells des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI) mit wahlweise uni- oder bilateraler Abklemmung der Nierengefäße und Reperusionszeiten von 24 Stunden oder 35 Tagen untersucht. Die Inhibition des Zelltods erfolgte präemptiv und bis zu 12 Stunden verzögert durch Necrostatin1, Ferrostatin1 und Cyclosporin A, die Neutralisierung der Histone erfolgte präemptiv und bis zu 6 Stunden verzögert durch einen spezifischen Antikörper aus einem BWA3-Klon und die Stimulierung der Regeneration erfolgte über kontinuierliche Injektionen von Trichostatin A.

Die präemptive Inhibition des Zelltodes zeigte bei bilateraler IRI von 35 Minuten einen lediglich trendweisen protektiven Effekt auf die Nierenfunktionsparameter Kreatinin und BUN, sowie histologisch eine leichte Reduktion der strukturellen Schädigung und Neutrophileninfiltration. Die verzögerte Applikation der Zelltodinhhibitoren wies keinen protektiven Effekt auf. Bei Reduzierung der Ischämiezeit der bilateralen IRI auf 30 bzw. 25 Minuten verbesserte die präemptive Zelltodinhhibition die Nierenfunktion signifikant, jedoch konnten Immunzellinfiltration und Nekrose nicht verringert werden. Bei unilateraler IRI zeigten die Zelltodinhhibitoren keinen protektiven Effekt auf Nierenfunktion und –struktur.

Die Zytotoxizität und proentzündliche Wirkung von Histonen ist vielfach belegt. *In vitro* wurde zudem der Einfluss niedrig konzentrierter Histone auf die Proliferationskapazität von HK2-Zellen nach Schädigung untersucht. Hierbei zeigte sich, dass nach Schädigung der Zellen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die zusätzliche Inkubation mit niedrigen Dosen Histone die reaktive Proliferation verminderte und zu einem vermehrten Anteil an Zellen in der G2/M-Phase und erhöhter Expression von TGF-β führte. Sämtliche Effekte wurden durch Koinkubation mit anti-Histon IgG abgemildert. Diese Ergebnisse

deuteten auf eine potentielle Rolle extrazellulärer Histone in der Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen hin.

Im Modell der bilateralen IRI führte die präemptive Gabe von anti-Histon IgG nach 24 Stunden zu einer Depletion von Histonen im Plasma und zu vermehrter IgG-Deposition in der Niere im Vergleich zu Kontroll-IgG. Die Nierenfunktion konnte nicht verbessert werden, die Expression und Plasmaspiegel von TNF $\alpha$  und IL6 und histologisch die Nekrose und Neutrophileninfiltration konnten jedoch verringert werden. Bei unilateraler IRI konnten diese Effekte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Neutralisation extrazellulärer Histone bewirkt in der akuten Phase also hauptsächlich eine Reduktion der sterilen Entzündung.

Der Einfluss extrazellulärer Histone auf die Progression zeigte sich 35 Tage nach unilateraler IRI. Hierbei führte die präemptive Histonneutralisation zu einer verbesserten Nierenfunktion, reduzierten renalen Fibrose, verminderten Expression profibrotischer Gene und reduzierten Immunzellinfiltration. Interessanterweise erzielte die 3 und 6 Stunden verzögerte Applikation des anti-Histon IgG bereits keinen signifikanten protektiven Effekt mehr. Eine Neutralisation der initialen Histon-vermittelten Nekroinflammation führt also zu einer verbesserten funktionellen und strukturellen Regeneration im Langzeit-Outcome.

Die Stimulation renaler Regeneration wurde ebenfalls durch kontinuierliche Applikation von Trichostatin A nach unilateraler IRI untersucht. Nach 35 Tagen konnte keine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion und Reduktion der Expression proentzündlicher Gene oder Fibrose erzielt werden.

Insgesamt konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass die präemptive Neutralisation extrazellulärer Histone die Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen abmildert, die Reduktion der Entzündung in der akuten Phase untermauert hierbei die Rolle der Histone im Konzept der Nekroinflammation. Der ausschließlich präemptive Therapieerfolg deutet auf ein Maximum des Histon-vermittelten Schadens innerhalb von weniger als 3 Stunden hin. Die antiproliferative Wirkung extrazellulärer Histone *in vitro* liefert einen weiteren Erklärungsansatz für die reduzierte Progression. Die hier gezeigten Effekte der Neutralisation extrazellulärer Histone stellen einen vielversprechenden Ansatz für die Prävention der Progression der akuten Nierenschädigung dar.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Voller Name
aHis IgG	anti-Histon Immunglobulin G
AKI	<i>acute kidney injury</i> , Akute Nierenschädigung
ANS	Akute Nierenschädigung
aPC	aktiviertes Protein C
ATN	Akute Tubulusnekrose
ATP	Adenosin-Triphosphat
$\alpha$ SMA	$\alpha$ Smooth Muscle Actin
BUN	<i>blood urea nitrogen</i> , Plasma-Harnstoff
Ca	Calcium
CCL2	CC-Motiv-Chemokin-Ligand 2
CDI	<i>cell death inhibitors</i> , Zelltodinhhibitoren
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNS
CNV	Chronisches Nierenversagen
CKD	<i>chronic kidney disease</i> , Chronisches Nierenversagen
CypD	Cyclophyllin D
CysA	Cyclosporin A
DAMPs	<i>danger associated molecular patterns</i> , Gefahren-assozierte molekulare Strukturen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ET	<i>extracellular traps</i> , Extrazelluläre Fallen
FBS	Fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinthioisocyanat

GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPX-4	Glutathionperoxidase-4
HMGB1	High-Mobility-Group-Protein 1
hpf	high power fields
HPV	Humane Papilloma Viren
HRP	<i>horseraddish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRI	<i>ischemia-reperfusion injury</i> , Ischämie-Reperfusionsschaden
i.v.	intravenös
KDIGO	Kidney Disease Improving Global Outcomes
kd	<i>kinase-dead</i> , funktionsunfähige Kinase
KIM-1	<i>kidney injury molecule 1</i>
ko	knock-out
LPS	Lipopolysaccharide
MLKL	<i>mixed lineage kinase domain-like pseudokinase</i>
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MPT-RN	<i>mitochondrial permeability transition - induced</i> Regulierte Nekrose
MTT	[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid]
NGAL	Neutrophilengelatinase
Nec 1	Necrostatin 1
NET	<i>neutrophil extracellular traps</i> , Neutrophile extrazelluläre Fallen
NLRP3	NOD-like Rezeptor Protein 3
OD	Optische Dichte
PAS	<i>periodic acid Schiff</i> , Periodsäure-Schiff-Reaktion
PAD	Peptidylarginin-Deiminase
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen
PBA	4-Phenylbutyrat
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid
POMP	<i>permeability of outer mitochondrial membrane pores</i> Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran
PRR	<i>pattern recognition receptors</i> Mustererkennungsrezeptoren
PTC	Primäre Tubulusepithelzellen
qRT-PCR	quantitative Echtzeit- Polymerase-Kettenreaktion
RAGE	<i>receptor for advanced glycation endproducts</i>
RIPK1/3	<i>receptor interacting protein kinase 1/3</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Oxygen Spezies
rpm	Runden pro Minute
s.c.	subkutan
SEM	Standard Error of the Mean
SNGFR	<i>single nephron GFR</i> , Einzelnephron-GFR
STEMI	<i>ST-elevated myocardial infarction</i> , ST-Hebungsinfarkt
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TLR	Toll-like Rezeptoren
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNFα	Tumornekrose-Faktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
UV	ultraviolett

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Aufbau der Niere .....	1
<b>Abbildung 2 :</b> Einteilung der akuten Nierenschädigung nach KDIGO-Kriterien .....	3
<b>Abbildung 3:</b> Verlauf der Nierenfunktionsparameter GFR und Kreatinin bei Akuter Tubulusnekrose .....	7
<b>Abbildung 4:</b> Übersicht über die bisher bekannten Signaltransduktionswege des regulierten Zelltodes mit einem spezifischem Element der jeweiligen Signalkaskade. ....	12
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der Nekroinflammation .....	17
<b>Abbildung 6:</b> Aufbau eines Nukleosoms und Histonoktamers .....	19
<b>Abbildung 7:</b> Molekularer Ablauf einer akuten Tubulusnekrose und darauffolgender steriler Entzündungsreaktion .....	23
<b>Abbildung 8:</b> Aufbau des Operationstisches für IRI-Operation .....	38
<b>Abbildung 9:</b> Ablauf der IRI-Operation .....	39
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung einer typischen Absorptionskurve einer 7 Wochen alten und gesunden männlichen C57BL/6N Maus .....	42
<b>Abbildung 11:</b> Zellviabilitätsassay (MTT) zur Überprüfung der anti-Histon IgG-Bindungskapazität und Wirkung .....	49
<b>Abbildung 12:</b> Verzögerte Applikation von Zelltodinhhibitoren ohne Effekt auf Nierenfunktions-parameter nach bilateraler IRI .....	55
<b>Abbildung 13:</b> Histologische Evaluation des Effekts der Zelltodinhhibitoren nach bilateraler IRI .....	58
<b>Abbildung 14:</b> Titration der Ischämiezeit zur Differenzierung des Effekts der Zelltodinhhibitoren .....	59
<b>Abbildung 15:</b> Histologische Evaluation der Titration der Ischämiezeit .....	62
<b>Abbildung 16:</b> Zeitlicher Verlauf der Zellzahl von HK-2 Zellen nach Stimulation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Histonen und anti-Histon IgG durch Calcein-Färbung .....	65
<b>Abbildung 17:</b> Zellzyklus-Analyse von HK-2 Zellen im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Histonen .....	67
<b>Abbildung 18:</b> Expression von TGFβ durch HK-2 Zellen im zeitlichen Verlauf nach Stimulation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Histonen .....	68
<b>Abbildung 19:</b> Depletion extrazellulärer Histone durch anti-Histon IgG nach bilateraler IRI .....	69
<b>Abbildung 20:</b> Einfluss der Applikation von anti-Histon IgG auf Nierenfunktions- und Entzündungsparameter nach bilateraler IRI .....	71
<b>Abbildung 21:</b> Histologischer Effekt der Applikation von anti-Histon IgG nach bilateraler IRI .....	73
<b>Abbildung 22:</b> Einfluss der Applikation von anti-Histon IgG und Zelltodinhhibitoren auf GFR 24h nach unilateraler IRI .....	75
<b>Abbildung 23:</b> Auswirkung der Applikation von anti-Histon IgG und Zelltodinhhibitoren auf Expression verschiedener Gene 24h nach unilateraler IRI .....	76
<b>Abbildung 24:</b> Histologische Evaluation der Applikation von anti-Histon IgG und Zelltodinhhibitoren 24h nach unilateraler IRI .....	79
<b>Abbildung 25:</b> Effekte präemptiver und verzögerter Applikation von anti-Histon IgG 5 Wochen nach unilateraler IRI .....	81
<b>Abbildung 26:</b> Reduktion der Expression von pro-inflammatorischen/-fibrotischen Genen nach Applikation von anti-Histon IgG .....	82
<b>Abbildung 27:</b> Einfluss von präemptiver und verzögerter Applikation von anti-Histon IgG auf Nierenfibrose- und atrophie 5 Wochen nach unilateraler IRI .....	86
<b>Abbildung 28:</b> Effekte kontinuierlicher Applikation von TSA auf GFR 5 Wochen nach IRI .....	88
<b>Abbildung 29:</b> Kontinuierliche Applikation von TSA ohne Reduktion der Expression von Nieren-schädigungsmarkern .....	89
<b>Abbildung 30:</b> Effekte kontinuierlicher Applikation von TSA auf Nierenfibrose und -atrophie 5 Wochen nach IRI .....	92
<b>Abbildung 31:</b> Auswirkung extrazellulärer Histone auf die Progression von akutem zu chronischem Nierenversagen .....	91

