

Aus der pädiatrischen Nephrologie
Dr. von Haunersches Kinderspital der LMU München
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein



**Tyrphostin AG490 reduziert
Makrophageninfiltration, Apoptose und
interstitielle Fibrose in der neonatalen Niere
nach unilateraler Ureterligatur**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Teresa Génot
aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med Bärbel Lange-Sperandio

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Datum der mündlichen Prüfung: 22.12.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	V
1 Einleitung	6
1.1 Kongenitale obstruktive Uropathien.....	6
1.1.1 Diagnostik, Therapie und Prognose.....	7
1.1.2 Nephrogenese und Pathogenese obstruktiver Uropathien	9
1.2 Neonatales Tiermodell der obstruktiven Uropathie.....	11
1.3 Pathophysiologie der UUO	12
1.3.1 Inflammation	13
1.3.2 Programmierter Zelltod	15
1.3.3 Interstitielle Fibrose.....	16
1.4 Transkriptionsfaktor STAT3.....	19
1.4.1 Definition und Funktion.....	19
1.4.2 STAT3-Signaltransduktionsweg	20
1.5 Therapeutische Blockade von STAT3.....	21
1.5.1 Allgemeine Mechanismen.....	21
1.5.2 Tyrphostin AG490.....	22
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Versuchstiere.....	24
2.2 Mikrochirurgische Operationstechnik der UUO	24
2.3 Studienprotokoll.....	25
2.3.1 Tyrphostin AG490 - Behandlungsgruppe versus Kontrollgruppe.....	25
2.3.2 Applikation von Tyrphostin AG490.....	26
2.3.3 Organentnahme.....	27
2.4 Histomorphologische Methoden.....	27
2.4.1 Paraffineinbettung der Organe	27
2.4.2 Herstellung von Mikroschnitten.....	28
2.4.3 Immunhistochemische Färbung von Makrophagen	28
2.4.4 Immunhistochemische Färbung von Kollagen-I Fasern.....	29
2.4.5 Westernblots	30
2.5 Statistik.....	31
2.6 Reagenzien	32

3	Ergebnisse	33
3.1	Morphologie und Histologie	33
3.2	Effekte von Tyrphostin AG490 auf profibrotische Makrophagen in der neonatalen UUO-Niere	33
3.2.1	Tubuläre Galectin-3 Expression	35
3.2.2	Interstitielle Galectin-3 Expression	36
3.2.3	Glomeruläre Galectin-3 Expression	38
3.3	Effekte von Tyrphostin AG490 auf die Kollagen-I Ablagerung in der neonatalen UUO-Niere	39
3.4	Westernblots	42
3.4.1	Caspase-8 Aktivierung	42
3.4.2	PDGF-Rezeptor- β Expression	43
3.4.3	Galectin-3 Expression	44
4	Diskussion	45
4.1	Reduktion von profibrotischen Makrophagen durch Tyrphostin AG490	45
4.2	Reduktion der renalen Apoptose durch Tyrphostin AG490	48
4.3	Reduktion der interstitiellen Fibrose durch Tyrphostin AG490	51
4.4	Unerwünschte Effekte von Tyrphostin AG490	57
4.5	Zusammenschau der Effekte von Tyrphostin AG490	58
5	Ausblick	59
6	Literaturverzeichnis	61
7	Abbildungs-und Tabellenverzeichnis	78
8	Danksagung	81
9	Affidavit	82
10	Lebenslauf	83
11	Publikationsliste	84

Abkürzungsverzeichnis

AG490	Tyrphostin AG 490: JAK/STAT3- Inhibitor
Bcl	B-cell lymphoma protein
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large protein
Bmp-4	Bone morphogenetic protein-4
Bx471	Selektiver CCR1-Antagonist
CAKUT	Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract
CC	Chemokin
CCL	Chemokin-Ligand
c-Jun	Protoonkogen c-Jun
Cox	Cyclooxygenase
d	Tag
DAMP	damage associated molecular pattern
DAP-Kinase	Death associated protein-Kinase
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epithelial Growth Factor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition
FADD	Fas-associated Death Domain Protein
Fas	Fas-Rezeptor
G2/M	Zellzyklusphasen
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Gp 130	Glykoprotein 130
HIF	Hypoxie induzierter Faktor
HNF1 β	Hepatocyte Nuclear Factor 1 β
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IL	Interleukin
INF	Interferon
IO	Intact Opposite
IRF-1	Interferon regulatory factors
JAK	Tyrosinkinase Januskinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
KIM-1	Kidney Injury Molecule 1
MAPK/ERK	Mitogen-activated proteinkinase/ extracellular signal-regulated kinase
Mcl	Myeloid leukemia cell differentiation protein
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MLKL	Mixed-lineage kinase domain-like Pseudokinase
MMP	Matrixmetalloprotease
MMT	Makrophagen-Myofibroblasten-Transition
n	Gruppengröße
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
NGAL	Neutrophilen-Gelatinase-assoziiertes Lipocalin
p	Signifikanzwert
p53	Tumorsuppressorprotein
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PAX2	Paired-Box-Gen 2

Abkürzungsverzeichnis

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinosit-3-Kinase
PLC- γ	Phospholipase C- γ
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End products
RIPK	Receptor interacting protein kinase
SIS3	Specific Inhibitor of Smad 3
S3I-201	STAT3-Inhibitor S3I-201
Sham	Scheinoperierte Kontrolle
Smad	Smad-Proteine
Src	Tyrosinkinase src
STAT	Signal Transducer and Activator of Transkription
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling
TWIST	Transkriptionsfaktor
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Zusammenfassung

Angeborene obstruktive Uropathien stellen im Kindesalter eine Hauptursache für die Entwicklung einer chronisch terminalen Niereninsuffizienz dar. Sie führen in der Niere zu einer zytokinvermittelten Entzündungsreaktion, zum Verlust funktionsfähiger Nephrone und zur progredienten Entwicklung interstitieller Fibrose. Der Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-3 ist als Transkriptionsfaktor in proinflammatorische und profibrotische Prozesse involviert.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem JAK2/STAT3-Signalweg im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie. Hierfür wurde bei neonatalen Mäusen am zweiten Lebenstag eine unilaterale Ureterligatur (UUO) durchgeführt. Zur Blockade des JAK2/STAT3-Signalweges wurde vom 2. Lebenstag an täglich Tyrphostin AG490 s.c. appliziert. Am 3., 7., und 14. Lebenstag erfolgte die Entnahme der Nieren.

Nach neonataler UUO wandern Makrophagen ins Interstitium ein und fördern zusammen mit geschädigten Tubulusepithelzellen die tubulointerstitielle Inflammation in der Niere. Die Tubuli atrophieren infolge des mechanischen Druckes und der Hypoxie durch Apoptose und Nekrose. Aufbauend auf diese chronische tubulointerstitielle Inflammation kommt es durch Aktivierung von Myofibroblasten zur progressiven Entwicklung interstitieller Fibrose. Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie führen letztendlich zum irreversiblen Verlust funktionsfähiger Nephrone, welcher mit dem Funktionsverlust der Niere korreliert.

Für die vorliegende Arbeit wurden neonatale Nieren hinsichtlich der folgenden pathologischen Kernprozesse nach UUO immunhistochemisch bzw. mittels Westernblot untersucht: Makrophageninfiltration, Apoptose und Kollagen-I-Ablagerungen.

Es konnte gezeigt werden, dass die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 im Interstitium der neonatalen Niere die Expression von Galectin-3 reduziert, was auf eine verminderte Infiltration von profibrotischen Makrophagen ins Interstitium der neonatalen Niere hinweist. Der anti-apoptotische Effekt der JAK2/STAT3-Blockade zeigte sich in einer reduzierten Caspase-8 Expression in der ureterligierten Niere. Somit konnten die neonatalen Nieren durch die JAK2/STAT3-Blockade mit ihren noch reduzierten Regenerations- und Kompensationsmechanismen vor tubulärer Atrophie geschützt werden. Außerdem reduzierte die JAK2/STAT3-Blockade die interstitielle Kollagen-I Expression und verminderte dadurch die Fibrosebildung in der neonatalen Niere.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Blockade des JAK2/STAT3-Signalweges in ureterligierten, neonatalen Mäusen nephroprotektiv wirkt. Die JAK2/STAT3-Blockade könnte somit einen neuen Therapieansatz bei angeborenen obstruktiven Uropathien darstellen.

1 Einleitung

1.1 Kongenitale obstruktive Uropathien

Kongenitale obstruktive Uropathien sind eine häufige Ursache chronisch terminaler Niereninsuffizienz im Kindesalter [2, 3]. Unter einer angeborenen obstruktiven Uropathie versteht man eine Harnabflussstörung, die ohne adäquate Therapie das Nierenentwicklungspotential begrenzt und zur fortschreitenden Verschlechterung der Nierenfunktion führt [4]. Der Zeitpunkt der Obstruktion, der Schweregrad der intrauterinen Obstruktion und die Obstruktionsdauer entscheiden maßgeblich über die Progredienz der Uropathie in der sich entwickelnden Niere [5].

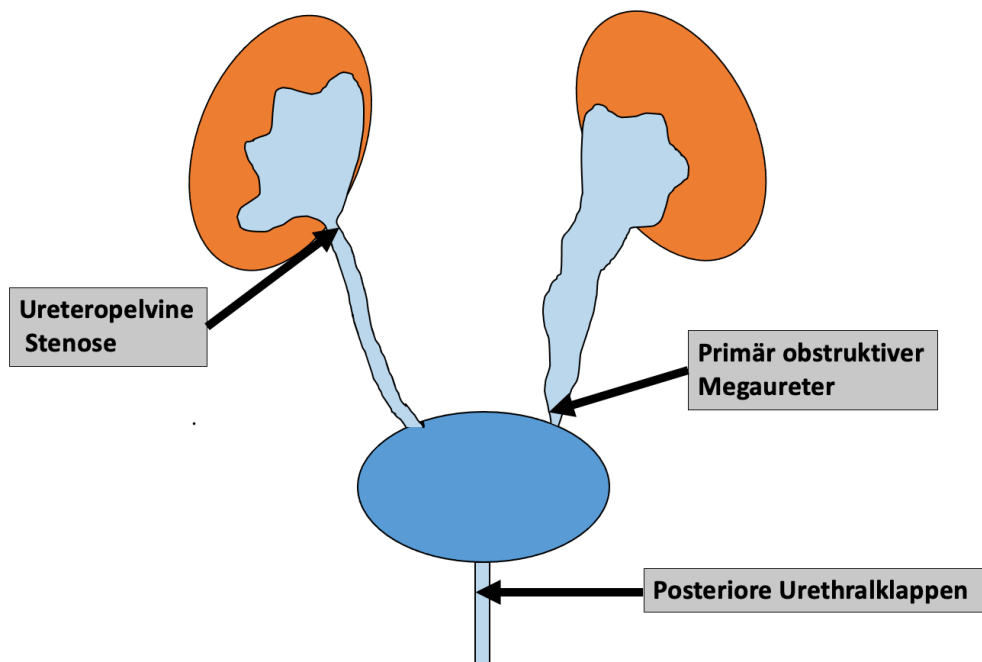


Abbildung 1: Kongenitale obstruktive Uropathien – die häufigsten Differenzialdiagnosen: 1. Oberer Harntrakt: Ureteropelvine Stenose (39-44%), primär obstruktiver Megaureter 2. Unterer Harntrakt: Posteriore Urethralklappen (39%), Urethralatresie (9-14%) [2]

Je nach der Lokalisation der Obstruktion werden kongenitale obstruktive Uropathien folgendermaßen eingeteilt: Die ureteropelvine Stenose stellt mit einer Inzidenz von circa 1:1000 – 1:1500 die häufigste Form einer angeborenen Obstruktion dar und führt meist linksseitig zu einer Einengung des pyeloureteralen Überganges [6, 7]. Die konsekutive Hydronephrose entwickelt sich infolge des Harnrückstaus im Nierenbecken [8]. Die weiter distal liegende, zweithäufigste Form stellt der primär obstruktive Megaureter dar,

dem eine Einengung des Ureters kurz vor Einmündung in die Harnblase zugrunde liegt. Durch den Harnrückstau kommt es neben einer Hydronephrose zu einem prästenotisch massiv dilatierten Ureter. Sowohl die ureteropelvine Stenose als auch der primär obstruktive Megaureter treten vor allem einseitig auf [9]. Die schwerwiegendste Ursache für eine obstruktive Uropathie sind posteriore Urethralklappen. Diese Form betrifft nur Jungen und tritt mit einer Inzidenz von 1:5000 auf. Die infravesikale Obstruktion führt zur bilateralen Hydronephrose und zum Bild der Megacystis mit verdickter Blasenwand. Mehr als ein Drittel der betroffenen Jungen entwickelt im Krankheitsverlauf eine chronische Niereninsuffizienz [1, 2, 10]. (Abb.1)

1.1.1 Diagnostik, Therapie und Prognose

Im Zentrum der Diagnostik steht die Ultraschalluntersuchung. In bis zu 4,5 % aller Schwangerschaften wird im Rahmen eines pränatalen Ultraschalls v.a. im zweiten Trimenon (12.-28. SSW) eine fetale Hydronephrose mit unilateralem oder bilateralem Auftreten diagnostiziert. Klinisch relevant werden davon im Verlauf nur ca. 10% [2, 8, 11, 12].

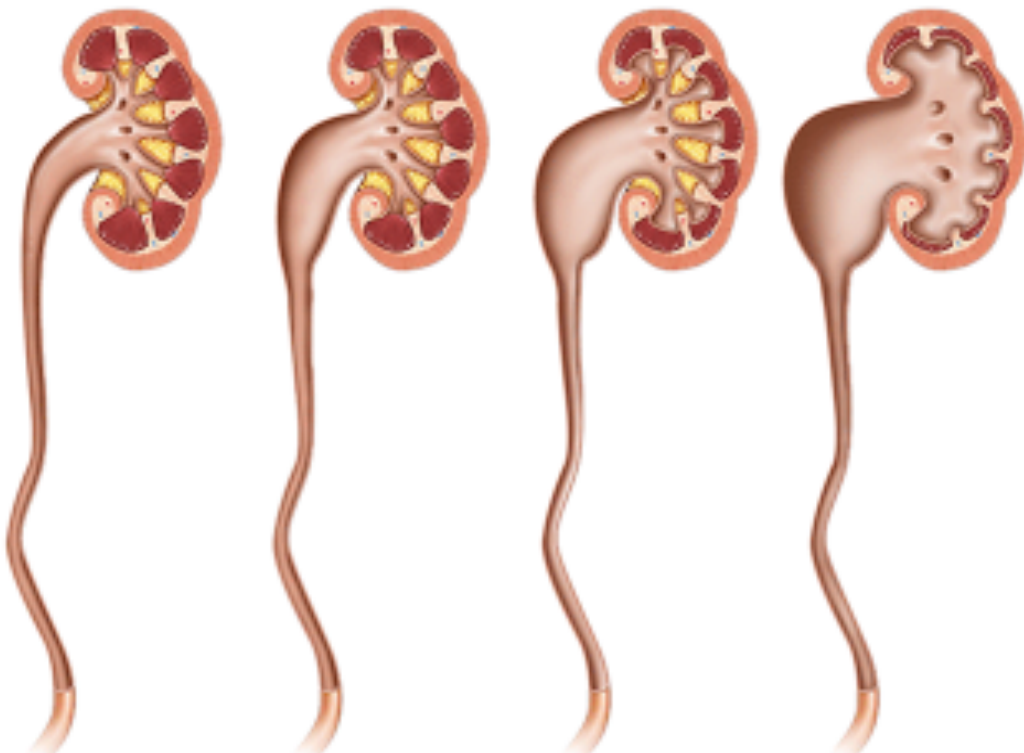


Abbildung 2: Stadieneinteilung (Grad I-IV) der Hydronephrose [13]

Postpartal erfolgen sonographische Kontrollen der Hydronephrose in der ersten Lebenswoche und anschließend regelmäßig im Verlauf. Eine Nierenbeckenerweiterung von > 7 mm gilt beim Neugeborenen als abnormal. Insbesondere die moderaten (10-15 mm) und ausgeprägten (>15 mm) Nierenbeckenerweiterungen erfordern weiterführende Diagnostik [2, 13]. Fast 90% der milden bis moderaten Hydronephrosen sind innerhalb der ersten zwei Lebensjahre rückläufig oder stabil. Bei den restlichen 10% zeigt sich allerdings eine

persistierende Nierenbeckenkelchdilatation, die weiterer Diagnostik bedarf [14, 15]. Seltener fallen Kinder erst später durch klinische Beschwerden wie abdominelle Schmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Flankenschmerzen oder rezidivierende Harnwegsinfekte auf [2]. Zur weiteren diagnostischen Abklärung einer vermuteten Harntransportstörung wird die ^{99m}Tc -Mercaptoacetyltriglycine-Szintigraphie (MAG-3) hinzugezogen. Mit Hilfe dieser kann die Beurteilung der seitengetrenten Nierenfunktion und des Abflussmusters erfolgen [16]. Eine weitere Möglichkeit der Bildgebung ist die statisch-dynamische Magnetresonanz-Urographie, die neben der Nierenfunktion auch die Morphologie der Harntransportstörung beurteilt [17]. Eine Hydronephrose wird dann zum Problem, wenn sie zur Einschränkung der Nierenpartialfunktion oder zu klinischen Beschwerden (u.a. Infektionen, Schmerzen) führt und das Nierenentwicklungspotential begrenzt. Auch die Hypertrophie der kontralateralen Niere kann hinweisend für eine Funktionseinschränkung der obstruierten Niere sein [18, 19]. Für das bestmögliche klinische Outcome ist eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit von Kindernephrologen und Urologen erforderlich. Infravesikale Obstruktionen erfordern meist unverzüglich postnatal eine operative Intervention mit suprapubischer Harnableitung. Durch eine pränatale vesiko-amniale Shuntanlage kann zwar die perinatale Sterblichkeit reduziert, aber nicht der renale Verlauf beeinflusst werden [20, 21]. Die ureteropelvine Stenose hingegen lässt mehr therapeutischen Spielraum, da sie in der Regel unilateral auftritt und nur 30-40% der Patienten eine operative Korrektur benötigen [5, 22, 23]. Die Anderson-Hynes-Plastik stellt das operative Standardverfahren der ureteropelvinen Stenose dar. In einem laparoskopischen oder offenen Procedere erfolgt die Resektion der Harnleiterstenose und Reanastomosierung des Ureters [24, 25].

Auf der Suche nach prognostischen Markern für obstruktive Uropathien wurden bereits zahlreiche Bestandteile des fetalen Urins untersucht u.a. Elektrolyte, $\alpha 1$ -Mikroglobulin, $\beta 2$ -Mikroglobulin, NGAL, TGF- β , MCP1, Mikroalbumin, IGF-1, Kreatinin, Cystatin C. Auch die massenspektrometrische Analyse von Urinproteomen scheint vielversprechend [2, 5, 26, 27]. Bandin et al. konnten zeigen, dass konservativ behandelte Patientin mit ureteropelviner Stenose im Gegensatz zu operierten Patienten nach 5 Jahren ein pathologisches Urinproteommuster aufwies, das auf anhaltende pathologische Umbauprozesse in der Niere hindeutet [28, 29]. Bisher finden diese Marker jedoch noch keine Anwendung im klinischen Alltag [30].

Unverändert stellen sich daher folgende Fragen: Welche Patienten mit einer ureteropelvinen Stenose profitieren von einer operativen Pyeloplastik? Wann ist der optimale Zeitpunkt des Eingriffs? Welche Risiken entstehen durch ein abwartendes Verhalten? Gibt es zuverlässige Biomarker, die über die Progression der Erkrankung Auskunft geben [5, 31, 32]? Ein tieferes Verständnis der Pathophysiologie obstruktiver Uropathien könnte bei der Beantwortung dieser Fragen helfen. Dazu möchte diese Dissertation beitragen.

1.1.2 Nephrogenese und Pathogenese obstruktiver Uropathien

In der embryonalen Entwicklung der Niere bilden sich folgende Vorstufen: Pronephros (Vorniere), Mesonephros (Urnier) und anschließend, circa in der 5. SSW, das Metanephros (Nachnieren). Während sich Pronephros und Mesonephros wieder zurückbilden, persistiert das Metanephros als endgültige Nierenanlage. Diese entsteht durch das Auswachsen der Ureterknospe aus dem Wolff'schen Gang, die anschließend in das metanephrogene Mesenchym einsprosst. Die reziproke Interaktion von Ureterknospe und metanephrogenem Mesenchym ('Budding') ist von zentraler Bedeutung für die Entstehung und Differenzierung der einzelnen Nierenbestandteile und des Harnleiters. Die Ureterknospe

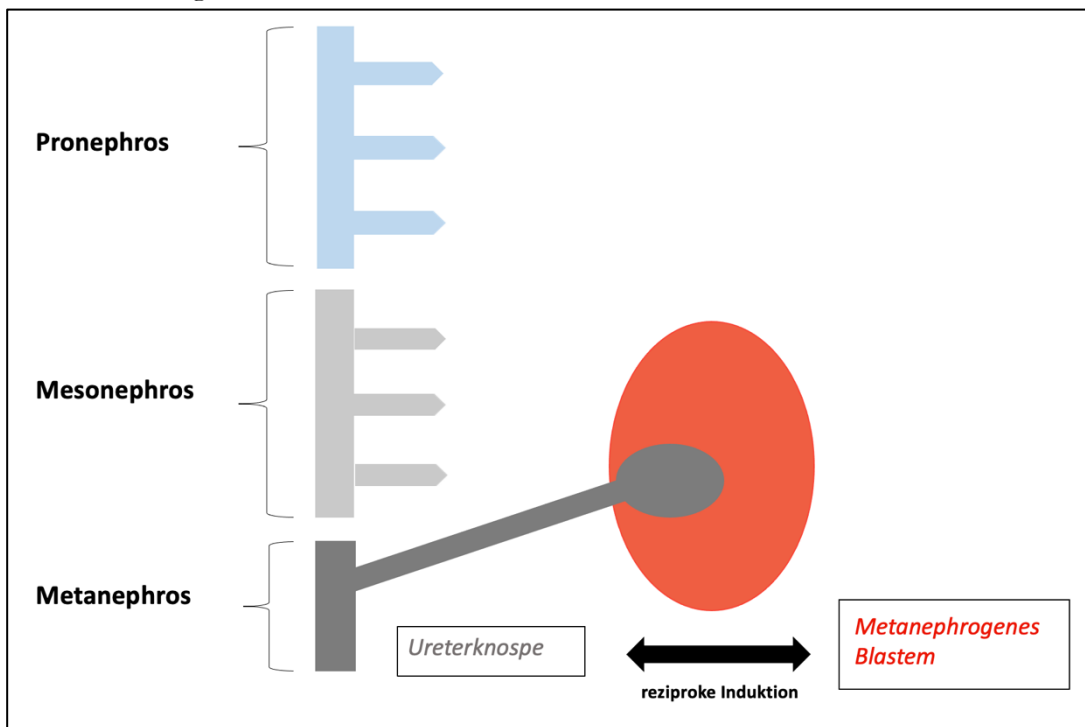


Abbildung 3: Nephrogenese: Nierenvorstufen Pronephros, Mesonephros und Metanephros. Endgültige Nierenanlage entsteht aus Metanephros durch das Einsprossen der Ureterknospe (grau) ins metanephrogene Blastem (rot) (= „reziproke Induktion“); Skizze modifiziert nach [3, 4]

verzweigt sich im Blastem und formt sich zum harnableitenden System der Niere mit Sammelrohren, Nierenbecken und Ureter [1, 33]. Aus dem metanephrogenen Mesenchym entstehen durch den Prozess der mesenchymal-epithelialen Transformation die Nephrone. Pro Niere bilden sich durchschnittlich ca. eine Million Nephrone aus. Die genaue Nephronenzahl kann sich zwischen Individuen um mehr als das 10-fache unterscheiden [34]. (Abb.3)

Beim Menschen findet die Nephrogenese von der ca. 5. SSW bis zur 36. SSW statt und wird postnatal nicht fortgeführt. Vor allem durch Frühgeburt, niedriges Geburtsgewicht oder Störungen in der Nephrogenese kann ein Nephronendefizit entstehen, das lebenslang

persistiert [33, 35]. In einer tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit Verlust von über 50% der Nephronmasse aufgrund einer transitorischen partiellen Ureterobstruktion das Nephronwachstum nicht mehr aufholen konnten und sogar noch weiter an Nephronmasse verloren. Aufgrund dieser mangelnden Kompensationsmöglichkeiten entsteht ein hohes Risiko für die Entwicklung einer chronischen Niereninsuffizienz [36].

Zeitgleich zur Nierenentwicklung bildet sich durch Elongation aus dem distalen Teil der Ureterknopse der Harnleiter, der als muskulärer Schlauch für den Harntransport zuständig ist. Die Wandstruktur entsteht durch gezielte Interaktion zwischen den inneren epithelialen und den sie umgebenden mesenchymalen Zellen. Das molekulare Signal führt zur Differenzierung der Epithelzellen in ein vielschichtiges Urothel. Das Urothel wird von einer Deckschicht aus starren Plaques und Uroplakinen, speziellen Transmembranproteinen, umgeben, die für die Urinundurchlässigkeit und Widerstandsfähigkeit des Ureters sorgen. Zeitgleich differenzieren sich die mesenchymalen Zellen in Stromazellen, Fibroblasten und glatte Muskelzellen, die sich innen zirkulär und außen longitudinal ausrichten, und für den mechanischen Harntransport von der Niere zur Blase zuständig sind. Für die Koordination der pyeloureteralen Peristaltik sind außerdem Schrittmacherzellen, u.a. Cajalzellen und atypische Muskelzellen notwendig. Diese sind v.a. im Nierenbecken lokalisiert und übertragen das neuronale Signal pulsatorisch auf die glatten Muskelzellen des Ureters [2, 6, 37, 38]. Eine funktionelle Obstruktion kann durch die Fehlsteuerung, bzw. Fehlentwicklung von Innervation und/oder Peristaltik entstehen [1]. Essentielle Bestandteile für die Entwicklung einer reibungslosen Peristaltik sind u.a. Bone morphogenetic Protein-4 (Bmp-4, essentiell für die periureterale Ausbildung von glatter Muskulatur) sowie das Signalmolekül Calcineurin. Tierexperimentell führte eine selektive Inaktivierung von Calcineurin zu einer peristaltischen Dysfunktion wegen mangelnder Proliferation der glatten Muskulatur entlang des sich entwickelnden Harntrakts [6, 39]. Auch Komponenten des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems sind maßgeblich an der Entwicklung der Peristaltik beteiligt [40, 41]. Besonders vulnerable Prozesse im Verlauf der Nephrogenese sind die Induktion der metanephrischen Niere, des Ureters und die Reifung des pyeloureteralen Peristaltikmechanismus [1, 42].

Zusammenfassend wird bei der Fehlentwicklung der Nieren und des Harntrakts von einem komplexen Zusammenspiel genetischer und nicht-genetischer Faktoren ausgegangen. Nach neuesten Erkenntnissen können bei ca. 18% der Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract (CAKUT)-Erkrankungen monogenetische Mutationen nachgewiesen werden. Mit dem Begriff CAKUT werden alle angeborenen Fehlbildungen der Niere und der ableitenden Harnwege zusammengefasst. 40 relevante Gene wie z.B. Paired-Box-Gen 2 (PAX2) oder Hepatocyte-Nuclear-Factor 1 β (HNF1 β) konnten in den letzten Jahren identifiziert werden, die hauptsächlich renale Dysplasien hervorrufen [43]. 10-15% sind auf genetische Kopienvariationen (copy number variations, CNV) zurückzuführen, die meist syndromale Nierenfehlbildungen verursachen [44]. Bei ca. 10% der Nieren- und

Harntraktmalformationen liegt eine positive Familienanamnese vor [38]. Daneben haben vermutlich auch exogene und epigenetische Faktoren vermutlich auch einen ätiologischen Einfluss [45].

1.2 Neonatales Tiermodell der obstruktiven Uropathie

Bei der Erforschung obstruktiver Uropathien hat sich das neonatale Maus- und Rattenmodell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) bewährt, da Zeitpunkt, Dauer und Schweregrad der Obstruktion als entscheidende Faktoren der obstruktiven Uropathie gezielt variiert

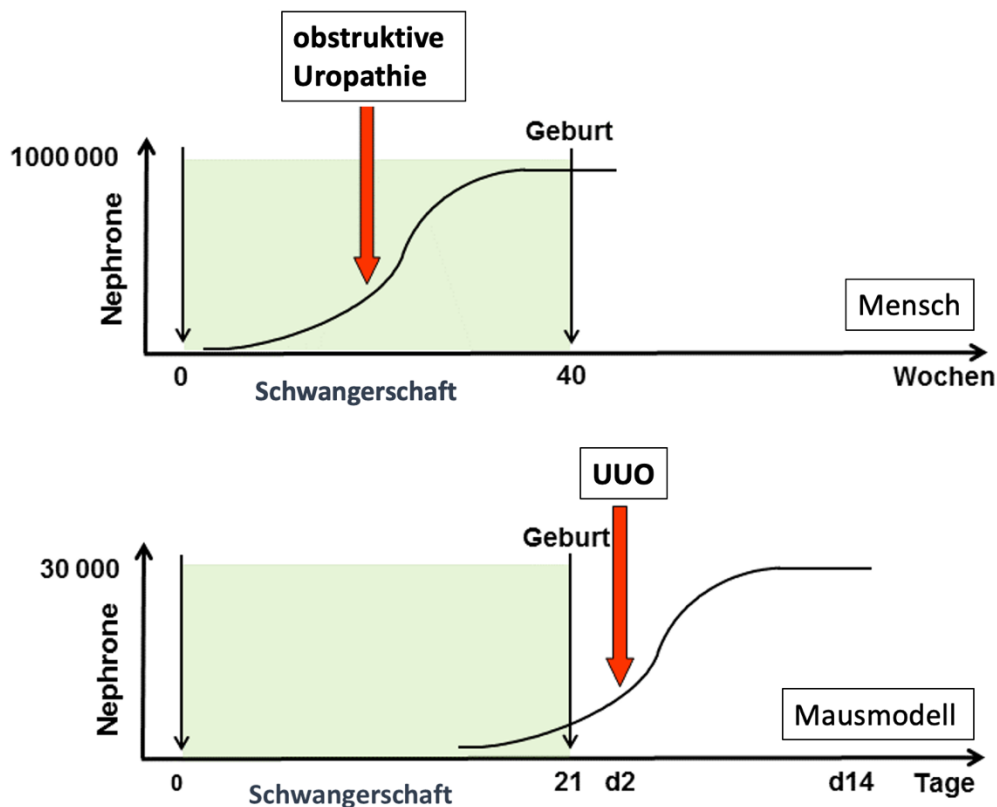


Abbildung 4: Nephrogenese und obstruktive Uropathie, bzw. UUO: Die Nephrogenese findet bei Mäusen v.a. postnatal statt versus pränatal beim Menschen (siehe beide Kurven der Nephronenentwicklung). Postnatal induzierte UUO im Mausmodell und die intrauterin entstandene obstruktive Uropathie beim Menschen betreffen die gleiche Phase der Nephrogenese.

werden können [46-48]. Je nach beabsichtigtem Schweregrad erfolgt dabei operativ eine partielle oder komplette Ligatur des Harnleiters [49, 50]. Die partielle Ligatur spiegelt eher die klinische Realität der obstruktiven Uropathien wider [7]. Jedoch stellt die Reproduzierbarkeit einer partiellen Ligatur an 1-2g schweren neonatalen Mäusen eine technische Herausforderung dar.

In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Versuche an neonatalen Mäusen, bei denen eine komplette operative Ureterligatur am 2. Lebenstag durchgeführt wurde. Diese spezielle Form der UUO wurde in den 1980er Jahren von Chevalier et al. entwickelt und etablierte sich als neonatales Tiermodell einer kongenitalen obstruktiven Uropathie [51, 52]. In Mäusen und Ratten ist die physiologische Nierenentwicklung zum Zeitpunkt der Geburt nur zu circa 10% abgeschlossen. Postnatal dauert die Nephrogenese noch weitere 10-14 Tage an [52]. Beim Menschen hingegen ist die Nephrogenese bereits intrauterin um die 36. SSW abgeschlossen. Die postnatal durchgeführte unilaterale Ureterobstruktion bei Nagetieren und die intrauterin entstandene obstruktive Uropathie beim Menschen finden somit in der gleichen vulnerablen Phase der Nephrogenese statt. Da zusätzlich die histologischen Veränderungen von UUO-Nieren und Nierenbiopsien bei obstruktiven Uropathien vergleichbar sind, lassen sich vom neonatalen Mausmodell direkte Rückschlüsse auf die intrauterine Pathogenese und die Auswirkungen obstruktiver Uropathien ziehen [7, 53, 54]. (Abb.4)

Im UUO-Modell sind die charakteristischen Pfeiler der obstruktiven Uropathie-Pathogenese wie Leukozyteninfiltration, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose, gut und zuverlässig reproduzierbar beschrieben [47]. Die gesunde, kontralaterale Niere entwickelt dabei eine kompensatorische Hypertrophie, deren Ausmaß von Schwere und Dauer der Obstruktion abhängt [55].

