

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Serelaxin-vermittelte Inhibition von Fibroblastenaktivierung bei renaler Fibrogenese

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Friederike Hesse

aus
Göttingen

Göttingen 2018

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in	Prof. Dr. Michael Zeisberg
Ko-Referent/in:	PD Dr. Frauke Czepluch
Drittreferent/in:	Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 03.04.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "**Serelaxin-vermittelte Inhibition von Fibroblastenaktivierung bei renaler Fibrogenese**" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Medizinische und gesellschaftliche Relevanz von chronischen Nierenerkrankungen	1
1.2 Chronische Niereninsuffizienz	3
1.2.1 Definition und Stadieneinteilung.....	3
1.2.2 Klinische Folgen der chronischen Niereninsuffizienz	4
1.3 Definition der tubulointerstitiellen Fibrose.....	4
1.3.1 Pathogenese der Nierenfibrose	5
1.3.2 Myofibroblasten	5
1.3.3 Therapieoptionen bei chronisch progredienter Niereninsuffizienz.....	6
1.4 TGF- β -Superfamilie	7
1.4.1 Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1).....	7
1.4.2 TGF-beta-Rezeptor-Signalkaskade	8
1.5 Relaxin	10
1.5.1 Geschichte.....	10
1.5.2 Aufbau und Synthese des Peptidhormons Relaxin	10
1.5.3 Expression und Sekretion von Relaxin-Peptiden im Menschen und in Mäusen	12
1.5.4 Aktivierung der Signal-Transduktions-Wege durch Relaxin-Peptide	12
1.6 Definition der Epigenetik	14
1.7 DNA-Methylierung.....	15
1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
2. Material	18
2.1 Geräte	18
2.2 Software und Datenbanken	19
2.3 Gebrauchsmaterialien	19
2.4 Chemikalien und Reagenzien	20
2.5 Kitsysteme.....	21
2.6 Puffer und Lösungen.....	23
2.7 Stimulanzien.....	24
2.8 Oligonukleotide (Primer)	25
2.9 Antikörper.....	26

2.10	Zelllinien sowie murine und humane Gewebsproben	27
3.	Methoden	29
3.1	Zellbiologische Methoden	29
3.1.1	Trypsinierung und Passagieren der Fibroblasten	29
3.1.2	Auftauen und Einfrieren von adhärennten Zellen	29
3.2	Mausstudie	30
3.2.1	Tiermodell und Studiendesign	30
3.2.2	Berechnung der Medikamentendosierung	30
3.2.3	Funktionsweise und Implantierung der osmotischen Minipumpe	31
3.2.4	Unilaterale Ureterobstruktion	31
3.2.5	Präparation der Versuchstiere	32
3.2.6	Verarbeitung und Lagerung der Blutproben	32
3.2.7	Zweites unabhängiges Tiermodell (medikamententoxische Verifikation mit anderem genetischen Hintergrund - FVBN)	32
3.3	Proteinbiologische Methoden	33
3.3.1	Proteinisolation	33
3.3.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	34
3.3.3	Proteintransfer	34
3.3.4	Semi-Dry-Western Blot	35
3.4	Molekularbiologische Methoden	36
3.4.1	RNA-Isolation aus Fibroblasten und murinem Gewebe	36
3.4.2	Reverse Transkription der mRNA in cDNA	38
3.4.3	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	38
3.4.4	DNA-Isolation aus murinem Gewebe	40
3.4.5	Methylierte DNA-Immunopräzipitation (MeDips)	41
3.5	Histologische Methoden	42
3.5.1	Anfertigung und Aufbereitung der Gewebeschnitte	42
3.5.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	43
3.5.3	Periodsäure-Schiff'sche-Färbung (PAS-Färbung)	44
3.5.4	Masson-Trichrom-Färbung	44
3.5.5	Immunfluoreszenz	45
3.5.6	Histologische Auswertungen	47
3.5.7	Statistische Analysen	48
4.	Ergebnisse	49
4.1	Versuche im Mausmodell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO)	49

4.1.1	Expression von Relaxin-1 in der murinen Niere	49
4.2	Lokalisation und Expression der Relaxin-Rezeptoren-1 und -2 (<i>Rxfp1</i> und <i>Rxfp2</i>) in der murinen Niere.....	49
4.2.1	Erhöhte Expression in der UUO-Niere	49
4.3	Dosisabhängiger Einfluss von RLX030 auf renale Myofibroblasten-Akkumulation nach UUO an Tag drei, sieben und zehn	51
4.3.1	Geschlechtsunspezifische Wirkung von RLX030	53
4.4	Bestätigung der Ergebnisse in einem zweiten unabhängigen Maus-Modell	54
4.5	Wirkung von RLX030 auf die TGF- β 1- Signalkaskade.....	56
4.5.1	Inhibition des Smad2-Signalwegs	56
4.6	Regulation der Matrixmetalloproteinasen-2, -3 und -9.....	58
4.7	<i>Rescue</i> -Experiment	60
4.8	RLX030 ist äquivalent wirksam in humanen Fibroblastenkulturen	62
4.9	Expression der Relaxin-Isoformen sowie deren Rezeptoren in humanen Nierenbiopsien	62
4.10	Aberrante Promotermethylierung als Biomarker für endogenen Relaxin-Verlust.....	65
4.10.1	Der Verlust von intrarenalem Relaxin beruht auf aberranter Promotermethylierung	65
4.10.2	Aberrante Relaxin-Promotermethylierung akkumuliert in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	67
5.	Diskussion.....	69
5.1	Studienlage RLX030	69
5.2	Induktion der Relaxin-Rezeptoren in der geschädigten Niere	69
5.3	Attenuierung der renalen Fibrosierung <i>in vivo</i> durch Applikation von RLX030	71
5.4	Molekulare Transduktionsmechanismen zur Inhibition der renalen Fibrogenese	74
5.5	Beleuchtung des intrarenalen Verlusts von Relaxin durch epigenetische Regulationsmechanismen.....	75
5.6	Molekulargenetische Identifikation eines therapielevanten Biomarkers.....	76
6.	Zusammenfassung	80
7.	Anhang.....	82
8.	Literaturverzeichnis.....	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn	2
Abbildung 2:	TGF- β 1 Signalkaskade	9
Abbildung 3:	Struktur des Peptidhormons Relaxin.....	11
Abbildung 4:	Signaltransduktion von <i>RXFP1</i> vermittelt durch Relaxin	14
Abbildung 5:	DNA-Methylierung	16
Abbildung 6:	Initiales Mausmodell zur Untersuchung des inhibitorischen Effekts von RLX030.....	30
Abbildung 7:	Osmotische Minipumpe Modell 1002 der Firma Alzet®	31
Abbildung 8:	Zweites unabhängiges Mausmodell mit dem genetischen Hintergrund FVBN und Folsäure-Applikation zur Induktion der Nierenfibrose	33
Abbildung 9:	Expression von Relaxin-1.....	49
Abbildung 10:	Expression der Relaxin-Rezeptoren-1 und -2.....	50
Abbildung 11:	Lokalisation von Relaxin-Rezeptoren-1 und -2 in der Kontroll- sowie fibrotisch veränderten Niere.....	51
Abbildung 12:	Inhibition der experimentellen renalen Fibrogenese durch RLX030 im histopathologischen Korrelat der UUO-Niere.....	52
Abbildung 13:	Geschlechtsunspezifische Wirkung von RLX030	53
Abbildung 14:	Antifibrotische Wirkung von RLX030 im Maus-Modell der Folsäure-Nephropathie.	55
Abbildung 15:	Inhibition des pSmad2-Signalwegs im murinen Gewebe.....	56
Abbildung 16:	Inhibition des pSmad-Signalwegs in Primärkulturen muriner Fibroblasten	57
Abbildung 17:	RLX030 Wirkung auf murine Fibroblastenproliferation	57
Abbildung 18:	Regulation der Matrixmetalloproteinasen-2, -3 und -9.....	58
Abbildung 19:	Expression von Matrixmetalloproteinasen-2 und -9 in der Immunfluoreszenzfärbung von murinen Nierenpräparaten	59
Abbildung 20:	Mausmodell der <i>Rescue</i> -Studie über einen Zeitraum von 14 Tagen	60
Abbildung 21:	RLX030 vermittelt protektive Effekte bei schon etablierter Nierenfibrose.....	61
Abbildung 22:	Inhibition der humanen Fibroblastenproliferation durch RLX030.....	62
Abbildung 23:	Expression der Relaxin-Isoformen in humanen Nierenbiopsien	63
Abbildung 24:	Heatmap: <i>RLN1</i> - und <i>RLN2</i> -Verlust assoziiert mit der Progression chronischer Niereninsuffizienz (CKD).....	64
Abbildung 25:	Expression der Relaxin-Rezeptoren-1 und -2 in humanen Nierenbiopsien.....	65
Abbildung 26:	Korrelation von intrarenaler <i>RLN1/RLN2</i> -Methylierung mit intrarenaler <i>RLN1/RLN2</i> Expression.....	65
Abbildung 27:	Korrelation von intrarenaler <i>RLN1/RLN2</i> -Methylierung mit <i>RLN1/RLN2</i> -Methylierung im Blut.....	66
Abbildung 28:	Korrelation von <i>RLN1/RLN2</i> -Methylierung im Blut mit intrarenaler <i>RLN1/RLN2</i>	

	Expression	66
Abbildung 29:	Korrelation von intrarenaler <i>Rln1/Rln3</i> -Methylierung mit <i>Rln1/Rln3</i> -Methylierung im Blut	67
Abbildung 30:	Nierenfunktionseinschränkung korreliert mit aberranter Relaxin-Promotormethylierung	68
Abbildung 31:	Heatmap der Relaxin-Isoformen und entsprechende Rezeptoren in gesunden, kontralateralen (KL) und UUO-Nieren	70
Abbildung 32:	Veränderte Relaxin-Rezeptor-1-Expression in geschädigten Nieren mit einhergehendem endogenen Relaxin-Verlust.....	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Diagnosekriterien chronischer Nierenerkrankungen (CKD)	3
Tabelle 2:	Vorkommen von Relaxin und seinen Rezeptoren im humanen und murinen Nieren ...	12
Tabelle 3:	Purelink® RNA Mini-Kit.....	21
Tabelle 4:	Pierce™ BCA™ Protein Assay.....	21
Tabelle 5:	Superscript® II Reverse Transcriptase	21
Tabelle 6:	Supersignal® West Pico	22
Tabelle 7:	Trichrom-Farbstoff (Masson) Kit	22
Tabelle 8:	Weigert's Eisenhämatoxylin Set	22
Tabelle 9:	Dneasy Blood & Tissue Kit (250).....	22
Tabelle 10:	Methylamp™ Methylated DNA Capture Kit	22
Tabelle 11:	Primersequenzen von PrimerDesign für die qRT-PCR	25
Tabelle 12:	Primersequenzen von Eurofins MWG Operon für die qRT-PCR	26
Tabelle 13:	Verwendete Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung	26
Tabelle 14:	Verwendete Zelllinien	27
Tabelle 15:	Verwendete Antikörper für die Western Blots.....	36
Tabelle 16:	Stimulationsschema von Fibroblasten für die qRT-PCR	36
Tabelle 17:	Oligonukleotid-Ansatz für die reverse Transkription.....	38
Tabelle 18:	RNAseOut-Ansatz für die reverse Transkriptase.....	38
Tabelle 19:	Primersequenzen für die qRT-PCR.....	39
Tabelle 20:	Primersequenzen für die methylierte DNA-Immunopräzipitation (MeDiP)	42
Tabelle 21:	Lösungen der HE-Färbung	43
Tabelle 22:	Lösungen der PAS-Färbung	44
Tabelle 23:	Lösungen der MTS-Färbung.....	44
Tabelle 24:	Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung <i>in vivo</i>	46
Tabelle 25:	Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung <i>in vitro</i>	47
Tabelle 26:	Patientenkohorte mit chronischen Nierenerkrankungen aufgeschlüsselt hinsichtlich klinischer und histologischer Charakteristika	82

Abkürzungsverzeichnis

Nicht gesondert aufgeführt sind die im deutschen Sprachgebrauch üblichen Standardabkürzungen

AK	Antikörper	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
AR	<i>androgen receptor</i>	DMSO	Dimethylsulfoxid
α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
AT-2	Angiotensin-2	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
a.u.	arbiträre Einheit (<i>arbitrary unit</i>)	DTT	1,4-Dithiothreitol
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
BMP7	<i>bone morphogenetic protein 7</i>	EMT	epithelial-mesenchymale Transition
bp	Basenpaare	ESRD	terminales Nierenversagen (<i>end-stage renal disease</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)	EtOH	Ethanol
C ₀	Talspiegel	FSGS	segmentale Glomerulosklerose
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)	FSP1	<i>fibroblast-specific protein 1</i>
CKD	chronisch progrediente Nieren- insuffizienz (<i>chronic kidney disease</i>)	fwd	Vorwärtsprimer (<i>forward primer</i>)
COL1A1	<i>collagen type I α1</i>	GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Co-SMAD	<i>common-mediator SMAD</i>	GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Ct	<i>threshold cycle</i>	h	Stunde(n)
Δ CT / $\Delta\Delta$ CT	delta-CT / delta delta-CT	HE	Hämatoxylin-Eosin
CYP3A4/5	<i>cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4/ polypeptide</i>	HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	IL	<i>interleukin</i>
DGfN	Deutsche Gesellschaft für Nephrologie	Ig	Immunoglobulin
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation	I-SMAD	inhibitorisches SMAD
DTG	Deutsche Transplantationsgesellschaft	kDa	Kilodalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser	KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcome
		LDS	Lithiumdodecylsulfat
		M	Molarität

MET	mesenchymal-epitheliale Transition	SV40	<i>Affenvirus 40 (Simian virus 40)</i>
min	Minute(n)	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris-buffered saline</i>)
MOPS	3-(N-Morpholino)- propansulfonsäure	TBS-T	<i>tris-buffered saline Tween</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)	TGF- β 1	<i>transforming growth factor-β1</i>
MTS	Masson-Trichrom-Färbung (<i>Masson's trichrome stain</i>)	TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
NF- κ B	<i>nuclear factor of kappa light poly- peptide gene enhancer in B-cells 1</i>	Tween 20	<i>polyoxyethylen(20)-sorbitan- monolaurat</i>
NFW	nukleasefreies Wasser	USRDS	United States Renal Data System
NTN	nephrotoxische Serum Nephritis	UUO	unilaterale Ureterobstruktion
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (<i>periodic acid-Schiff reaction</i>)	<i>Weitere Abkürzungen sind an entsprechender Stelle im Text ausgeführt.</i>	
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate- buffered saline</i>)		
PBS-T	<i>phosphate-buffered saline Tween</i>		
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)		
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin		
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase		
pSMAD	phosphoryliertes SMAD		
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>		
rev	Rückwärtsprimer (<i>reverse primer</i>)		
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)		
RNase	Ribonuklease		
R-SMAD	regulatorisches SMAD		
s	Sekunde(n)		
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)		
siRNA	<i>small interfering RNA</i>		

1. Einleitung

1.1 Medizinische und gesellschaftliche Relevanz von chronischen Nierenerkrankungen

Chronische Nierenerkrankungen sind ein weltweites Gesundheitsproblem. Allein in Deutschland und den USA nahm die Inzidenz und Prävalenz von chronischen Nierenerkrankungen in den letzten 10 Jahren stetig zu. Gemäß dem Annual Data Report des United States Renal Data System (USRDS) lag 1993 die Inzidenz einer terminalen Niereninsuffizienz bzw. ESRD (End Stage Renal Disease) bei 63.596 Patienten pro Jahr und stieg bis 2013 auf 117.162 Patienten per anno an. Dies entspricht einer Steigerung der Inzidenz um ca. 46% innerhalb von 20 Jahren (USRDS 2013 Annual Data Report).

Nach dem Bericht der Gesellschaft für Qualitäts-Sicherung Niere – QuaSI-Niere von 2006/2007 können in der Bundesrepublik Deutschland vergleichbare Tendenzen beobachtet werden. 1995 wurden in Deutschland 54.656 Patienten mit einer chronischen Nierenersatztherapie behandelt, ein Jahrzehnt später betrug die Summe aller Patienten in chronischer Nierenersatztherapie schon 91.718 Patienten. Zur Nierenersatztherapie zählen Dialysebehandlungen (66.508 Patienten im Jahr 2006), welche unterteilt werden in Hämo- (63.307) und Peritonealdialyse (3.201) sowie die Nierentransplantationen (2.776 Patienten). Die Zahl der Neuaufnahmen in die chronische Nierenersatztherapie (Inzidenz) stieg von 11.731 Patienten im Jahr 1995 auf 17.548 Patienten 2006. Dies ergibt eine prozentuale Steigerung um 33% (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

Diese Zunahme ist nicht alleine durch den demographischen Wandel erklärbar, sondern bedarf auch einer genaueren Betrachtung der Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn einer Nierenersatztherapie. Die Diagnose des Diabetes mellitus wurde mit 34% am häufigsten erfasst, wobei der größte Anteil (32%) vom Diabetes mellitus Typ II gestellt wird (Frei und Schober-Halstenberg 2008, Whaley-Connell et al. 2009). Gleich dahinter ist die vaskuläre Nephropathie mit 24% zu nennen, gefolgt von den Glomerulonephritiden mit 13% und der interstitiellen Nephritis mit 8% (Frei und Schober-Halstenberg 2008, Bakris und Ritz 2009, Collins et al. 2015). Wie aus dem Bericht der QuaSI-Niere 2006/2007 hervorgeht, nehmen vor allem die altersbedingten Erkrankungen immer weiter zu. Neben dem Diabetes mellitus Typ II ist hier vor allem die vaskuläre Nephropathie zu nennen, deren prozentualer Anteil von 14% im Jahr 1997 auf 24% bis 2006 angestiegen ist. Als chronische Nierenerkrankungen bezeichnet, bedingen sie häufig eine irreversible und progressive Reduktion der Nierenfunktion, welche mit der Ausbildung einer terminalen Niereninsuffizienz einhergeht. Neben der steigenden Inzidenz und Prävalenz von Patienten in Nierenersatztherapien wird auch eine Zunahme weiterer Risikofaktoren beobachtet, welche unter anderem zu einem Anstieg der Mortalität führen. Hier stellen kardiale (39,7%) und Infektionskrankheiten (17,8%) die häufigsten Todesursachen bei

Frauen und Männern dar, gefolgt von vaskulären (11,8%) und malignen Erkrankungen (10,3%) (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

Mehrmalige Dialysesitzungen pro Woche oder immunsuppressive Therapien nach Nierentransplantation führen neben einer verkürzten Lebensdauer und Einschränkung der Lebensqualität auch zu einer erheblichen Kostenzunahme im Gesundheitswesen. Derzeit belaufen sich die kumulativen Kosten allein für die ambulante Dialysebehandlung pro Patient im Jahr auf etwa 40.000 Euro in Deutschland (DGfN 2014, Nebel 2003). Somit verursachen Dialysebehandlungen in der Bundesrepublik Deutschland jährlich schätzungsweise Kosten in Höhe von ca. 3 Milliarden Euro (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

Sowohl die klinische als auch die volkswirtschaftliche Relevanz von terminaler Niereninsuffizienz und effektiven Behandlungsmethoden sind folglich essentiell und verdeutlichen die Notwendigkeit von präventiven Maßnahmen.

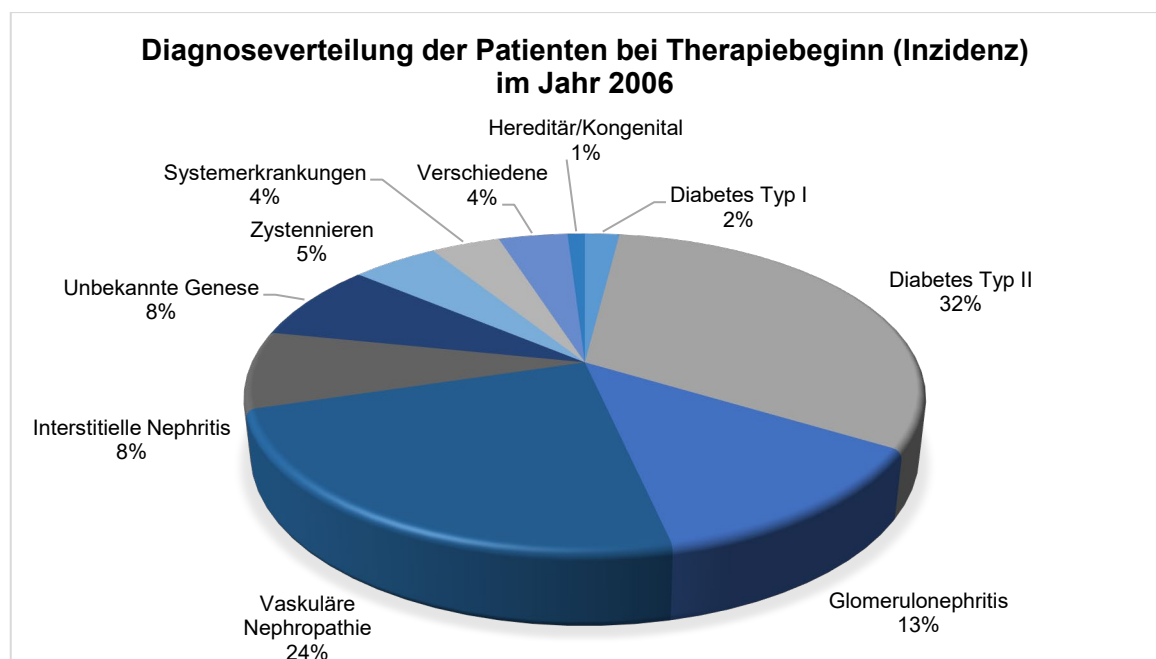


Abbildung 1: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahr 2006 (modifiziert nach Frei und Schober-Halstenberg 2008).

1.2 Chronische Niereninsuffizienz

1.2.1 Definition und Stadieneinteilung

2003 wurde KDIGO – Kidney Disease – Improving Global Outcomes von der Amerikanischen Nierenstiftung (National Kidney Foundation) als eine unabhängige, gemeinnützige Organisation gegründet. Entsprechend ihrer Satzung verfolgt die KDIGO das Ziel, die Behandlung und Prognose von Patienten mit Nierenerkrankungen weltweit durch die Entwicklung und Implementierung globaler Leitlinien (kdigo.org) zu verbessern.

Der Begriff einer chronischen Nierenerkrankung ist seitdem neu definiert. Von einer chronischen Niereninsuffizienz (CKD) wird folglich gesprochen, wenn eine abnormale Nierenstruktur oder renale Funktionseinschränkung länger als 3 Monate andauert.

Marker für eine Nierenschädigung sind demnach: eine reduzierte errechnete glomeruläre Filtrationsrate (eGFR <60 ml/min/1,73m²), eine Albuminurie (AER ≥30 mg/24h) sowie pathologische Veränderungen des Urinsediments, des Serums, der Histologie oder der Bildgebung.

Relevante Prognosefaktoren für den Behandlungserfolg der chronischen Niereninsuffizienz sind folgende Faktoren: Zum einen muss die Ursache einer chronischen Nierenerkrankung identifiziert, sowohl die eGFR- (G1-G5) als auch die Albuminurie-Kategorie (A1-A3) erfasst und weitere Risikofaktoren oder Komorbiditäten ausgeschlossen werden (KDIGO CKD Work Group. 2013).

Tabelle 1: Diagnosekriterien chronischer Nierenerkrankungen (CKD) (modifiziert nach KDIGO CKD Work Group 2013, Seite 5)

Prognose der chronischen Niereninsuffizienz				Albuminurie-Kategorie (Albuminausscheidung im Urin in mg/g)		
				A1	A2	A3
				Normal / leicht erhöht	Moderat erhöht	Stark erhöht
				<30 mg/g	30-300 mg/g	>300 mg/g
eGFR-Kategorie Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min/1,73m ²)	G1	Normal oder hoch	≥90	55,6	1,9	0,4
	G2	Mild eingeschränkt	60-89	32,9	2,2	0,3
	G3a	Mild / moderat eingeschränkt	45-59	3,6	0,8	0,2
	G3b	Moderat / schwer eingeschränkt	30-44	1,0	0,4	0,2
	G4	Schwer eingeschränkt	15-29	0,2	0,1	0,1
	G5	Nierenversagen	<15	0,0	0,0	0,1

Die Farbkodierung gibt das Risiko für das Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz an: grün: niedriges Risiko, gelb: moderat erhöhtes Risiko, orange: hohes Risiko, rot: sehr hohes Risiko. Die aufgeführten Ziffern in den entsprechenden Feldern zeigen die prozentuale

Verteilung der erwachsenen Bevölkerung der USA innerhalb dieser Gruppe. Vergleichbare Werte sind in Deutschland aktuell nicht verfügbar.

1.2.2 Klinische Folgen der chronischen Niereninsuffizienz

Häufig besteht bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz eine lange Latenzphase der Beschwerdefreiheit. Erst bei bereits etablierter Niereneinschränkung im Stadium 4 (G4) der Niereninsuffizienz kommt es bei 42% der Patienten im Rahmen von Routineuntersuchungen zur Diagnosestellung (Coresh et al. 2007, Methven und MacGregor 2009). Typischerweise induziert die renale exkretorische Funktionseinschränkung nicht nur eine Störung des Volumen-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes mit einhergehender Ödembildung, sondern auch eine Urämiesymptomatik. Diese ist bedingt durch fehlende Elimination harnpflichtiger Substanzen (z.B. Harnstoff-N, Polyamine, β 2-Mikroglobulin) sowie deren toxische Wirkung auf verschiedene Organe. Urämiesymptome sind vielfältig, gefürchtet sind vor allem die Entwicklung einer urämischen Perikarditis/Pleuritis sowie einer urämischen Enzephalopathie, die bis zum Koma führen kann (Vanholder et al. 2016). Darüber hinaus ist ebenfalls eine Abnahme der inkretorischen Nierenfunktion zu konstatieren. Aufgrund einer eingeschränkten Erythropoetin- und Calcitriolsynthese kommt es sowohl zur Ausbildung einer renalen Anämie als auch konsekutiv, durch Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreodismus, zur renalen Osteopathie (Keller und Geberth 2010, Vanholder et al. 2008). Die Mehrheit der Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz versterben an kardiovaskulären Folgeerkrankungen zum einen bedingt durch koronare Herzerkrankungen bei Phosphat- und Kalziumablagerungen und zum anderen durch Herzrhythmusstörungen im Rahmen von Elektrolytstörungen, insbesondere Hyperkaliämien (Gao und Liu 2017).

1.3 Definition der tubulointerstitiellen Fibrose

Chronische Nierenerkrankungen, ungeachtet ihrer Genese, beruhen auf vergleichbaren Pathomechanismen, welche zu einer progredienten Destruktion des funktionellen Nierenparenchyms aufgrund von Vernarbungsprozessen (Fibrosierung) führen (Eddy 1996). Dieser als tubulointerstitielle Fibrose bezeichnete pathologische Vernarbungsprozess führt zu einer Zerstörung der physiologischen Organstruktur und zu einer erheblichen Einschränkung der Organfunktion (Risdon et al. 1968). Charakteristisch ist das kombinierte Auftreten einer tubulointerstitiellen Fibrose mit tubulärer Atrophie (IFTA), einer Glomerulosklerose sowie einer Rarefizierung peritubulärer Kapillaren (Bröcker et al. 2010, Boor et al. 2010, Eddy 2013). Das Ausmaß dieser Veränderungen hat einen signifikanten Einfluss auf die weitere Prognose der Nierenfunktion (Bohle et al. 1987). Der chronische Funktionsverlust von Organen wie Herz, Lunge, Leber, Knochenmark und Niere trägt geschätzt zu einem Drittel der natürlichen Todesfälle weltweit bei (Zeisberg und Kalluri 2013).

1.3.1 Pathogenese der Nierenfibrose

Der Prozess der renalen Fibrogenese ist hochkomplex und wird durch multiple Einflussfaktoren bestimmt. Das Verständnis über die Pathomechanismen bei der Entstehung der Nierenfibrose ist jedoch essentiell für die Entwicklung von neuen therapeutischen Behandlungsverfahren.

Die Fibrogenese wird auch als „pathologische Wundheilung“ bezeichnet, da sie mit einer zunehmenden Akkumulation von extrazellulärer Matrix einhergeht (Bröcker et al. 2010). Sie entspricht der Gewebsantwort auf verschiedene Schädigungsreize, wie einer Hyperglykämie, Hypertonie oder Autoimmunreaktion. Die histologisch typischen Veränderungen der IFTA können als gemeinsame Endstrecke von pathogenetisch unterschiedlichen Nierenerkrankungen gesehen werden. Aufgrund der immanenten Schädigungsreize kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen pro- und antifibrotischen Zytokinen und der daraus resultierenden progressiven

Matrixakkumulation und reduzierten Matrixdegradation (Bröcker et al. 2010, Danobeitia et al. 2014). Im Rahmen der interstitiellen Fibrosierung erfolgt eine Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen und Kollagenen im Interstitium, insbesondere Kollagen-1 und -3. (Boor et al. 2010, Bröcker et al. 2010). Wohingegen bei der tubulären Atrophie drei Formen von strukturellen Veränderungen beobachtet werden können. Hierzu zählen: Verbreiterungen der tubulären Basalmembran, eine Abflachung des Tubulusepithels sowie eine Dilatation des Tubuluslumens mit PAS-positiven proteinhaltigen Detritus. Des Weiteren sind Schädigungen glomerulärer Strukturen zu beobachten, bedingt durch eine initiale kompensatorische Überfunktion, die über eine Aktivierung verschiedener Mediatoren (Prostaglandin, Angiotensin II und Wachstumsfaktoren) zu einer Glomerulosklerose beiträgt. Jedoch bleibt zu beachten, dass der Begriff 'interstitielle Fibrose und Tubulusatrophie' (IFTA) keine Diagnose einer Krankheit darstellt, sondern nur eine Deskription des Krankheitsprozesses liefert (Müller et al. 2000, Bröcker et al. 2010, Zhou und Liu 2016).

1.3.2 Myofibroblasten

Aktivierte Fibroblasten (sog. Myofibroblasten) gelten als die wichtigste Effektorzelle in der Entwicklung der Nierenfibrose (Grupp und Müller 1999). Sie gehören neben den dendritischen Zellen und Makrophagen zu den tubulointerstitiellen Zellen der Niere (Müller et al. 1995, Roberts et al. 1997). Im gesunden Nierengewebe sind diese nur zu einem geringen Anteil präsent. Der relative Fibroblastenanteil wird nach Müller und Rodemann auf 7% geschätzt, wobei eine signifikante Zunahme in fibrotischen Nieren beschrieben wird. Hier lag der relative Fibroblastenanteil bei ca. 46% (Müller und Rodemann 1991).

Fibroblasten sind ortsständige mesenchymale Zellen mit spindelförmiger Morphologie, die sich im fibrotischen Gewebe zu Myofibroblasten transdifferenzieren und sich durch eine gesteigerte Proliferationsfähigkeit mit erhöhter Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM) auszeichnen

(Strutz und Zeisberg 2006). Hierzu zählt unter anderem Fibronectin, Laminin und die Kollagene Typ 1, 3 und 5. Des Weiteren haben sie Einfluss auf die ECM-Homöostase durch die Synthese verschiedener Matrixmetalloproteinasen, die wiederum zu einer Degradation der extrazellulären Matrix führen (Gabbiani et al. 1971, Majno et al. 1971).

Charakteristisch für Myofibroblasten ist die *de novo*-Expression von *alpha*-Glattmuskelzellaktin (*alpha-smooth muscle actin/* α -SMA), welches den Zellen kontraktile Eigenschaften verleiht und unter physiologischen Bedingungen in Form von „Tissue-Remodelling“ zum Wundverschluss führt (Tang et al. 1997, Vaughan et al. 2000, Tomasek et al. 2002, Cook 2010). Im gesunden Nierengewebe wird α -SMA in der Regel nicht von interstitiellen Fibroblasten exprimiert (Alpers et al. 1994, Clayton et al. 1997, Ina et al. 2002). Während der Aktivierung und Transition zu Myofibroblasten kommt es dagegen neben der *de novo*-Expression von α -SMA auch zu einer Phänotyp-Veränderung mit einer ausgeprägten Heterogenität (Strutz und Müller 2006).

Der Ursprung aktivierter, ECM-produzierender Myofibroblasten ist noch nicht vollständig geklärt. Es ist ein komplexer Prozess, der von mehreren Einflussfaktoren bestimmt wird. Zum einen können Myofibroblasten durch Aktivierung und nachfolgende Proliferation residenter Fibroblasten entstehen (Strutz und Zeisberg 2006). Diese Aktivierung residenter Fibroblasten und deren proliferative Expansion stellt nach heutiger Auffassung den zentralen Mechanismus bei renaler Fibrogenese dar (LeBleu et al. 2013). Andere Hypothesen beziehen sich auf die Aktivierung hämatopoetischer oder mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks. CD-4⁺T-Lymphozyten, welche die Einwanderung von Monozyten und Makrophagen beeinflussen, vermitteln ferner die Differenzierung von Monozyten zu Kollagen-produzierenden Fibrozyten (Liu 2011). Im gesunden Nierengewebe von Mäusen wird der Anteil von knochenmarksabgeleiteten Fibroblasten auf 12% vermutet (Strutz und Müller 2006, LeBleu et al. 2013).

1.3.3 Therapieoptionen bei chronisch progredienter Niereninsuffizienz

Die tubulointerstitielle Fibrosierung der Niere ist das gemeinsame Korrelat von chronischen Nierenerkrankungen. Zurzeit besteht die Therapie von CKD-Patienten jedoch vor allem aus der Behandlung bzw. Prävention von Begleiterkrankungen oder kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Hypertonus oder Diabetes.

Zu den ersten Maßnahmen gehört die Beseitigung von reversiblen Risikofaktoren. Hierzu zählt zum einen sowohl die Vermeidung von nephrotoxischen Substanzen, beispielsweise nicht-steroidale Antiphlogistika, Lithium oder Kontrastmitteln als auch die Vermeidung von Infektionen, die besonders bei immunsupprimierten Patienten nach einer Transplantation lebensbedrohlich werden können. Ein weiterer Aspekt ist die Progressionshemmung mit diätetischer Reduktion von tierischem Eiweiß auf <0,8 g/kg KG/ Tag aufgrund der toxischen Wirkung einer Hyperproteinämie auf das Tubulusepithel und die Senkung von Serum-

Cholesterol, welches vor allem bei einer fortgeschrittenen Proteinurie ansteigt. Als Proteinurie wird die Menge an ausgeschiedenem Albumin im 24-Stunden-Sammelurin bezeichnet. Hierbei erfolgt eine Unterscheidung zwischen Mikroalbuminurie (30-300 mg Albumin/24h) und Makroalbuminurie (>300 mg Albumin/24h). Darüber hinaus ist die Behandlung von renalen Begleiterkrankungen wie der normochromen, normozytären Anämie, der renalen Osteoporose sowie einer oftmals apparenten metabolischen Azidose ein wichtiger Therapieaspekt. Ferner zählen zu den Therapieempfehlungen eine adäquate Blutdruckeinstellung auf 130/80 mmHg, um kardiovaskuläre Risikofaktoren zu minimieren (KDIGO CKD Work Group 2013).

Nur wenige Medikamente sind für die direkte antifibrotische Behandlung von Nierenerkrankungen zugelassen und zielen auf die Blockade des intrarenalen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) ab. Zur First-Line-Therapie bei CKD-Patienten gehören die direkten Renin-Antagonisten, Angiotensin Converting Enzyme-Inhibitoren (ACE-Hemmer) sowie Angiotensin-II-Rezeptor-Blocker (AT1-Blocker) (Siragy und Carey 2010). Neben einer blutdrucksenkenden Wirkung zeigen diese Medikamentengruppen auch nephroprotektive Eigenschaften durch Senkung des glomerulären Filtrationsdrucks und konsekutive Abnahme der Proteinurie (Wenzel und Wolf 2005).

Oftmals gelingt es nicht, die Progression der chronischen Nierenfunktionseinschränkung trotz Optimierung von Risikofaktoren gänzlich aufzuhalten. Die Folge ist der häufige Übergang in eine terminale Niereninsuffizienz mit Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie.

1.4 TGF- β -Superfamilie

1.4.1 Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)

Die Superfamilie der *transforming growth factors* (TGFs) gehören zur Gruppe multifunktionaler Zytokine und sind strukturverwandte, zellregulatorische Proteine, die eine wichtige Rolle in der Embryogenese durch Induktion der Zelldifferenzierung haben (Massagué 1990, Ducey und Karsenty 2000, Chang et al. 2002). Aber auch beim Adulten haben sie essentielle Bedeutungen durch die Beteiligung an Reparaturmechanismen von Geweben, Zellzykluskontrolle, Migration, Angiogenese sowie Immunreaktionen (Chang et al. 2002, Ducey und Karsenty 2000, Herpin et al. 2004, Li et al. 2006, Maeshima und Makino 2010). Roberts et al. beschrieben 1980 bereits die wachstumsstimulierende Funktion von TGFs in murinen Fibroblasten (Roberts et al. 1980, Kondo et al. 2004). Die TGF- β -Superfamilie umfasst die Transforming Growth Factors (TGFs), Activine und Inhibine, Müllerian Inhibiting Substance (MIS), Bone Morphogenic Proteins (BMPs), Nodal, Growth Differentiation Factors (GDFs) und Lefty (Zhao 2003). Jedoch ist eine genaue Unterteilung schwer, da immer mehr Subfamilien beschrieben werden (Shi und Massagué 2003, Gordon und Blobel 2008).

Das erste isolierte Mitglied der TGF- β -Superfamilie ist der Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1). Dieser wird als das wichtigste profibrotische Zytokin im Prozess der renalen tubulointerstitiellen Fibrose angesehen. Auch in anderen Organen, wie Leber, Lunge,

Knochenmark, Haut oder Myokard wird er als Hauptmediator der Organfibrose bezeichnet. Eine Überexpression von TGF- β 1 führt zu einer gesteigerten Synthese sowie zu einem reduzierten Abbau extrazellulärer Matrix und einer Suppression der Immunantwort (Attisano und Wrana 2002).

Es werden in Säugetieren drei Isoformen unterschieden: TGF- β 1, - β 2 und - β 3. Diese sind hoch konserviert und zeigen ähnliche Wirkungen (Cheifetz et al. 1990, Border et al. 1992). TGF- β 1 ist ein ubiquitär vorkommendes, multifunktionelles Homodimer mit einer Größe von 25 kDa und wird überwiegend im Endothel, in Bindegewebszellen (Fibroblasten) und hämatopoetischen Zellen exprimiert. TGF- β 2 hingegen wird vornehmlich in Neuronen sowie im Epithel produziert und TGF- β 3 in mesenchymalen Zellen. TGF- β 1 wird *in vivo* von Zellen in dessen latenter Form sezerniert und bedarf einer extrazellulären Aktivierung des TGF- β 1-Homodimers. Endoproteinasen, wie Plasmin, Cathepsin G, Thrombospondin oder Integrin führen zu einer Abspaltung der aktiven Form vom Propeptid, welches als Latency Associated Protein (LAP) bezeichnet wird (Piek et al. 1999, Annes et al. 2004).

1.4.2 TGF-beta-Rezeptor-Signalkaskade

Die Mitglieder der TGF- β -Superfamilie vermitteln ihre pleiotrope Wirkung über drei verschiedene Typen von TGF- β -Rezeptoren. Typ I und II sind transmembranständige Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren und direkt an der intrazellulären Signaltransduktion von Zellmembran zum Nucleus beteiligt (Piek et al. 1999). Der TGF- β -Rezeptor Typ III hat keine intrazelluläre Signalfunktion, er besteht aus transmembranständigen Proteinen, Betaglykanen und Endoglin (Piek et al. 1999, Akhurst und Hata 2012).

