

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

**Epigenetische Therapie mit niedrig dosiertem Hydralazin verhindert
die Progression vom akuten ins chronische Nierenversagen im
Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Ulrike Steinle

aus

Heilbronn

Göttingen 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

Referent/in: Prof. Dr. med. M. Zeisberg

Ko-Referent/in: Prof. Dr. Dr. Alfred Neeße

Drittreferent/in: Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 30. Oktober 2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „epigenetische Therapie mit niedrig dosiertem Hydralazin verhindert die Progression vom akuten ins chronische Nierenversagen im Mausmodell“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

INHALTSVERZEICHNIS	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 EINFÜHRUNG NEPHROPATHIEN	3
1.2 AKUTES NIERENVERSAGEN	6
1.2.1 THERAPEUTISCHE ANSÄTZE BEI DER PROGRESSION VOM AKUTEN INS CHRONISCHE NIERENVERSAGEN	8
1.2.2 EPIGENETISCHE DETERMINANTEN DER NIERENFIBROSE	9
1.3 DEMETHYLIERUNG ALS THERAPEUTISCHER ANSATZ	11
1.3.1 5'-AZACYTIDIN	11
1.3.2 HYDRALAZIN	11
1.4 MAUSMODELLE DES AKUTEN NIERENVERSAGENS OHNE BZW. MIT PROGRESSION INS CHRONISCHE NIERENVERSAGEN	13
1.5 ZIELSETZUNG	15
2. MATERIALIEN UND METHODEN	16
2.1 MATERIAL	16
2.1.1 GERÄTE	16
2.1.2 CHEMIKALIEN	17
2.1.3 FÄRBECHEMIKA LIEN	17
2.1.4 GEBRAUCHSMATERIALIEN	18
2.1.5 KITSYSTEME	19
2.1.6 ANTIKÖRPER	20
2.1.7 PRIMER RTPCR	20
2.1.8 STIMULANZIEN	20
2.1.9 ALLGEMEINE PUFFER UND LÖSUNGEN	20
2.1.10. OPERATIONS MATERIALIEN	22
2.2 METHODEN	23
2.2.1 VORBEREITUNG GEWEBESCHNITTE	23
2.2.2 IMMUNFLOURESZENZ	23
2.2.3 IMMUNHISTOCHEMIE	25
2.2.4 MASSON-TRICHRUM (MTS)-FÄRBUNG	26
2.2.5 HÄMATOXYLIN-EOSIN (HE)-FÄRBUNG NACH MAYER	26
2.2.6 PERIODIC-ACID-SCHIFFS (PAS)-FÄRBUNG	27
2.2.7 ZELLKULTUR	28
	1

1. Einleitung

2.2.8 IMMUNOPREZIPITATION METHYLIERTER UND HYDROXYMETHYLIERTER DNA (MEDIP/hMEDIP)	29
2.2.9 <i>WILD</i> TYP-MAUSLINIE	31
2.2.10 AUSWERTUNG	33
3. ERGEBNISSE	35
3.1 <i>IN-VITRO</i>-STIMULATIONSVERSUCH AN PRIMÄREN FIBROBLASTENKULTUREN	35
3.2 EPIGENETISCHE THERAPIE MIT NIEDRIG-DOSIERTEM HYDRALAZIN VERRINGERT DEN ÜBERGANG VOM AKUTEN INS CHRONISCHE NIERENVERSAGEN UND DIE INTRARENALE FIBROBLASTENAKKUMULATION	37
3.3 ÜBERGANG VOM AKUTEN INS CHRONISCHE NIERENVERSAGEN UNTER SCHWERER IRI IST MIT <i>RASAL1</i>-PROMOTERMETHYLIERUNG ASSOZIIERT	42
3.3.1 ABERRANTE <i>RASAL1</i> -PROMOTERMETHYLIERUNG ALS EPIGENETISCHER FAKTOR DER FIBROSEREGULATION	42
3.3.2 NACHWEIS EINES TET3-VERMITTELTEN DEMETHYLIERUNGSMECHANISMUS UNTER NIEDRIG DOSIERTER HYDRALAZINTHERAPIE	43
4. DISKUSSION	44
4.1 <i>RASAL1</i>-PROMOTERMETHYLIERUNG ALS SCHLÜSSELROLLE DER PROGRESSION VOM AKUTEN INS CHRONISCHE NIERENVERSAGEN	44
4.2 HYDRALAZIN ALS THERAPEUTISCHE INTERVENTION MIT INDUKTION TET3-VERMITTELTHER HYDROXYMETHYLIERUNG	44
4.3 DARSTELLUNG DER KORRELATION VON FIBROSIERUNGSKOMPONENTEN NIERENKRANKER PATIENTEN	45
4.4 MEDIKAMENTÖSER EINGRIFF INS RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM UND SEIN EINFLUSS AUF DAS AKUTE NIERENVERSAGEN	47
5. ZUSAMMENFASSUNG	48
6. ANHANG	50
6.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	50
6.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	51
6.3 TABELLENVERZEICHNIS	52
7. LITERATURVERZEICHNIS	53

1. Einleitung

1.1 Einführung Nephropathien

Bei dem Begriff Nephropathie handelt es sich um eine durch verschiedene Faktoren verursachte Nierenfunktionseinschränkung. Zwei wichtige Komponenten stellen hierbei das akute und das chronische Nierenversagen dar (Venkatachalam et al. 2010; Thadhani et al. 1996; Chawla et al. 2014). Früher wurden diese als zwei eigenständige Krankheitsbilder betrachtet, heute ist bekannt, dass sie im Zusammenhang miteinander stehen. Patienten mit bereits bestehendem chronischen Nierenschaden sind prädisponiert, ein akutes Nierenversagen zu entwickeln, und die akute Niereninsuffizienz beschleunigt die Progression des chronischen Nierenversagens (Venkatachalam et al. 2010). Diese ist somit als Risikofaktor für die Entstehung einer chronischen Niereninsuffizienz anzusehen (Venkatachalam et al. 2010).

Das histopathologische Korrelat einer chronischen Niereninsuffizienz ist die sogenannte tubulointerstitielle Fibrose der Niere. Hierbei handelt es sich um einen vermehrten Bindegewebsumbau des physiologischen Nierenparenchyms, welcher progredient zum völligen Funktionsverlust führen kann und somit in einem terminalen Nierenversagen endet. Der zugrundeliegende Mechanismus der Nierenfibrose ist die Aktivierung und proliferative Expansion von residenten Fibroblasten, welche zur vermehrten Bildung extrazellulärer Matrix beisteuern, die sich zwischen den Zellen ansammelt (Zeisberg et al. 2000). Diese Umwandlung von Fibroblasten zu sogenannten Myofibroblasten, auch als Transdifferenzierung bezeichnet, ist mit kontraktilen Eigenschaften durch Induktion zytoskeletaler Funktionsproteine wie alpha-Glattmuskelzellaktin (englisch *alpha-smooth muscle actin*) assoziiert (Strutz und Zeisberg 2006). Zu den Komponenten der extrazellulären Matrix zählen verschiedene Kollagene (Typen 1, 3 und 4), Fibronectin und Proteoglykane. Obwohl die Niere bei Schädigung einen eigenen Reparaturmechanismus besitzt, kann sie diesen nicht immer vollständig realisieren, sodass durch Chronifizierung des Schadens tubulointerstitielle Fibrosierung entsteht. Obwohl die aktivierten Fibroblasten normalerweise nach adäquater Regeneration des Gewebes in ihren Ruhezustand zurückkehren, kommt es bei einer Fibrose zum beständigen Aktivierungszustand dieser Fibroblasten, welcher autonom von externen Stimuli fortbesteht (Rodemann und Müller 1991; Rockey et al. 2015). Dieser Aktivierungszustand ist so stabil, dass sie selbst in Zellkulturen den aktivierten Phänotyp mit erhöhter intrinsischer proliferativer Aktivität beibehalten und weiterhin extrazelluläre Matrix produzieren (Rodemann und Müller 1991).

1. Einleitung

Pathophysiologisch ist das Zytokin *transforming growth factor-beta 1* (TGF- β 1) ein relevanter Regulationsfaktor, welcher die Nierenreparatur steuert (Zeisberg und Zeisberg 2013). TGF- β 1, welches Mitglied der aus insgesamt drei Isoformen bestehenden TGF- β -Superfamilie ist, spielt eine essentielle Rolle bei der Regulation des Wachstums und der Differenzierung von Zellen (Massagué et al. 2000). Die übergeordnete Superfamilie des TGF- β beinhaltet viele weitere Angehörige, zu denen unter anderem Activine, Inhibine, *bone morphogenetic proteins* und weitere zählen (Meno et al. 1996; Zhao 2003), die auch weitgehend für die Regulation von Zelldifferenzierung und -wachstum verantwortlich sind. Das als erstes Mitglied isolierte TGF- β 1 (Massagué 1990) wird als Schlüsselprotein von Fibrosierungsprozessen angesehen (Meng et al. 2015). TGF- β 1 bindet an seinen TGF- β 1-Rezeptor, eine Serin-/Threoninkinase, wodurch die Rezeptorsubstrate Smad2 und Smad3 phosphoryliert werden und zusammen mit Smad4 einen Komplex bilden, welcher einen signifikanten Einfluss auf profibrotische Zielgene im Zellkern hat. Zusammenfassend betrachtet spielt die TGF- β 1/Smad-Signalkaskade eine tragende Rolle in der Entstehung renaler Fibrosierung und somit des chronischen Nierenversagens, wie in Mausmodellen bestätigt wurde (Meng et al. 2015).