Unsere Arbeitsgruppe konnte u.a. zeigen, dass es in neonatalen Nieren im Vergleich zu adulten Nieren zu einer deutlich schwereren tubulointerstitiellen Schädigung nach UUO kommt. In neonatalen UUO-Nieren zeigte sich eine frühere und ausgeprägtere Hochregulierung entwicklungsrelevanter Gene (u.a. Gdnf, Pax2, Six4, Six2, Dach1, Eya1, Bmp4 und Hnf-1 β) [56]. Die schwere tubulointerstitielle Schädigung in neonatalen Nieren erklärt sich durch die massive Beeinträchtigung der vulnerablen Differenzierungs-, Wachstums- und Reifungsprozesse im Rahmen der Nephrogenese, während die Reparaturmechanismen noch limitiert und unausgereift sind [47].

Das neonatale UUO-Modell bietet die ideale Grundlage, um spezifische Signaltransduktionswege zu untersuchen und neue Therapieansätze bei kongenitalen obstruktiven Uropathien zu entwickeln.

1.3 Pathophysiologie der UUO

Infolge der unilateralen Ureterobstruktion sind Sammelrohre und distale Tubuli einem akut erhöhten hydrostatischen Druck ausgesetzt [53, 57]. Die massive Dilatation der Tubuli vergrößert das Lumen der Tubuli um das bis zu Dreifache und führt zur mechanischen Dehnung der Tubulusepithelzellen [53]. Ins Interstitium wandern Entzündungszellen v.a. Makrophagen ein und fördern zusammen mit den geschädigten Tubulusepithelzellen die tubulointerstitielle Inflammation [58]. Vasokonstriktion und Rarefizierung der Kapillaren führen zur Ischämie des Nierengewebes und schränken die glomeruläre Filtrationsrate

(GFR) stark ein [52, 59, 60]. Insbesondere proximale Tubuli reagieren frühzeitig auf die Ischämie und Hypoxie und atrophieren vorrangig durch Apoptose, aber auch durch Nekrose oder Autophagie [53, 60-63]. Daraus resultieren funktionslose atubuläre Glomeruli [61, 62, 64]. Aufbauend auf die chronische tubulointerstitielle Inflammation kommt es zur progressiven Entwicklung interstitieller Fibrose. Dabei proliferieren und differenzieren interstitielle Fibroblasten und Zellen anderer Zellreihen zu aktivierten Myofibroblasten und produzieren extrazelluläre Matrix. Interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie führen letztendlich zum irreversiblen Verlust funktionsfähiger Nephrone, welcher mit dem Funktionsverlust der Niere korreliert [5, 7, 62].

Im Fokus unserer Forschung liegen die pathophysiologischen Kernprozesse der chronischen Inflammation, tubulären Atrophie und interstitiellen Fibrose [48]. Zahlreiche Signaltransduktionswege sind in die Fibroseentwicklung und Progression nach UUO involviert [65]. Hervorzuheben ist der STAT3-Signaltransduktionsweg, dessen Bedeutung in der Pathophysiologie der obstruktiven Uropathie in der vorliegenden Arbeit untersucht werden soll. (Abb.5)

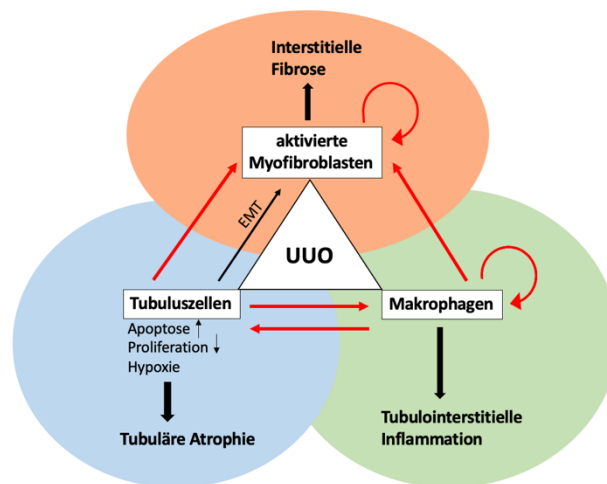


Abbildung 5: Pathophysiologische Zusammenhänge der UUO: Inflammation (grün), tubuläre Atrophie (blau), Fibrose (rot); geschädigte Tubuluszellen und Makrophagen sezernieren pro-inflammatorische und profibrotische Zytokine; Differenzierung von Tubuluszellen zu Myofibroblasten über EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) (rote Pfeile symbolisieren Aktivierung, Kreispfeile symbolisieren autokrine Aktivierung) [1]

1.3.1 Inflammation

Infolge der unilateralen Ureterligatur (UUO) wandern Leukozyten v.a. Makrophagen und aktivierte T-Lymphozyten chemokinvermittelt (u.a. CCL2, CCL5) unter dem Einfluss zahlreicher Adhäsionsmoleküle (u.a. ICAM-1) und Uromodulin-vermittelt ins Interstitium

ein [66-69]. Die Entzündungszellen sezernieren zusammen mit den geschädigten Tubulusepithelzellen und Myofibroblasten proinflammatorische und profibrotische Zytokine [58, 67, 70]. Zahlreiche Chemokine und Adhäsionsmoleküle (u.a. CCL2, CCL5, Osteopontin, IL-1, ICAM-1, Twist-1, Angiotensin II, Selektine, RAGE), Rezeptoren (u.a. CCR1, CCR5, Toll-like-receptor-2), Transkriptionsfaktoren (u.a. IRF-1, NF- κ B, TNF α) und die Nekrose tubulärer Epithelzellen begünstigen die Inflammation. Über parakrine und autokrine Aktivierungsschleifen der Makrophagenrekrutierung kommt es zur Zunahme der tubulointerstitiellen Inflammation [2, 69, 71]. Bei diesen Makrophagen handelt es sich um eine heterogene Zellpopulation, die je nach Mikroumgebung den funktionellen Phänotyp verändern kann. Sowohl protektive als auch schädliche Subpopulationen konnten im Rahmen der UUU in der Niere beobachtet werden [72, 73].

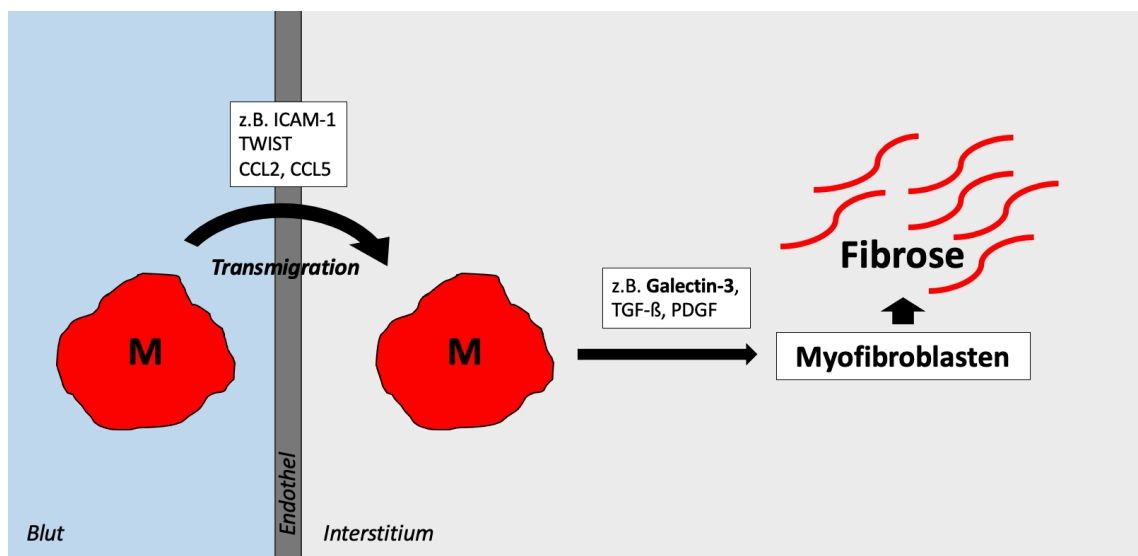


Abbildung 6: Profibrotische Makrophagen (M): Chemokinvermittelte Einwanderung ins Interstitium, durch Sekretion profibrotischer Zytokine Aktivierung von Myofibroblasten [69, 77, 78]

In der vorliegenden Arbeit wurde u.a. die profibrotische Subpopulation der Galectin-3 positiven Makrophagen untersucht, die durch die Sekretion zahlreicher profibrotischer Faktoren wie TGF- β 1, PDGF, CCL18 und Galectin-3 zur Zunahme der Fibrose führt [68, 74-79]. Galectin-3, ein 32-35 kDa Lectinprotein, gilt dabei als spezifischer Marker für profibrotische Makrophagen [75, 80]. (Abb.6)

1.3.2 Programmierter Zelltod

Apoptose und Nekroptose sind Formen des programmierten Zelltods nach UO [81, 82].

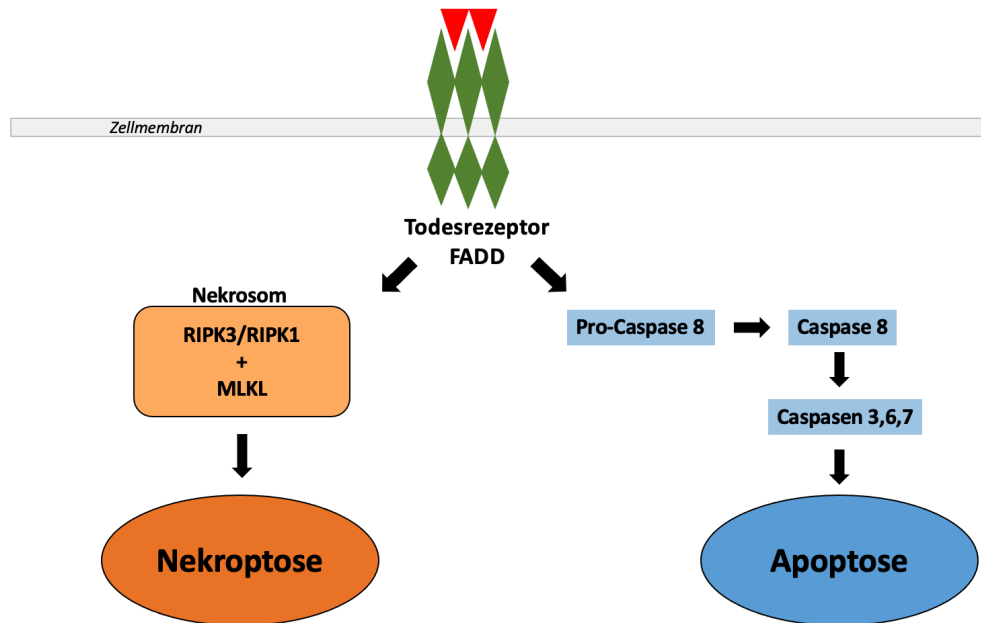


Abbildung 7: Programmierter Zelltod- Nekroptose und Apoptose; FADD (Fas-associated Death Domain Protein), RIPK (receptor interacting protein kinase), MLKL (mixed-lineage kinase domain-like Pseudokinase) [1]

Apoptose findet vorwiegend in den distalen Tubuli und Sammelrohren statt [82, 83]. Bei der extrinsischen Apoptose kommt es durch Ligandenbindung an sogenannten „Todesrezeptoren“ (TNF-Rezeptorfamilie) zur zytosolischen Bindung des Adaptermoleküls FADD (Fas-associated Death Domain Protein). Dieser Proteinkomplex bindet wiederum Procaspase-8, die sich durch autokatalytische Spaltung aktiviert. Caspase-8 induziert als Initiator-Caspase die kaskadenartige proteolytische Aktivierung der Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6 und 7). Diese zerstören lebenswichtige zelluläre Proteine und führen zum programmierten Zelltod [84]. Das distale Nierenkompartiment reagiert frühzeitig auf die obstruktionsbedingte, mechanische Distension der Epithelzellen mit Dilatation der Tubuli [61, 85]. Je größer der mechanische Stress ist, desto mehr Tubulusepithelzellen gehen apoptotisch zugrunde [9, 83, 86]. Neben der hydrostatischen Dilatation induzieren oxidativer Stress, Hypoxie und pro-apoptische Faktoren (u.a. $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$, Angiotensin II, p53) Apoptose nach UO [58, 85, 87]. Neuere Studien zeigen, dass vermutlich auch toxische Lipide, die durch eine Hypoxie-bedingte Fehlsteuerung der β -Oxidation in Tubulusepithelzellen entstehen, Apoptose in Zellen induzieren [63, 88]. Im Vergleich zu adulten Nieren ist die tubuläre Apoptose in neonatalen Nieren stärker ausgeprägt. Die gesteigerte Apoptose erklärt sich dadurch, dass die physiologische Nephrogenese gehemmt wird und Kompensations- und Regenerationsmechanismen in neonatalen Nieren noch mangelhaft ausgebildet sind [85].

Als weitere Form des programmierten Zelltods kommt es nach UUU zur Nekrose/Nekroptose. Anders als die Apoptose ist diese Form des Zelltods vor allem in den proximalen Tubuli lokalisiert, wo die Tubulusepithelzellen stärker auf oxidativen Stress reagieren. Nekroptose ist eine Receptor-interacting serine/threonine-Protein Kinase 3 (RIPK3) - abhängige Nekrose. Durch die Aktivierung von „Todesrezeptoren“ kommt es zum Integritätsverlust der Zelle und durch die Ruptur der Zellmembran zur Freisetzung von pro-inflammatorischem Zellmaterial (u.a. Zytokine und Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs)). So führt Nekrose im Gegensatz zur Apoptose zur progredienten Entzündungsreaktion. Die Interaktions- und Aktivierungsschleife von Nekrose und Inflammation wird als Nekroinflammation bezeichnet [82, 83]. (Abb.7, Abb.8)

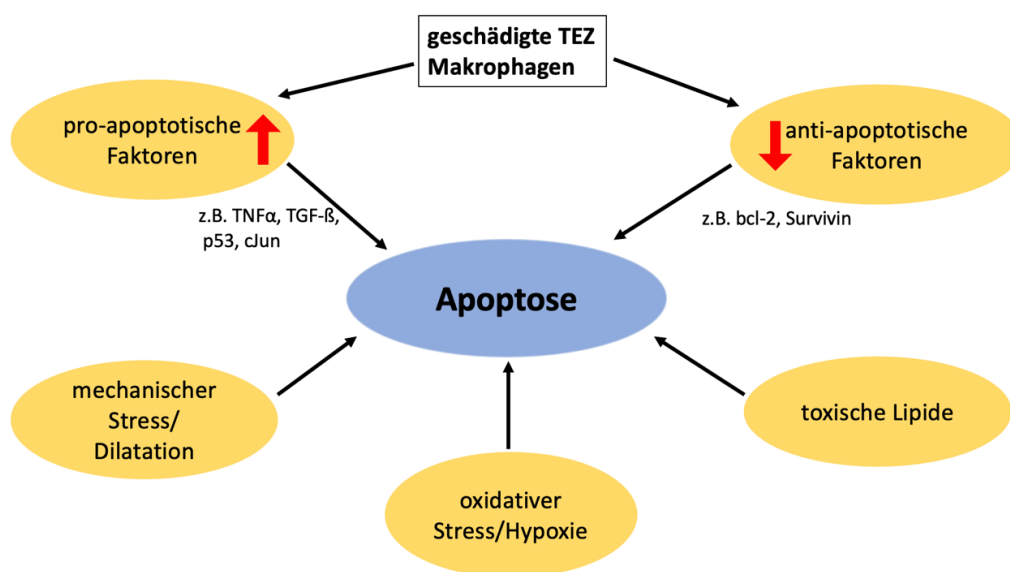


Abbildung 8: Ursachen der UUU-bedingten Apoptose; Tubulusepithelzellen (TEZ) und Makrophagen fördern durch gesteigerte Sekretion pro-apoptischer Faktoren und verminderte Sekretion anti-apoptischer Faktoren die Apoptose; mechanischer und oxidativer Stress sowie toxische Lipide wirken ebenfalls pro-apoptisch

1.3.3 Interstitielle Fibrose

Tierexperimentell führt die unilaterale Ureterobstruktion zur Entwicklung interstitieller Fibrose [89, 90]. Verantwortlich ist ein Ungleichgewicht zwischen Kollagen auf- und abbauenden, reparativen sowie destruktiven Prozessen. Bei überproportionaler Bildung von extrazellulärer Matrix und gleichzeitiger Hemmung von Kollagenasen und Metalloproteinasen kommt es zur überschüssigen Kollagenablagerung im Interstitium und im peritubulären Raum der Niere. Ähnlich wie bei der physiologischen Wundheilung erfolgt die Reparatur des Schadens durch Matrix-`Remodeling`. Die Fibrosebildung kann als überschießender Prozess einer chronischen Wundheilung betrachtet werden, die zur irreversiblen Narbenbildung führt [91, 92]. Die extrazelluläre Matrix besteht dabei aus

Kollagenen vom Typ I, III, IV, V und VI, Glykoproteinen, Proteoglykanen und Fibronectin [53, 67, 91, 93-95]. Mit fortschreitender Fibrosebildung kommt es zur Zerstörung der renalen Mikroarchitektur. Der Raum zwischen Tubuli und peritubulären Kapillaren wird durch die Kollagendeposition zunehmend größer. Die verlängerten Diffusionswege führen zur inadäquaten Blutversorgung der Tubuli. Die hypoxiebedingte tubuläre Atrophie führt schließlich zum irreversiblen Funktionsverlust der Niere [63, 68].

Nach einer unilateralen Ureterobstruktion sind aktivierte Myofibroblasten die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix [67, 96, 97]. Die initiale Aktivierung von Myofibroblasten erfolgt über profibrotische Zytokine wie TGF- β und PDGF, die von geschädigten Tubulusepithelzellen und infiltrierenden Makrophagen sezerniert werden [58, 68, 78, 87, 93, 98-101]. Auch die enge räumliche Koexistenz von Makrophagen und Myofibroblasten im geschädigten Interstitium führt vermutlich über direkte Zellinteraktion zur Myofibroblastenaktivierung [102]. Im weiteren Verlauf bleiben Myofibroblasten auch ohne externe Stimuli im aktivierten Zustand, indem sie sich einer epigenetischen Reprogrammierung unterziehen und eigenständig Zytokine wie TGF- β_1 produzieren können [67, 91, 100, 103].

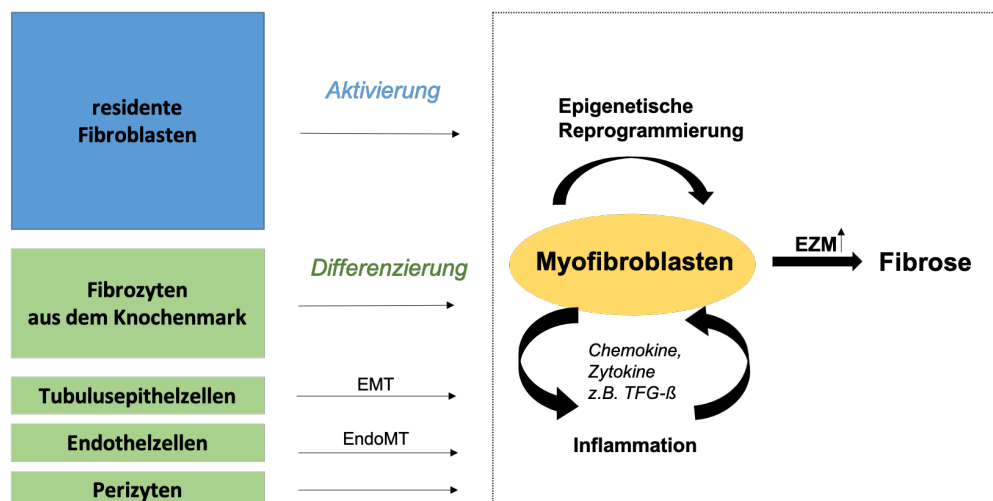


Abbildung 9: Entstehung von aktivierten Myofibroblasten über Differenzierungs- und Aktivierungsprozesse [12]; Myofibroblasten werden durch pro-inflammatorische Zytokine und epigenetische Reprogrammierung aktiviert und produzieren extrazelluläre Matrix (EZM); Skizze modifiziert nach [15]

Ungefähr die Hälfte aller Myofibroblasten in der Niere nach UUO entsteht durch die Aktivierung und Proliferation residenter Fibroblasten [97, 104]. Die andere Hälfte der Myofibroblasten entsteht durch Differenzierungsprozesse aus anderen Zellreihen. Von extrarenal wandern mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks, sogenannte Fibrozyten, über die Blutzirkulation ein und speisen als zweitgrößte Gruppe den Pool der aktivierten Myofibroblasten (ca. 35%) [97].

Die Entstehung weiterer Myofibroblasten erfolgt über die Differenzierung von Tubulusepithelzellen, Endothelzellen und Perizyten. Bei der endothelialen-mesenchymalen Transition (EndoMT) kann auf den Myofibroblasten eine Koexistenz von Endothelmarkern (CD31) und Myofibroblastenmarkern (FSP-1, α -SMA) nachgewiesen werden [105, 106]. Der endotheliale Beitrag am Myofibroblastenpool in der Niere beträgt ca. 10% [97]. Tubulusepithelzellen tragen über den Prozess der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) ebenfalls zur Fibrosebildung bei [58]. Ca. 5% aller Myofibroblasten wird ein epithelialer Ursprung zugeschrieben [97]. Bei der EMT verlieren geschädigte Tubulusepithelzellen ihre epithelialen Marker und ihre Zelladhäsion (z.B. E-Cadherin) und wandern mit neu erworbenen mesenchymalen Markern (z.B. FSP-1, α SMA, Desmin, Vimentin) als Myofibroblasten ins Interstitium der Niere ein [53, 58, 63, 107, 108]. Die Emigration aus dem tubulären Zellverband hinterlässt Lücken und verstärkt die tubuläre Atrophie [88]. (Abb.9)

Einen weiteren Beitrag zur Entwicklung interstitieller Fibrose leisten Perizyten, die sich aus ihrem endothelialen Gefüge lösen und ins Interstitium einwandern [59, 67, 96, 109-112]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β), ein mesenchymaler Zellmarker, zur Detektion von Perizyten eingesetzt [59, 67, 68, 113]. PDGFR- β ist Bestandteil des PDGF-Systems, eines Rezeptor-Liganden Systems, das Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsprozesse von mesenchymalen Zellen im physiologischen und pathologischen Kontext reguliert. Die physiologische Bedeutung zeigt sich darin, dass eine genetische Deletion des PDGFR- β zur embryonalen Letalität führt [114, 115]. Das PDGF-System besteht aus 5 Liganden-Isoformen (PDGF-AA, AB, BB, CC, DD) mit unterschiedlicher Bindungsaffinität zu den drei dimerischen Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$). An den PDGFR- β Rezeptor bindet sowohl der selektive Ligand PDGF-DD als auch der nicht selektive Ligand PDGF-BB. PDGF-CC und -DD werden als inaktive Formen synthetisiert und erst durch die enzymatische Abspaltung der CUB-Domäne aktiviert, während die anderen PDGF-Isoformen bereits als aktivierte Form vorliegen [114]. Die Ligandenbindung von PDGF-Isoformen an deren Rezeptor induzierte profibrotische Signalwege wie JAK/STAT, Phosphoinosit-3-Kinase (PI3K), Mitogen-activated protein Kinase (MAPK) und Phospholipase C- γ (PLC γ), die entscheidend an den pathophysiologischen Prozessen der renalen Fibroseentwicklung nach UUO beteiligt sind [116-118]. (Abb.10)

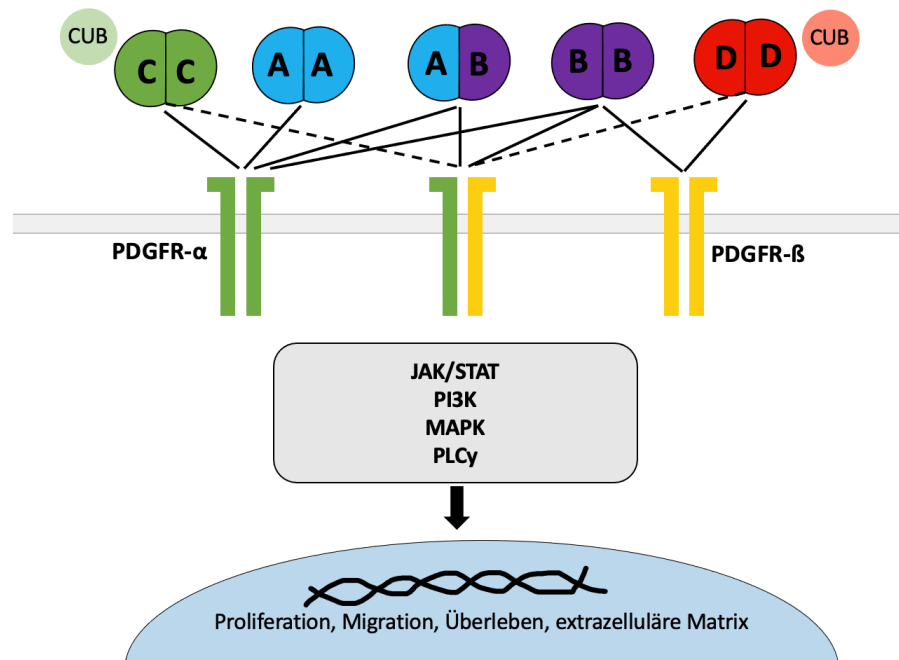


Abbildung 10: Das Platelet-derived Growth Factor System (PDGF) bestehend aus zwei Rezeptorketten PDGFR- α (grün) und PDGFR- β (gelb). Die Liganden sind die Dimere PDGF-CC,-AA,-AB,-BB,-DD. Gesicherte Liganden-Rezeptor Bindungsmöglichkeiten sind mit einer durchgehenden Linie gekennzeichnet, vermutete Bindungsmöglichkeiten mit gestrichelter Linie [114].

1.4 Transkriptionsfaktor STAT3

1.4.1 Definition und Funktion

STAT3, der Signal Transducer und Activator of Transcription 3, gehört zur Gruppe der zytosolischen Transkriptionsfaktoren und wurde erstmals 1994 identifiziert [119]. Die STAT3 kodierenden Gene liegen auf dem Chromosom 17q21. Der STAT3 Transkriptionsfaktor besteht aus 770 Aminosäuren und besitzt eine DNA bindende SH2-Domäne [119]. STAT3 von Mensch und Maus unterscheidet sich einzig in einer Aminosäure [120].

Der STAT3 Transkriptionsfaktor reguliert durch die Expression der STAT3-Zielgene zahlreiche überlebenswichtigen Zellprozesse verschiedener Funktionskreise. Dazu gehören inflammatorische Prozesse (z.B. IL-6, IL-10, IL-11, IL-23, COX2, NF- κ B, TGF- β), Zellüberleben und Proliferation (z.B. bcl-xl, bcl-2, Survivin, Mcl-1, Cyclin D1, p53), Angiogenese (u.a. VEGF, HIF1 α) und Adhäsions-/Migrationsprozesse (z.B. src, TWIST, ICAM1, MMP2, MMP9) [119, 121-134].

Die physiologische Relevanz von STAT3 zeigt sich darin, dass ein kompletter Knock-out der STAT3-Moleküle letal endet [135]. Neben der überlebenswichtigen physiologischen Funktion hat STAT3 eine zentrale Stellung in der Regulierung vieler pathologischer Prozesse

wie Autoimmunerkrankungen, Tumorentstehung und Tumorprogression [121, 136, 137]. Hohe STAT3-Level sind beispielsweise mit einer schlechten Tumorzelldifferenzierung und höherer Metastasierungswahrscheinlichkeit assoziiert [122, 138]. Außerdem vermittelt STAT3 zytokingesteuert die Fibrosierung von Organen wie Herz, Lunge und Niere [100, 137, 139]. Teilweise wird STAT3 jedoch auch eine protektive Rolle im Reparaturprozess der Fibrose zugeschrieben [140].

1.4.2 STAT3-Signaltransduktionsweg

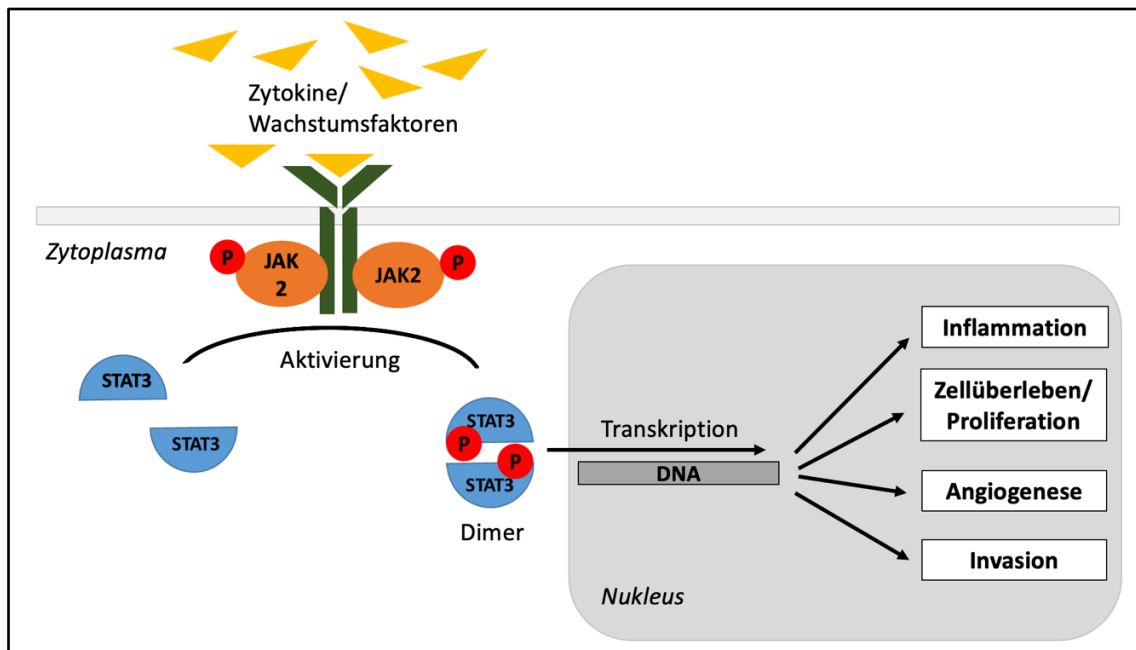


Abbildung 11: JAK2/STAT3-Signaltransduktionsweg: Rezeptor-Ligandenbildung führt über die intrazelluläre JAK2-Phosphorylierung zur STAT3-Aktivierung. Das phosphorylierte STAT3-Dimer reguliert im Zellkern als Transkriptionsfaktor die Expression von STAT3-Zielgenen; Skizze angelehnt an: [8-11]

Infolge der UUO induzieren zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren eine STAT3-Aktivierung. Hierunter fallen u.a. TGF β 1, TNF α , PDGF, EGF, VEGF, Angiotensin 2, Interferone, gp 130 Familie (z.B. IL-6, IL-11) [100, 119, 122, 141, 142]. Ihre Ligandenbindung an den membranständigen Rezeptor löst intrazellulär im Zytosol durch die Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Tyrosinkinase JAK2 die Aktivierung des JAK2/STAT3-Signaltransduktionswegs aus [127]. Die aktivierten STAT3-Proteine dimerisieren im Zytosol und diffundieren in den Zellkern. Dort regulieren sie als Transkriptionsfaktor die Expression der STAT3-Zielgene [119, 141, 143]. Die klassische Aktivierung erfolgt dabei wie bereits erwähnt durch die Phosphorylierung von STAT3 mittels Januskinase 2 (JAK2). Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (u.a.