Nach der Bindung von TGF- β 1 an deren korrespondierenden Typ II Rezeptor kommt es zur Rekrutierung des Typ I-Rezeptors in einem heterotetrameren Komplex, zur Transphosphorylierung seiner Serin- und Threonin-Residuen und resultierender Aktivierung der intrazellulären TGF- β -Signalkaskade (Heldin et al. 1997, Rahimi und Leof 2007).

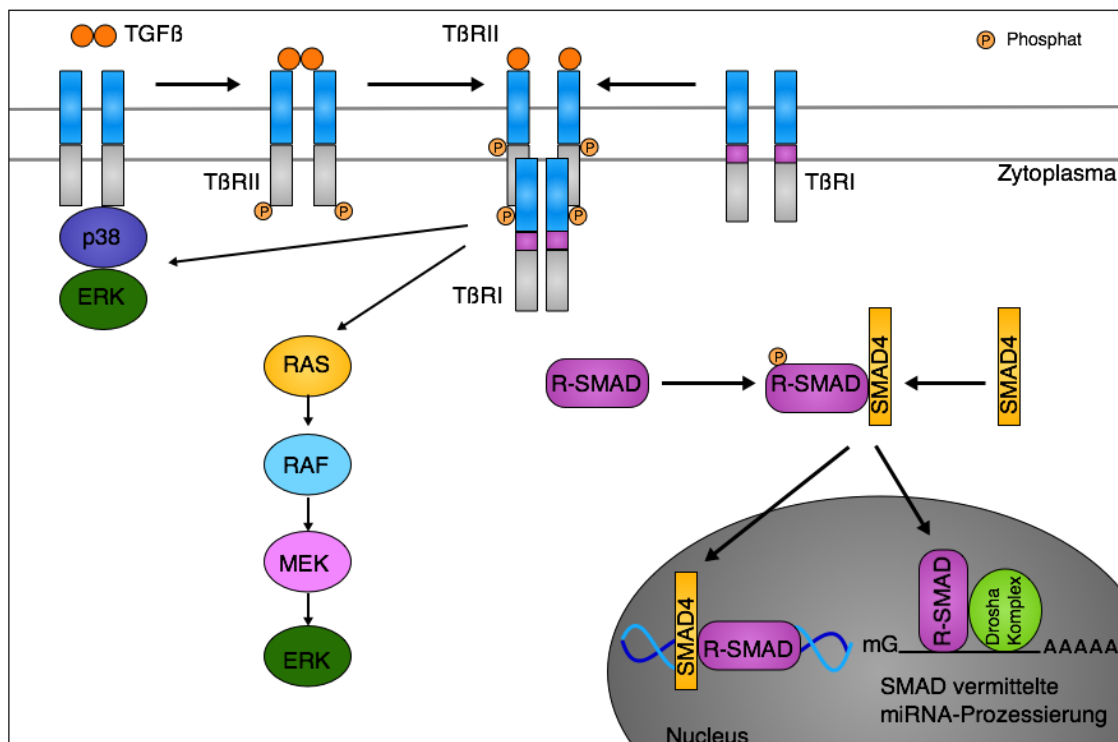


Abbildung 2: TGF- β 1 Signalkaskade. Der aktivierte TGF- β -Rezeptor-Komplex III vermittelt seine Signaltransduktion über multiple Mechanismen. Nach Phosphorylierung und konsekutiver Aktivierung der SMAD-Proteine kommt es zur Beeinflussung der Genexpression (modifiziert nach Akhurst und Hata 2012).

Diese besteht aus einer Phosphorylierung und damit Aktivierung der intrazellulären SMAD-Signalkaskade. Es können drei Gruppen an SMAD-Proteinen unterschieden werden. Zum einen gibt es die R-SMADs, hierzu zählen SMAD 2 und 3, welche direkt vom TGF- β -Rezeptor Typ I phosphoryliert werden und mit SMAD 4 einen heteromeren Komplex bilden (Rahimi und Leof 2007). Sie werden als Rezeptor-regulierte SMAD-Proteine bezeichnet (Heldin et al. 1997, Attisano und Wrana 2002, Shi und Massagué 2003). SMAD 4 ist ein Co-SMAD, welches nach einer Heterodimer-Bildung mit R-SMADs in den Zellkern transloziert und dort an der DNA als Transkriptionsfaktor die Genexpression beeinflusst (Yamashita et al. 1994). Auf diese Weise kommt es zu einer Vielzahl an zellulären Wirkungen, wie beispielsweise der Aktivierung residenter Fibroblasten in der Niere mit konsekutiv gesteigerter Synthese extrazellulärer Matrix, Induktion von epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) und Apoptose in Tubulusepithelzellen (Heino et al. 1989, Strutz und Müller 2006, Zeisberg und Kalluri 2013). Zudem sind noch sogenannte inhibitorische SMADs (SMAD 6 und 7) beschrieben, welche durch Bindung an den Typ-I-Rezeptor die Phosphorylierung der R-SMADs unterbinden (Border et al. 1990, Feng und Derynck 1997, Massagué und Chen 2000, Shi und Massagué 2003).

1.5 Relaxin

1.5.1 Geschichte

Das Peptidhormon Relaxin wurde 1930 von Dr. Frederick Hisaw während seiner Studien im Feld der reproduktiven Endokrinologie entdeckt und benannt (Bathgate et al. 2013). Es wurde vornehmlich als zentrales Schwangerschaftshormon bekannt, da es perinatal die Eigenschaften besitzt, eine Verlängerung des Ligamentum pubicum zu vermitteln, zu einer Weitung des Geburtskanals zu führen, die spontanen Kontraktionen des Myometriums zu hemmen sowie das Wachstum und die Differenzierung der Brustdrüsen zu beeinflussen (Fevold et al. 1930).

Hisaw konnte 1926 durch eine Seruminjektion von einem schwangeren Meerschweinchen in ein nicht-schwangeres weibliches Tier zeigen, dass Relaxin bei dem mit Serum behandelten Meerschweinchen ebenfalls zu einer Verlängerung des Ligamentum pubicum und einer Weitung des Symphysenspaltes führte (Hisaw 1929, Kibblewhite D et al. 1992, Bathgate et al. 2013).

Obwohl die Mehrheit der Relaxinisoformen im Zusammenhang mit Reproduktionsmechanismen entdeckt wurde, steht heutzutage vornehmlich die Wirkung auf andere, nicht-reproduktive Zielgewebe im Vordergrund. Relaxin verfügt über zentralnervöse, vaskuläre, renale und kardiale Effekte, welche aufgrund der antifibrotischen Eigenschaften ein außerordentlich großes therapeutisches Potential bergen (Dschietzig et al. 2001, Hudson et al. 1983, Bogzil et al. 2005, Danielson et al. 2006, Nistri et al. 2007, Hewitson et al. 2007, Teichman et al. 2010, Cernaro et al. 2014, Kang et al. 2014).

1.5.2 Aufbau und Synthese des Peptidhormons Relaxin

Relaxin ist ein 6,3 kDa großes Peptidhormon, welches zur Hormongruppe der *Relaxin Family Peptides* gehört, welche einen Teil der Insulin-Superfamilie darstellen (Bani 1997). Zu diesen strukturverwandten Hormonen zählen unter anderem: Insulin, IGF-1, IGF-2, Relaxin-1, Relaxin-2, Relaxin-3, Leydig cell insulin-like (INSL3) und early insulin-like (INSL4/5/6)-Peptide (Blundell und Humbel 1980, Sherwood 2004, Bathgate et al. 2006). Trotz ihrer großen Ähnlichkeit im strukturellen Aufbau und Bindungsverhalten mit Insulin besitzen die Relaxin-Peptide ihre eigenen Rezeptoren und üben unterschiedliche Wirkungen im Organismus aus.

Relaxin wird als Präprohormon durch den Prozess der posttranslationalen Prozessierung synthetisiert und muss vor Erlangen seiner Wirkung aktiviert werden (Bryant-Greenwood und Schwabe 1994). Das Prä-Pro-Relaxin besteht aus dem Signalpeptid, einer A-, B-Kette sowie dem C-Peptid. Charakteristisch sind die A- und B-Kette über zwei Disulfidbrücken verbunden. Eine weitere Disulfidbrücke ist innerhalb der A-Kette gelegen. Nach Abspaltung des Signalpeptides entsteht das sogenannte Pro-Relaxin, welches bereits über eine vergleichbare Bioaktivität wie das reife Relaxin verfügt (Bryant-Greenwood und Schwabe 1994).

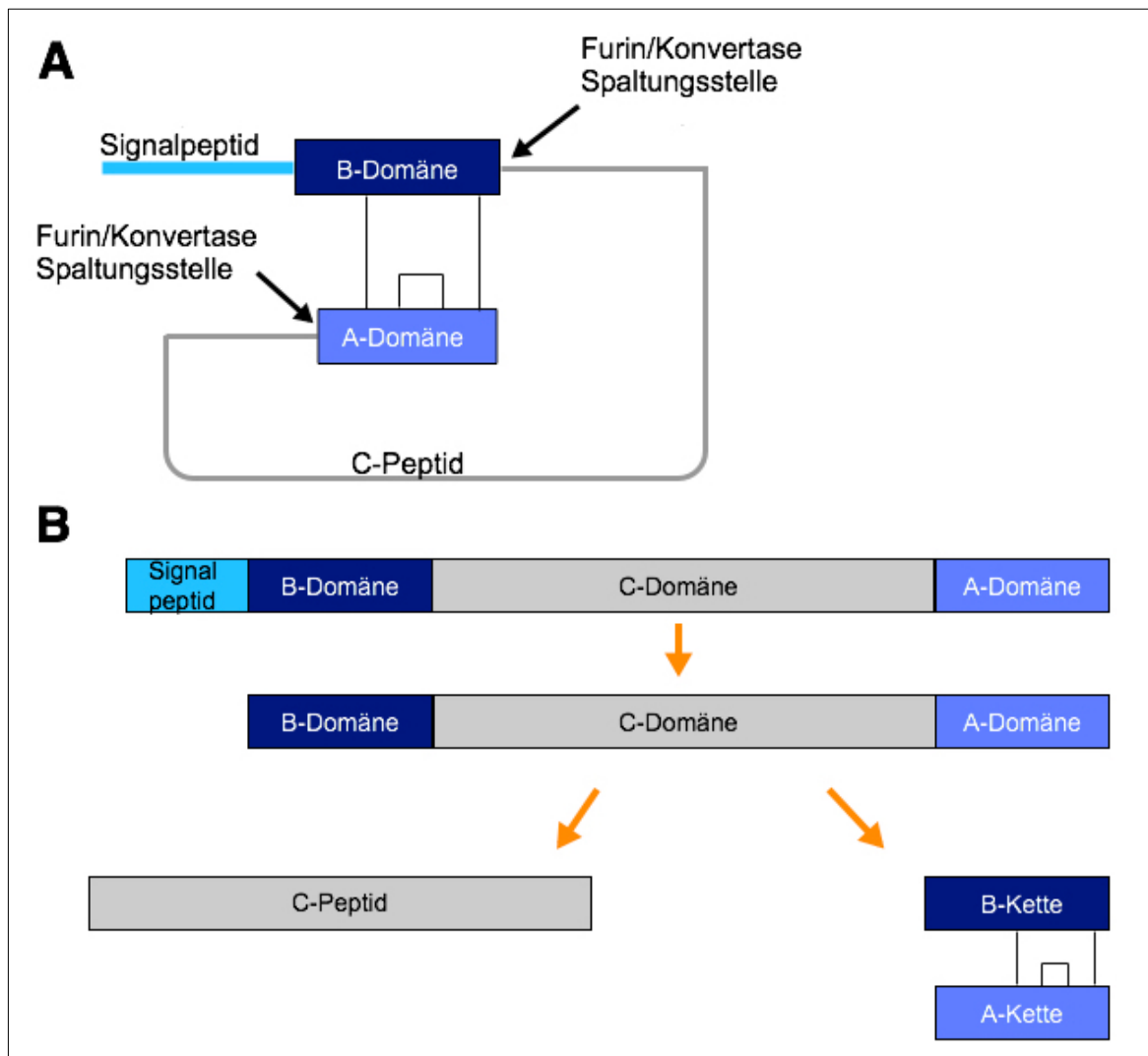


Abbildung 3: Struktur des Peptidhormons Relaxin. (A) Darstellung des Präprohormons charakterisiert durch die Drei-Domänenstruktur sowie den Disulfidbrücken innerhalb und zwischen den Domänen. (B) Intrazelluläre enzymatische Prozessierung des Prä-Pro- zu Pro-Relaxin und schließlich zum reifen heterodimeren Relaxin (modifiziert nach Ivell et al. 2011).

Abgeleitet von der Prozessierung des Prohormons Insulin wird vermutet, dass für die weitere Synthese von Relaxin die Prohormon-Konvertase PC-1 verantwortlich ist. Durch die Abspaltung des C-Peptides entsteht das reife Relaxin (Marriott et al. 1992). Die B-Kette vermittelt hauptsächlich die primäre Interaktion mit dem Rezeptor. Damit es allerdings zu einer suffizienten Bindung kommen kann, muss die dreidimensionale Konformation des Hormons durch die A-Kette aufrechterhalten werden (Bathgate et al. 2006, Hossain et al. 2011).

Der Homologiegrad zwischen Relaxin und Insulin liegt bei ca. 25%. Dies betrifft vornehmlich die sechs Cystein-Residuen, welche an der Bildung der bei beiden Hormonen identischen Disulfidbrücken beteiligt sind (Eigenbrot et al. 1991).

Innerhalb der unterschiedlichen Säugerspezies zeigen die Relaxin-Peptide eine erkennbare Heterogenität in der Aminosäuresequenz, allerdings bewahren fast alle ein hoch konserviertes

RXXRXXI/V-Motiv (R=Arginin) in der B-Kette, welches essentiell für die Bioaktivität und Rezeptorbindung von Relaxin ist (Bathgate et al. 2013).

1.5.3 Expression und Sekretion von Relaxin-Peptiden im Menschen und in Mäusen

Gen-Isoformen

Beim Menschen sind 3 Isoformen von Relaxin bekannt: Relaxin-H1, -H2, -H3, welche von jeweils drei Relaxingenen kodiert werden (*RLN1*, *RLN2*, *RLN3*). Das Vorkommen von Relaxin-H2 beschränkt sich hierbei auf den Menschen sowie den Menschenaffen und entspricht in anderen Säugetieren dem Relaxin-1. Relaxin-H1 und -H2 konnten auf dem kurzen Arm von Chromosom 9 (9p24) lokalisiert werden, wohingegen Relaxin-H3 auf Chromosom 19 liegt (Hudson et al. 1983). Serelaxin (RLX030, Novartis) ist das rekombinante Analogon des humanen Relaxin-H2, welches derzeit die einzig bekannte zirkulierende Form von Relaxin im Plasma ist (Bani 1997, Bathgate et al. 2006).

Tabelle 2: Vorkommen von Relaxin und seinen Rezeptoren im humanen und murinen Nieren (modifiziert nach Bathgate et al. 2013)

Human		Murin	
<i>Gen-ID</i>	<i>Niere</i>	<i>Gen-ID</i>	<i>Niere</i>
RLN1	x		
RLN2	x	Rln1	x
RLN3	x	Rln3	x
RXFP1	x	Rxfp1	x
RXFP2	x	Rxfp2	x
RXFP3	-	Rxfp3	-
RXFP4	x	Rxfp4	-

1.5.4 Aktivierung der Signal-Transduktions-Wege durch Relaxin-Peptide

Serelaxin vermittelt seine pleiotropen Effekte über membranständige, sieben-transmembranöse G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, welche früher auch als *leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptors* (LGRs) bezeichnet wurden. Sie besitzen ein Molekulargewicht zwischen 60 und 80 kDa und bestehen aus ca. 400-500 Aminosäuren. Intrazellulär befindet sich das C-terminale Ende, welches über die sieben-transmembranöse Domäne mit dem extrazellulär gelegenen N-Terminus verbunden ist (Iyengar 1993). Es sind vier Relaxin-Rezeptoren bekannt, die in zwei Gruppen gemäß ihrem Aufbau und Signaltransduktion unterteilt werden können: 2002 wurden *RXFP1* (LGR7) und *RXFP2* (LGR8) von Hsu et al. identifiziert. Sie führen über eine Gs-Protein-Kopplung zur Aktivierung der Adenylatcyclase. Die

Rezeptoren *RXFP3* (GPCR 135) und *RXFP4* (GPCR 142) sind hingegen mit kleinen Peptidrezeptoren assoziiert und führen über ein *Gi*-Protein zur Hemmung der Adenylatzyklase. *RXFP3* kann zudem eine Aktivierung von *extracellular-signaling-regulated-kinase 1 und 2* (Erk1/2) bewirken (Bathgate et al. 2006, Huang et al. 2015). Der *RXFP1* stellt die Bindungsstelle für Relaxin-H1 und -H2 bereit, *RXFP2* für INSL3, Relaxin-H1 und -H2, *RXFP3* für Relaxin-H3 und *RXFP4* für INSL5 und Relaxin-H3 (Bathgate et al. 2006).

Die renoprotektive Wirkung von Serelaxin (RLX030) wird insbesondere über *RXFP1* vermittelt, somit stellt das Vorhandensein von *RXFP1* eine essentielle Komponente für die therapeutische Wirksamkeit von Serelaxin dar. Nach der Bindung von Serelaxin an *RXFP1* kommt es durch nachfolgende Aktivierung der Adenylatzyklase zu einer intrazellulären Erhöhung des cyclischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Charakteristisch ist eine biphasische Erhöhung: Nach einem initial schnellen Anstieg der cAMP-Konzentration und einer leichten Abnahme sind konstant hohe cAMP-Spiegel zu beobachten (Bathgate et al. 2013, Chow et al. 2014). Dies ist ein atypischer Verlauf, bei allen anderen G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren wird durch die erhöhte cAMP-Konzentration die Phosphodiesterase PDE4 aktiviert. Diese führt zum Abbau und Konzentrationsabnahme von cAMP. Konstant hohe cAMP-Spiegel haben vielfältige physiologische Wirkungen. Zum einen fördern sie über eine gesteigerte VEGF-Expression die Angiogenese. Zum anderen führen sie zu einer Dezidualisierung und Differenzierung des Myometriums während der Schwangerschaft. Wie aus **Abbildung 4** ersichtlich, sind die molekularen Transduktionswege von *RXFP1* sehr vielfältig. Zu den antifibrotisch relevanten Wirkungen zählt vor allem die gesteigerte Expression von Stickstoffmonoxid (NO). Es werden drei verschiedene Mechanismen unterschieden, die sich zudem von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden können. Die epitheliale NOS (eNOS)-Aktivierung erfolgt über den Signalweg *Gαi*-Protein, PI3-K und Akt. Wohingegen die iNOS über die Proteinkinase A (PKA), eine nachfolgenden Inaktivierung von I κ B und anschließende Aktivierung von NF- κ B stimuliert wird. NO führt über eine cGMP-Erhöhung zur Phosphorylierungshemmung von SMAD2/3 in der TGF- β 1-Transduktionskaskade sowie zu einer Stimulation der Matrix-degradierenden Metalloproteinasen MMP-1, -2, -9 und -13 (el Nahas et al. 1991).

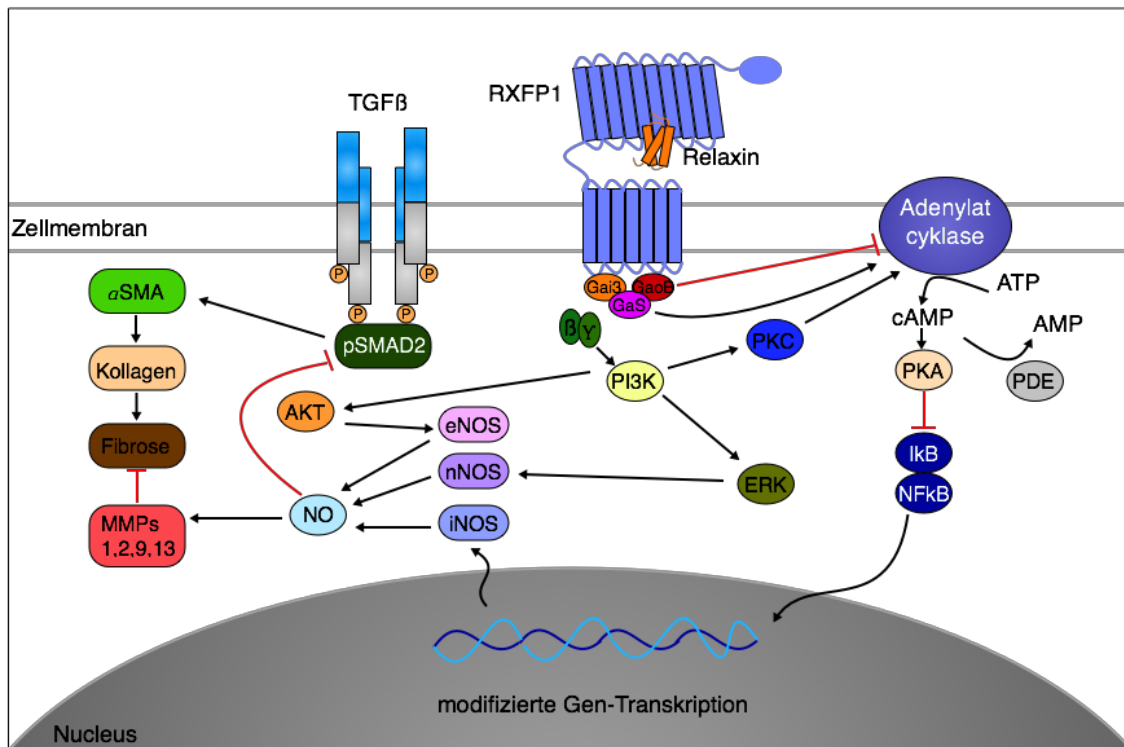


Abbildung 4: Signaltransduktion von *RXFP1* vermittelt durch Relaxin. Die antifibrotische Wirkung von Relaxin wird über den *RXFP1* vermittelt, der zu einer Induktion der Expression von eNOS, nNOS, iNOS und einer anschließend erhöhten Synthese von NO führt. NO verstärkt die Expression der MMPs, die zu einer Reduktion von Fibrose beitragen. Zudem kommt es zu einer Inhibition von pSMAD2 und damit einer direkten Hemmung der TGF- β -Signalkaskade (modifiziert nach Bathgate et al. 2013).

1.6 Definition der Epigenetik

Die Ursprungsdefinition der Epigenetik ist auf Conrad Waddington zurückzuführen, der 1942 den Begriff prägte als „Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, welche den Phänotyp hervorbringen“ (Waddington 1968, Dupont et al. 2009). Heutzutage wird eine explizitere Definition verwendet, hierbei untersucht die Epigenetik Vorgänge, die zu einer vererbaren Aktivitätsänderung von Genen führten, ohne dabei die ursprüngliche DNA-Sequenz zu verändern. Zielstrukturen sind die Chromosomen, die durch DNA-Methylierung, Modifikation der Histone oder posttranskriptionelle Prozesse verändert werden. Epigenetische Regulationsmechanismen sind in viele unterschiedliche Prozesse involviert. Hier ist beispielsweise die X-chromosomale Inaktivierung in weiblichen Zellkernen oder auch das genomische Imprinting von maternalen und paternalen Genen zu nennen. Darüber hinaus beeinflusst epigenetische Modifikation das Immunabwehrsystem durch chemische Modifikation von DNA und Histonproteinen (Bird 2002, Herman und Baylin 2003, Weinhold 2006).

1.7 DNA-Methylierung

Ein zentraler Mechanismus für die epigenetische Alteration von genomischer DNA ist die DNA-Methylierung von „CpG-Inseln“ in spezifischen Promotorregionen von Genen. Bei dem Prozess der DNA-Methylierung wird das Nukleotid Cytosin in der palindromischen Nukleotidabfolge des Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotids (CpG) an der C5-Position durch entsprechende DNA-Methyltransferasen (DNMTs) auf beiden DNA-Strängen symmetrisch methyliert. Als Methylgruppendonator wird S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) verwendet, welches nach der Übertragung der Methylgruppe als S-Adenosyl-Homocystein (SAH) vorliegt (Herman und Baylin 2003). Etwa 60-80% der Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotide (CpG) liegen methyliert vor. Allerdings ist die CpG-Dinukleotid Frequenz im menschlichen Genom mit 3-4% relativ gering (Weber et al. 2007). Dies ist bedingt durch eine spontane hydrolytische Desaminierung von 5-Methylcytosin, welche vom DNA-Reparatursystem nicht erkannt wird und es im Folgenden zur Transition nach Thymin kommt (Rideout et al. 1990). Das 5'-Ende von Genen im Bereich von Promotorregionen weist eine erhöhte Dichte von CpG Dinukleotiden auf, die als sogenannte CpG-Inseln bezeichnet werden (Laird und Jaenisch 1994). CpG-Inseln sind kurze Regionen von ca. 0,5-4kb Länge, die während der Evolution stark konserviert sind und eine hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden (mindestens 55%) aufweisen (Takai und Jones 2003). Jedoch liegt nur ein geringer Prozentsatz der CpG-Inseln in methylierter Form vor und führt zu einer stabilen Repression des assoziierten Gens (Holliday und Pugh 1975, Riggs 1975). Der weitaus größere Anteil der CpG-Inseln befindet sich im unmethylierten Zustand und ermöglicht die Expression des entsprechenden Gens. Promotoren, die eine geringe CpG-Dichte aufweisen sind jedoch oft methyliert. Beachtenswert sind Regionen um den Transkriptionsstart, die eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und transkriptioneller Aktivität aufweisen (Meissner et al. 2008). Folglich kann eine Hypermethylierung von DNA meist mit einer Repression der Genexpression verbunden sein, während eine Hypomethylierung zur transkriptionellen Aktivität führt (Klose und Bird 2006). Die beschriebene Transkriptionshemmung wird durch sogenannte Repressorproteine, die mittels konservierter Methyl-CpG-Bindungsdomäne spezifisch an methylierte CpGs binden, vermittelt. Hierzu gehören MeCP1 und MeCP2 als auch Methyl-Cytosin-Bindungsproteine MBD1, 2 und 3, welche mit Chomatin-Remodelierungs-Komplexen wechselwirken (Jones und Baylin 2002).

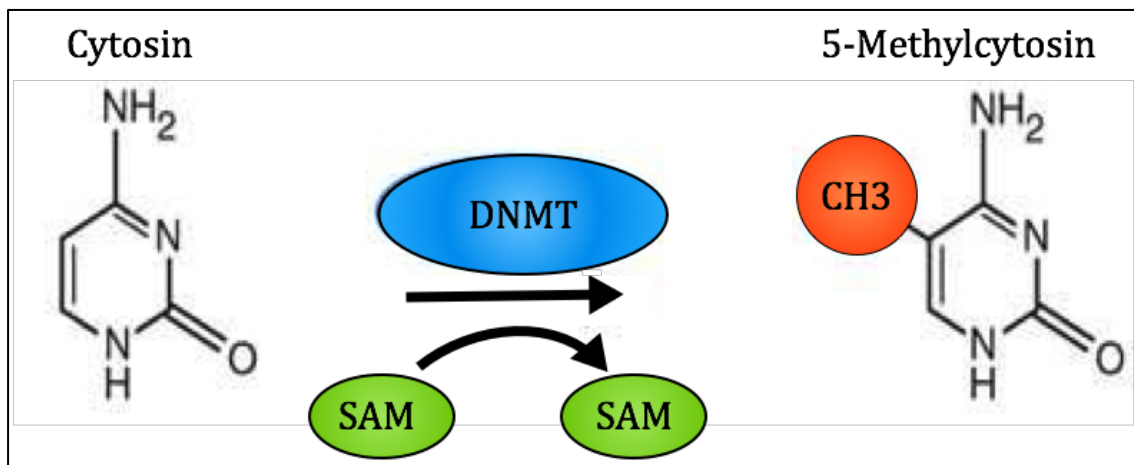


Abbildung 5: DNA-Methylierung. Methyltransferasen (DNMT) katalysieren die Methylierung des Cytosins an seiner C5-Position. Als Methylgruppendonor wird S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) verwendet. Nach der Übertragung entsteht S-Adenosyl-Homocystein (SAH) (modifiziert nach Day und Sweatt 2010).

Die Relevanz der abarrenten Methylierung von CpG-Promotor-Inseln wurde zuerst am Beispiel der Krebsentstehung deutlich. Hier führte die DNA-Hypermethylierung zur transkriptionellen Inaktivierung spezifischer Tumorsuppressorgene (Mikeska und Craig 2014, Zeisberg und Zeisberg 2013). Tampe et al. 2015 eruierten in jüngeren Studien zudem einen weiteren Einflussbereich epigenetischer Modifikation. Hierbei handelte es sich um den Zusammenhang zwischen DNA-Hypermethylierung und der Fibroblastenaktivierung in fibrotisch destruierten Nieren (Bechtel et al. 2010).

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Progression chronischer Nierenerkrankungen (CKD) mit dem histopathologischen Korrelat der tubulointerstitiellen Fibrose ist ein ungelöstes Problem in der klinischen Nephrologie. Klinische Studien über den Fibroseverlauf und weiterführende therapeutische Behandlungsmethoden sind komplex und schwer umsetzbar. Dies ist zurückzuführen auf die Rarität von adäquaten Biomarkern zur Therapiestratifizierung und Kontrolle der Krankheitsprogression. In tierexperimentellen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Relaxin-1 in Mäusen zu einer Exazerbation der Nierenfibrose führt (Samuel et al. 2003). Dagegen konnte in präklinischen Studien gezeigt werden, dass das rekombinante Analogon des humanen Relaxin-H2, Serelaxin (RLX030, Novartis) vielversprechende Effekte in Modellen des chronischen Nierenschadens vermittelt. Über die Regulation der Relaxinisoformen bei renalen Erkrankungen ist bislang nur wenig bekannt. Bechtel et al. 2010 demonstrierten, dass epigenetische Mechanismen der Promotormethylierung von spezifischen Genen zur Progression der Fibrogenese beitragen (Bechtel et al. 2010). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Hypermethylierung von entsprechenden Genen im fibrotischen Gewebe der

Niere mit dem Grad der Fibrose korreliert (Tampe et al. 2015). Abschließend wurde ebenfalls konstatiert, dass methylierte DNA-Fragmente aus der Niere freigesetzt werden und im peripheren Blut von nierenkranken Patienten das Ausmaß der Promotermethylierung in der Niere reflektieren (Tampe et al. 2015).

Basierend auf diesen Erkenntnissen entwickelte sich die hypothetische Annahme, dass die Unterdrückung der endogenen Relaxin-Signaltransduktion mittels Hypermethylierung der Relaxingene (*RLN1*, *RLN2*, *RLN3*) zur Exazerbation der Fibrogenese beiträgt. Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss von rekombinantem Serelaxin (RLX030) auf die Inhibition der renalen Fibrogenese zu determinieren und zugrundeliegende Signaltransduktionswege näher zu untersuchen. Auf folgenden Fragestellungen lag in dieser Arbeit der Fokus:

- a) Wie sind Relaxin-Rezeptoren bei Nierenfibrose als Voraussetzung für die Wirksamkeit von RLX030 reguliert?
- b) Führt die dosisabhängige Applikation von RLX030 zu einer effektiven Abschwächung renaler Fibrosierung im Mausmodell der Nierenfibrose?
- c) Unterliegt der Verlust von Relaxin in der Niere epigenetischen Regulationsmechanismen?
- d) Lassen sich im Serum von nierenkranken Patienten zirkulierende Promotorfragmente aus der Niere detektieren und als Biomarker nutzen, um Patienten zu identifizieren, welche aufgrund eines Mangels von intrarenalem Relaxin von RLX030 profitieren könnten?

2. Material

2.1 Geräte

Analysewaage, 1213 MP	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Ausgießstation Leica EG 1120H	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Autoklav	Biosciences, Fernwald, Deutschland
The Belly Dancer-Stovall	Life science incorporated, Greenboro, USA
BRAUN Dampfgarer 3216	BRAUN GmbH, Kronberg, Deutschland
CO2 Incubators Heracell™ VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad, München, Deutschland
Eismaschine AF80	Scotsman-ice, Vernon Hills (IL), USA
Fastblot™ B44	Biometra, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzkamera ColorView	Olympus, Münster, Deutschland
Gefrierschrank Premium NoFrost	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Gewebeinfiltrationsautomat Leica TP1020	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Heizblock TR-L288	Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Kühlschrank	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge 3-18KS	Sigma, Osterode am Harz, Deutschland
Kühlzentrifuge, Mikroliterzentrifuge R5424	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Magnetrührer (beheizbar), IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axiovert S100 TV	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2165	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop™ 2000; Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Paraffinstreckbad GFL 1052	GFL-GmbH, Burgwedel, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann®, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Rollermixer SRT6	Bibby Scientific, Stuart®, Staffordshire, UK
Spannungsgerät MS 300V Power Supply	Major Science, Saratoga(CA), USA
Sterilbank NuAire Biological Safety cabinets	NuAire, Plymouth(MN), USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutsch.
Stickstofftank APOLLO	Messer Griesheim, Deutschland
Thermocycler Mastercycler ep gradient S	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
ThermoMixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
TissueLyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Ultratiefkühlgerät (Modell: MDF-U54V)	SANYO biomedical, Wood Dale (IL), USA
Ultrasonic Liquid Processors S-400	Misonix Sonicators, Newtown, USA
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Wärmebad GFL 1083	GFL-GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge PerfectSpin P	PEQLAB Biotech., Erlangen, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica, Solms, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Columbus, USA

2.2 Software und Datenbanken

BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
cellSens Dimension 1.6	Olympus SIS, Münster, Deutschland
cell^D	Olympus SIS, Münster, Deutschland
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
MS Office	Microsoft, Redmond, USA
StepOnePlus™ Software v2.3	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutsch.
Photoshop CS6,	Adobe, San Jose, Kalifornien
Illustrator CS5	Adobe, San Jose, Kalifornien
ImageJ 1.49q	NIH, Bethesda, Maryland

2.3 Gebrauchsmaterialien

Biospere® Filterspitzen 10, 100, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
CELLSTAR® 6 Well Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutsch.
CELLSTAR® Tubes(Falcon) 15 / 50 ml-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutsch.
Dako Pen (Code-No. S2002)	Dako, Glostrup, Dänemark
Eindeckgläser SuperFrost® Plus	Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutsch.
Falcon®, CultureSlides 4 Well/1,7 cm. pro Well	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Filterpapier	Bio-Rad, Kalifornien, USA
MicroAmp® Fast 8-Tube Strip, 0.1 ml	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutsch.
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutsch.
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutsch.
Microscope Cover Slips 24*40 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Microscope Cover Slips 24*60 mm	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Mikroliter Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nalgene Mr. Frosty™ Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nunc CryoTube™ Vials 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Protein Gels, (1.5 mm, 10 well und 15 well)	life technologies™, Novex®, Carlsbad, USA
Pipetten 5, 10, 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Rotilabo® Einbettkassetten für Biopsien,	CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
RT² Profiler™ PCR Array Human Transcription	Qiagen, Hilden, Deutschland Factors

Safe Look Tubes 1.5, 2 ml
 Skalpelle
 Stainless Steel Beads 5 mm
 Steril Filter Unit, 0,5-0,22 µm
 TC-Schale 100 Cell+
 Tissue-Tek® Cryomold® Intermediate
 Tissue-Tek O.C.T. COMPOUND, 125 ml
 XCell SureLock™ Electrophoresis Cell
 Zellkulturflasche mit Luftfilter T75
 Zellschaber

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
 FEATHER Safety Razor Co., Osaka, Japan
 Qiagen, Hilden, Deutschland
 Millex, Billerica, MA, USA
 Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht, Deutschland
 SAKURA, Alphen aan den Rijn, Niederlande
 SAKURA, Alphen aan den Rijn, Niederlande
 life technologies™, Novex®, Carlsbad, USA
 Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
 Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Albumin Fraktion V
 Amphotericin B, lyophilisiert
 Bouin's solution
 cOmplete ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free,
 Chloroform ≥ 99,8 % (CHCl₃)
 DAPI
 DMEM High Glucose
 DMEM, Low Glucose, Pyruvate
 Dulbecco's PBS
 Eindeckmedium Shandon™ Immu-Mount™
 Entellan®
 Essigsäure 2,5 l
 Ethanol ROTHIPURAN® ≥ 99.8%, p.a.
 Fast SYBR® Green Master Mix
 Fetal Bovine Serum
 Forene® 100% (V/V); Wirkstoff: Isofluran
 Hämlaunsäure sauer nach Mayer
 Heparin- ROTEXMEDICA, 25000 I.E /5 ml
 Milchpulver
 2-Mercaptoethanol 99%, p.a.
 10mM dNTP Mix
 Natriumchlorid > 99,8%, p.a.
 Nitrocellulose Blotting Membrane
 Amersham™ Protran Premium 0,45 µm NC
 Novex® Sharp Pre-stained Protein standard
 NP40 Cell Lysis Buffer

CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
 BIOCHROM, Berlin, Deutschland
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
 life technologies™, Gibco®, Carlsbad, USA
 life technologies™, Gibco®, Carlsbad, USA
 life technologies™, Gibco®, Carlsbad, USA
 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
 CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
 Applied Biosystems®, Carlsbad, USA
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
 AbbVie GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
 CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
 ROTEXMEDICA, Trittau, Deutschland
 CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
 CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
 Invitrogen™, Carlsbad, USA
 CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
 Amersham Bioscience Europe GmbH,
 Freiburg, Deutschland (GE Healthcare)
 life technologies™, Novex®, Carlsbad, USA
 Invitrogen™, Carlsbad, USA

Nuclease-Free Water (Cat.-No. 129114)	Qiagen, Hilden, Deutschland
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	life technologies™, Novex®, Carlsbad, USA
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer	life technologies™, Novex®, Carlsbad, USA
Oligo(dt) 12-18 Primer	Invitrogen™, Carlsbad, USA
Pierce™ Fast Semi- Dry Transfer Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNAseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen™, Carlsbad, USA
Roti® Histofix, Formaldehydlösung 4%	CARL ROTH, Karlsruhe,
Target Retrieval Solution, pH 6 (10X)	Dako, Glostrup, Dänemark
TRIS PUFFERAN® ≥ 99,9%, p.a.	CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol® Reagent	Ambion®, Carlsbad, USA
Tween® 20%	CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame USA
Wasserstofferoxid 30%, ROTIPURAN® p.a.,	CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland
20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide	Cell Signaling Danvers, USA
Xylol (Isomere) > 98%, rein,	CARL ROTH, Karlsruhe, Deutschland

2.5 Kitsysteme

Tabelle 3: Purelink® RNA Mini-Kit

Purelink® RNA Mini-Kit	Ambion®, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lysis Buffer ▪ Wash Buffer I ▪ Wash Buffer II ▪ RNase-Free-Water (75ml) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Spin Cartidges mit Collection Tubes (5x50 each) ▪ Collection Tubes (5x50 each) ▪ Recovery Tubes (5x50 each)

Tabelle 4: Pierce™ BCA™ Protein Assay

Pierce™ BCA™ Protein Assay	Thermo Scientific, USA
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Bca™ Reagent A, 2 X 500ml ▪ Bca™ Reagent B, 1 X 25ml 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Albumin Standard Ampules, 2mg/ml, 10 x 1ml

Tabelle 5: Superscript® II Reverse Transcriptase

Superscript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen™, Carlsbad, USA
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Superscript® II, Reverse Transcriptase ▪ 5 X First Strand Buffer 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,1 MDTT(1,4-Dithiothreitol)

Tabelle 6: Supersignal® West Pico

Supersignal® West Pico	Thermo Scientific, USA
<ul style="list-style-type: none"> Supersignal® West Pico Stable, Peroxide Solution, 100ml 	<ul style="list-style-type: none"> Supersignal® West Pico Luminol/ Enhancer Solution, 100ml

Tabelle 7: Trichrom-Farbstoff (Masson) Kit

Trichrom-Farbstoff (Masson) Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin Lösung, 250ml, Ht15-1 Phosphorwolframlösung, 250ml, HT15-2 	<ul style="list-style-type: none"> Phosphormolybdänsäure-Lösung, 250ml, HT15-3 Anilinblau-Lösung, 250ml, HT15-4

Tabelle 8: Weigert's Eisenhämatoxylin Set

Weigert's Eisenhämatoxylin Set	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> Part A: Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung HT 107 	<ul style="list-style-type: none"> Part B: Weigert's Eisenhämatoxylin Lösung HT 109

Tabelle 9: Dneasy Blood & Tissue Kit (250)

Dneasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> Buffer ATL, AL, AE Buffer AW 1 (Concentrate) Buffer AW 2 (Concentrate) Proteinase K 	<ul style="list-style-type: none"> DNeasy Mini Spin Columns in 2ml Collection Tubes Collection Tubes (2ml)

Tabelle 10: Methylamp™ Methylated DNA Capture Kit

Methylamp™ Methylated Dna Capture Kit	Epigentek Group Inc., Farmingdale, NY
<ul style="list-style-type: none"> MC1 (Antibody Buffer) MC2 (Reaction Buffer) MC3 (Wash Buffer) MC4 (Dna Release Buffer) MC5 (Binding Buffer) MC6 (Elution Buffer) 	<ul style="list-style-type: none"> Normal Mouse Igg (1mg/ml) Proteinase K (10mg/ml) Anti-5-Methylcytosine (1mg/ml) 8-Well Assay Strips 8-Well Stripe Caps F-Spin Column F-Collection Tube

2.6 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer und Lösungen

10x PBS

K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	2,00 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	11,5 g
NaCl	80,00 g
ddH ₂ O	1000 ml

Einfriermedium

FCS	40 ml
DMSO	10 ml

10x TBS

NaCl	87 g
Tris	24,23 g
ddH ₂ O	1000 ml

Puffer und Lösungen für Western Blot

Lysispuffer

cOmplete ULTRA Tablets (Protease Inhibitor)	1 Tablette
NP40 Cell Lysis Buffer	10 ml

1x T-BST

ddH ₂ O	900 ml
TBS	100 ml
Tween 20%	1 ml

Innenpuffer

ddH ₂ O	9950 ml
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer	50 ml
β-Mercaptoethanol	1 ml

Blocklösung

BSA (2% / 5%)	1 g / 2,5 g
TBST	50 ml

Außenpuffer

ddH ₂ O	9950 ml
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer	50 ml

Milchpulver (2% / 5%)	1g/ 2,5 g
TBST	50 ml

Sample Buffer

NuPAGE® LDS Sample Buffer	200 µl
H ₂ O	180 µl
β-Mercaptoethanol	80 µl

Puffer und Lösungen (Immunhistofluoreszenz)

Citratpuffer	
Target Retrieval Solution, pH 6 (10x)	10 ml
ddH ₂ O	90 ml

Blocklösung

BSA (1%)	0,5 g
PBS	50 ml

Ansatz für die real-time PCR (pro Probe)

PrimerDesign		Eurofines	
MasterMix	10 μ l	MasterMix	10 μ l
Primer	1 μ l	Primer forward (20 μ M)	0,2 μ l
nukleasefreies Wasser (NFW)	4 μ l	Primer reverse (20 μ M)	0,2 μ l
		NFW	4,6 μ l

Oligonukleotid-Mischung für die Umschreibung der mRNA in cDNA

RNA (50ng/ μ l)	10 μ l
dNTP-Mix 10 mM	1 μ l
Oligo-dt-Poly a-Tail	1 μ l

First Strand Buffer-Mischung für die Umschreibung der mRNA in cDNA

5x First Strand Buffer	4 μ l
0,1M DTT	2 μ l
RNase OUT	1 μ l

Paraformaldehyd-Lösung (PFA):

4 g Paraformaldehyd-Pulver in 100 ml aqua dest. mischen (= 4%)

Es entsteht eine milchig, weiße Flüssigkeit.