Das Maß der tubulointerstitiellen Veränderungen bzw. Fibrosierung gilt als bester Prädiktor in Bezug auf Nierenfunktion und deren prognostischen Verlauf. Verschiedene Faktoren verhindern die vollständige Regeneration des funktionellen Nierenparenchyms. Dazu zählen der Zellzyklusarrest, interstitielle Inflammation und die Reduktion des mikrovaskulären Endothels, welche zur Akkumulation aktivierter Fibroblasten führt und somit in einer Fibrose resultiert (Schlondorff 2008; Venkatachalam et al. 2010; Yang et al. 2010; Bonventre 2014). So kommt es in der chronischen Niereninsuffizienz zu Störungen im Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt sowie des Säure-Basen-Gleichgewichts und zu einer Abnahme inkretorischer Funktionen (Sekretionsabnahme von Erythropoetin, Renin, aktiviertem Vitamin D und Prostaglandinen) mit toxischen Organschäden durch die Akkumulation harnpflichtiger Substanzen.

Epidemiologisch leiden 7,3% der Allgemeinbevölkerung unter einer chronischen Nierenfunktionseinschränkung (<http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/bedeutung-der-nierenheilkunde.html>). Die Kosten der chronischen Niereninsuffizienz belaufen sich hierbei jährlich auf etwa 3 Milliarden Euro, was diese zu einem sozioökonomischen und gesundheitspolitischen Problem macht. Die meisten Patienten stellen sich erst im fortgeschrittenen Stadium des chronischen Nierenversagens einem Nephrologen vor, sodass die Nierenfunktionsstörung nicht mehr gänzlich aufgehalten werden kann. Schreitet diese weiterhin fort, so kommt es letztendlich zu einer terminalen Niereninsuffizienz mit Notwendigkeit einer Nie-

1. Einleitung

renersatztherapie. Derzeit beläuft sich die Anzahl an Patienten in chronischer Dialysebehandlung in Deutschland auf ca. 80.000 (<http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/dialyse.html>). Das Verfahren der Nierentransplantation, welches für viele Patienten die letzte Instanz für Genesung bedeutet, ist immer noch durch eine geringe Organspendebereitschaft der Gesellschaft limitiert (<http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich/dialyse.html>). Deshalb ist es wichtig, durch Präventionsmaßnahmen früh in die Progression des Nierenfunktionsverlustes einzugreifen und diese zu verhindern.

Das chronische Nierenversagen wird durch die CGA-Klassifikation in verschiedene Schweregrade eingeteilt. Die Abkürzung CGA steht für Causa, glomeruläre Filtrationsrate und Albuminurie, welche wiederum in verschiedene Stadien eingeteilt werden. In der folgenden *Abbildung 1* sind die Stadien, basierend auf den KDIGO-Kriterien, aufgeführt (Levey 2012).

Stadieneinteilung des chronischen Nierenversagens				Albuminurie-Stadium Angabe in mg/g		
				A1 optimal und hochnormal <30	A2 hoch 30-300	A3 sehr hoch und nephrotisch >300
GFR-Stadium Angabe in ml/min	G1	hoch und optimal	<105			
			90-104			
	G2	mild	75-89			
			60-74			
	G3a	mild-moderat	45-59			
	G3b	moderat-schwer	30-44			
	G4	schwer	15-29			
G5	Nierenversagen	<15				

Abbildung 1: Entwicklung eines chronischen Nierenversagens nach den KDIGO-Kriterien

1. Einleitung

1.2 Akutes Nierenversagen

Beim akuten Nierenversagen handelt es sich um einen schnell einsetzenden Abfall der renalen Funktion, welcher bei etwa 10% aller intensivpflichtigen Patienten vorkommt (<http://www.dgfn.eu/patienten/was-nieren-krank-macht/akutes-nierenversagen.html>). Dabei steigt das Serumkreatinin um über 50% des Ausgangswertes an (Keller und Geberth 2007). Es liegt meist eine verminderte Harnausscheidung vor (<500 ml Urin/Tag = Oligurie, <100 ml Urin/Tag = Anurie). Die Folgen davon sind Störungen im Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt sowie des Säure-Basen-Gleichgewichts. Die Ursachen für das Eintreten eines akuten Nierenversagens sind hauptsächlich der septische (47%) und kardiale (27%) Schock, große chirurgische Eingriffe (34%) und die Hypovolämie (26%) (Harty 2014).

In *Abbildung 2* sind die Ursachen des akuten Nierenversagens in drei Kategorien unterteilt. Nur ein Drittel der postoperativ auftretenden akuten Nierenversagen sind reversibel, der übrige Anteil entwickelt ein chronisches Nierenversagen, wovon 1% eine dauerhafte Nierenerersatztherapie benötigen.

Prärenale Ursachen (Minderperfusion)	Intrarenale Ursachen	Postrenale Ursachen
<u>Volumenverlust</u> : Blutverlust, Dehydratation <u>Hypotension</u> : Sepsis, Medikamente, Herzinsuffizienz	<u>Renaler Schaden</u> : Nephritis, Glomerulonephritis, Vaskulitiden, Tubulusschaden	Ureterobstruktion Blasenausgangsstenose

Abbildung 2: Ursachen des akuten Nierenversagens modifiziert nach John Harty (Harty 2014).

In der folgenden *Abbildung 3* ist die Einteilung des akuten Nierenversagens, basierend auf den KDIGO-Kriterien, beschrieben (Levey 2012).

Die Einteilung besteht aus zwei Komponenten:

RIFLE- Kriterien (Risk, Injury, Failure, Loss, Endstage renal disease)

AKIN - Stadien (Acute Kidney Injury Network)

Die AKIN-Stadieneinteilung entstand zur Verkürzung und Vereinfachung der RIFLE-Kriterien.

1. Einleitung

Stadieneinteilung des akuten Nierenversagens			
RIFLE	AKIN	Serum-Kreatinin	Urin-Ausscheidung
Risk	1	RIFLE/AKIN: 1,5-2,0 x Kreatinin↑ AKIN: Kreatininanstieg um 0,3 mg/dl innerhalb 48 h	<0,5 ml/kg KG/h über 6 h
Injury	2	2,0 - 3,0 x Kreatinin↑	<0,5 ml/kg KG/h über 12 h
Failure	3	>3 x Kreatinin↑ oder Kreatinin >4 mg/dl + akuter Anstieg ≥0,5 mg/dl	<0,3 ml/kg KG/h über 24 h oder Anurie (fehlende Urinausscheidung) über 12 h
Loss	-	Nierenversagen für >4 Wochen	-
ESRD	-	Nierenversagen für >3 Monate	-

Abbildung 3: Einteilung des akuten Nierenversagens basierend auf KDIGO-Kriterien.

In der *Abbildung 4* wird daraus resultierend das akute Nierenversagen in drei verschiedene klinische Verläufe nach einem nierenschädigenden Ereignis eingeteilt.

Der Verlauf der oberen grünen Linie beschreibt die vollständige Regeneration der Nierenfunktion nach einem schädigenden Ereignis ohne bleibende Folgen. Im Gegensatz dazu zeigt der darunterliegende rote Verlauf eine unmittelbar nach dem Schaden auftretende progrediente Abnahme der Nierenfunktion, also einen Übergang vom akuten ins chronische Nierenversagen. Massive Beeinträchtigung und den schwersten Verlauf zeigt die blaue Linie, die schon während des Schadens im vollständigen Nierenversagen endet.

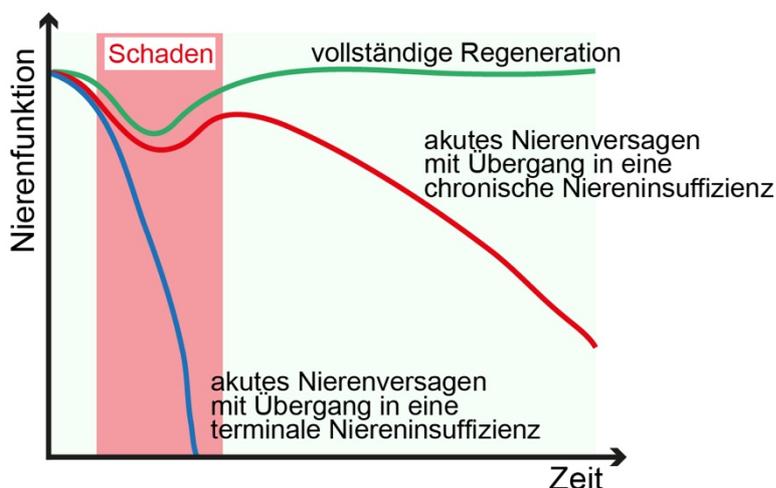


Abbildung 4: Schematische Verläufe des akuten Nierenversagens modifiziert nach John Harty (Harty 2014).