EGFR, PDGFR und VEGFR) und rezeptorunabhängige zytosolische Tyrosinkinasen (u.a. Abl, Src und JNK) können STAT3 aber auch JAK2-unabhängig aktivieren [100, 119]. Oxidativer Stress dient ebenfalls als STAT3-Aktivator [144]. (Abb.11)

Die Kontrolle der STAT3-Aktivierung erfolgt über Inhibition und negative Rückkopplungsmechanismen. Proteine der Suppressor Of Cytokine Signaling (SOCS, v.a. SOCS1 und 3) hemmen kompetitiv als Pseudosubstrat oder durch direkte Blockade die Phosphorylierung von STAT3 [119, 140, 145]. Dephosphorylierung von Rezeptoren und von JAK-Rezeptor-assoziierten Phosphatasen führen zur Inaktivierung von STAT3. Auch im Zellkern kann ebenfalls durch Dephosphorylierung die Transkription von STAT3-Zielgenen unterbunden werden. Auch die Intensität und Dauer der Zytokinstimulation regulieren den Aktivitätszustand von STAT3 (Verweildauer im Nukleus bis zum Zeitpunkt der Ausschleusung zurück ins Zytosol) [119, 122, 146].

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass STAT3 pro-inflammatorische, pro-apoptotische und profibrotische Prozesse nach UUO im adulten Mausmodell reguliert [143, 144, 147]. STAT3 wird dabei in der adulten Mausniere normalerweise nur gering exprimiert. Nach UUO im adulten Mausmodell kam es insbesondere in Tubulusepithelzellen, Myofibroblasten und in geringerem Ausmaß auch in Makrophagen zu einer Hochregulierung von aktiviertem STAT3 [143, 147-149]. In der vorliegenden Arbeit soll die Bedeutung von STAT3 im neonatalen Modell der obstruktiven Uropathie untersucht werden.

1.5 Therapeutische Blockade von STAT3

1.5.1 Allgemeine Mechanismen

Es existiert eine Bandbreite an synthetischen und natürlichen STAT3-Inhibitoren, die über verschiedene Mechanismen und Zielstrukturen eine Blockade des STAT3-Signalwegs erzielen. Die STAT3-Aktivität kann dabei direkt unterbunden werden, indem die Phosphorylierung, die zytosolische Dimerisierung, die Translokation in den Zellkern oder die DNA-Bindung blockiert wird. Eine indirekte Hemmung von STAT3 entsteht dagegen durch die Inhibition von Tyrosinkinasen und die damit reduzierte Phosphorylierung von STAT3 [119, 127]. In der vorliegenden Arbeit wurde der STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG490 im neonatalen UUO-Modell eingesetzt.

1.5.2 Tyrphostin AG490

Tyrphostin AG490 gehört zu den synthetischen Kinaseinhibitoren und setzt sich chemisch aus 2-cyano-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide mit der molekularen Formel $C_{17}H_{14}N_2O_3$ zusammen [150]. (Abb.12)

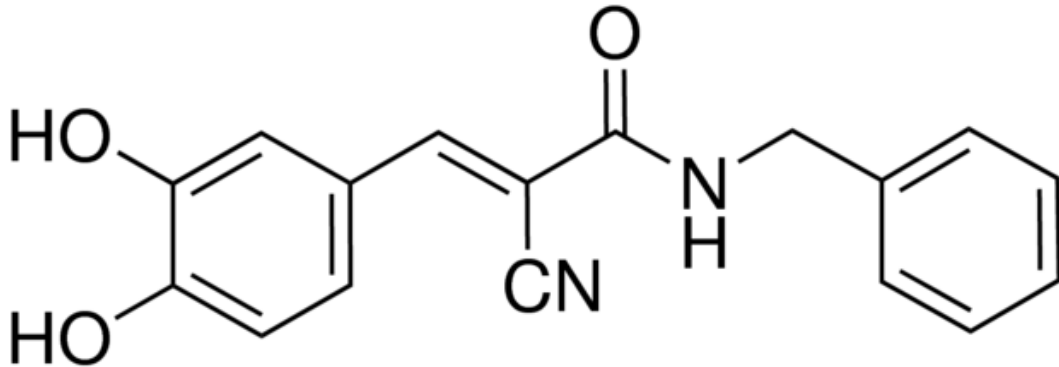


Abbildung 12: Die chemische Struktur von Tyrphostin AG490

Tyrphostin AG490 ist ein potenter STAT3-Inhibitor, der bereits in niedriger Dosierung zu einer hocheffektiven Inhibition der Kinaseaktivität der Januskinase 2 (JAK2) führt. Durch die ausbleibende Phosphorylierung verbleibt STAT3 im inaktiven Zustand und kann nicht als Transkriptionsfaktor aktiviert werden [134]. Da JAK2 nicht hochselektiv STAT3 aktiviert, sind zusätzlich auch andere JAK2-abhängige Transkriptionsfaktoren wie STAT1 von der Tyrphostin-Blockade betroffen [151, 152]. Zusätzlich hemmt Tyrphostin auch in geringem Ausmaß JAK3, was eine Inhibition von STAT5 bewirkt [153]. Ein weiterer Nebeneffekt von Tyrphostin AG490 ist die Hemmung des EGF-Rezeptors sowie von Adenylat- und Guanylatzyklen. Neben der STAT3-Blockade scheint Tyrphostin AG490 über antioxidative Effekte protektiv auf das Umgebungsgewebe zu wirken [134, 154, 155]. In der Niere schützte Tyrphostin AG490 experimentell vor oxidativem Stress, akutem Nierenversagen, einer Ischämie-Reperfusionstörung, vor Nephrotoxizität und Sepsis [154, 156-158]. In extrarenalen Tiermodellen konnte durch die Gabe von Tyrphostin AG490 niedrigere Inflamationslevel bei rheumatoider Arthritis sowie ein verminderter Leberschaden nach LPS-induziertem Schock erzielt werden [159, 160]. Außerdem zeigte sich nach Lungentransplantation seltener eine akute Abstoßungsreaktion [153]. Am malignen Mausmodell unterdrückte die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 das Wachstum und die Progression von Tumoren [136, 152, 161].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Tyrphostin AG490 auf die sich entwickelnde Niere mit unilateraler Ureterobstruktion untersucht.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf den bisherigen Forschungsergebnissen zum Pathomechanismus obstruktiver Uropathien sollen folgende Fragen beantwortet werden:

Welche Rolle spielt der Transkriptionsfaktor STAT3 in Bezug auf Inflammation, Apoptose und Fibrosebildung nach einer neonatalen unilateralen Ureterobstruktion?

Kann die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 die obstruktiven Uropathie im neonatalen Mausmodell positiv beeinflussen? Kommt es durch die therapeutische Blockade zur Reduktion von Inflammation, Apoptose und interstitieller Fibrose in der neonatalen Niere?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden neugeborene Wildtypmäuse des Inzuchtstammes Charles River 57/ Black 6 (C57BL/6J) vom französischen Lieferanten Janvier (53941 St. Berthevin Cedex) bezogen. Die Durchführung aller tierexperimentellen Versuche erfolgte auf Grundlage der Genehmigung durch das Regierungspräsidium Oberbayern (ROB 55.2-1-54-2531-90-10).

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in der zentralen Versuchstierhaltung der Innenstadt München. Dort wurden die Mäuse unter artgerechten, standardisierten und speziell pathogenfreien Bedingungen bei einer Raumtemperatur von durchschnittlich 22°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55% gehalten. Der Tag-Nacht-Rhythmus erfolgte durch gesteuerte Lichtphasen im Wechsel von 12 Stunden. Die Raumtemperatur war konstant bei 20-22°C. Die neugeborenen Mäuse wurden zusammen mit ihrem Muttertier in autoklavierten Polyetherimid-Käfigen (bluline Typ II long; Tecniplast, Hohenpreißenberg) untergebracht. Diese waren mit Einstreumaterial aus rindenfreiem Fichtenholz (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest), sowie einem roten Häuschen (EBECO), mit Nistmaterial und Weichholzstücken (Ssniff GmbH, Soest) als Nagematerial ausgestattet. Über den gesamten Beobachtungszeitraum, vom ersten bis zum maximal 14. Lebenstag, wurden die neugeborenen Mäuse vom Muttertier gestillt. Sowohl Futter (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) als auch Trinkwasser waren autoklaviert und standen dem Muttertier ad libitum zur Verfügung. Die Bestandteile des Futters waren prozentual festgelegt (19% Rohprotein, 3,3% Rohfett, 4,9% Rohfaser, 6,4% Rohasche). Außerdem wurden Vitamin A, D₃, E und C sowie Kupfersulfat substituiert.

2.2 Mikrochirurgische Operationstechnik der UUU

Der operative Eingriff der mikrochirurgischen unilateralen Ureterobstruktion (UUO) erfolgte am 2. Lebenstag bei neugeborenen Mäusen. Die Operation wurde unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000-C; Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Unter einer Inhalationsnarkose durch einen Verdampfer (Völker GmbH, Kaltenkirchen) mit Isofluran (Florene; Abott, Wiesbaden) und Sauerstoff wurde das Abdomen der neugeborenen Mäuse durch eine linksseitige, laterale Laparotomie eröffnet. Anschließend wurde der linke Ureter freipräpariert, dargestellt und am ureteropelvinen Übergang mit einem Seidenfaden der Stärke 8,0 mm (Perma-Hand Seide, Ethicon GmbH) doppelt und vollständig ligiert. Im Anschluss wurde das Abdomen mit fortlaufender Naht wieder verschlossen. Die von der Ligatur betroffene linke Niere wird als UUO-Niere und die „intakte“ kontralaterale Niere als IO (=intact opposite) bezeichnet.

In der Kontrollgruppe wurde am 2. Lebenstag eine Laparotomie als Scheinoperation (= Sham) durchgeführt. Nach Darstellung des linksseitigen Ureters erfolgte keine Ligatur, sondern der Verschluss der Bauchdecke.

2.3 Studienprotokoll

2.3.1 Tyrphostin AG490 - Behandlungsgruppe versus Kontrollgruppe

Gemäß dem Studienprotokoll wurde am 2. Lebenstag bei der Hälfte der Versuchstiere eine unilaterale Ureterobstruktion durchgeführt, während die andere Hälfte eine Laparotomie (Scheinoperation) erhielt. Eine weitere Differenzierung erfolgte durch die Behandlungsart: Versuchstiere beider Operationsverfahren wurden sowohl der Tyrphostin AG490 Behandlungs- als auch der Kontrollgruppe zugeteilt. Die Gruppeneinteilung erfolgte am Operationstag. Der Behandlungsgruppe wurde vor der OP ab dem 2. Lebenstag 10 mg pro kg Körpergewicht STAT3-Inhibitor Tyrphostin AG490 subkutan appliziert. Die Kontrollgruppe erhielt eine Injektion mit Vehikellösung. Im Zeitraum zwischen OP-Tag und Organentnahme wurde die subkutane Behandlung alle 24 Stunden wiederholt. Die Organentnahme wurde am 3., 7. bzw. dem 14. Lebenstag durchgeführt, was dem 1., 5., oder 12. postoperativen Tag entspricht.

a)				
Organentnahme	Behandlungsgruppe AG490, n = 48		Kontrollgruppe Vehikel, n = 48	
	UUO/ IO	Sham	UUO/ IO	Sham
3. Lebenstag	8	8	8	8
7. Lebenstag	8	8	8	8
14. Lebenstag	8	8	8	8

b)				
Organentnahme	Behandlungsgruppe AG490, n = 18		Kontrollgruppe Vehikel, n = 18	
	UUO	Sham	UUO	Sham
3. Lebenstag	3	3	3	3
7. Lebenstag	3	3	3	3
14. Lebenstag	3	3	3	3

Tabelle 1: Gruppeneinteilung a) Immunhistochemie, b) Westernblots; UUO, IO (=Intact opposite) und Sham (=Scheinoperiert); n= Anzahl der Nieren;

Wie in Tabelle 1 dargestellt wurden zu jedem der 3 Zeitpunkte von der Behandlungsgruppe und der Kontrollgruppe jeweils 8 UUO-Nieren und deren 8 intakte kontralaterale Nieren (IO= intact opposite) sowie 8 scheinoperierte Nieren für die Immunhistochemie gewonnen. Von den scheinoperierten Nieren wurde dabei pro Tier jeweils nur eine Niere für die Immunhistochemie ausgewertet. Äquivalent erfolgte für die Westernblots zu jedem der 3

Zeitpunkte die Entnahme von jeweils von mindestens 3 UUO-, IO- und scheinoperierten Nieren.

2.3.2 Applikation von Tyrphostin AG490

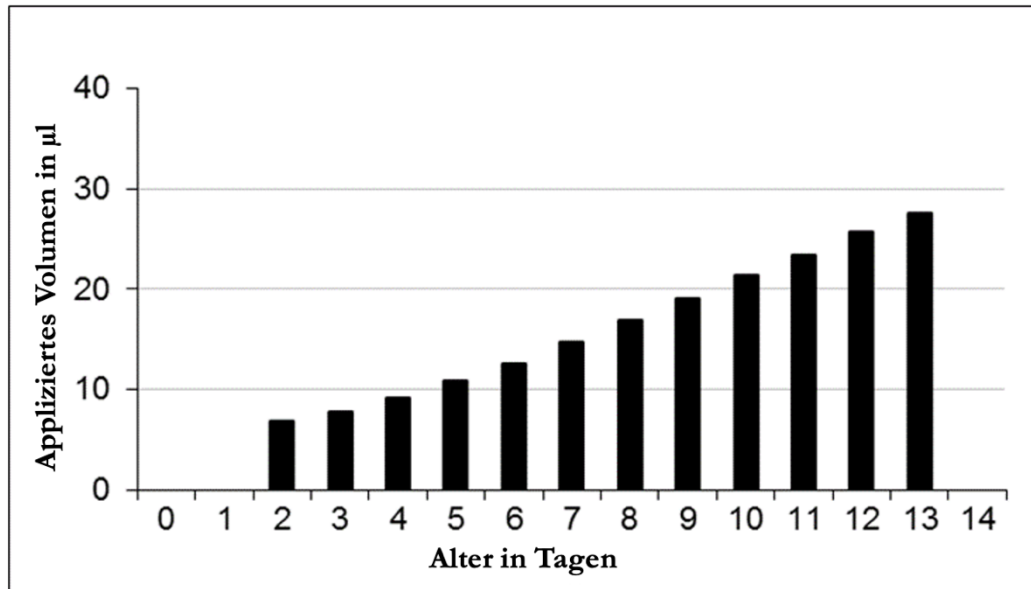


Abbildung 13: Durchschnittliche Applikationsvolumina der täglichen subkutanen Tyrphostin AG490 Injektionen

Die Injektionslösung der Behandlungsgruppe bestand aus 5 mg Tyrphostin (Sigma Aldrich, Steinheim), das in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Adrich, Steinheim) gelöst und dann mit 1,22 ml 0,9%-igem NaCl (Braun Melsungen AG, Melsungen) verdünnt wurde. Die Vehikellösung setzte sich aus 1 ml DMSO und 1,22 ml 0,9% NaCl-Lösung zusammen. Die Applikation erfolgte gewichtsadaptiert in die Nackenfalte der neonatalen Mäuse. Zur exakten Dosierung der Volumina (7-28 µl/d) erfolgte eine tägliche Kontrolle des Körpergewichts (Waage, EMB 2000-3; Kern, Buchholz). Zur präzisen Injektion wurden Hamilton-Spritzen (Typ Microliter 800 RN, 50 µl; Hamilton, Bonaduz, Schweiz) verwendet, die mit speziellen Nadelkanülenstärken (26 G, piont Style2, Länge 10mm) ausgestattet waren. Mit der ersten Applikation wurde direkt vor der OP (2. Lebenstag) begonnen. Anschließend wurden die subkutanen Applikationen täglich, im Zyklus von 24h bis zum Zeitpunkt der Organentnahme wiederholt. (Abb.13)

Die täglichen Injektionen wurden von den Mäusen gut vertragen und es traten keine relevanten Nebenwirkungen auf. Im zweiwöchigen Beobachtungszeitraum konnte bezüglich der Körpergewichtsentwicklung, der Motorik und des Sozialverhaltens kein Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

2.3.3 Organentnahme

Die Nieren wurden nach cervikaler Dislokation am 1., 5. oder 12. postoperativen Tag entnommen. Diese Zeitpunkte entsprachen dem 3., 7. oder 14. Lebenstag der Mäuse. Nach Freipräparation wurden die Nieren von Gefäßen, Ureter und Kapsel getrennt und gewogen. Anschließend wurden die Nieren für die histomorphologische Analyse zur Fixierung für 24 h in 4%-iger Formaldehydlösung gelegt, bzw. die Nieren für die Westernblots bei -80°C gelagert. (Abb.14)

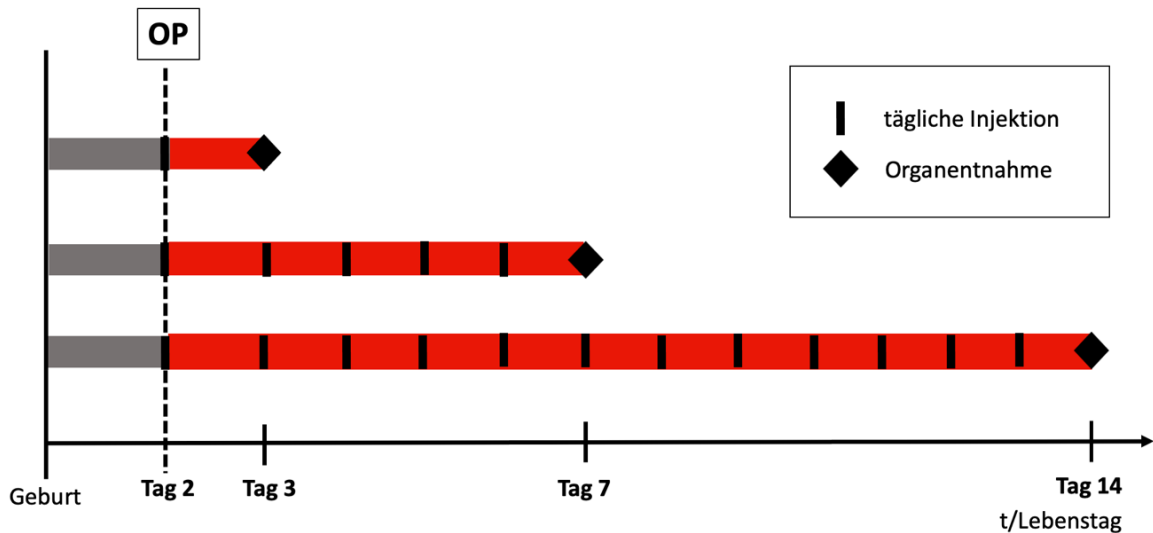


Abbildung 14: Versuchsplan: Operative Ureterligatur (UUO) am 2. Lebenstag, anschließend tägliche Injektion von Tyrphostin AG490 bzw. Vehikellösung. Die Organentnahme erfolgte am 3., 7., und 14. Lebenstag.

2.4 Histomorphologische Methoden

2.4.1 Paraffineinbettung der Organe

Nach Fixierung in 4%-iger Formaldehydlösung für 24h wurden die Nieren bis zur weiteren Prozessierung, jedoch mindestens für 24h, in 70%-iger Ethanollösung aufbewahrt. Als Vorbereitung zur Paraffineinbettung wurden die Organe in eine aufsteigende Alkoholreihe gelegt: zweimal je 30 min in 96% Ethanol und zweimal je 45 min in 99% Ethanol. Anschließend wurden sie für 45 min in Xylol gelegt. In der Organkassette (Sanova, Wien) wurden die jeweiligen Nierenpaare so ausgerichtet, dass die beiden Nierenhili zueinander zeigten, und zentral in der Einbettkassette positioniert waren. Mit Hilfe der Paraffinausgießstation wurden die Einbettkassetten randvoll mit flüssigem Paraffin gefüllt. Die Temperatur des Paraffinbads betrug ca. 60 °C. Anschließend härteten die Paraffinblöcke

zunächst auf einer Kühlplatte (EG 50 C; Leica, Nussloch) bei -5°C und dann bei Raumtemperatur vollständig aus.

2.4.2 Herstellung von Mikroschnitten

Um die Nieren für immunhistologische Schnitte vorzubereiten, wurden die Organblöcke im nächsten Schnitt mit Hilfe des Rotationsmikrotoms (RM2255; Leica, Nussloch) geschnitten. Die Schichtdicke der angefertigten Schnitte betrug $3\ \mu\text{m}$. Um die hauchdünnen Paraffinschnitte vollständig zu entrollen und zu glätten wurden sie für wenige Sekunden in ein Wärmebad (H 1220; Leica, Nussloch) mit einer konstanten Temperatur von $37\ ^{\circ}\text{C}$ gegeben. Anschließend wurden je 2 Schnitte auf einen Objektträger aufgezogen und platziert. Danach lagerten die Objektträger für mindestens 12 h im Trockenschrank (MiniOven MK II; MWG Biotech, Ebersberg). Die endgültige Aufbewahrung der Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur.

2.4.3 Immunhistochemische Färbung von Makrophagen

Die Infiltration von Makrophagen in die neonatalen Nieren nach UUO wurde mittels einer immunhistochemischen Färbung nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mithilfe eines Anti-Galectin-3 Antikörpers. Galectin-3 wird von profibrotischen Makrophagen im Zytoplasma exprimiert [162]. Zu Beginn der Färbung erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte durch Lagerung (zweimal für je 5 Minuten) in Dewax und anschließend (dreimal für je 5 Minuten) in Aqua destillata. Nach einer gründlichen Spülung mit Leitungswasser erfolgte eine Permeabilisierung der Schnitte in 100% Methanol bei -20°C für 15 Minuten. Daraufhin wurden die Nieren für 5 Minuten in PBS gelagert. Zur Antigen-Demaskierung der Oberflächenproteine wurden die Schnitte im Dampfdrucktopf bei 125°C für 4 Minuten mit Citratpuffer (0,01 M; pH 6) behandelt. Nach einer 18-minütigen Abkühlung erfolgte eine weitere Waschung mit PBS für 5 Minuten. Nach der Neutralisierung der Schnitte in 3% H_2O_2 in Methanol für 10 Minuten, schloss sich erneut eine zweimalige Waschung in PBS für je 5 Minuten an. Zum Blocken wurden die Schnitte für 10 Minuten mit 1% BSA in PBS mit normalem Pferdeserum (5,4 ml PBS, 600 ml 10% BSA, 3 Tropfen Serum) inkubiert. Der Erstantikörper Anti-Galectin-3 Antikörper (rat-anti mouse; #Cedarlane, Kanada) wurde mit einer Konzentration von 1:400 - 1:600 in PBS gelöst. Anschließend wurden die Objektträger für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Antikörper inkubiert. Auf die Negativkontrollen wurde zeitgleich nur die PBS-Lösung ohne Antikörper gegeben. Nach zwei weiteren Waschungen mit PBS für je 5 Minuten wurde der biotinylierte Zweitantikörper goat anti rat I (#Southern Biotech, Alabama) in einer Konzentration von 1:100 mit PBS auf die Nieren pipettiert. Die Inkubation des Zweitantikörpers erfolgte 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Schnitte erneut (zweimal für je 5 Minuten) in PBS gelagert. Zur Verbesserung der Farbintensität der Makrophagen wurden die Schnitte für 30 min mit Avidin/Biotin behandelt. Im Anschluss wurden die Objektträger erneut zweimal für 5 Minuten in PBS gewaschen. Zur enzymatischen Sichtbarmachung wurden die Schnitte für 3

Minuten mit Dako DAB inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine gründliche Waschung der Objektträger für zweimal 5 Minuten in Leitungswasser. Zur Gegenfärbung des Nierenparenchyms wurden die Schnitte für > 5 Minuten in 0,05% Methylenblau gelagert. Folgend durchliefen sie eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70%, 96% und 100% Ethanol, bevor sie zweimal für je 5 Minuten in Xylol getaucht wurden. Als letzter Schritt erfolgte die Eindeckelung der entwässerten Schnitte mit Eukitt. Die Auswertung der Makrophageninfiltration erfolgte verblindet unter dem Mikroskop (Leica DM 1000) bei 400-facher Vergrößerung. Pro Niere wurden die interstitiellen, dunklen Makrophagen in 20 sich nicht-überlappenden Feldern mit Hilfe eines Rasters ausgezählt. Je nach Lokalisation wurden die Galectin-3 positiven Zellen den Kompartimenten Tubuli, Glomeruli und Interstitium zugeteilt.

2.4.4 Immunhistochemische Färbung von Kollagen-I Fasern

Die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose erfolgte mithilfe der immunhistochemischen Färbung von Kollagen-I. Die Vorbereitung der Schnitte erfolgte analog zu 2.4.3.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper, Anti-Kollagen-I Antikörper (anti-goat; #Southern Biotech, Alabama), erfolgte in einer Konzentration von 1:500 für 3 Stunden bei Raumtemperatur. Zeitgleich wurden die Kontrollen mit der gleichen Lösung jedoch ohne den Antikörper inkubiert. Nach einer weiteren zweimaligen Waschung im PBS für je 5 Minuten wurde der biotinylierte Zweitantikörper donkey-anti-goat (#Santa Cruz, Heidelberg) in einer Konzentration von 1:400 auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubationszeit des Zweitantikörpers betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Erneut wurde zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen.

Für die folgenden Schritte der Färbung wurden Reagenzien des Histostain-Kits verwendet. Zur Erhöhung der Farbintensität wurden die Objektträger für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Streptavidin-Konjugat behandelt. Nach einer weiteren zweimaligen Waschung für je 5 Minuten in PBS, erfolgte die Rotfärbung des Kollagen-I. Diese erfolgte mit einer Inkubation in Chromogen-Substrat (bestehend aus 1 ml Aqua dest. und jeweils einem Tropfen von Lösung 3A, 3B und 3C) für mehr als 8 Minuten. Anschließend wurde wieder zweimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Zur Gegenfärbung des Nierenparenchyms wurden die Objektträger für maximal 8 Minuten in Hematoxylin eingelegt. Daraufhin erfolgte für ca. 10 Minuten eine gründliche Waschung mit Leitungswasser. Abschließend wurden die Objektträger mit Eukitt eingedeckelt. Die Auswertung der Kollagen-I Färbung in den neonatalen Nieren erfolgte unter dem Mikroskop (Leica DM 1000) verblindet bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Rasters von 10x10 Kästchen. Pro Niere wurden in 20 sich nicht-überlappenden Gesichtsfeldern die Kollagen-I positiven Rasterfelder ausgezählt.

2.4.5 Westernblots

Die Expression von Galectin-3 und PDGFR- β sowie die Aktivierung von Caspase-8 (aktiviertes Spaltprodukt, 45 kDa) in der neonatalen Mausniere wurde mithilfe von Westernblots gemessen.

Zunächst wurden die Nieren in einem Proteinlysepuffer (Tris 50 mM, 2% SDS, 1mM Na₂VO₂) homogenisiert, der Proteinaseinhibitoren (Complete Mini, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland) und Benzozasen (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) enthielt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 16,000 x g. Mit Hilfe des BCA Kits (Thermo Scientific #23225, Waltham Massachusetts, USA) wurden Proteinmengen von 20 μ g ermittelt und im Gel geladen. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Trennung der Proteine in Polyacrylamidgel bei 160 V für 80 Minuten. Während das Gel lief, wurden bereits das Whatman-Filterpapier und Membranen zugeschnitten und vorbereitet. Für den Blotaufbau wurden 1-2 Lagen Whatmanpapier auf der Anodenplatte angebracht. Darauf folgte die luftblasenfreie Anordnung des Gels und der in Methanol equilibrierten PVDF-Membran (Millipore, Schwalbach, Deutschland). Eine weitere 1-2-schichtige Lage von Whatmanpapier folgte vor der Abdeckung mit der Kathodenplatte. Der Proteintransfer auf die PVDF- Membran erfolgte bei einer Spannung von 80 mA für 90 Minuten. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Im Anschluss wurde die Membran für 1-2 Stunden in TBS-T (Tris-gepufferte Saline) mit 5%-igem Milchpulveranteil geblockt. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (Anti-Caspase-8 AK; #4927S Cell Signaling, Frankfurt/ Anti-PDGFR-Rezeptor- β AK; #4564 Cell Signaling, Frankfurt/ Anti-Galectin-3 AK; #19283 Santa Cruz, Heidelberg) bei 4 °C. Nachdem die Blots dreimal für je 10 Minuten mit 0,05% TBS-T gewaschen wurden, erfolgte für eine Stunde die Inkubation bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Es schloss sich ein weiterer Waschschrift (dreimal je 10 Minuten in TBS-T) an.

Die Darstellung der Proteinbanden erfolgte mit Chemilumineszenz. Hierfür wurden die Membranen für 1-2 Minuten in eine 1:1 Mischung aus Lösung A (12,5 ml 0,1 M Tris pH 8,3; 55 μ l 90 mM pCumarsäure; 125 μ l 250mM Luminol) und Lösung B (12,5 ml 0,1 M Tris pH 8,3; 7,5 μ l 35% Wasserstoffperoxid) getaucht. Die dadurch ausgelöste Chemilumineszenzreaktion wurde durch das Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak, Stuttgart, Deutschland) in einer Dunkelkammer visualisierbar gemacht. Die Expositionszeit des Films variierte je nach Antikörper zwischen Sekunden und Minuten. Mittels Densitometrie wurden die Proteinbanden quantifiziert. Jede einzelne Bande repräsentiert die Proteinexpression in einer Niere.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat®. Die Vergleiche zwischen der Behandlungs- und Kontrollgruppe wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) oder dem multifaktoriellen Turkey Test gezogen. Ein $p < 0,05$ definierte die statistische Signifikanz. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Programm SigmaPlot® genutzt.

2.6 Reagenzien

Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anti- Galectin-3 anti-goat, polyclonal	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Caspase-8 anti-rabbit, polyclonal	Cell Signaling, Frankfurt
Anti-Collagen-I, anti-goat, polyclonal	Southern Biotech, Birming, Alabama, USA
Anti-Galectin-3, rat-anti-mouse IgG monoklonal	Cedarlane, Burlington, Kanada
Anti-PDGF-Rezeptor β , anti-rabbit, monoclonal	Cell Signaling, Frankfurt
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Aqua destilata	Apotheke Innenstadt Universität München
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Dako Cytomation Liquid DAB-Substrat	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
DEWAX	BioGenex, San Ramon, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
donkey-anti-goat IgG Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Ethanol 70%, 96%, 100%	Merck, Darmstadt
Eukitt	Sigma-Aldrich, Steinheim
GAPDH, anti-mouse, monoclonal	DUNN Laobrtechnik, Asbach
Glycin	Applichem, Darmstadt
goat-anti-rat IgG Antikörper, biotinyliert	Southern Biotech, Birming, Alabama, USA
Histostain SP Kit (AEC Broad Spectrum)	Invitrogen, Karlsruhe
Isofluran	Abbott, Wiesbaden
Luminol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Applichem, Darmstadt
Mercaptoethanol- β	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Natrium-ortho-vanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Normal horse Serum	Dianova, Hamburg
PBS pH 7,4	Biochrome AG, Berlin
p-Cumarsäure	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
SDS	Applichem, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tri-natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Tris	Applichem, Darmstadt
Tyrphostin AG 490	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectastain ABC-Elite Standard: HRP	Linaris, Drossenheim
Vector DAB HRP-Substrat	Linaris, Drossenheim
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol	Merck, Darmstadt

3 Ergebnisse

3.1 Morphologie und Histologie

Bereits 24 Stunden nach unilateraler Ureterligatur zeigte sich eine makroskopisch sichtbare Hydronephrose der ureterligierten Niere. Mit der Dauer der Obstruktion nahm die Nierenbeckenerweiterung zu und der Parenchymsaum der neonatalen Niere ab. Nach 12 Tagen Ureterligatur war die UUO-Niere im Vergleich zur kontralateralen Niere deutlich kleiner. Die kontralaterale Niere zeigte dagegen eine kompensatorische Hypertrophie. Mikroskopisch stellten sich Sammelrohre und distale Tubuli in der UUO-Niere dilatiert dar. (Abb.15)

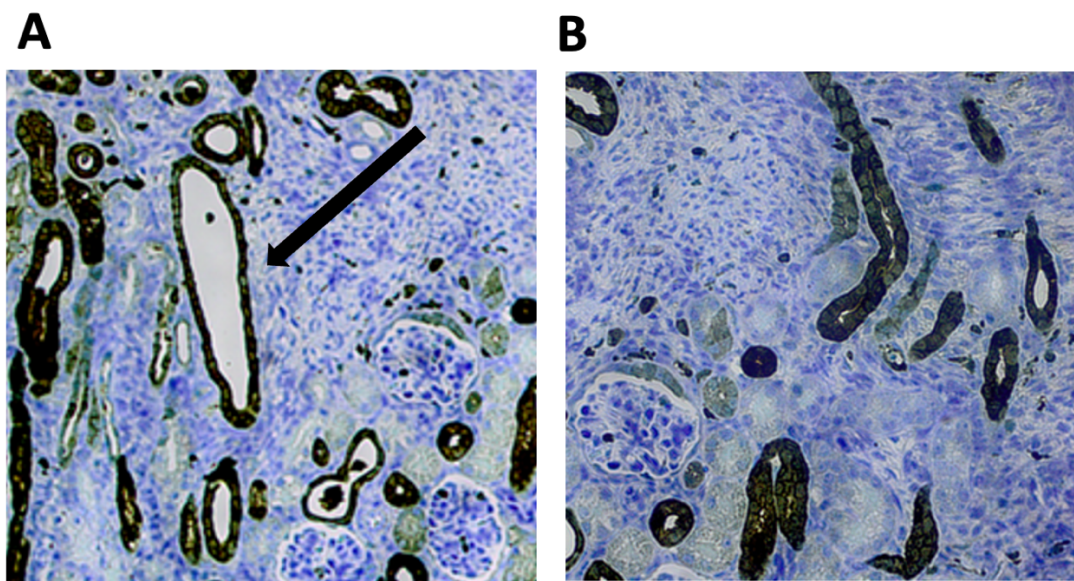


Abbildung 15: Dilatierte Tubuli in UUO-Niere am 7. Lebenstag (A), Sham-Niere am 7. Lebenstag (B): Nach Ureterligatur am 2. LT wurden die Nieren am 7. LT entnommen und immunhistochemisch gefärbt. Darstellbar ist die Dilatation der Tubuli und Sammelrohre in der UUO-Niere (d7) (siehe → in Bild A). In der Sham-Niere zeigt sich dieser Effekt am 7. LT nicht (Bild B).