## 8 Literaturverzeichnis

1. Marschner JA. Die Rolle von Pentraxin 3 bei entzündlichen Nierenerkrankungen. 2019.
2. Zimanyi MA, Hoy WE, Douglas-denton RN, Hughson MD, Holden LM, Bertram JF. Nephron number and individual glomerular volumes in male Caucasian and African American subjects. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;2428-2433. doi:10.1093/ndt/gfp116
3. Zhuo JL. Proximal Nephron. *Compr Physiol*. 2014;3(3):1079-1123. doi:10.1002/cphy.c110061.Proximal
4. Maunsbach AB. Observations on the Segmentation of the Proximal Tubule in the Rat Kidney ~ Comparison of Results from Phase Contrast , Fluorescence and. *J Ultrastruct Res*. 1966;258.
5. Lameire NH, Bagga A, Cruz D, et al. Acute kidney injury: An increasing global concern. *Lancet*. 2013;382(9887):170-179. doi:10.1016/S0140-6736(13)60647-9
6. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, et al. World incidence of AKI: A meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(9):1482-1493. doi:10.2215/CJN.00710113
7. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(5):1569-1574. doi:10.1093/ndt/gfn009
8. Ostermann M, Chang RWS. Acute kidney injury in the intensive care unit according to RIFLE\*. *Crit Care Med*. 2007;35(8):1837-1843. doi:10.1097/01.CCM.0000277041.13090.0A
9. Hoste EAJ, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*. 2015;41(8):1411-1423. doi:10.1007/s00134-015-3934-7
10. Libório AB, Leite TT, De Oliveira Neves FM, Teles F, De Melo Bezerra CT. AKI complications in critically ill patients: Association with mortality rates and RRT. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(1):21-28. doi:10.2215/CJN.04750514
11. Kellum J a, Lameire N, Aspelin P, et al. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl*. 2012;2(1):1-138. doi:10.1038/kisup.2012.7
12. Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron - Clin Pract*. 2012;120(4):179-184. doi:10.1159/000339789
13. Bastin AJ, Ostermann M, Slack AJ, Diller GP, Finney SJ, Evans TW. Acute kidney injury after cardiac surgery according to Risk/Injury/Failure/Loss/End-stage, Acute Kidney Injury Network, and Kidney Disease: Improving Global Outcomes classifications. *J Crit Care*. 2013;28(4):389-396. doi:10.1016/j.jcrc.2012.12.008
14. Thiele RH, Isbell JM, Rosner MH. AKI associated with cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(3):500-514. doi:10.2215/CJN.07830814
15. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. 2012;380(9843):756-766. doi:10.1016/S0140-6736(11)61454-2
16. Fu Y, Tang C, Cai J, Chen G, Zhang D. Rodent models of AKI-CKD transition. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2018. doi:10.1152/ajprenal.00199.2018
17. de Caestecker M, Harris R. Translating Knowledge Into Therapy for Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol*. 2018;38(1):88-97. doi:10.1016/j.semnephrol.2017.09.008
18. Schmidt C, Steinke T, Moritz S, Graf BM, Bucher M. Akutes Nierenversagen und Sepsis: Nur eine Organdysfunktion bei septischem Multiorganversagen? *Anaesthesist*. 2010;59(8):682-699. doi:10.1007/s00101-010-1767-x

19. Romagnoli S, Clark WR, Ricci Z, Ronco C. Renal replacement therapy for AKI: When? How much? When to stop? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2017;31(3):371-385. doi:10.1016/j.bpa.2017.10.001
20. Chen H, Busse LW. Novel Therapies for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Reports*. 2017;2(5):785-799. doi:10.1016/j.ekir.2017.06.020
21. Kher V, Srisawat N, Noiri E, et al. Prevention and Therapy of Acute Kidney Injury in the Developing World. *Kidney Int Reports*. 2017;2(4):544-558. doi:10.1016/j.ekir.2017.03.015
22. Schmidt J, Beutel G, Kielstein J. Diagnostik und Pathophysiologie der akuten Nierenschädigung / des akuten Nierenversagens – Prävention möglich? *DMW - Dtsch Medizinische Wochenschrift*. 2015;140(04):245-249. doi:10.1055/s-0041-100518
23. Burger A, Bellomo R, Chapman M, Finfer S, Hickling K, Myburgh J. Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: A placebo-controlled randomised trial. *Lancet*. 2000;356:2139-2143. doi:10.1016/S0140-6736(00)03495-4
24. Nigwekar SU, Waikar SS. Diuretics in acute kidney injury. *Semin Nephrol*. 2011;31(6):523-534. doi:10.1016/j.semnephrol.2011.09.007
25. Kidney international supplements. Chapter 1 : Definition and classification of CKD. *Kidney Int*. 2013:19-62. doi:10.1038/kisup.2012.64
26. M. Girndt. Diagnostik und Therapie der chronischen Nierenerkrankung. *Internist*. 2017:243-256. doi:10.1007/s00108-017-0195-2
27. Titze S, Schmid M, Köttgen A, et al. Disease burden and risk profile in referred patients with moderate chronic kidney disease : composition of the German Chronic Kidney Disease ( GCKD ) cohort. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;(September 2014):441-451. doi:10.1093/ndt/gfu294
28. Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: A systematic review and meta-analysis. *Kidney Int*. 2012;81(5):442-448. doi:10.1038/ki.2011.379
29. Tonelli M, Wiebe N, Cullerton B, et al. Chronic Kidney Disease and Mortality Risk : A Systematic Review. *J Am Soc Nephrol*. 2004:2034-2047. doi:10.1681/ASN.2005101085
30. Mcculloch CE, Ph D, Hsu C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med*. 2004:1296-1305.
31. Agrawal N, Pavlakis M. Caring for the patient with a failing allograft : challenges and opportunities. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019. doi:10.1097/MOT.0000000000000655
32. Cleemput I, Laet C De. Analysis of the costs of dialysis and the effects of an incentive mechanism for low-cost dialysis modalities. *Health Policy (New York)*. 2013;110(2-3):172-179. doi:10.1016/j.healthpol.2013.03.001
33. Zambrowski J. Cost of dialysis in France. *Nephrol Ther*. 2016:95-97. doi:10.1016/j.nephro.2016.02.002
34. Teo SH, Endre ZH. Biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2017;31(3):331-344. doi:10.1016/j.bpa.2017.10.003
35. Rewa O, Bagshaw SM. Acute kidney injury-epidemiology, outcomes and economics. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(4):193-207. doi:10.1038/nrneph.2013.282
36. Picken M, Long J, Williamson GA, Polichnowski AJ. Progression of Chronic Kidney Disease After Acute Kidney Injury: Novelty and Significance. *Hypertension*. 2016;68(4):921-928. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07749
37. Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease as Interconnected Syndromes. *N Engl J Med*. 2014;371(1):58-66. doi:10.1056/NEJMra1214243