Zugabe von Natronlauge, bis sich das Paraformaldehyd löst (bei pH = 7)

Lösung nur frisch verwenden; ca. 1h bei Raumtemperatur auf beheiztem Magnetrührer durchmischen. Die Lösung wird klar.

2.7 Stimulanzen

rhTGF-beta1 10 μ g

R&D System, Wiesbaden, Deutschland

Folic acid (F7876-10G)

Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.8 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 11: Primersequenzen von PrimerDesign für die qRT-PCR

Ziel-mRNA	Primer-Sequenz 5' -> 3'	Spezies
	PrimerDesign, Southampton, UK	
<i>Rln1 F</i>	TGA TAA ACT GGG TGA AGC AGA AG	Mus Musculus
<i>Rln1 R</i>	CCT CTT TTT CCG TGA ATG GGT AT	Mus Musculus
<i>Rln3 F</i>	CTT GCG GAG GCT CAC GAT	Mus Musculus
<i>Rln3 R</i>	CAG GTG GTC TGT ATT GGC TTC	Mus Musculus
<i>Rxfp1 F</i>	ATT TCT CTC TGC TGT GCT GAC T	Mus Musculus
<i>Rxfp1 R</i>	CGG CTG TGC GTG CTT ATT G	Mus Musculus
<i>RLN1 F</i>	GGC AAC CAT CAT TAC CAG AGC	Homo sapiens
<i>RLN1 R</i>	TCC AAG CCT AAG TAT TTT AAT TCT GAA	Homo sapiens
<i>RLN2 F</i>	GCT CCT CAG ACA CCT AGA CC	Homo sapiens
<i>RLN2 R</i>	CTG TGG CAA ATT AGC AAC AAA TTC	Homo sapiens
<i>RXFP1 F</i>	GCT GTA TGC CAT GTC AAT CAT T	Homo sapiens
<i>RXFP1 R</i>	TCT CCA CGA AAC TTT AGG TCA A	Homo sapiens
<i>RXFP2 F</i>	GAT CAC TCC TTC ATG CCA AAA AG	Homo sapiens
<i>RXFP2 R</i>	TGT CAC CAC AGT TCT CTT CGT	Homo sapiens
<i>RXFP3 F</i>	ACC AAA TCA GTG ACC ATC GTT	Homo sapiens
<i>RXFP3 R</i>	GCG TTG AAC TTG ATG AGG ATG	Homo sapiens
<i>GAPDH</i>	(Cat.-No. HK-SY-hu-1200)	Homo Sapiens
<i>GAPDH</i>	(Cat.-No. HK-SY-mo-1200)	Mus Musculus

Tabelle 12: Primersequenzen von Eurofins MWG Operon für die qRT-PCR

Ziel-mRNA	Primer-Sequenz 5' -> 3'	Spezies
Eurofins MWG Operon (Ebersberg)		
COL1A2 F	GGT GAA GTG GGT CTT CCA GG	Homo sapiens
COL1A2 R	TAA GGC CGT TTG CTC CAG G	Homo sapiens
α SMA F	AAG CAC AGA GCA AAA GAG GAA T	Homo sapiens
α SMA R	ATG TCG TCC CAG TTG GTG AT	Homo sapiens
α SMA F	CTC TTC CAG CCA TCT TTC ATT G	Mus musculus
α SMA R	GTT GTT AGC ATA GAG ATC CTT TCC T	Mus musculus
Col1a1 F	ATG GAT TCC CGT TCG AGT ACG	Mus musculus
Col1a1 R	TCA GCT GGA TAG CGA CAT CG	Mus musculus
MMP2 F	GGC AGA CAT CAT GAT CAA CT	Mus musculus
MMP2 R	TGC TGT CAT AGG ATG TG	Mus musculus
MMP 3 F	ATT CCA TGG AGC CAG GCT TTC	Mus musculus
MMP 3 R	CAT TTG GGT CAA ACT CCA ACT GTG	Mus musculus
MMP 9 F	TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG	Mus musculus
MMP 9 R	GTA CAT AGG GTA CAT GAG CG	Mus musculus

2.9 Antikörper

Tabelle 13: Verwendete Antikörper für Western Blot und Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Spezies	Hersteller und Cat.-No.	Verwendung und Verdünnung
Anti-Collagen 1 , (Cat.- No.: ab34710)	Kaninchen	Abcam Biochemicals®, Cambridge, UK	IF: 1:200
Anti-Alpha Smooth Muscle Actin , (Cat.- No.: 5228)	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland	IF: 1:100 WB: 1:5000
Anti-p-Smad2 (Ser465/467), (Cat.- No.: 3108s)	Kaninchen	Cell Signaling TECHNOLOGY®, Danvers (MA), USA	WB: 1:600 IF: 1:100
Anti-p-Smad3 (Ser423/425), (Cat.- No.: 9520)	Kaninchen	Cell Signaling TECHNOLOGY®, Danvers (MA), USA	WB: 1:1000 IF: 1:100
Anti-Relaxin-Rezeptor 1 (H-160), (Cat.- No.: sc-50328)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	WB: 1:500 IF: 1:50
Anti-Relaxin-Rezeptor 2 (H-150), (Cat.- No.: sc-50327)	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	WB: 1:500 IF: 1:100
Anti-Relaxin 3-Rezeptor 1 , (Cat.- No.: ab138062)	Kaninchen	Abcam Biochemicals®, Cambridge, UK	IF: 1:100
Anti-Relaxin 1 , (Cat.- No.: ab89919)	Ratte	Abcam Biochemicals®, Cambridge, UK	IF: 1:100

Anti-Relaxin 2 , (Cat.- No.: ab183505)	Kaninchen	Abcam Biochemicals®, Cambridge, UK	WB: 1:1000 IF: 1:500
Anti-Relaxin 3 , (Cat.- No.: ab89920)	Maus	Abcam Biochemicals®, Cambridge, UK	IF: 1:100
Anti Collagen IV-AF 488 , (Cat.- No.: 1340-30)	Ziege	Southern BioTech Birmingham, USA	IF: 1:10
Alexa Fluor® 555, Anti-Kaninchen polyklonal IgG , (Cat.- No.: A-31572)	Esel	life technologies™, Invitrogen™, Carlsbad, USA	IF: 1:400
Alexa Fluor® 488, Anti-Kaninchen polyklonal IgG , (Cat.- No.: A-21206)	Esel	life technologies™, Invitrogen™, Carlsbad, USA	IF: 1:400
Alexa Fluor® 555, Anti-Maus polyklonal IgG , (Cat.-No.: A-21202)	Esel	life technologies™, Invitrogen™, Carlsbad, USA	IF: 1:400
Alexa Fluor® 594, Anti-Ratte , (Cat.-No.: A20185)	Esel	life technologies™, Invitrogen™, Carlsbad, USA	IF: 1:400
HRP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen polyklonal IgG (Code No. P 0448)	Ziege	Dako, Glostrup, Dänemark	WB: 1:2000
HRP-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus polyklonal IgG , (Code No. P 0161)	Kaninchen	Dako, Glostrup, Dänemark	WB: 1:2000

2.10 Zelllinien sowie murine und humane Gewebsproben

Alle Zelllinien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in **Tabelle 14** aufgelistet.

Tabelle 14:Verwendete Zelllinien

Name	Spezies	Bedeutung	Herkunft	immortalisiert
TK 173	Mensch	Kontrolle	Uni Göttingen, G. Müller	SV40
TK 188	Mensch	fibrotisch	Uni Göttingen, G. Müller	SV40
mWT	Maus	Kontrolle	Uni Göttingen, M. Zeisberg	
mWTRLX	Maus	fibrotisch, stimuliert mit RLX030	eigene Herstellung	

TK 173

Die Zelllinie TK173 wurde von Müller et al. etabliert und von der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie der Georg-August-Universität Göttingen zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um humane renale Fibroblasten aus dem medullären Anteil einer nicht infizierten Normalniere. Diese wurden mittels Transfektion mit dem Plasmid pSV3gpt des Simian Virus 40 immortalisiert (Schüttert et al. 2003). Hierbei behielten sie jedoch phänotypische und biochemische Eigenschaften von renalen interstitiellen Fibroblasten. Die Zelllinie TK188 stellt ein pathologisches Korrelat zur Zelllinie TK173 dar. Sie wurden aus Nieren mit tubulointerstitieller Fibrose entnommen (Dihazi et al. 2011).

Primäre renale Fibroblasten

Primärkulturen haben eine begrenzte Lebensdauer, zeigen dafür aber vergleichbare Eigenschaften *in vitro* wie *in vivo*. Die Generierung der Primärfibroblasten erfolgte aus Wildtyp-Mäusen. Hierfür wurden die entnommenen UUO-Nieren sofort auf Eis gebettet, der kortikale Anteil des Nierengewebes entfernt und dieser unter Verwendung eines Skalpell's gründlich zerkleinert. Die homogenisierte Masse wurde für drei Stunden bei 37 °C und 650 U/min in 5 ml DMEM mit 20% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 4 U/ml Kollagenase Typ IV im Thermorüttler inkubiert. Das Homogenat wurde anschließend durch einen cell-stainer-Filter in ein 50-ml-Falcon überführt und mit 5 ml DMEM mit 20% FCS gespült. Es folgte die Zentrifugation bei 1000 U/min für 5 min, Verwerfung des Überstands und die Resuspendierung des Pellets mit 1 ml frischem Medium. Anschließend wurden die Zellen auf eine 58 cm² Petrischale mit 5 ml Medium expandiert und bei 37 °C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Nach zwei Stunden und am nächsten Tag folgten erneute Mediumwechsel.

Murines Nierengewebe

Die acht bis zwölf Wochen alten Wildtyp-Mäuse *C57BL/6J* wurden im European Neuroscience Institute Göttingen (ENI) untergebracht. Die Haltung erfolgte tiergerecht in Käfigen bei konstanter Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 Stunden. Wasser sowie Nahrung wurden alle 48 Stunden erneuert.

Die obligate Genehmigung wurde von der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVIS) erteilt (Antragsnummer: G15.1842).

Humanes Nierengewebe und Vollblutproben

Des Weiteren erfolgte die Gewebs- und Vollblutanalyse von Patienten mit chronischer Nierenerkrankung. Die Genehmigung für das Forschungsvorhaben an humanen Vollblutproben und Gewebematerial wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen erteilt (Antragsnummer: DOK_128_2015). Eine detaillierte Auflistung der Patientenkohorte mit chronischen Nierenerkrankungen, aufgeschlüsselt hinsichtlich klinischer und histologischer Charakteristika, ist in **Tabelle 26** einsehbar.

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Primäre renale Fibroblasten

Die TKs und primären Fibroblasten wurden als Monolayer in 75-cm²-Zellkulturflaschen oder in Petrischalen bei 37 °C in Gegenwart von 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Begasung im Inkubator kultiviert. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 300 mosmol/l mit einem niedrigen Glukosegehalt (1 g/l) verwendet, welches zusätzlich angereichert wurde mit 10% (20% für primäre Fibroblasten) fetalem Kälber-Serum (FCS), 1% 0,2 mol/l L-Glutamin und 1% 1000 U/ml Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B. Die Stimulation erfolgte in serumfreiem DMEM. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal in der Woche. Die Zellen wurden mehrmals wöchentlich unter dem Mikroskop hinsichtlich Konfluenz, abgestorbene Zellen und möglichen Kontaminationen kontrolliert.

3.1.1 Trypsinierung und Passagieren der Fibroblasten

Nach Erreichen einer 80%-Konfluenz erfolgte die Subkultivierung. Hierzu wurde zuerst das verbrauchte Medium entfernt und der Zellrasen in 10 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Zellkulturflasche zugegeben und durch gleichmäßiges Schwenken alle Zellen damit bedeckt. Um den Ablösungsprozess des Trypsins zu unterstützen, wurden die Zellflaschen für etwa 3 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Zellsuspension wurde danach 5 ml Kulturmedium hinzugegeben, um die enzymatische Reaktion des Trypsins und somit die weitere Zellyse zu stoppen. Mittels einer Pipette wurde die Suspension in ein 15-ml-Falcon überführt. Es folgte die Zentrifugation bei 100 U/min für 5 min bei 21 °C. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen, das gebildete Zellpellet mit frischem Vollmedium resuspendiert und auf mehrere Zellkulturflaschen expandiert. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Sämtliche Arbeitsschritte in der Zellkultur erfolgten unter der Sterilbank und waren von einer gründlichen Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion begleitet.

3.1.2 Auftauen und Einfrieren von adhärenenten Zellen

Zur längeren Aufbewahrung wurden Zellen eingefroren und im Stickstofftank gelagert. Zunächst wurden die Zellen im Vollmedium resuspendiert und zu gleichen Teilen, circa 500 µl, mit dem Einfriermedium in ein Kryoröhrchen überführt. Dieses verblieb über Nacht im mit Methanol gefüllten Nalgene Mr. Frosty Freezing Container und wurden bei einer Abkühlrate von -1 °C/min auf -80 °C heruntergekühlt. Am nächsten Tag konnte das Kryoröhrchen im Stickstofftank bei -196 °C kryokonserviert werden.

Für die erneute Verwendung wurden die Zellen in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, mit DMEM verdünnt, abzentrifugiert und anschließend auf Zellkulturflaschen bzw. Petrischalen mit 10 ml/ 5 ml des entsprechenden Vollmediums verteilt.

3.2 Mausstudie

3.2.1 Tiermodell und Studiendesign

Der Effekt von RLX 030 zur Behandlung renaler Fibrogenese wurde im Tierexperiment unter Verwendung eines etablierten Mausmodells untersucht. In den entsprechenden Versuchsgruppen wurden acht bis zwölf Wochen alte männliche und weibliche Mäuse mit dem Hintergrund WT *C57BL/6J* und einem Körpergewicht von ungefähr 20 g verwendet. Die Wildtyp-Mäuse wurden drei Zeitpunkten (drei, sieben und zehn Tagen) und drei Konzentrationsgruppen mit jeweils ≥ 12 Tieren zugewiesen. Mindestens sechs Tiere dienten pro Zeitpunkt und Konzentration jeweils als Kontrollgruppe und wurden mit PBS behandelt.

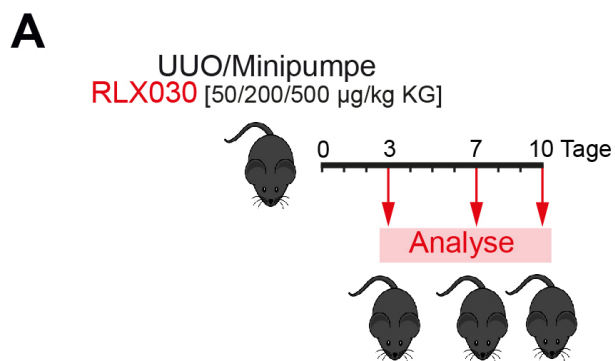


Abbildung 6: Initiales Mausmodell zur Untersuchung des inhibitorischen Effekts von RLX030. (A) Unilaterale Ureterobstruktion sowie Implantation der osmotischen Minipumpe gefüllt mit drei unterschiedlichen Konzentrationen RLX030 an Tag 0. Anschließende Sektion der Mäuse nach drei, sieben oder zehn Tagen.

3.2.2 Berechnung der Medikamentendosierung

Die Versuchstiere wurden mit dem Wirkstoff Relaxin030 (Novartis) behandelt, welches eine Konzentration von 4,75 mg/ml besaß. Die angestrebten Medikamentendosierungen betragen 500-, 200- und 50 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$. Um eine konstante Abgabe des Relaxins sicherzustellen, wurden den Wildtyp-Mäusen osmotische Minipumpen (Modell 1002) der Firma Alzet® intraperitoneal im Abdomen implantiert. Vor Implantation wurde diese entsprechend der Volumengröße von 100 μl bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ mit 35,2 μl Relaxin030 und 64,8 μl PBS mittels einer Kanüle befüllt und über Nacht bei 37 °C in PBS equilibriert. Für die Kontrollgruppen wurden die Pumpen mit 100 μl PBS versehen. Mit einer Pumprate von 0,25 μl pro Stunde wurden 6 μl dieser Lösung pro Tag über drei, sieben und zehn Tage durch Osmose kontinuierlich abgegeben.

3.2.3 Funktionsweise und Implantierung der osmotischen Minipumpe

Die ALZET-Pumpe besteht aus einer äußeren semipermeablen Membran, einer Salzkammer mit hochkonzentrierter Natriumchloridlösung und der inneren flexiblen impermeablen Membran, die den Medikamentenfüllraum umschließt. Aufgrund einer osmotischen Druckdifferenz strömt Körperflüssigkeit durch die semipermeable Membran zur Salzkammer. Diese drückt durch eine kontinuierliche Volumenzunahme das im Füllraum befindliche Medikament über eine Auslauföffnung am Pumpenpol in den Tierkörper. Die konstante Pumprate wird somit durch die Wasserpermeabilität der äußeren Membran bestimmt und wird nicht durch das Molekulargewicht oder die physikalischen oder chemischen Eigenschaften der abzugebenden Lösungen beeinflusst. Die Pumpen wurden sofort nach der unilateralen Obstruktion des Ureters (UUO) in die Versuchstiere eingebracht (Greenshaw 1986, Doucette et al. 2000).

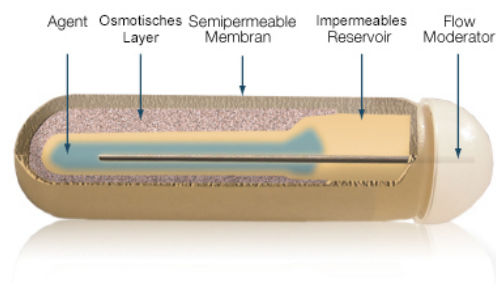


Abbildung 7: Osmotische Minipumpe Modell 1002 der Firma Alzet® (modifiziert nach: alzet.com).

3.2.4 Unilaterale Ureterobstruktion

Die UUO-Operation diente der Induktion renaler tubulointerstitieller Fibrose und wurde von Herrn Dr. med. Björn Tampe (Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen) durchgeführt. Die Wildtyp-Mäuse bekamen 20 min vor Operation 100 µl des Analgetikums Buprenorphin (0,1 g/kg KG, 1:10 mit NaCl 0,9% verdünnt) intravenös verabreicht. Weiter wurden sie kurznarkotisiert mit inhalativen Isofluran, das Bauchfell rasiert, desinfiziert und die Tiere auf dem Rücken in ein Schlauchsystem platziert. Über dieses erfolgt die weitere Anästhesie mit Isofluran. Mittels einer medianen, ca. 1 cm langen Laparotomie wurde der Bauch eröffnet. Nach vorsichtigen Eventerieren der Darmschlingen konnte der linke Ureter vom umliegenden Gewebe separiert und dargestellt werden. Durch zwei Ligaturen (Prolene 6-0, ETHICON, Belgien) im Abstand von 5 mm wurde der Ureter zwischen dem oberen und mittleren Drittel abgebunden. Die kontralaterale Niere blieb unbeeinträchtigt und fungierte als Kontrolle. Nach Zurückverlagern des Darms wurde die Alzet® Minipumpe intraperitoneal in die Bauchhöhle eingebracht. Zum Schluss erfolgte ein zweischichtiger Wundverschluss (Vicryl 4-0, ETHICON, Belgien). Sowohl vor als auch nach OP bekamen die Mäuse über das Trinkwasser

Metamizol zur Weiteren analgetischen Behandlung (Novaminsulfon 500 mg/ml Tropfen, 15 Tropfen auf 250 ml).

3.2.5 Präparation der Versuchstiere

Nach dem dritten, siebten und zehnten postoperativen Tag wurden die Mäuse von Frau Sarah Rinkleff erneut mittels Isofluran kurzernarkotisiert und ihnen anschließend 500 µl Blut mittels Heparin-getränkten Glaspipetten retrobulbär entnommen. Das Blut wurde in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß überführt und für die Dauer der Sektion auf Eis gelagert. Danach erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Bei der Sektion wurden das Abdomen sowie der Thorax mittels Längslaparotomie eröffnet, Herz, Milz, Leber, Lunge, Pankreas, Interstitium, Uterus und beide Nieren entnommen. Die besagten Organe wurden mit Hilfe eines Skalpell gedrittelt, wobei je ein Teil in ein Kryoröhrchen, ein weiterer in Tissue-Tek® Cryomold®-Formen überführt und kurzzeitig in flüssigem Stickstoff gelagert wurde, bevor sie zur Langzeitaufbewahrung bei -80 °C kryokonserviert wurden. Der letzte Gewebeanteil wurde auf Einbettkassetten verteilt und in 4%-iger Formaldehydlösung fixiert.

3.2.6 Verarbeitung und Lagerung der Blutproben

Die Eppendorfgefäße mit dem Blut wurden bei 4 °C und 3500 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschließend konnte das Serum im Überstand in ein weiteres 1,5-ml-Eppendorfgefäß pipettiert und bei -80 °C tiefgefroren werden.

3.2.7 Zweites unabhängiges Tiermodell (medikamententoxische Verifikation mit anderem genetischen Hintergrund - FVBN)

In einem weiteren etablierten Mausmodell wurden 12-14 Wochen alte männliche und weibliche Wildtyp-Mäuse mit dem Hintergrund FVBN und einem Körpergewicht von 25 g verwendet. Die Mäuse wurden vier Zeitpunkten (3, 28, 84, 140 Tage) mit jeweils ≤ 20 Tieren zugewiesen. Mindestens fünf Tiere wurden pro Zeitpunkt mit RLX030 oder mit PBS behandelt, diese wurden abermals über eine osmotische Minipumpe von der Firma Alzet (Modell 2006) appliziert. Die angestrebte Medikamentendosierung betrug 200 µg/kg KG/Tag. Für den ersten Zeitpunkt (Tag drei) fand sowohl die Applikation der Folsäure als auch die Implantation der osmotischen Minipumpe am gleichen Tag statt. Bei den anderen Zeitpunkten erfolgte zuerst die subkutane Injizierung der Folsäure (Folic acid (F7876-10G)) und zwei Tage später dann die subkutane Implantation der Pumpe. Ein Wechsel der Pumpen wurde nach jeweils sechs Wochen durchgeführt. Die Präparation der Versuchstiere war identisch mit dem ersten Mausmodell.

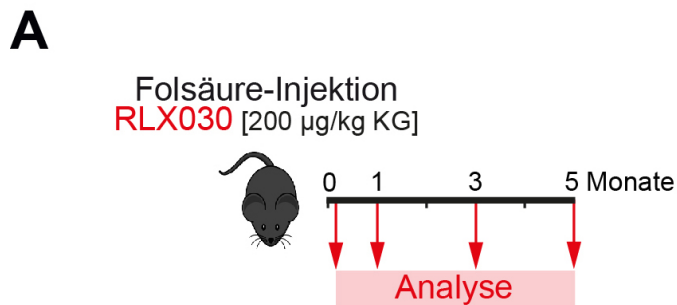


Abbildung 8: Zweites unabhängiges Mausmodell mit dem genetischen Hintergrund FVBN und Folsäure-Applikation zur Induktion der Nierenfibrose. (A) Folsäure-Injektion sowie Implantation der osmotischen Minipumpe gefüllt mit 200 µg/kg KG/Tag RLX030. Anschließende Sektion der Mäuse nach drei Tagen, einem, drei und fünf Monaten.

3.3 Proteinbiologische Methoden

3.3.1 Proteinisolation

Murines Nierengewebe

Von den Nierengewebeproben wurden ca. 4 mm³ große Stücke abgetrennt, in 2-ml-Eppendorfgefäßen mit 350 µl NP40-Lysisbuffer überführt und mittels einer Edelstahlkugel im Oszillator homogenisiert. Zum sicheren Probenaufschluss wurde das Homogenisat anschließend im Sonicator nochmals fragmentiert. Für die weitere Proteinisolation wurde das Lysat in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß pipettiert.

Stimulation von TK-Zellen und primären Fibroblasten

Nach Aussaat der TK-Zellen bzw. primären Fibroblasten in T75-Zellkulturflaschen zu je 1x10⁶ und 5x10⁵ Zellen in 5 ml erfolgte die Kultivierung über sechs Stunden im DMEM-Vollmedium und für weitere sechs Stunden im serumfreien Hungermedium. Anschließend wurden die Zellen mit TGF-β1 und RLX030 in einer absteigenden Verdünnungsreihe 72 Stunden lang inkubiert. Als Kontrolle diente wiederum je eine unbehandelte Zellkulturflasche im Hungermedium. Nach Beendigung der Stimulationszeit wurde der Zellrasen mit 3 ml PBS gewaschen und mittels eines Zellschabers bzw. Trypsin (primäre Fibroblasten) vom Zellkulturflaschenboden gelöst. Anschließend erfolgte die Zentrifugation und Zelllyse durch Hinzugabe von 150 µl Zelllysispuffer über 30 min auf Eis sowie das regelmäßige Vortexen alle 10 min. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 8000 U/min. konnte der Überstand abgenommen werden.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand diente das BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce. Das Prinzip dieser Methode basiert auf einer kombinierten Reaktion bei der zunächst unter Proteinanwesenheit im alkalischen Medium Cu⁺² zu Cu⁺¹ reduziert wird (Biuret-

Reaktion). Das reduzierte Kupfer-Ion bildet mit zwei Molekülen Bicinchinonsäure (BCA) einen violetten und wasserlöslichen Chelatkomplex. Dieser weist eine starke Absorption bei 562 nm auf.

- 1). Protein (Peptidbindungen) + Cu^{+2} \rightarrow tetradentate- Cu^{+1} Komplex
- 2). Cu^{+1} + 2 Bicinchonsäure (BCA) \rightarrow BCA- Cu^{+1} - Komplex (violettgefärbt bei 562nm)

Der Farbkomplex ist in seiner Extinktion proportional zur Proteinkonzentration und kann kolometrisch mittels Spektralphotometer NanoDrop™ 2000 detektiert werden. Hierbei wird die Proteinmenge relativ zu einer BSA-Standardkurve ermittelt.

3.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Proteine können nach Verdünnung auf die entsprechende Konzentration (25 µg) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970) ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Hierfür wird das Proteinlysate im Verhältnis 1:1 mit dem LDS-Sample-Buffer gemischt und für 5 min bei 95 °C im Thermoblock denaturiert. Die hohe Wärmeexposition sowie das anionische Detergenz SDS führen zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen. Das Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol bricht darüber hinaus Disulfidbrücken auf. Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine gehen somit verloren. Zudem führt das SDS zur Negativladung aller Proteine, indem durch Anlagerung die Eigenladung der Proteine verdeckt werden. Somit kann eine ausschließliche Trennung nach Größe der Polypeptidketten stattfinden.

Für die SDS-Page wurden 4-12% Bis-Tris-Gele eingesetzt. Pro Well wurden 25 µl des Protein-Puffer-Gemisches pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde mit einem Innen- und Außenpuffer befüllt und unter Verwendung einer Spannungsquelle erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben bei zunächst 80 V für 15 min und anschließend bei 120 V für über zwei Stunden. Als Leiter für den Größenvergleich wurde der Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standard verwendet, welcher Proteine im Größenbereich zwischen 3,5 – 260 kDA umfasst.

3.3.3 Proteintransfer

Das Blotting dient der quantitativen sowie qualitativen Analyse der durch SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennten Proteine. Für diese Methode wurden die Proteine aus dem Bis-Tris-Trenngel auf eine Blotting-Membran übertragen und so mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen. Diese Membran bestand aus Nitrozellulose, an die die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkung gebunden werden (Bioanalytik | Friedrich Lottspeich | Springer, Rehm und Letzel 2010). Der Transfer der Proteine erfolgte nach der Semi-Dry Methode. Hierfür wurden die Membran sowie die Filterpapiere für ein paar Minuten im Transferpuffer äquilibriert. Dieser setzt sich aus dem Fast-Semi-Dry-Buffer und destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10

zusammen. Im Weiteren wurde ein Blot-Sandwich gebaut, welches in der Reihenfolge aus Filterpapieren, Nitrozellulosemembran, Gel und abermals Filterpapieren geschichtet auf den Fastblot eingespannt wurde. Für die Eluierung der Proteine aus dem Gel und den Transfer auf die Membran wurde eine senkrecht zum Gel gerichtete Spannung von zunächst 150 mA angelegt, welche nach 15 min auf 250 mA für weitere 45 min erhöht wurde.

3.3.4 Semi-Dry-Western Blot

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockmedium (5%iger Magermilch bzw. 5%igem BSA in TBS-T) inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren, bevor die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in 2%iger Magermilch oder 2%igem BSA inkubiert wurde. Der Antikörper bindet spezifisch an eine bestimmte Aminosäuresequenz (Epitop) des Proteins. (Die Antikörperkonzentrationen sind in **Tabelle 15** aufgeführt.)

Nach dreimaligem Waschen der Nitrozellulosemembran mit TBS-T für je 5 min wurde sie mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper in der Verdünnung 1:2000 für eine Stunde bei Raumtemperatur im 5%igem Blockmedium inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T über jeweils 5 min, erfolgte die Detektion mittels 20x LumiGLO® Reagenz und 20x Peroxidase im Verhältnis 1:1. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert die Reaktion des Luminols (LumiGlo) mit der Peroxidase (H_2O_2) zu einem angeregten intermediären Dianion, 3-Aminophthalat. Dieses emittiert Licht (Chemilumineszenz), während es in seinen engergetischen Grundzustand zurückkehrt. (Lottspeich und Zorbas, 1998). Diese Chemilumineszenz wird im ChemiDoc™ MP System quantifiziert und ist proportional zur Proteinmenge auf der Membran. Die densitometrische Auswertung der Western Blot-Bilder erfolgte mit dem Programm ImageJ. Zur Normalisierung erfolgt das Anfärben der Membran mit dem Housekeeping-Gen GAPDH. Hierfür wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur mit dem Stripping Buffer von Thermo Scientific auf dem Roller inkubiert. Danach erfolgte nach dreimaligem Waschen in TBS-T für 5 min das Blocken der Membran in 5%igem BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur und die Inkubation mit dem Primärantikörper GAPDH in 2%igem BSA über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran abermals nach dreimaligem Waschen mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in 5%igem BSA für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T für jeweils 5 min erfolgte die erneute Detektion mittels des ChemiDoc™ MP System.

Tabelle 15: Verwendete Antikörper für die Western Blots

Primärantikörper	Zugehöriger Sekundärantikörper				
	Antigen (kDa)	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung
Anti-Alpha Smooth Muscle Actin (42kDa)	Maus	1:5000	Kaninchen	HRP	1:2000
Anti-p-Smad2 (Ser465/467), (60kDa)	Kaninchen	1:600	Ziege	HRP	1:2000
Anti-p-Smad 3 (Ser423/425), (52kDa)	Kaninchen	1:1000	Ziege	HRP	1:2000
Anti-Relaxin-Receptor 1 (H-160), (85-95kDa)	Kaninchen	1:500	Ziege	HRP	1:2000
Anti-Relaxin-Receptor 2 (H-150), (86-103kDa)	Kaninchen	1:500	Ziege	HRP	1:2000
Anti-Relaxin 2, (21kDa)	Kaninchen	1:1000	Ziege	HRP	1:2000

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA-Isolation aus Fibroblasten und murinem Gewebe

Fibroblasten

TK 173 und 188 wurden in 6-Well-Platten zu je 100.000 Zellen in 2 ml Vollmedium pro Well ausgesät. Die primären Fibroblasten befanden sich hingegen in Petrischalen zu jeweils 60.000 Zellen und 5 ml Vollmedium. Nach sechs Stunden wurde bei allen drei Zelllinien ein Mediumwechsel in das serumfrei Hungermedium DMEM durchgeführt. Das Stimulanz TGF- β 1 wurde in serumfreiem DMEM auf 10 ng/ml und Relaxin030 im PBS auf eine Konzentration von 1 ng/ μ l verdünnt. Die Stimulationskonzentrationen sowie die genaue Stimulationsdauer beider Substanzen sind der folgenden **Tabelle 16** zu entnehmen.

Als Kontrollen dienten in allen Experimenten unstimulierte Fibroblasten, welche simultan in reinem DMEM inkubiert wurden. Nach entsprechender Inkubationsdauer erfolgte nach dem Waschen mit PBS die Zelllysis mittels Trypsin und die anschließende Isolierung der mRNA unter Verwendung des Kitsystems PureLink® RNA Mini-Kit.

Tabelle 16: Stimulationsschema von Fibroblasten für die qRT-PCR

Ziel mRNA für qRT-PCR	Medikamenten-Konz.	Kostimulanzen	Stimulationsdauer
Acta2	RLX030 0,1 – 100 ng/ μ l	rhTGF- β 1	48 Stunden
Col1a1	RLX030 0,1 – 100 ng/ μ l	rhTGF- β 1	72 Stunden
Rxfp1, Rxfp2, Rxfp3		rhTGF- β 1	48 Stunden

<i>Rln1, Rln2, Rln3</i>	rhTGF- β 1	48 Stunden
-------------------------	------------------	------------

Die zu verwendenden Zellen wurden mittels Trypsin von den 6-Well-Platten gelöst, gezählt, in 1,5 ml Tubes für 5 min bei 12000 U/min abzentrifugiert und das Pellet mit 1 ml TRIzol®-Lösung gründlich homogenisiert. Das entstandene Lysat wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um eine komplette Auflösung der Nukleoprotein-Komplexe zu gewährleisten.

Für eine optimale Phasentrennung wurde das Zelllysate mit 200 μ l Chloroform angereichert, einige Sekunden lang kräftig geschüttelt und für 15 min bei 4 °C und 12000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden vorsichtig 500 μ l der oberen transparenten Phase in ein neues 1,5-ml-Eppendorf-Gefäß überführt, welches noch mit der gleichen Menge an 70%igem Ethanol versetzt wurde. In zwei Arbeitsschritten wurde dann das gesamte Zellextrakt auf eine Silikat-Gelmembran einer Spin-Säule aufgetragen. Es erfolgte die Zentrifugation für 15 Sekunden bei 12000 U/min und das Verwerfen des Durchflusses. Zur weiteren Aufbereitung wurden verschiedene Waschpufferlösungen hinzugefügt:

- 1 x 700 μ l Wash Buffer I
- 2 x 500 μ l Wash Buffer II

Jeder Waschschrift war gefolgt von einer 15-sekündigen Zentrifugation bei 12000 U/min. Zum Schluss konnte nach einer 2-minütigen Trockenzentrifugation die RNA mit 50 μ l nukleasefreiem Wasser und einem letzten Zentrifugationsschritt von der Membran gelöst werden.

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA wurde das NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer verwendet. Hierfür wurden 1 μ l des RNA-Eluats auf die Probenhalterung aufgetragen und die Absorption im Verhältnis zum nukleasefreien Wasser bestimmt. Zur Sicherstellung der Qualität der RNA-Probe wurde der Quotient der Absorptionskoeffizienten bei 260 nm und 280 nm definiert. Dabei entspricht ein Wert von 2,0 reiner RNA. Liegen Abweichungen über dem angegebenen Wert vor, spricht dies für Proteinkontaminationen.