3.2 Effekte von Tyrphostin AG490 auf profibrotische Makrophagen in der neonatalen UUO-Niere

Um die Auswirkung einer unilateralen Ureterobstruktion auf die Infiltration mit profibrotischen Makrophagen zu untersuchen wurden die neonatalen Nieren immunhistochemisch mittels Anti-Galectin-3 Antikörper gefärbt und ausgewertet. Die interstitielle Galectin-3 Expression ist ein Marker für die Makrophageninfiltration. Tubuli und Glomeruli exprimieren Galectin-3 konstitutiv. Die Galectin-3 positiven Zellen stellten

sich braun dar und wurden mithilfe eines Rasters in den Tubuli, Glomeruli und im Interstitium ausgezählt. (Tab.2, Abb.16, Abb.17)

	UO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
Tubuli						
3. Tag	273,8 ± 23,2	248,5 ± 28,1	142,9 ± 18,1	123,1 ± 10,8	114,6 ± 9,5	110,9 ± 7,6
7. Tag	332,9 ± 24,7	309,6 ± 13,5	237,6 ± 13,7	235,6 ± 10,0	176,3 ± 7,3	160,3 ± 10,9
14. Tag	395,4 ± 25,7	573,5 ± 47,1	319,6 ± 26,5	329,5 ± 29,9	186,0 ± 11,6	176,5 ± 11,2
Interstitium						
3.Tag	41,1 ± 3,7	50,3 ± 4,9	22,3 ± 4,0	19,8 ± 3,1	23,6 ± 2,6	17,5 ± 2,6
7. Tag	95,4 ± 12,3	122,6 ± 12,1	30,0 ± 2,5	24,4 ± 2,0	16,1 ± 1,8	17,5 ± 2,0
14. Tag	228,9 ± 18,2	304,6 ± 55,6	17,8 ± 3,5	19,3 ± 3,8	17,9 ± 2,2	11,5 ± 2,2
Glomeruli						
3. Tag	17,3 ± 2,7	8,9 ± 1,1	13,6 ± 3,1	6,1 ± 1,4	7,9 ± 1,1	8,6 ± 1,4
7. Tag	12,4 ± 1,9	17,9 ± 1,9	19,8 ± 4,1	15,9 ± 2,3	16,9 ± 2,5	13,5 ± 1,8
14. Tag	18,1 ± 3,6	24,0 ± 3,2	11,9 ± 2,3	11,8 ± 2,4	14,4 ± 4,9	10,9 ± 2,7

Tabelle 2: Galectin-3 Expression: Mittelwert ± Standardfehler, UO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle am 3.,7. und 14. Lebenstag

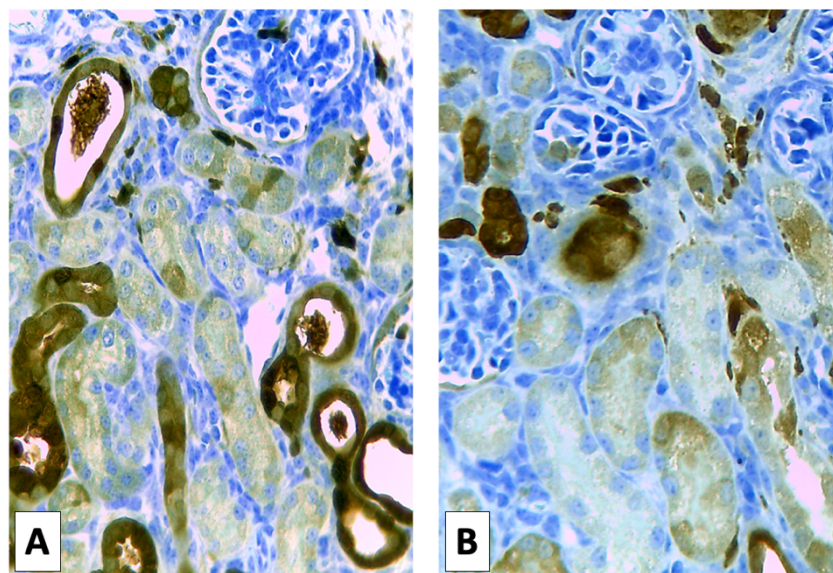


Abbildung 16: Reduktion der Galectin-3 Expression in den Tubuli und im Interstitium der neonatalen UO-Niere durch Tyrphostin AG490. Galectin-3 Expression am 14. Lebenstag in einer UO-Niere nach Behandlung mit Vehikel (A) bzw. Tyrphostin AG490 (B); x 400 vergrößert

3.2.1 Tubuläre Galectin-3 Expression

Zu allen drei Zeitpunkten nach UUO war in den neonatalen Nieren ein signifikanter Anstieg der Galectin-3 Expression in den Tubuli zu verzeichnen. Konkret stieg die tubuläre Galectin-3 Expression in der UUO-Niere am 3. Lebenstag auf das 2,2-fache im Vergleich zur Sham-Niere an (Vehikelgruppe mit $248,5 \pm 28,1$ versus scheinoperierte Mäuse mit $110,9 \pm 7,6$ Galectin-3 positive Zellen; $p < 0,05$). Am 7. Lebenstag zeigte sich eine Zunahme der tubulären Galectin-3 Expression der UUO-Niere auf das 1,9-fache ($309,6 \pm 13,5$ versus $160,3 \pm 10,9$; $p < 0,05$). Am 14. Lebenstag zeigte sich der stärkste Anstieg der tubulären Galectin-3 Expression in der UUO-Niere auf das 3,2-fache ($573,5 \pm 47,1$ versus $176,5 \pm 11,2$; $p < 0,05$). Über den Zeitraum vom 3. bis zum 14. Lebenstag nahm die Galectin-3 Expression in den Tubuli der ligierten Niere um das 2,4-fache zu. Auch in der kontralateralen Niere (IO) zeigte sich eine stetige Zunahme der Galectin-3 positiven Zellen, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als in den ureterligierten Nieren. Am 3. Lebenstag kam es in der IO-Niere zu einer nicht signifikanten Zunahme der tubulären Galectin-3 Expression auf das 1,1-fache im Vergleich zur scheinoperierten Niere ($123,1 \pm 10,8$ versus $110,9 \pm 7,6$). Am 7. Lebenstag stieg die tubuläre Galectin-3 Expression in der IO-Niere signifikant auf das 1,5-fache an ($235,6 \pm 10,0$ versus $160,3 \pm 10,9$; $p < 0,05$). Am 14. Lebenstag war in der IO-Niere eine Zunahme auf das 1,9-fache im Vergleich zur Sham-Niere nachweisbar ($329,5 \pm 29,9$ versus $176,5 \pm 11,2$; $p < 0,05$). In der scheinoperierten Kontrolle zeigte sich über die gesamte Dauer der Ureterligatur ein konstant niedriges Level an Galectin-3 positiven Tubuli.

Im Gegensatz dazu reduzierte die STAT-Blockade mit Tyrphostin AG490 die tubuläre Expression von Galectin-3 in der UUO-Niere. Eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Vehikelgruppe zeigte sich am 14. Lebenstag nach UUO. Zu diesem Zeitpunkt reduzierte Tyrphostin AG490 die tubuläre Galectin-3 Expression signifikant um 34% ($395,4 \pm 25,7$ versus $573,5 \pm 47,1$; $p < 0,05$) (Abb.16 und 17). In den IO-Nieren führte die Behandlung mit AG490 zu einer unveränderten Galectin-3 Expression.

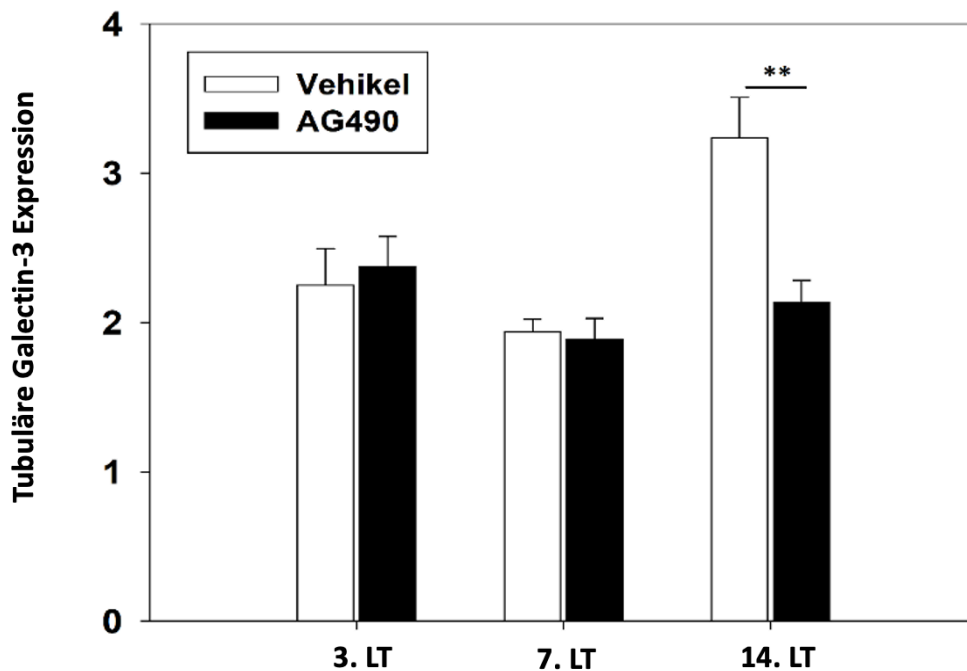


Abbildung 17: Tubuläre Galectin-3 Expression in der neonatalen UUU-Niere. Morphometrische Analyse Galectin-3 positiver Tubulusepithelzellen in UUU-Nieren mit Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebensstag (LT), x-fach bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=8; **p < 0,01

3.2.2 Interstitielle Galectin-3 Expression

Die unilaterale Ureterobstruktion führte zu einer deutlichen Zunahme der interstitiellen Galectin-3 Expression. Konkret zeigte sich am 3. Lebensstag, einen Tag nach unilateraler Ureterligatur, ein signifikanter Anstieg der interstitiellen Galectin-3 Expression auf das 2,9-fache im Vergleich zur scheinoperierten Niere ($50,3 \pm 4,9$ versus $17,5 \pm 2,6$; $p < 0,05$). Am 7. Lebensstag stieg die Anzahl der Galectin-3 positiven Zellen im Interstitium der UUU-Niere signifikant auf das 7-fache an ($122,6 \pm 12,1$ versus $17,5 \pm 2,0$; $p < 0,05$). Der maximale Anstieg wurde am 14. Lebensstag erreicht. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine signifikante Zunahme der interstitiellen Galectin-3 positiven Zellen in der UUU-Niere auf das 26,5-fache im Vergleich zur Sham-Niere ($304,6 \pm 55,6$ versus $11,5 \pm 2,2$; $p < 0,05$). Über den Zeitraum vom 3. Lebensstag bis zum 14. Lebensstag stieg die interstitielle Galectin-3 Expression in der UUU-Niere damit um das 6-fache an. Zusammenfassend zeigte sich nach UUU in der neonatalen Niere eine signifikante Zunahme der interstitiellen Galectin-3 positiven Makrophageninfiltration über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. In den kontralateralen Nieren (IO) war auch ein diskreter Anstieg der Galectin-3 positiven Zellen im Interstitium nachweisbar. Konkret ergab sich am 3. Lebensstag ein Anstieg der interstitiellen Galectin-3 Expression in der IO-Niere auf das 1,1-fache im Vergleich zur

Sham-Niere ($19,8 \pm 3,1$ versus $17,5 \pm 2,6$). Am 7. Lebenstag war in der IO-Niere eine Zunahme auf das 1,4-fache der interstitiellen Galectin-3 Expression nachweisbar ($24,4 \pm 2,044$ versus $17,5 \pm 2,0$; $p < 0,05$). Ein nahezu gleichbleibender Anstieg auf das 1,7-fache zeigte sich am 14. Lebenstag in der IO-Niere ($19,3 \pm 3,8$ versus $11,5 \pm 2,2$).

Die Behandlung mit Tyrphostin AG490 reduzierte signifikant die Anzahl interstitieller Makrophagen in der ureterligierten Niere. Tyrphostin AG490 verminderte die Anzahl der Galectin-3 positiven Zellen in der UUU-Niere am 3. Lebenstag signifikant um 38% ($41,1 \pm 3,7$ versus Vehikelgruppe mit $50,3 \pm 4,9$; $p < 0,05$) und am 7. Lebenstag um 16% ($95,4 \pm 12,3$ versus Vehikelgruppe mit $122,6 \pm 12,1$) im Vergleich zur Sham-Niere. Am 14. Lebenstag zeigte sich die stärkste Reduktion der interstitiellen Galectin-3 Expression um 52% ($228,9 \pm 18,2$ versus Vehikelgruppe mit $304,6 \pm 55,6$; $p < 0,05$) (Abb.18). Sowohl in den scheinoperierten Nieren, als auch in den kontralateralen Nieren (IO) blieb die Zahl der interstitiellen Makrophagen über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant.

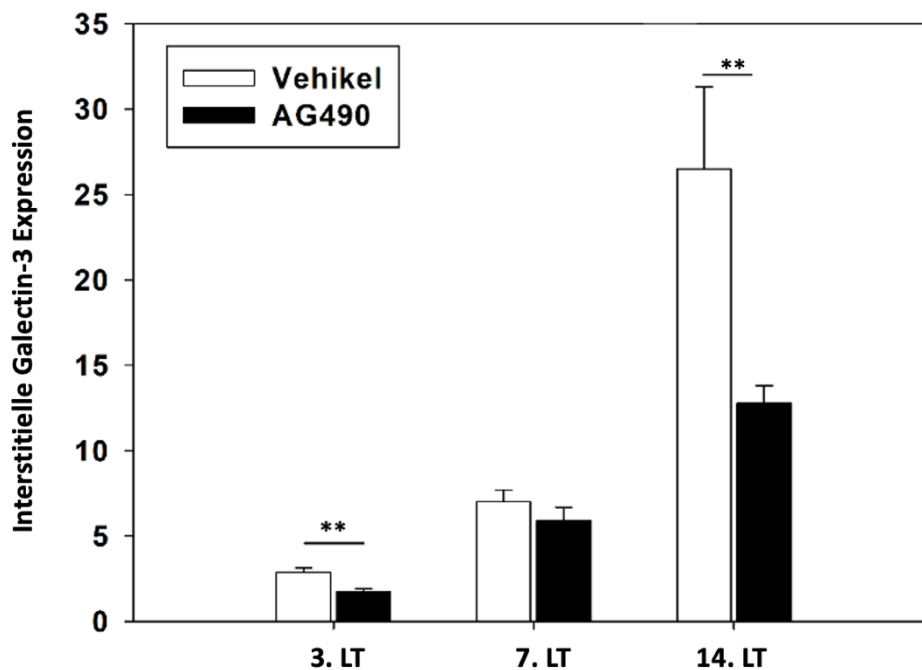


Abbildung 18: Interstitielle Makrophageninfiltration in der neonatalen UUU-Niere. Morphometrische Analyse Galectin-3 positiver Zellen im Interstitium in UUU-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag (LT), x-fach bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=8; ** p < 0,01

3.2.3 Glomeruläre Galectin-3 Expression

Nach UUO zeigte sich auch eine Zunahme der glomerulären Galectin-3 Expression. Während am 3. Lebenstag nur eine dezente Zunahme der glomerulären Galectin-3 Expression in der UUO-Niere zu verzeichnen war, stieg die glomeruläre Galectin-3 Expression in der UUO-Niere am 7. Lebenstag auf das 1,3-fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle an ($17,9 \pm 1,9$ in der Vehikelgruppe versus $13,5 \pm 1,8$ in der Kontrollgruppe). Am 14. Lebenstag zeigte sich ein signifikanter Anstieg der glomerulären Galectin-3 Expression in der UUO-Niere auf das 2,2-fache im Vergleich zur Sham-Niere ($24,0 \pm 3,2$ versus $10,9 \pm 2,7$; $p < 0,05$). Die unilaterale Ureterobstruktion führte somit zu einer deutlichen Zunahme der glomerulären Galectin-3 Expression verglichen mit der scheinoperierten Kontrolle. In den kontralateralen Nieren (IO) zeigte sich am 7. Lebenstag ein diskreter Anstieg der Galectin-3 Expression auf das 1,2-fache ($15,9 \pm 2,3$ versus $6,1 \pm 1,4$) und am 14. Lebenstag auf das 1,1-fache ($11,8 \pm 2,3$ versus $10,9 \pm 2,7$) im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle.

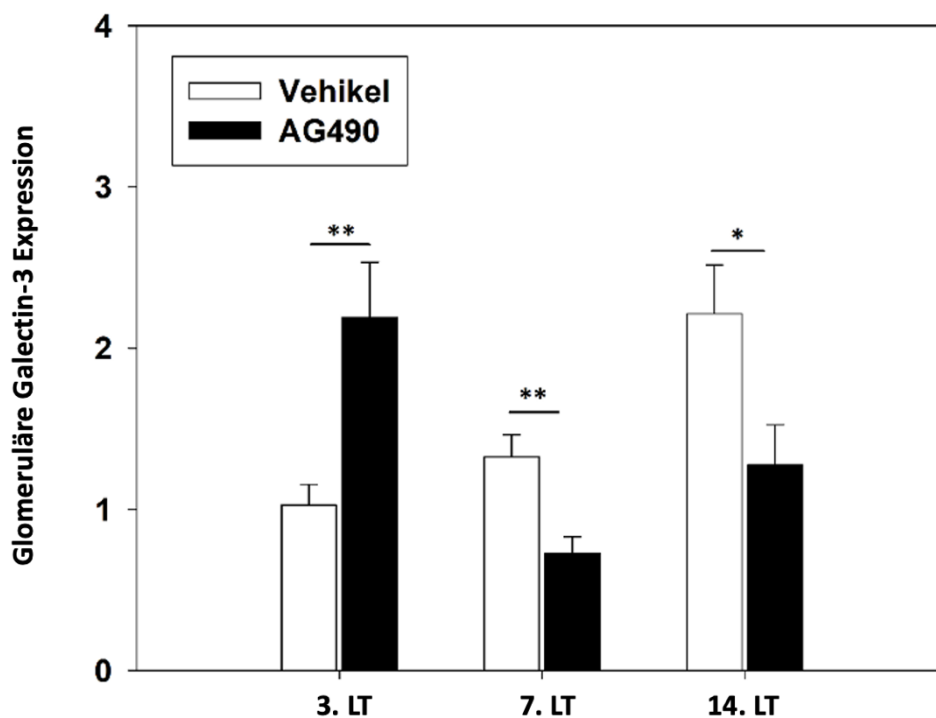


Abbildung 19: Glomeruläre Galectin-3 Expression in der neonatalen UUO-Niere. Morphometrische Analyse Galectin-3 positiver Glomeruli in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag (LT), x-fach bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=8; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Interessanterweise führte die STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 in der UUO-Niere zunächst zu einer signifikanten Zunahme der glomerulären Galectin-3 Expression um 53 % verglichen mit der Vehikelgruppe am 3. Lebenstag ($17,3 \pm 2,7$ versus $8,9 \pm 1,1$; $p < 0,05$).

Im Verlauf war jedoch die glomeruläre Galectin-3 Expression in der Tyrphostin-Gruppe am 7. Lebenstag signifikant um 45% ($12,4 \pm 1,9$ versus $17,9 \pm 1,9$; $p < 0,05$) und am 14. Lebenstag signifikant um 42% ($18,1 \pm 3,6$ versus $24,0 \pm 3,2$; $p < 0,05$) reduziert (Abb.19). Zusammenfassend zeigte sich eine geringe, konstitutive Galectin-3 Expression in den Glomeruli.

3.3 Effekte von Tyrphostin AG490 auf die Kollagen-I Ablagerung in der neonatalen UO-Niere

Um den Effekt der unilateralen Ureterligatur auf die interstitielle Kollagen-I Ablagerung zu untersuchen, wurden die neonatalen Nieren immunhistochemisch mittels Anti-Kollagen-I Antikörper gefärbt und ausgewertet. Infolge der unilateralen Ureterobstruktion kommt es durch die krankhafte Ablagerung von extrazellulärer Matrix zur Bildung interstitieller Fibrose in der Niere. Kollagen-I ist ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix. Die rot gefärbten Kollagen-I Fibrillen waren größtenteils flächenartig und vor allem an der Rinden-Mark-Grenze sowie peritubulär nachweisbar. In den scheinoperierten Nieren hingegen ließ sich das Kollagen deutlich geringer exprimiert vor allem in Gefäßwänden, bzw perivaskulär nachweisen (Abb.21). Die Tabelle 3 zeigt einen Überblick über die Kollagen-I positiven Felder in den Kontroll- und Behandlungsgruppen:

	UO		IO		Sham	
	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel	AG 490	Vehikel
3. Tag	1047,6 ± 146,7	903,8 ± 102,1	509 ± 51,7	620,8 ± 307,2	206,3 ± 41,1	122,3 ± 21,4
7. Tag	637,5 ± 71	752,3 ± 71,5	418,5 ± 67,6	320,3 ± 25,4	403,3 ± 93,8	215,8 ± 28,2
14. Tag	1515 ± 88,2	1568,4 ± 78,2	633,4 ± 153,3	343,3 ± 59,9	380 ± 94,6	305,9 ± 66,9

Tabelle 3: Kollagen-I positive Felder (Mittelwert ± Standardfehler), UO ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle, jeweils am 3.,7. und 14. Lebenstag

Die unilaterale Ureterligatur führte zu einer signifikanten Zunahme der Ablagerung von Kollagen-I Fibrillen. Am 3. Lebenstag zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kollagenablagerung in der UO-Niere auf das 7,4-fache im Vergleich zur Sham-Niere (Vehikelgruppe mit $903,8 \pm 102,1$ versus scheinoperierte Mäuse mit $122,3 \pm 21,4$; $p < 0,05$). Am 7. Lebenstag stieg die Kollagen-I Ablagerung in der UO-Niere signifikant auf das 3,5-fache an ($752,3 \pm 71,5$ versus $215,8 \pm 28,2$; $p < 0,05$). Am 14. Lebenstag war ein signifikanter Anstieg auf das 5,1-fache zu verzeichnen ($1568,4 \pm 78,2$ versus $305,9 \pm 66,9$; $p < 0,05$). Über die gesamte Zeitdauer der Obstruktion (3. - 14. Lebenstag) stieg die Kollagenablagerung in der Vehikelgruppe auf das 1,7-fache an. Auch in den kontralateralen Nieren (IO) kam es zu einer Zunahme der Kollagen-I Expression. Am 3. Lebenstag zeigte sich in der IO-Niere ein signifikanter Anstieg der Kollagen-I Ablagerung auf das 5,1-fache verglichen mit der Sham-Niere ($620,8 \pm 307,2$ versus $122,3 \pm 21,4$; $p < 0,05$). Am 7. Lebenstag stieg die Kollagen-I

Ergebnisse

Ablagerung in der IO-Nieren signifikant auf das 1,5-fache ($320,3 \pm 25,4$ versus $215,8 \pm 28,2$; $p < 0,05$). Am 14. Lebenstag zeigte sich in der IO-Niere nur noch eine Zunahme der Kollagen-I Fibrillen auf das 1,1-fache im Vergleich zur Sham-Niere ($343,3 \pm 60$ versus $305,9 \pm 67$).

Im Gegensatz dazu reduzierte die Behandlung mit Tyrphostin AG490 die Kollagen-I Expression in der neonatalen Niere nach UUO deutlich. Am 3. Lebenstag war die Kollagenablagerung verglichen mit der Vehikelgruppe um 31% reduziert ($1047,6 \pm 145,7$ versus $903,8 \pm 102,1$). Am 7. Lebenstag zeigte sich die größte, signifikante Reduktion der Kollagen-I Ablagerung um 55 % ($637,5 \pm 71$ versus $752,3 \pm 71,5$; $p < 0,05$). Am 14. Lebenstag war die Kollagen-I Ablagerung signifikant um 22 % vermindert ($1515 \pm 88,2$ versus $1568,4 \pm 78$; $p < 0,05$).

Somit führte die STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 zu einer signifikanten Reduktion der interstitiellen Fibrose in neonatalen Nieren mit UUO. (Abb.20, Abb.21)

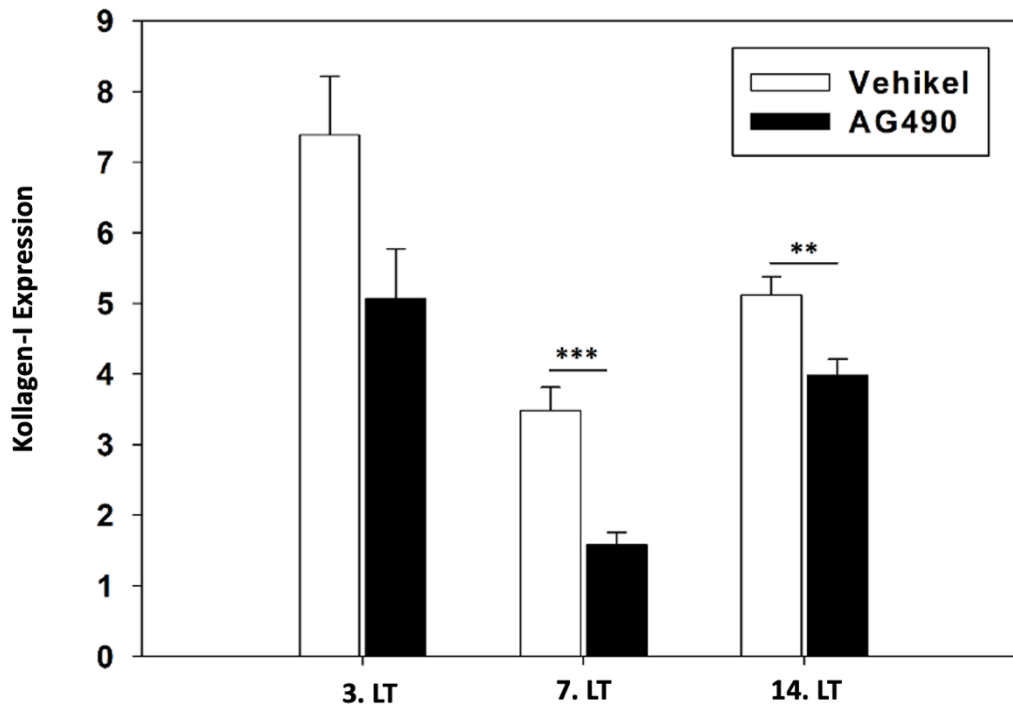


Abbildung 20: Morphometrische Analyse Kollagen-I positiver Felder in der neonatalen UUO-Niere mit Vehikel-bzw. Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag (LT), x-fach bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in 20 Gesichtsfeldern, n=8; ** p < 0,01; *** p < 0,001

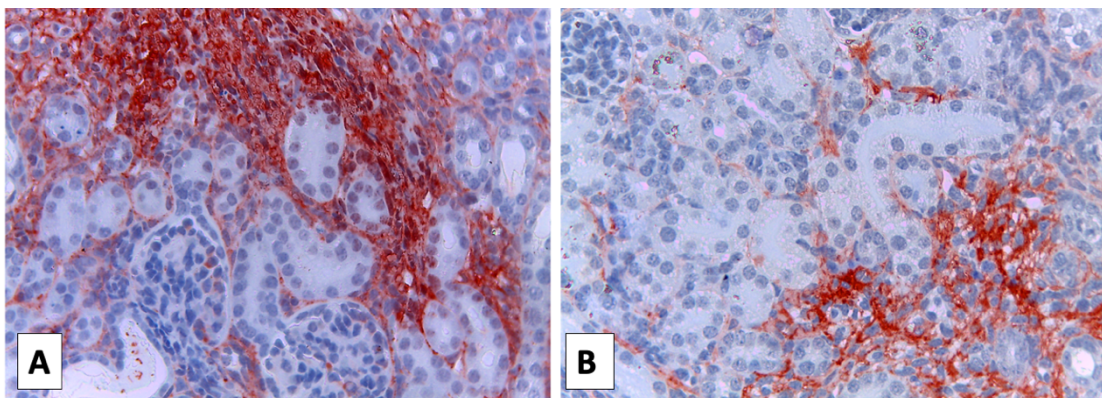


Abbildung 21: Reduktion der Kollagen-I-Expression durch Tyrphostin AG490 in der neonatalen UUO-Niere. Kollagen-I Expression am 14. Lebenstag in einer UUO-Niere nach Behandlung mit Vehikel (A) bzw. Tyrphostin AG490 (B); x 400 vergrößert

3.4 Westernblots

3.4.1 Caspase-8 Aktivierung

Um die Auswirkung der unilatralen Ureterobstruktion auf die Apoptose in den neonatalen Nieren zu untersuchen, wurde die Caspase-8 Aktivierung in der Niere mittels Westernblot ausgewertet. Als aktivierte Initiator-Caspase löst Caspase-8 die Enzymkaskade des programmierten Zelltods aus. Die unilaterale Ureterobstruktion induzierte in der neonatalen Niere eine verstärkte Expression des aktivierten Spaltprodukts Caspase-8 als Ausdruck der gesteigerten Apoptose. Während sich am 3. Lebenstag noch kein Unterschied in der Caspase-8 Aktivierung in der neonatalen UUO-Niere zeigte, kam es am 7. Lebenstag zu einer deutlichen Hochregulation der Caspase-8 Aktivierung auf das 1,5-fache verglichen mit der scheinoperierten Kontrolle. Am 14. Lebenstag zeigte sich in der neonatalen UUO-Niere eine Hochregulation der Caspase-8 Aktivierung auf das 1,4-fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle.

Die Behandlung mit Tyrphostin AG490 führte zu einer Reduktion der Caspase-8 Aktivierung in der ureterligierten Niere neonataler Mäuse. Es zeigte sich eine Reduktion der Caspase-8 Aktivierung um 35% am 7. Lebenstag und um 49% am 14. Lebenstag. Somit reduzierte die JAK2/STAT3-Blockade mittels Tyrphostin AG490 signifikant die Apoptose in der neonatalen UUO-Niere nach. (Abb.22)

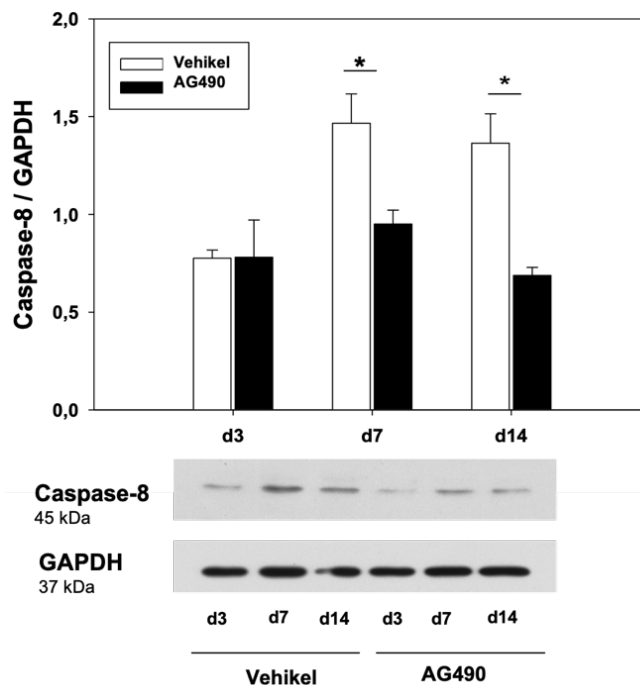


Abbildung 22: Expression von Caspase-8 (A) in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=3; * p < 0,5

3.4.2 PDGF-Rezeptor- β Expression

Um die Auswirkung des PDGF/PDGFR- β Systems auf die Fibrosebildung nach UUO zu prüfen, wurde mittels Westerblot die Expression von PDGF-Rezeptor- β untersucht. PDGFR- β dient dabei als mesenchymaler Marker zur Detektion von Perizyten und gibt Auskunft über die Aktivität des profibrotischen PDGF/PDGFR- β Rezeptor-Liganden-Systems. Am 3. Lebenstag kam es zu keiner Zunahme der PDGFR- β -Expression in den neonatalen UUO-Niere verglichen mit der scheinoperierten Kontrolle. Die Ureterligatur induzierte eine diskrete Hochregulation der PDGFR- β - Expression in der neonatalen Niere auf das 1,2-fache am 7. und 14. Lebenstag im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle.