1. Einleitung

1.2.1 Therapeutische Ansätze bei der Progression vom akuten ins chronische Nierenversagen

Für eine adäquate Behandlung ist es aus klinischer Sicht relevant, den Übergang vom akuten Nierenversagen in eine chronische Nierenfunktionseinschränkung zu vermeiden (Lo et al. 2009). Zu den schützenden und protektiven Maßnahmen gehört das adäquate Einhalten bestimmter Blutdruckwerte. Internationale Richtlinien empfehlen bei Patienten mit unkompliziertem Hypertonus einen Zielwert von $\leq 140/90$ mmHg, bei diabetischen und niereninsuffizienten Patienten einen Zielwert von $\leq 130-139/80-85$ mmHg (Herold 2013). Andernfalls kommt es zu einer hypertensiven renalen Schädigung: Intraglomerulärer Hypertonus führt zu Proteinurie, welche direkt nephrotoxische Eigenschaften besitzt und einen Nierenfunktionsverlust induziert (Herold 2013).

Zu den physiologischen, körpereigenen Mechanismen der Blutdruckregulation gehört das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), das medikamentös durch sogenannte RAAS-Inhibitoren (Renin-Antagonisten, ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptor-Blocker) gehemmt werden kann (siehe *Abbildung 5*). Sie zählen zu den Antihypertensiva der ersten Wahl bei Patienten mit chronischem Nierenversagen, insbesondere bei ausgeprägter Proteinurie. In Kombination mit Diuretika und Calcium-Antagonisten senken sie die Hypertonie, die Proteinurie und erhalten renale Funktionen (Wenzel 2005).

Ursache dieser renalen Funktionsabnahme ist unter anderem die renale Hypoxie, welche oxidativen Stress induziert und durch die Bioverfügbarkeit von RAAS-Komponenten kompensiert werden kann. Um diese Verfügbarkeit aufrechtzuerhalten, wird das Absetzen von RAAS-Inhibitoren empfohlen (Efrati et al. 2012). Deshalb wird im Klinikalltag vor chirurgischen Eingriffe versucht, solche Medikamentengruppen präemptiv abzusetzen, um das Risiko eines akuten Nierenversagens zu verringern (Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI) et al. 2017)

1. Einleitung

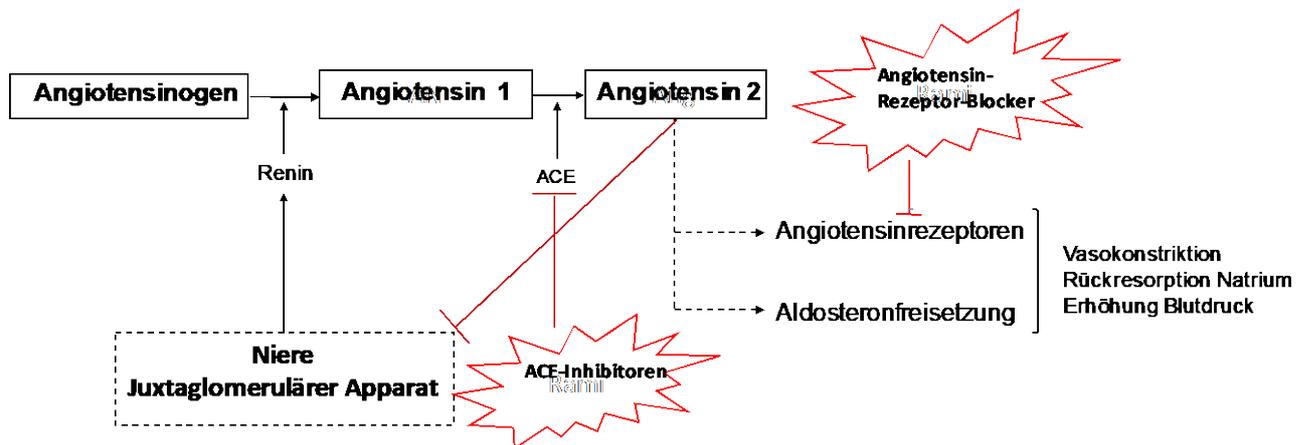


Abbildung 5: Renin-Angiotensin-System.

Wie in *Abbildung 5* beschrieben, reguliert der Körper die Hypertonie renal über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System. Die Barorezeptoren des juxtaglomerulären Apparates der Niere registrieren die verminderte Durchblutung der glomerulären Gefäße. Die Niere schüttet reaktiv Renin aus, welches in den Epitheloidzellen der Media (juxtaglomeruläre Zellen) des Vas afferens gebildet wird. Renin wandelt hepatisch gebildetes Angiotensinogen in dessen aktive Form Angiotensin 1 um. Angiotensin-Converting-Enzym, welches in renalen und pulmonalen Epithelzellen gebildet wird, wandelt Angiotensin 1 in Angiotensin 2 um. Dieses wirkt vasokonstriktiv auf die postglomerulären Gefäße und stimuliert zusätzlich die ADH (antidiuretisches Hormon) - und Aldosteronausschüttung. Das Peptidhormon ADH baut in die Sammelrohrzellen der Niere Aquaporine ein, damit mehr Wasser resorbiert werden kann und folglich der Blutdruck steigt. Aldosteron induziert luminal den Einbau von Natriumkanälen, wodurch die Rückresorption steigt und reaktiv Wasser dem osmotischen Gradienten folgt. Im Austausch für Natrium wird Kalium sezerniert (Pacurari et al. 2014).

Ein klinikalltäglicher ACE-Hemmer ist Ramipril, welches auch deshalb in dieser Studie Verwendung fand. Das inaktive Prodrug wird nach Applikation hydrolysiert und durch Esterasen zum aktiven Ramiprilat gespalten.

1.2.2 Epigenetische Determinanten der Nierenfibrose

Die Epigenetik beschreibt stabile Veränderungen der genomischen DNA durch Methylierung oder Histonmodifikation, ohne die primäre DNA-Sequenz zu beeinflussen. Durch Methylierung, d. h. das Anbringen einer Methylgruppe an die menschliche DNA, wird diese modifiziert (Shames et al. 2007). Diesen Methylierungsprozess gibt es in Promoterregionen, welche ein genexpressiver DNA-Abschnitt darstellt und somit die Genervielfältigung beeinflusst.

1. Einleitung

Diese Promotorregionen sind durch einen Reichtum von CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Inseln gekennzeichnet, welche durch Übertragung von Methylgruppen an die C5-Position des CpG-Dinukleotids modifiziert werden. Diese Art der DNA-Modifikation dient im Allgemeinen zur Suppression von Genexpression und trägt kausal zu Fibrose und Tumoren bei (Sproul und Meehan 2013).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Zeisberg konnte das Gen *RASAL1* (Ras-Gap-like protein-1) identifiziert werden, welches in aktivierten Fibroblasten durch diese Promotormethylierung transkriptionell supprimiert wird. *RASAL1* hydrolysiert das aktive Ras-GTP in seine inaktive Form Ras-GDP, die Folge eines *RASAL1*-Verlustes ist eine Überaktivierung von endogenem Ras und konsekutiver Fibroblastenproliferation (siehe *Abbildung 6*) (Bechtel et al. 2010). Durch Normalisierung der *RASAL1*-Promotormethylierung und Restauration der *RASAL1*-Expression kann die Fibrose kausal vermindert werden (Bechtel et al. 2010; Tampe et al. 2014, S. 3; Tampe et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2015).