Murines Nierengewebe

Die bei der Maus-Sektion gewonnenen Gewebeproben wurden zum sicheren Probenaufschluss zuerst in ca. 2 mm³ große Gewebestücke geschnitten, in 2-ml-Eppendorfgefäße mit 1 ml Trizol und einer Edelstahlkugeln (Bead) überführt. Im Tissue Lyser wurde das Gewebe bei 50 Hz für 5 min homogenisiert. Anschließend wurde 1 ml des Lysats in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und die RNA, wie schon beschrieben, mit dem PureLink® RNA Mini Kit System isoliert.

3.4.2 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Die aufgereinigte mRNA wurde im Anschluss unter Verwendung des Thermocyclers Mastercycler ep gradient S in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden 50 ng der mRNA mit 2 µl des Oligonukleotid-Ansatzes gemischt und für 5 min bei 65 °C inkubiert. Das Oligo-dT ist komplementär zur Poly-Adenosin-Sequenz und spezifisch für mRNAs.

Oligonukleotid-Ansatz (ProProbe)

Tabelle 17: Oligonukleotid-Ansatz für die reverse Transkription

Reagenz	Volumen
Oligo-dT	1 µl
dNTP Mix 10 mM	1 µl
5 min bei 65°C	
Pause bei 4 °C	

Für den Verdau endogener RNasen wurde der Ansatz für 2 min bei 42°C mit dem Ribonuklease-Inhibitor RNaseOut™ inkubiert.

RNaseOut-Ansatz™ (Pro Probe)

Tabelle 18: RNaseOut-Ansatz für die reverse Transkriptase

Reagenz	Volumen
5 x First Strand Buffer	4 µl
0,1 MDTT	2 µl
RNaseOut™	1 µl
2 min bei 42 °C	

Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte nach Zugabe von 1 µl der Reversen Transkriptase SuperScript® II und Inkubation über 50 min bei 42 °C. Anschließend wurde diese bei 70 °C für 15 min inaktiviert.

Die umgeschriebene cDNA konnte nun mit 80 µl nukleasefreiem Wasser auf eine Endkonzentration von 50 ng/µl verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

3.4.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine von Mullis und Faloona etablierte *in vitro*-Technik zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten (Mullis und Faloona 1987). Nach thermischer Denaturierung und Dissoziation der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge folgt die

Hybridisierung spezifischer Primerpaare (Oligonukleotide von 10-30 Basenpaaren Länge) an die Einzelsträngige-DNA. Dieser Prozess wird als Annealing bezeichnet. Die Vorwärts- und Rückwärtsprimer binden bei ihrer spezifischen Annealingtemperatur (65-72 °C) an die komplementären DNA-Strukturen. Sie fungieren so über ihre freie 3'-OH Gruppe für die thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bacterium *Thermus aquaticus*, als Ausgangspunkt für die Synthese eines neuen komplementären DNA-Strangs (Elongation). Die quantitative real-time PCR ist ein Verfahren, welches von Higuchi et al. etabliert wurde und bei dem in Echtzeit die Akkumulation von PCR-Produkten verfolgt werden kann, um so die exponentielle Phase der Reaktion zu identifizieren. Dies ist für die anschließende Quantifizierung der Templatmenge entscheidend. Die Messung erfolgt in Form eines spezifischen Fluoreszenzsignals, welches von der gebildeten PCR-Produktmenge abhängig ist. Das produktabhängige Fluoreszenzsignal wird durch spezifische DNA-bindende Fluoreszenzfarbstoffe ermöglicht. Für die folgenden qRT-PCRs wurde SYBER-Green I verwendet, ein Farbstoff, welcher sequenzunabhängig in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA bindet und proportional fluoresziert. Folglich kann nach jedem Zyklus die Menge an PCR-Produkten gemessen und mit einem Fluoreszenzschwellenwert, bei dem das Fluoreszenzsignal sich deutlich vom Hintergrundsignal abhebt, verglichen werden. Die Zykluszahl, welche diesen Schwellenwert erreicht, wird als Threshold-Zyklus bzw. C_T Wert bezeichnet. Je mehr cDNA enthalten ist, desto kleiner ist der C_T Wert.

Zu beachten ist jedoch, dass man bei der Verwendung des CYBER Green I nicht zwischen Produkt und sogenannten Nebenprodukten wie zum Beispiel Primerdimern oder unspezifischen Amplifikationsprodukten unterscheiden kann. Aus diesem Grund wird anschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die beiden farbstoffassoziierten DNA-Einzelstränge werden bei ansteigender Temperatur in Abhängigkeit vom Schmelzwert T_m des Doppelstrangs unterschiedlich stark voneinander getrennt. Auf diese Weise wird das CYBER Green I wieder freigesetzt und führt so zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Diese erreicht ihr Maximum, wenn beide Stränge vollständig voneinander getrennt werden. Ein spezifischer Primer führt zu einem Hochpunkt für das Hauptprodukt, wohingegen mehrere Maxima für unspezifische Nebenprodukte sprechen und nicht erscheinen sollten. In **Tabelle 19** sind die spezifischen Primersequenzen für die qRT-PCR abgebildet.

Tabelle 19: Primersequenzen für die qRT-PCR

Ziel-mRNA	mRNA-Nummer	Primer Vorwärtsstrang 5'-3' Primer Rückwärtsstrang 5'-3'	Ta [°C]	Fragmentlänge [bp]
Acta2	NM_007392	CTC TTC CAG CCA TCT TTC ATT G GTT GTT AGC ATA GAG ATC CTT CCT	58,4	111
Col1a1	NM_007742	ATG GAT TCC CGT TCG AGT ACG TCA GCT GGA TAG CGA CAT CG	59,7	63

<i>Rln1</i>	NM_011272	TGA TAA ACT GGG TGA AGC AGA AG	57,4	82
		CCT CTT TTT CCG TGA ATG GGT AT	57,5	
<i>Rln3</i>	NM_173184	CTT GCG GAG GCT CAC GAT	57,2	95
		CAG GTG GTC TGT ATT GGC TTC	56,9	
<i>Rxfp 1</i>	NM_212452	ATT TCT CTC TGC TGT GCT GAC T	58,2	102
		CGG CTG TGC GTG CTT ATT G	58,0	
<i>Rxfp 2</i>	NM_080468	ACG AAC TCC ACC TTC CTA ACG	58,0	88
		AAA ATG TCT TCT CTG GAA CAA AAC C	57,6	
<i>RLN1</i>	NM_006911	GGC AAC CAT CAT TAC CAG AGC	57,6	148
		TCC AAG CCT AAG TAT TTT AAT TCT GAA	56,7	
<i>RLN2</i>	NM_134441	GCT CCT CAG ACA CCT AGA CC	56,9	105
		CTG TGG CAA ATT AGC AAC AAA TTC	57,0	
<i>RXFP 1</i>	NM_021634	GCT GTA TGC CAT GTC AAT CAT T	56,0	99
		TCT CCA CGA AAC TTT AGG TCA A	55,8	
<i>RXFP2</i>	NM_130806	GAT CAC TCC TTC ATG CCA AAA AG	57,0	128
		TGT CAC CAC AGT TCT CTT CGT	57,5	
<i>RXFP 3</i>	NM_016568	ACC AAA TCA GTG ACC ATC GTT	56,1	95
		GCG TTG AAC TTG ATG AGG ATG	55,9	

3.4.4 DNA-Isolation aus murinem Gewebe

Die Aufreinigung der DNA erfolgte aus humanem und murinem Nierengewebe sowie Vollblutproben. Es wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit (250) (Cat.-No. 69506) verwendet. 100 µl des Vollbluts bzw. 20 g schwere Gewebstücke wurden mit 20 µl der Proteinase K in einem 1,5-ml-Tube gemischt und mit PBS bis 220 µl aufgefüllt. Hierbei kam zu einer gezielten Aufspaltung der Peptidbindungen. Anschließend wurden 200 µl des AL-Puffers hinzugefügt und die Lösung sofort mittels eines Vortexers ausreichend durchmischt, sodass eine homogene Lösung entstand. Diese wurde dann für 10 min bei 56 °C inkubiert. Bei den Gewebeproben erfolgte eine Inkubation über Nacht. Weiter wurde das Lysat mit 100 µl Ethanol (100%) versetzt und erneut gut durchmischt. Die Mixtur wurde auf eine DNeasy Mini Spin Säule pipettiert, bei $\geq 6000 \times g$ für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluss verworfen und anschließend mit zwei Wasch-Puffern AW 1 und 2 (je 500 µl) für 1 und 3 min bei ≥ 6000 und $20000 \times g$ zentrifugiert. Abschließend wurde die Säule in ein neues Mikrozentrifugen Tube überführt und die Membran mit 200 µl des AE-Puffers für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA konnte so im Puffer gelöst werden und befand sich nach erneuter Zentrifugation im Durchfluss. Für eine höhere DNA-Konzentration konnte der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt werden. Mit Hilfe des NanoDrops wurde photometrisch die DNA-Konzentration bestimmt.

3.4.5 Methylierte DNA-Immunopräzipitation (MeDips)

Prinzip

Epigenetische Modifikationen haben Einfluss auf die Aktivität von Genen. Ein zentraler Mechanismus für die epigenetische Alteration von genomischer DNA ist die Hypermethylierung von CpG-Inseln in spezifischen Promotorregionen von Genen und eine globale DNA-Hypomethylierung. Hierbei beeinflussen methylierte CpG-Inseln den Prozess, in dem DNA-Methyltransferasen (Dnmts) eine Methylgruppe vom S-Adenosyl-L-Methionin zum fünften Kohlenstoffatom (C5) eines Cytosins übertragen.

Die DNA-Methylierung kann unter anderem mittels methylierter DNA-Immunopräzipitation untersucht werden. Bei dieser Methode wird ein Antikörper gegen 5-Methyl-Cytosin eingesetzt, der die methylierten DNA-Abschnitte anreicht. Diese können anschließend für eine Standard-DNA-Detektion verwendet werden. Die MeDIP wurde mit dem Methylamp™Methylated DNA Capture Kit von Epigentek, nach Angaben des Herstellers, durchgeführt. Die isolierte DNA wurde zusammen mit dem Reaktions-Puffer MC2 durch einen Sonicators mittels Ultraschall in 500-1000 bp große Fragmente zerkleinert und für 2 min bei 95 °C inkubiert. Zur Vorbereitung wurden Strip-Wells mit 100 µl MC1 (Antikörper-Puffer) und 1 µl mit Anti-5-Methylcytosin für die Proben angesetzt. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur folgten zwei Waschschritte mit je 150 µl MC1 und MC3. Anschließend wurden 100 µl der fragmentierten DNA pro Well aufgetragen und abermals für 120 min auf einem Shaker (Belly Dancer 50-100 U/min) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit MC3 wurden 60 µl MC4 (DNA Release Buffer) mit 1 µl Proteinase K angesetzt und jeweils 60 µl auf jedes Well pipettiert. Zudem wurden Wells als Negativkontrolle angesetzt mit Input-DNA. Nach einer Stunde Inkubation im Wasserbad bei 65 °C wurden 180 µl EtOH (100%) auf die Wells gegeben, resuspendiert und auf die Spin Säule übertragen, die kurz vorher mit 100 µl MC5 (Binding Buffer) behandelt wurde. Es schlossen sich drei Zentrifugationsschritte für 20 s bei 12000 U/min an, wobei die Säule mit 200 µl 90%igem EtOH behandelt wurde. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Säule auf ein neues Eppendorfgefäß platziert, die Filtermembran mit 20 µl MC6 (Elutions-Puffer) behandelt und abschließend erneut bei 12000 U/min für 20 s zentrifugiert. Das Eluat enthielt die gereinigte methylierte DNA. Die DNA-Sequenz wird mit Primern, die für die Promoterregionen von Relaxin-1, -2 und -3 spezifisch sind, in einer qRT-PCR-Reaktion amplifiziert. Unter Verwendung der StepOne™Software von Applied Biosystem kann das PCR-Produkt sequenziert und die Sequenz analysiert werden.

Beim Designen der Primer wurde darauf geachtet, dass die PCR-Produkte nicht länger als 200 bp waren. Zudem war zu beachten, dass die Primer-Region Cytosin beinhaltet. Dieses wird durch Thymin ersetzt und führt zu einer spezifischen Amplifikation von methylierter DNA.

Für die humanen *RLN1*, *RLN2*, *RLN3*, murinen *Rln1* und *Rln3* wurden Reaktionsansätze hergestellt, die 10 µl CyberGreen, 4,6 µl nukleasefreies Wasser und jeweils 0,2 µl Primer Vorwärtsstrang (20 µl) und Primer Rückwärtsstrang (20 µl) enthielten.

Programm der qRT-PCR *RLN1*, *RLN2*, *RLN3* sowie *Rln1* und *Rln3*:

20 s 95° C, (3 s 95 °C, 30 s Annealing + Elongation) x50 Annealing-Temperatur:

<i>RLN1</i>	59 °C	Rln 1	66 °C
<i>RLN2</i>	63 °C	Rln 3	68 °C
<i>RLN3</i>	65 °C		

Tabelle 20: Primersequenzen für die methylierte DNA-Immunopräzipitation (MeDiP)

Ziel-Gen	Primer Vorwärtsstrang 5'-3' Primer Rückwärtsstrang 5'-3'	Ta [°C]	Fragmentlänge [bp]
<i>RLN1</i>	CCA GGA AGA TGC TCC TCA GAC CCG GTG AGA TTC CCA GTG AGA C	59 °C	250 bp
<i>RLN2</i>	GGC CCA GGA TGC CTC GCC TG CCT TTT GCT CCA GGT GCT CAT GCC	63 °C	173 bp
<i>RLN3</i>	CGC CTT ACG GGG TCA GGC TTT GC GGG CAG GTG TCC CTG GCT GAA TGT G	65 °C	200 bp
<i>Rln1</i>	GCT CCA GCT CCT GGG GTT CTG GC CCA GTG GCT TGC CTG GCA AGC AGA G	66 °C	195 bp
<i>Rln3</i>	GCT CGG GCT GCT GCT GCT GGC TTC C GCG CTT ACC AGG ACA CCT GTT CCA GG	68 °C	224 bp

3.5 Histologische Methoden

3.5.1 Anfertigung und Aufbereitung der Gewebeschnitte

Fixierung

Um autolytische Vorgänge nach dem Tod zu verhindern und die Gewebemorphologie in weitgehend natürlichem Zustand zu erhalten, erfolgte die Fixierung in 4%igem Formaldehyd. Dieses führt zur Ausbildung von Methylbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine und somit zu deren Blockierung. Die so entstandene Proteinvernetzung hat eine bessere Strukturhaltung zum Ziel.

Paraffineinbettung

Die über Nacht in 4%igem Formaldehyd gelagerten Biopsate wurden anschließend in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Gewebeprobe am folgenden Tag zunächst unter laufendem

Leistungswasser vier Stunden lang bewässert, um das Fixiermittel auszuwaschen. Anschließend wurden die Organpräparate im Gewebeeinfiltrationsautomat von Leica über eine aufsteigende Alkoholreihe in Paraffin gebettet. (1,5 h: 1 x 50%, 1 x 70%, 1 x 80%, 2 x 95%, 2 x 100%, 2 x Chloroform und 3 x Paraffin für je eine Stunde) Im Anschluss wurden sie in der Ausgießstation in Paraffinblöcke gegossen und auf der Kühlplatte heruntergekühlt, sodass im nächsten Schritt aus jedem Block mittels eines Mikrotoms, Gewebeschnitte von je 3 µm Dicke angefertigt werden konnten. Diese wurden zuerst in ein Wasserbad überführt zur besseren Entfaltung und anschließend auf SuperFrost-Objektträger übertragen. Zur besseren Adäsion des Gewebes an den Objektträgern erfolgte eine Trocknung über Nacht bei 37 °C. Die histologischen Präparate konnten danach bis zur histologischen Weiterverarbeitung in Präparatekästen bei Raumtemperatur aufbewahrt werden

Vorbereitung der Gewebeschnitte

Vor jeder histologischen Färbung wurden die Gewebeschnitte zunächst für zweimal 10 min in 100%igem Xylol entparaffiniert und durchliefen anschließend die folgende absteigende Alkoholreihe: 2 x 5 min EtOH 100%, 1 x 5 min EtOH 80%, 1 x 5 min EtOH 50%, 1 x 5 min EtOH 30%. Abschließend kamen die Schnitte für 5 min in Aqua dest. zur weiteren Bewässerung.

3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Prinzip

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung stellt eine Standardfärbung im histologischen Labor dar, deren Ziel die Darstellung von Gewebestrukturen und Beurteilung pathologischer Veränderungen im Gewebeschnitt ist.

Die basophilen Zellkerne werden mit Eisen-Hämatoxylin blau gefärbt und rot kontrastiert durch den azido- oder eosinophilen Zytoplasmafarbstoff Eosin.

Tabelle 21: Lösungen der HE-Färbung

Färbelösung	Ansatz		Einwirkdauer
Hämalaun nach Meyer (CARL ROTH)			6 min
Eosin pH 5	Eosin-G	200 ml	1-2 min
	Salzsäure/Essigsäure	1-2 Tropfen	

Färbung

Die Schnitte wurden für die Kernfärbung zuerst 5 min in Meyers Hämalaunlösung gelegt und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend erfolgte die Plasmafärbung in der mit 100%iger Essigsäure angesäuerten Eosinlösung (pH5). Abschließend wurden die Schnitte jeweils zweimal kurz mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (EtOH 96% und EtOH 100%) entwässert, sowie 2 x 5 min in Xylol geklärt. Das Eindecken der Präparate wurde mit dem Eindeckmittel Entellan vorgenommen.

3.5.3 Periodsäure-Schiff'sche-Färbung (PAS-Färbung)

Prinzip

Die PAS-Färbung ist ebenfalls eine Routinefärbung. Hierbei kommt es zur magenta-roten Färbung von glykogenhaltigen Zellbestandteilen und der extrazellulären Matrix wie beispielsweise Glykogen, Muco- und Glykoproteinen oder neutralen Mucopolysacchariden.

Die Perjodsäure ist ein starkes Oxidationsmittel und führt dazu, dass freie Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen oxidiert werden. Diese bilden dann mit der im Schiff-Reagenz vorhandenen Fuchsin-schwefeligen Säure einen rot-pinken Komplex.

Tabelle 22: Lösungen der PAS-Färbung

Färbelösung	Einwirkdauer
Perjodsäure 1%	10 min
Schiff's Reagenz	20 min
Hämalaun nach Meyer (CARL ROTH GmbH & Co. KG)	5 min

Färbung

Die entparaffinierten Präparate wurden für 10 min in 1%iger Perjodsäure gestellt, für weitere 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und kurz mit Aqua dest. gespült. Es folgte die 20-minütige Inkubation im Schiff'schen Reagenz und das anschließende Waschen unter warmen Leitungswasser. Für die Kernfärbung kamen die Gewebeschnitte für 5 min ins Hämalaun nach Meyer und wurden unter fließendem Leitungswasser 10 min gebläut. Wie bereits beschrieben erfolgte abschließend das Entwässern über eine aufsteigende Alkoholreihe und das blasenfreie Eindecken mit Entellan.

3.5.4 Masson-Trichrom-Färbung

Prinzip

Die MTS-Färbung dient der differenzierten Bindegewebsdarstellung sowie der Quantifizierung des Fibrosegrads im Nierenparenchym. Hierbei färben sich die Zellkerne bräunlich-schwarz und das Zytoplasma rot an. Die Kollagenfasern heben sich von der Umgebung durch eine blaue Kontrastierung ab.

Tabelle 23: Lösungen der MTS-Färbung

Färbelösung	Ansatz	Einwirkdauer
Bouins Lösung		15 min
Weigerts Hämatoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich)	Part A	100 ml
	Part B	100 ml
Säurefuchsin		5 min

Phosphorwolframsäure- /Phosphormolybdänsäure-Arbeitslösung (Sigma-Aldrich)	Phosphorwolframsäure 50 ml Phosphormolybdänsäure 50 ml ddH ₂ O 100 ml	5 min
Anilinblau		10 min
Essigsäure		kurz eintauchen
ddH ₂ O		

Färbung

Im Anschluss an die Entparaffinierung wurden die Schnitte bei 56 °C 15 min in der vorgewärmten Bouins Lösung fixiert, im Leitungswasser für 10 min heruntergekühlt und zum Auswaschen der gelben Farbe unter fließendes Leitungswasser gestellt. Des Weiteren wurden die Präparate zur Zellkernfärbung 5 min in Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung getaucht, erneut für 5 min gebläut unter fließendem Leitungswasser und schließlich dreimal mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte das Eintauchen der Gewebeschnitte in die Bieberich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung für 5 min und drei weitere Spülungen mit destilliertem Wasser. Nachdem die Schnitte für abermals 5 min mit der Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdän-Arbeitslösung behandelt worden waren, erfolgte die Inkubation der Präparate in Anilinblau zum Kollagennachweis. Ein leichtes Auswaschen der Farben wurde durch kurzzeitiges Eintauchen in 1%iger Essigsäure und destilliertem Wasser erreicht. Abschließend wurden die Schnitte wieder jeweils zweimal kurz mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (EtOH 96% und EtOH 100%) entwässert, sowie 2 x 5 min in Xylol geklärt. Das Eindecken der Präparate erfolgte mit dem Eindeckmittel Entellan.

3.5.5 Immunfluoreszenz

in vivo

Bei der Immunfluoreszenz werden Antikörper mit gekoppeltem Fluoreszenz-Farbstoff verwendet. Es lassen sich Proteine und somit spezifische Strukturen in Zellen als auch in Geweben genau lokalisieren. Bei den durchgeführten Färbungen wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz verwendet. Der Antikörper, welcher an das spezifische Protein (Epitop) bindet ist unmarkiert. Die eigentliche Färbung erfolgt erst im zweiten Schritt. Hier bindet ein zweiter mit Fluorochrom markierter Antikörper spezifisch an den ersten Antikörper. Im Anschluss an die Entparaffinierung folgten zwei weitere Waschschrte in PBS für jeweils 5 min und die Überführung der Gewebeschnitte in den Citratpuffer pH 6. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte für 40 min bei 95 °C in den Dampfgerar gestellt, anschließend abgekühlt

bei Raumtemperatur und erneut in PBS für 5 min gewaschen. In einer Feuchtkammer wurden die Gewebeschnitte 30 min mit einer Blocklösung aus 1% BSA in PBS inkubiert. Dieser Schritt diente der Absättigung freier Bindungsstellen und verhinderte somit unspezifische Antikörperbindungen. Es folgte die Auftragung der primären Antikörper in der Blocklösung und die Inkubation über Nacht bei 4 °C ebenfalls in einer Feuchtkammer.

Nach dreimaligem Waschen der Präparate mit PBS für je 5 min, wurden sie mit einem Fluoreszenz (Alexa Fluor® 555 oder 488) -markierten Sekundärantikörper, welcher in der Blocklösung verdünnt wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten erfolgte die Kernfärbung mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) 1:1000 für 5 min. Abschließend wurde erneut mit PBS gewaschen und die Schnitte mit Immu-Mount (Fisher Diagnostics Cat.No. 9990412) eingedeckt.

Tabelle 24: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung *in vivo*

Primärantikörper			zugehöriger Sekundärantikörper		
Antigen	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
αSMA	Maus	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Collagen I	Kaninchen	1:200	Esel	Alexa Fluor®488	1:400
Relaxin-Rezeptor 1	Kaninchen	1:50	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin-Rezeptor 2	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin-Rezeptor 3	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin 1	Ratte	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin 2	Kaninchen	1:500	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin 3	Maus	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Anti Collagen IV	Ziege	1:10			

Zellkultur

Pro 4-Well-Chamber Slides wurden je 10.000 Zellen humaner TK173 bzw. primäre Fibroblasten aus murinen Nieren ausgesät. Anschließend erfolgte die Kultivierung über sechs Stunden im DMEM-Vollmedium und über weitere sechs Stunden im serumfreien Hungermedium. Darauf folgend wurden die Zellen für zwei bzw. 48 Stunden mit 10 ng/ml rh TGF-β1 alleine und mit 1-100 ng/ml Relaxin030 stimuliert, wobei die gleichzeitige Inkubation von je zwei Chamber Slides im serumfreien Hungermedium als Kontrolle dienten.

Nach Beendigung der Stimulationsdauer wurde der Zellrasen für 3 x 5 min in PBS gewaschen und anschließend in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für 10 min fixiert. Nach drei weiteren Waschschrritten schloss sich die Inkubation im Triton-X 100 für 10 min an. Zur Blockierung von unspezifischen Antigenen wurden die Zellen für 30 min in einer 3%igen BSA/PBS-Blocklösung behandelt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem spezifischen Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligen Waschen in PBS wurde der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper, ebenfalls in Blockmedium verdünnt, für eine Stunde bei Raumtemperatur

in einer Dunkelkammer aufgetragen. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Zellkernfärbung durch eine zehnmünütige Inkubation mit 4',6-Diamino-2-Phenylindol (DAPI). Es schloss sich eine letzte Waschung der Schnitte in PBS und das Eindecken mit Immu-Mount an.

Tabelle 25: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung *in vitro*

Primärantikörper			zugehöriger Sekundärantikörper		
Antigen	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
αSMA	Maus	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
pSmad2	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Fluor®488	1:400
pSmad3	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Fluor®488	1:400
Relaxin-Rezeptor 1	Kaninchen	1:50	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin-Rezeptor 2	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin -Rezeptor 3	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin 1	Ratte	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin 2	Kaninchen	1:500	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
Relaxin 3	Maus	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
MMP 2 (2C1)	Maus	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400
MMP 9 (E-11)	Maus	1:100	Esel	Alexa Fluor®555	1:400

3.5.6 Histologische Auswertungen

Die histologischen Bildaufnahmen der PAS- und MTS-Gewebsschnitte wurden am Lichtmikroskop Olympus BX43 unter Verwendung der cellSense Dimension 1.6 Software erstellt. Die zufällig ausgewählten Gesichtsschnitte wurden an 10 unterschiedlichen Bereichen am Übergang zwischen renalem Kortex und Medulla mit einer 200-fachen Vergrößerung abfotografiert. Die morphometrische Analyse der MTS-Gewebsschnitte fand im Hinblick auf ihren prozentualen Fibrosegrad statt. Dies erfolgte durch die Verwendung eines Folienrasters mit 638 x 10mm² Quadraten bei 400-facher Vergrößerung. Als positive Quadrate wurden charakteristisch blau gefärbte Kollagenfasern des tubulointerstitiellen Nierengewebes determiniert. Weitere blau gefärbte Areale, wie die Glomeruli oder die Adventitia von Gefäßen wurden für die Analysen außer Acht gelassen. Der prozentuale Anteil an fibrotisch veränderten, positiven Quadraten ergab sich aus dem Mittelwert, dividiert durch die Gesamtanzahl vorhandener Folienrasterquadrate. Die Auswertung der Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgte am Mikroskop Axiovert S100TV mittels der Fluoreszenzkamera Olympus XM10 bei 400-facher

Vergrößerung. Pro zufällig ausgewählten Gewebeschnitt wurden 10 Gesichtsfelder am Übergang von renalem Kortex und Medulla, unter Verwendung der cell[^]D Software, analysiert. Mit Hilfe eines Folienrasters mit 638 x 10mm² Quadraten, konnte der prozentuale Anteil der Antigen-positiven Quadrate ermittelt werden. Die Anzahl der positiven Quadrate wurde quantifiziert, der Mittelwert durch die Gesamtanzahl der Folienrasterquadrate (638) dividiert und multipliziert mit dem Faktor 100. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenz-Färbungen wurden durch Herrn Dr. med. Björn Tampe am Konfokalmikroskop erstellt.

3.5.7 Statistische Analysen

Die Ergebnisse wurden nach mindestens dreimaliger Durchführung der Experimente als Mittelwert mit Standardabweichung und Signifikanzniveau angegeben, welches bei paarweisen Vergleichen mittels studentischen t-Tests und multiplen Vergleichen mittels ANOVA und Bonferroni-Abgleich ermittelt wurde. Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 definiert. Ein $p < 0,05$ wurde mit *, $p < 0,01$ mit **, $p < 0,001$ mit *** und $p < 0,0001$ mit **** in den einzelnen Graphen gekennzeichnet, welche mit dem Programm GraphPad Prism 6 erstellt wurden.

4. Ergebnisse

4.1 Versuche im Mausmodell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO)

4.1.1 Expression von Relaxin-1 in der murinen Niere

Renale Fibrogenese führt im UUO-Mausmodell zu einer Reduktion von Relaxin-1. Die quantitative Veränderung der Relaxin-1-Expression in der UUO-Niere nach 10 Tagen Obstruktion wurde mittels qRT-PCR und Western-Blot-Analysen untersucht. Die qRT-PCR zeigt die verminderte Expression von Relaxin-1 im murinen Gewebe (**Abbildung 9A**). Der Relaxin-Verlust konnte ebenfalls auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigt werden (**Abbildung 9B,C**). Beide Methoden zeigten eine signifikante Reduktion der Expression von Relaxin-1 im fibrotisch veränderten Nierengewebe.

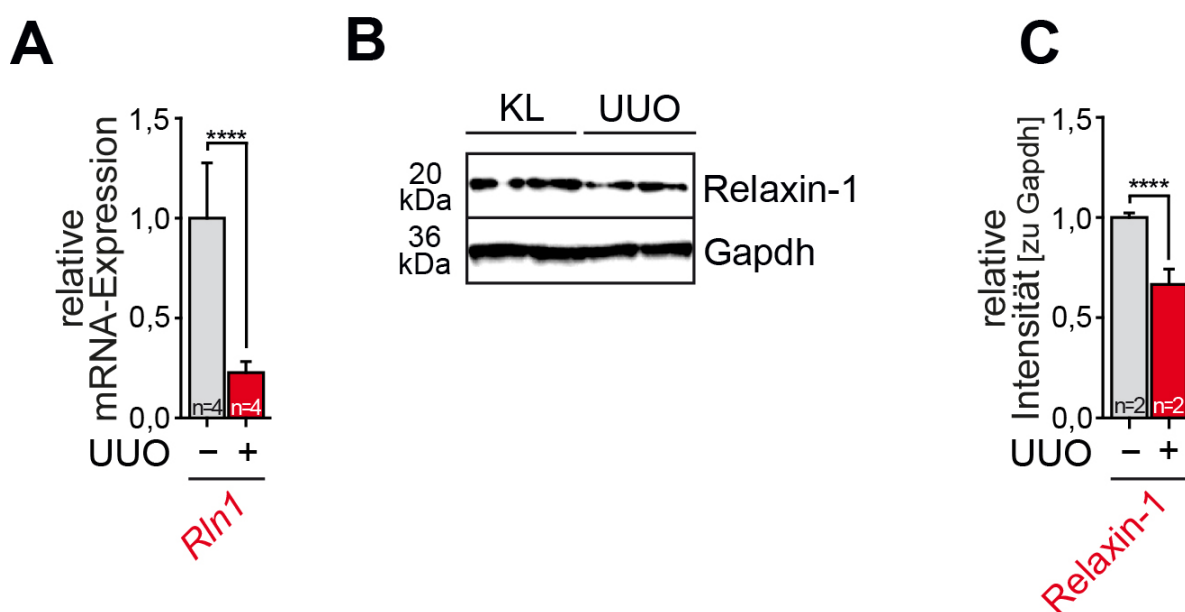


Abbildung 9: Expression von Relaxin-1. (A) Die mRNA-Expression von *Rln1* wurde mittels qRT-PCR in Nierenlysaten analysiert (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, der Graph zeigt Mittelwerte±Standardabweichungen, **** p<0,0001). (B,C) Intrarenale Proteinlevels von Relaxin-1 wurden mittels Western Blot analysiert, die relative Bandenintensität wurde zu Gapdh normalisiert. Zur statistischen Analyse wurde die absolut optometrisch quantifizierbare Expression von Kontrollnieren arbiträr auf den Wert eins festgelegt. (n von biologischen Replikaten wie angegeben, der Graph zeigt Mittelwerte±Standardabweichungen, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte in Relation zur Kontrollnieren mit Kontrollpuffer-behandelter Mäuse).

4.2 Lokalisation und Expression der Relaxin-Rezeptoren-1 und -2 (*Rxfp1* und *Rxfp2*) in der murinen Niere

4.2.1 Erhöhte Expression in der UUO-Niere

Die quantitative Veränderung der *Rxfp1* und *Rxfp2*-Expression in der murinen Niere 10 Tage nach Obstruktion wurde mittels qRT-PCR, Western-Blot-Analysen und Doppelimmunfluoreszenz bestimmt. Auf mRNA-Ebene kam es zu einer signifikanten Zunahme der Expression von *Rxfp1* und *Rxfp2* (**Abbildung 10A**). Dieses Ergebnis konnte im Western Blot auf Proteinebene bestätigt werden

(Abbildung 10B,C). Alle Verfahren zeigten eine deutlich erhöhte Expression von *Rxfp1* und *Rxfp2* in der UUO-Niere im Vergleich zur kontralateralen Kontrollniere (KL).

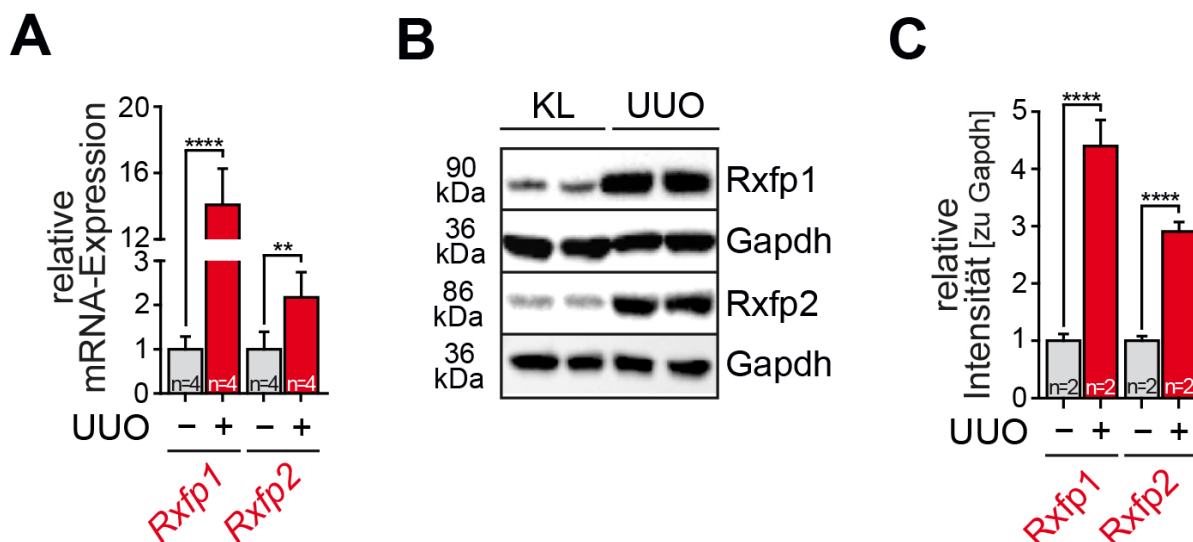


Abbildung 10: Expression der Relaxin-Rezeptoren-1 und -2. (A) Die mRNA-Expression von *Rxfp1* und *Rxfp2* wurde mittels qRT-PCR in Nierenlysaten analysiert (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, der Graph zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichungen, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). (B,C) Intrarenale Proteinlevels von *Rxfp1* und *Rxfp2* wurden mittels Western Blot analysiert, die relative Bandenintensität wurde zu Gapdh normalisiert (n von biologischen Replikaten wie angegeben, der Graph zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichungen, **** $p < 0,0001$; Kalkulation der p-Werte in Relation zur Kontrollniere mit PBS-behandelter Mäuse).

Die Lokalisation der Relaxin-Rezeptoren *Rxfp1* und *Rxfp2* in der murinen Kontrollniere (KL) bzw. obstruktiven Niere (UUO) an Tag 10 wurde mit Hilfe einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung untersucht. Wie den folgenden Abbildungen zu entnehmen ist, sind die Rezeptoren *Rxfp1* und *Rxfp2* insbesondere in interstitiellen Fibroblasten lokalisiert (Abbildung 11). In Tubulusepithelzellen konnte hingegen keine Expression festgestellt werden.

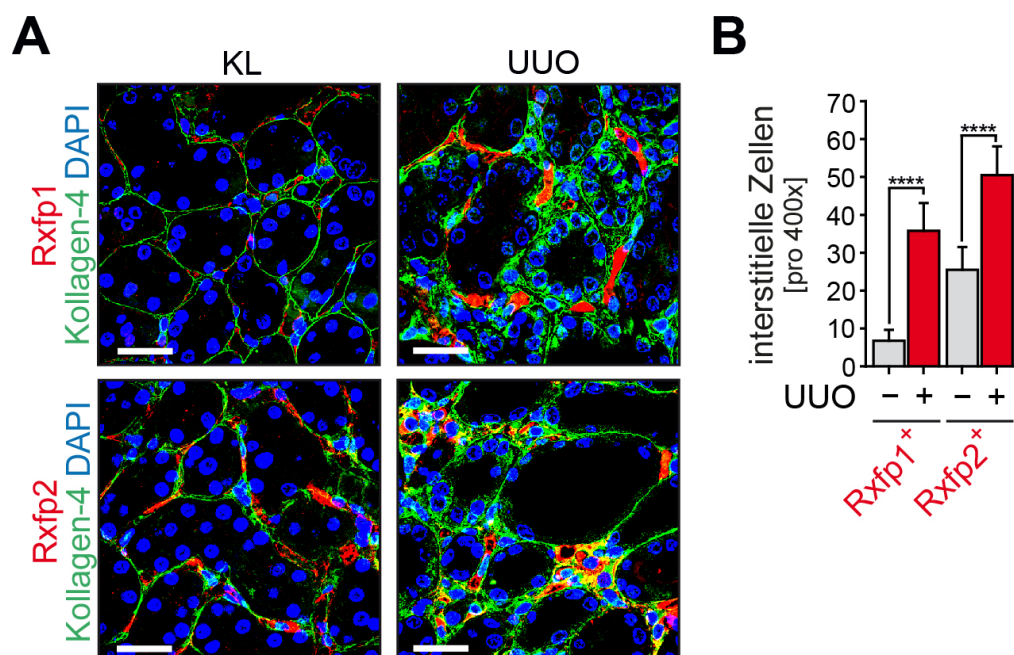


Abbildung 11: Lokalisation von Relaxin-Rezeptoren-1 und -2 in der Kontroll- sowie fibrotisch veränderten Niere. (A) Repräsentative Mikrofotographie von immunfluoreszenzmarkierten Gewebeschnitten gegen *Rxfp1* und *Rxfp2*. Die Bildausschnitte zeigen Kontrollnieren und UUO-Präparate (Messbalken 25 µm). (B) Anzahl interstitieller Zellen positiv auf die Marker *Rxfp1* und *Rxfp2* (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n=4 in jeder Gruppe, der Graph zeigt Mittelwerte±Standardabweichungen, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte in Relation zur Kontrollniere mit PBS-behandelter Mäuse).