Die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 führte zu einer unveränderten PDGFR- β -Expression nach unilateraler Ureterligatur. Das bedeutet, dass über den Untersuchungszeitraum von 14 Tagen die STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 keinen Einfluss auf den profibrotischen PDGFR- β Rezeptors hatte. Folglich ist die Reduktion der Fibrose durch die STAT3-Blockade in diesem Zeitraum nicht auf eine verminderte Expression von PDGFR- β zurückzuführen. (Abb.23)

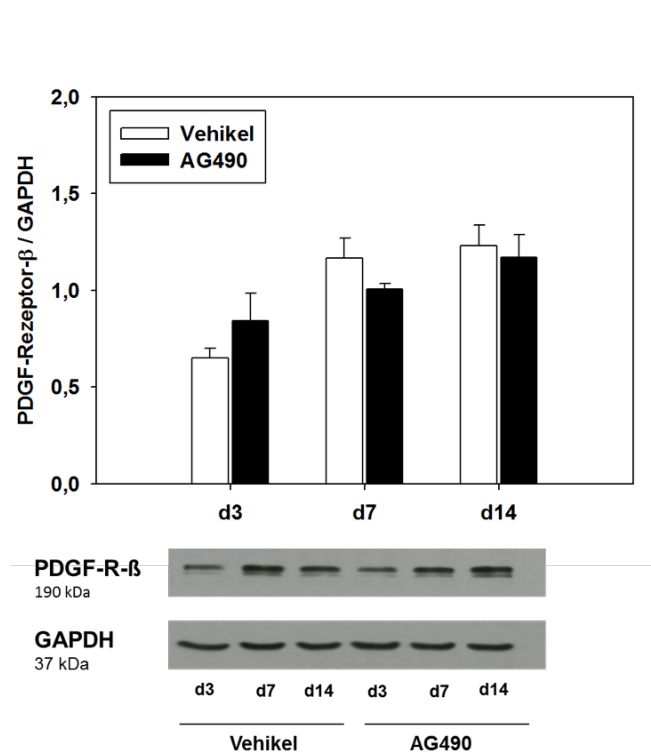


Abbildung 23: Expression von PDGF-Rezeptor- β in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=3

3.4.3 Galectin-3 Expression

Um die Auswirkung der unilateralen Ureterobstruktion auf profibrotische Makrophagen zu untersuchen wurde die Galectin-3 Expression in der Niere mittels Westernblot geprüft. Im Gegensatz zur kompartimentspezifischen (tubulär, interstitiell und glomerulär) Auswertung der immunhistochemischen Färbung (siehe 3.2), wurde mittels Westernblot die Galectin-3 Expression der gesamten Niere gemessen. Am 3. und 7. Lebenstag zeigte sich eine nahezu konstante Galectin-3 Expression in der neonatalen UUO-Niere im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Am 14. Lebenstag zeigte sich eine diskrete Hochregulation der Galectin-3 Expression auf das 1,1-fache in neonatalen UUO-Niere verglichen mit der scheinoperierten Kontrolle.

Die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 führte zu einer unveränderten Galectin-3 Expression nach unilateraler Ureterligatur. Abweichend dazu zeigte sich in unseren immunhistochemischen Ergebnissen eine signifikante Reduktion der Galectin-3 Expression (siehe 3.2.). Eine mögliche Erklärung ist, dass durch die fehlende Kompartimenttrennung der lokale Effekt der Galectin-3 Expression nicht mehr nachweisbar war. (Abb.24)

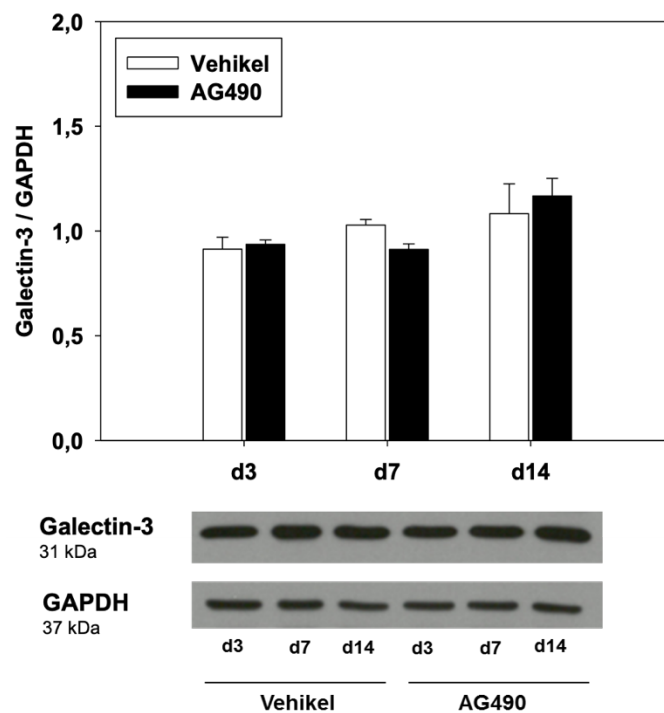


Abbildung 24: Expression von Galectin-3 in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=3

4 Diskussion

Kongenitale obstruktive Uropathien sind eine häufige Ursache chronisch terminaler Niereninsuffizienz im Kindesalter [2]. Pathophysiologisch entscheidend sind dabei die Infiltration der Niere mit Makrophagen, die Inflammation und der Zelltod (Apoptose, Nekrose) in der sich noch entwickelnden Niere, die zum irreversiblen Verlust von Nephronen führen. Der initialen Inflammationsreaktion in der Niere kommt dabei eine entscheidende Bedeutung zu. In der vorliegenden Arbeit wurde am neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie der Effekt einer JAK2/STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 untersucht. Entsprechend der Arbeitshypothese, dass STAT3 Inflammation, Apoptose und Fibrosebildung in der Niere vermittelt, sollte die JAK2/STAT3-Blockade im neonatalen Tiermodell zur Reduktion dieser pathophysiologischen Prozesse führen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die Hypothese und zeigten nach täglicher subkutaner Applikation des JAK2/STAT3- Inhibitors Tyrphostin AG490 eine signifikante Reduktion von Inflammation, Apoptose und interstitieller Fibrose in der neonatalen Niere mit UUO.

4.1 Reduktion von profibrotischen Makrophagen durch Tyrphostin AG490

Makrophagen wandern im Tiermodell der obstruktiven Uropathie nach einer unilateralen Ureterobstruktion als Entzündungszellen in die obstruierte Niere ein [66-68]. Physiologischerweise kommen in der neonatalen Niere nur vereinzelt Makrophagen vor [77]. In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass bereits 24 Stunden nach unilateraler Ureterobstruktion Makrophagen in die neonatalen Niere einwandern. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde die Makrophageninfiltration u.a. immunhistochemisch durch den Nachweis F4/80 positiver Makrophagen erbracht [163]. F4/80 weist eine geringe Selektivität auf und wird von verschiedenen renalen Makrophagen-Subpopulationen (u.a. Monozyten, dendritische Zellen) unterschiedlich stark exprimiert [164, 165]. In der vorliegenden Arbeit wurde die pathophysiologisch relevante Subpopulation der Galectin-3 positiven Makrophagen untersucht. Diese Makrophagensubpopulation fördert über die Sekretion zahlreicher pro-fibrotischer Faktoren (u.a. TFG- β 1, PDGF, CCL18 und Galectin-3) die Aggravierung der Fibrose [68, 74-79]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die unilaterale Ureterobstruktion in der neonatalen Niere zur signifikanten Zunahme interstitieller Makrophagen führte. Bis zum 14. Lebenstag nach UUO zeigte sich ein progredienter Anstieg der interstitiellen Makrophagen auf das mehr als 26-fache im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle. Unsere Ergebnisse sind damit in Übereinstimmung mit Henderson et al., die in adulten UUO-Nieren ebenfalls eine erhöhte Makrophagenzahl nachweisen konnten [75].

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die JAK2/STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 zu einer signifikanten Reduktion Galectin-3 positiver Makrophagen in den

ureterligierten Nieren neonataler Mäuse führt. Bereits 24 Stunden nach Ureterligatur konnte eine Reduktion der interstitiellen Makrophagen um 38% erreicht werden. Am 14. Lebenstag verringerte sich die Makrophagenzahl interstitiell um 52%. Die tubuläre Galectin-3 Expression reduzierte sich am 14. Lebenstag um 34%. Wie kommt die Reduktion Galectin-3 positiver Makrophagen im Interstitium durch die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 zustande?

Der Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert die Expression von Selektinen und Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und Twist-1, die maßgeblich an der interstitiellen Makrophageninfiltration nach UO beteiligt sind [125, 163, 166]. Des Weiteren steigert STAT3 die Transkriptionsaktivität von NF- κ B im Zellkern und erhöht somit die Expressionsrate der für die Makrophageninfiltration relevanten Zielgene [125]. Auch die STAT3-induzierte Expression von Myeloid cell leukemia sequence-1 (Mcl-1) verbessert *in vitro* das Überleben von Makrophagen [129]. Kürzlich konnte auch von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass u.a. auch Uromodulin eine Rolle in der Makrophagenrekrutierung nach UO im neonatalen Mausmodell spielt [69]. Physiologisch wird Uromodulin von Tubulusepithelzellen ins tubuläre Lumen sezerniert. Nach UO kommt es jedoch zur pathologischen Akkumulation von Uromodulin im Interstitium, wo es eine pro-inflammatorische Rolle einnimmt. Als sogenanntes „Damage associated molecular pattern“ (DAMP) erhöht Uromodulin dabei die Gefäßpermeabilität und induziert sowohl die Makrophageninfiltration als auch ihre TNF α - Sekretion [167]. Auch im adulten UO-Mausmodell nahm die Uromodulin-Expression nach Ureterligatur in der Niere zu. Dementsprechend kam es in adulten Uromodulin-Knockout Mäusen zu einer deutlich reduzierten Inflammation nach UO [168]. Extrarenal konnte durch intraperitoneale und intraskrotale Injektion von Uromodulin eine Makrophageninfiltration *in vivo* induziert werden [69]. Die Uromodulin-induzierte Erhöhung der Gefäßpermeabilität führt dabei ebenfalls zur Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen [167]

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass die STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 in der neonatalen Niere die Produktion und Sekretion von Chemokinen der Makrophagenrekrutierung wie CCL2 (MCP-1) und CCL5 (RANTES) reduziert. Auch in der Vergangenheit konnte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen, dass neonatale ICAM-1/RAGE-Knockout-Mäuse nach UO eine deutliche Reduktion des profibrotischen Makrophagenmarkers Galectin-3 im Vergleich zu Wildtypmäusen aufweisen [89]. Weitere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Blockade des Chemokin-1-Rezeptors durch BX471 die neonatale Makrophageninfiltration ebenfalls erfolgreich hemmt [58]. Im adulten Mausmodell der UO hemmte sowohl die STAT3-Blockade mit Paclitaxel als auch mit S3I-201 und Mefundione die Makrophageninfiltration [147, 166]. Dabei konnte mit Mefundione die Anzahl der infiltrierenden Makrophagen nach UO um bis zu 60% reduziert werden [95]. Des Weiteren erzielte das Knockout des Adhäsionsmolekül Osteopontin in adulten UO-Nieren eine um bis zu 75% verminderte

Makrophageninfiltration [169]. Auch der JAK2-Inhibitor Ruxolitinib reduzierte die Expression von CCL2 und reduzierte somit die Makrophageninfiltration in adulten UUO-Nieren [170].

Auch in anderen renalen Krankheitsmodellen wie im Mausmodell des Diabetes Typ I reduzierte der STAT3-Knockdown die renale Makrophageninfiltration [137]. Im Rattenmodell der nephrotoxischen Nephritis bewirkte sowohl die selektive Blockade des ICAM-1 Rezeptors als auch die Blockade von NF- κ b eine verminderte Makrophageninfiltration [73, 171]. Auch im Rattenmodell der diabetischen Nephropathie reduzierte der STAT3-Inhibitor Nifuroxazide die interstitielle Makrophageninfiltration in der Niere [172].

Zusammenfassend basiert die Reduktion der Makrophageninfiltration im neonatalen Mausmodell durch Tyrphostin AG490 vermutlich auf einer reduzierten Expression von pro-inflammatorischen Adhäsionsmolekülen und Chemokinen.

Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen haben eine Vielzahl vorangegangener Studien belegt, dass unterschiedlichste Inhibitionsmodelle der Makrophageninfiltration (u.a. die Blockade von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen oder die systemische Depletion von Makrophagen) die Inflammation und Fibrose nach unilateraler Ureterobstruktion reduzieren [76, 173]. Es wird vermutet, dass Makrophagen insbesondere zum späteren Zeitpunkt nach einer obstruktiven Uropathie eine anti-fibrotische, protektive Rolle einnehmen könnten. Nishida et al. vermuten, dass sich der anti-fibrotische Effekt der Makrophagen erst ab Tag 14 nach UUO im adulten Mausmodell zeigt [174]. Auch der experimentelle Transfer von Galectin-3 positiven Makrophagen wirkte sich protektiv auf die renale Fibrosebildung aus [77]. Die Heterogenität und Plastizität der Makrophagen bedingen hier möglicherweise die große Bandbreite ihrer funktionellen Rolle [175, 176]. Neben dem Umgebungsmilieu ist wahrscheinlich der Zeitpunkt nach UUO und der Ursprung der Makrophagen (embryonaler Dottersack, Knochenmark oder Milz) entscheidend für die funktionelle Makrophagenrolle [73, 177-179]. Zusammenfassend kann man im Entzündungsprozess der unilateralen Ureterobstruktion von einer Ko-Existenz funktionell divergierender Makrophagensubpopulationen ausgehen, die sowohl eine reparative als auch eine pro-fibrotische Rolle besitzen [75].

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die JAK2/STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 im neonatalen Mausmodell der obstruktiven Uropathie die Infiltration interstitieller Galectin-3 positiver Makrophagen reduzierte. Somit schützte Tyrphostin AG490 vor tubulointerstitieller Inflammation und makrophageninduzierter Fibrose in der neonatalen Mausniere mit obstruktiver Uropathie.

4.2 Reduktion der renalen Apoptose durch Tyrphostin AG490

Die Apoptose nach unilateraler Ureterobstruktion stellt die Hauptursache für das massive Tubulusepithelzelldefizit in der neonatalen Niere dar [83]. Im Vergleich zu adulten Nieren ist die tubuläre Apoptose in neonatalen Nieren nach UUO deutlich stärker ausgeprägt [85, 87]. Die gesteigerte Apoptose hemmt zum einen die physiologische Nephrogenese, zum anderen sind Kompensations- und Regenerationsmechanismen in der neonatalen Niere noch mangelhaft ausgebildet [85, 180]. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass neonatale Mäuse mit einer reduzierten Nephronanzahl aufgrund einer transitorischen partiellen Ureterobstruktion die Glomerulogenese nicht mehr aufnehmen konnten und sogar noch weiter an Nephronmasse verloren [36]. Der apoptotische Verlust von Nephronmasse, die tubuläre Atrophie und das limitierte Regenerationspotential der neonatalen Niere erklären die progrediente Niereninsuffizienz [53].

In der vorliegenden Arbeit wurde der selektive Apoptosemarker Caspase-8 untersucht. Das aktivierte Spaltprodukt von Caspase-8 induziert als zentraler Bestandteil des extrinsischen Apoptosewegs die kaskadenartige Aktivierung der Effektorcaspasen, die letztendlich den Zelltod herbeiführen [84]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine signifikante Zunahme der Caspase-8 Aktivierung in der neonatalen Mausniere nach UUO. Übereinstimmend damit konnte auch im adulten UUO-Modell eine deutliche Zunahme der Apoptose vor allem in den Tubuli und in geringerem Ausmaß auch im Interstitium und in den Glomeruli gezeigt werden [147, 181]. Auch immunhistochemisch konnte unsere Arbeitsgruppe mittels TUNEL-Assay (Anfärbung von DNA-Fragmenten) eine Zunahme tubulärer Apoptose nach UUO zeigen. Da der TUNEL-Assay einen nicht selektiven Marker für verschiedene Formen des Zelltods (u.a. Apoptose, Nekrose) darstellt, wurde in der vorliegenden Arbeit der selektive Apoptosemarker Caspase-8 untersucht. Durch die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 konnte eine signifikante Reduktion der Caspase-8 Aktivierung um 35% am 7. Lebenstag und um 49% am 14. Lebenstag erreicht werden. Tyrphostin AG490 schützte die neonatalen Nieren vor renaler Apoptose und verbesserte das Zellüberleben v.a. von Tubulusepithelzellen.

Vergleichbar mit diesen Ergebnissen in neonatalen Nieren konnte nach Tyrphostin-Behandlung im adulten Rattenmodell der renalen Ischämie-Reperfusion 24 und 48 Stunden nach dem Ischämieereignis ein signifikanter Rückgang der Apoptose von Tubulusepithelzellen festgestellt werden [182]. Ji et al. zeigten, dass eine Inhibition der TGF- β /Smad-Signalkaskade die Aktivität der Effektorcaspase-3 des extrinsischen Apoptosewegs reduzierte und zu einem besseren Zellüberleben führte [183]. Auch die direkte Inhibition von TGF- β mit Tranilast führte im adulten Mausmodell zu einem Anstieg der tubulären Proliferation und einer Hochregulierung des anti-apoptotischen Faktors Bcl-2 [184]. Über eine indirekte STAT3-Inhibition mit Trichostatin A konnte ebenfalls eine Reduktion der tubulären Apoptose und der Caspase-3 Aktivität im adulten UUO-Modell erzielt werden [185]. In einigen Studien (u.a. am Mausmodell von Ischämie/Reperfusion und

Nephrotoxizität) konnte gezeigt werden, dass die STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 den intrazellulären oxidativen Stress verringert. Dadurch wird sowohl eine Reduktion des anti-apoptotischen Bcl-2 als auch die Aktivierung von pro-apoptotischen Caspasen verhindert und somit das tubuläre und endotheliale Zellüberleben stimuliert [144, 158].

Wie lässt sich der anti-apoptotische Effekt der STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 erklären?

STAT3 ist durch die Regulierung pro-apoptotischer und anti-apoptotischer Faktoren entscheidend an Zelltod und Zellüberleben beteiligt [122, 186]. Nach UUO fördert STAT3 die Expression und Aktivierung zahlreicher pro-apoptotischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$, Angiotensin II und c-Jun. Diese werden in den Tubulusepithelzellen gebildet und induzieren dort renale Apoptose [61, 87]. $\text{TNF}\alpha$ und $\text{TGF-}\beta$ verstärken das pro-apoptotische Signal zusätzlich durch autoaktive STAT3-Aktivierungsschleifen [119, 125]. Auch das Protein p53 wirkt pro-apoptotisch indem es den natürlichen STAT3-Inhibitor SOCS7 hemmt. Dies führt zur Aggravation der renalen Apoptose [187]. Desweiteren reduziert STAT3 die Expression anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-2 [186, 188]. Die therapeutische Blockade der Makrophagenrekrutierung führte ebenfalls zur reduzierten Ausschüttung pro-apoptotischer Zytokine und zur signifikanten Reduktion der tubulären Apoptose [58, 163].

Zusammenfassend reduziert die STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 nach UUO die Apoptose vermutlich durch die Supprimierung pro-apoptotischer und Hochregulierung anti-apoptotischer Faktoren.

Neben der Apoptose stellen die Nekrose und die Nekroptose die wichtigsten Formen des Zelltods nach UUO dar. Es wird sogar vermutet, dass die Nekrose nach UUO zeitlich früher einsetzt als die Apoptose. Unserer Arbeitsgruppe verzeichnete erst ab dem 7. Tag nach neonataler UUO eine Zunahme der Apoptose, die bis zum 14. Tag signifikant zunahm [82]. Das verspätete Einsetzen der Apoptose nach UUO ist eine mögliche Erklärung für unserer Ergebnisse, die erst am 7. Lebenstag einen signifikanten Anstieg der Caspase-8 Aktivierung zeigen. Eine weitere mögliche Erklärung könnte sein, dass neonatale Tubuluszellen erst nach vollständigem Ausreifen der Mitochondrien und dem damit verbundenen Wechsel von glykolytischem zu oxidativem Metabolismus sensitiv genug auf eine UUO-induzierte Hypoxie reagieren und folglich apoptotisch zugrunde gehen [85].

Die beiden Formen des programmierten Zelltods, Apoptose und Nekroptose, unterscheiden sich grundlegend und haben doch gemeinsame Komponenten. Während die Apoptose zur Schrumpfung der Zelle ohne entzündliche Reaktion des benachbarten Gewebes führt, kommt es bei der RIPK3-abhängig regulierten Nekroptose zum Integritätsverlust der Zelle. Durch die Ruptur der Zellmembran werden intrazelluläre, pro-inflammatorische Bestandteile wie Zytokine und DAMPs freigesetzt [189, 190]. Nach UUO fördert STAT3 die Hochregulierung des Zytokins $\text{TNF}\alpha$, das durch die Bindung an den Todesrezeptor

sowohl pro-apoptotisch als auch pro-nekroptotisch wirken kann. Im Ischämie-Reperusionsmodell wirkte sich der RIPK3-Knockdown beispielsweise protektiv auf die Mäuse aus und führte zu einem milderem Krankheitsverlauf [191]. Die JAK2/STAT3-Blockade reduziert möglicherweise über die verminderte Expression von $\text{TNF}\alpha$ auch die Nekroptose. In der vorliegenden Arbeit wurde die Nekroptose nicht untersucht. Das Zusammenspiel von Apoptose und Nekroptose nach UUO sollte zukünftig Inhalt weiterer Untersuchungen sein um die Auswirkungen der STAT3-Blockade besser zu verstehen.

Es wird vermutet, dass der progressive Krankheitsverlauf nach Ureterobstruktion mit dem zunehmenden Verlust der Tubuli und der tubulären Atrophie korreliert und weniger mit dem Ausmaß der glomerulären Schädigung zusammenhängt [61, 88]. Docherty et al. konnten zeigen, dass eine erfolgreiche Reduktion der tubulären Apoptose die adulte Niere im UUO-Modell schützt [81]. Aufgrund des erheblichen Einflusses der Apoptose auf den Krankheitsverlauf werden derzeit der pro-apoptotische Faktor $\text{TNF}\alpha$ und Caspase-Spaltprodukte als Biomarker für das Follow-up von Patienten nach Pyeloplastik bei ureteropelviner Stenose diskutiert [192]. Ein vielversprechender Biomarker für proximale Tubulusschädigung bei obstruktiver Uropathie ist auch das Kidney Injury Molecule 1 (KIM-1). Es handelt sich dabei um ein Transmembranprotein, das an der Phagozytose von apoptotischen und nekrotischen Zellen beteiligt ist [82]. Einiges deutet darauf hin, dass Apoptose-assoziierte Biomarker in Zukunft wichtiger werden und die Apoptosehemmung selbst zur therapeutischen Zielscheibe in der Behandlung obstruktiver Uropathien wird.

4.3 Reduktion der interstitiellen Fibrose durch Tyrphostin AG490

Die Entwicklung interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie stellen die Endstrecke der obstruktiven Uropathie dar und korrelieren mit dem Ausmaß der chronischen Niereninsuffizienz [2]. Im Tiermodell der URO zerstört die massive und unkoordinierte Ablagerung extrazellulärer Matrix die renale Architektur und führt zum irreversiblen Funktionsverlust der Niere [63, 68]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von Kollagen-I als Hauptkomponente extrazellulärer Matrix in der neonatalen Niere gemessen. Kollagen-I ist ein fibrillenbildendes Kollagen, das als strukturbildendes Protein für mechanische Festigkeit sorgt [193]. Die Ablagerung extrazellulärer Matrix konnte vor allem an der renalen Mark-Rinden-Grenze, im Markbereich und peritubulär beobachtet werden. Ein vergleichbares Lokalisationsschema der extrazellulären Matrix wurde auch in der adulten Mausniere nach URO gezeigt [53, 61, 143, 147]. In der vorliegenden Arbeit konnte zu allen Zeitpunkten nach URO eine signifikante Zunahme der Kollagendeposition gezeigt werden. Dies stimmt mit publizierten Daten im adulten Mausmodell der URO überein, die ebenfalls eine deutliche Zunahme der interstitiellen Kollagenablagerung zeigten [147, 194]. Am 3. Lebenstag zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in den URO-Nieren ein stärkerer Anstieg der Kollagen-I Ablagerung als am 7. Lebenstag. Ein möglicher Erklärungsansatz liegt in der physiologischen Nephrogenese. Die Mesenchymzellen des metanephrogenen Mesenchym differenzieren sich zu Tubulusepithelzellen (mesenchymale-epitheliale Transition (MET) und bilden die Nephrone. Zu diesem frühen Zeitpunkt (3. Lebenstag) ist möglicherweise die mesenchymale-epitheliale Transition noch nicht abgeschlossen und der entwicklungsbedingte Pool an Mesenchymzellen in der neonatalen Niere bildet zusätzlich noch Kollagen [195].

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 im neonatalen Mausmodell zu einer signifikanten Reduktion der Kollagen-I Ablagerung führte. Die Kollagen-I Deposition wurde am 7. Lebenstag um 55% und am 14. Lebenstag um 22% reduziert. In Übereinstimmung mit unseren neonatalen Daten wurde im adulten Maus- und Rattenmodell der URO auch eine Reduktion der interstitiellen Fibrose nach therapeutischer JAK2/STAT3-Blockade gezeigt. Pang et al. zeigten, dass die pharmakologische STAT3-Inhibition mit S3I-201 die interstitielle Fibrose in adulten URO-Nieren um bis zu 60% reduziert. Dabei reduzierte die STAT3-Blockade nicht nur die Aktivierung der Fibroblasten, sondern induzierte auch deren Apoptose [147]. Entsprechend führte auch eine STAT3-Blockade durch Mefunidone zu einer reduzierten Expression von Kollagen vom Typ I und III [95]. Eine vergleichbare Reduktion der tubulointerstitiellen Fibrose erzielte die STAT3-Blockade durch Paclitaxel, ein Zytostatikum der Gruppe der Taxane. Zhang et al. berichteten, dass dieser Effekt durch die Inhibition von TGF- β /Smad vermittelt wird [166]. TGF- β ist nach URO hochreguliert und induziert über den Smad-Signaltransduktionsweg die Expression profibrotischer Gene. Auch die direkte Hemmung des TGF- β /Smad Signalswegs durch Specific Inhibitor of Smad 3 (SIS3) reduzierte die

Fibrosebildung im adulten UUO-Modell [183]. Über die JAK2-Blockade mit Ruxolitinib konnte ebenfalls die tubulointerstitielle Fibrose im adulten UUO-Modell reduziert werden [170].

Wie wird die Reduktion der interstitiellen Fibrose durch die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 möglicherweise erzielt?

Im Tiermodell der unilateralen Ureterligatur sind aktivierte Myofibroblasten die Hauptproduzenten extrazellulärer Matrix. Die Zunahme der Myofibroblastenzahl ist abhängig vom Schweregrad und der Dauer der unilateralen Ureterobstruktion [50]. STAT3 reguliert die Proliferation und Aktivierung der Myofibroblasten nach UUO. So fanden Kuratsune et al. am 7. Tag nach unilateraler Ureterobstruktion eine um das 2500-fach erhöhte STAT3-Aktivität in Myofibroblasten im Vergleich zur scheinoperierten Kontrolle [148]. Nach UUO vermittelt STAT3 auch die Expression von pro-fibrotischen Zytokinen. Eine zentrale Rolle kommt dabei dem Zytokin TGF- β_1 zu, das neben der Aktivierung profibrotischer Prozesse eine Hemmung von Kollagenasen und Metalloproteinasen bewirkt [141, 196]. Neben der Aktivierung residenter Fibroblasten koordiniert TGF- β_1 aber auch maßgeblich die Differenzierungsprozesse anderer Zellreihen zu Myofibroblasten. Dabei wandern beispielsweise geschädigte Tubulusepithelzellen über den Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) als Myofibroblasten ins Interstitium ein. Neben den Epithelzellen differenzieren auch Makrophagen, mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks, Endothelzellen und Perizyten zu aktivierten Myofibroblasten [58, 97, 99, 197, 198]. Twist1, ein weiterer wichtiger Regulator der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), wird ebenfalls STAT3-abhängig exprimiert [199]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Inhibition der epithelial-mesenchymalen Transition zur Reduktion der Fibrose führt [58]. Die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 könnte daher durch die reduzierte Expression profibrotischer Stimuli wie TGF- β_1 und Twist-1 die Differenzierungsprozesse, Proliferation und Aktivierung von Myofibroblasten in der neonatalen Niere hemmen.

Zu den Zielgenen von STAT3 gehören sowohl Metalloproteinasen, die für den enzymatischen Abbau der pathologischen Matrixkomponenten zuständig sind, als auch deren Inhibitoren. Campanholle et al. konnten zeigen, dass die JAK2/STAT3-Blockade die Expression von Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) reduziert. TIMP-1 ist ein natürlicher Inhibitor von Metalloproteinasen und zusätzlich für das Zellüberleben von Myofibroblasten wichtig ist [68]. Die Inhibition von TIMP-1 führt somit wahrscheinlich zur verstärkten Aktivierung der matrixabbauenden Metalloproteinasen sowie zu einem Verlust von matrixproduzierenden Myofibroblasten [200]. Der antifibrotische Effekt der STAT3-Blockade wird außerdem über die hochregulierte Expression von Metalloproteasen wie MMP-3 und -13 verstärkt, die extrazelluläre Matrix enzymatisch abbauen und somit protektiv auf die Niere wirken [201]. Neben der Hochregulierung der schützenden, matrixabbauenden Metalloproteasen, hemmt die STAT3-Blockade auch profibrotische Metalloproteasen. Die

profibrotischen Metalloproteinasen MMP-2, MMP-9 und MMP-14 fördern über den Abbau der Basalmembran aktiv den Prozess der Ablösung und Transformation von Tubulusepithelzellen zu Myofibroblasten (EMT) [202, 203]. Matsui et al. konnten bestätigen, dass eine Herunterregulierung der STAT3-abhängigen MMP-9 Expression vor UO-induzierter Fibrose schützt [204]. Auch Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1), ein profibrotischer Regulator der Metalloproteinasen, wird durch die STAT3-Blockade gehemmt [202, 205]. Die JAK2/STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 hemmt daher möglicherweise durch eine gesteigerte Expression von matrixabbauenden Metalloproteinasen (MMP-3 und -13) die Fibrosebildung in der neonatalen Mausniere. Außerdem führt die verminderte Expression von profibrotischen Metalloproteinasen (MMP-2, MMP-9 und MMP-14) und von Metalloproteinaseninhibitoren wie TIMP-1 möglicherweise zur reduzierten interstitiellen Fibrose.

Die UO-induzierte Vasokonstriktion und Gefäßrarefizierung führt zur chronischen Ischämie und Hypoxie in der Niere [2]. Auf den Hypoxiereiz der unilateralen Ureterobstruktion hin exprimiert Hypoxie-induzierter Faktor α (HIF α) in den proximalen Tubulusepithelzellen STAT3-abhängig profibrotische Faktoren wie TGF- β , CTGF, PDGF und PAI-1 [63, 88]. Die tierexperimentelle Ausschaltung der HIF-Gene bewirkte eine reduzierte Kollagenablagerung [206]. Möglicherweise ist die reduzierte Fibrosebildung durch Tyrphostin AG490 auch durch eine reduzierte HIF α -Expression zu erklären. Die direkte Inhibition von HIF α könnte weitere Erkenntnisse bringen, inwiefern der Hypoxiereiz die Fibrosebildung induziert.