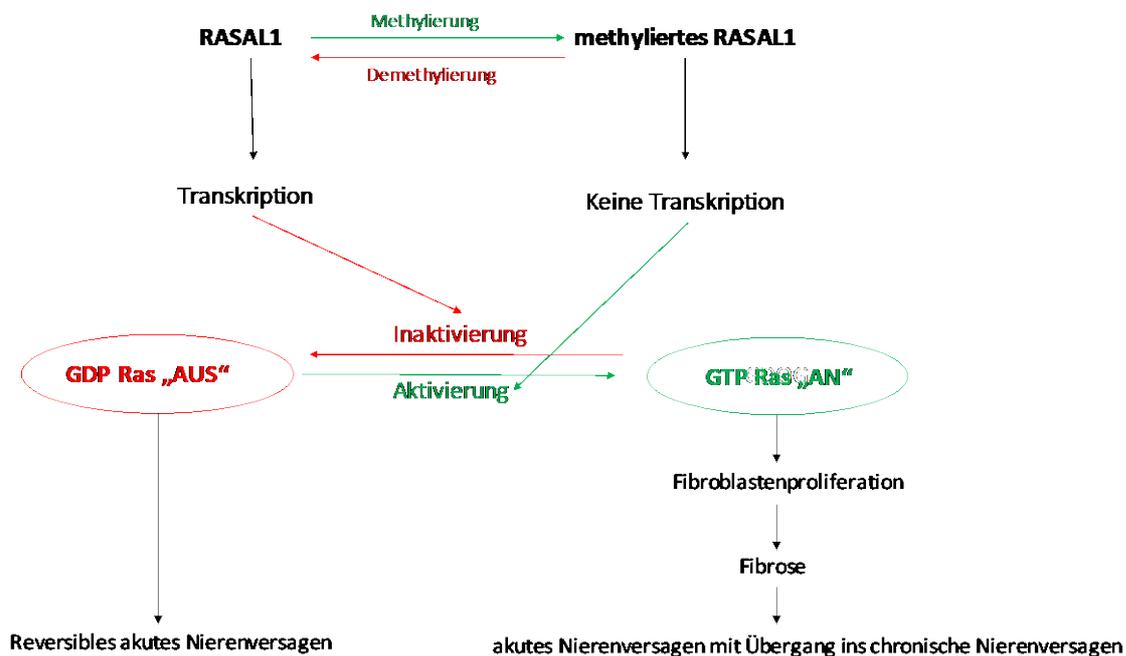


Abbildung 6: RASAL1 bei Fibroblastenaktivierung.

1.3 Demethylierung als therapeutischer Ansatz

1.3.1 5'-Azacytidin

5'-Azacytidin ist ein Zytostatikum, welches als Pyrimidin-Analogon fungiert und folglich die DNA- und RNA-Synthese hemmt, also ein sogenannter DNA-Methyltransferase Inhibitor (Jones und Taylor 1980). Durch diese Hemmung gelingt die aktive Verhinderung der DNA-Methylierung (Christman 2002), welche in der Therapie des myelodysplastischen Syndroms und der myeloischen Leukämie Verwendung findet, sofern keine Stammzelltransplantation möglich ist (Christman 2002). 5-Azacytidin weist dennoch ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil auf zu denen Thrombo-, Leuko- und Neutrozytopenien sowie gastrointestinale Problematik zählen. Die Therapie findet daher unter ärztlicher Aufsicht statt. 2009 erhielt es in Deutschland unter dem Handelsnamen Vidaza® als antineoplastisches Medikament seine Zulassung. Vorangegangene Studien der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass 5'-Azacytidin demethylierende Eigenschaften besitzt und die Nierenfibrose antagonisieren kann, indem es Gene wie beispielsweise *RASAL1* demethyliert und restaurieren kann (Bechtel et al. 2010, Tampe et al. 2015, S. 3).

1.3.2 Hydralazin

Hydralazin (synonym: 1-Hydrazinylphthalazine) wurde das erste Mal 1952 als Antihypertensivum eingeführt. Es wirkt vasodilatatorisch auf die glatte Muskulatur der arteriellen Gefäße, wobei der Mechanismus noch nicht vollständig bekannt ist. Es ist vom Dihydralazin (Handelsname Nepressol) zu unterscheiden. Die Applikation findet bei beiden Varianten oral statt, Hydralazin muss jedoch 4-5x/Tag und Dihydralazin nur 1-2x/Tag verabreicht werden. Früher war Hydralazin Bestandteil der standardisierten Dreifachtherapie Hydrochlorthiazid, Propranolol und Hydralazin (Leonetti et al. 1990). Seitdem ACE-Hemmer und Angiotensin-Rezeptor-Antagonisten jedoch Mittel der ersten Wahl sind, gilt Hydralazin als Reserveantihypertensivum und als Zweitlinientherapeutikum bei chronischer Herzinsuffizienz. Aufgrund seines günstigen Nebenwirkungsprofils findet es zudem während der Schwangerschaft Anwendung (Leonetti et al. 1990; Dries et al. 1999; McMurray et al. 2012; James et al. 2014; Farag et al. 2015; Zeisberg und Zeisberg 2015).

Tierexperimentelle Studien zeigten, dass niedrig dosiertes Hydralazin demethylierende Eigenschaften besitzt und somit methyliertes, also supprimiertes *RASAL1*, wieder restaurieren kann (Tampe et al. 2015). Dieser Demethylierungsmechanismus wird durch eine TET3-

1. Einleitung

induzierte Hydroxymethylierung ermöglicht und schon in Dosierungen erreicht, welche den Blutdruck nicht beeinflussen (Tampe et al. 2014, S. 3). *Ten-Eleven Translocation* 1-3 (TET1-3-Proteine sind DNA-Hydroxylasen, die enzymatische Aktivität an Position 5 der Cytosinbase besitzen und folglich eine wichtige Rolle bei der Genregulierung spielen (Wu und Zhang 2011). Sie wandeln 5-Methylcytosin in 5-Hydroxymethylcytosin um, welches mit transkriptioneller Induktion einhergeht (Ficz et al. 2011). Vorangegangene Studien zeigten, dass TET3 bei renaler Fibrose supprimiert ist, sodass *RASAL1* im inaktiven, hypermethylierten Zustand vorliegt. Im Gegenzug dazu konnte gezeigt werden, dass bei verminderter Fibrose TET3-Proteine vermehrt nachzuweisen sind und sie somit für den Demethylierungszustand von *RASAL1* durch Hydroxymethylierung verantwortlich sind (Tampe et al. 2014).

RASAL1-Promotormethylierung gilt als Determinante für die Nierenfibrose und stellt daher einen therapeutischen Angriffspunkt dar (Tampe et al. 2015). Diese demethylierenden Eigenschaften sind nicht auf die Niere beschränkt, zahlreiche Studien bestätigten auch die Hochregulation verschiedener Tumorsuppressorgene nach Beginn einer Hydralazintherapie, beispielsweise bei Mamma- und Cervixkarzinomen (Candelaria et al. 2007). Bezüglich der demethylierenden Therapie weist Hydralazin im Vergleich zu 5-Azacytidin günstigere Eigenschaften auf. Die orale Applikation von Hydralazin ist ohne ärztliche Aufsicht durchführbar und weist zudem ein günstigeres Nebenwirkungsprofil ohne Toxizität auf.

1.4 Mausmodelle des akuten Nierenversagens ohne bzw. mit Progression ins chronische Nierenversagen

Vorherige Studien haben bestätigt, dass eine zeitlich begrenzte renale Ischämie durch Unterbindung der renalen Perfusion ein stabiles tierexperimentelles Modell darstellt, welches typische Befunde einer akuten Nierenschädigung aufweist. Es demonstriert temperaturabhängig den Verlauf eines akuten, durch Ischämie induzierten Nierenversagens (Le Clef et al. 2016). Eine erhöhte Körpertemperatur bedeutet für den Stoffwechsel einen erhöhten Umsatz, sodass intrazelluläre Energiespeicher schneller verbraucht werden. Zusätzlich akkumulieren Abbauprodukte des Gewebeschadens, welche die Produktion freier Radikale induzieren und somit das Nierenparenchym weiter schädigen (Le Clef et al. 2016). Im Gegensatz dazu wirkt Hypothermie unter renaler Ischämie nephroprotektiv, anti-inflammatorisch und erniedrigt die vasculäre Permeabilität (Le Clef et al. 2016). Man unterscheidet deshalb die warme (38 °C) *ischemia reperfusion injury* (*severe IRI*) von der kalten (25 °C) Methode (*moderate IRI*). Grundlegend erhöht sich bei beiden einseitigen IRI-Modellen das Serumkreatinin als laborchemischer Marker für eine akute Nierenfunktionseinschränkung, welches an Tag 1 postoperativ seinen Höhepunkt erreicht. Im weiteren Verlauf wählen die Modelle unterschiedliche Wege: Beim *moderate IRI*-Modell nimmt der Serumkreatininspiegel zunehmend ab, bis an Tag 42 postoperativ eine komplette Normalisierung des Wertes als Ausdruck einer Rekompensation vorliegt. Anders verläuft es beim *severe IRI*-Modell, bei dem keine vollständige Normalisierung nach 42 Tagen als Ausdruck einer andauernden und chronifizierten Nierenfunktionseinschränkung stattfindet (Yang et al. 2010). Weitere Studien belegten auf epigenetischer Basis, dass im *severe IRI*-Modell eine *RASAL1*-Methylierung nachgewiesen werden kann, jedoch im *moderate IRI*-Modell nicht. Daher wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen *RASAL1*-Methylierung und den Verläufen der IRI-Modelle vermutet (*Abbildung 7*).