38. Hartmann B, Czock D, Keller F. Drug Therapy in Patients With Chronic Renal Failure. *Dtsch Arztebl Int.* 2010;107(37). doi:10.3238/arztebl.2010.0647
39. Sanoff S, Okusa MD. Impact of acute kidney injury on chronic kidney disease and its progression. *Contrib Nephrol.* 2011;171(1):213-217. doi:10.1159/000327332
40. Venkatachalam MA, Weinberg JM, Kriz W, Bidani AK. Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(8):1765-1776. doi:10.1681/ASN.2015010006
41. Sawhney S, Marks A, Fluck N, Levin A, Prescott G, Black C. Intermediate and Long-term Outcomes of Survivors of Acute Kidney Injury Episodes: A Large Population-Based Cohort Study. *Am J Kidney Dis.* 2017;69(1):18-28. doi:10.1053/j.ajkd.2016.05.018
42. Chawla LS, Amdur RL, Amodeo S, Kimmel PL, Palant CE. The severity of acute kidney injury predicts progression to chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011;79(12):1361-1369. doi:10.1038/ki.2011.42
43. Kundert F, Platen L, Iwakura T, Zhao Z, Marschner JA, Anders H. Immune mechanisms in the different phases of acute tubular necrosis. *Kidney Res Clin Pract.* 2018;2018(3):185-196.
44. Rogers T, Bailey RF, Guo H, et al. Long-Term Consequences of Kidney Donation. *N Engl J Med.* 2009;459-469.
45. El-Achkar TM, Dagher PC. Tubular cross talk in acute kidney injury: a story of sense and sensibility. *Am J Physiol - Ren Physiol.* 2015;308(12):F1317-F1323. doi:10.1152/ajprenal.00030.2015
46. Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(4):189-200. doi:10.1038/nrneph.2011.16
47. Kalakeche R, Hato T, Rhodes G, et al. Endotoxin Uptake by S1 Proximal Tubular Segment Causes Oxidative Stress in the Downstream S2 Segment. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(8):1505-1516. doi:10.1681/ASN.2011020203
48. Davidson AJ. Uncharted waters : nephrogenesis and renal regeneration in fish and mammals. *Pediatr Nephrol.* 2011;1435-1443. doi:10.1007/s00467-011-1795-z
49. Forni LG, Darmon M, Ostermann M, et al. Renal recovery after acute kidney injury. *Intensive Care Med.* 2017;43(6):855-866. doi:10.1007/s00134-017-4809-x
50. Liu KD, Brakeman PR. Renal repair and recovery. *Crit Care Med.* 2008;36(4):187-192. doi:10.1097/CCM.0b013e318168ca4a
51. Helal I, Fick-brosnahan GM, Reed-gitomer B, Schrier RW. Glomerular hyperfiltration: mechanisms and clinical implications. *Nat Publ Gr.* 2012;8(5):293-300. doi:10.1038/nrneph.2012.19
52. Lazzeri E, Angelotti ML, Peired A, et al. Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nat Commun.* 2018;9(1):1-18. doi:10.1038/s41467-018-03753-4
53. Fattah H, Layton A, Vallon V. How do Kidneys Adapt to a Deficit or Loss in Nephron Number ? *Physiology.* 2019;(35):189-197. doi:10.1152/physiol.00052.2018
54. Carney EF. CKD risk factors are associated with increased single-nephron GFR. *Nat Publ Gr.* 2017;13(8):443. doi:10.1038/nrneph.2017.95
55. Hodgkins KS, Schnaper HW. Tubulointerstitial injury and the progression of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2012;27(6):901-909. doi:10.1007/s00467-011-1992-9
56. H. Azuma. Initial Ischemia/Reperfusion Injury Influences Late Functional and Structural Changes in the Kidney. *Transplant Proc.* 1997;1345(96).

57. Gamba G, Venkatachalam M a, Griffin K a, et al. Acute kidney injury : a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am J Physiol Ren Physiol*. 2010;(4894):1078-1094. doi:10.1152/ajprenal.00017.2010.
58. He L, Wei Q, Liu J, et al. AKI on CKD: heightened injury, suppressed repair, and the underlying mechanisms. *Kidney Int*. 2017;92(5):1071-1083. doi:10.1016/j.kint.2017.06.030
59. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449(October):819-826. doi:10.1038/nature06246
60. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):428-435. doi:10.1038/nature07201
61. Holers VM. Complement and Its Receptors : New Insights into Human Disease. *Annu Rev Immunol*. 2014. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120154
62. Amigorena S. Antigen presentation : from cell biology to physiology. *Immunol Rev*. 2016:5-7.
63. Masopust D, Schenkel JM. The integration of T cell migration, differentiation and function. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):309-320. doi:10.1038/nri3442
64. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells E I. *Nat Publ Gr*. 2015;15(3):160-171. doi:10.1038/nri3795
65. Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:772-782. doi:10.1038/nri1707
66. Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol*. 2009;11(1):21-27. doi:10.1038/ni.1817
67. Pandolfi F, Cianci R, Pagliari D, et al. The Immune Response to Tumors as a Tool toward Immunotherapy. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/894704
68. Bonavia A, Singbartl K. A review of the role of immune cells in acute kidney injury. *Pediatr Nephrol*. 2018:1629-1639. doi:10.1007/s00467-017-3774-5
69. Singbartl K, Formeck CL, Kellum JA. Kidney-Immune System Crosstalk in AKI. *Semin Nephrol*. 2019;39(1):96-106. doi:10.1016/j.semnephrol.2018.10.007
70. Matzinger P. Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994:991-1045.
71. Grace Y. Chen and Gabriel Nuñez. Sterile inflammation : sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2011;10(12):826-837. doi:10.1038/nri2873.Sterile
72. Matzinger P. The Danger Model : A Renewed Sense of Self. *Science (80- )*. 2002;296(April):301-306.
73. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME, Leggatt GR, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Front Immunol*. 2015;6(August):1-11. doi:10.3389/fimmu.2015.00422
74. Zhang quin, Hauser CJ. Circulating Mitochondrial DAMPs Cause Inflammatory Responses to Injury Qin. *Nature*. 2010;464(7285):104-107. doi:10.1038/nature08780.Circulating
75. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated Cell Death in AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(12):2689-2701. doi:10.1681/ASN.2014030262
76. von Mässenhausen A, Tonnus W, Linkermann A. Cell Death Pathways Drive Necroinflammation during Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2018:1-4. doi:10.1159/000490807
77. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, Zen F De. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(47):16836-16841.