4.3 Dosisabhängiger Einfluss von RLX030 auf renale Myofibroblasten-Akkumulation nach UUO an Tag drei, sieben und zehn

Die antifibrotischen Eigenschaften von RLX030 konnten histologisch durch Periodic acid-Schiff (PAS), Masson Trichrom (MTS) sowie durch quantitative Veränderungen der mesenchymalen Fibrosemarker *alpha-smooth muscle actin* (α -SMA) und Kollagen-1 mittels Immunfluoreszenz in *C57BL/6J*-Mäusen nach UUO detektiert werden. In den Kontrollen kam es zu einer deutlichen Zunahme an Kollagenablagerungen im interstitiellen Kompartiment (**Abbildung 12A,B**). Die MTS-Färbung zeigte im Vergleich zwischen den behandelten und Kontrolltieren signifikante Differenzen. Diese Ablagerungen waren bei den mit RLX030 behandelten Mäusen deutlich geringer erkennbar. Innerhalb der behandelten Gruppen zeigten die Mäuse, welche mit 500 µg/kg und 200 µg/kg Körpergewicht (KG) RLX030 behandelt wurden, eine deutlich geringere Kollagenablagerung, verglichen mit den niedrig dosierten Mäusen (50 µg/kg KG) (**Abbildung 12A,B**). In der Immunfluoreszenz zeigte sich bestätigend eine dosisabhängig verminderte Expression von interstitiellem Kollagen-1 sowie α -SMA nach Behandlung mit 500 µg/kg, 200 µg/kg und 50 µg/kg KG. Die mit 500 µg/kg und 200 µg/kg KG behandelte RLX030-Kohorte zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant geringeren Flächenanteil an interstitiellem Kollagen-1 sowie α -SMA (**Abbildung 12C,D**).

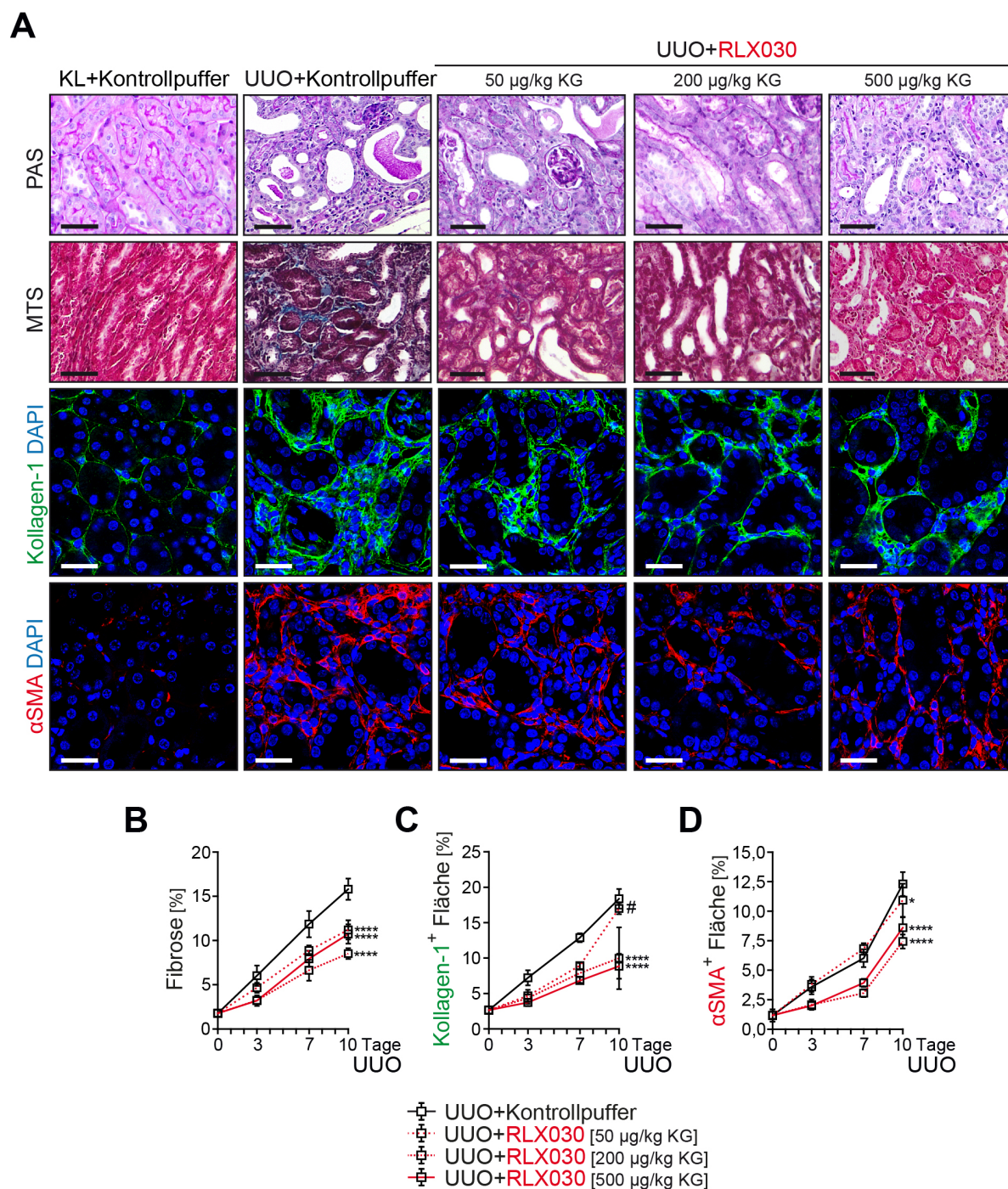


Abbildung 12: Inhibition der experimentellen renalen Fibrogenese durch RLX030 im histopathologischen Korrelat der UUO-Niere. (A) Repräsentative Mikrofotografie von Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) und Masson-Trichrom (MTS) gefärbten Nierenpräparaten (Messbalken 50 µm) sowie von immunfluoreszenzmarkierten Gewebsschnitten gegen Kollagen-1 und α-SMA (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen Kontrollnieren sowie fibrotisch veränderte UUO-Nieren von Kontrollpuffer-behandelten und RLX030-behandelten Mäusen mit drei unterschiedlichen Konzentrationen zehn Tage nach unilateraler Ureterobstruktion. (B-D) Morphometrische Quantifizierung der interstitiellen Fläche, positiv für Fibrose, Kollagen-1 und α-SMA im zeitlichen Verlauf. (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 200x bzw. 400x Vergrößerung, n=6 in jeder Gruppe, die Graphen zeigen Mittelwerte± Standardabweichungen, * p<0,05, **** p<0,0001, # keine Signifikanz).

4.3.1 Geschlechtsunspezifische Wirkung von RLX030

Die Applikation von RLX030 (500 µg/kg KG) attenuierte unabhängig vom Geschlecht die Akkumulation von interstitiellen Kollagen-1 und α-SMA im UUO-Mausmodell (**Abbildung 13**).

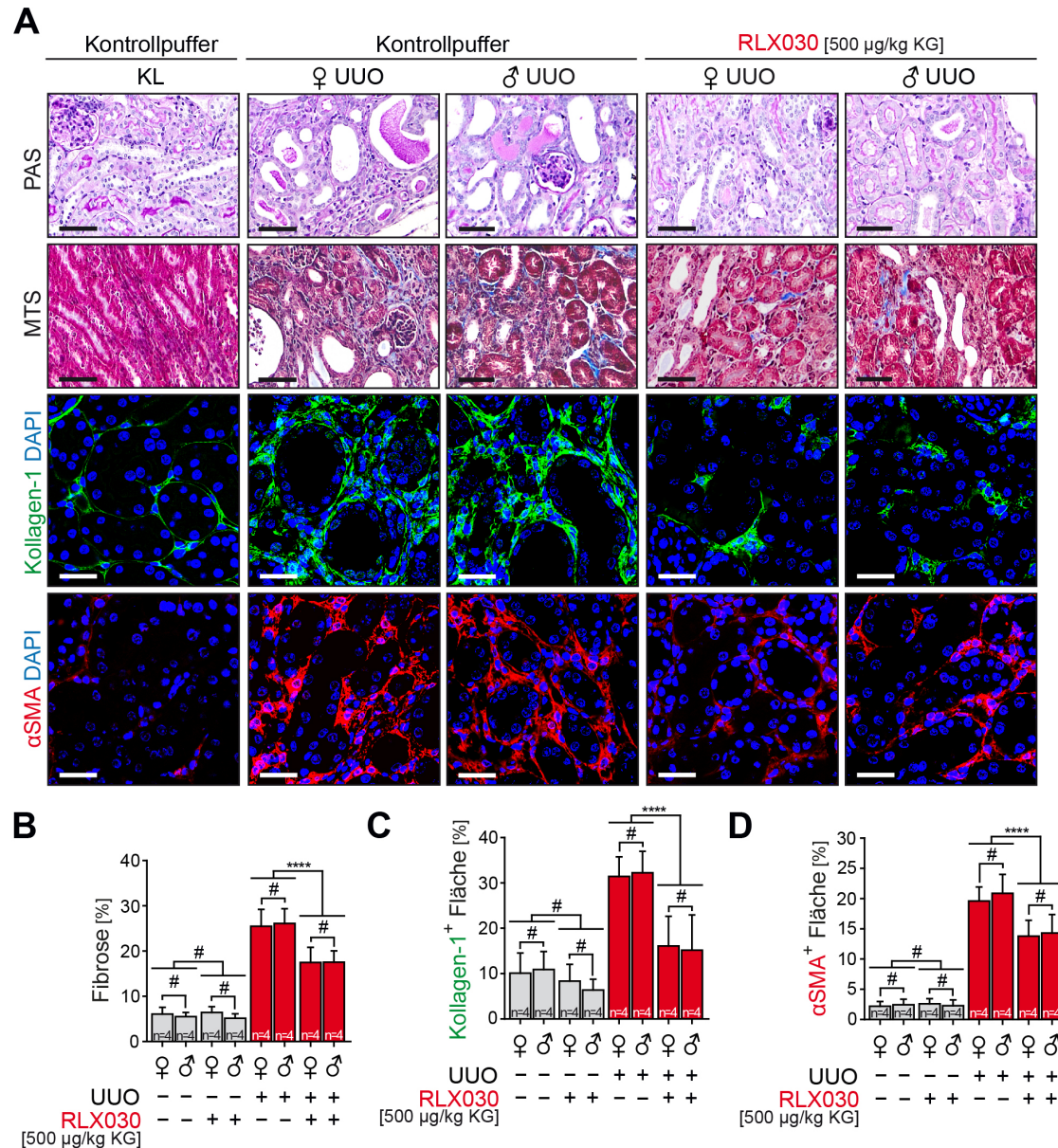


Abbildung 13: Geschlechtsunspezifische Wirkung von RLX030. (A) Repräsentative Mikrofotografie von PAS- und MTS-gefärbten weiblichen und männlichen Nierenpräparaten (Messbalken 50 µm) sowie von immunfluoreszenzmarkierten Gewebsschnitten gegen Kollagen-1 und α-SMA (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen Kontrollnieren sowie fibrotisch veränderte UUO-Nieren von Kontrollpuffer-behandelten und RLX030-behandelten Mäusen. (B) Morphometrische Quantifizierung der interstitiellen Fibrose in MTS-gefärbten Gewebsschnitten. (C-D) Morphometrische Quantifizierung der Kollagen-1- und α-SMA-Expression zur Beurteilung der Fibroblasten-Akkumulation in Nierenpräparaten. (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 200x bzw. 400x Vergrößerung, n in biologischen Replikaten wie angegeben, die Graphen zeigen Mittelwerte± Standardabweichungen, **** p<0,0001, # keine Signifikanz).

4.4 Bestätigung der Ergebnisse in einem zweiten unabhängigen Maus-Modell

Die antifibrotische Wirkung von RLX030 (200 µg/kg KG) konnte ebenfalls in einem zweiten, unabhängigen Maus-Modell der Folsäure-Nephropathie (FAN) und anderem genetischen Hintergrund (*FVB/N*) nachgewiesen werden. Die initiale tubulotoxische Injektion (250 µg/g KG) der Folsäure führt zu einer akuten Niereninsuffizienz und im Anschluss zur renalen Fibrosierung und ist durch eine langsamere Krankheitsprogression charakterisiert. Histologisch zeigte sich eine dosisabhängig verminderte Akkumulation von interstitieller Fibrose, Kollagen-1 sowie α -SMA nach Behandlung mit 200 µg/kg KG RLX030 (**Abbildung 14**). Aus vorangegangenen Experimenten zur Dosisfindung zeigten beide RLX030 Konzentrationen (200 µg/kg KG und 500 µg/kg KG) äquivalente Ergebnisse im Hinblick auf die Inhibition renaler interstitieller Fibrose. Aus diesem Grund wurde für dieses Modell die niedrigere Medikamentenkonzentration von 200 µg/kg KG gewählt.

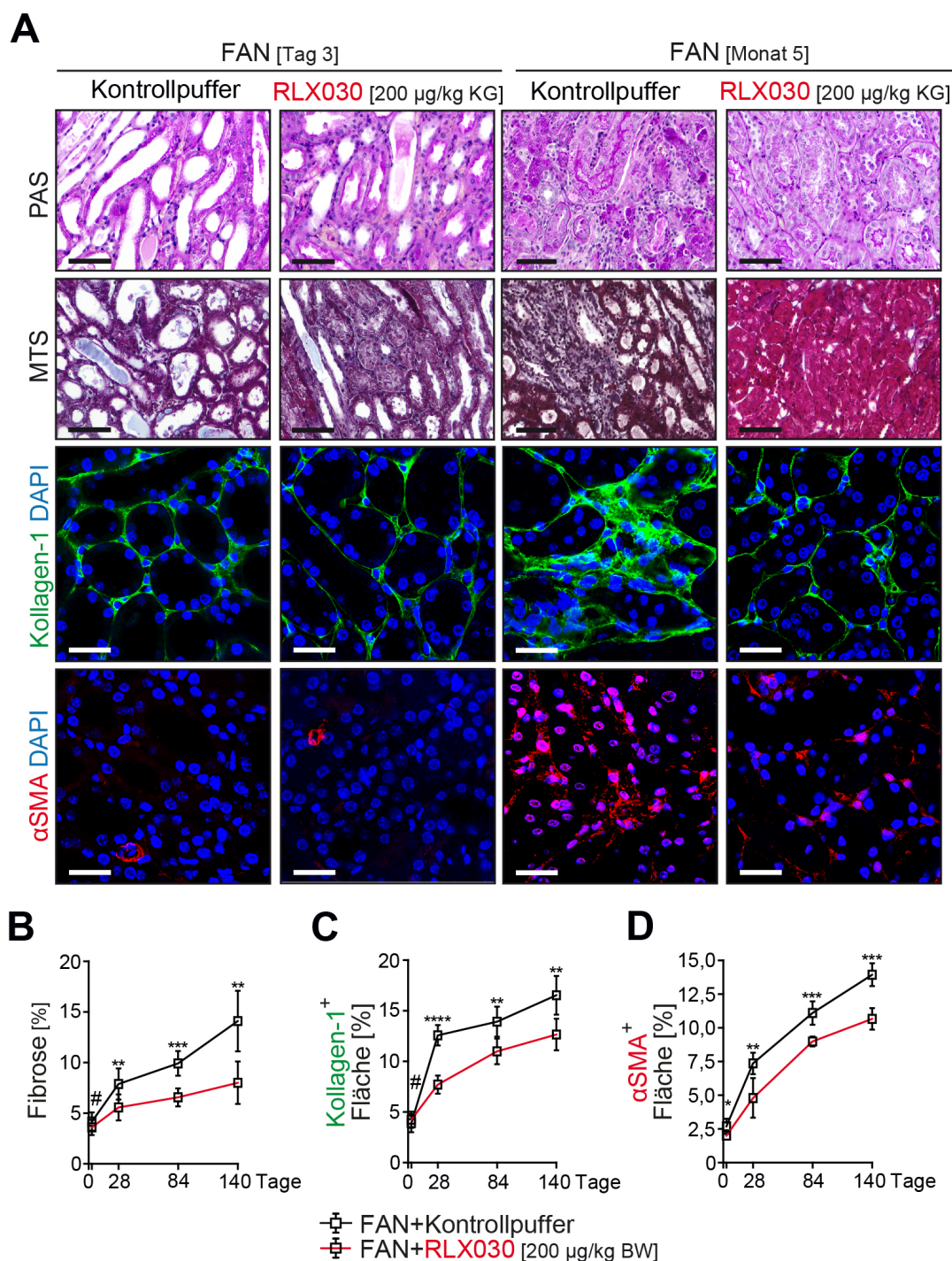


Abbildung 14: Antifibrotische Wirkung von RLX030 im Maus-Modell der Folsäure-Nephropathie. (A) Repräsentative Mikrofotographie von PAS- und MTS-gefärbten renalen Gewebspräparaten (Messbalken 50 µm) sowie von immunfluoreszenzmarkierten Nierenpräparaten gegen Kollagen-1 und α-SMA (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen Folsäure-induzierte Nierenschäden von mit Kontrollpuffer- und RLX030-behandelten Mäusen zu zwei Zeitpunkten. **(B-D)** Morphometrische Quantifizierung der interstitiellen Flächen positiv für Fibrose, Kollagen-1 und α-SMA im zeitlichen Verlauf. (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 200x bzw. 400x Vergrößerung, n=5 in jeder Gruppe, die Graphen zeigen Mittelwerte±Standardabweichungen, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, # keine Signifikanz; Kalkulation der p-Werte in Relation zu Kontrollpuffer-behandelter Mäuse).

4.5 Wirkung von RLX030 auf die TGF- β 1- Signalkaskade

4.5.1 Inhibition des Smad2-Signalwegs

Der antagonisierende Effekt von RLX030 auf die TGF- β 1-induzierte Phosphorylierung von Smad2 (pSmad2) wurde mittels histologischer Analysen verglichen. Die unbehandelte UUO-Niere wies gegenüber der KL-Niere eine Induktion der Expression von pSmad2 auf (**Abbildung 15**). Dieser Effekt konnte durch eine Behandlung mit 500 μ g/kg, 200 μ g/kg und 50 μ g/kg KG RLX030 dosisabhängig und signifikant reduziert werden (**Abbildung 15**).

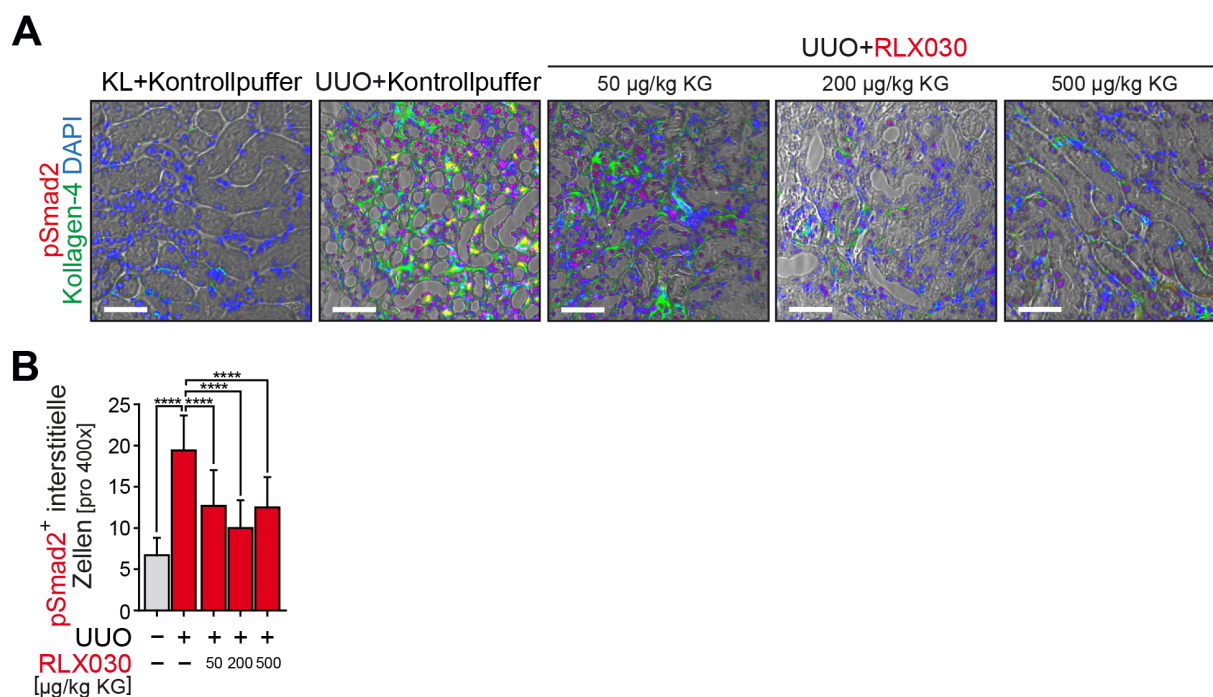


Abbildung 15: Inhibition des pSmad2-Signalwegs im murinen Gewebe. (A) Repräsentative Mikrofotographie von immunfluoreszenz mit primären Antikörpern gegen pSmad2 und Kollagen-4 markierten Nierenpräparaten (Messbalken 50 μ m). Die Bildausschnitte zeigen Kontroll- und UUO-Nieren mit von Kontrollpuffer- und RLX030-behandelten Mäusen zehn Tage nach Operation. (B) Morphometrische Quantifizierung interstitieller Zellen positiv für pSmad2 (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n=4 in jeder Gruppe, der Graph zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichungen, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte in Relation zur Kontrollniere bzw. zur UUO-Niere Kontrollpuffer-behandelter Mäuse).

Diese Effekte konnten in Primärkulturen muriner Fibroblasten bestätigt werden. Der Einfluss von RLX030 auf die TGF- β 1-induzierte Induktion der Smad2-Signalkaskade und konsekutiver Fibroblastenaktivierung wurde nach Stimulation von murinen Fibroblastenkulturen mit TGF- β 1 (10 ng/mL) allein oder in Kombination mit RLX030 in unterschiedlichen Dosierungen untersucht. Die Supplementation des Kulturmediums mit RLX030 reduzierte dosisabhängig die TGF- β 1-induzierte Akkumulation von pSmad2 (**Abbildung 16**).

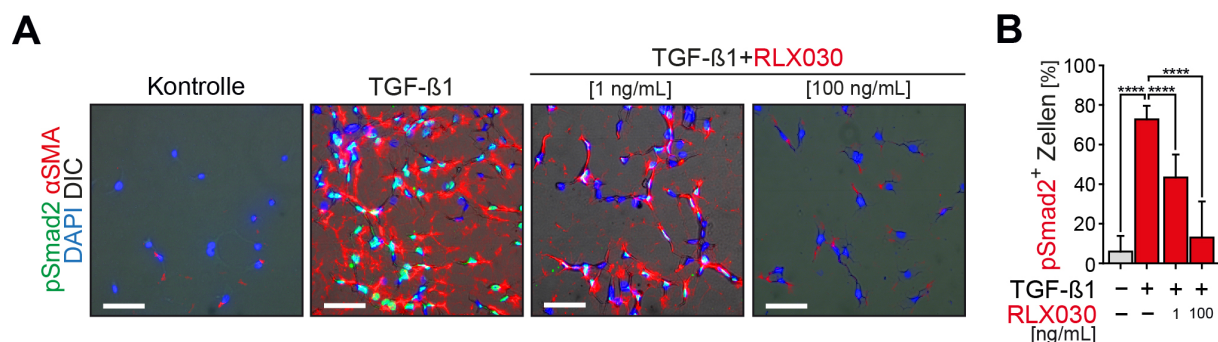


Abbildung 16: Inhibition des pSmad-Signalwegs in Primärkulturen muriner Fibroblasten. (A) Repräsentative Mikrophotographie von immunfluoreszenzmarkierten murinen Fibroblasten mit primären Antikörpern gegen pSmad2 und α -SMA (Messbalken 50 μ m). Die Bildausschnitte zeigen als Kontrolle mit PBS-behandelte Fibroblasten im Vergleich zu TGF- β 1- und TGF- β 1 mit RLX030-behandelte Fibroblasten in zwei Konzentrationen. (B) Morphometrische Quantifizierung der Zellen positiv für pSmad2 (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro 4-Well-Chamber Slide bei 400x Vergrößerung, der Graph zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichungen, **** $p < 0,0001$; Kalkulation der p-Werte in Relation zur PBS-behandelten Kontrolle bzw. zu TGF- β 1-behandelten Fibroblasten).

Diese Hemmung TGF- β 1-induzierter pSmad-Akkumulation korrelierte mit Inhibition der Fibroblastenproliferation **Abbildung 17 A/B**, sowie mRNA-Expression von Collagen-1a1 (*Col1a1*) und α -SMA (*Acta2*) **Abbildung 17 C/D**.

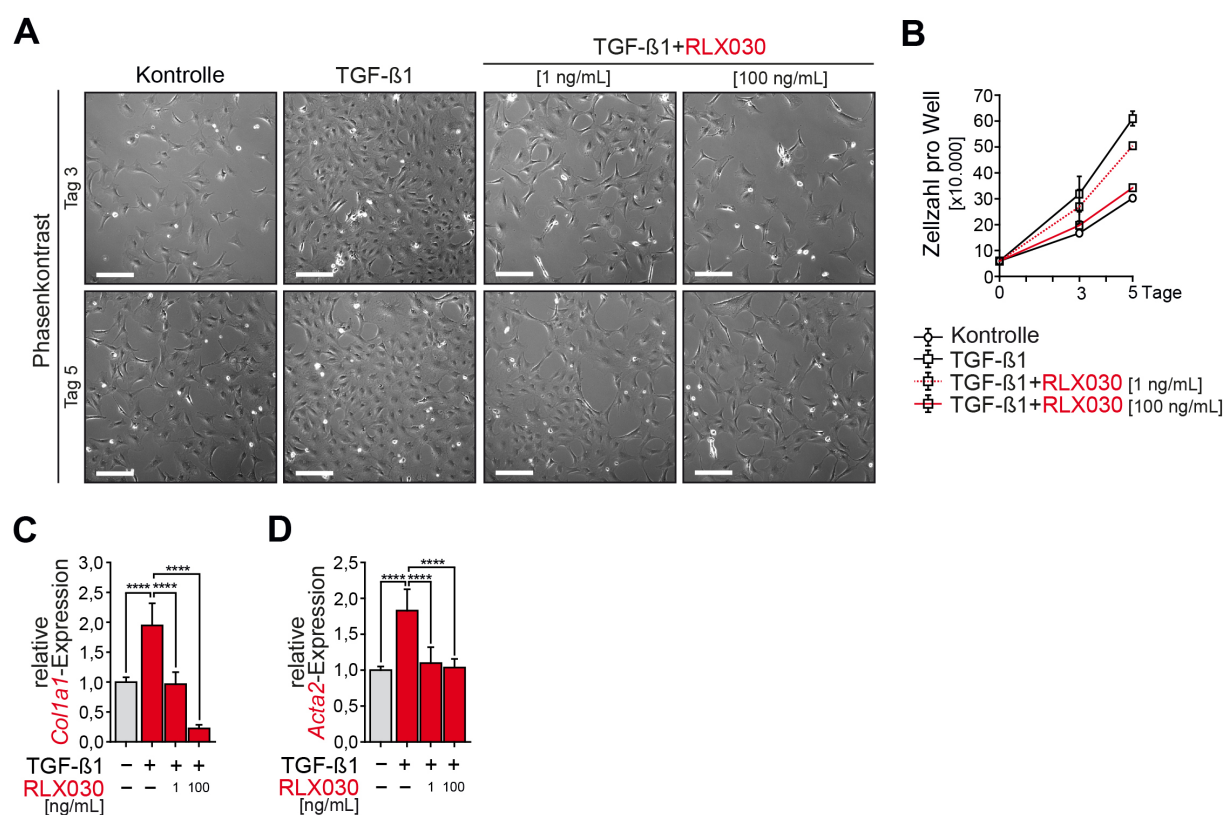


Abbildung 17: RLX030 Wirkung auf murine Fibroblastenproliferation. (A) Repräsentative Phasenkontrastbilder von kultivierten Primärkulturen renaler Fibroblasten aus Mäusen nach Stimulation mit TGF- β 1 und angezeigten Konzentrationen von RLX030 (Messbalken 50 μ m). (B) Morphometrische Bestimmung der Zellproliferation. (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Well bei 400x Vergrößerung, der Graph

zeigt Mittelwerte±Standardabweichungen). (C,D) Die mRNA-Expression von *Col1a1* und *Acta2* wurde mittels qRT-PCR bestimmt (Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen Mittelwerte±Standardabweichungen, **** $p < 0,0001$; Kalkulation der p-Werte in Relation zur PBS-behandelten Kontrolle bzw. zu TGF- β 1-behandelten Fibroblasten).

4.6 Regulation der Matrixmetalloproteinasen-2, -3 und -9

Die antifibrotischen Effekte von RLX030 äußern sich zudem bei der Stimulation von Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Auf mRNA-Ebene konnten diese mittels qRT-PCR bestimmt werden. Kohorten, welche mit 500 μ g/kg KG RLX030 behandelt wurden zeigten an Tag 10 nach Obstruktion eine signifikante Induktion insbesondere von *Mmp2* und *Mmp9* im Vergleich zur UUU-Kontrollgruppe (Abbildung 18).

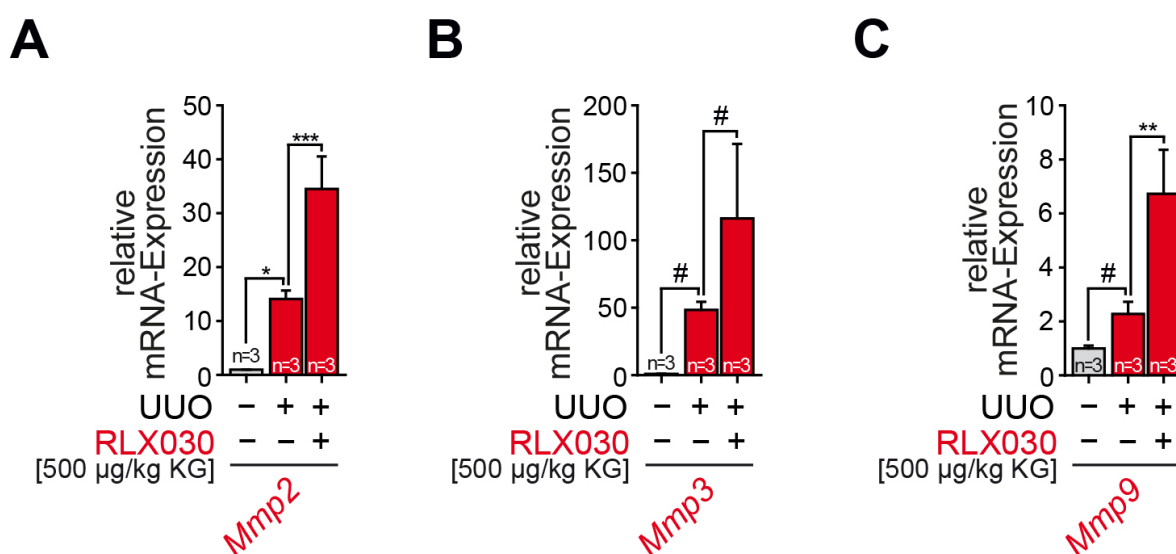


Abbildung 18: Regulation der Matrixmetalloproteinasen-2, -3 und -9. (A-C) Die intrarenale mRNA-Expression der Matrixmetalloproteinasen *Mmp2*, *Mmp3* und *Mmp9* aus murinen Nierenpräparaten zehn Tage nach UUU wurde mittels qRT-PCR bestimmt (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen Mittelwerte±Standardabweichungen, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, # keine Signifikanz; Kalkulation der p-Werte in Relation zur Kontrollniere bzw. zur UUU-Niere Kontrollpuffer-behandelter Mäuse).

Dies wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bestätigt, die Applikation von 500 μ g/kg KG RLX030 induzierte die Matrixmetalloproteinasen *Mmp2* und *Mmp9* insbesondere im interstitiellen Kompartiment (Abbildung 19).

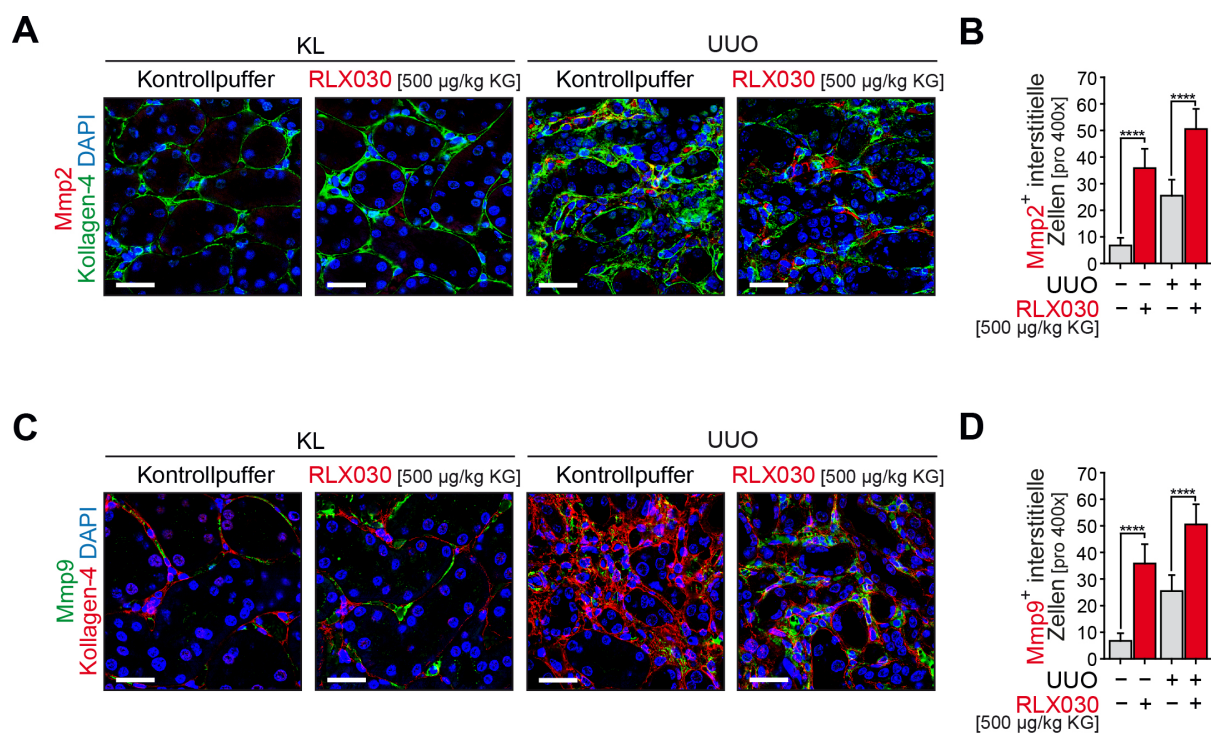


Abbildung 19: Expression von Matrixmetalloproteinasen-2 und -9 in der Immunfluoreszenzfärbung von murinen Nierenpräparaten. (A +C) Repräsentative Mikrofotographie von renalen Gewebsschnitten nach Immunfluoreszenzmarkierung gegen Mmp2 und Mmp9 (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen gesunde Kontroll- sowie fibrotische UUO-Nieren von Kontrollpuffer- und RLX030-behandelten Mäusen zehn Tage nach UUO. **(B+D)** Morphometrische Quantifizierung interstitieller Zellen positiv für Mmp2 und Mmp9 (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n= 4 in jeder Gruppe, die Graphen zeigen Mittelwerte±Standardabweichungen, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte in Relation zur Kontrollniere bzw. zur UUO-Niere Kontrollpuffer-behandelter Mäuse).

4.7 Rescue-Experiment

MMPs besitzen eine essentielle Funktion bei der Degradation von Extrazellulärer Matrix (ECM). Neben der Induktion von Matrixmetalloproteinasen im Interstitium konnte gleichzeitig eine Reduktion von interstitieller Kollagen-1 sowie α -SMA-Akkumulation identifiziert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen entstand die Hypothese, dass RLX030 (500 μ g/kg KG) auch noch nach einer verzögerten Applikation zu einer Inhibition interstitieller Fibrose führen kann.

A

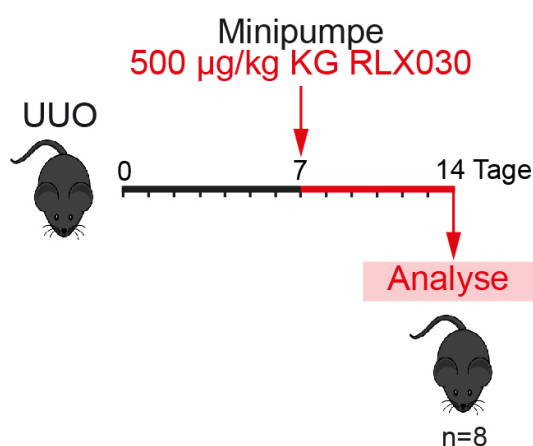
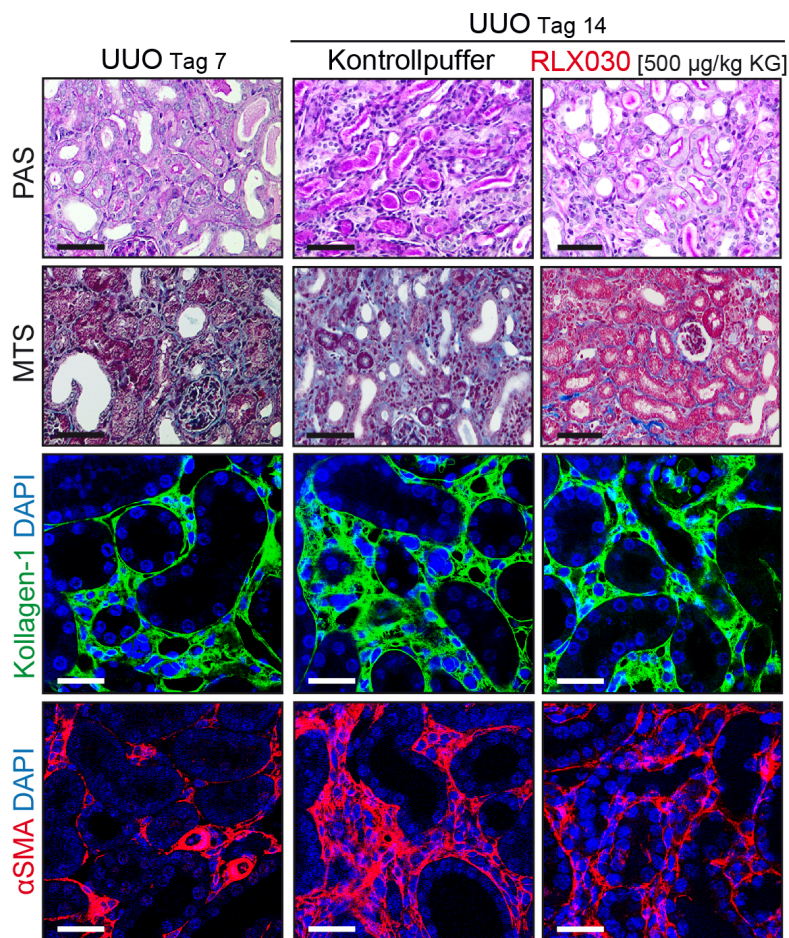


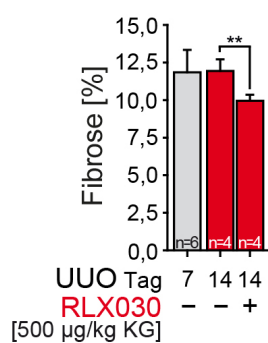
Abbildung 20: Mausmodell der Rescue-Studie über einen Zeitraum von 14 Tagen (A) Unilaterale Ureterobstruktion an Tag 0. Die Implantation der osmotischen Minipumpe gefüllt mit 500 μ g/kg KG RLX030 erfolgte sieben Tage nach UO. Anschließende Sektion der Mäuse nach weiteren sieben Tagen (Tag 14).