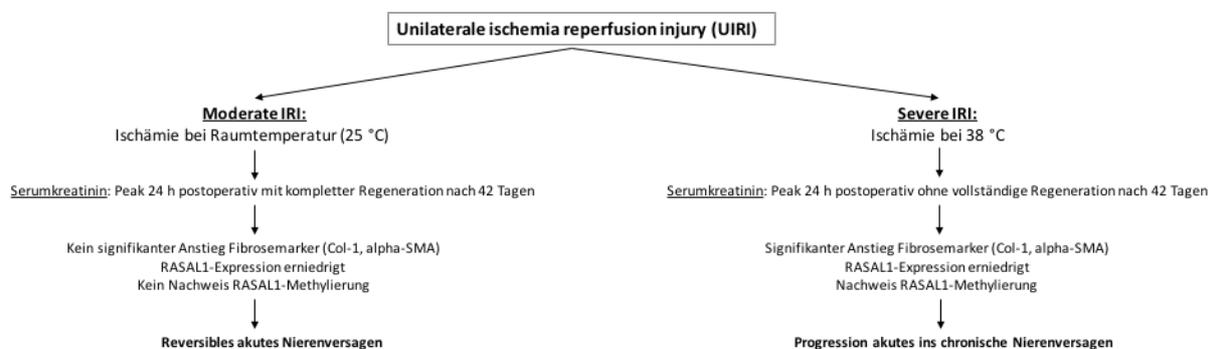


Abbildung 7: Schematische Gegenüberstellung des *moderate* und *severe* IRI.

1. Einleitung

In der unten folgenden *Abbildung 8* werden die beiden in *Abbildung 7* erläuterten UIRI-Modelle anhand der Nierenfunktion und der MTS-Gewebefärbung verdeutlicht (Yang et al. 2010). Es wird das drastische Ausmaß des Überganges vom akuten ins chronische Nierenversagen sowohl im Kreatininverlauf als auch in der MTS Übersichtsfärbung deutlich. In *Abbildung a* wird anhand des Kreatininverlaufes nach Nierenschaden dessen Funktion deutlich. Betrachtet man die beiden IRI-Modelle miteinander, wird klar, dass bei beiden unmittelbar nach der Schädigung das Kreatinin in den ersten 3 Tagen deutlich ansteigt, beim moderaten etwas weniger als beim *severe* IRI. Ausschlaggebend ist dennoch, dass sich beim moderaten IRI das Serumkreatinin nach 7 Tagen wieder normalisiert. Ein chronisch erhöhter Serumwert bleibt jedoch beim *severe* IRI erhalten, welcher die chronische Schädigung der Niere nach akutem Versagen zeigt.

Abbildung b ergänzt dazu die Gewebeübersicht dieser beiden Modelle, wobei der Schaden vom *severe* IRI signifikant ist, welcher den Progress vom akuten ins chronische Nierenversagen veranschaulicht.

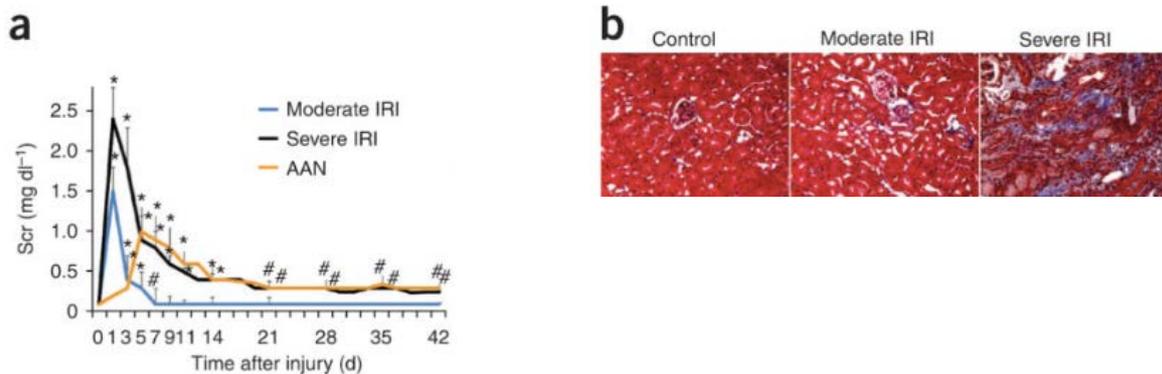


Abbildung 8: Kreatininverlauf und MTS-Färbungsübersicht beider *ischemia reperfusion injury*-Modelle (Yang et al. 2010b).

1.5 Zielsetzung

Das Ziel meiner Arbeit bestand anlehnend an die beschriebenen Vorarbeiten der Arbeitsgruppen Zeisberg darin, die Progression des akuten ins chronische Nierenversagen unter Therapie mit niedrig dosiertem Hydralazin und Ramipril zu untersuchen und einen kausalen Zusammenhang mit aberranter Promotormethylierung als therapeutischen Ansatz herzustellen.

Die Fragestellungen waren wie folgend:

- a. Kann die epigenetische Therapie mit Hydralazin aberrante *RASALI*-Promotermethylierung im Mausmodell des akuten Nierenversagens mit Übergang in eine chronische Niereninsuffizienz normalisieren?
- b. Inwieweit beeinflusst Hydralazin den funktionellen Verlauf und histopathologische Veränderungen in diesem?
- c. Kann Hydralazin den pro-fibrotischen Phänotyp aktivierter Fibroblasten normalisieren?
- d. Wie verhält sich im Gegensatz dazu der ACE-Inhibitor Ramipril unter den besagten Umständen?

2. Materialien und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaage TE2101	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav LGAK0027 Integra	Bioscience, Fernwald, Deutschland
Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator BB6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Dampfgarer	Braun, Kronberg, Deutschland
Eismaschine AF 80	Scotsman, Vernon Hills, USA
Floureszenzkamera Axiovert S100TV	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C Sanyo Ultra Low	Sanyo, Wood Dale, USA
Kühlschrank +4°C	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Lichtmikroskop BX43	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2165	Leica, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop 2000 Spektralphotometer	Thermoscientific, Waltham, USA
Perfect Spin P	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
RNA-Umschreibungscycler	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotamax 120 Plattformschüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sonicator	Misonix, New York, USA
Step one Plus Real-Time PCR-System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Sterilbank	Kojair, Vilppula, Finnland
Stickstofftank Apollo Biosafe	Messer Griesheim, Deutschland
The Belly Dancer	Stovall life science, Greensborg, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mikroliter R5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tissue Lyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trockenschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Vacuum Aspiration System	Ditabis, Pforzheim, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wärmebad GFL 1083	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland

2. Materialien und Methoden

Zellkultur Kojair, Vilppula, Finnland

2.1.2 Chemikalien

0,1M DTT	Invitrogen, Carlsbad, USA
5x First Strand Buffer P/N Y02321	Invitrogen, Carlsbad, USA
AED Substrate Chromogen Ready-to-use	Dako, Eching, Deutschland
Amphotericin B	Biochrom GmbH, Berlin Deutschland
Chloroform, Emplura	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Citrat Target Retrieval Solution pH6 (10x)	Dako, Eching, Deutschland
Citrat Target Retrieval Solution pH9 (10x)	Dako, Eching, Deutschland
DMEM Nährmedium	Life Technologies, Carlsbad, USA
dNTP 10mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco's PBS 141790-094	Life Technologies, Carlsbad, USA
Entellan Eindeckmedium	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99%	Walter CMP, Kiel, Deutschland
Fast SYBR Green Master Mix	Appliedbiosystems, Foster City, USA
FCS fetales Kälberserum	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Venlo, Niederlande
Oligo (dt)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin Streptomycin	Life Technologies, Carlsbad, USA
RNase Out Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase Zap Ambion	Thermo Scientific, Waltham, USA
Superscript	Invitrogen, Carlsbad, USA
Superscript Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Trizol Reagent	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin EDTA solution T4049	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.3 Färbechemikalien

HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung)

Eosin G-Lösung 0,5% wässrig X883.2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer T865.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere) >98%, rein	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2. Materialien und Methoden

PAS-Färbung (Periodic-acid-schiffsreaction)

Hämalaunlösung sauer nach Mayer T865.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Perijodsäurelösung 1% HP00.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schiffs Reagenz X900.1	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol (Isomere) >98%, rein	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

MTS-Färbung (Masson-Trichrom-Staining)

Anilinblau-Lösung HT154	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung HT151	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bouin's solution HT10132	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure Rotipuran 100%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphomolybdänsäure-Lösung HT153	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Phosphowolframsäure-Lösung HT152	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Weigerts Eisen-Hämatoxylinlösung Teil A HT107	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Weigerts Eisen-Hämatoxylinlösung Teil B HT109	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Gebrauchsmaterialien

8er Kettenreagenzgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Biosphere Filtertip 10, 100, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser 24x40 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24x60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Einbettkassetten 053765	Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland
Elektrische Pipette Pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Falcon 50 ml, steril Cellstar Tubes 227261	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland

2. Materialien und Methoden

Filter 0,22 µm, 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Flacon 15 ml, steril Cellstar Tubes	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Glaspipetten 747720	Brand, Wertheim, Deutschland
Handschuhe Gentle Skin Senitive	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Immu-Mount Shandon 9990402	Thermo Scientific, Waltham, USA
Injektionskanüle 1,2x40 mm	BD Microlance, New Jersey, USA
Injektionsspritze 5 ml	B.Braun AG, Melsungen, Deutschland
Labortücher Kimtech Science	Kimberly Clark, Roswell, USA
Manuelle Pipette Reference	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MicroAmp fast optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad, USA
Neubauer Zählkammer Tiefe 0,100 mm	Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Optical Adhesive Covers 4360954	Life Technologies, Carlsbad, USA
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagenzgefäß 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reagenzgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reagenzgefäß 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TC-Flasche Filter T75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Schalen 100, Cell+	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.5 Kitsysteme