doi:10.1073/pnas.1415518111

78. Anders H-J. Necroptosis in Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2018;3(2):1059. doi:10.1159/000489940
79. Mulay SR, Linkermann A, Anders H-J. Necroinflammation in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):27-39. doi:10.1681/ASN.2015040405
80. Linkermann A, Brasen JH, Darding M, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(29):12024-12029. doi:10.1073/pnas.1305538110
81. Wen Z, Liu Y, Li F, et al. Circulating histones exacerbate inflammation in mice with acute liver failure. *J Cell Biochem*. 2013;114(10):2384-2391. doi:10.1002/jcb.24588
82. Nakazawa D, Kumar S V., Marschner J, et al. Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(6):1753-1768. doi:10.1681/ASN.2016080925
83. Linkermann A, Stockwell BR, Krautwald S, Anders H. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. *Nat Rev Immunol*. 2014.
84. Wei Q, Dong G, Chen JK, Ramesh G, Dong Z. Bax and Bak have critical roles in ischemic acute kidney injury in global and proximal tubule-specific knockout mouse models. *Kidney Int*. 2013;84(1):138-148. doi:10.1038/ki.2013.68
85. Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, et al. Rip1 (Receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury. *Kidney Int*. 2012;81(8):751-761. doi:10.1038/ki.2011.450
86. Galluzzi L, Kepp O, Chan FK-M, Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2017;12(1):103-130. doi:10.1146/annurev-pathol-052016-100247
87. Von Mässenhausen A, Tonnus W, Himmerkus N, et al. Phenytoin inhibits necroptosis. *Cell Death Dis*. 2018;9(3). doi:10.1038/s41419-018-0394-3
88. Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: Process and function. *Cell Death Differ*. 2016;23(3):369-379. doi:10.1038/cdd.2015.158
89. Proneth B, Conrad M. Ferroptosis and necroinflammation, a yet poorly explored link. *Cell Death Differ*. 2018. doi:10.1038/s41418-018-0173-9
90. Halestrap AP, Richardson AP. The mitochondrial permeability transition: A current perspective on its identity and role in ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:129-141. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.08.018
91. Izzo V, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol*. 2016;26(9):655-667. doi:10.1016/j.tcb.2016.04.006
92. Devalaraja-Narashimha K, Diener AM, Padanilam BJ. Cyclophilin D gene ablation protects mice from ischemic renal injury. *Am J Physiol Physiol*. 2009;297(3):F749-F759. doi:10.1152/ajprenal.00239.2009
93. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359(5):473-481. doi:10.1056/NEJMoa071142
94. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (80- )*. 2004;303(March):1532-1536.
95. Nakazawa D, Marschner JA, Platen L, Anders H. Extracellular traps in kidney disease. *Kidney Int*. 2018;94(6):1087-1098. doi:10.1016/j.kint.2018.08.035

96. Gupta S, Kaplan MJ. The role of neutrophils and NETosis in autoimmune and renal diseases. *Nat Publ Gr.* 2016;12(7):402-413. doi:10.1038/nrneph.2016.71
97. Desai J, Mulay SR, Nakazawa D. Matters of life and death . How neutrophils die or survive along NET release and is “ NETosis ” 5 necroptosis ? *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11):2211-2219. doi:10.1007/s00018-016-2195-0
98. Yipp BG, Kubes P. Review Article NETosis : how vital is it ? *Blood.* 2013;122(16):2784-2795. doi:10.1182/blood-2013-04-457671.In
99. Morshed M, Hlushchuk R, Simon D, et al. NADPH Oxidase – Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. *J Immunol.* 2014. doi:10.4049/jimmunol.1303418
100. Schorn C, Janko C, Latzko M, Chaurio R, Schett G, Herrmann M. Monosodium urate crystals induce extracellular DNA traps in neutrophils , eosinophils , and basophils but not in mononuclear cells. *Front Immunol.* 2012;3(September):1-8. doi:10.3389/fimmu.2012.00277
101. Oda M, Kurosawa M, Yamamoto H, Domon H, Kimura T. Sulfated vizantin induces formation of macrophage extracellular traps. *Microbiol Immunol.* 2018;(September):310-316. doi:10.1111/1348-0421.12589
102. Okubo K, Kurosawa M, Kamiya M, et al. Macrophage extracellular trap formation promoted by platelet activation is a key mediator of rhabdomyolysis- induced acute kidney injury. *Nat Med.* 2018;24(2). doi:10.1038/nm.4462
103. Kumar SVR, Kulkarni OP, Mulay SR, et al. Neutrophil Extracellular Trap-Related Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe GN. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(10):2399-2413. doi:10.1681/ASN.2014070673
104. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D. The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis.* 2017;1-11. doi:10.1038/cddis.2017.52
105. Allam R, Santhosh V. Extracellular histones in tissue injury and inflammation. *J Mol Med.* 2014:465-472. doi:10.1007/s00109-014-1148-z
106. Shi S, Van der Laan LJW. Necroptotic Cell Death in Liver Transplantation and Underlying Diseases: Mechanisms and Clinical Perspective. *J Hepatol.* 2017. doi:10.1002/lt.25488
107. Yang F, Shang L, Wang S, Liu Y, Ren H, Zhu W. Research Article TNF  $\alpha$  -Mediated Necroptosis Aggravates Ischemia-Reperfusion Injury in the Fatty Liver by Regulating the Inflammatory Response. *Oxid Med Cell Longev.* 2019;2019. doi:10.1155/2019/2301903
108. Lech M, Römmele C, Uhl B, et al. Endogenous and exogenous pentraxin-3 limits postischemic acute and chronic kidney injury. *Kidney Int.* 2013:647-661. doi:10.1038/ki.2012.463
109. Kornberg RD. Chromatin Structure : A Repeating Unit of Histones and DNA Chromatin structure is based on a repeating unit of eight. *Science (80- ).* 184.
110. Campos EI, Reinberg D. Histones : Annotating Chromatin. *Annu Rev Genet.* 2009:559-601. doi:10.1146/annurev.genet.032608.103928
111. Ramaiah V, Kumar S. Extracellular Histones Cause Vascular Necrosis in Severe Glomerulonephritis Santhosh Kumar Vankayala Ramaiah. 2015.
112. Jenuwein T, Allis CD. Translating the Histone Code. *Science (80- ).* 2001;293(August):1074-1081.
113. Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14(11):1008-1016. doi:10.1038/nsmb1337
114. Felsenfeld G, Groudine M. Controlling the double helix. *Nature.* 2003;421(January):448-453.