Im Rahmen dieses Studiendesigns bekamen die UO-Kohorten erst mit einer Verzögerung von sieben Tagen postoperativ die osmotische Minipumpe mit RLX030 implantiert. Eine Quantifizierung des Fibrosegrads erfolgte ebenfalls mittels histologischer Analysen. Hierbei wies die unbehandelte UO-Kohorte eine ausgeprägte Akkumulation von interstitieller Matrix und α -SMA auf. Im Gegensatz dazu zeigte die mit RLX030 500 μ g/kg KG behandelte Kohorte eine signifikante Reduktion der renalen Fibrosierung (**Abbildung 21**).

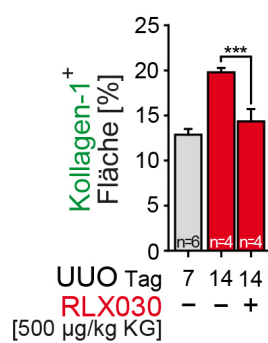
A



B



C



D

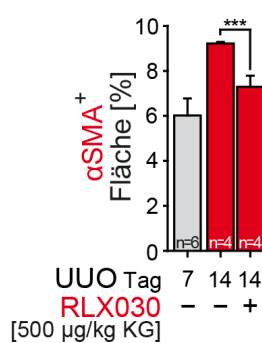


Abbildung 21: RLX030 vermittelt protektive Effekte bei schon etablierter Nierenfibrose. (A) Repräsentative Mikrofotografie PAS- und MTS-gefärbten renalen Gewebspräparaten (Messbalken 50 µm) sowie von immunfluoreszenzmarkierten Nierenpräparaten gegen Kollagen-1 und α-SMA (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen fibrotisch veränderte UUO-Nieren von Kontrollpuffer-behandelten und RLX030-behandelten Mäusen sieben sowie 14 Tage nach unilateraler Ureterobstruktion. (B-D) Morphometrische Quantifizierung interstitieller Flächen positiv für Fibrose, Kollagen-1 und α-SMA. (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 200x bzw. 400x Vergrößerung, n=6 bzw. n=4 in jeder Gruppe, die Graphen zeigen Mittelwerte±Standardabweichungen, ** p<0,01, *** p<0,001; Kalkulation der p-Werte in Relation zur UUO-Niere Kontrollpuffer-behandelter Mäuse).

4.8 RLX030 ist äquivalent wirksam in humanen Fibroblastenkulturen

Die antifibrotische Wirkung von RLX030 kann ebenfalls im humanen System detektiert werden. In einem äquivalenten Zellkulturversuch führt RLX030 zu einer Inhibition humaner Fibroblastenproliferation. Die Zellkohorte mit der höchsten RLX030 Konzentration (100 ng/ml) zeigt hierbei eine deutlich reduzierte Proliferationsrate im Vergleich zur alleinigen mit TGF- β 1-stimulierten Kultur (**Abbildung 22**).

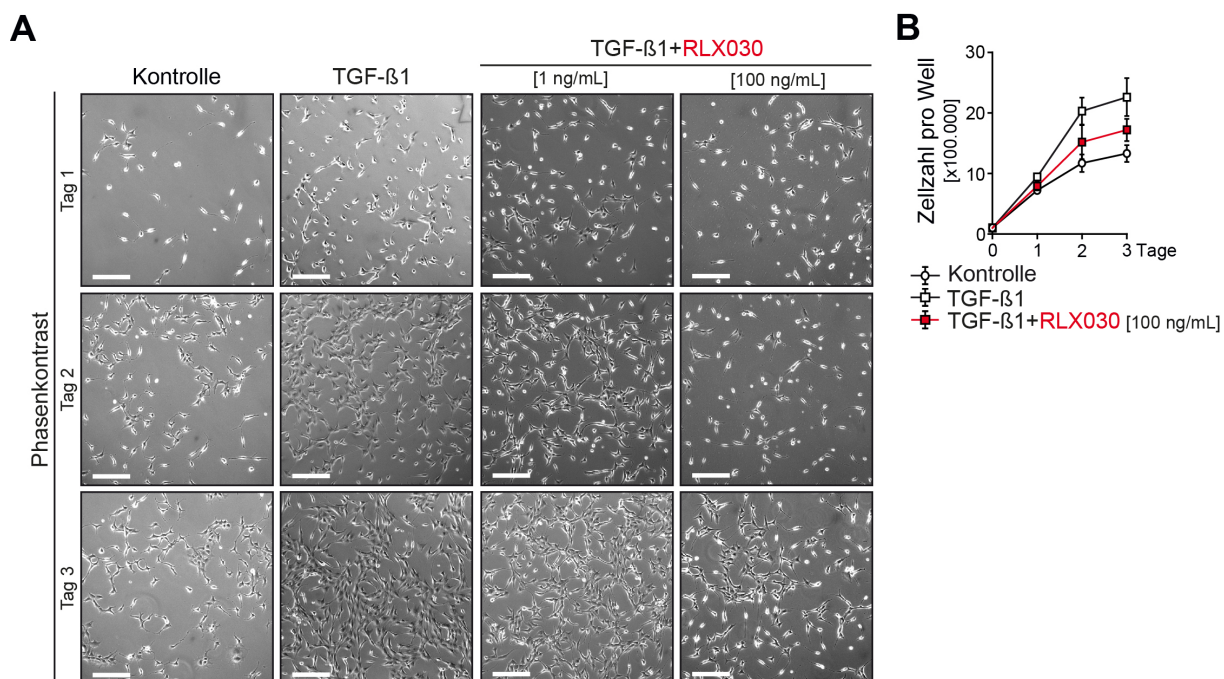


Abbildung 22: Inhibition der humanen Fibroblastenproliferation durch RLX030. (A) Repräsentative Phasenkontrastbilder von kultivierten human Fibroblastenkulturen nach Stimulation mit TGF- β 1 und angezeigten Konzentrationen RLX030 (Messbalken 50 μ m). (B) Morphometrische Bestimmung der Zellproliferation. (Die Bildanalyse erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Well bei 400x Vergrößerung, der Graph zeigt Mittelwerte \pm Standardabweichungen).

4.9 Expression der Relaxin-Isoformen sowie deren Rezeptoren in humanen Nierenbiopsien

Die Reduktion von Relaxin-1 und -2 (*RLN1* und *RLN2*) bei renaler Fibrogenese ist nicht nur in murinen Nieren detektierbar, sondern lässt sich auch in humanen Nierenbiopsien mit unterschiedlichen Grunderkrankungen mittels qRT-PCR untersuchen. Für *RLN1* ist eine Verminderung der Expression vor allem bei der fokal-segmentaler Glomerulosklerose (FSGS), systemischem Lupus Erythematoses (SLE), benigner Sklerose, membranöser Glomerulosklerose (GN), Minimal Change-Nephropathie, C3-vermittelter Glomerulonephritis (GN), IgA-Nephropathie (IgAN) mit FSGS sowie nekrotisierender Glomerulonephritis (GN) festzustellen (**Abbildung 23A**). Bei *RLN2* ist eine deutlich verminderte Expression für folgende Erkrankungen der Niere zu konstatieren: die fokal-segmentale Glomerulosklerose (FSGS), systemischer Lupus Erythematoses (SLE), benigne Sklerose, membranöse Glomerulosklerose (GN), Minimal Change-Nephropathie, C3-vermittelte Glomerulonephritis (GN), IgA-Nephropathie (IgAN) mit FSGS sowie nekrotisierender

Glomerulonephritis (GN, **Abbildung 23B**). Dagegen zeigt sich keine Veränderung von *RLN1* oder *RLN2* im akuten Nierenversagen (AKI, **Abbildung 23**) und bestätigt die Assoziation mit insbesondere chronischen Nierenerkrankungen.

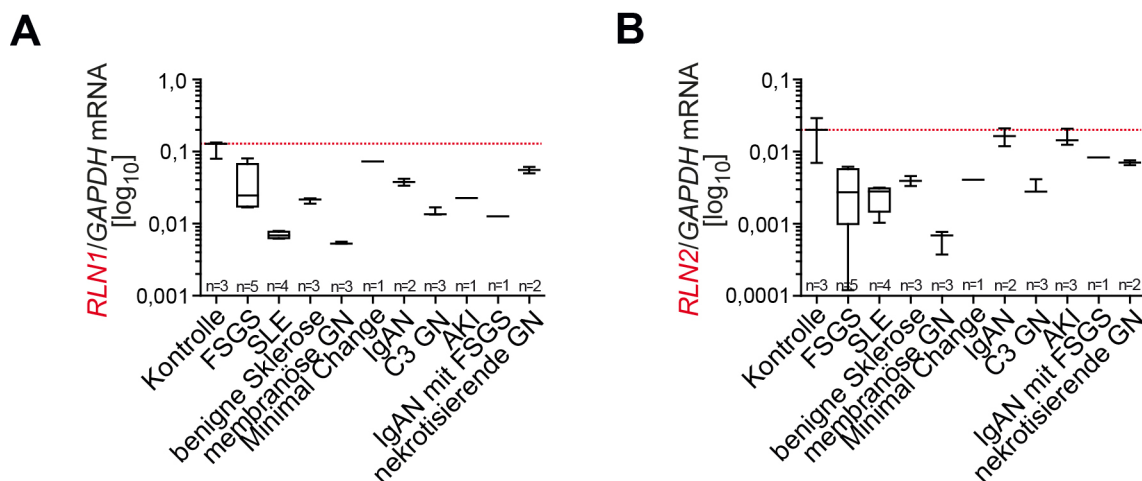


Abbildung 23: Expression der Relaxin-Isoformen in humanen Nierenbiopsien. (A,B) Die intrarenale mRNA-Expression von *RLN1* und *RLN2* relativ zu *GAPDH* wurde mittels qRT-PCR bestimmt (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen \log_{10} -transformierte Mittelwerte \pm Minimum/Maximum).

Weitere Anhaltspunkte hierfür konnten durch die webbasierte Datenbank *NephroSeq* gefunden werden, hier ergibt sich eine robuste Korrelation zwischen Verlust der Nierenfunktion (eGFR-Verlust) und intrarenaler Expression von insbesondere *RLN1* (Ju et al. 2015).

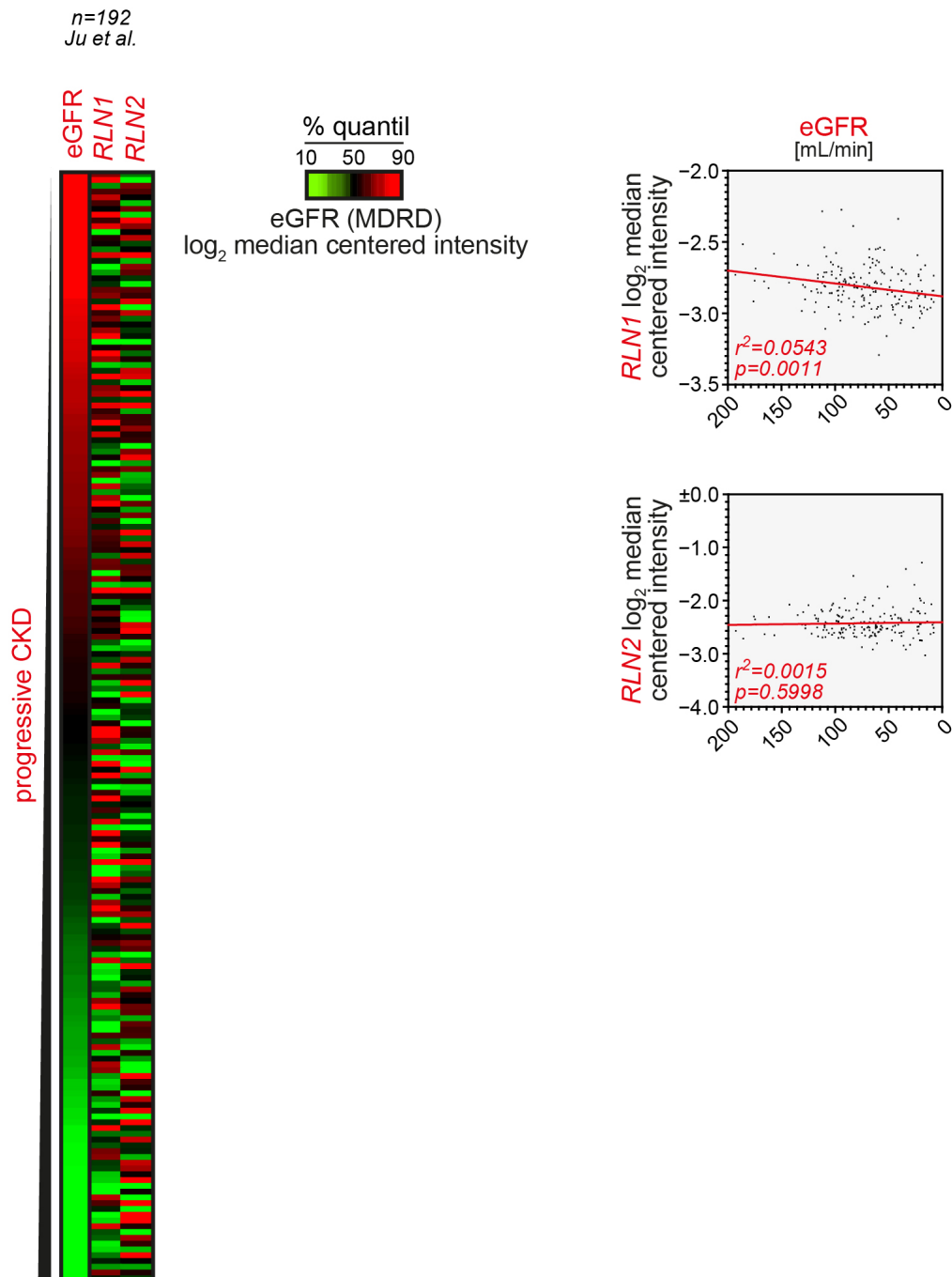


Abbildung 24: Heatmap: *RLN1*- und *RLN2*-Verlust assoziiert mit der Progression chronischer Niereninsuffizienz (CKD). Die Heatmap illustriert durchschnittliche Expressionslevel der Genexpression von *RLN1*- und *RLN2* in Abhängigkeit von der eGFR. Eine Abnahme der eGFR ist mit einem gleichzeitigen Verlust von *RLN1* und *RLN2* assoziiert (modifiziert nach: Ju et al. 2015).

Konsistent mit Beobachtungen in murinen Nieren kommt es in allen analysierten Erkrankungen der Niere zu einer intrarenalen Induktion der Relaxin-Rezeptoren *RXFP1* und *RXFP2* (Abbildung 25).

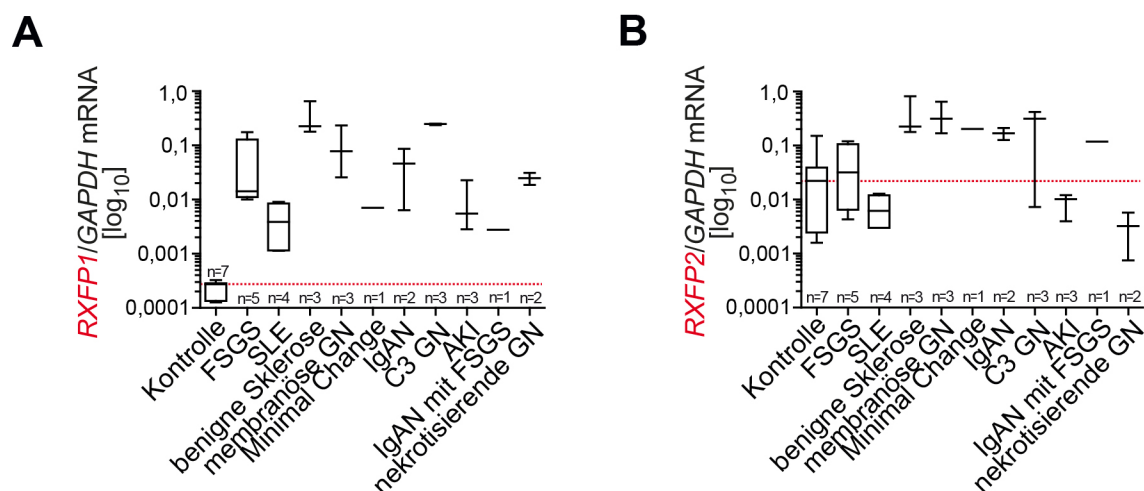


Abbildung 25: Expression der Relaxin-Rezeptoren-1 und -2 in humanen Nierenbiopsien. (A,B) Die intrarenale mRNA-Expression von *RXFP1* und *RXFP2* relativ zu *GAPDH* wurde mittels qRT-PCR bestimmt (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen \log_{10} -transformierte Mittelwerte \pm Minimum/Maximum).

4.10 Aberrante Promotermethylierung als Biomarker für endogenen Relaxin-Verlust

4.10.1 Der Verlust von intrarenalem Relaxin beruht auf aberranter Promotermethylierung

Aberrante Promotermethylierung stellt einen epigenetischen Mechanismus dar, welcher zu einer stabilen Suppression der Genexpression führt. Aufbauend auf Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erfolgte die Analyse aberranter Relaxin-Promotermethylierung mittels MeDIP. Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen *RLN1*-Methylierung (*5mC-RLN1*) und intrarenaler *RLN1*-Expression (**Abbildung 26A**). Ein ähnlicher Zusammenhang konnte für *RLN2* etabliert werden (**Abbildung 26B**), dies ist indikativ für epigenetische Regulationsmechanismen.

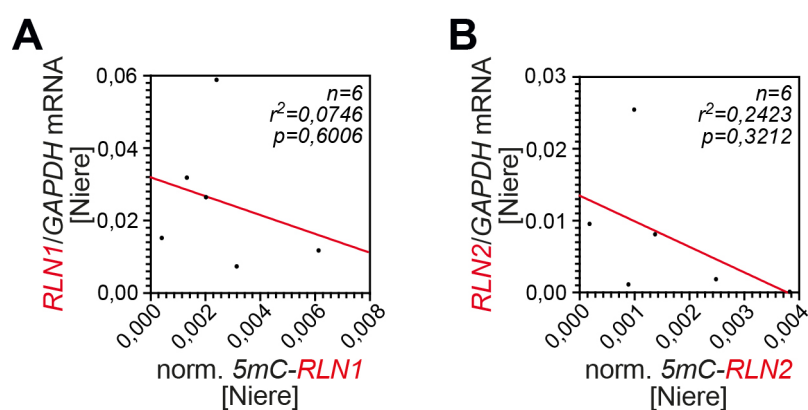


Abbildung 26: Korrelation von intrarenaler *RLN1/RLN2*-Methylierung mit intrarenaler *RLN1/RLN2*-Expression. (A,B) Analyse der intrarenalen *RLN1/RLN2*-Methylierung in Korrelation mit der intrarenalen *RLN1/RLN2*-Expression in fibrotisch veränderten humanen Nierengewebe. (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen mit r^2 und p-Werten).

Da aberrante Promotermethylierung in der Niere auch im Blut detektiert werden kann, erfolgte die Analyse von *5mC-RLN1* und *5mC-RLN2* im Blut in Korrelation mit der Niere. Es konnte eine positive Korrelation etabliert werden (**Abbildung 27**).

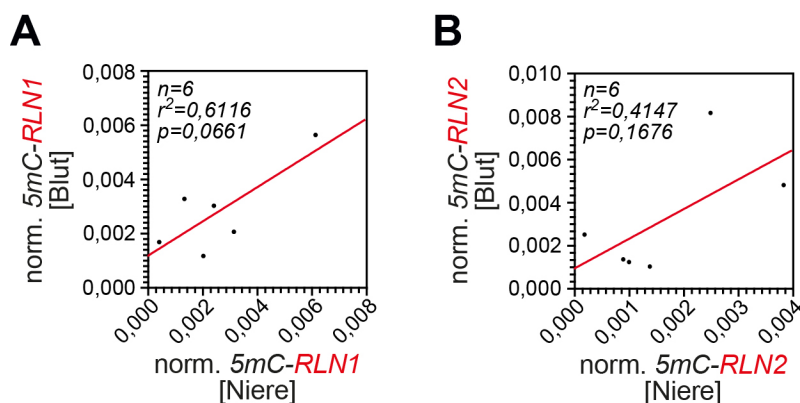


Abbildung 27: Korrelation von intrarenaler *RLN1/RLN2*-Methylierung mit *RLN1/RLN2*-Methylierung im Blut. (A,B) Analyse der intrarenalen *RLN1/RLN2*-Methylierung aus humanem Nierengewebe in Korrelation mit der *RLN1/RLN2*-Methylierung im Blut von entsprechend nierenerkrankten Patienten. (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen mit r^2 und p-Werten).

Im nächsten Schritt wurde die *5mC-RLN1* und *5mC-RLN2* im Blut mit intrarenaler mRNA-Expression von *RLN1* und *RLN2* verglichen. Hier zeigte sich eine inverse Korrelation (**Abbildung 28**), indikativ für einen Nutzen von aberranter *5mC-RLN1* und *5mC-RLN2* im Blut als Biomarker für endogenen Verlust von Relaxin in der Niere.

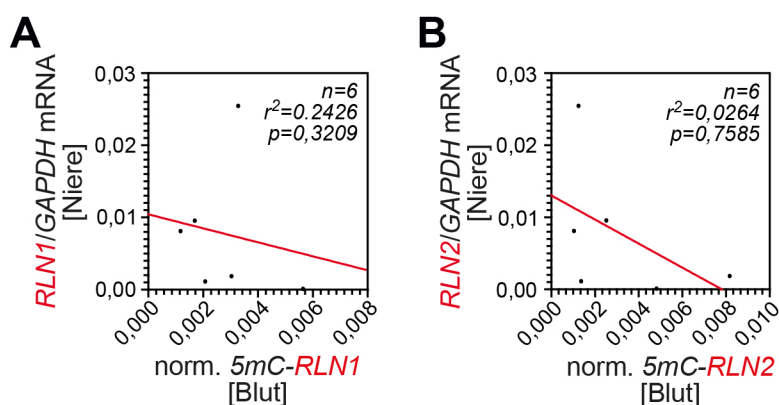


Abbildung 28: Korrelation von *RLN1/RLN2*-Methylierung im Blut mit intrarenaler *RLN1/RLN2*-Expression. (A,B) Analyse der *RLN1/RLN2*-Methylierung im Blut von nierenerkrankten Patienten in Korrelation mit der entsprechenden intrarenalen *RLN1/RLN2*-Expression. (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen mit r^2 und p-Werten).

Eine ähnliche Korrelation ließ sich in nierenkranken UUO-Mäusen etablieren, auch hier waren *Rln1/Rln3*-Methylierung in gleicher Weise in der Niere und korrespondierendem Blut nachweisbar (**Abbildung 29**).

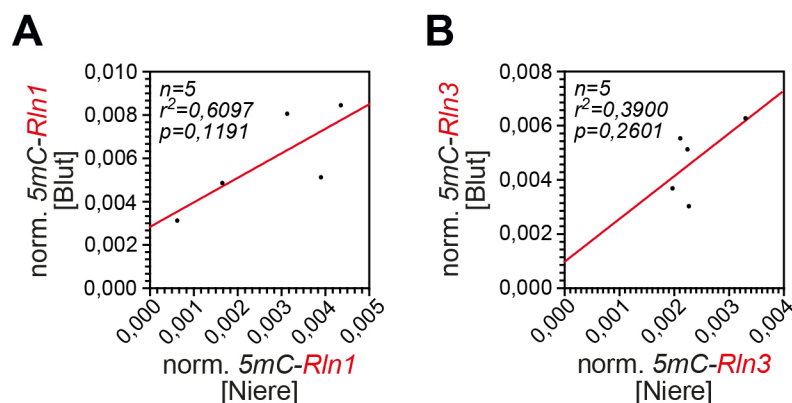


Abbildung 29: Korrelation von intrarenaler *Rln1/Rln3*-Methylierung mit *Rln1/Rln3*-Methylierung im Blut. (A,B) Analyse der intrarenalen *Rln1/Rln3*-Methylierung aus UUO-Nieren von PBS-behandelten Mäusen in Korrelation mit der *Rln1/Rln3*-Methylierung im Blut der Mäuse. (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen mit r^2 und p-Werten).

4.10.2 Aberrante Relaxin-Promotermethylierung akkumuliert in Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

Aufbauend auf einem korrelativen Zusammenhang zwischen intrarenalem Verlust von Relaxin und Akkumulation von Relaxin-Promotermethylierung im Blut erfolgte die Validierung in einer unabhängigen Kohorte aus nierenkranken Patienten **Tabelle 26**. Hier ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Nierenfunktionseinschränkung (Anstieg von Kreatinin, eGFR-Verlust und Harnstoff-N-Erhöhung) und Akkumulation von *5mC-RLN1*, *5mC-RLN2* und *5mC-RLN3* nachweisen (**Abbildung 30**) Erneut, dies könnte einen Nutzen von aberranter *5mC-RLN1-3* im Blut als Biomarker für endogenen Verlust von Relaxin in der Niere indizieren.

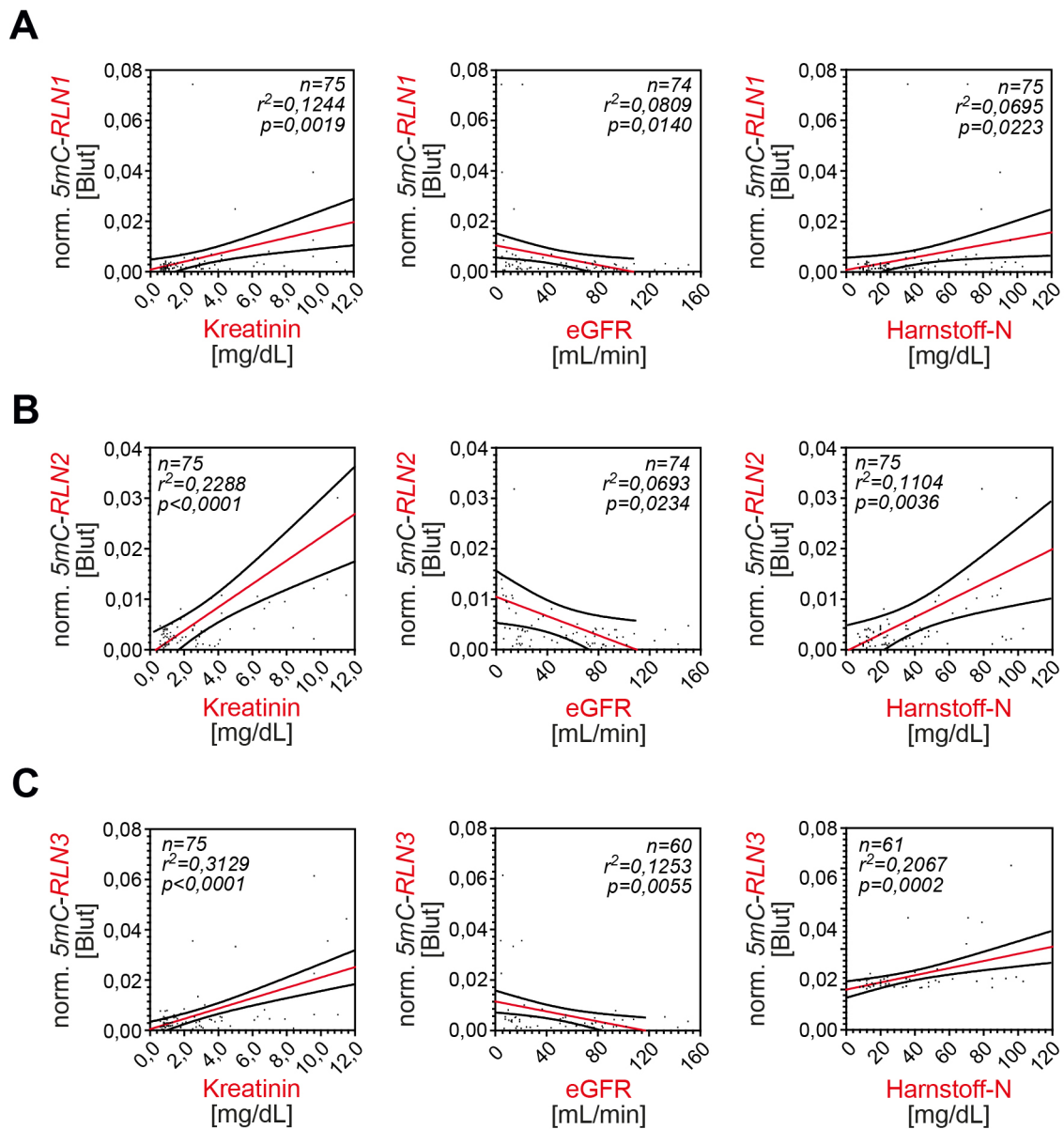


Abbildung 30: Nierenfunktionseinschränkung korreliert mit aberranter Relaxin-Promotormethylierung. (A-C) Analyse der Nierenfunktionseinschränkung mittels Anstieg von Kreatinin, eGFR-Verlust und Harnstoff-N-Erhöhung in Korrelation mit *RLN1-3*-Methylierung im Blut nierenerkrankter Patienten. (n von biologischen Replikaten wie angegeben, Analyse in technischen Triplikaten, die Graphen zeigen lineare Regressionsanalysen mit r^2 und p-Werten).

5. Diskussion

Das humane Relaxin weist zahlreiche pleiotrope Effekte auf, die bereits in vorangegangenen Studien, insbesondere durch den Wissenschaftler Frederick Hisaw, beschrieben wurden (Bani 1997, Collino et al. 2013, Conrad und Novak 2004). Neben der Niere können weitere Effekte vor allem kardiovaskulär, im Gehirn sowie in den Reproduktionsorganen nachgewiesen werden (Bani 1997). Im Rahmen dieser Arbeit fand vor allem eine Auseinandersetzung mit der Inhibition renaler Fibrogenese und der Früherkennung renaler Erkrankungen statt. Die antifibrotischen Effekte von Serelaxin (RLX030) in murinen (Hewitson et al. 2010) als auch humanen renalen Fibroblasten (Heeg et al. 2005) und ihre Vermittlung über die Inhibition der TGF- β -Signalkaskade sind schon von mehreren tierexperimentellen Studien dokumentiert worden (Sasser 2014, Bathgate et al. 2013, Heeg et al. 2005, Mookerjee et al. 2009).

5.1 Studienlage RLX030

Sowohl die Effizienz, Tolerierbarkeit als auch die Sicherheit von RLX030 zur Behandlung von Patienten wurde von der Firma Novartis primär in Studien zur akuten Herzinsuffizienz untersucht (Díez 2014, Wilson et al. 2015, Díez und Ruilope 2016). Im Juni 2013 wurde zwar eine Phase-I-Studie „PK of Serelaxin in Severe Renal Impairment and ESRD (CRLX030A2102)“ zur Evaluierung des Medikaments in Patienten mit schwerwiegenden Nierenerkrankungen oder terminaler Niereninsuffizienz angelegt, jedoch sind bisher noch keine Ergebnisse dieser Studie publiziert worden (clinicaltrials.gov).

RELAX-AHF-2 (NCT01870778) war eine multizentrale, randomisierte Doppelblindstudie in der Phase III mit den folgenden zwei Zielsetzungen: Die Reduktion kardiovaskulär bedingter Todesfälle sowie die Verhinderung des Voranschreitens von Herzinsuffizienzsymptomen. Im Oktober 2013 wurde die Studie initialisiert und umfasste 6.600 Patienten, welche aufgrund von akuter Herzinsuffizienz (AHF) hospitalisiert wurden. Aufgrund unzureichender Erfolge wurde sie jedoch im März 2017 eingestellt (Novartis provides update on Phase III study of RLX030 (serelaxin) in patients with acute heart failure).

5.2 Induktion der Relaxin-Rezeptoren in der geschädigten Niere

Sowohl in der murinen wie auch in der humanen Niere sind die sieben-transmembranen Relaxin-Rezeptoren -1 und -2 (*Rxfp1,2* und *RXFP1,2*) vorhanden und vermitteln über eine G-Proteingekoppelte Kaskade die pleiotropen Wirkungen von Relaxin (Halls et al. 2007, Bathgate et al. 2013, Sasser 2014). Im Rahmen von immunhistochemischen Färbungen konnte die Lokalisation der Rezeptoren *RXFP1* und *RXFP2* in renalen Fibroblasten konstatiert werden, wohingegen eine Expression in Tubulusepithelzellen oder glomerulären Zellen nicht beobachtet werden konnte. In tier- und humanexperimentellen Daten von Halls et al. sowie Bathgate et al. lassen sich bereits ähnliche Ergebnisse finden. Weiterführend konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch ein neuer, essentieller Aspekt detektiert werden: Hierbei wurde bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen,

ungeachtet ihrer zugrundeliegenden Erkrankung, bzw. in UUO-geschädigten murinen Nieren, eine Hochregulation der entsprechenden Relaxin-Rezeptoren (*Rxfp1,2* und *RXFP 1,2*) etabliert. Der genaue Mechanismus der Hochregulation ist bisher jedoch noch unbekannt und bedarf weiterführender Forschung. Darüber hinaus konnte in diesen fibrotisch geschädigten Mauseieren ein intrarenaler Verlust des Hormons Relaxin konstatiert werden. Erste Ergebnisse hierzu wurden bereits in Vorversuchen von der Arbeitsgruppe Zeisberg erbracht (Lovisa et al. 2015) und konnten in der vorliegenden Arbeit mittels Western-Blot-Analysen auf Proteinebene sowie PCR-Auswertungen auf mRNA-Ebene validiert werden.

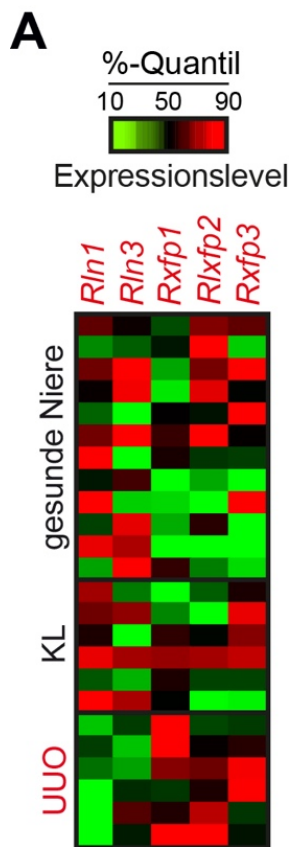


Abbildung 31: Heatmap der Relaxin-Isoformen und entsprechende Rezeptoren in gesunden, kontralateralen (KL) und UUO-Nieren. Die Heatmap illustriert durchschnittliche Expressionslevel der Genexpression von *Rln1*, *Rln3*, *Rxfp1*, *Rxfp2* und *Rxfp3* sowohl in UUO-geschädigten, als auch gesunden Nieren (modifiziert nach: Lovisa et al. 2015).

Es konnte folglich eine Korrelation zwischen dem endogenen Verlust von Relaxin in geschädigten Nieren und einer simultanen Induktion der entsprechenden Rezeptoren beobachtet werden. Basierend auf diesen Ergebnissen, ergaben sich zwei wichtige Konsequenzen: Zum einen ließ sich hieraus auf eine erhöhte Empfänglichkeit für die Applikation von RLX030 in fibrotisch geschädigten Nieren schließen. Zum anderen warf dies die Vermutung auf, dass geringere Konzentrationen bei der

Applikation von RLX030 benötigt werden, um einen therapeutisch relevanten antifibrotischen Effekt zu erzielen.

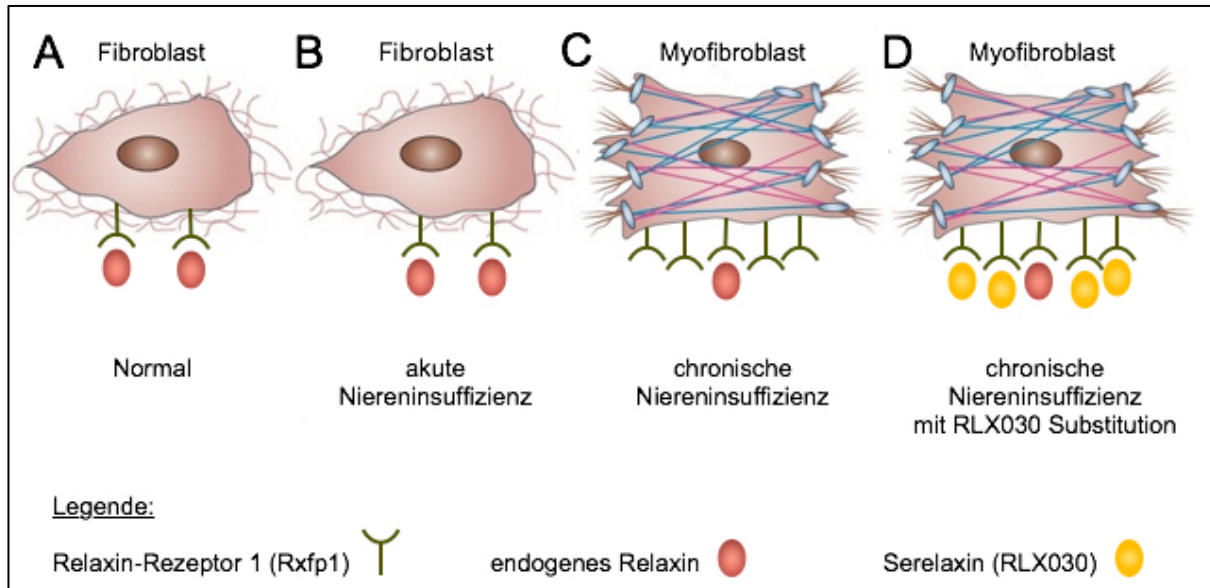


Abbildung 32: Veränderte Relaxin-Rezeptor-1-Expression in geschädigten Nieren mit einhergehendem endogenem Relaxin-Verlust. (A) Reguläre Relaxin-Rezeptor-1-Expression von nierengesunden Fibroblasten. (B) Unveränderte *Rxfp1*-Expression bei akuter Niereninsuffizienz. (C) Induktion der *Rxfp1*-Expression bei chronischer Niereninsuffizienz mit gleichzeitigem Verlust von endogenem Relaxin. (D) Induktion der *Rxfp1*-Expression mit Supplementation von Serelaxin (RLX030) bei chronischer Niereninsuffizienz (modifiziert nach Falke et al. 2015).

5.3 Attenuierung der renalen Fibrosierung *in vivo* durch Applikation von RLX030

Die tubulointerstitielle Fibrose, wie sie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz untersucht werden kann, geht einher mit einer interstitieller Fibrose sowie einer tubulären Atrophie. Ein etabliertes Nagermodell stellt hierbei die chirurgisch durchgeführte unilaterale Ureterobstruktion (UUO) dar, welche im Hinblick auf den zeitlichen Ablauf, die Dauer und Schwere der Ausprägung beeinflusst werden kann. Zu Beginn entsteht aus der obstruierten Niere aufgrund der tubulären Dilatation eine Hydronephrosis. Die anschließende kortikale Atrophie sowie interstitielle Inflammation resultieren in der irreversiblen Nierenfibrose (Klahr und Morrissey 2002). Vorteilhaft ist darüber hinaus eine geringe Mortalität postoperativ bei den Tieren sowie die interne Kontrollierbarkeit der Methode aufgrund der erhaltenen Funktionalität der kontralateralen Niere (Ucero et al. 2013). Aufgrund dessen dient es einmal sowohl als Model der irreversiblen akuten Niereninsuffizienz als auch der Progression eines Nierenversagens (Chevalier et al. 2009). Zur Untersuchung der globalen Nierenfunktion und ihrer Funktionsparameter ist dieses Model allerdings nicht geeignet. Nachteilig ist zudem, dass kein signifikant glomerulärer Schaden detektiert werden kann und darüber hinaus die dauerhafte Ureterobstruktion zu einer, im Vergleich zum chronisch nierenkranken Patienten, aggressiven Progression der renalen Destruktion führt (Rossant und McKerlie 2001, Justice et al. 2011). Resultierend ist eine früh anhaltende renale Vasokonstriktion verbunden mit einer verminderten

Nierenperfusion. Dies gilt es bei Applikation von Medikamenten und der Übertragbarkeit von Dosierungen zu bedenken (Eddy et al. 2012).