DNeasy Blood & Tissue Kit 250	Qiagen,, Hilden, Deutschland
Epiquik™ Hydroxymethylated DNA Immunoprecipitation P-1038	Epigentek, NY, USA
Methylamp™ Methylated DNA Capture P-1015	Epigentek, NY, USA
Vectashield Mounting Medium for Fluoreszenz with DAPI	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Vectastain Universal Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

2. Materialien und Methoden

2.1.6 Antikörper

Alpha-SMA Kaninchen	Abcam, Cambridge, GB
Anti-5-Methylcytosin	Epigentek, New York, USA
Col-1 Kaninchen	Abcam, Cambridge, GB
Esel-Anti-Kaninchen	Life Technologies, Carlsbad, USA
RASAL-1	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.7 Primer rtPCR

mmRasal1mC-F	Eurofines, Freiburg, Deutschland
mmRasal1mC-R	Eurofines, Freiburg, Deutschland

2.1.8 Stimulanzen

Dimethylsulfoxide D8418-250ML	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hydralazine hydrochloride H1753-10G	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ramipril R0404-100MG	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
rhTGF-beta1 10 µg	R&D System, Wiesbaden, Deutschland

2.1.9 Allgemeine Puffer und Lösungen

10 x PBS:

ddH ₂ O	1000 ml
KH ₂ PO ₄	1,44 g
NA ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	7,59 g
NaCl	90,00 g

Blocklösung:

BSA	1 g
-----	-----

2. Materialien und Methoden

ddH₂O 100 ml

Peroxidaseblock

H₂O₂ 30% 50 ml

ddH₂O 450 ml

pH6-Citrat-Buffer

Citrat Target Retrieval Solution pH6 (10x) 5 ml

Destilliertes Aquadest 45 ml

pH9-Citrat-Buffer

Citrat Target Retrieval Solution pH9 (10x) 5 ml

Destilliertes Aquadest 45 ml

Einfriermedium

Dimethylsulfoxide D8418-250ML 10 ml

FCS fetales Kälberserum 40 ml

96% Ethanol

Destilliertes Aquadest 40 ml

Ethanol 99% 960 ml

Phosphomolybdän/Phosphowolframsäure

Destilliertes Aquadest 10 ml

Phosphomolybdänsäure-Lösung HT153 50 ml

Phosphowolframsäure-Lösung HT152 50 ml

1 x Wash Buffer hydroxyMeDIP

10x Wash Buffer 10 ml

Bidestilliertes Wasser 90 ml

2. Materialien und Methoden

2.1.10. Operationsmaterialien

Isoflouran 2-3%	Abbvie, Wiesbaden, Deutschland
Metamizol 3 ml/l Trinkwasser	Hexal, Holzkirchen, Deutschland
Micro vessel clip 8mm #56.85.07	Acland, Lidingö, Schweden
Nicht-resorbierbares Nahtmaterial Prolene 8706H	Johnson&Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland
Resorbierbares Nahtmaterial Vicryl V494H	Johnson&Johnson Medical, Norderstedt, Deutschland
Temgesic 0,1 mg/kg Körpergewicht	Indivior EU Ltd, Slough Berkshire, GB
Wärmeplatte OTS40	Medite, Burgdorf, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Vorbereitung Gewebeschnitte

Das über Nacht in Formaldehydlösung (Roti® Histofix) eingelegte Gewebematerial wurde durch 4-stündiges Waschen unter fließendem Leitungswasser vom Fixiermittel befreit und dann in einen Einbettautomaten gegeben, der eine aufsteigende Alkoholreihe (30 Minuten/Reihe) beinhaltet. Danach folgt die Inkubation in Chloroform und Ausgießen in 56 °C warmes, flüssiges Paraffin. Die dadurch entstandenen Paraffinblöcke wurden gekühlt und mit Hilfe eines Mikrotoms in 3 µm dicke Scheiben geschnitten. Die zarten Schnitte wurden in ein Wasserbad gegeben, sodass durch Auffangen mit einem Objektträger eine faltenfreie Platzierung möglich wurde. Die fertigen Schnitte trockneten über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator.

2.2.2 Immunfluoreszenz

Zur Reinigung der Schnitte musste das Gewebe vom Paraffin gereinigt werden. Diese Entparaffinierung erfolgt in Xylol (2x10min) und dann in absteigender Alkoholreihe (2x2 min in 100% EtOH, 1x2 min 95% EtOH, 1x2 min 70% EtOH, 1x2 min 50% EtOH und 1x2 min 30% EtOH) wie im folgendem schrittweise dargestellt ist:

Entparaffinierung:

1. Xylol	2x10 min
2. 100% Ethanol	2x 5 min
3. 95% Ethanol	5 min
4. 80% Ethanol	5 min
5. 50% Ethanol	5 min
6. 30% Ethanol	5 min
7. Aquadest	5 min

Nachdem das Gewebe erst 5 min in Aquadest und weitere 2x5 min in PBS auf einer Kippapparatur gewaschen worden war, erfolgte die Antigendemaskierung durch Citratpuffer (pH 6) im Dampfgerar für 40 min. Anschließend nach 10min Abkühlung der Schnitte war weiteres Waschen mit 2x5min in PBS notwendig. Zur Verhinderung unspezifischer Antigenbindung wurden die freien Bindungsstellen mittels BSA-Block (1%iger BSA-Block in PBS) für 30 min

2. Materialien und Methoden

inkubiert. Nachdem der Schnitt getrocknet und mit einem Fettstift umrandet worden war, erfolgte die Benetzung des Gewebeschnittes mit dem nach Datasheet verdünnten Primärantikörper, welcher über Nacht bei 4 °C inkubierte (50 µl/Schnitt).

Nachdem das Präparat am folgenden Tag 3x5 min in PBS gereinigt wurde, inkubiert der Sekundärantikörper (50µl/Schnitt) eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Dunkelkammer und wurde wieder 3x5 min in PBS gereinigt. Bei der Tet3-Färbung war ein weiterer Schritt vorgesehen: Die Konjugation eines weiteren Antikörpers (Kollagen-4), welcher nach der Sekundärantikörperinkubation über 3 Stunden bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer einwirkte und mit PBS abgewaschen wurde. Abschließend erfolgte das Eindecken mit Vecta Shield Mounting Medium, welches DAPI als Kernfärbung enthält. Die weitere Lagerung der fertig gefärbten Schnitte war bei 4 °C vorgesehen.

Antigen	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
Primärantikörper			Sekundärantikörper		
TET3	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Flour 568	1:200
Col-1	Kaninchen	1:200	Esel	Alexa Flour 488	1:200
α-SMA	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Flour 568	1:200

Tabelle 1: Primär-und Sekundärantikörper.

Primärantikörper: TET3 (T-13) Santa Cruz sc-139186 Lot: G2111
 α-SMA Sigma A5228-100UL Lot: 015M4884V
 Kollagen-1 Abcam 34710 Lot: GR212641-1

Sekundärantikörper: Alexa Flour 555 donkey anti-rabbit IgG A31572 Lot: 1134920
 Alexa Flour 568 donkey anti-rabbit life technologies Cat.No. A10042
 Alexa Flour 488 donkey anti-rabbit Lot: A21206, Ref: A21206

Konjugierter Antikörper: Goat Anti-Typ 4 Kollagen AF488 Cat.No. 1340-30

2. Materialien und Methoden

2.2.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie dient zur Anfärbung spezifischer Makromoleküle durch Antikörpermarkierung. Die Entparaffinierung erfolgte wie in der Immunfluoreszenz beschrieben. Nachdem die Schnitte weitere 5 min in bidestilliertem Wasser und 2x5 min in PBS gewaschen wurden, werden die Präparate in Citratpuffer (pH 6) für 40 min inkubiert, weitere 10 min abgekühlt und dann wieder 2x5 min in PBS behandelt. Der Unterschied zur Immunfluoreszenzfärbung ist hier die Behandlung der Schnitte mit einem Peroxidaseblock (20 min bei Raumtemperatur), welcher endogene Peroxidasen hemmt. Die folgenden Schritte erfolgen wieder gleich der Immunfluoreszenz: 1% BSA in PBS, Block auf die Schnitte pipettieren, 30 min in einer Feuchtkammer inkubieren und dann den Primärantikörper über Nacht bei 4 °C einwirken lassen.