doi:10.1038/nature01410

115. Helin K, Dhanak D. Chromatin proteins and modifications as drug targets. *Nature*. 2013. doi:10.1038/nature12751
116. Hirsch JG. Bactericidal action of Histone. *J Exp Med*. 1958:925-944.
117. Singh RK, Liang D, Gajjalaiahvari UR, Kabbaj MM, Paik J. Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. *Cell Cycle*. 2010;9(20):4236-4244. doi:10.4161/cc.9.20.13636
118. Xu J, Zhang X, Pelayo R, et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med*. 2009;15(11):1318-1322. doi:10.1038/nm.2053
119. Gamberucci A, Fulceri R, Marcolongo P, Pralong WF, Benedetti A. Histones and basic polypeptides activate Ca<sup>2+</sup>/cation influx in various cell types. *Biochem J*. 1998;630:623-630.
120. Chaput C, Zychlinsky A. Sepsis : the dark side of histones. *Nat Med*. 2009;15(11):1245-1246. doi:10.1038/nm1109-1245
121. Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, et al. Histones from Dying Renal Cells Aggravate Kidney Injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(8):1375-1388. doi:10.1681/ASN.2011111077
122. Pereira LF, Caturla FMMRBA, Bustos A, Concha EGDELA. Histones interact with anionic phospholipids with high avidity ; its relevance for the binding of histone-antihistone immune complexes. *Clinical Exp Immunol*. 1994:175-180.
123. Kleine TJ, Lewis PN, Lewis SA, Teri J, Lewis PN, Lewis SA. Histone-induced damage of a mammalian epithelium : the role of protein and membrane structure. *Am J Physiol*. 1997.
124. Xu J, Zhang X, Monestier M, Esmon NL, Esmon CT. Extracellular Histones Are Mediators of Death through TLR2 and TLR4 in Mouse Fatal Liver Injury. *J Immunol*. 2011:2-8. doi:10.4049/jimmunol.1003930
125. Huang H, Evankovich J, Yan W, et al. Endogenous Histones Function as Alarmins in Sterile Inflammatory Liver Injury Through Toll-like Receptor 9 in Mice. *Hepatology*.:999-1008. doi:10.1002/hep.24501
126. Allam R, Darisipudi MN, Tschopp J, Anders H. Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol*. 2013:3336-3342. doi:10.1002/eji.201243224
127. Marsman G, Zeerleder S, Luken BM. Extracellular histones , cell-free DNA , or nucleosomes : differences in immunostimulation. *Cell Death Dis*. 2016;7(12):e2518-9. doi:10.1038/cddis.2016.410
128. Monestier M, Fasy TM, Losman MJ, Novick KE, Muller S. Structure and binding properties of monoclonal antibodies to core histones from autoimmune mice. *Mol Immunol*. 1993;30(12):1069-1075. doi:10.1016/0161-5890(93)90153-3
129. Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion — from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011;17(11):1391-1401. doi:10.1038/nm.2507
130. Land WG, Agostinis P, Gasser S. Transplantation and Damage-Associated Molecular Patterns ( DAMPs ). *Am J Transplant*. 2016;(June):3338-3361. doi:10.1111/ajt.13963
131. Vallés PG, Lorenzo AG, Bocanegra V, Vallés R. Acute kidney injury : what part do toll-like receptors play ? *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014:241-251.
132. Weller S, Varrier M, Ostermann M. Lymphocyte Function in Human Acute Kidney Injury. *Nephron*. 2017:1-7. doi:10.1159/000478538
133. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med*. 2014:455-465. doi:10.1056/NEJMra1310050

134. Ysebaert DK, Greef KE De, Vercauteren SR, et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia / reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2000:1562-1574.
135. Swaminathan S, Griffin MD. First responders : understanding monocyte-lineage traffic in the acutely injured kidney. *Kidney Int*. 2008:1509-1511. doi:10.1038/ki.2008.555
136. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1 – M2 polarization balance. *Front Immunol*. 2014;5(November):1-9. doi:10.3389/fimmu.2014.00614
137. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and Macrophage Heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(December):953-964. doi:10.1038/nri1733
138. Günthner R, Anders H. Interferon-Regulatory Factors Determine Macrophage Phenotype Polarization. *Mediators Inflamm*. 2013;2013.
139. Lech M, Grobmayr R, Ryu M, et al. Macrophage Phenotype Controls Long-Term AKI Outcomes--Kidney Regeneration versus Atrophy. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(2):292-304. doi:10.1681/ASN.2013020152
140. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation : the beginning programs the end. *Nat Rev Immunol*. 2005;6(12):1191-1197. doi:10.1038/ni1276
141. Headland SE, Norling L V. The resolution of inflammation : Principles and challenges. *Semin Immunol*. 2015;27(3):149-160. doi:10.1016/j.smim.2015.03.014
142. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol*. 1997;61(April):375-380. doi:10.1002/jlb.61.4.375
143. Komada T, Chung H, Lau A, et al. Macrophage Uptake of Necrotic Cell DNA Activates the AIM2 Inflammasome to Regulate a Proinflammatory Phenotype in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2018:ASN.2017080863. doi:10.1681/ASN.2017080863
144. Kinsey GR. Macrophage Dynamics in AKI to CKD Progression. *J Am Soc Nephrol*. 2013:2013-2015. doi:10.1681/ASN.2013101110
145. Gordon S, Martinez FO. Review Alternative Activation of Macrophages : Mechanism and Functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007
146. Massot B, Michel M, Diem S, et al. TLR-Induced Cytokines Promote Effective Proinflammatory Natural Th17 Cell Responses. *J Immunol*. 2014. doi:10.4049/jimmunol.1302089
147. Kulkarni OP, Hartter I, Mulay SR, et al. Toll-Like Receptor 4 – Induced IL-22 Accelerates Kidney Regeneration. *J Am Soc Nephrol*. 2014:978-989. doi:10.1681/ASN.2013050528
148. Xu M, Feng D, Wang H, Guan Y, Yan X, Gao B. IL-22 Ameliorates Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Targeting Proximal Tubule Epithelium. *J Am Soc Nephrol*. 2014:967-977. doi:10.1681/ASN.2013060611
149. Lazzeri E, Angelotti ML, Conte C, Anders H, Romagnani P. Surviving Acute Organ Failure : Cell Polyploidization and Progenitor Proliferation. *Trends Mol Med*. 2019;25(5):366-381. doi:10.1016/j.molmed.2019.02.006
150. Sallustio F, Curci C, Stasi A, et al. Role of Toll-Like Receptors in Actuating Stem / Progenitor Cell Repair Mechanisms : Different Functions in Different Cells. *Stem Cells Int*. 2019;2019. doi:10.1155/2019/6795845
151. Hodeify R, Megyesi J, Tarcsafalvi A, Safirstein RL, Price PM. Protection of cisplatin cytotoxicity by an inactive cyclin-dependent kinase. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2010:112-120. doi:10.1152/ajprenal.00151.2010.
152. Dirocco DP, Bisi J, Roberts P, et al. CDK4 / 6 inhibition induces epithelial cell cycle arrest and ameliorates acute kidney injury. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2013. doi:10.1152/ajprenal.00475.2013