Insgesamt konnte zu allen Zeitpunkten (nach drei, sieben und zehn Tagen) in obstruierten Nieren des RLX030-behandelten Mauskollektivs eine signifikante Reduktion der progredienten renalen Fibrosierung detektiert werden. Morphometrische Bildanalysen von Masson-Trichrom sowie Immunfluoreszenzfärbungen von α -SMA und Kollagen-1 verdeutlichten anschaulich die Progression tubulointerstitieller Fibrose in den Kontrollkohorten, als auch deren deutliche Suppression unter dosisabhängiger RLX030-Applikation. Die antifibrotische Wirkung von RLX030 konnte auch von Samuel et al. bestätigt werden, jedoch zeigten sich hier in vorangegangenen Versuchen Geschlechterunterschiede bei der Entwicklung von Altersfibrose in männlichen Relaxin-1-Knockout-Mäusen (Danielson et al. 2000, Sasser 2013, Hewitson et al. 2012). Bei entsprechend weiblichen Mäusen konnte keine signifikante Zunahme von tubulointerstitieller Fibrose detektiert werden (Samuel et al. 2004b). Darauf basierend, erfolgte im UUO-Mausmodell die Untersuchung des Mausgeschlechts auf die RLX030-Wirkung. Es wurden jeweils vier weibliche und vier männliche Mäuse mit RLX030 für 10 Tage behandelt. Ein geschlechtsspezifischer Wirkungsunterschied bei exogener RLX030-Applikation konnte nach morphometrischen Bildanalysen in dieser Studie jedoch nicht festgestellt werden.

Methodische Diskrepanzen im Vergleich zu anderen Arbeiten von beispielsweise Hewitson et al. und Heeg et al. sind unter anderem in der dosisveränderten Applikation des Medikaments zu sehen (Hewitson et al. 2010, Heeg et al. 2005). Die beobachtete Induktion von Relaxin-Rezeptoren-1 und -2 in der murinen wie auch humanen fibrotisch destruierten Niere bot einen ersten Anhaltspunkt für dieses Studiendesign.

Nach dem Vorbild klinischer Dosierungsfindungsstudien ermöglichte die Applikation von verschiedenen Konzentrationen des Medikaments RLX030 das effektivste Wirkungsspektrum zu identifizieren. Hierbei verdeutlichte sich in den tierexperimentellen Analysen, dass bereits die mittlere Stimulationsdosis (200 μ g/kg KG) den deutlichsten Effekt des Medikaments zeigte. Fraglich ist jedoch, in welchem Maße eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den chronisch nierenkranken Patienten möglich ist. Trotz offenkundiger Differenzen zur Sequenzierung des murinen Transkriptoms sowie Epigenoms bietet die Hausmaus ein noch immer etabliertes Untersuchungsmodell zum Studium von humanen Erkrankungen und der Wirksamkeit von Medikamenten (Peters et al. 2007, Rosenthal und Brown 2007).

Eruiert wurde somit nicht nur der antifibrotische Effekt von RLX030, sondern zudem die therapeutische Mindestdosis, bei der eine noch deutliche antifibrotische Wirkung sichtbar war. Die Applikation von 200 μ g/kg KG RLX030 konnte dementsprechend als effektivste Dosierung ermittelt werden. Gestützt wurden diese Erkenntnisse neben den morphometrischen Untersuchungen durch PCR-Analysen auf mRNA-Ebene. Die Applikation des Medikaments fand bei allen erwähnten Arbeitsgruppen mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe statt, die im Vergleich zu einer repetitiven

subkutanen Injektion einen konstanten Medikamentenspiegel in den Versuchstieren sicherte (Doucette et al. 2000).

Weitere Differenzen zur Methodik der Arbeitsgruppe Hewitson et al. bestehen ferner im Zeitpunkt der Applikation des Medikaments. Sie verabreichten das Medikament bereits vier Tage vor der unilateralen Ureterobstruktion, um eine konstante RLX030-Konzentration von 20–40 ng/ml im Blut zu erreichen (Hewitson et al. 2010). Diese Konzentration entsprach endogenen Relaxinspiegeln von schwangeren Mäusen (Samuel et al. 2016). Überlegungen der vorliegenden Arbeit befassten sich jedoch vor allem mit der Vergleichbarkeit des Mausmodells und dem Erkrankungsablauf von chronisch nierenerkrankten Patienten. Die Einnahme des Medikaments erfolgt im klinischen Krankheitsverlauf erst nach Detektion der Erkrankung, so dass die Implantation der osmotischen Minipumpe erst nach bzw. bei akuter Niereninsuffizienz stattfinden durfte. Die Versuche wurden aus diesem Grund in zwei Phasen durchgeführt. Zu Beginn erfolgte die Implantation der osmotischen Minipumpen befüllt mit dem Medikament und die unilaterale Ureterobstruktion simultan. In einem anschließend durchgeführten *Rescue*-Experiment fand die Implantation der Pumpe erst sieben Tage post-UUO statt, sodass sich die Wildtypmäuse bei Implantation bereits im manifesten Nierenversagen befanden. Auch hier konnte eine Inhibition von tubulointerstitiellem Kollagen-1 und *alpha smooth muscle actin*-positiven Zellen in immunhistologischen Gewebsanalysen und MTS-Auswertungen nachgewiesen werden.

Die Inhibition der renalen Fibrogenese von RLX030 im UUO-Mausmodell konnte in einem zweiten unabhängigen Modell validiert werden. Hohe Dosen von Folsäure (250 µg/gKG), die Wildtyp-Mäusen mit dem genetischen Hintergrund *FVB/N* subkutan appliziert wurden, führten zur Induktion einer renalen interstitiellen Fibrose. Hierbei entsteht in der akuten Phase (1-14 Tagen) eine tubuläre Nekrose, für die zwei mögliche Ursachen diskutiert werden: Zum einen die tubuläre Obstruktion, die durch Folsäurekristalle hervorgerufen wird und zum anderen der direkt toxische Effekt der Folsäure auf die Tubuluszellen. Im Verlauf kommt es dann partiell jedoch zu einer Regeneration der tubulären Epithelzellen, sodass in der chronischen Phase (Tag 28-42) die interstitielle Fibrose dominiert. Das Modell wurde bereits in vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe Zeisberg zur Induktion interstitieller Fibrose verwendet (Bechtel et al. 2010), anhand derer auch die Untersuchungszeitpunkte Tag 28, 84 und 140 bestimmt wurden. Verglichen mit dem UUO-Modell kann in diesem Mausmodell die Nierenfunktion als Maß für die Entwicklung der chronischen Niereninsuffizienz bestimmt werden. Hingegen besteht im Folsäure-Modell ein Nachteil in Bezug auf die Homogenität der Ergebnisse. Bei manchen Mäusen wird eine spontane Regeneration nach 42 Tagen beobachtet (Long et al. 2001, Yang et al. 2010, Doi et al. 2006). Im Rahmen dieser Studie wurde die Krankheitsprogression mittels Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationsbestimmungen im Serum kontrolliert.

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen von α -SMA und Kollagen-1 sowie MTS-Färbungen in histologischen Gewebsschnitten ergab die Fibrosequantifizierung ab Tag 28 einen signifikanten Unterschied zwischen RLX030-behandelten Mäusen und der Kontrollkohorte. Da an Tag drei keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontroll- und der behandelten Gruppe detektiert wurden,

erfolgte die Pumpenimplantation mit RLX030 für die nachfolgenden Zeitpunkte erst zwei Tage nach Folsäure-Injektion. Die Applikation fand somit bei bereits bestehender akuter Niereninsuffizienz statt. Zusammenfassend ließ sich die antifibrotische Wirkung von RLX030 in zwei unabhängigen Mausmodellen (UUO und FAN) mit zusätzlich unterschiedlichem genetischen Hintergrund (respektive *C57BL/6* und *FVB/N*) bestätigen.

5.4 Molekulare Transduktionsmechanismen zur Inhibition der renalen Fibrogenese

Die Wirkung von Relaxin auf die renale Gewebemorphologie wird hauptsächlich über den eingangs beschriebenen Relaxin-Rezeptor-1 vermittelt. Die genauen Transduktionswege sind zentrale Aspekte in der aktuellen Forschung, um neue therapeutisch nutzbare Angriffspunkte detektieren zu können. Die Progression renaler Fibrogenese wird wesentlich durch das Zytokin TGF- β 1 beeinflusst (Border und Noble 1997, Peters et al. 1998, López-Hernández und López-Novoa 2012). Bathgate et al. beschrieben im Hinblick auf antifibrotische Effekte zwei wichtige Signaltransduktionewege in humanen und murinen renalen Myofibroblasten: Diskutiert wird eine verstärkte Relaxin-induzierte Synthese des diatomischen Radikals NO (nitric oxide) über Proteinkinasen - PI3K und ERK -, welche zu einer Induktion der Matrixmetalloproteinase-1 (Kollagenase-1), -3 (Stromelysin-1), -9 (Gelatinase B) und -13 (Kollagenase-3) führen (Baccari und Bani 2008). Weiterhin wird eine direkte Interaktion von NO in die Signaltransduktion von TGF- β vermutet (Garber et al. 2001, Masterson et al. 2004), welches über eine Inhibition der TGF- β -induzierten Phosphorylierung von Smad2, den antifibrotischen Effekt von Relaxin vermittelt (Heeg et al. 2005, Mookerjee et al. 2009). Dieser Signalweg konnte unter anderem *in vitro* an ventrikulären Fibroblasten aus Ratten beobachtet werden (Conrad 2010). Danielson et al. unterstützten diese Hypothese, indem sie Ratten simultan mit rekombinanten Relaxin H2 und einem NO-Synthase-Inhibitor (Nomega-nitro-L-arginine methyl ester) behandelten (Danielson et al. 1999). Die zuvor beobachtete Zunahme der eGFR sowie des renalen Plasmaflusses (ERPF) wurde nach Applikation des NO-Synthase-Inhibitors unterbunden. Folglich konnte NO als ein essentieller Mediator für die antifibrotische Wirkung von Relaxin bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterführende Versuche im tierexperimentellen Model der tubulointerstitiellen Fibrose *in vivo* durchgeführt. In Gewebsschnitten von Tag 10-geopferten Mäusen, die mit einer Konzentration von 200 und 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG Serelaxin behandelt wurden, konnte anhand von immunhistologischen Gewebsanalysen eine deutliche Degradation von pSmad2 in den Medikamenten-behandelten Gewebsschnitten untersucht werden (Chow et al. 2012).

Renale tubulointerstitielle Fibrose resultiert nicht nur aus einer Überproduktion von extrazellulärer Matrix, sondern auch aus einer beeinträchtigten Degradation von Matrixproteinen. Dies wird vor allem durch eine Herabregulation von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) oder einer Induktion von TIMPs (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinase*) herbeigeführt (Eddy 2000, Sasser 2013). Das Wirkungsspektrum der Matrixmetalloproteinasen besitzt eine hohe Diversität. Neben der Abwehrfunktion und Wundheilung sind sie zudem auch an Gefäßneubildungen beteiligt (Bonnema et al. 2007). Sie gehören zur Gruppe der extrazellulären Endopeptidasen und sind an der Regulation von

Auf- und Abbauprozessen des Matrixgewebes beteiligt (Giannandrea und Parks 2014). Die Aktivität der MMPs kann über verschiedene Mechanismen reguliert werden: Auf Transkriptionsebene, durch die Aktivierung von latenten pro-MMPs und durch die Inhibition der TIMPs (Giannandrea und Parks 2014, Chow et al. 2012). Entsteht ein Ungleichgewicht im Zusammenspiel von MMPs und TIMPs, hat dies großen Einfluss auf das *tissue remodeling*. Eine erhöhte Induktion führt zur verstärkten Degradation der Extrazellulären Matrix, wohingegen eine prominente TIMPs Expression zu einer deutlichen Fibrosierung des Gewebes führt (Giannandrea und Parks 2014, Madlener 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte mittels qRT-PCR-Analysen auf mRNA-Ebene in Gewebeproben von unbehandelten und mit RLX030-behandelten Wildtypmäusen an Tag sieben und zehn eine deutlich erhöhte Expression von *Mmp-2*, und *-9* festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch schon in anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden. Samuel et al wiesen eine Relaxin vermittelte Stimulation von *Mmp-2* nicht nur in experimentellen Fibrosemodellen der Niere *in vivo* nach, sondern auch in Modellen der Herz- und Lungenfibrose (Unemori et al. 1996, Rideout et al. 1990, Samuel et al. 2004a). Eine genaue Aktivitätsbestimmung der MMPs mittels Gelatin-Zymographie (Jeyabalan et al. 2006) erfolgte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht. Diese Methode ist zwar sensitiver, allerdings auch sehr Zeit- und Materialaufwendig. Zudem war im Rahmen dieser Arbeit vor allem die relative Expressionsmenge von MMP-2 und MMP-9 interessant, die ebenfalls auf mRNA-Ebene und morphometrischen Färbungsuntersuchungen bestimmt werden konnte. Der genaue molekulare Mechanismus zur Inhibition der renalen Fibrogenese durch MMPs ist noch immer nicht vollends verstanden. Giannandrea und Parks führen, basierend auf ihren Arbeiten, an, dass MMPs einen direkten Einfluss auf Inflammationsprozesse sowie die Aktivierung von Myofibroblasten haben und somit nicht nur auf Effekte der EZM-Umwandlung limitiert sind (Kapila et al. 2009).

5.5 Beleuchtung des intrarenalen Verlusts von Relaxin durch epigenetische Regulationsmechanismen

Der endogene Verlust von Relaxin hat eine hohe therapeutische Relevanz. Die genauen Regulationsmechanismen der Relaxinisoformen bei Nierenerkrankungen sind allerdings zurzeit wenig erforscht. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Methylierungsprozesse von Promotorregionen spezifischer Gene zur Exazerbation der Fibrogenese führen (Bechtel et al. 2010, Tampe und Zeisberg 2014). Tampe et al. eruierten spezifisch den Mechanismus der Hypermethylierung von entsprechenden Genen (*RASAL1*) in fibrotisch destruierten Nierenparenchym, die mit der Ausprägung der Fibrose korrelieren (Tampe et al. 2015).

Bei der DNA-Methylierung erfolgt am Cytosin, welches Teil von so genannten CpG-Inseln ist, eine Methylierung an der C5-Position, sodass 5-Methyl Cytosin entsteht. Dieser Prozess wird funktionell relevant, wenn die CpG-Inseln Teil von Gen-Promotorregionen sind, da dies zu einer Suppression der Transkription führt (Zeisberg und Zeisberg 2013). Wie bereits eingangs erwähnt, wurde die Relevanz der abarrenten Methylierung von CpG-Promotor-Inseln zuerst am Beispiel der Krebsentstehung

deutlich. Hier führte die DNA-Methylierung zur Inaktivierung spezifischer Tumorsuppressorgene (Mikeska und Craig 2014, Zeisberg und Zeisberg 2013, Dawson et al. 2013).

Unter der Verwendung der integrativen *disease platform NephroSeq* (NephroSeq.org) konnte initial die Hypothese der Relaxin-DNA-Promotor-Hypermethylierung und der damit einhergehende Verlust des endogenen Relaxins in der Niere entwickelt werden. Die Datenbank implementierte, dass im murinen Genom Relaxin-1, Relaxin-3, Relaxin-Rezeptor-2 und -3 sowie im humanen Genom Relaxin-1, Relaxin-2, Relaxin-3 und Relaxin-Rezeptor-3 proximal gelegene CpG-Promotor-Inseln aufweisen. Dementsprechend wurde in Vorversuchen zu dieser Arbeit eine limitierte Anzahl an fibrotisch veränderten murinen Nieren untersucht. Hierbei wurde die renale Schädigung durch unterschiedliche Mausmodelle erzeugt: STZ-induzierte diabetische Nephropathie (DN), Nephrotoxische Serum Nephritis (NTN) und Unilaterale Ureterobstruktion (UUO). Die renale Fibrogenese war in allen Modellen mit einer deutlichen Zunahme der DNA-Promotor-Methylierung von Relaxin-1 und Relaxin-3 assoziiert.

Diese Beobachtungen konnten in einer größeren Mausekohorte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Weiterhin bot sich die Möglichkeit, eine mögliche Übertragbarkeit der Mechanismen auf den Menschen in humanen Nierenbiopsien zu untersuchen. Unabhängig der chronischen renalen Grunderkrankungen (Membranproliferative GN, Lupus Nephritis, FSGN, Complement-GN und Diffus nekrotisierende GN) konnte stichprobenhaft eine Hypermethylierung der entsprechenden intrarenalen DNA-Promotorfragmente konstatiert werden. Eine Ausnahme bestand jedoch für Patienten mit akuter Niereninsuffizienz. Bei dieser Kohorte konnte zum einen kein signifikanter Verlust von *RLN1* und *RLN2* detektiert werden, zum anderen blieb die Induktion der Rezeptoren *RXFP1* und *RXFP2* aus.

Interessant ist hierbei vor allem, welche Rolle die epigenetische Regulation bei der Entwicklung von akuter Niereninsuffizienz einnimmt. Epigenetische Modifikation scheint vor allem einen Einfluss auf die Transition von akuter (AKI) zur chronischen Niereninsuffizienz (CKD) zu haben (Tampe et al. 2017). Während AKI-Episoden sind Tubulusepithelzellen einem hypoxischen Milieu ausgesetzt, welches nicht nur zur Modifikation vom zellulären Metabolismus führt, sondern auch Einfluss auf Chromatinstrukturen und die Bindungsaffinität verschiedener Transkriptionsfaktoren hat (Bomsztyk und Denisenko 2013). Pratt et al. 2006 zeigten zudem einen Zusammenhang zwischen der Hochregulation des Komplementfaktors C3, bedingt durch einen Anstieg an demethylierten CpG-Dinukleotiden im C3-DNA-Promotor von Rattennieren. Epigenetische Modifikation scheint somit vor allem essentiell an der Persistenz von Inflammation und EMT, die schlussendlich zu CKD führen, beteiligt zu sein. Ausgehend von diesen Studien lassen sich neue Möglichkeiten im Hinblick auf Diagnostik und Therapie ableiten (Reddy und Natarajan 2015, Rodríguez-Romo et al. 2015).

5.6 Molekulargenetische Identifikation eines therapielevanten Biomarkers

Ein wichtiger aktueller Forschungsschwerpunkt in wissenschaftlichen Studien ist die Identifikation von Biomarkern zur Therapiestratifizierung. Ausgehend von dem Prinzip der personalisierten Medizin,

besteht die Hypothese, dass Patienten mit identischer Diagnose auf die Behandlung mit dem gleichen Medikament unterschiedlich ansprechen (Collins und Varmus 2015). Während die Therapie für den einen Patienten effektiv und wirksam ist, lassen sich für den anderen keine adäquaten Therapieerfolge verzeichnen. Die verlässliche Vorhersage des Therapieeffektes nimmt eine immer wichtigere Rolle in der patientenbezogenen Medizin ein (Collins und Varmus 2015). Aktuell eingesetzte Funktionsparameter umfassen zum einen die errechnete glomeruläre Filtrationsrate (eGFR), die auf der Bestimmung des Kreatinin-Werts beruht, zum anderen den Nachweis von Proteinen im Urin (Proteinurie) (Lassus et al. 2010, Gupta et al. 2012, Levin et al. 2014). Der große Nachteil von beiden Funktionsparametern ist erstens der Zeitfaktor und zweitens die Undifferenziertheit. Es kommt erst zu einer Veränderung der Messwerte nach bereits erfolgter bzw. bestehender Schädigung der Niere. Dementsprechend wird ein Biomarker benötigt, der bereits vor einem irreversiblen Verlust der Nierenfunktion zu bestimmen ist (Ärzteblatt). Zum anderen wird das Prinzip der individualisierten Medizin vernachlässigt. Es werden Biomarker benötigt, welche Patienten identifizieren, die einen deutlichen therapeutischen Nutzen aus der Behandlung mit RLX030 ziehen.

Zur effektiven Quantifizierung der renalen Fibrose wird immer noch eine Nierenbiopsie benötigt. Nachteilig bei dieser Art der Diagnostik ist die Invasivität, eine eingeschränkte vielfache Wiederholbarkeit sowie die Ungenauigkeit in Bezug auf molekulare Fragestellungen. Ein effizienter und prognostisch-wertvoller Biomarker sollte das Vorkommen renaler Fibrose reflektieren sowie Aussagen über den Outcome eines Patienten bieten. Eine nicht-invasive Probengewinnung ist essentiell. In vergangenen Jahren wurde die Etablierung der sogenannten *liquid biopsy* (Flüssigbiopsie) vorangetrieben zur Identifikation von DNA-Fragmenten im Blut (Fackler et al. 2014, Genovese et al. 2014, Lee et al. 2014, Mischak 2015, Di Meo et al. 2017, Magalhães et al. 2017). Zurzeit wird diese Methode vor allem bei der Früherkennung von Tumorerkrankungen genutzt (Leon et al. 1977). Interessant ist nicht nur die Detektion von DNA-Fragmenten, sondern auch die Exploration von DNA-Modifikation im Hinblick auf DNA-Methylierung (Li et al. 2012).

In bereits publizierten Studien (Mikeska und Craig 2014) wurde konstatiert, dass quantitative Veränderungen von Methylierungsstrukturen einen erheblichen Nutzen als Biomarker bergen (Tampe et al. 2015, Papageorgiou et al. 2011). Insbesondere im Vergleich zu anderen Verfahren, wie der Histonmodifikation oder microRNAs, sind sie spezifischer in ihrem Detektionsspektrum (Zeisberg und Zeisberg 2015, Papageorgiou et al. 2011). DNA-Methylierungsmuster werden bereits während der Embryonalentwicklung bestimmt, sodass Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster entweder durch Alterungsprozesse oder durch Krankheiten bedingt sind (Dahl und Guldborg 2003). Zurzeit werden vielversprechende DNA-Methylierungs-Biomarker vor allem in klinischen Studien der Krebsforschung zur Früherkennung eingesetzt (Mikeska und Craig 2014). Die Bedeutsamkeit von aberrante Methylierung der CpG-Promotor-Inseln wird verdeutlicht durch die Wirksamkeit von 5'-Azacytidin, dem ersten de-methylierenden Agens, welches für den klinischen Gebrauch bei Patienten mit MDS und Akuter Myeloischer Leukämie (AML) zugelassen wurde (Tampe et al. 2015, Zeisberg

und Zeisberg 2013). Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass DNA-Promotormethylierung einen reversiblen epigenetischen Prozess darstellt und folglich einen weiteren Angriffspunkt, nicht nur zur Therapie von Tumorerkrankungen, sondern auch zur Umkehr von Organfibrosen bieten könnte. Erste Erkenntnisse wurden bereits von Tampe et al. 2015 erbracht. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass der hypermethylierte *Rasa1*-DNA-Promotor in fibrotisch destruierten Nieren nach der Behandlung mit dem Bone morphogenetic protein 7 (BMP7) normalisiert werden kann.

Des Weiteren sind Untersuchungen in Bezug auf den Methylierungsgrad von bestimmten Genen interessant, um das individuelle Risiko eines Patienten fibrotisch destruierte Nieren zu entwickeln, abschätzen zu können, oder den Nutzen einer Demethylierungstherapie bestimmen zu können. Weiterentwickelt wurden diese Ergebnisse von der Arbeitsgruppe Zhang et al. Sie konnten mit dem Hormon Klotho und dessen Repression durch entsprechende methylierte DNA-Promotorfragmente in fibrotisch veränderten humanen und murinen Nieren, neben *RASAL1*, einen vermeintlich weiteren Biomarker zur frühzeitigen Identifikation renaler Fibrose bestimmen (Zhang et al. 2016).

Effiziente Nachweismethoden zur Analyse von DNA-Methylierung sind wichtige Voraussetzungen zur Bestimmung von Biomarkern. Es gibt verschiedenste Nachweismethoden, die jeweils auf unterschiedlichen Ebenen Informationen über DNA-Promotormethylierung liefern. Die Spannweite reicht hierbei von einer genomweiten Methylierungsanalyse bis zur Bestimmung von Methylierungsmustern eines einzelnen Gens (Dahl und Gulberg 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde das MeDIP-Verfahren zur Detektion methylierter DNA-Fragmente gewählt. Hierbei kommt es zu einer Anreicherung von Fragmenten in Abhängigkeit von der Dichte methylierter CpGs. Folglich kann somit genomweit nach hypermethylierten CpG-reichen Sequenzen gesucht werden. Diese Eigenschaft ist insbesondere für die Suche nach neuen Biomarkern essentiell. Das Verfahren zeigt jedoch auch Limitationen. Die Qualität und Spezifität der Antikörper sowie eine deutlich reduzierte Anreicherungs-effizienz in Regionen mit vermindertem CpG-Auftreten sind zwei wichtige Punkte, die es zu bedenken gilt (Olkhov-Mitsel und Bapat 2012).

In der vorliegenden Arbeit dienten zunächst Blutproben von Wildtypmäusen (*C57BL/6*) als Versuchsmaterial. In den zugehörigen Blutproben konnte bei den nierengeschädigten Tieren eine signifikant gesteigerte Konzentration an zirkulierenden *Rln1* und *Rln3* DNA-Promotorfragmenten festgestellt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden Blutproben einer Patientenkohorte bestehend aus 75 Volontären in Bezug auf DNA-Promotorfragment-Methylierung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass beim Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz zirkulierende methylierte CpG-Promotorfragmente von *RLN1*, *RLN2* und *RLN3* mit dem Grad an intrarenaler Methylierung der entsprechenden Gene sowie an interstitieller renaler Fibrose korrelieren. Als Nierenfunktionsparameter dienten die eGFR, der Serum-Kreatinin, Harnstoffspiegel (BUN), die Clearance sowie der renale Fibrosegrad. Besonders sensitiv korrelierten die zirkulierenden methylierten *RLN2* DNA-Promotorfragmente mit der Serum-Kreatinin- und Harnstoffkonzentration. Die Induktion der Biomarker war zudem unabhängig von der chronischen Grunderkrankung des Patienten

erkennbar. Dies bestätigt die Hypothese der Arbeitsgruppe Mao, dass epigenetische Veränderungen, die an der Ausbildung von Krankheiten beteiligt sind, eine Gewebsspezifität aufweisen (Mao 2014).

Zu bedenken gilt jedoch, dass Methylierungsmuster von DNA-Promotorfragmenten abhängig vom Alter der Patienten variieren können, da epigenetische Veränderungen Teil des natürlichen Alterungsprozesses sind (Bocklandt et al. 2011, Stubbs et al. 2017). Beispielsweise konnten unterschiedliche methylierte Promotorfragmentspiegel in nierengesunden Patienten verschiedenen Alters bestimmt werden. Demzufolge kann die Konzentration an methylierten zirkulierenden DNA-Promotorfragmenten bei Patienten mit der gleichen renalen Erkrankung teils unterschiedlich ausfallen. Dagegen zeigte die Patientenkohorte im Rahmen dieser Arbeit deutliche Tendenzen, die auf eine positive Korrelation zwischen Anstieg der Nierenretentionswerte und zirkulierenden methylierten Promotorfragmenten schließen lassen.

Der genaue Mechanismus der Freisetzung der methylierten CpG-Promotorfragmente in die Blutbahn ist noch nicht eindeutig geklärt. Vermutungen gehen von einer unspezifischen Freisetzung aus destruierten Zellen aus, ähnlicher der Freisetzung von DNA-Fragmenten bei Krebserkrankungen (Tampe et al. 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein weiterer molekularer Biomarker identifiziert werden, der zum einen in enger Korrelation mit Nierenfunktionsparametern Rückschlüsse auf den Funktionsstatus der Nieren bietet und zum anderen Grund zur Annahme gibt, dass zirkulierende methylierte *RLN1* und *RLN2* DNA-Promotorfragmente im Blut ohne weitere Biopsien als therapeutische relevante Biomarker bei chronischer Niereninsuffizienz dienen können, um spezifisch Patienten zu identifizieren, welche von einer entsprechenden Therapie mit RLX030 profitieren könnten.

6. Zusammenfassung

Die Progression chronischer Nierenerkrankungen sowie die daraus resultierende terminale Niereninsuffizienz mit dem histopathologischen Korrelat der tubulären Atrophie und interstitiellen Fibrosierung (sog. tubulointerstitielle Fibrose) sind immer noch ein gesundheitliches und sozioökonomisches Problem im klinischen Alltag der Nephrologie. Dies ist vor allem bedingt durch mangelnde Therapiekonzepte und -strategien. Im Rahmen der RELAX-AHF-2 (NCT01870778)-Studie fielen bei Patienten mit akuter Herzinsuffizienz neben einer Reduktion der kardial bedingten Dyspnoe ebenfalls positive Effekte des Medikaments auf Nierenfunktionsparameter auf. Weiterhin konnten in präklinischen Studien vielversprechende Effekte zur Inhibition der chronischen Nierenschädigung gezeigt werden. Daraus abgeleitet ergaben sich mögliche neue Behandlungskonzepte, um zielgerichtet Fibrosierungsprozesse inhibieren zu können. Während des progressiven Strukturverlusts der Niere kommt es zu einem Verlust der endogenen Relaxin-Expression, wohingegen der zugehörige Relaxin-Rezeptor (*RXFP1*) in interstitiellen Fibroblasten sowohl im murinen Niereninsuffizienzmodell als auch bei nierenerkrankten Patienten beträchtlich induziert wird. Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher, zum einen die Determinierung der Relaxin-Rezeptor-Expression in murinen wie auch humanen Gewebeproben als mögliches Therapieziel zu untersuchen. Zudem sollte die genaue Testung von RLX030 im Mausmodell mit Dosierungsfindung zu verschiedenen Zeitpunkten erfolgen sowie die Identifizierung eines möglichen Biomarkers etabliert werden, welcher eine Identifikation von nierenkranken Patienten zulässt, die von einer Substitution mit RLX030 profitieren würden.

Es konnte eine deutliche Induktion der Relaxin-Rezeptoren (*RXFP1*, 2 und 3) im Interstitium von murinen sowie humanen fibrotischen Nieren identifiziert werden. Diese Untersuchungen fanden mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene, durch Western Blot und histologische Gewebsanalysen auf Protein- und morphometrischer Ebene statt. Verbunden mit einem simultanen Verlust des endogenen Relaxins resultierte die Annahme, dass eine Substitution mit RLX030 essentiell zur Inhibition der renalen Fibrogenese beitragen könnte. Weiterhin konnte die mittlere Konzentrationsdosis von RLX030 (200 µg/kg Körpergewicht) als effektivste Dosierung zur Antagonisierung der renalen Fibrogenese nach zehntägiger unilateraler Ureterobstruktion (UUO) in *C57BL/6J*-Mäusen etabliert werden. Im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrollkohorte ergab sich unter RLX030-Supplementation eine deutliche Reduktion der tubulointerstitiellen Fibrose mit simultan verminderter tubulärer Atrophie. Die korrespondierenden profibrotischen Markerproteine α -SMA und Kollagen-1 wurden in histomorphologischen Untersuchungen ebenfalls supprimiert detektiert. Entsprechende Ergebnisse konnten ebenfalls zu weiteren Zeitpunkten an den Tagen drei und sieben nach UUO etabliert werden. Eine Bestätigung der Ergebnisse erfolgt in einem zweiten, unabhängigen Mausmodell durch Induktion einer chronischen Niereninsuffizienz mittels Folsäure. Die Analysen der Gewebeproben erfolgten an den Tagen 3, 28, 84 und 140 nach Folsäureinjektion. Nach anfänglich indifferenter akuter Niereninsuffizienz zwischen Kontroll- und RLX030-behandelter Kohorte ergaben sich signifikante Unterschiede im weiteren chronischen Verlauf der Niereninsuffizienz. Histomorphologisch manifestierte sich ebenfalls eine verminderte Akkumulation von interstitiellen Kollagen-1- und α -SMA-

positiven Myofibroblasten. Ferner wurde die antifibrotische Wirkung von RLX030 mittels interventionellen Therapieansatzes untersucht. Im Rahmen dessen wurde ein chronisches Nierenversagen mittels UUO induziert, die Applikation von RLX030 erfolgte hierbei mit einer Verzögerung von sieben Tagen nach UUO, wenn renale Fibrose bereits etabliert ist für weitere sieben Tage. Gewebeanalysen im Hinblick auf Akkumulation von Extrazellulärmatrix und Myofibroblasten ergaben eine deutliche Reduktion der spezifischen Fibrosemarker auch bei interventioneller Applikation von RLX030. Die Degradation von Extrazellulärmatrix beruht hierbei auf Induktion der Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9. Molekularbiologische Analysen in Primärkulturen von murinen Fibroblasten unter der Exposition von RLX030 bestätigten die anti-fibrotische sowie proliferationshemmende Wirkung des Medikaments. Zur Spezifizierung des endogenen Relaxin-Verlusts erfolgten Analysen epigenetischer Regulationsmechanismen. Hierbei konnte mittels DNA-Immunoprecipitation methylierter genomischer DNA (MeDIP) etabliert werden, dass der transkriptionelle Verlust von endogenem Relaxin auf aberranter Promotermethylierung beruht. Zudem lassen sich diese methylierten Promoterfragmente auch im Blut nachweisen, korrelieren mit dem Methylierungsstatus in der Niere und zeigen somit endogene Expressionslevel von Relaxin an. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass chronisch-progressive Nierenerkrankungen mit einem zunehmenden Verlust von Relaxin assoziiert sind, wogegen dessen Rezeptoren vermehrt exprimiert werden. Die Supplementation des synthetischen exogenen Relaxin-Analogons RLX030 vermittelt in zwei unabhängigen murinen Niereninsuffizienzmodellen anti-fibrotische Effekte und führt zu einer signifikanten Inhibition der renalen Fibrogenese. Mechanistisch wird dies über Induktion spezifischer MMPs vermittelt, welche Extrazellulärmatrix degradieren und auch im interventionellen Therapieansatz effektiv sind. Der Verlust des endogenen Relaxins durch aberrante Promotermethylierung lässt sich als im Blut zirkulierende Promotorfragmente nachweisen. Diese könnten als Biomarker zur Identifikation von Patienten dienen, welche von RLX030 profitieren.