Am folgenden Tag, nachdem die Schnitte 2x5 min in PBS gewaschen wurden, konnte der Sekundärantikörper (50 µl/Schnitt) für 30 min in der Feuchtkammer einwirken. Nach erneutem Waschen mit 2x5 min PBS wurde die im Kit enthaltenen ABC Lösung für weitere 30 min inkubiert und danach die Schnitte wiederholt 2x5 min in PBS gewaschen. Nach Inkubation mit dem Chromogen (AEC-Substrat) wurden die Präparate unter einem Mikroskop solange betrachtet, bis eine Rotfärbung zu sehen war. Sofortiges Zurückstellen der Schnitte in PBS stoppte die Chromogenreaktion. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin für 2 min und darauffolgendes Bläuen in Leitungswasser über 5 min. Die Eindeckung der Schnitte erfolgte mit Immu-Mount 300705 (Thermo Scientific).

Antigen	Ursprung	Verdünnung	
Primärantikörper			Sekundärantikörper
Rasal 1	Kaninchen	1:100	Vectastain Biotinylated Universal Antibody

Tabelle 2: Antikörper Rasal1.

2. Materialien und Methoden

2.2.4 Masson-Trichrom (MTS)-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung ermöglicht eine Darstellung des Bindegewebes durch Blaufärbung des Kollagens, welches sich im Vergleich vom rötlichen Zytoplasma deutlich abhebt.

Die Entparaffinierung und Bewässerung der renalen Mausschnitte erfolgte wie in der Immunfluoreszenzfärbung beschrieben, mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe.

Im Folgenden ist Schritt für Schritt die Färbung beschrieben.

1. Entparaffinierung
2. vorgewärmte Bouins Lösung (56 °C) 15 min
3. fließendes Leitungswasser 10 min
4. Weigerts Eisen-Hämatoxylinlösung 5 min
5. fließendes Leitungswasser 5 min
6. Bidest 3x spülen
7. Säurefuchsin 5 min
8. Bidest 3x spülen
9. Phosphomolybdän/Phosphowolframsäure 5 min
10. Anilinblau 10 min
11. Essigsäure kurz eintauchen
12. Bidest kurz eintauchen
13. 96% Ethanol 2x kurz eintauchen
14. 100% Ethanol 2x kurz eintauchen
15. Xylol 2x5 min
16. blasenfreies Eindecken mittels Entellan®

2.2.5 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Mayer

Zuerst wurden die Nierenschnitte wie in den oben genannten Färbungen entparaffiniert und bewässert. Die Kernfärbung erfolgte hier mit der Hämalaunlösung nach Mayer einmalig für 6 min und darauffolgendem Bläuen unter fließendem Leitungswasser für 10 min. Die Anfärbung des Zytoplasmas der Nierenzellen wurde durch Eosin mit pH5 erreicht, welches mit Aquadest abgespült und dann mit 96% Ethanol und 100% Ethanol entwässert wurde. Zuletzt erfolgte das Fixieren durch Xylol.

2. Materialien und Methoden

1. Entparaffinierungsschritte siehe Immunhistochemie
2. Hämalaun nach Mayer 6 min
3. fließendes Leitungswasser 10 min
4. Aquadestspülung
5. 96% Ethanol 1 min
6. 100% Ethanol 4 min
7. Xylol 2x5 min
8. blasenfreies Eindecken mittels Entellan®

2.2.6 Periodic-Acid-Schiffs (PAS)-Färbung

Die Periodic-Acid-Schiffs-Färbung dient der Darstellung kohlenhydratreicher Strukturen. Eine differenzierte Beurteilung tubulärer und glomerulärer Strukturen wird durch diese Färbemethode ermöglicht. Die Nierenschnitte wurden zuerst wie in den vorherigen Färbungen beschrieben, entparaffiniert und bewässert. Die anfangs benutzte 1% Perjodsäure induziert durch Oxidierung der freien Hydroxylgruppen der Saccharide zu Aldehydgruppen zusammen mit dem schwefelsauren Fuchsinrot, welches im Schiffs-Reagenz vorhanden ist, eine Verbindung und färbt sich somit an. Durch Abspülen der Perjodsäure mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Schiffs-Reagenz über 20 min. Danach wurden die Schnitte mit warmem Leitungswasser gewaschen. Die Kernfärbung wurde durch Hämalaun nach Mayer erreicht. Zum Schluss wurde wie in der HE-Färbung mit Ethanol gespült und mit Xylol fixiert.

1. Entparaffinierung siehe Immunhistochemie
2. Perjodsäure 1% 10 min
3. Leitungswasser 10 min
4. Aquadestspülung
5. Schiffsreagenz 20 min
6. warmes Leitungswasser 5 min
7. Hämalaun nach Mayer 5 min
8. fließendes Leitungswasser 10 min
9. 96% Ethanol 1 min
10. 100% Ethanol 4 min
11. Xylol 2x5 min
12. blasenfreies Eindecken mittels Entellan®

2. Materialien und Methoden

2.2.7 Zellkultur

Für den Zellkulturversuch nutzte ich isolierte primäre Fibroblasten aus murinen Nieren. Diese sind sehr sensibel, weshalb ich bei der Kultivierung das Nährmedium mit Antibiotikum und Antimykotikum versetzte. Als erstes zählte ich die Fibroblasten mithilfe der Neubauer Zählkammer aus und ließ sie in 20%-igem FCS-Medium (DMEM) mit 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin über sechs Stunden lang anwachsen. Nachdem sie sich adäquat an den Kulturboden gebunden hatten, wurden sie mit 5 ml PBS gewaschen, um die Zellen frei vom Medium zu bekommen, um sie dann in 5 ml Hungermedium mit 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Amphotericin zu inkubieren. Daraufhin erfolgte die Stimulation mit 0,5 µl/ml Medium TGF-β1 (20 ng/ml) alle 48 Stunden. Nach 5 Tagen TGF-β1-Stimulation erfolgte die Medikamentenbehandlung nach unten aufgeführtem Schema:

<u>TGF-β1:</u>	20 ng/ml	→ 0,5 µl/ml Medium (0,45 µm Filter)
<u>Ramipril:</u>	10 mg/ml in DMSO	→ 1 µl/ml Medium (0,45 µm Filter)
<u>Hydralazin:</u>	25 mg/ml in NFW	→ 2 µl/ml Medium (0,22 µm Filter)
<u>DMSO:</u>	1 µl/ml Medium (0,45 µm Filter)	

Die Medikamente wurden vor Gebrauch mit den angegebenen Materialien steril filtriert, um Kontaminationen der primären Fibroblastenkulturen zu vermeiden.

Die Zellkulturen wurden während des Versuches bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator mit 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂-Gehalt aufbewahrt.

10-cm-Schalen: 3 ml Medium/Schale, Aussaat 100.000 Zellen

Die Zellen wurden zur Detektion der Fibroblastenproliferation an den Tagen 5-7 von Dr. Björn Tampe mit dem Mikroskop Zeiss Axiovert S100TV fotografiert.

2.2.8 Immunoprecipitation methylierter und hydroxymethylierter DNA (MeDIP/hMeDIP)

DNA-Isolation

Die DNA-Isolation erfolgte mithilfe des DNeasy Blood & Tissue Kit (250) Cat. No.69506. Das in 25 mg schwere Stücke geschnittene Nierengewebe wurde zusammen mit 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup gegeben. Dadurch wurden Peptidbindungen gezielt aufgespalten. Die Proteinase K hat ihr Lysierungsoptimum bei 56°C über 12 h im Thermoblock. Nach Zugabe von weiteren 200 µl AL-Buffer und 200 µl Ethanol (96-100%) wurden die Proben auf eine Mini Spin Column pipettiert, bei 8.000 Umdrehungen pro Minute für 1 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Überführung der Säule in ein neues 2-ml- Cup wurden die Proben erneut mit 500 µl AW1-Buffer gewaschen, bei 8000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und das Eluat verworfen. Der letzte Waschschritt erfolgte mit 500 µl AW2-Buffer, 3 min Zentrifugation bei 14.000 Umdrehungen pro Minute, welche für 1 min bei verworfenem Überstand wiederholt wurde. Zuletzt löste 100 µl AE-Buffer nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation bei 8.000 Umdrehungen pro Minute die isolierte DNA von der Säule. Schlussendlich wurde die isolierte DNA-Konzentration mit dem Nanodrop 2000 von Peqlab gemessen.