153. Groh ED De, Swanhart LM, Cosentino CC, et al. Inhibition of Histone Deacetylase Expands the Renal Progenitor Cell Population. *J Am Soc Nephrol*. 2010;794-802. doi:10.1681/ASN.2009080851
154. M. H. Levine, Z. Wang, T. R. Bhatti, Y. Wang, D. D. Aufhauser, S. McNeal, Y. Liu, S. Cheraghlou, R. Han, L. Wang and WWH. Class-Specific Histone/Protein Deacetylase Inhibition Protects Against Renal Ischemia Reperfusion Injury and Fibrosis Formation. *Am J Transplantation*. 2017;15(4):965-973. doi:10.1111/ajt.13106.Class-Specific
155. Liu BC, Tang TT, Lv LL, Lan HY. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2018;93(3):753-760. doi:10.1016/j.kint.2017.09.033
156. Humphreys BD. Mechanisms of Renal Fibrosis. *Annu Rev Pathol*. 2018.
157. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis : therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012;18(7):1028-1040. doi:10.1038/nm.2807
158. Meng X, Nikolic-paterson DJ, Lan HY. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nat Publ Gr*. 2016;12(6):325-338. doi:10.1038/nrneph.2016.48
159. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah J V., Bonventre J V. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med*. 2010;16(5):535-543. doi:10.1038/nm.2144
160. Kumar S. Cellular and molecular pathways of renal repair after acute kidney injury. *Kidney Int*. 2018;93(1):27-40. doi:10.1016/j.kint.2017.07.030
161. Ryan MJ, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int*. 1994;45(1):48-57. doi:10.1038/ki.1994.6
162. Marschner JA, Schäfer H, Holderied A, Anders HJ. Optimizing mouse surgery with online rectal temperature monitoring and preoperative heat supply. Effects on post-ischemic acute kidney injury. *PLoS One*. 2016;11(2):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0149489
163. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nat Protoc*. 2006;1(2):581-585. doi:10.1038/nprot.2006.83
164. Thomasova D, Anders H. Cell cycle control in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;(December 2014):1622-1630. doi:10.1093/ndt/gfu395
165. Moonen L, D'Haese P, Vervaet B. Epithelial Cell Cycle Behaviour in the Injured Kidney. *Int J Mol Sci*. 2018;19(7):2038. doi:10.3390/ijms19072038
166. Humphreys BD, Cantaluppi V, Portilla D, et al. Targeting Endogenous Repair Pathways after AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2015:1-9. doi:10.1681/ASN.2015030286
167. Grams ME, Chow EKH, Segev DL, Coresh J. Lifetime Incidence of CKD stages 3-5 in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2013;62(2):245-252. doi:10.1053/j.ajkd.2013.03.009
168. Cosentino CC, Skrypnyk NI, Brilli LL, et al. Histone Deacetylase Inhibitor Enhances Recovery after AKI. *J Am Soc Nephrol*. 2013:943-953. doi:10.1681/ASN.2012111055
169. Wallach D, Kang T, Kovalenko A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective David. *Nat Publ Gr*. 2013;(December). doi:10.1038/nri3561
170. Zhao G, Fu C, Wang L, Zhu L, Yan Y, Xiang Y. Down-regulation of nuclear HMGB1 reduces ischemia-induced HMGB1 translocation and release and protects against liver ischemia- reperfusion injury. *Nat Publ Gr*. 2017;(January):1-11. doi:10.1038/srep46272
171. Xiao L, Zhou D, Tan RJ, Fu H, Zhou L, Hou FF. Sustained Activation of Wnt / b -Catenin Signaling Drives