Auch Angiotensin II wird nach UO in den proximalen Tubuluszellen hochreguliert und fördert über die JAK2/STAT3-Kaskade die pathologische Kollagenablagerung [148, 185, 202, 207]. Durch die gezielte Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) konnten wiederholt antifibrotische Effekte erzielt werden. In mehreren Studien konnte tierexperimentell gezeigt werden, dass die STAT3-Inhibition die RAAS-induzierte profibrotische Signalkaskade unterbricht [142, 208, 209]. Die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 führte daher im vorliegenden neonatalen UO-Modell auch möglicherweise über die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems zur reduzierten Fibrosebildung in der Niere.

Der profibrotische STAT3-Signaltransduktionsweg kann die Expression von Mitgliedern der Src-Familie (u.a. src, fyn) verstärken. Diese Nicht-Rezeptor Tyrosinkinasen sind wichtige Mediatoren der Fibroblastenaktivierung nach UO. Die selektive Inhibition von Src und Fyn führt zu einer reduzierten Ablagerung von extrazellulärer Matrix im adulten Mausmodell der UO [210, 211]. Ein Knock-down von Fyn wirkte sich über eine erniedrigte STAT3-Expression protektiv auf die Fibrosebildung aus [212]. Die JAK2/STAT3-Blockade hemmt daher möglicherweise die Expression der profibrotischen Kinasen der Src-Familie.

Einen indirekten Beitrag zur Fibrose leisten die Makrophagen durch die STAT3-induzierte Sekretion großer Mengen an pro-fibrotischen Faktoren wie TGF- β 1, PDGF, CCL18 und

Galectin-3 [68, 74-79]. Die Anzahl der Galectin-3 positiven Makrophagen korreliert dabei mit dem Schweregrad der Fibrose nach UUO [75, 78]. Die Aktivierung profibrotischer Makrophagen wird durch STAT3-abhängige Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF und TGF- β 1 gesteuert [73, 178]. So konnte beispielsweise in IL-4- und IL-13-defizienten Mäusen eine reduzierte Lungenfibrose durch verminderte Aktivierung profibrotischer Makrophagen erreicht werden [213]. Vermutet wird, dass die JAK2/STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 den zytokinabhängigen Phänotypwechsel zu profibrotischen Makrophagen insbesondere durch eine reduzierte TGF- β Expression hemmt [147].

Kontextabhängig kann sich die Rolle von Galectin-3 in der Niere ändern. Physiologisch ist Galectin-3 während der Nephrogenese hochreguliert und fördert insbesondere die Entwicklung der Sammelrohre, das Zellüberleben und die Proliferation [214]. Nach UUO gilt Galectin-3 als spezifischer Marker für profibrotische Makrophagen und als potenter Myofibroblastenaktivator [75, 80]. Die profibrotische Wirkung von Galectin-3 konnte dabei organübergreifend z.B. in Herz, Lunge und Leber gezeigt werden [215-217]. Durch die STAT3-Blockade ist die Sekretion pro-fibrotischer Faktoren wie Galectin-3 durch Makrophagen stark eingeschränkt [119, 217]. Niedrige Expressionslevel von Galectin-3, bzw. der Transfer von Galectin-3 defizienten Makrophagen schützen vor Myofibroblastenaktivierung und reduzieren die Fibrosebildung um bis zu 80% [75, 80, 218, 219]. Auch in klinischen Studien wirkte sich die Inhibition von Galectin-3 protektiv auf chronische Nierenerkrankungen aus. So konnte beispielsweise die GFR von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz Stadium III durch den Galectin-3 Inhibitor GCS-100 deutlich verbessert werden [220, 221]. Die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 schützt daher möglicherweise auch klinisch vor makrophageninduzierter Fibrose. Galectin-3 sollte zukünftig als biologischer Marker für die tubulointerstitielle Fibrose weiter untersucht werden.

Zuletzt wurde zunehmend auch der Einfluss nicht kodierender RNA-Fragmente, sogenannter micro RNAs, auf die Genregulierung der interstitiellen Fibrose diskutiert [222]. Nach UUO stimulieren STAT3-induzierte Zytokine wie TGF- β 1 und TNF α die Expression profibrotischer micro RNAs wie miRNA-192 und miRNA-21 in den Tubulusepithelzellen der Niere. Durch die gezielte Blockade von miRNA-21 konnte die Fibrosebildung reduziert werden [223-225]. Die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 hemmt daher möglicherweise auch die Fibrosebildung durch verminderte Expression profibrotischer micro RNAs.

Auch extrarenal wirkte die STAT3-Blockade in verschiedenen Krankheitsmodellen antifibrotisch. So konnten Chakraborty et al. zeigen, dass sowohl die pharmakologische STAT3-Blockade mit S3I-201, als auch der genetische STAT3-Knockout in Fibroblasten die TGF β -abhängige Differenzierung zu Myofibroblasten maßgeblich hemmt und somit zu einer Verbesserung der Fibrose beim Krankheitsbild der systemischen Sklerose führt. Der

Rückgang der Fibrose zeigte sich in reduzierten mRNA-Level an Kollagen-I [100]. Am Mausmodell der Psoriasis führte die STAT3-Blockade ebenfalls zu einer reduzierten Fibrosebildung. Auch in einer klinischen Studie mit Psoriasis-Patienten konnte der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden [226]. Im Rattenmodell der Leberfibrose reduzierte AG490 die fibrotischen Vorgänge nicht nur, sondern erzielte teilweise eine Regression [227]. Auch in operativ resezierten Darmabschnitten von Morbus Crohn Patienten zeigte sich eine protektive Wirkung der STAT3-Blockade auf fibrotische Strikturenbildung [228]. Im Rattenmodell der Bleomycin-induzierten Lungenfibrose reduzierte ISI-124, ein JAK2-Inhibitor, über eine verminderte STAT3-Aktivierung, die Expression von Fibrosemarkern [229].

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Einfluss des nach UUO hochregulierten Rezeptors PDGFR- β auf die interstitielle Fibrose untersucht [113, 119, 230, 231]. PDGFR- β ist Bestandteil eines Rezeptor-Liganden System, das Proliferations-, Differenzierungs- und Migrationsprozesse von mesenchymalen Zellen reguliert. Im physiologischen Zustand werden die Rezeptoren PDGFR- α und β konstitutiv von murinen und humanen mesenchymalen Nierenzellen wie Perizyten und interstitiellen Fibroblasten exprimiert [232]. Wir konnten zeigen, dass die JAK2/STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 nach neonataler UUO die Expression von PDGFR- β nicht reduzierte. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass PDGF den Transkriptionsfaktor STAT3 JAK2-unabhängig aktiviert [119]. Dies bedeutet möglicherweise eine Umgehung der JAK2-inhibierenden Wirkung von Tyrphostin AG490. Eine direkte STAT3-Hemmung könnte Aufschluss geben über die STAT3-Regulierung des PDGFR/PDGF-Systems. Interessanterweise beobachteten Buhl et al. erst ab dem 10. Tag nach UUO einen anti-fibrotischen Effekt in den PDGF-DD Knock-out Mäusen. Die Vermutung liegt nahe, dass PDGFR- β und sein Ligand PDGF-DD zwar zur Progression aber weniger zur Initiierung der renalen Fibrose nach UUO beitragen [114]. Ein längerer Untersuchungszeitraum könnte klären, ob eine Hochregulierung des PDGFR- β -Rezeptors erst zu einem späteren Zeitpunkt in der neonatalen Niere eintritt.

Nach UUO kommt es zur Hochregulierung des PDGFR/PDGF-Systems in aktivierten Mesenchymzellen sowie zur de novo Expression der Liganden PDGF-DD in Tubulusepithelzellen und PDGF-CC in infiltrierenden Makrophagen [118]. Die Rezeptor-Liganden-Bindung des PDGFR-Systems induziert anschließend STAT3-abhängig die Expression profibrotischer Gene [113, 119, 230, 231]. Jastrzebski et al. vermuten sogar, dass die rezeptorvermittelte Liganden-Endozytose für die vollständige STAT3-Aktivierung erforderlich ist [233]. Über autokrine und parakrine Aktivierungsschleifen werden Proliferation, Differenzierung und Migration der PDGF- β exprimierenden Mesenchymzellen induziert und führen zur Fibroseprogression [118]. Einige Studien deuten darauf hin, dass PDGFR- β die Migration von Perizyten aus dem mikrovaskulären Gefüge stimuliert und in Folge die direkte Fibrosebildung über die Perizyten-Myofibroblasten-Transition fördert. Hinweisend ist die Koexpression von Markern beider Zellreihen, von α SMA und PDGFR β , in den de novo differenzierten Myofibroblasten [96, 111]. Außerdem

wird vermutet, dass PDGFD die Hochregulierung des profibrotischen Faktors MMP-9 fördert. Eine Rezeptor-Blockade kann vermutlich die Differenzierung von Perizyten zu matrixbildenden Myofibroblasten hemmen [234, 235]. Im experimentellen Tiermodell der adulten UUO resultierten sowohl die fehlende Aktivierung des PDGFR- β , als auch der induzierte Knockout von PDGF-DD in einer reduzierten renalen Fibrosebildung [114, 236, 237]. So reduzierte die PDGF-Rezeptorblockade mit AG1295 die Fibrose im adulten Rattenmodell der UUO [236]. Auch in anderen tierexperimentellen Krankheitsmodellen wie z.B. im Rattenmodell der mesangioproliferativen Glomerulonephritis konnte durch die Inhibition der PDGFR- β -Achse eine Fibrosereduktion erzielt werden [113, 238, 239]. Im murinen Ischämie-Modell reduzierte die Inhibition des PDGFR- β -Rezeptors ebenfalls die tubulointerstitielle Fibrose [234]. Durch die Hemmung des PDGFR- β -Signalwegs mit dem Kinaseinhibitor Imatinib zeigte sich eine verminderte Progression der rapid progressiven Glomerulonephritis (RPGN) und der Lupus-Nephritis im Tiermodell [239, 240]. Auch die genetische Deletion von PDGFR- β verbesserte den Krankheitsverlauf im murinen Modell der diabetischen Nephropathie [241]. Äquivalente Ergebnisse einer reduzierten Fibrose zeigten sich auch im Mausmodell der Leberfibrose nach PDGFR- β -Blockade [242].

In einer in vitro Studie konnte in Fibroblasten eine Herunterregulierung von PDGF-DD durch den STAT3-abhängigen Fibrosemediator TGF β gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass TGF β als Gegenspieler von PDGF-DD wirkt. Im Umkehrschluss führt die Herunterregulierung von TGF β durch die STAT3-Blockade möglicherweise zur Hochregulierung des PDGFR-Systems [243]. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Erkenntnisse zum Zusammenspiel von TGF β und PDGF-DD zu gewinnen.

Auch der profibrotische Effekt von Perizyten wird zunehmend kontrovers diskutiert und der Perizytentransformation zu matrixbildenden Myofibroblasten eher eine untergeordnete Rolle zugesprochen [79, 97]. Die Tatsache, dass die STAT3-Blockade mit Tyrphostin AG490 eine signifikante Reduktion der interstitiellen Fibrose erzielte ohne Einfluss auf die PDGFR- β -Expression zu nehmen, stützt diese Hypothese. Somit leisten Perizyten in der neonatalen Mausniere vermutlich keinen entscheidenden Beitrag zur Fibrosebildung nach UUO.

Laut aktueller Studienlage sind sowohl PDGFR- α als auch β in die Aktivierung interstitieller Fibroblasten involviert, die Funktion von PDGFR- $\alpha\beta$ während der Fibrose ist jedoch weitgehend unbekannt. Auch ist unklar, ob PDGF-Isoformen, je nachdem an welchen Rezeptor sie binden, unterschiedliche Funktionen einnehmen. Untersuchungen der einzelnen Faktoren des PDGF/PDGFR-Systems sind notwendig, um den Einfluss des PDGFR-Systems auf die UUO-induzierte Fibrose zu verstehen.

Die interstitielle Fibrose ist die Endstrecke der meisten chronischen Nierenerkrankungen und führt zum irreversiblen Funktionsverlust der Nieren [196]. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Reduktion der Kollagen-I Ablagerung durch Tyrphostin AG490. Somit könnte die STAT3-Blockade einen entscheidenden Therapieansatz in der Behandlung obstruktiver Uropathien und chronischer Nierenerkrankungen mit interstitieller Fibrose darstellen

4.4 Unerwünschte Effekte von Tyrphostin AG490

Die Komplexität des STAT3/JAK2-Signaltransduktionswegs ergibt sich aus den zahlreichen Kombinationsmöglichkeiten von 4 JAK- und 7 STAT-Proteinen, einer Diversität von mehr als 40 Zytokinrezeptorsignalen und Crosstalk-Verbindungen zu anderen Signaltransduktionssystemen [141, 148].

Tyrphostin AG490 hemmt neben STAT3 auch andere JAK2-abhängige Transkriptionsfaktoren wie STAT1 [143]. Die unselektive Wirkweise von JAK2 wirft die Frage auf, welche der beobachteten Inhibitionseffekte auf eine kumulative Wirkung und welche auf die selektive Blockade von STAT3 zurückzuführen sind. Im Modell der renalen Ischämie-Reperfusion konnte beispielsweise gezeigt werden, dass STAT1 in humanen, renalen Tubulusepithelzellen die Expression zahlreicher pro-apoptotischer Gene, u.a. einiger Caspasen, reguliert [151, 244]. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die beobachtete Reduktion der Apoptose nach Gabe von Tyrphostin AG490 zu einem gewissen Teil einen Nebeneffekt der STAT1-Blockade darstellt. Berthien et al. vermuteten nach Untersuchungen am murinen Modell der diabetischen Nephropathie außerdem, dass die JAK2-Expression von Maus und Mensch divergiert [245].

Durch den direkten Vergleich verschiedener STAT3-Inhibitionssysteme könnten künftig neue Erkenntnisse über die STAT3-Wirkmechanismen gewonnen werden. Ein selektiver STAT3-Knockout in verschiedenen Zelllinien könnte den Effekt von Tyrphostin AG490 nach UO möglicherweise noch genauer definieren.

4.5 Zusammenschau der Effekte von Tyrphostin AG490

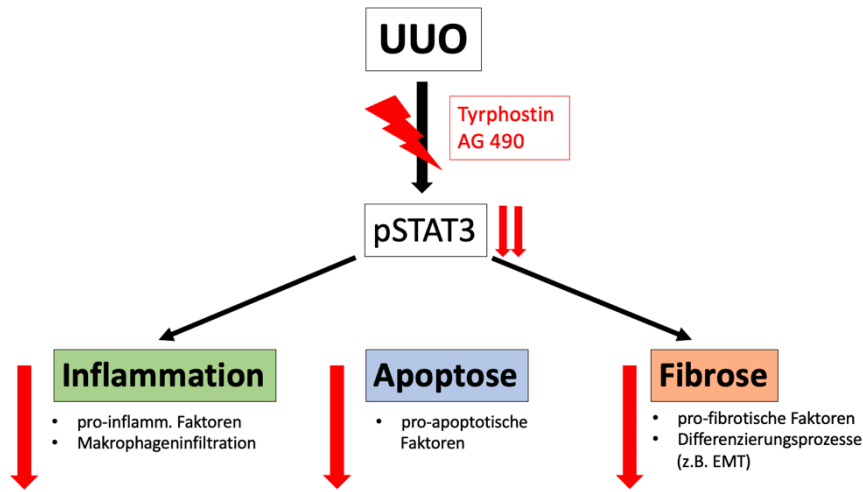


Abbildung 25: STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 reduziert Inflammation, Apoptose und Fibrose

UUO (ureterligierte Nieren)	Tyrphostin AG 490			Kontrollgruppe		
Lebenstag	3	7	14	3	7	14
Kollagen-I	↓↓	↓↓↓	↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
M2-Makrophagen						
tubulär	↑	↓	↓↓	↑↑↑	↑↑	↑↑↑
interstitiell	↓↓	↓↓	↓↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
glomerulär	↓↓↓	↓↓	↓↓	↑	↑↑	↑↑↑
Caspase-8	↔	↓↓	↓↓			
PDGFR-β	↔	↔	↔			
Galectin-3	↔	↔	↔			

IO (kontralaterale Nieren)	Tyrphostin AG 490			Kontrollgruppe		
Lebenstag	3	7	14	3	7	14
Kollagen-I	↓↓↓	↓	↑↑	↑↑↑	↑↑	↑↑
M2-Makrophagen						
tubulär	↑↑	↓	↓	↑↑	↑↑	↑↑
interstitiell	↓	↑↑	↓	↑↑	↑↑	↑↑
glomerulär	↑↑↑	↔	↓	↓	↑↑	↑

Tabelle 4: Veränderung in den UUO- und IO-Nieren bezogen auf scheinoperierte Kontrollen: ↔ keine Veränderung; ↑/↓ Zunahme/Reduktion >10%; ↑↑ Zunahme 10-100%; ↓↓ Reduktion 10-50%; ↑↑↑ Zunahme > 100%; ↓↓↓ Reduktion > 50%

5 Ausblick

Kongenitale obstruktive Uropathien stellen im Kindesalter eine Hauptursache für die Entwicklung einer chronisch terminalen Niereninsuffizienz dar und können zur irreversiblen Nierenschädigung führen [3]. Histologisch kommt es dabei zu einer Entzündungsreaktion in der Niere mit Zunahme von Zelltod und einem Verlust von Nephronmasse. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das neonatale Tiermodell der kongenitalen obstruktiven Uropathie über Inflammation, Apoptose und Fibrose zur tubulointerstitiellen Schädigung führt. Auch in Nierenbiopsien von Patienten mit Ureterabgangsstenose konnten diese histologischen Veränderungen bestätigt werden. Darüber hinaus scheiden Patienten mit Ureterabgangsstenose verschiedene proinflammatorische und profibrotische Biomarker aus, die tierexperimentell nachgewiesen wurden [2]. Die Einschätzung des Schweregrads und der OP-Bedürftigkeit von obstruktiven Uropathien mittels Sonographie und Szintigraphie ist nach wie vor schwierig. Aktuell werden ca. 30% - 40% der ureteropelvinen Stenosen operativ korrigiert [5, 22, 23]. Bei der Mehrzahl der Patienten erfolgt aktuell ein konservativ abwartendes Verhalten ohne therapeutische Intervention [246]. Anhand von Biomarkern im Urin konnten jedoch bei konservativ therapierten Patienten mit Ureterabgangsstenose im 5-Jahres Follow-up persistierende renale Umbauprozesse gezeigt werden. Für die Langzeitprognose sind daher weitere Untersuchungen bei nicht-operierten Patienten notwendig, um eine spätere Krankheitsprogression zu verhindern [2]. Neuere diagnostische Ansätze werden benötigt, um relevante Harntransportstörungen frühzeitiger zu erkennen und den Erhalt der Nierenfunktion zu gewährleisten.

Mit geeigneten Biomarkern könnte diese Lücke geschlossen werden, um auf eine einfache, nicht-invasive Weise genauere Aussagen zu Therapie und Prognose zu treffen. Derzeit sind Biomarker im Gespräch, die im Rahmen des renalen Entzündungs- und Fibrosierungsprozesse u.a. STAT3 vermittelt im Urin vermehrt ausgeschieden werden. Vielversprechend könnte beispielsweise TGF- β 1 sein. In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Urinkonzentration von TGF- β 1 bei Kindern mit einer ureteropelvinen Obstruktion deutlich höher lag als in der gesunden Kontrollgruppe. Ein Jahr nach der operativen Pyeloplastik zeigte sich eine signifikante Reduktion des Zytokins im Urin [247]. Als weitere Marker der histologischen Schädigung wurden KIM-1, NGAL, EGF und MCP-1 untersucht [246, 248, 249]. Die vorliegenden Ergebnisse wie auch die aktuellen Studien sprechen dafür, dass auch apoptotische Marker in Erwägung gezogen werden können [192]. Des Weiteren gibt die Quantifizierung von Kollagenfragmenten im Urin Aufschluss über die Progression der renalen Fibrosierung [250]. Möglicherweise könnte auch über die Messung von pSTAT3 im Urin eine Aussage über die Krankheitsaktivität von obstruktiven Uropathien getroffen werden.

Prospektive randomisierte Studien müssten abgeschlossen werden, um die Effektivität der vorgeschlagenen Biomarker zu überprüfen. Es werden Langzeitstudien benötigt, die

Ausblick

Biomarker während und über den Krankheitsverlauf hinaus messen, um Biomarker auf ihre diagnostische und prognostische Aussagekraft hin zu überprüfen.

Ein weiteres Augenmerk liegt in der Etablierung nicht-invasiver, pharmakologischer Therapiemethoden bei angeborenen obstruktiven Uropathien. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die STAT3-Blockade mit Tyrphostin zu einer signifikanten Reduktion der Fibrosebildung und der Apoptose in der neonatalen Mausniere führte. Die Inhibition des JAK2/STAT3-Signaltransduktionswegs könnte insofern helfen, den progressiven Krankheitsverlauf zu verlangsamen und zum Erhalt der Nierenfunktion bei Patienten mit obstruktiver Uropathie beizutragen.

6 Literaturverzeichnis

1. Chen, F., *Genetic and developmental basis for urinary tract obstruction*. *Pediatr Nephrol*, 2009. 24(9): p. 1621-32.
2. Lange-Sperandio, B., *Pediatric Obstructive Uropathy*, in *Pediatric Nephrology*, E.D. Avner, et al., Editors. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 1749-1777.
3. Warady, B.A. and V. Chadha, *Chronic kidney disease in children: the global perspective*. *Pediatr Nephrol*, 2007. 22(12): p. 1999-2009.
4. Peters, C.A., *Urinary tract obstruction in children*. *J Urol*, 1995. 154(5): p. 1874-83; discussion 1883-4.
5. Chevalier, R.L., *Congenital urinary tract obstruction: the long view*. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2015. 22(4): p. 312-9.
6. Chang, C.P., B.W. McDill, J.R. Neilson, H.E. Joist, J.A. Epstein, G.R. Crabtree, and F. Chen, *Calcineurin is required in urinary tract mesenchyme for the development of the pyeloureteral peristaltic machinery*. *J Clin Invest*, 2004. 113(7): p. 1051-8.
7. Klein, J., J. Gonzalez, M. Miravete, C. Caubet, R. Chaaya, S. Decramer, F. Bandin, J.L. Bascands, B. Buffin-Meyer, and J.P. Schanstra, *Congenital ureteropelvic junction obstruction: human disease and animal models*. *Int J Exp Pathol*, 2011. 92(3): p. 168-92.
8. Asl, A.S. and S. Maleknejad, *Clinical outcome and follow-up of prenatal hydronephrosis*. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2012. 23(3): p. 526-31.
9. Chevalier, R.L., *Perinatal obstructive nephropathy*. *Semin Perinatol*, 2004. 28(2): p. 124-31.
10. Tambo, F.F.M., P.N. Tolefac, M.N. Ngowe, J.Z. Minkande, L. Mbouche, G. Guemkam, N.A. Telelen, F.F. Angwafo, 3rd, and A.M. Sosso, *Posterior urethral valves: 10 years audit of epidemiologic, diagnostic and therapeutic aspects in Yaounde gynaeco-obstetric and paediatric hospital*. *BMC Urol*, 2018. 18(1): p. 46.
11. Ismaili, K., M. Hall, C. Donner, D. Thomas, D. Vermeylen, and F.E. Avni, *Results of systematic screening for minor degrees of fetal renal pelvis dilatation in an unselected population*. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. 188(1): p. 242-6.
12. Mallik, M. and A.R. Watson, *Antenatally detected urinary tract abnormalities: more detection but less action*. *Pediatr Nephrol*, 2008. 23(6): p. 897-904.
13. Ismaili, K., F.E. Avni, K.M. Wissing, and M. Hall, *Long-term clinical outcome of infants with mild and moderate fetal pyelectasis: validation of neonatal ultrasound as a screening tool to detect significant nephrouropathies*. *J Pediatr*, 2004. 144(6): p. 759-65.
14. Cheng, A.M., V. Phan, D.F. Geary, and N.D. Rosenblum, *Outcome of isolated antenatal hydronephrosis*. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2004. 158(1): p. 38-40.
15. Thom, R.P. and N.D. Rosenblum, *A translational approach to congenital non-obstructive hydronephrosis*. *Pediatr Nephrol*, 2013. 28(9): p. 1757-61.
16. Gordon, I., *Diuretic renography in infants with prenatal unilateral hydronephrosis: an explanation for the controversy about poor drainage*. *BJU Int*, 2001. 87(6): p. 551-5.
17. Grattan-Smith, J.D., S.B. Little, and R.A. Jones, *MR urography evaluation of obstructive uropathy*. *Pediatr Radiol*, 2008. 38 Suppl 1: p. S49-69.

18. Andres-Jensen, L., F.S. Jorgensen, J. Thorup, J. Flachs, J.L. Madsen, L.L. Maroun, P. Norgaard, P.G. Vinicoff, B.H. Olsen, and D. Cortes, *The outcome of antenatal ultrasound diagnosed anomalies of the kidney and urinary tract in a large Danish birth cohort*. Arch Dis Child, 2016. 101(9): p. 819-24.
19. Duncan, K.A., *Antenatal renal pelvic dilatation; the long-term outlook*. Clin Radiol, 2007. 62(2): p. 134-9.
20. Bildau, J., C. Enzensberger, J. Degenhardt, A. Kawecki, A. Tenzer, T. Kohl, R. Stressig, J. Ritgen, B. Utsch, and R. Axt-Fliedner, [*Lower urinary tract obstruction (LUTO)--clinical picture, prenatal diagnostics and therapeutic options*]. Z Geburtshilfe Neonatol, 2014. 218(1): p. 18-26.
21. Morris, R.K., G.L. Malin, E. Quinlan-Jones, L.J. Middleton, K. Hemming, D. Burke, J.P. Daniels, K.S. Khan, J. Deeks, and M.D. Kilby, *Percutaneous vesicoamniotic shunting versus conservative management for fetal lower urinary tract obstruction (PLUTO): a randomised trial*. Lancet, 2013. 382(9903): p. 1496-506.
22. John, U., *Prognose konnataler Uropathien*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2010. 158(12): p. 1241-1247.
23. Nasir, A.A., E.A. Ameh, L.O. Abdur-Rahman, J.O. Adeniran, and M.K. Abraham, *Posterior urethral valve*. World J Pediatr, 2011. 7(3): p. 205-16.
24. Abdel-Karim, A.M., A. Fahmy, A. Moussa, H. Rashad, M. Elbadry, H. Badawy, and A. Hammady, *Laparoscopic pyeloplasty versus open pyeloplasty for recurrent ureteropelvic junction obstruction in children*. J Pediatr Urol, 2016. 12(6): p. 401.e1-401.e6.
25. Lam, P.N., C. Wong, T.L. Mulholland, J.B. Campbell, and B.P. Kropp, *Pediatric laparoscopic pyeloplasty: 4-year experience*. J Endourol, 2007. 21(12): p. 1467-71.
26. Caubet, C., C. Lacroix, S. Decramer, J. Drube, J.H. Ehrich, H. Mischak, J.L. Bascands, and J.P. Schanstra, *Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery in pediatric renal disease*. Pediatr Nephrol, 2010. 25(1): p. 27-35.
27. Decramer, S., P. Zurbig, S. Wittke, H. Mischak, J.L. Bascands, and J.P. Schanstra, *Identification of urinary biomarkers by proteomics in newborns: use in obstructive nephropathy*. Contrib Nephrol, 2008. 160: p. 127-41.
28. Bandin, F., J. Siwy, B. Breuil, H. Mischak, J.L. Bascands, S. Decramer, and J.P. Schanstra, *Urinary proteome analysis at 5-year followup of patients with nonoperated ureteropelvic junction obstruction suggests ongoing kidney remodeling*. J Urol, 2012. 187(3): p. 1006-11.
29. Chertin, B., A. Pollack, D. Koulikov, R. Rabinowitz, O. Shen, D. Hain, I. Hadas-Halpren, and A. Farkas, *Does renal function remain stable after puberty in children with prenatal hydronephrosis and improved renal function after pyeloplasty?* J Urol, 2009. 182(4 Suppl): p. 1845-8.
30. Lee, R.S., *Biomarkers for pediatric urological disease*. Curr Opin Urol, 2009. 19(4): p. 397-401.
31. Chevalier, R.L., *Prognostic factors and biomarkers of congenital obstructive nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2016. 31(9): p. 1411-20.
32. Chertin, B., A. Pollack, D. Koulikov, R. Rabinowitz, D. Hain, I. Hadas-Halpren, and A. Farkas, *Conservative treatment of ureteropelvic junction obstruction in children with antenatal diagnosis of hydronephrosis: lessons learned after 16 years of follow-up*. Eur Urol, 2006. 49(4): p. 734-8.
33. Rasouly, H.M. and W. Lu, *Lower urinary tract development and disease*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2013. 5(3): p. 307-42.

34. Bertram, J.F., R.N. Douglas-Denton, B. Diouf, M.D. Hughson, and W.E. Hoy, *Human nephron number: implications for health and disease*. *Pediatr Nephrol*, 2011. 26(9): p. 1529-33.
35. Rodriguez, M.M., A.H. Gomez, C.L. Abitbol, J.J. Chandar, S. Duara, and G.E. Zilleruelo, *Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants*. *Pediatr Dev Pathol*, 2004. 7(1): p. 17-25.
36. Sergio, M., C.I. Galarreta, B.A. Thornhill, M.S. Forbes, and R.L. Chevalier, *The Fate of Nephrons in Congenital Obstructive Nephropathy: Adult Recovery is Limited by Nephron Number Despite Early Release of Obstruction*. *J Urol*, 2015.
37. Lye, C.M., L. Fasano, and A.S. Woolf, *Ureter myogenesis: putting Teashirt into context*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. 21(1): p. 24-30.
38. Song, R. and I.V. Yosypiv, *Genetics of congenital anomalies of the kidney and urinary tract*. *Pediatr Nephrol*, 2011. 26(3): p. 353-64.
39. Reis, G.S., E.S.A.C. Simoes, I.S. Freitas, T.R. Heilbuth, L.A. Marco, E.A. Oliveira, and D.M. Miranda, *Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract*. *J Pediatr (Rio J)*, 2014. 90(1): p. 58-64.
40. Fujinaka, H., Y. Miyazaki, T. Matsusaka, H. Yoshida, A.B. Fogo, T. Inagami, and I. Ichikawa, *Salutary role for angiotensin in partial urinary tract obstruction*. *Kidney Int*, 2000. 58(5): p. 2018-27.
41. Miranda, D.M., A.C. Dos Santos, Jr., H.C. Sarubi, L. Bastos-Rodrigues, D.V. Rosa, I.S. Freitas, L.A. De Marco, E.A. Oliveira, and A.C. Simoes e Silva, *Association of angiotensin type 2 receptor gene polymorphisms with ureteropelvic junction obstruction in Brazilian patients*. *Nephrology (Carlton)*, 2014. 19(11): p. 714-20.
42. dos Santos Junior, A.C., D.M. de Miranda, and A.C. Simoes e Silva, *Congenital anomalies of the kidney and urinary tract: an embryogenetic review*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2014. 102(4): p. 374-81.
43. van der Ven, A.T., D.M. Connaughton, H. Ityel, N. Mann, M. Nakayama, J. Chen, A. Vivante, D.Y. Hwang, J. Schulz, D.A. Braun, J.M. Schmidt, D. Schapiro, R. Schneider, J.K. Warejko, A. Daga, A.J. Majmundar, W. Tan, T. Jobst-Schwan, T. Hermle, E. Widmeier, S. Ashraf, A. Amar, C.A. Hoogstraaten, H. Hugo, T.M. Kitzler, F. Kause, C.M. Kolvenbach, R. Dai, L. Spaneas, K. Amann, D.R. Stein, M.A. Baum, M.J.G. Somers, N.M. Rodig, M.A. Ferguson, A.Z. Traum, G.H. Daouk, R. Bogdanović, N. Stajić, N.A. Soliman, J.A. Kari, S. El Desoky, H.M. Fathy, D. Milosevic, M. Al-Saffar, H.S. Awad, L.A. Eid, A. Selvin, P. Senguttuvan, S. Sanna-Cherchi, H.L. Rehm, D.G. MacArthur, M. Lek, K.M. Laricchia, M.W. Wilson, S.M. Mane, R.P. Lifton, R.S. Lee, S.B. Bauer, W. Lu, H.M. Reutter, V. Tasic, S. Shril, and F. Hildebrandt, *Whole-Exome Sequencing Identifies Causative Mutations in Families with Congenital Anomalies of the Kidney and Urinary Tract*. *J Am Soc Nephrol*, 2018. 29(9): p. 2348-2361.
44. Verbitsky, M., R. Westland, A. Perez, K. Kiryluk, Q. Liu, P. Krithivasan, A. Mitrotti, D.A. Fasel, E. Batourina, M.G. Sampson, M. Bodria, M. Werth, C. Kao, J. Martino, V.P. Capone, A. Vivante, S. Shril, B.H. Kil, M. Marasà, J.Y. Zhang, Y.J. Na, T.Y. Lim, D. Ahram, P.L. Weng, E.L. Heinzen, A. Carrea, G. Piaggio, L. Gesualdo, V. Manca, G. Masnata, M. Gigante, D. Cusi, C. Izzi, F. Scolari, J.A.E. van Wijk, M. Saraga, D. Santoro, G. Conti, P. Zamboli, H. White, D. Drozd, K. Zachwieja, M. Miklaszewska, M. Tkaczyk, D. Tomczyk, A. Krakowska, P. Sikora, T. Jarmoliński, M.K. Borszewska-Kornacka, R. Pawluch, M. Szczepanska, P. Adamczyk, M. Mizerska-Wasiak, G. Krzemien, A. Szmigielska, M. Zaniew, M.G. Dobson, J.M.