7. Anhang

Tabelle 26: Patientenkohorte mit chronischen Nierenerkrankungen aufgeschlüsselt hinsichtlich klinischer und histologischer Charakteristika

Patienten ID	Histologische Diagnose	Geschlecht	Alter	Fibrosierungsgrad in %	Kreatinin [mg/dl]	eGFR (MDRD) [ml/min]	BUN [mg/dl]	Clearance
P1	Z.n. Nierentransplantation (NTx)	m	69	<10	1,9	38,76	38	37
P2	Mesangioproliferative GN vom Typ IgA-Nephritis	m	35	<5	9,2	7,60	50	49
P3	Z.n. NTx, benigne Nephrosklerose, FSGS	w	53	30	1,2	52,36	21	52,5
P4	Z.n. NTx, Globalsklerose, benigne Nephrosklerose	w	76	40	2,9	17,31	57	
P5	Mesangioproliferative GN vom Typ IgA-Nephritis	m	80	45	7	8,39	40	2
P6	FSGS	m		30				
P7	Benigne Nephrosklerose	m	59	30-40	7,9	7,84	52	1,2
P8	Benigne Nephrosklerose	m	53	<25	1,5	54,82	22	43
P9	Z.n. NTx, fokal akuter und chronifizierter Schaden	m	67	10	1,5	51,27	66	46,9
P10	Lupus-Nephritis	m	51	<15	2,1	37,56	46	106,5
P11	Mesangioproliferative GN vom Typ IgA-Nephritis	w		15				
P12	Akuter Tubulusschaden des Cortex	w	53	<10	4,2	12,40	54	
P14	FSGS	w	67	0	1,1	55,01	35	96
P15		m	75	20	8,4	6,88	43	23
P16	FSGS mit IgA-Nephritis	m	59	<15	1,5	53,55	25	138
P17	Lupus-Nephritis	w	53	0	1	64,62	15	58
P19	FSGS	w	84	30-40	1,6	33,49	22	34
P20		m	65	15	0,8	107,89	7	87
P22	Mesangioproliferative GN vom Typ IgAN	w	44	20-25	0,9	77,62	13	86
P23	Mesangioproliferative GN vom Typ IgAN	m	64	5-10	1,4	57,02	25	102
P24		m		40	4,2	15,41	62	3
P25	Chronisch-tubulointerstitieller Schaden	m		20				
P26	FSGS, benigne Nephrosklerose	w		30	0,8	102,18	10	112,6
P27	Interstitielle Nephritis	w	60	0	6,5	7,25	62	8
P28	Primär maligne Nephrosklerose	m	48	30 - 40	5	14,03	79	15,6
P29	Z.n. NTx, FSGS, schwere Nephrosklerose	w	56	40-50	3,6	14,47	67	13,5
P30	Membranoproliferative GN, FSGS	m	28	25-30	1,9	50,51	23	30,2
P31	Glomeruläre thrombotische Mikroangiopathie	w	55	40	9,6	4,78	90	

Patienten ID	Histologische Diagnose	Geschlecht	Alter	Fibrosierungsgrad in %	Kreatinin [mg/dl]	eGFR (MDRD) [ml/min]	BUN [mg/dl]	Clearance
P32	Benigne Nephrosklerose	m	76	10-15	1,3	59,45	15	
P33	Lupus-Nephritis Typ V und IIIC	w	61	0	3,9	12,92	41	18,4
P34	FSGS mit IgAN	w	44	0	0,9	77,12	12	103,7
P35	Membranoproliferative GN, FSGS	m		70	9,6	4,80	70	8
P36	Benigne Nephrosklerose	m	73	<25	1,4	54,94	24	65
P37	FSGS	m		<10				
P38	Membranoproliferative GN Typ 1	w		>60	2	36,66	40	
P40	Benigne Nephrosklerose mit IgAN	m	44	>90	11,5	5,57	88	
P41	Normalbefund	w	31	0	0,9	85,73	17	129,5
P42	FSGS	w		>50	9,6	5,86	96	
P43	Lupus-Nephritis Typ IIIC	w	37	15	0,8	94,48	13	74
P44	Lupus-Nephritis IIIC	w		15				
P45		w	51	5				
P46	FSGS	m	57	25	3	24,40	48	32
P47	Z.n. NTx, chronischer tubulointerstitieller Schaden	w	81	kA	2,1	24,68	44	23,7
P48		m		10	0,9	77,12	8	
P49	MPAN	m		40				
P50	FSGS	w		35				
P51	Diabetische Nephropathie, benigne Nephrosklerose	m	57	>50	3,2	22,65	53	30
P52	Benigne Nephrosklerose mit IgAN	w	54	30-35	1,8	33,12	24	
P53	Nekrotisierend-proliferative GN mit IgAN	m	47	50	6,7	10,12	70	1
P54		w	58	<10	2,1	26,72	39	27,1
P55		m		60	6,3	7,84	85	
P56	Benigne Nephrosklerose	w	55	10	0,9	73,34	14	62
P57	FSGS	m	57	>70	6,1	10,61	103	
P59	FSGS mit IgAN			5	11		99	
P60	Renale Amyloidose	m	77	0	1,1	71,86	23	40
P61	Benigne Nephrosklerose	w	68		1,3	45,03	22	95,8
P62	IgAN	w	67	0	0,6	110,73	18	114,3
P63	Benigne Nephrosklerose	w	76	>40	2,5	20,67	36	22
P64	Mesangioproliferative GN vom Typ IgAN	m		20	0,7	92,34	10	110,3
P65	Membranöse GN, benigne Nephrosklerose	m	63	25	1	83,40	20	
P66	Minimal change GN	w		5				
P67	Membranöse GN	w	54	60	10,4	4,29	71	2,5
P68	FSGS mit IgAN	m	32	25	0,8	132,36	11	114

Patienten ID	Histologische Diagnose	Geschlecht	Alter	Fibrosierungsgrad in %	Kreatinin [mg/dl]	eGFR (MDRD) [ml/min]	BUN [mg/dl]	Clearance
P69	IgAN	m	49	60	2	39,94	27	59,1
P70		m	52	<10	1,6	50,88	20	95
P71	IgAN	m	67	20	1,6	47,76	23	64,8
P73	FSGS mit IgAN	w	75	30-35	2,8	18,20	59	26,2
P74	Z.n. NTx 1997, Nephrosklerose	w	76	20	3,1	16,08	85	19,1
P75	Mesangioproliferative GN vom Typ IgAN	m	64	>7,5	2,7	26,41	39	41,8
P76	Benigne Nephrosklerose mit IgAN	m	85	25	1,4	52,95	37	49
P78	Benigne Nephrosklerose	m		40				
P79	Benigne Nephrosklerose mit IgAN	m	87	20	1,2	63,08	16	89
P80	FSGS mit IgAN, benigne Nephrosklerose	m	58	<10	1,2	69,91	12	84
P81	Nephrosklerose mit FSGS	m	59	30	1,8	43,39	22	42,4
P82	FSGS	w	41	0	0,6	123,93	12	159,6
P83	Diabetische Nephropathie, FSGS	w	75	50	2,2	24,04	44	48
P84	Z.n. NTx, benigne Nephrosklerose	m	62	35	1,9	39,92	52	42,3
P85	IgAN mit mesangioproliferativer GN	w	81	20	0,7	88,18	19	117,1
P86		w	88		0,9	64,88	20	72,9
P87		w		15	0,8	75,81	16	
P88	Kryoglobulinämie-assoziierte Immunkomplex-Nephritis	m	57	10	2,7	27,30	28	22,1
P89	Diabetische Nephropathie, FSGS	w	77	35	2,9	17,36	91	25
P90	M. Wegener	w	68	0	5,1	9,27	59	3
P91	Z.n. NTx 1996, fokale Tubulusatrophie mit IgAN	w	52	<25	2,2	26,41	32	40
P92		m	34	35	4,7	16,97	35	15
P93	Mikroskopische Polyangiitis	m	75	70	3,3	20,16	40	1,4
P94	Benigne Nephrosklerose	m	65	30	2,6	27,80	35	
P95	FSGS	w						
P96	FSGS mit interstitieller Nephritis	m	35	0	4	20,25	44	
P97	FSGS	m		>50	1,1	75,31	25	105,3
P98	Minimal Change GN	w	66	0	0,6	110,32	8	106,7
P99	Mesangioproliferative GN vom Typ IgAN	m	69	20	0,6	150,38	20	80,2
P100	Membranöse GN	w	76	0	0,8	78,30	20	
P101	Benigne Nephrosklerose mit IgAN	m	62	20	1	83,40	21	87,1
P102	Interstitielle Nephritis	m	73	<10	1,8	43,58	33	
P103	Lupus-Nephritis IIIC	w	32	<5	0,9	84,01	22	153,2

Patienten ID	Histologische Diagnose	Geschlecht	Alter	Fibrosierungsgrad in %	Kreatinin [mg/dl]	eGFR (MDRD) [ml/min]	BUN [mg/dl]	Clearance
P105	FSGS	m	43	<15	1	93,90	14	87
P106	Z.n. NTX 2001, IgAN	m	65	0	1,9	39,46	27	58,6
P108	Morbus Fabry	w	55	10	0,8	82,44	12	138,1
P109	Benigne Nephrosklerose	m	68	10	4,1	16,12	93	16,9
P110	FSGS	m	43	15	0,6	167,02	17	131
P111		m		10	1,3	63,45	25	
P112	Interstitielle Nephritis mit reaktiver FSGS	w	74	0	3,8	12,84	35	23
P113	Diabetische Nephropathie, FSGS	m	72	80	3,5	19,09	24	18,7
P114	Interstitielle Nephritis mit reaktiver FSGS	w	51	90	2,9	19,10	48	25,3
P115		w		15	1	60,32	20	
P116	Komplementfaktor-GN	m	34	0	1	99,31	8	131,5
P117	Mesangioproliferative GN vom Typ IgAN	m	66	10	0,9	92,78	12	156,9
P118		m	71	0	0,6	142,41	10	
P119	IgAN, benigne Nephrosklerose	w	59	0	0,9	70,73	13	73,7
P120	Benigne Nephrosklerose, FSGS	w	80	40-50	2,5	20,36	44	34,4
P121	Benigne Nephrosklerose	m	93	0	3,6	12,90	76	16,3
P123	Benigne nephrosclerose	m			1,2		12	
P125	Benigne nephrosclerose	w			1,3			
P127	Benigne nephrosclerose TX	m			3		99	
P128	Benigne nephrosclerose	m			7,1			
P132	FSNGN	m			1,1			

8. Literaturverzeichnis

Akhurst RJ, Hata A (2012): Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 11, 790–811

Alpers CE, Hudkins KL, Floege J, Johnson RJ (1994): Human renal cortical interstitial cells with some features of smooth muscle cells participate in tubulointerstitial and crescentic glomerular injury. *J Am Soc Nephrol JASN* 5, 201–209

Alzet® osmotic pumps: http://www.alzet.com/products/ALZET_Pumps/howdoesitwork.html (Zugriff am 14.01.2017)

Annes JP, Chen Y, Munger JS, Rifkin DB (2004): Integrin α V β 6-mediated activation of latent TGF- β requires the latent TGF- β binding protein-1. *J Cell Biol* 165, 723–734

Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches. <http://www.aerzteblatt.de/nachrichten/64812> (Zugriff am 03.08.2016)

Attisano L, Wrana JL (2002): Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646–1647

Baccari MC, Bani D (2008): Relaxin and nitric oxide signalling. *Curr Protein Pept Sci* 9, 638–645

Bakris GL, Ritz E (2009): The message for World Kidney Day 2009: hypertension and kidney disease: a marriage that should be prevented. *Kidney Int* 75, 449–452

Bani D (1997): Relaxin: A pleiotropic hormone. *Gen Pharmacol Vasc Syst* 28, 13–22

Bathgate RA, Ivell R, Sanborn BM, Sherwood OD, Summers RJ (2006): International Union of Pharmacology LVII: Recommendations for the Nomenclature of Receptors for Relaxin Family Peptides. *Pharmacol Rev* 58, 7–31

Bathgate RA, Halls ML, Westhuizen ET van der, Callander GE, Kocan M, Summers RJ (2013): Relaxin Family Peptides and Their Receptors. *Physiol Rev* 93, 405–480

Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Müller GA, Kalbacher H, Salant DJ, Müller CA, Kalluri R, Zeisberg M (2010): Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med* 16, 544–550

Bird A (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6–21

Blundell TL, Humbel RE (1980): Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* 287, 781–787

Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, Vilain E (2011): Epigenetic Predictor of Age. *PLoS ONE* 6, e14821

Bogzil AH, Eardley R, Ashton N (2005): Relaxin-induced changes in renal sodium excretion in the anesthetized male rat. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 288, R322–R328

- Bohle A**, Mackensen-Haen S, von Gise H (1987): Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution. *Am J Nephrol* 7, 421–433
- Bomsztyk K**, Denisenko O (2013): Epigenetic alterations in acute kidney injury. *Semin Nephrol* 33, 327–340
- Bonnema DD**, Webb CS, Pennington WR, Stroud RE, Leonardi AE, Clark LL, McClure CD, Finklea L, Spinale FG, Zile MR (2007): Effects of age on plasma matrix metalloproteinases (mmps) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs). *J Card Fail* 13, 530–540
- Boor P**, Ostendorf T, Floege J (2010): Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6, 643–656
- Border WA**, Noble NA (1997): TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy. *Kidney Int* 51, 1388–1396
- Border WA**, Okuda S, Languino LR, Sporn MB, Ruoslahti E (1990): Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor beta 1. *Nature* 346, 361-364
- Border WA**, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E (1992): Natural inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360, 1476-4687
- Bröcker V**, Kreipe H, Haller H (2010): Tubulointerstitial fibrosis. *Nephrol* 5, 284–292
- Bryant-Greenwood GD**, Schwabe C (1994): Human relaxins: chemistry and biology. *Endocr Rev* 15, 5–26
- Cernaro V**, Lacquaniti A, Lupica R, Buemi A, Trimboli D, Giorgianni G, Bolignano D, Buemi M (2014): Relaxin: new pathophysiological aspects and pharmacological perspectives for an old protein. *Med Res Rev* 34, 77–105
- Chang H**, Brown CW, Matzuk MM (2002): Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23, 787–823
- Cheifetz S**, Hernandez H, Laiho M, Dijke P ten, Iwata KK, Massagué J (1990): Distinct transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF-beta isoforms. *J Biol Chem* 265, 20533–20538
- Chevalier RL**, Forbes MS, Thornhill BA (2009): Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy. *Kidney Int* 75, 1145–1152
- Chow BSM**, Chew EGY, Zhao C, Bathgate RAD, Hewitson TD, Samuel CS (2012): Relaxin Signals through a RXFP1-pERK-nNOS-NO-cGMP-Dependent Pathway to Up-Regulate Matrix Metalloproteinases: The Additional Involvement of iNOS. *PLoS ONE* 7, 1932-6203

Chow BSM, Kocan M, Bosnyak S, Sarwar M, Wigg B, Jones ES, Widdop RE, Summers RJ, Bathgate RAD, Hewitson TD, Samuel CS (2014): Relaxin requires the angiotensin II type 2 receptor to abrogate renal interstitial fibrosis. *Kidney Int* 86, 75–85

Clayton A, Steadman R, Williams JD (1997): Cells isolated from the human cortical interstitium resemble myofibroblasts and bind neutrophils in an ICAM-1--dependent manner. *J Am Soc Nephrol* 8, 604–615

ClinicalTrials: NIH U.S National Library of Medicine. Efficacy, Safety and Tolerability of Serelaxin When Added to Standard Therapie in AHF (RELAX-AHF-2)
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01870778> (Zugriff am 19.01.2017)

ClinicalTrials: PK of Serelaxin in Severe Renal Impairment and ESRD (CRLX030A2102)
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01875523?term=Serelaxin&rank=8> (Zugriff am 19.01.2017)

Collino M, Rogazzo M, Pini A, Benetti E, Rosa AC, Chiazza F, Fantozzi R, Bani D, Masini E (2013): Acute treatment with relaxin protects the kidney against ischaemia/reperfusion injury. *J Cell Mol Med* 17, 1494–1505

Collins FS, Varmus H (2015): A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med* 372, 0028-4793

Collins AJ, Foley RN, Gilbertson DT, Chen S-C (2015): United States Renal Data System public health surveillance of chronic kidney disease and end-stage renal disease. *Kidney Int Suppl* 5, 2–7

Conrad KP (2010): Unveiling the vasodilatory actions and mechanisms of relaxin. *Hypertension* 56, 2–9

Conrad KP, Novak J (2004): Emerging role of relaxin in renal and cardiovascular function. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 287, R250–R261

Cook HT (2010): The Origin of Renal Fibroblasts and Progression of Kidney Disease. *Am J Pathol* 176, 22–24

Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Lente FV, Levey AS (2007): Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *JAMA* 298, 2038–2047

Dahl C, Guldborg P (2003): DNA methylation analysis techniques. *Biogerontology* 4, 233–250

Danielson LA, Sherwood OD, Conrad KP (1999): Relaxin is a potent renal vasodilator in conscious rats. *J Clin Invest* 103, 525–533

Danielson LA, Kercher LJ, Conrad KP (2000): Impact of gender and endothelin on renal vasodilation and hyperfiltration induced by relaxin in conscious rats. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 279, R1298–R1304

Danielson LA, Welford A, Harris A (2006): Relaxin Improves Renal Function and Histology in Aging Munich Wistar Rats. *J Am Soc Nephrol* 17, 1325–1333

- Danobeitia JS**, Djamali A, Fernandez LA (2014): The role of complement in the pathogenesis of renal ischemia-reperfusion injury and fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 7, 1755-1536
- Dawson SJ**, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, Dunning MJ, Gale D, Forsheo T, Mahler-Araujo B, et al. (2013): Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 368, 1199-1209
- Day JJ**, Sweatt JD (2010): DNA methylation and memory formation. *Nat Neurosci* 13, 1319–1323
- DGFN**, Deutsche Gesellschaft für Nephrologie (2014): Daten und Fakten zur Nephrologie. <https://www.dgfn.eu/hintergrundmaterial.html> (Zugriff am 19.01.2017).
- Di Meo A**, Bartlett J, Cheng Y, Pasic MD, Yousef GM (2017): Liquid biopsy: a step forward towards precision medicine in urologic malignancies. *Mol Cancer* 16, 80
- Díez J** (2014): Serelaxin: A Novel Therapy for Acute Heart Failure with a Range of Hemodynamic and Non-Hemodynamic Actions. *Am J Cardiovasc Drugs* 14, 275–285
- Díez J**, Ruilope LM (2016): Serelaxin for the treatment of acute heart failure: a review with a focus on end-organ protection. *Eur Heart J-Cardiovasc Pharmacother* 2, 119–130
- Dihazi H**, Dihazi GH, Mueller C, Lahrichi L, Asif AR, Bibi A, Eltoweissy M, Vasko R, Mueller GA (2011): Proteomics characterization of cell model with renal fibrosis phenotype: osmotic stress as fibrosis triggering factor. *J Proteomics* 74, 304–318
- Doi K**, Okamoto K, Negishi K, Suzuki Y, Nakao A, Fujita T, Toda A, Yokomizo T, Kita Y, Kihara Y, et al. (2006): Attenuation of Folic Acid-Induced Renal Inflammatory Injury in Platelet-Activating Factor Receptor-Deficient Mice. *Am J Pathol* 168, 1413–1424
- Doucette TA**, Ryan CL, Tasker RA (2000): Use of osmotic minipumps for sustained drug delivery in rat pups: effects on physical and neurobehavioural development. *Physiol Behav* 71, 207–212
- Dschietzig T**, Richter C, Bartsch C, Laule M, Armbruster FP, Baumann G, Stangl K (2001): The pregnancy hormone relaxin is a player in human heart failure. *FASEB J* 15, 2187–2195
- Ducy P**, Karsenty G (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 57, 2207–2214
- Dupont C**, Armant DR, Brenner CA (2009): Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Semin Reprod Med* 27, 351–357
- Eddy AA** (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 7, 2495-2508
- Eddy AA** (2000): Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol Berl Ger* 15, 290–301
- Eddy AA** (2013): The origin of scar-forming kidney myofibroblasts. *Nat Med* 19, 964–966
- Eddy AA**, Okamura DM, Yamaguchi I, López-Guisa JM (2012): Investigating Mechanisms of Chronic Kidney Disease in Mouse Models. *Pediatr Nephrol Berl Ger* 27, 1233–1247

Eigenbrot C, Randal M, Quan C, Burnier J, O'Connell L, Rinderknecht E, Kossiakoff AA (1991): X-ray structure of human relaxin at 1.5 Å. Comparison to insulin and implications for receptor binding determinants. *J Mol Biol* 221, 15–21

Fackler MJ, Lopez Bujanda Z, Umbricht C, Teo WW, Cho S, Zhang Z, Visvanathan K, Jeter S, Argani P, Wang C, et al. (2014): Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Cancer Res* 74, 0008-5472

Falke LL, Gholizadeh S, Goldschmeding R, Kok RJ, Nguyen TQ (2015): Diverse origins of the myofibroblast[mdash]implications for kidney fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 11, 233–244

Feng XH, Derynck R (1997): A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J* 16, 3912–3923

Fevold HL, Hisaw FL, Meyer RK (1930): The relaxative hormone of the corpus luteum. its purification and concentration1. *J Am Chem Soc* 52, 3340–3348

Frei U, Schober-Halstenberg H-J: Jahresbericht 2006/2007 - Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere, Berlin 2008

Gabbiani G, Ryan GB, Majne G (1971): Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27, 549–550

Gao H, Liu S (2017): Role of uremic toxin indoxyl sulfate in the progression of cardiovascular disease. *Life Sci* 185, 23–29

Garber SL, Mirochnik Y, Brecklin CS, Unemori EN, Singh AK, Slobodskoy L, Grove BH, Arruda JA, Dunea G (2001): Relaxin decreases renal interstitial fibrosis and slows progression of renal disease. *Kidney Int* 59, 876–882

Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, Karsdal MA, Boor P (2014): The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair* 7, 4

Giannandrea M, Parks WC (2014): Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech* 7, 193–203

Gordon KJ, Blobe GC (2008): Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782, 197–228

Greenshaw AJ (1986): Osmotic mini-pumps: A convenient program for weight-adjusted filling concentrations. *Brain Res Bull* 16, 759–761

Grupp C, Müller GA (1999): Renal fibroblast culture. *Exp Nephrol* 7, 377–385

Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, Shah VO, Balakrishnan VS, Guzman NJ, Girndt M, et al. (2012): Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol* 7, 1938-1946

- Halls ML**, van der Westhuizen ET, Bathgate RAD, Summers RJ (2007): Relaxin Family Peptide Receptors – former orphans reunite with their parent ligands to activate multiple signalling pathways. *Br J Pharmacol* 150, 677–691
- Heeg MHJ**, Koziolok MJ, Vasko R, Schaefer L, Sharma K, Müller GA, Strutz F (2005): The antifibrotic effects of relaxin in human renal fibroblasts are mediated in part by inhibition of the Smad2 pathway. *Kidney Int* 68, 96–109
- Heino J**, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massagué J (1989): Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem* 264, 380–388
- Heldin C-H**, Miyazono K, ten Dijke P (1997): TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471
- Herman JG**, Baylin SB (2003): Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349, 2042–2054
- Herpin A**, Lelong C, Favrel P (2004): Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 28, 461–485
- Hewitson TD**, Ho WY, Samuel CS (2010): Antifibrotic Properties of Relaxin: *In Vivo* Mechanism of Action in Experimental Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Endocrinology* 151, 4938–4948
- Hewitson TD**, Mookerjee I, Masterson R, Zhao C, Tregear GW, Becker GJ, Samuel CS (2007): Endogenous Relaxin Is a Naturally Occurring Modulator of Experimental Renal Tubulointerstitial Fibrosis. *Endocrinology* 148, 660–669
- Hewitson TD**, Zhao C, Wigg B, Lee SW, Simpson ER, Boon WC, Samuel CS (2012): Relaxin and castration in male mice protect from, but testosterone exacerbates, age-related cardiac and renal fibrosis, whereas estrogens are an independent determinant of organ size. *Endocrinology* 153, 188–199
- Hisaw FL** (1929): The Corpus Luteum Hormone. I. Experimental Relaxation of the Pelvic Ligaments of the Guinea Pig. *Physiol Zool* 2, 59–79
- Holliday R**, Pugh JE (1975): DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226–232
- Hossain MA**, Rosengren KJ, Samuel CS, Shabanpoor F, Chan LJ, Bathgate RAD, Wade JD (2011): The Minimal Active Structure of Human Relaxin-2. *J Biol Chem* 286, 37555–37565
- Huang Z**, Myhr C, Bathgate RAD, Ho BA, Bueno A, Hu X, Xiao J, Southall N, Barnaeva E, Agoulnik IU, et al. (2015): Activation of Relaxin Family Receptor 1 from Different Mammalian Species by Relaxin Peptide and Small-Molecule Agonist ML290. *Front Endocrinol* 6, 1664–2392
- Hudson P**, Haley J, John M, Cronk M, Crawford R, Haralambidis J, Tregear G, Shine J, Niall H (1983): Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature* 301, 628–631

- Ina** K, Kitamura H, Tatsukawa S, Takayama T, Fujikura Y, Shimada T (2002): Transformation of interstitial fibroblasts and tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy. *Med Electron Microsc* 35, 87–95
- Ivell** R, Kotula-Balak M, Glynn D, Heng K, Anand-Ivell R (2011): Relaxin family peptides in the male reproductive system—a critical appraisal. *Mol Hum Reprod* 17, 71–84
- Iyengar** R (1993): Molecular and functional diversity of mammalian Gs-stimulated adenylyl cyclases. *FASEB J* 7, 768–775
- Jeyabalan** A, Kerchner LJ, Fisher MC, McGuane JT, Doty KD, Conrad KP (2006): Matrix metalloproteinase-2 activity, protein, mRNA, and tissue inhibitors in small arteries from pregnant and relaxin-treated nonpregnant rats. *J Appl Physiol* 100, 1955–1963
- Jones** PA, Baylin SB (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415–428
- Ju** W, Nair V, Smith S, Zhu L, Shedden K, Song P, Mariani LH, Eichinger FH, Berthier CC, Randolph A, et al. (2015): Tissue transcriptome-driven identification of epidermal growth factor as a chronic kidney disease biomarker. *Sci Transl Med* 7, 316ra193-316ra193
- Justice** MJ, Siracusa LD, Stewart AF (2011): Technical approaches for mouse models of human disease. *Dis Model Mech* 4, 305–310
- Kang** Y-M, Choi Y-R, Yun C-O, Park J-O, Suk K-S, Kim H-S, Park M-S, Lee B-H, Lee H-M, Moon S-H (2014): Down-regulation of collagen synthesis and matrix metalloproteinase expression in myofibroblasts from Dupuytren nodule using adenovirus-mediated relaxin gene therapy. *J Orthop Res* 32, 515–523
- Kapila** S, Wang W, Uston K (2009): Matrix metalloproteinase induction by relaxin causes cartilage matrix degradation in target synovial joints. *Ann N Y Acad Sci* 1160, 322–328
- KDIGO** (Kidney Disease: Improving Global Outcomes): Mission KDIGO. <https://kdigo.org/mission/#history> (Zugriff am 20.03.2017)
- KDIGO** (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) **CKD Work Group** (2013): KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter Suppl* 3, 1–150
- Keller** CK, Geberth SK: *Praxis der Nephrologie*. 3. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010
- Kibblewhite** D, Larrabee WF, Jr, Sutton D (1992): The effect of relaxin on tissue expansion. *Arch Otolaryngol Neck Surg* 118, 153–156
- Klahr** S, Morrissey J (2002): Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F861-875
- Klose** RJ, Bird AP (2006): Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem*

Sci 31, 89–97

Kondo S, Kagami S, Urushihara M, Kitamura A, Shimizu M, Strutz F, Müller GA, Kuroda Y (2004): Transforming growth factor- β 1 stimulates collagen matrix remodeling through increased adhesive and contractive potential by human renal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1693, 91–100

Laird PW, Jaenisch R (1994): DNA methylation and cancer. *Hum Mol Genet* 3, 1487–1495

Lassus JPE, Nieminen MS, Peuhkurinen K, Pulkki K, Siirilä-Waris K, Sund R, Harjola V-P, FINN-AKVA study group (2010): Markers of renal function and acute kidney injury in acute heart failure: definitions and impact on outcomes of the cardiorenal syndrome. *Eur Heart J* 31, 2791–2798

LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R (2013): Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 19, 1047–1053

Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, et al. (2014): Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6, 1946-6234

Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ (1977): Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 37, 646-650

Levin A, Rigatto C, Barrett B, Madore F, Muirhead N, Holmes D, Clase CM, Tang M, Djurdjev O (2014): Biomarkers of inflammation, fibrosis, cardiac stretch and injury predict death but not renal replacement therapy at 1 year in a Canadian chronic kidney disease cohort. *Nephrol Dial Transpl* 29, 1037-1047

Li L, Choi J-Y, Lee K-M, Sung H, Park SK, Oze I, Pan K-F, You W-C, Chen Y-X, Fang J-Y, et al. (2012): DNA Methylation in Peripheral Blood: A Potential Biomarker for Cancer Molecular Epidemiology. *J Epidemiol* 22, 384–394

Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson A-KL, Flavell RA (2006): Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24, 99–146

Liu Y (2011): Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 7, 684–696

Long DA, Woolf AS, Suda T, Yuan HT (2001): Increased Renal Angiopoietin-1 Expression in Folic Acid-Induced Nephrotoxicity in Mice. *J Am Soc Nephrol* 12, 2721–2731

López-Hernández FJ, López-Novoa JM (2012): Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects. *Cell Tissue Res* 347, 141–154

Lottspeich F, Engels JW (Hrsg.): *Bioanalytik*. 3. Auflage; Springer Spektrum, Berlin Heidelberg 2012

Lovisa S, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadnagara K, Carstens JL, Wu C-C, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T, et al. (2015): Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 21, 998–1009

Madlener M: *Matrixmetalloproteinasen: vielfältige Modulatoren der Wundheilung*. Herbert Utz Verlag,

München 1998

Maeshima Y, Makino H (2010): Angiogenesis and chronic kidney disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 3, 1755-1536

Magalhães P, Pejchinovski M, Markoska K, Banasik M, Klinger M, Švec-Billá D, Rychlík I, Rroji M, Restivo A, Capasso G, et al. (2017): Association of kidney fibrosis with urinary peptides: a path towards non-invasive liquid biopsies? *Sci Rep* 7, 16915

Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR (1971): Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 173, 548–550

Mao Y (2014): Hypermethylation of RASAL1: A Key for Renal Fibrosis. *EBioMedicine* 2, 7–8

Marriott D, Gillece-Castro B, Gorman CM (1992): Prohormone convertase-1 will process prorelaxin, a member of the insulin family of hormones. *Mol Endocrinol* 6, 1441–1450

Massagué J (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597–641

Massagué J, Chen Y-G (2000): Controlling TGF- β signaling. *Genes Dev* 14, 627–644

Masterson R, Hewitson TD, Kelynack K, Martic M, Parry L, Bathgate R, Darby I, Becker G (2004): Relaxin down-regulates renal fibroblast function and promotes matrix remodelling in vitro. *Nephrol Dial Transplant* 19, 544–552

Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, et al. (2008): Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454, 766–770

Methven S, MacGregor MS (2009): Clinical management of chronic kidney disease. *Clin Med* 9, 269–272

Mikeska T, Craig JM (2014): DNA Methylation Biomarkers: Cancer and Beyond. *Genes* 5, 821–864

Mischak H (2015): Pro: urine proteomics as a liquid kidney biopsy: no more kidney punctures! *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 30, 532–537

Mookerjee I, Hewitson TD, Halls ML, Summers RJ, Mathai ML, Bathgate RAD, Tregear GW, Samuel CS (2009): Relaxin inhibits renal myofibroblast differentiation via RXFP1, the nitric oxide pathway, and Smad2. *FASEB J* 23, 1219–1229

Müller GA, Rodemann HP (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 17, 680–683

Müller GA, Zeisberg M, Strutz F (2000): The importance of tubulointerstitial damage in progressive renal disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 15 Suppl 6, 76–77

- Müller** GA, Frank J, Rodemann HP, Engler-Blum G (1995): Human renal fibroblast cell lines (tFKIF and tNKF) are new tools to investigate pathophysiologic mechanisms of renal interstitial fibrosis. *Exp Nephrol* 3, 127–133
- el Nahas** AM, Bassett AH, Cope GH, Le Carpentier JE (1991): Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring. *Kidney Int* 40, 29–34
- Nebel** M: Kosten der Nierenersatztherapie. In: *Dialyseverfahren in Theorie und Praxis*; hrsg. v. Hörl WH, Wanner C; 6. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003, 619-629
- Nistri** S, Bigazzi M, Bani D (2007): Relaxin as a Cardiovascular Hormone: Physiology, Pathophysiology and Therapeutic Promises. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem Former Curr Med Chem - Cardiovasc Hematol Agents* 5, 101–108
- Novartis**: Novartis provides update on Phase III study of RLX030 (serelaxin) in patients with acute heart failure. <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-provides-update-phase-iii-study-rlx030-serelaxin-patients-acute-heart> (Zugriff am 20.07.2017)
- Olkhov-Mitsel** E, Bapat B (2012): Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers. *Cancer Med* 1, 237–260
- Papageorgiou** EA, Karagrigoriou A, Tsaliki E, Velissariou V, Carter NP, Patsalis PC (2011): Fetal-specific DNA methylation ratio permits noninvasive prenatal diagnosis of trisomy 21. *Nat Med* 17, 510–513
- Peters** H, Border WA, Noble NA (1998): Targeting TGF- β overexpression in renal disease: Maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int* 54, 1570–1580
- Peters** LL, Robledo RF, Bult CJ, Churchill GA, Paigen BJ, Svenson KL (2007): The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis. *Nat Rev Genet* 8, 58–69
- Piek** E, Heldin C-H, Dijke PT (1999): Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J* 13, 2105–2124
- Pratt** JR, Parker MD, Affleck LJ, Corps C, Hostert L, Michalak E, Lodge JPA (2006): Ischemic epigenetics and the transplanted kidney. *Transplant Proc* 38, 3344–3346
- Rahimi** RA, Leof EB (2007): TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem* 102, 593–608
- Reddy** MA, Natarajan R (2015): Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases. *Kidney Int* 88, 250-261
- Rehm** H, Letzel T: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 6. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2010
- Rideout** WM, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA (1990): 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 249, 1288–1290

- Riggs AD** (1975): X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 14, 9–25
- Risdon RA**, Sloper JC, Wardener HE (1968): Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet* 2, 363-366
- Roberts IS**, Burrows C, Shanks JH, Venning M, McWilliam LJ (1997): Interstitial myofibroblasts: predictors of progression in membranous nephropathy. *J Clin Pathol* 50, 123–127
- Roberts AB**, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ (1980): Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3494–3498
- Rodríguez-Romo R**, Berman N, Gómez A, Bobadilla NA (2015): Epigenetic regulation in the acute kidney injury to chronic kidney disease transition. *Nephrology* 20, 736–743
- Rosenthal N**, Brown S (2007): The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nat Cell Biol* 9, 993–999
- Rossant J**, McKerlie C (2001): Mouse-based phenogenomics for modelling human disease. *Trends Mol Med* 7, 502–507
- Samuel CS**, Summers RJ, Hewitson TD (2016): Antifibrotic Actions of Serelaxin - New Roles for an Old Player. *Trends Pharmacol Sci* 37, 485-497
- Samuel CS**, Zhao C, Bond CP, Hewitson TD, Amento EP, Summers RJ (2004b): Relaxin-1-deficient mice develop an age-related progression of renal fibrosis. *Kidney Int* 65, 2054–2064
- Samuel CS**, Unemori EN, Mookerjee I, Bathgate RAD, Layfield SL, Mak J, Tregear GW, Du X-J (2004a): Relaxin modulates cardiac fibroblast proliferation, differentiation, and collagen production and reverses cardiac fibrosis in vivo. *Endocrinology* 145, 4125–4133
- Sasser JM** (2013): The emerging role of relaxin as a novel therapeutic pathway in the treatment of chronic kidney disease. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 305, R559–R565
- Sasser JM** (2014): New targets for renal interstitial fibrosis: relaxin family peptide receptor 1–angiotensin type 2 receptor heterodimers. *Kidney Int* 86, 9–10
- Schütter JB**, Liu MH, Gliem N, Fiedler GM, Zopf S, Mayer C, Müller GA, Grunewald RW (2003): Human renal fibroblasts derived from normal and fibrotic kidneys show differences in increase of extracellular matrix synthesis and cell proliferation upon angiotensin II exposure. *Pflug Arch Eur J Physiol* 446, 387–393
- Sherwood OD** (2004): Relaxin's Physiological Roles and Other Diverse Actions. *Endocr Rev* 25, 205–234
- Shi Y**, Massagué J (2003): Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113, 685–700

- Siragy** HM, Carey RM (2010): Role of the intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system in chronic kidney disease. *Am J Nephrol* 31, 541–550
- Strutz** F, Zeisberg M (2006): Renal Fibroblasts and Myofibroblasts in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* 17, 2992–2998
- Strutz** F, Müller GA (2006): Renal fibrosis and the origin of the renal fibroblast. *Nephrol Dial Transplant* 21, 3368–3370
- Stubbs** TM, Bonder MJ, Stark A-K, Krueger F, von Meyenn F, Stegle O, Reik W (2017): Multi-tissue DNA methylation age predictor in mouse. *Genome Biol* 18, 1474-7596
- Takai** D, Jones PA (2003): The CpG island searcher: a new WWW resource. *In Silico Biol* 3, 235–240
- Tampe** B, Zeisberg M (2014): Evidence for the involvement of epigenetics in the progression of renal fibrogenesis. *Nephrol Dial Transpl* 29, 0931-0509, 1460-2385
- Tampe** B, Tampe D, Zeisberg EM, Muller GA, Bechtel-Walz W, Koziolk M, Kalluri R, Zeisberg M (2015): Induction of Tet3-dependent epigenetic remodeling by low-dose hydralazine attenuates progression of chronic kidney disease. *EBioMedicine* 2, 2352-3964
- Tampe** B, Steinle U, Tampe D, Carstens JL, Korsten P, Zeisberg EM, Müller GA, Kalluri R, Zeisberg M (2017): Low-dose hydralazine prevents fibrosis in a murine model of acute kidney injury-to-chronic kidney disease progression. *Kidney Int* 91, 157–176
- Tang** WW, Van GY, Qi M (1997): Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. *Kidney Int* 51, 926–931
- Teichman** SL, Unemori E, Teerlink JR, Cotter G, Metra M (2010): Relaxin: Review of Biology and Potential Role in Treating Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep* 7, 75–82
- Tomasek** JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349–363
- Ucero** AC, Benito-Martin A, Izquierdo MC, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ramos AM, Berzal S, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A (2013): Unilateral ureteral obstruction: beyond obstruction. *Int Urol Nephrol* 46, 765–776
- Unemori** EN, Pickford LB, Salles AL, Piercy CE, Grove BH, Erikson ME, Amento EP (1996): Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo. *J Clin Invest* 98, 2739–2745
- USRDS** (United States Renal Data System) **2013 Annual Data Report**: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013. <https://www.usrds.org/atlas13.aspx> (Zugriff am 28.10.2017)
- Vanholder** R, Van Laecke S, Glorieux G (2008): What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol Berl*

Ger 23, 1211–1221

Vanholder R, Fouque D, Glorieux G, Heine GH, Kanbay M, Mallamaci F, Massy ZA, Ortiz A, Rossignol P, Wiecek A, et al. (2016): Clinical management of the uraemic syndrome in chronic kidney disease. *Lancet Diabetes Endocrinol* 4, 360–373

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ (2000): Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 257, 180–189

Waddington CH (1968): Towards a theoretical biology. *Nature* 218, 525–527

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D (2007): Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39, 457–466

Weinhold B (2006): Epigenetics: The Science of Change. *Environ Health Perspect* 114, A160–A167

Wenzel U, Wolf G (2005): Blutdruckunabhängige Wirkungen von Antihypertensiva. *Internist* 46, 548–556

Whaley-Connell A, Sowers JR, McCullough PA, Roberts T, McFarlane SI, Chen S-C, Li S, Wang C, Collins AJ, Bakris GL, KEEP Investigators (2009): Diabetes mellitus and CKD awareness: the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 53, S11–21

Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP (2001): Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut* 49, 577–583

Wilson SS, Ayaz SI, Levy PD (2015): Relaxin: A Novel Agent for the Treatment of Acute Heart Failure. *Pharmacother J Hum Pharmacol Drug Ther* 35, 315–327

Yamashita H, Ichijo H, Grimsby S, Morén A, ten Dijke P, Miyazono K (1994): Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269, 1995–2001

Yang H-C, Zuo Y, Fogo AB (2010): Models of chronic kidney disease. *Drug Discov Today Dis Models* 7, 13–19

Zeisberg EM, Zeisberg M (2013): The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol* 229, 1096–9896

Zeisberg M, Kalluri R (2013): Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 304, C216–C225

Zeisberg M, Zeisberg EM (2015): Precision renal medicine: a roadmap towards targeted kidney fibrosis therapies. *Fibrogenesis Tissue Repair* 8, 16

Zhang Q, Yin S, Liu L, Liu Z, Cao W (2016): Rhein reversal of DNA hypermethylation-associated Klotho suppression ameliorates renal fibrosis in mice. *Sci Rep* 6, 2045–2322

Zhao G-Q (2003): Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 35, 43–56

Zhou D, Liu Y (2016): Renal fibrosis in 2015: Understanding the mechanisms of kidney fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 12, 68–70

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Michael Zeisberg für die Überlassung des Themas, die Unterstützung und die konstante Betreuung während der Durchführung der Experimente und der Erstellung dieser Dissertation danken.

Ein besonderer Dank gebührt darüber hinaus Herrn Dr. med. Björn Tampe. Seine konstruktiven und wertvollen inhaltlichen Anmerkungen, die außerordentliche Unterstützung bei der Planung, Umsetzung und Auswertung der Experimente haben wesentlich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen. Insbesondere danke ich für die ausgezeichnete Hilfestellung bei der Korrektur dieser Dissertation.

Ein großer Dank gilt außerdem den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Annika Faust, Frau Anika Krüger und Frau Sarah Rinkleff für die professionelle Einarbeitung in die Methodik der Laborarbeiten, ihren konstanten fachlichen und moralischen Beistand bei der Durchführung vieler Experimente sowie den täglichen kollegialen Austausch.

Ein weiterer Dank gebührt meiner Doktorandenvorgängerin Frau Dr. med. Friederike Klöpper für ihre große Unterstützung bei der Einarbeitung in die Zellkultur sowie ihre differenzierten und konstruktiven Ratschläge. Unser Austausch über inhaltliche und organisatorische Fragestellungen hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Mein Name ist Friederike Hesse, ich wurde am 02. Juni 1992 in Göttingen als ältestes Kind von Jörg Hesse und Kerstin Hesse geboren.

Von 1998 bis 2002 besuchte ich die Grundschule in Elliehausen und im Anschluss daran die Orientierungsschule (Jahnschule) in Göttingen von 2002 bis 2004. Anschließend wechselte ich auf das Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen, an dem ich meine schulische Ausbildung im Juni 2011 mit dem Abitur abschloss.

Zum Wintersemester 2011/12 begann ich mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen, an der ich 2013 die Physikums-Prüfung mit der Note 2,0 ablegte. Im Februar 2015 begann ich meine Dissertation in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Michael Zeisberg in der Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen.

Das reguläre Studium der Humanmedizin nahm ich zum Wintersemester 2015/16 wieder auf und absolvierte im Frühjahr 2017 das 2. Staatsexamen (M2) mit der Note 2,0. Ab Mai 2017 trat ich in das Praktische Jahr ein. Zuerst absolvierte ich das Innere-Medizin-Tertial in der Kardiologie und Nephrologie in Großbritannien (King's College London und University of Aberdeen), darauf folgte mein Wahlfach in der Radiologie, welches ich zur Hälfte in der Strahlentherapie an der UMG und in St. Gallen, Schweiz (diagnostische Radiologie) verbrachte. Das letzte Tertial der Chirurgie absolvierte ich erneut an der UMG. Im Mai 2018 legte ich das Dritte Staatsexamen (M3) mit der Note 1,0 ab und erlangte die Approbation zur Ärztin.