- AKI to CKD Progression. *J Am Soc Nephrol*. 2016;1727-1740. doi:10.1681/ASN.2015040449
172. Linkermann A, Tonnus W. The in vivo evidence for regulated necrosis The in vivo evidence for regulated necrosis. *Immunol Rev*. 2017;(May). doi:10.1111/imr.12551
  173. De Meyer SF, Suidan GL, Fuchs TA, Monestier M, Wagner DD. Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(8):1884-1891. doi:10.1161/ATVBAHA.112.250993
  174. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2661-2671. doi:10.1172/JCI61303.ALI
  175. Liu L, Zhang P, Bai M, et al. p 53 upregulated by HIF- 1  $\alpha$  promotes hypoxia- induced G 2 / M arrest and renal fibrosis in vitro and in vivo. *J Mol Cell Biol*. 2018;11:371-382.
  176. Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol*. 1975;66.
  177. Clef N Le, Verhulst A, Haese PCD, Vervaeke BA. Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. *PLoS One*. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0152153
  178. Zager RA, Johnson ACM, Becker K. Acute unilateral ischemic renal injury induces progressive renal inflammation , lipid accumulation , histone modification , and “ end-stage ” kidney disease. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2011. doi:10.1152/ajprenal.00431.2011.
  179. Saxena AB, Myers BD, Derby G, et al. Adaptive hyperfiltration in the aging kidney after contralateral nephrectomy. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2006;1590:629-634. doi:10.1152/ajprenal.00329.2005.
  180. Anders H. Immune system modulation of kidney regeneration — mechanisms and implications. *Nat Publ Gr*. 2014;10(6):347-358. doi:10.1038/nrneph.2014.68
  181. Chang-panesso M, Humphreys BD. Cellular plasticity in kidney injury and repair. *Nat Publ Gr*. 2016;13(1):39-46. doi:10.1038/nrneph.2016.169
  182. Kramann R, Kusaba T, Humphreys BD. Full Reviews Who regenerates the kidney tubule ? *Nephrol Dial Transplant*. 2015;(August 2014):903-910. doi:10.1093/ndt/gfu281
  183. Davis MM. A Prescription for Human Immunology. *Immunity*. 2010;29(6):835-838. doi:10.1016/j.immuni.2008.12.003.A
  184. Smith CL, Blake JA, Kadin JA, Richardson JE, Bult CJ. Mouse Genome Database ( MGD ) -2018 : knowledgebase for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(October 2017):836-842. doi:10.1093/nar/gkx1006
  185. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol*. 2019. doi:10.4049/jimmunol.172.5.2731
  186. Willyard C. Send in the germs. *Nature*. 2018.
  187. Herrath MG Von, Nepom GT. Lost in translation : barriers to implementing clinical immunotherapeutics for autoimmunity. *J Exp Med*. 2005;1159-1162. doi:10.1084/jem.20051224
  188. Pippin JJ. Animal Research in Medical Sciences : Seeking a Convergence of Science , Medicine , and Animal Law. *Hum Soc Inst Sci Policy Anim Stud Repos*. 2012.
  189. Ostermann M, Liu K. Pathophysiology of AKI. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2017;31(3):305-314. doi:10.1016/j.bpa.2017.09.001
  190. Soares TJ, Costa RS, Volpini RA, Silva CGADA, Coimbra TM. Long-term evolution of the acute tubular necrosis ( ATN ) induced by glycerol : role of myofibroblasts and macrophages. *Int J Exp Pathol*.

2002:165-172.

191. Reis NG, Della H, Francescat C, et al. Protective effect of calcitriol on rhabdomyolysis-induced acute kidney injury in rats. *Nature*. 2019;(April):1-10. doi:10.1038/s41598-019-43564-1
192. Sharp CN, Doll MA, Dupre T V, et al. Repeated administration of low-dose cisplatin in mice induces fibrosis. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2019:560-568. doi:10.1152/ajprenal.00512.2015
193. Wildhagen KCAA, De Frutos PG, Reutelingsperger CP, et al. Nonanticoagulant heparin prevents histone-mediated cytotoxicity in vitro and improves survival in sepsis. *Blood*. 2014;123(7):1098-1101. doi:10.1182/blood-2013-07-514984
194. Martı AJ. Human Recombinant Activated Protein C for Severe Sepsis Topical Anesthesia Alone Versus Topical Anesthesia with Intracameral Lidocaine for Phacoemulsification. *Anesthesia Analg*. 2007:346.
195. Griffin JH, Mosnier LO, Zlokovic B V, et al. Thrombotic Stroke: Neuroprotective Therapy by Recombinant Activated Protein C. *Artherosclerotic Thromb Vasc Biol*. 2017;36(11):2143-2151. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308038.Thrombotic
196. Cornec D, Kabat BF, Mills JR, et al. Pharmacokinetics of rituximab and clinical outcomes in patients with anti-neutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis. *Rheumatology*. 2018;(August):639-650. doi:10.1093/rheumatology/kex484
197. Wildhagen KCAA, Wiewel MA, Schultz MJ, et al. Extracellular histone H3 levels are inversely correlated with antithrombin levels and platelet counts and are associated with mortality in sepsis patients. *Thromb Res*. 2015;136(3):542-547. doi:10.1016/j.thromres.2015.06.035
198. Cheng Z, Abrams ST, Alhamdi Y, et al. Circulating Histones Are Major Mediators of Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Acute Critical Illnesses. *Crit Care Med*. 2019:1-8. doi:10.1097/CCM.0000000000003839

## 9 Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater und Mentor Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders, der mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mit seiner großen Erfahrung in die Wissenschaft eingeführt hat. Seinem großen wissenschaftlichen Eifer ist es zu verdanken, dass ich dieses interessante Thema nicht nur bearbeiten konnte, sondern auch die Ergebnisse auf nationalen und internationalen Foren präsentieren konnte.

Mein besonderer Dank gilt Julian Marschner und Daigo Nakazawa, die mich mit Engelsgeduld und großem Sachverständnis in die Methoden und Erfordernisse des wissenschaftlichen Arbeitens eingelernt haben und mich zu jedem Zeitpunkt sowohl fachlich unterstützt, als auch persönlich erheitert haben. Ebenfalls möchte ich mich bei Janina Mandelbaum, Dan Draganovici für die technische Unterstützung (Histologie) bedanken. Meinen Mitdoktoranden Johannes Bauernschmitt, Moritz Hernandez und Jakob Molnar und allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern des Labors danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Gudermann danke ich für Aufnahme und Förderung im „FöFoLe“-Programm.

Zuletzt gilt mein Dank natürlich meinen Freunden, meiner Schwester Lucia und meinen Eltern Gabriele und Stefan für die große Unterstützung und letzteren beiden auch für die konstante, stets freundliche Erinnerung diese Arbeit auch abzuschließen.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Einfluss extrazellulärer Histone von akutem zu chronischem Nierenversagen“**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttm ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Lukas Rath

München, den 24.10.2020

---

Lukas Stefan Adrian Rath

## **11 Übereinstimmungserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel

**„Einfluss extrazellulärer Histone von akutem zu chronischem Nierenversagen“**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Lukas Rath

München, den 11.11.2019

---

Lukas Stefan Adrian Rath