- Darlow, P. Puri, D.E. Barton, S.L. Furth, B.A. Warady, Z. Gucev, V.J. Lozanovski, V. Tasic, I. Pisani, L. Allegri, L.M. Rodas, J.M. Campistol, C. Jeanpierre, S. Alam, P. Casale, C.S. Wong, F. Lin, D.M. Miranda, E.A. Oliveira, E.S.A.C. Simões, J.M. Barasch, B. Levy, N. Wu, F. Hildebrandt, G.M. Ghiggeri, A. Latos-Bielenska, A. Materna-Kirylyuk, F. Zhang, H. Hakonarson, V.E. Papaioannou, C.L. Mendelsohn, A.G. Gharavi, and S. Sanna-Cherchi, *The copy number variation landscape of congenital anomalies of the kidney and urinary tract*. Nat Genet, 2019. 51(1): p. 117-127.
45. Chevalier, R.L., *Evolutionary Nephrology*. Kidney Int Rep, 2017. 2(3): p. 302-317.
46. Thornhill, B.A., M.S. Forbes, E.S. Marcinko, and R.L. Chevalier, *Glomerulotubular disconnection in neonatal mice after relief of partial ureteral obstruction*. Kidney Int, 2007. 72(9): p. 1103-12.
47. Chevalier, R.L., M.S. Forbes, and B.A. Thornhill, *Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy*. Kidney Int, 2009. 75(11): p. 1145-52.
48. Ucerro, A.C., A. Benito-Martin, M.C. Izquierdo, M.D. Sanchez-Nino, A.B. Sanz, A.M. Ramos, S. Berzal, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, and A. Ortiz, *Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction*. Int Urol Nephrol, 2014. 46(4): p. 765-76.
49. Thornhill, B.A., L.E. Burt, C. Chen, M.S. Forbes, and R.L. Chevalier, *Variable chronic partial ureteral obstruction in the neonatal rat: a new model of ureteropelvic junction obstruction*. Kidney Int, 2005. 67(1): p. 42-52.
50. Yoo, K.H., B.A. Thornhill, M.S. Forbes, and R.L. Chevalier, *Inducible nitric oxide synthase modulates hydronephrosis following partial or complete unilateral ureteral obstruction in the neonatal mouse*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. 298(1): p. F62-71.
51. Chevalier, R.L., *Counterbalance in functional adaptation to ureteral obstruction during development*. Pediatr Nephrol, 1990. 4(4): p. 442-4.
52. Truong, L.D., L. Gaber, and G. Eknayan, *Obstructive uropathy*. Contrib Nephrol, 2011. 169: p. 311-26.
53. Hiatt, M.J., L. Ivanova, P. Trnka, M. Solomon, and D.G. Matsell, *Urinary tract obstruction in the mouse: the kinetics of distal nephron injury*. Lab Invest, 2013. 93(9): p. 1012-23.
54. Huang, W.Y., C.A. Peters, D. Zurakowski, J.G. Borer, D.A. Diamond, S.B. Bauer, D.L. McLellan, and S. Rosen, *Renal biopsy in congenital ureteropelvic junction obstruction: evidence for parenchymal maldevelopment*. Kidney Int, 2006. 69(1): p. 137-43.
55. Yoo, K.H., B.A. Thornhill, M.S. Forbes, and R.L. Chevalier, *Compensatory renal growth due to neonatal ureteral obstruction: implications for clinical studies*. Pediatr Nephrol, 2006. 21(3): p. 368-75.
56. Kubik, M.J., M. Wyczanska, M. Gasparitsch, U. Keller, S. Weber, F. Schaefer, and B. Lange-Sperandio, *Renal developmental genes are differentially regulated after unilateral ureteral obstruction in neonatal and adult mice*. Sci Rep, 2020. 10(1): p. 19302.
57. Chevalier, R.L., B.A. Thornhill, M.S. Forbes, and S.C. Kiley, *Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy*. Pediatr Nephrol, 2010. 25(4): p. 687-97.
58. Lange-Sperandio, B., A. Trautmann, O. Eickelberg, A. Jayachandran, S. Oberle, F. Schmidutz, B. Rodenbeck, M. Homme, R. Horuk, and F. Schaefer, *Leukocytes induce epithelial to mesenchymal transition after unilateral ureteral obstruction in neonatal mice*. Am J Pathol, 2007. 171(3): p. 861-71.

59. Smith, S.W., C. Schrimpf, D.J. Parekh, M. Venkatachalam, and J.S. Duffield, *Kidney pericytes: a novel therapeutic target in interstitial fibrosis*. *Histol Histopathol*, 2012. 27(12): p. 1503-14.
60. Dendooven, A., D.A. Ishola, Jr., T.Q. Nguyen, D.M. Van der Giezen, R.J. Kok, R. Goldschmeding, and J.A. Joles, *Oxidative stress in obstructive nephropathy*. *Int J Exp Pathol*, 2011. 92(3): p. 202-10.
61. Forbes, M.S., B.A. Thornhill, J.J. Minor, K.A. Gordon, C.I. Galarreta, and R.L. Chevalier, *Fight-or-flight: murine unilateral ureteral obstruction causes extensive proximal tubular degeneration, collecting duct dilatation, and minimal fibrosis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012. 303(1): p. F120-9.
62. Chevalier, R.L., *The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016. 311(1): p. F145-61.
63. Louis, K. and A. Hertig, *How tubular epithelial cells dictate the rate of renal fibrogenesis?* *World J Nephrol*, 2015. 4(3): p. 367-73.
64. Forbes, M.S., B.A. Thornhill, and R.L. Chevalier, *Proximal tubular injury and rapid formation of atubular glomeruli in mice with unilateral ureteral obstruction: a new look at an old model*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011. 301(1): p. F110-7.
65. Pat, B., T. Yang, C. Kong, D. Watters, D.W. Johnson, and G. Gobe, *Activation of ERK in renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction: modulation by antioxidants*. *Kidney Int*, 2005. 67(3): p. 931-43.
66. Alikhan, M.A. and S.D. Ricardo, *Mononuclear phagocyte system in kidney disease and repair*. *Nephrology (Carlton)*, 2013. 18(2): p. 81-91.
67. Duffield, J.S., *Cellular and molecular mechanisms in kidney fibrosis*. *J Clin Invest*, 2014. 124(6): p. 2299-306.
68. Campanholle, G., G. Ligresti, S.A. Gharib, and J.S. Duffield, *Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 3. Novel mechanisms of kidney fibrosis*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013. 304(7): p. C591-603.
69. Immler, R., B. Lange-Sperandio, T. Steffen, H. Beck, I. Rohwedder, J. Roth, M. Napoli, G. Hupel, F. Pfister, B. Popper, B. Uhl, H. Mannell, C.A. Reichel, V. Vielhauer, J. Scherberich, M. Sperandio, and M. Pruenster, *Extratubular Polymerized Uromodulin Induces Leukocyte Recruitment and Inflammation In Vivo*. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 588245.
70. Lange-Sperandio, B., K. Schimpfen, B. Rodenbeck, T. Chavakis, A. Bierhaus, P. Nawroth, B. Thornhill, F. Schaefer, and R.L. Chevalier, *Distinct roles of Mac-1 and its counter-receptors in neonatal obstructive nephropathy*. *Kidney Int*, 2006. 69(1): p. 81-8.
71. Duffield, J.S., M. Luper, V.J. Thannickal, and T.A. Wynn, *Host responses in tissue repair and fibrosis*. *Annu Rev Pathol*, 2013. 8: p. 241-76.
72. Nishida, M. and K. Hamaoka, *Macrophage phenotype and renal fibrosis in obstructive nephropathy*. *Nephron Exp Nephrol*, 2008. 110(1): p. e31-6.
73. Wang, Y. and D.C. Harris, *Macrophages in renal disease*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. 22(1): p. 21-7.
74. Micallef, L., N. Vedrenne, F. Billet, B. Coulomb, I.A. Darby, and A. Desmouliere, *The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair*. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2012. 5(Suppl 1): p. S5.

75. Henderson, N.C., A.C. Mackinnon, S.L. Farnworth, T. Kipari, C. Haslett, J.P. Iredale, F.T. Liu, J. Hughes, and T. Sethi, *Galectin-3 expression and secretion links macrophages to the promotion of renal fibrosis*. Am J Pathol, 2008. 172(2): p. 288-98.
76. Kitamoto, K., Y. Machida, J. Uchida, Y. Izumi, M. Shiota, T. Nakao, H. Iwao, T. Yukimura, T. Nakatani, and K. Miura, *Effects of liposome clodronate on renal leukocyte populations and renal fibrosis in murine obstructive nephropathy*. J Pharmacol Sci, 2009. 111(3): p. 285-92.
77. Cao, Q., Y. Wang, and D.C. Harris, *Pathogenic and protective role of macrophages in kidney disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. 305(1): p. F3-11.
78. Nikolic-Paterson, D.J., S. Wang, and H.Y. Lan, *Macrophages promote renal fibrosis through direct and indirect mechanisms*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. 4(1): p. 34-38.
79. Falke, L.L., S. Gholizadeh, R. Goldschmeding, R.J. Kok, and T.Q. Nguyen, *Diverse origins of the myofibroblast-implications for kidney fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2015. 11(4): p. 233-44.
80. MacKinnon, A.C., S.L. Farnworth, P.S. Hodkinson, N.C. Henderson, K.M. Atkinson, H. Leffler, U.J. Nilsson, C. Haslett, S.J. Forbes, and T. Sethi, *Regulation of alternative macrophage activation by galectin-3*. J Immunol, 2008. 180(4): p. 2650-8.
81. Docherty, N.G., O.E. O'Sullivan, D.A. Healy, J.M. Fitzpatrick, and R.W. Watson, *Evidence that inhibition of tubular cell apoptosis protects against renal damage and development of fibrosis following ureteric obstruction*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. 290(1): p. F4-13.
82. Popper, B., M.T. Rammer, M. Gasparitsch, T. Singer, U. Keller, Y. Döring, and B. Lange-Sperandio, *Neonatal obstructive nephropathy induces necroptosis and necroinflammation*. Sci Rep, 2019. 9(1): p. 18600.
83. Cachat, F., B. Lange-Sperandio, A.Y. Chang, S.C. Kiley, B.A. Thornhill, M.S. Forbes, and R.L. Chevalier, *Ureteral obstruction in neonatal mice elicits segment-specific tubular cell responses leading to nephron loss*. Kidney Int, 2003. 63(2): p. 564-75.
84. Tummers, B. and D.R. Green, *Caspase-8: regulating life and death*. Immunol Rev, 2017. 277(1): p. 76-89.
85. Forbes, M.S., B.A. Thornhill, C.I. Galarreta, J.J. Minor, K.A. Gordon, and R.L. Chevalier, *Chronic unilateral ureteral obstruction in the neonatal mouse delays maturation of both kidneys and leads to late formation of atubular glomeruli*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. 305(12): p. F1736-46.
86. Kida, Y. and T. Sato, *Tubular changes in obstructed kidney of adult mice evaluated using immunohistochemistry for segment-specific marker*. Histol Histopathol, 2007. 22(3): p. 291-303.
87. Galarreta, C.I., B.A. Thornhill, M.S. Forbes, L.N. Simpkins, D.K. Kim, and R.L. Chevalier, *Transforming growth factor-beta1 receptor inhibition preserves glomerulotubular integrity during ureteral obstruction in adults but worsens injury in neonatal mice*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. 304(5): p. F481-90.
88. Schelling, J.R., *Tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease progression*. Pediatr Nephrol, 2016. 31(5): p. 693-706.
89. Gasparitsch, M., A.K. Arndt, F. Pawlitschek, S. Oberle, U. Keller, M. Kasper, A. Bierhaus, F. Schaefer, L.T. Weber, and B. Lange-Sperandio, *RAGE-mediated interstitial fibrosis in neonatal obstructive nephropathy is independent of NF-kappaB activation*. Kidney Int, 2013. 84(5): p. 911-9.

90. Gasparitsch, M., A. Schieber, T. Schaubeck, U. Keller, M. Cattaruzza, and B. Lange-Sperandio, *Tyrphostin AG490 reduces inflammation and fibrosis in neonatal obstructive nephropathy*. PLoS One, 2019. 14(12): p. e0226675.
91. Klingberg, F., B. Hinz, and E.S. White, *The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis*. J Pathol, 2013. 229(2): p. 298-309.
92. Grgic, I., J.S. Duffield, and B.D. Humphreys, *The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease*. Pediatr Nephrol, 2012. 27(2): p. 183-93.
93. Eddy, A.A., *Progression in chronic kidney disease*. Adv Chronic Kidney Dis, 2005. 12(4): p. 353-65.
94. Bani-Hani, A.H., M.T. Campbell, D.R. Meldrum, and K.K. Meldrum, *Cytokines in epithelial-mesenchymal transition: a new insight into obstructive nephropathy*. J Urol, 2008. 180(2): p. 461-8.
95. Liu, C., W. Mei, J. Tang, Q. Yuan, L. Huang, M. Lu, L. Wu, Z. Peng, J. Meng, H. Yang, H. Shen, B. Lv, G. Hu, and L. Tao, *Mefunidone attenuates tubulointerstitial fibrosis in a rat model of unilateral ureteral obstruction*. PLoS One, 2015. 10(6): p. e0129283.
96. Humphreys, B.D., S.L. Lin, A. Kobayashi, T.E. Hudson, B.T. Nowlin, J.V. Bonventre, M.T. Valerius, A.P. McMahon, and J.S. Duffield, *Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Am J Pathol, 2010. 176(1): p. 85-97.
97. LeBleu, V.S., G. Taduri, J. O'Connell, Y. Teng, V.G. Cooke, C. Woda, H. Sugimoto, and R. Kalluri, *Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Nat Med, 2013. 19(8): p. 1047-53.
98. Kok, H.M., L.L. Falke, R. Goldschmeding, and T.Q. Nguyen, *Targeting CTGF, EGF and PDGF pathways to prevent progression of kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2014. 10(12): p. 700-11.
99. Pardali, E., G. Sanchez-Duffhues, M.C. Gomez-Puerto, and P. Ten Dijke, *TGF-beta-Induced Endothelial-Mesenchymal Transition in Fibrotic Diseases*. Int J Mol Sci, 2017. 18(10).
100. Chakraborty, D., B. Sumova, T. Mallano, C.W. Chen, A. Distler, C. Bergmann, I. Ludolph, R.E. Horch, K. Gelse, A. Ramming, O. Distler, G. Schett, L. Senolt, and J.H.W. Distler, *Activation of STAT3 integrates common profibrotic pathways to promote fibroblast activation and tissue fibrosis*. Nat Commun, 2017. 8(1): p. 1130.
101. Eddy, A.A., *Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis*. Kidney Int Suppl (2011), 2014. 4(1): p. 2-8.
102. Yang, N., L.L. Wu, D.J. Nikolic-Paterson, Y.Y. Ng, W.C. Yang, W. Mu, R.E. Gilbert, M.E. Cooper, R.C. Atkins, and H.Y. Lan, *Local macrophage and myofibroblast proliferation in progressive renal injury in the rat remnant kidney*. Nephrol Dial Transplant, 1998. 13(8): p. 1967-74.
103. Bechtel, W., S. McGoohan, E.M. Zeisberg, G.A. Muller, H. Kalbacher, D.J. Salant, C.A. Muller, R. Kalluri, and M. Zeisberg, *Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney*. Nat Med, 2010. 16(5): p. 544-50.
104. Picard, N., O. Baum, A. Vogetseder, B. Kaissling, and M. Le Hir, *Origin of renal myofibroblasts in the model of unilateral ureter obstruction in the rat*. Histochem Cell Biol, 2008. 130(1): p. 141-55.
105. Zeisberg, E.M., S.E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg, and R. Kalluri, *Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition*. J Am Soc Nephrol, 2008. 19(12): p. 2282-7.

106. Piera-Velazquez, S., F.A. Mendoza, and S.A. Jimenez, *Endothelial to Mesenchymal Transition (EndoMT) in the Pathogenesis of Human Fibrotic Diseases*. J Clin Med, 2016. 5(4).
107. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014. 15(3): p. 178-96.
108. Liu, J., Y. Zhong, G. Liu, X. Zhang, B. Xiao, S. Huang, H. Liu, and L. He, *Role of Stat3 Signaling in Control of EMT of Tubular Epithelial Cells During Renal Fibrosis*. Cell Physiol Biochem, 2017. 42(6): p. 2552-2558.
109. Kida, Y. and J.S. Duffield, *Pivotal role of pericytes in kidney fibrosis*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011. 38(7): p. 467-73.
110. Kramann, R., D.P. DiRocco, and B.D. Humphreys, *Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease*. J Pathol, 2013. 231(3): p. 273-89.
111. Lin, S.L., T. Kisseleva, D.A. Brenner, and J.S. Duffield, *Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney*. Am J Pathol, 2008. 173(6): p. 1617-27.
112. Pan, S.Y., Y.T. Chang, and S.L. Lin, *Microvascular pericytes in healthy and diseased kidneys*. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2014. 7: p. 39-48.
113. Floege, J., F. Eitner, and C.E. Alpers, *A new look at platelet-derived growth factor in renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2008. 19(1): p. 12-23.
114. Buhl, E.M., S. Djudjaj, J. Babickova, B.M. Klinkhammer, E. Folestad, E. Borkham-Kamphorst, R. Weiskirchen, K. Hudkins, C.E. Alpers, U. Eriksson, J. Floege, and P. Boor, *The role of PDGF-D in healthy and fibrotic kidneys*. Kidney Int, 2016. 89(4): p. 848-61.
115. Bjarnegård, M., M. Enge, J. Norlin, S. Gustafsdottir, S. Fredriksson, A. Abramsson, M. Takemoto, E. Gustafsson, R. Fässler, and C. Betsholtz, *Endothelium-specific ablation of PDGFB leads to pericyte loss and glomerular, cardiac and placental abnormalities*. Development, 2004. 131(8): p. 1847-57.
116. Ostendorf, T., F. Eitner, and J. Floege, *The PDGF family in renal fibrosis*. Pediatr Nephrol, 2012. 27(7): p. 1041-50.
117. Papadopoulos, N. and J. Lennartsson, *The PDGF/PDGFR pathway as a drug target*. Mol Aspects Med, 2018. 62: p. 75-88.
118. Boor, P., T. Ostendorf, and J. Floege, *PDGF and the progression of renal disease*. Nephrol Dial Transplant, 2014. 29 Suppl 1: p. i45-i54.
119. Aggarwal, B.B., A.B. Kunnammakara, K.B. Harikumar, S.R. Gupta, S.T. Tharakan, C. Koca, S. Dey, and B. Sung, *Signal transducer and activator of transcription-3, inflammation, and cancer: how intimate is the relationship?* Ann N Y Acad Sci, 2009. 1171: p. 59-76.
120. Vogel, T.P., J.D. Milner, and M.A. Cooper, *The Ying and Yang of STAT3 in Human Disease*. J Clin Immunol, 2015. 35(7): p. 615-23.
121. Lin, L., R. Amin, G.I. Gallicano, E. Glasgow, W. Jogunoori, J.M. Jessup, M. Zasloff, J.L. Marshall, K. Shetty, L. Johnson, L. Mishra, and A.R. He, *The STAT3 inhibitor NSC 74859 is effective in hepatocellular cancers with disrupted TGF-beta signaling*. Oncogene, 2009. 28(7): p. 961-72.
122. Fang, B., *Genetic Interactions of STAT3 and Anticancer Drug Development*. Cancers (Basel), 2014. 6(1): p. 494-525.

123. Sharma, N., S. Shankar, and R. Srivastava, *STAT3 as an emerging molecular target in pancreatic cancer*. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy*, 2014: p. 115-122.
124. Zhang, X., P. Yue, S. Fletcher, W. Zhao, P.T. Gunning, and J. Turkson, *A novel small-molecule disrupts Stat3 SH2 domain-phosphotyrosine interactions and Stat3-dependent tumor processes*. *Biochem Pharmacol*, 2010. 79(10): p. 1398-409.
125. Yu, H., D. Pardoll, and R. Jove, *STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3*. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(11): p. 798-809.
126. Huang, G., H. Yan, S. Ye, C. Tong, and Q.L. Ying, *STAT3 phosphorylation at tyrosine 705 and serine 727 differentially regulates mouse ESC fates*. *Stem Cells*, 2014. 32(5): p. 1149-60.
127. Kamran, M.Z., P. Patil, and R.P. Gude, *Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances*. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 421821.
128. Mahboubi, K., F. Li, J. Plescia, N.C. Kirkiles-Smith, M. Mesri, Y. Du, J.M. Carroll, J.A. Elias, D.C. Altieri, and J.S. Pober, *Interleukin-11 up-regulates survivin expression in endothelial cells through a signal transducer and activator of transcription-3 pathway*. *Lab Invest*, 2001. 81(3): p. 327-34.
129. Liu, H., Y. Ma, S.M. Cole, C. Zander, K.H. Chen, J. Karras, and R.M. Pope, *Serine phosphorylation of STAT3 is essential for Mcl-1 expression and macrophage survival*. *Blood*, 2003. 102(1): p. 344-52.
130. Masuda, M., M. Suzui, R. Yasumatu, T. Nakashima, Y. Kuratomi, K. Azuma, K. Tomita, S. Komiyama, and I.B. Weinstein, *Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Res*, 2002. 62(12): p. 3351-5.
131. Niu, G., K.L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L.M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, and H. Yu, *Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis*. *Oncogene*, 2002. 21(13): p. 2000-8.
132. Niu, G., K.L. Wright, Y. Ma, G.M. Wright, M. Huang, R. Irby, J. Briggs, J. Karras, W.D. Cress, D. Pardoll, R. Jove, J. Chen, and H. Yu, *Role of Stat3 in regulating p53 expression and function*. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(17): p. 7432-40.
133. Catlett-Falcone, R., T.H. Landowski, M.M. Oshiro, J. Turkson, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J.L. Fernandez-Luna, G. Nunez, W.S. Dalton, and R. Jove, *Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells*. *Immunity*, 1999. 10(1): p. 105-15.
134. Fernandez-Sanchez, R., S. Berzal, M.D. Sanchez-Nino, F. Neria, S. Goncalves, O. Calabia, A. Tejedor, M.J. Calzada, C. Caramelo, J.J. Deudero, and A. Ortiz, *AG490 promotes HIF-1alpha accumulation by inhibiting its hydroxylation*. *Curr Med Chem*, 2012. 19(23): p. 4014-23.
135. Takeda, K., K. Noguchi, W. Shi, T. Tanaka, M. Matsumoto, N. Yoshida, T. Kishimoto, and S. Akira, *Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(8): p. 3801-4.
136. Fu, L.X., Q.W. Lian, J.D. Pan, Z.L. Xu, T.M. Zhou, and B. Ye, *JAK2 tyrosine kinase inhibitor AG490 suppresses cell growth and invasion of gallbladder cancer cells via inhibition of JAK2/STAT3 signaling*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2017. 31(1): p. 51-58.

137. Pace, J., P. Paladugu, B. Das, J.C. He, and S.K. Mallipattu, *Targeting STAT3 signaling in kidney disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2019. 316(6): p. F1151-f1161.
138. Barbieri, I., S. Pensa, T. Pannellini, E. Quaglino, D. Maritano, M. Demaria, A. Voster, J. Turkson, F. Cavallo, C.J. Watson, P. Provero, P. Musiani, and V. Poli, *Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten*. Cancer Res, 2010. 70(6): p. 2558-67.
139. Tao, J., L. Mariani, S. Eddy, H. Maecker, N. Kambham, K. Mehta, J. Hartman, W. Wang, M. Kretzler, and R.A. Lafayette, *JAK-STAT signaling is activated in the kidney and peripheral blood cells of patients with focal segmental glomerulosclerosis*. Kidney Int, 2018. 94(4): p. 795-808.
140. Koike, K., S. Ueda, S. Yamagishi, H. Yasukawa, Y. Kaida, M. Yokoro, K. Fukami, A. Yoshimura, and S. Okuda, *Protective role of JAK/STAT signaling against renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction*. Clin Immunol, 2014. 150(1): p. 78-87.
141. Matsui, F. and K.K. Meldrum, *The role of the Janus kinase family/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in fibrotic renal disease*. J Surg Res, 2012. 178(1): p. 339-45.
142. Ni, J., Y. Shen, Z. Wang, D.C. Shao, J. Liu, L.J. Fu, Y.L. Kong, L. Zhou, H. Xue, Y. Huang, W. Zhang, C. Yu, and L.M. Lu, *Inhibition of STAT3 acetylation is associated with angiotensin renal fibrosis in the obstructed kidney*. Acta Pharmacol Sin, 2014. 35(8): p. 1045-54.
143. Chuang, P.Y. and J.C. He, *JAK/STAT signaling in renal diseases*. Kidney Int, 2010. 78(3): p. 231-4.
144. Arany, I., J.K. Megyesi, B.D. Nelkin, and R.L. Safirstein, *STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells*. Kidney Int, 2006. 70(4): p. 669-74.
145. Carow, B. and M.E. Rottenberg, *SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation*. Front Immunol, 2014. 5: p. 58.
146. Villarino, A.V., Y. Kanno, J.R. Ferdinand, and J.J. O'Shea, *Mechanisms of Jak/STAT signaling in immunity and disease*. J Immunol, 2015. 194(1): p. 21-7.
147. Pang, M., L. Ma, R. Gong, E. Tolbert, H. Mao, M. Ponnusamy, Y.E. Chin, H. Yan, L.D. Dworkin, and S. Zhuang, *A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. Kidney Int, 2010. 78(3): p. 257-68.
148. Kuratsune, M., T. Masaki, T. Hirai, K. Kiribayashi, Y. Yokoyama, T. Arakawa, N. Yorioka, and N. Kohno, *Signal transducer and activator of transcription 3 involvement in the development of renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction*. Nephrology (Carlton), 2007. 12(6): p. 565-71.
149. Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira, and T. Kishimoto, *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor*. Nature, 1997. 387(6636): p. 924-9.
150. Aldrich, S. *Tyrphostin AG 490 solid*. 24.05.2017; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t3434?lang=de®ion=DE>.
151. Wang, J., C. Ouyang, X. Chen, B. Fu, Y. Lu, and Q. Hong, *Effect of Jak2 kinase inhibition on Stat1 and Stat3 activation and apoptosis of tubular epithelial cells induced by ATP depletion/recovery*. J Nephrol, 2008. 21(6): p. 919-23.

152. Kobayashi, A., Y. Tanizaki, A. Kimura, Y. Ishida, M. Nosaka, S. Toujima, Y. Kuninaka, S. Minami, K. Ino, and T. Kondo, *AG490, a Jak2 inhibitor, suppressed the progression of murine ovarian cancer*. Eur J Pharmacol, 2015. 766: p. 63-75.
153. Higuchi, T., T. Shiraishi, T. Shirakusa, S. Hirayama, H. Shibaguchi, M. Kuroki, M. Hiratuka, S. Yamamoto, A. Iwasaki, and M. Kuroki, *Prevention of acute lung allograft rejection in rat by the janus kinase 3 inhibitor, tyrphostin AG490*. J Heart Lung Transplant, 2005. 24(10): p. 1557-64.
154. Goncalves, S., R. Fernandez-Sanchez, M.D. Sanchez-Nino, A. Tejedor, F. Neria, J. Egido, M. Ruiz-Ortega, and A. Ortiz, *Tyrphostins as potential therapeutic agents for acute kidney injury*. Curr Med Chem, 2010. 17(10): p. 974-86.
155. Toda, T., S. Yamamoto, R. Yonezawa, Y. Mori, and S. Shimizu, *Inhibitory effects of Tyrphostin AG-related compounds on oxidative stress-sensitive transient receptor potential channel activation*. Eur J Pharmacol, 2016. 786: p. 19-28.
156. Zhang, L., P. Lu, X. Guo, T. Liu, X. Luo, and Y.T. Zhu, *Inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway protects mice from the DDP-induced acute kidney injury in lung cancer*. Inflamm Res, 2019. 68(9): p. 751-760.
157. Zhou, Y., W. Xu, and H. Zhu, *CXCL8(3-72) K11R/G31P protects against sepsis-induced acute kidney injury via NF-kappaB and JAK2/STAT3 pathway*. Biol Res, 2019. 52(1): p. 29.
158. Neria, F., M.A. Castilla, R.F. Sanchez, F.R. Gonzalez Pacheco, J.J. Deudero, O. Calabia, A. Tejedor, F. Manzarbeitia, A. Ortiz, and C. Caramelo, *Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells from oxidative stress and cyclosporin A toxicity*. Kidney Int, 2009. 75(2): p. 227-34.
159. Gyurkovska, V. and N. Ivanovska, *Tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 reduces liver injury in LPS-induced shock*. Eur J Pharmacol, 2015. 751: p. 118-26.
160. Park, J.S., J. Lee, M.A. Lim, E.K. Kim, S.M. Kim, J.G. Ryu, J.H. Lee, S.K. Kwok, K.S. Park, H.Y. Kim, S.H. Park, and M.L. Cho, *JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation of regulatory T Cells and Th17 cells*. J Immunol, 2014. 192(9): p. 4417-24.
161. Qian, C., J. Wang, J. Yao, L. Wang, M. Xue, W. Liu, and J. Si, *Involvement of nuclear JAK2 signaling in AG490-induced apoptosis of gastric cancer cells*. Anat Rec (Hoboken), 2013. 296(12): p. 1865-73.
162. Sica, A. and A. Mantovani, *Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas*. J Clin Invest, 2012. 122(3): p. 787-95.
163. Lange-Sperandio, B., F. Cachat, B.A. Thornhill, and R.L. Chevalier, *Selectins mediate macrophage infiltration in obstructive nephropathy in newborn mice*. Kidney Int, 2002. 61(2): p. 516-24.
164. Cao, Q., D.C. Harris, and Y. Wang, *Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis*. Physiology (Bethesda), 2015. 30(3): p. 183-94.
165. Dos Anjos Cassado, A., *F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen*. Results Probl Cell Differ, 2017. 62: p. 161-179.
166. Zhang, L., X. Xu, R. Yang, J. Chen, S. Wang, J. Yang, X. Xiang, Z. He, Y. Zhao, Z. Dong, and D. Zhang, *Paclitaxel attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis by inhibiting STAT3 signaling*. Drug Des Devel Ther, 2015. 9: p. 2139-48.
167. Schmidt, S., M. Moser, and M. Sperandio, *The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies*. Mol Immunol, 2013. 55(1): p. 49-58.

168. Maydan, O., P.G. McDade, Y. Liu, X.R. Wu, D.G. Matsell, and A.A. Eddy, *Uromodulin deficiency alters tubular injury and interstitial inflammation but not fibrosis in experimental obstructive nephropathy*. *Physiol Rep*, 2018. 6(6): p. e13654.
169. Bascands, J.-L. and J.P. Schanstra, *Obstructive nephropathy: insights from genetically engineered animals*. *Kidney international*, 2005. 68(3): p. 925-937.
170. Bai, Y., W. Wang, P. Yin, J. Gao, L. Na, Y. Sun, Z. Wang, Z. Zhang, and C. Zhao, *Ruxolitinib Alleviates Renal Interstitial Fibrosis in UUO Mice*. *Int J Biol Sci*, 2020. 16(2): p. 194-203.
171. Tomita, N., R. Morishita, H.Y. Lan, K. Yamamoto, M. Hashizume, M. Notake, K. Toyosawa, B. Fujitani, W. Mu, D.J. Nikolic-Paterson, R.C. Atkins, Y. Kaneda, J. Higaki, and T. Ogihara, *In vivo administration of a nuclear transcription factor-kappaB decoy suppresses experimental crescentic glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. 11(7): p. 1244-52.
172. Said, E., S.A. Zaitone, M. Eldosoky, and N.M. Elsherbiny, *Nifuroxazide, a STAT3 inhibitor, mitigates inflammatory burden and protects against diabetes-induced nephropathy in rats*. *Chem Biol Interact*, 2018. 281: p. 111-120.
173. Kitagawa, K., T. Wada, K. Furuichi, H. Hashimoto, Y. Ishiwata, M. Asano, M. Takeya, W.A. Kuziel, K. Matsushima, N. Mukaida, and H. Yokoyama, *Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney*. *Am J Pathol*, 2004. 165(1): p. 237-46.
174. Nishida, M., H. Fujinaka, T. Matsusaka, J. Price, V. Kon, A.B. Fogo, J.M. Davidson, M.F. Linton, S. Fazio, T. Homma, H. Yoshida, and I. Ichikawa, *Absence of angiotensin II type 1 receptor in bone marrow-derived cells is detrimental in the evolution of renal fibrosis*. *J Clin Invest*, 2002. 110(12): p. 1859-68.
175. Ferenbach, D.A., T.A. Sheldrake, K. Dhaliwal, T.M. Kipari, L.P. Marson, D.C. Kluth, and J. Hughes, *Macrophage/monocyte depletion by clodronate, but not diphtheria toxin, improves renal ischemia/reperfusion injury in mice*. *Kidney Int*, 2012. 82(8): p. 928-33.
176. Schraml, B.U. and C. Reis e Sousa, *Defining dendritic cells*. *Curr Opin Immunol*, 2015. 32: p. 13-20.
177. Han, Y., F.Y. Ma, G.H. Tesch, C.L. Manthey, and D.J. Nikolic-Paterson, *Role of macrophages in the fibrotic phase of rat crescentic glomerulonephritis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. 304(8): p. F1043-53.
178. Rogers, N.M., D.A. Ferenbach, J.S. Isenberg, A.W. Thomson, and J. Hughes, *Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil*. *Nat Rev Nephrol*, 2014. 10(11): p. 625-43.
179. Wu, Y. and K.K. Hirschi, *Tissue-Resident Macrophage Development and Function*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. 8: p. 617879.
180. Chevalier, R.L., B.A. Thornhill, A.Y. Chang, F. Cachat, and A. Lackey, *Recovery from release of ureteral obstruction in the rat: relationship to nephrogenesis*. *Kidney Int*, 2002. 61(6): p. 2033-43.
181. Lopez-Hernandez, F.J. and J.M. Lopez-Novoa, *Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects*. *Cell Tissue Res*, 2012. 347(1): p. 141-54.
182. Yang, N., M. Luo, R. Li, Y. Huang, R. Zhang, Q. Wu, F. Wang, Y. Li, and X. Yu, *Blockage of JAK/STAT signalling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat*. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. 23(1): p. 91-100.

183. Ji, X., H. Wang, Z. Wu, X. Zhong, M. Zhu, Y. Zhang, R. Tan, Y. Liu, J. Li, and L. Wang, *Specific Inhibitor of Smad3 (SIS3) Attenuates Fibrosis, Apoptosis, and Inflammation in Unilateral Ureteral Obstruction Kidneys by Inhibition of Transforming Growth Factor beta (TGF-beta)/Smad3 Signaling*. Med Sci Monit, 2018. 24: p. 1633-1641.
184. Miyajima, A., T. Asano, T. Asano, I. Yoshimura, K. Seta, and M. Hayakawa, *Tranilast ameliorates renal tubular damage in unilateral ureteral obstruction*. J Urol, 2001. 165(5): p. 1714-8.
185. Pang, M., J. Kothapally, H. Mao, E. Tolbert, M. Ponnusamy, Y.E. Chin, and S. Zhuang, *Inhibition of histone deacetylase activity attenuates renal fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. 297(4): p. F996-f1005.
186. Truong, L.D., D. Sheikh-Hamad, S. Chakraborty, and W.N. Suki, *Cell apoptosis and proliferation in obstructive uropathy*. Semin Nephrol, 1998. 18(6): p. 641-51.
187. Yang, R., X. Xu, H. Li, J. Chen, X. Xiang, Z. Dong, and D. Zhang, *p53 induces miR199a-3p to suppress SOCS7 for STAT3 activation and renal fibrosis in UUO*. Sci Rep, 2017. 7: p. 43409.
188. Francis, J.M., C.M. Heyworth, E. Spooncer, A. Pierce, T.M. Dexter, and A.D. Whetton, *Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells*. J Biol Chem, 2000. 275(50): p. 39137-45.
189. Mulay, S.R., *Multifactorial functions of the inflammasome component NLRP3 in pathogenesis of chronic kidney diseases*. Kidney Int, 2019. 96(1): p. 58-66.
190. Wyczanska, M. and B. Lange-Sperandio, *DAMPs in Unilateral Ureteral Obstruction*. Front Immunol, 2020. 11: p. 581300.
191. Linkermann, A., J.H. Bräsen, M. Darding, M.K. Jin, A.B. Sanz, J.O. Heller, F. De Zen, R. Weinlich, A. Ortiz, H. Walczak, J.M. Weinberg, D.R. Green, U. Kunzendorf, and S. Krautwald, *Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(29): p. 12024-9.
192. Shirazi, M., A. Eslahi, V. Sharifi, F. Rahimi, and A. Safarpour, *Evaluation of Caspase 3 Enzyme and TNF-alpha as Biomarkers in Ureteropelvic Junction Obstruction in Children- a preliminary report*. Pak J Med Sci, 2017. 33(2): p. 315-319.
193. Kisling, A., R.M. Lust, and L.C. Katwa, *What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease?* Life Sci, 2019. 228: p. 30-34.
194. Buchtler, S., A. Grill, S. Hofmarksrichter, P. Stöckert, G. Schiechl-Brachner, M. Rodriguez Gomez, S. Neumayer, K. Schmidbauer, Y. Talke, B.M. Klinkhammer, P. Boor, A. Medvinsky, K. Renner, H. Castrop, and M. Mack, *Cellular Origin and Functional Relevance of Collagen I Production in the Kidney*. J Am Soc Nephrol, 2018. 29(7): p. 1859-1873.
195. Brakeman, P.R., K.D. Liu, K. Shimizu, Y. Takai, and K.E. Mostov, *Nectin proteins are expressed at early stages of nephrogenesis and play a role in renal epithelial cell morphogenesis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2009. 296(3): p. F564-74.
196. Liu, Y., *Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics*. Kidney Int, 2006. 69(2): p. 213-7.
197. Wang, S., X.M. Meng, Y.Y. Ng, F.Y. Ma, S. Zhou, Y. Zhang, C. Yang, X.R. Huang, J. Xiao, Y.Y. Wang, S.M. Ka, Y.J. Tang, A.C. Chung, K.F. To, D.J. Nikolic-Paterson,

- and H.Y. Lan, *TGF-beta/Smad3 signalling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis*. *Oncotarget*, 2016. 7(8): p. 8809-22.
198. Wu, C.F., W.C. Chiang, C.F. Lai, F.C. Chang, Y.T. Chen, Y.H. Chou, T.H. Wu, G.R. Linn, H. Ling, K.D. Wu, T.J. Tsai, Y.M. Chen, J.S. Duffield, and S.L. Lin, *Transforming growth factor beta-1 stimulates profibrotic epithelial signaling to activate pericyte-myofibroblast transition in obstructive kidney fibrosis*. *Am J Pathol*, 2013. 182(1): p. 118-31.
199. Cho, K.H., K.J. Jeong, S.C. Shin, J. Kang, C.G. Park, and H.Y. Lee, *STAT3 mediates TGF-beta1-induced TWIST1 expression and prostate cancer invasion*. *Cancer Lett*, 2013. 336(1): p. 167-73.
200. Chen, X., W. Liu, J. Wang, X. Wang, and Z. Yu, *STAT1 and STAT3 mediate thrombin-induced expression of TIMP-1 in human glomerular mesangial cells*. *Kidney Int*, 2002. 61(4): p. 1377-82.
201. Yao, Z.Z., A.X. Hu, and X.S. Liu, *DUSP19 regulates IL-1beta-induced apoptosis and MMPs expression in rat chondrocytes through JAK2/STAT3 signaling pathway*. *Biomed Pharmacother*, 2017. 96: p. 1209-1215.
202. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. 21(11): p. 1819-34.
203. Ronco, P. and C. Chatziantoniou, *Matrix metalloproteinases and matrix receptors in progression and reversal of kidney disease: therapeutic perspectives*. *Kidney Int*, 2008. 74(7): p. 873-8.
204. Matsui, F., S.K. Babitz, A. Rhee, K.L. Hile, H. Zhang, and K.K. Meldrum, *Mesenchymal stem cells protect against obstruction-induced renal fibrosis by decreasing STAT3 activation and STAT3-dependent MMP-9 production*. *American journal of physiology. Renal physiology*, 2017. 312(1): p. F25-F32.
205. Fintha, A., A. Sebe, A. Masszi, T. Terebessy, T. Huszar, L. Rosivall, and I. Mucsi, *Angiotensin II activates plasminogen activator inhibitor-1 promoter in renal tubular epithelial cells via the AT1 receptor*. *Acta Physiol Hung*, 2007. 94(1-2): p. 19-30.
206. Kabei, K., Y. Tateishi, M. Nozaki, M. Tanaka, M. Shiota, M. Osada-Oka, S. Nishide, J. Uchida, T. Nakatani, S. Tomita, and K. Miura, *Role of hypoxia-inducible factor-1 in the development of renal fibrosis in mouse obstructed kidney: Special references to HIF-1 dependent gene expression of profibrogenic molecules*. *J Pharmacol Sci*, 2018. 136(1): p. 31-38.
207. Liu, N., J.K. Guo, M. Pang, E. Tolbert, M. Ponnusamy, R. Gong, G. Bayliss, L.D. Dworkin, H. Yan, and S. Zhuang, *Genetic or pharmacologic blockade of EGFR inhibits renal fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2012. 23(5): p. 854-67.
208. Terashima, H., M. Kato, H. Yasumo, H. Tsuchida, M. Mizuno, and T. Sada, *A sensitive short-term evaluation of antifibrotic effects using newly established type I collagen reporter transgenic rats*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010. 299(4): p. F792-801.
209. Xu, Z., C. Zou, W. Yu, S. Xu, L. Huang, Z. Khan, J. Wang, G. Liang, and Y. Wang, *Inhibition of STAT3 activation mediated by toll-like receptor 4 attenuates angiotensin II-induced renal fibrosis and dysfunction*. *Br J Pharmacol*, 2019. 176(14): p. 2627-2641.
210. Yan, Y., L. Ma, X. Zhou, M. Ponnusamy, J. Tang, M.A. Zhuang, E. Tolbert, G. Bayliss, J. Bai, and S. Zhuang, *Src inhibition blocks renal interstitial fibroblast activation and ameliorates renal fibrosis*. *Kidney Int*, 2016. 89(1): p. 68-81.
211. Seo, H.Y., J.H. Jeon, Y.A. Jung, G.S. Jung, E.J. Lee, Y.K. Choi, K.G. Park, M.S. Choe, B.K. Jang, M.K. Kim, and I.K. Lee, *Fyn deficiency attenuates renal fibrosis by inhibition of phospho-STAT3*. *Kidney Int*, 2016. 90(6): p. 1285-1297.

212. Hamzeh, M.T., R. Sridhara, and L.D. Alexander, *Cyclic stretch-induced TGF- β 1 and fibronectin expression is mediated by β 1-integrin through c-Src- and STAT3-dependent pathways in renal epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. 308(5): p. F425-36.
213. Liu, T., H. Jin, M. Ullenbruch, B. Hu, N. Hashimoto, B. Moore, A. McKenzie, N.W. Lukacs, and S.H. Phan, *Regulation of found in inflammatory zone 1 expression in bleomycin-induced lung fibrosis: role of IL-4/IL-13 and mediation via STAT-6*. J Immunol, 2004. 173(5): p. 3425-31.
214. Chen, S.-C. and P.-L. Kuo, *The Role of Galectin-3 in the Kidneys*. International journal of molecular sciences, 2016. 17(4): p. 565-565.
215. Sharma, U.C., S. Pokharel, T.J. van Brakel, J.H. van Berlo, J.P. Cleutjens, B. Schroen, S. Andre, H.J. Crijns, H.J. Gabius, J. Maessen, and Y.M. Pinto, *Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction*. Circulation, 2004. 110(19): p. 3121-8.
216. Henderson, N.C., A.C. Mackinnon, S.L. Farnworth, F. Poirier, F.P. Russo, J.P. Iredale, C. Haslett, K.J. Simpson, and T. Sethi, *Galectin-3 regulates myofibroblast activation and hepatic fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(13): p. 5060-5.
217. Wang, X., Y. Wang, J. Zhang, X. Guan, M. Chen, Y. Li, and L. Zhang, *Galectin-3 contributes to vascular fibrosis in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rat model*. J Biochem Mol Toxicol, 2017. 31(5).
218. Okamura, D.M., K. Pasichnyk, J.M. Lopez-Guisa, S. Collins, D.K. Hsu, F.T. Liu, and A.A. Eddy, *Galectin-3 preserves renal tubules and modulates extracellular matrix remodeling in progressive fibrosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. 300(1): p. F245-53.
219. Prud'homme, M., M. Coutrot, T. Michel, L. Boutin, M. Genest, F. Poirier, J.M. Launay, B. Kane, S. Kinugasa, N. Prakoura, S. Vandermeersch, A. Cohen-Solal, C. Delcayre, J.L. Samuel, R. Mehta, E. Gayat, A. Mebazaa, C.E. Chadjichristos, and M. Legrand, *Acute Kidney Injury Induces Remote Cardiac Damage and Dysfunction Through the Galectin-3 Pathway*. JACC Basic Transl Sci, 2019. 4(6): p. 717-732.
220. Chen, S.C. and P.L. Kuo, *The Role of Galectin-3 in the Kidneys*. Int J Mol Sci, 2016. 17(4): p. 565.
221. Dong, R., M. Zhang, Q. Hu, S. Zheng, A. Soh, Y. Zheng, and H. Yuan, *Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review)*. Int J Mol Med, 2018. 41(2): p. 599-614.
222. Lorenzen, J.M., H. Haller, and T. Thum, *MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2011. 7(5): p. 286-94.
223. Chung, A.C., X.R. Huang, X. Meng, and H.Y. Lan, *miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis*. J Am Soc Nephrol, 2010. 21(8): p. 1317-25.
224. Zarjou, A., S. Yang, E. Abraham, A. Agarwal, and G. Liu, *Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: role of miR-21*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. 301(4): p. F793-801.
225. Meng, X.M., P.M. Tang, J. Li, and H.Y. Lan, *TGF-beta/Smad signaling in renal fibrosis*. Front Physiol, 2015. 6: p. 82.
226. Miyoshi, K., M. Takaishi, K. Nakajima, M. Ikeda, T. Kanda, M. Tarutani, T. Iiyama, N. Asao, J. DiGiovanni, and S. Sano, *Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor*. J Invest Dermatol, 2011. 131(1): p. 108-17.

227. Luo, S., Z. Li, M. Xu, Q. Zhang, Y. Qu, and L. Lu, [Reversal of liver fibrosis through AG490 inhibitor-mediated inhibition of the TGFbeta1-STAT3 pathway]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 2015. 23(12): p. 939-43.
228. Li, C., A. Iness, J. Yoon, J.R. Grider, K.S. Murthy, J.M. Kellum, and J.F. Kuemmerle, *Noncanonical STAT3 activation regulates excess TGF-beta1 and collagen I expression in muscle of stricturing Crohn's disease*. *J Immunol*, 2015. 194(7): p. 3422-31.
229. Kasembeli, M.M., U. Bharadwaj, P. Robinson, and D.J. Tweardy, *Contribution of STAT3 to Inflammatory and Fibrotic Diseases and Prospects for its Targeting for Treatment*. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(8).
230. Tang, J. and L. Luo, *MicroRNA-20b-5p inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human fetal airway smooth muscle cells by targeting signal transducer and activator of transcription 3*. *Biomed Pharmacother*, 2018. 102: p. 34-40.
231. Bonner, J.C., *Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. 15(4): p. 255-73.
232. Klinkhammer, B.M., J. Floege, and P. Boor, *PDGF in organ fibrosis*. *Mol Aspects Med*, 2018. 62: p. 44-62.
233. Jastrzebski, K., D. Zdzalik-Bielecka, A. Maminska, Y. Kalaidzidis, C. Hellberg, and M. Miaczynska, *Multiple routes of endocytic internalization of PDGFRbeta contribute to PDGF-induced STAT3 signaling*. *J Cell Sci*, 2017. 130(3): p. 577-589.
234. Chen, Y.T., F.C. Chang, C.F. Wu, Y.H. Chou, H.L. Hsu, W.C. Chiang, J. Shen, Y.M. Chen, K.D. Wu, T.J. Tsai, J.S. Duffield, and S.L. Lin, *Platelet-derived growth factor receptor signaling activates pericyte-myofibroblast transition in obstructive and post-ischemic kidney fibrosis*. *Kidney Int*, 2011. 80(11): p. 1170-81.
235. Lin, S.L., F.C. Chang, C. Schimpf, Y.T. Chen, C.F. Wu, V.C. Wu, W.C. Chiang, F. Kuhnert, C.J. Kuo, Y.M. Chen, K.D. Wu, T.J. Tsai, and J.S. Duffield, *Targeting endothelium-pericyte cross talk by inhibiting VEGF receptor signaling attenuates kidney microvascular rarefaction and fibrosis*. *Am J Pathol*, 2011. 178(2): p. 911-23.
236. Ludewig, D., H. Kosmehl, M. Sommer, F.D. Bohmer, and G. Stein, *PDGF receptor kinase blocker AG1295 attenuates interstitial fibrosis in rat kidney after unilateral obstruction*. *Cell Tissue Res*, 2000. 299(1): p. 97-103.
237. Liu, F., L. Wang, H. Qi, J. Wang, Y. Wang, W. Jiang, L. Xu, N. Liu, and S. Zhuang, *Nintedanib, a triple tyrosine kinase inhibitor, attenuates renal fibrosis in chronic kidney disease*. *Clin Sci (Lond)*, 2017. 131(16): p. 2125-2143.
238. Boor, P., A. Konieczny, L. Villa, U. Kunter, C.R. van Roeyen, W.J. LaRochelle, G. Smithson, S. Arrol, T. Ostendorf, and J. Floege, *PDGF-D inhibition by CR002 ameliorates tubulointerstitial fibrosis following experimental glomerulonephritis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2007. 22(5): p. 1323-31.
239. Iyoda, M., T. Shibata, M. Kawaguchi, T. Yamaoka, and T. Akizawa, *Preventive and therapeutic effects of imatinib in Wistar-Kyoto rats with anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis*. *Kidney Int*, 2009. 75(10): p. 1060-70.
240. Zoja, C., D. Corna, D. Rottoli, C. Zanchi, M. Abbate, and G. Remuzzi, *Imatinib ameliorates renal disease and survival in murine lupus autoimmune disease*. *Kidney Int*, 2006. 70(1): p. 97-103.
241. Suzuki, H., I. Usui, I. Kato, T. Oya, Y. Kanatani, Y. Yamazaki, S. Fujisaka, S. Senda, Y. Ishii, M. Urakaze, A. Mahmood, S. Takasawa, H. Okamoto, M. Kobayashi, K. Tobe, and M. Sasahara, *Deletion of platelet-derived growth factor receptor-β improves diabetic*

- nephropathy in Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIa (Tbr286Asp) transgenic mice.* Diabetologia, 2011. 54(11): p. 2953-62.
242. Bansal, R., J. Prakash, M. De Ruiter, and K. Poelstra, *Targeted recombinant fusion proteins of IFN γ and mimetic IFN γ with PDGF β R bicyclic peptide inhibits liver fibrogenesis in vivo.* PLoS One, 2014. 9(2): p. e89878.
243. Charni Chaabane, S., A. Coomans de Brachène, A. Essaghir, A. Velghe, S. Lo Re, J. Stockis, S. Lucas, L.M. Khachigian, F. Huaux, and J.B. Demoulin, *PDGF-D expression is down-regulated by TGF β in fibroblasts.* PLoS One, 2014. 9(10): p. e108656.
244. Schindler, C., D.E. Levy, and T. Decker, *JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines.* J Biol Chem, 2007. 282(28): p. 20059-63.
245. Berthier, C.C., H. Zhang, M. Schin, A. Henger, R.G. Nelson, B. Yee, A. Boucherot, M.A. Neusser, C.D. Cohen, C. Carter-Su, L.S. Argetsinger, M.P. Rastaldi, F.C. Brosius, and M. Kretzler, *Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy.* Diabetes, 2009. 58(2): p. 469-77.
246. Madsen, M.G., *Urinary biomarkers in hydronephrosis.* Dan Med J, 2013. 60(2): p. B4582.
247. Taha, M.A., A.A. Shokeir, H.G. Osman, A. Abd El-Aziz Ael, and S.E. Farahat, *Pelvi-ureteric junction obstruction in children: the role of urinary transforming growth factor-beta and epidermal growth factor.* BJU Int, 2007. 99(4): p. 899-903.
248. Wasilewska, A., K. Taranta-Janusz, W. Debek, W. Zoch-Zwierz, and E. Kuroczycka-Saniutycz, *KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy.* Pediatr Nephrol, 2011. 26(4): p. 579-86.
249. Taranta-Janusz, K., A. Wasilewska, W. Debek, and M. Waszkiewicz-Stojda, *Urinary cytokine profiles in unilateral congenital hydronephrosis.* Pediatr Nephrol, 2012. 27(11): p. 2107-2113.
250. Jianguo, W., L. Zhenzhen, L. Xianghua, Z. Zhazheng, S. Suke, and W. Suyun, *Serum and urinary procollagen III aminoterminal propeptide as a biomarker of obstructive nephropathy in children.* Clin Chim Acta, 2014. 434: p. 29-33.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Kongenitale obstruktive Uropathien – die häufigsten Differenzialdiagnosen: 1. Oberer Harntrakt: Ureteropelvine Stenose (39-44%), primär obstruktiver Megaureter 2. Unterer Harntrakt: Posteriore Urethralklappen (39%), Urethralatresie (9-14%) [2].....	6
Abbildung 2: Stadieneinteilung (Grad I-IV) der Hydronephrose [13].....	7
Abbildung 3: Nephrogenese: Nierenvorstufen Pronephros, Mesonephros und Metanephros. Endgültige Nierenanlage entsteht aus Metanephros durch das Einsprossen der Ureterknospe (grau) ins metanephrogene Blasem (rot) (= „reziproke Induktion“); Skizze modifiziert nach [3, 4].....	9
Abbildung 4: Nephrogenese und obstruktive Uropathie, bzw. UUU: Die Nephrogenese findet bei Mäusen v.a. postnatal statt versus pränatal beim Menschen (siehe beide Kurven der Nephronenentwicklung). Postnatal induzierte UUU im Mausmodell und die intrauterin entstandene obstruktive Uropathie beim Menschen betreffen die gleiche Phase der Nephrogenese.....	11
Abbildung 5: Pathophysiologische Zusammenhänge der UUU: Inflammation (grün), tubuläre Atrophie (blau), Fibrose (rot); geschädigte Tubuluszellen und Makrophagen sezernieren pro-inflammatorische und profibrotische Zytokine; Differenzierung von Tubuluszellen zu Myofibroblasten über EMT (epitheliale-mesenchymale Transition) (rote Pfeile symbolisieren Aktivierung, Kreis Pfeile symbolisieren autokrine Aktivierung) [1].....	13
Abbildung 6: Profibrotische Makrophagen (M): Chemokinvermittelte Einwanderung ins Interstitium, durch Sekretion profibrotischer Zytokine Aktivierung von Myofibroblasten [69, 77, 78].....	14
Abbildung 7: Programmierter Zelltod- Nekroptose und Apoptose; FADD (Fas-associated Death Domain Protein), RIPK (receptor interacting protein kinase), MLKL (mixed-lineage kinase domain-like Pseudokinase) [1].....	15
Abbildung 8: Ursachen der UUU-bedingten Apoptose; Tubulusepithelzellen (TEZ) und Makrophagen fördern durch gesteigerte Sekretion pro-apoptotischer Faktoren und verminderte Sekretion anti-apoptotischer Faktoren die Apoptose; mechanischer und oxidativer Stress sowie toxische Lipide wirken ebenfalls pro-apoptotisch.....	16
Abbildung 9: Entstehung von aktivierten Myofibroblasten über Differenzierungs- und Aktivierungsprozesse [12]; Myofibroblasten werden durch pro-inflammatorische Zytokine und epigenetische Reprogrammierung aktiviert und produzieren extrazelluläre Matrix (EZM); Skizze modifiziert nach [15].....	17
Abbildung 10: Das Platelet-derived Growth Factor System (PDGF) bestehend aus zwei Rezeptorketten PDGFR- α (grün) und PDGFR- β (gelb). Die Liganden sind die Dimere PDGF-CC,-AA,-AB,-BB,-DD. Gesicherte Liganden-Rezeptor Bindungsmöglichkeiten sind mit einer durchgehenden Linie gekennzeichnet, vermutete Bindungsmöglichkeiten mit gestrichelter Linie [114].....	19
Abbildung 11: JAK2/STAT3-Signaltransduktionsweg: Rezeptor-Ligandenbildung führt über die intrazelluläre JAK2-Phosphorylierung zur STAT3-Aktivierung. Das phosphorylierte STAT3-Dimer reguliert im Zellkern als Transkriptionsfaktor die Expression von STAT3-Zielgenen; Skizze angelehnt an: [8-11].....	20
Abbildung 12: Die chemische Struktur von Tyrphostin AG490.....	22
Abbildung 13: Durchschnittliche Applikationsvolumina der täglichen subkutanen Tyrphostin AG490 Injektionen.....	26
Abbildung 14: Versuchsplan: Operative Ureterligatur (UUO) am 2. Lebenstag, anschließend tägliche Injektion von Tyrphostin AG490 bzw. Vehikellösung. Die Organentnahme erfolgte am 3., 7., und 14. Lebenstag.....	27
Abbildung 15: Dilatierte Tubuli in UUU-Niere am 7. Lebenstag (A), Sham-Niere am 7. Lebenstag (B): Nach Ureterligatur am 2. LT wurden die Nieren am 7. LT	

entnommen und immunhistochemisch gefärbt. Darstellbar ist die Dilatation der Tubuli und Sammelrohre in der UUO-Niere (d7) (siehe → in Bild A). In der Sham-Niere zeigt sich dieser Effekt am 7. LT nicht (Bild B).	33
Abbildung 16: Reduktion der Galectin-3 Expression in den Tubuli und im Interstitium der neonatalen UUO-Niere durch Tyrphostin AG490. Galectin-3 Expression am 14. Lebenstag in einer UUO-Niere nach Behandlung mit Vehikel (A) bzw. Tyrphostin AG490 (B); x 400 vergrößert.....	34
Abbildung 17: Tubuläre Galectin-3 Expression in der neonatalen UUO-Niere. Morphometrische Analyse Galectin-3 positiver Tubulusepithelzellen in UUO-Nieren mit Vehikel-, bzw. Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag (LT), x-fach bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=8; **p < 0,01.....	36
Abbildung 18: Interstitielle Makrophageninfiltration in der neonatalen UUO-Niere. Morphometrische Analyse Galectin-3 positiver Zellen im Interstitium in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag (LT), x-fach bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=8; ** p < 0,01.....	37
Abbildung 19: Glomeruläre Galectin-3 Expression in der neonatalen UUO-Niere. Morphometrische Analyse Galectin-3 positiver Glomeruli in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag (LT), x-fach bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=8; * p < 0,05; ** p < 0,01.....	38
Abbildung 20: Morphometrische Analyse Kollagen-I positiver Felder in der neonatalen UUO-Niere mit Vehikel-bzw. Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag (LT), x-fach bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle in 20 Gesichtsfeldern, n=8; ** p < 0,01; *** p < 0,001.....	41
Abbildung 21: Reduktion der Kollagen-I-Expression durch Tyrphostin AG490 in der neonatalen UUO-Niere. Kollagen-I Expression am 14. Lebenstag in einer UUO-Niere nach Behandlung mit Vehikel (A) bzw. Tyrphostin AG490 (B); x 400 vergrößert.....	41
Abbildung 22: Expression von Caspase-8 (A) in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=3; * p < 0,5.....	42
Abbildung 23: Expression von PDGF-Rezeptor-β in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=3.....	43
Abbildung 24: Expression von Galectin-3 in UUO-Nieren mit Vehikel- bzw Tyrphostin AG490-Behandlung am 3., 7. und 14. Lebenstag, bezogen auf die scheinoperierte Kontrolle, n=3.....	44
Abbildung 26: STAT3-Blockade durch Tyrphostin AG490 reduziert Inflammation, Apoptose und Fibrose	58

Tabelle 1: Gruppeneinteilung a) Immunhistochemie, b) Westernblots; UUU, IO (=Intact opposite) und Sham (=Scheinoperiert); n= Anzahl der Nieren;	25
Tabelle 2: Galectin-3 Expression: Mittelwert \pm Standardfehler, UUU ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle am 3.,7. und 14. Lebenstag	34
Tabelle 3: Kollagen-I positive Felder (Mittelwert \pm Standardfehler), UUU ureterligierte Nieren, IO kontralaterale Nieren, Sham scheinoperierte Kontrolle, jeweils am 3.,7. und 14. Lebenstag.....	39
Tabelle 4: Veränderung in den UUU- und IO-Nieren bezogen auf scheinoperierte Kontrollen: \leftrightarrow keine Veränderung; \uparrow/\downarrow Anstieg/Abfall $>10\%$; $\uparrow\uparrow$ Anstieg 10-100%; $\downarrow\downarrow$ Abfall 10-50%; $\uparrow\uparrow\uparrow$ Anstieg $> 100\%$; $\downarrow\downarrow\downarrow$ Abfall $> 50\%$	58

8 Danksagung

Von Herzen möchte ich Frau Prof. Dr. Lange-Sperandio danken Teil Ihres Forschungsteams gewesen zu sein. Mit ihrer kompetenten Betreuung, vielen Ratschlägen und ihrer begeisternden und engagierten Art hat sie mich durch die Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitet. Desweiteren möchte ich mich bei Ursula Keller bedanken, die mich herzlich in das nephrologische Labor aufgenommen hat und mich mit viel Geduld in die Immunhistochemie eingearbeitet hat.

Schließlich möchte ich bei meinem Mann und meiner Familie bedanken, die mir immer bedingungslosen Rückhalt geboten haben.

9 Affidavit

Eidesstattliche Versicherung

Génot, Teresa

Name, Vorname

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

**Tyrphostin AG490 reduziert Makrophageninfiltration,
Apoptose und interstitielle Fibrose in der neonatalen Niere
nach unilateraler Ureterligatur**

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

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

München, den 23.12.2022
Ort, Datum

Teresa Génot
Unterschrift der Doktorandin

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Teresa Génot, geb. Schaubeck
Geburtsdatum: 05.02.1990
Geburtsort: München
Familienstand: verheiratet

Beruflicher Werdegang:

seit 06/2018 Assistenzärztin der Gynäkologie, Klinikum Starnberg

2010 – 2017 Medizinstudium, LMU- München
05/17 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: 1,6

01/17 – 04/17 PJ-Tertial Pädiatrie, Kinderklinikum Dritter
Orden, München

09/16 – 12/16 PJ-Tertial Chirurgie, Jordan University Hospital
(Amman) & Kind Abdullah University Hospital
(Irbid), Jordanien

05/16 – 08/16 PJ-Tertial Innere Medizin, Klinikum Dritter
Orden, München

02/15 – 07/15 Université Victor Segalen de Bordeaux II,
Erasmussemester Frankreich

Schulbildung:

2007 – 2009 Bernhard-Strigel-Gymnasium, Memmingen; Abitur

2000 – 2007 Rupert-Ness-Gymnasium, Ottobeuren

1996 – 2000 Sebastian- Kneipp-Grundschule, Bad Grönenbach

11 Publikationsliste

Gasparitsch M, Schieber A, Schaubek T, Keller U, Cattaruzza M, Lange-Sperandio B. Tyrphostin AG490 reduces inflammation and fibrosis in neonatal obstructive nephropathy. PLoS One. 2019 Dec 17;14(12):e0226675. doi: 10.1371/journal.pone.0226675. PMID: 31846485; PMCID: PMC6917291.