MeDIP isolierter DNA

Für dieses Verfahren wurde das Kit MethylampTM Methylated DNA Capture Kit von Epigenetek verwendet. Bevor die isolierte DNA weiterverarbeitet werden konnte, wurde sie mit dem Sonicator mittels Ultraschallwellen in Fragmente von 500-1000 Basenpaarenlänge aufgetrennt. Dafür wurden 1 µg DNA pro Probe mit MC2 auf ein Endvolumen von 150 µl aufgefüllt und die Proben verarbeitet. Danach erfolgte die Denaturierung der DNA für 2 min bei 95°C und sofortige Aufbewahrung auf Eis. Währenddessen fand die Vorbereitung der Pipettierplatten statt. Pro Probe wurden 100 µl MC1 und 1 µl vom Antikörper anti-5mC in die Kammern pipettiert, mit Paraffin bedeckt und bei Raumtemperatur 60 min inkubiert, sodass der Antikörper an die Platte binden konnte. Nach der Bindung erfolgte die zweimalige Waschung der Platten mit 150 µl MC1 und MC3, und die Zugabe von 95 µl DNA pro Well. Zur adäquaten Bindung wurde die DNA für 120 min auf dem Belly Dancer bei 100 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Danach erfolgte ein erneutes Waschen mit 150 µl MC3, anschließend wurde pro Well die DNA mit 60 µl MC4 und 1 µl PK versetzt und bei 65°C im Wasserbad

2. Materialien und Methoden

für 60 min inkubiert. Zur weiteren Verarbeitung der DNA wurde sie mit 180 µl 100% Ethanol von der Platte gelöst und auf eine Säule mit 100 µl MC5 pipettiert. Diese wurde dann 20 s bei 12.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal mit 90%-igem Ethanol zum Aufreinigen der DNA wiederholt. Zum Schluss wurde die Säule in ein neues Eppendorf-Cup gegeben und mit 20 µl MC6 zentrifugiert.

Hydroxy-MeDIP isolierter DNA

Für dieses Verfahren wurde das Kit EpiQuik™ Hydroxymethylated DNA Immunoprecipitation (hMeDIP) verwendet. Ebenso wurde hier mithilfe des Sonicator durch Ultraschallwellen die isolierte DNA in Fragmente von 500-1000 Basenpaarenlänge aufgetrennt. Dafür war es erst nötig 1 µg DNA auf 100 µl Endvolumen mit HS aufzufüllen und auf Eis im Ultraschallbad zu behandeln. Danach erfolgte für 2 min die Inkubation bei 95°C und sofortiges Abkühlen auf Eis. Während dieses Vorgangs wurden die Pipettierplatten vorbereitet, indem pro Kammer 100µl AB mit 1 µl Anti-5-hmC Antikörper gegeben wurde. Die Abdeckung der Kammern mit Paraffinband und 60 min Inkubation des Antikörpers bei Raumtemperatur schloss die Vorbereitung der Platte ab. Zuerst war es nötig, die Kammern durch zweimaliges Spülen mit 200 µl Waschpuffer zu reinigen, um 95 µl DNA auf den gebundenen Antikörper zu pipettieren. Erneutes Abdecken mit Paraffinband und 90 min Inkubation auf einer Rüttelplatte bei 100 Umdrehungen pro Minute war für die Bindung des Antikörpers an die DNA notwendig. Daraufhin folgten mehrere Waschschrte: 5 x 200 µl Waschpuffer und 1 x 200 µl DRB. In jede Kammer erfolgte die Zugabe von 39 µl DRB und 1 µl Proteinkinase K und mit geschlossenem Deckel die Inkubation im Wasserbad bei 65 °C für 20 min. Die Proben wurden danach sofort in PCR-Strip überführt und bei 95°C für 3 min in den Cyclyer gegeben.

Real-Time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR)

Die Polymeraskettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) ist eine Möglichkeit, spezifische DNA-Fragmente zu amplifizieren. Durch Hitzedenaturierung wird der DNA-Doppelstrang in seine zwei Einzelstränge aufgetrennt, woran sich durch Abkühlung ausgewählte Primerpaare an die komplementären Basen anlagern können. Das Enzym DNA-Polymerase gilt als Startpunkt zur Anlagerung freier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) zur Synthese des komplementären DNA-Strangs (Saiki et al. 1988). Zusätzlich ermöglicht die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) (Higuchi et al. 1993) die Detektion des Vervielfältigungsprodukts in Echtzeit. Dafür wird ein Fluoreszenzfarbstoff reversibel in die

2. Materialien und Methoden

doppelsträngige DNA eingebaut und unter UV-Licht dargestellt. Das erhaltene Fluoreszenzsignal verhält sich proportional zur Menge der synthetisierten, doppelsträngigen DNA.

Zur Detektion methylierter und hydroxymethylierter *Rasal1*-DNA-Anteile diente die SYBR-Green basierte Amplifikation. Für die Amplifikation der DNA wurde eine Reaktionsflüssigkeit (25 µl pro PCR-Reaktion) erstellt, welche aus folgenden Komponenten bestand:

1. Primerpaare (je 300 nmol/l)
2. passiver Referenzfarbstoff ROX (Bio-Rad, Hercules, USA)
3. verdünnter 2x SYBR-Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, USA)

Als nächsten Schritt wurden 5 µl der vorbereiteten DNA mit der Reaktionsflüssigkeit in eine 96-Well-Platte pipettiert und unter Verwendung des Mx3000P QPCR System (Stratagene, Santa Clara, USA) detektiert. Als das Fluoreszenzsignal über den Fluoreszenzschwellenwert (threshold) anstieg, wurde die PCR-Reaktion gestoppt. Danach wurden die PCR-Produkte elektrophoretisch aufgetrennt und mithilfe des Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert. Diese elektrophoretischen Ergebnisse wurden als virtuelle Geldbilder dargestellt.

Oligonukleotide	Sequenz	Hersteller
mmRasal1mC-F	5'-CTGGCTCAGCCTCCTGTTCTG-3'	Eurofines
mmRasal1mC-R	5'-CAGACAACCCCGATCCAGGACC-3'	Eurofines

Tabelle 3 : Primersequenzen *Rasal1*.

2.2.9 Wildtyp-Mauslinie

Präoperative Vorbereitung

Die Mäuse wurden täglich zwei Wochen präoperativ und sechs Wochen postoperativ mit den Medikamenten behandelt, die in DMSO gelöst wurden.

Ramipril: 10 mg/kg Körpergewicht/Tag

Hydralazin: 5 mg/kg Körpergewicht/Tag

DMSO: 11% DMSO in PBS gelöst

2. Materialien und Methoden

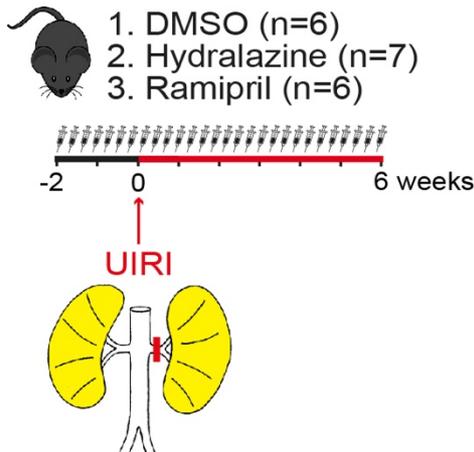


Abbildung 9: Ablauf Mausexperiment IRI

Operation

Alle operativen Eingriffe wurden von Herrn Dr. Björn Tampe durchgeführt. Acht bis zwölf Wochen alte Mäuse vom Genotyp *C57BL/6* wurden mit Isofluran-Inhalationsgas (2-3%) narkotisiert. Die Analgesie erfolgte durch eine subkutane Buprenorphinjektion. Der ventrale Körperteil der Maus wurde rasiert und desinfiziert. Dann erfolgte die Öffnung der Bauchdecke und die Präparation des linken Nierenhilus vom restlichen Gewebe. Dieser wurde mithilfe eines speziellen Gefäßclips 35 min abgeklemmt. Während dieser Ischämie wurde die Maus auf eine 38°C warme Platte gelegt. Nach der Entfernung des Clips und sichtlicher Reperfusion der Niere wurde die Bauchdecke wieder verschlossen, 1 ml warme Kochsalzlösung intraperitoneal zur Volumensubstitution injiziert und die Wunde verschlossen.

Postoperative Nachsorge und Sektion

Nach dem Eingriff wurden die Mäuse weiterhin für 42 Tage medikamentös behandelt. Am Ende der Studie wurden die Tiere zur Sektion vorbereitet. Sie wurden wieder mit Isofluran narkotisiert, sodass die Tötung mittels Genickbruch vollzogen werden konnte. Zur Entnahme der Nieren wurde das Abdomen eröffnet und die Organe gedrittelt. Der eine Teil wurde in ein Kryoröhrchen, der weitere Teil in Tissue-Tek® Cryomold®-Einbettform überführt. Für den Transport wurde das Material übergangsweise in flüssigem Stickstoff gelagert und dann bei -80°C kryokonserviert. Das letzte Drittel Gewebe diente der histologischen Konservierung, indem es in einer Einbettkassette in 4%-igem Formaldehyd (Roti® Histofix) fixiert wurde.

2.2.10 Auswertung

Auswertung histologischer Färbepreparate

Zur Analyse und Auswertung der PAS-, MTS- und immunhistologischen Färbung wurden die Schnitte am Lichtmikroskop Olympus BX43 mit der Kamera Olympus SC30 fotografiert und am Computer mithilfe der CellSens Dimension 1.6 Software ausgewertet. Es wurden pro Schnitt 10 zufällig gewählte Gesichtsfelder im Nierenkortex ausgewählt und ausgewertet.

MTS:

Zur Auswertung der einzelnen Gesichtsfelder diente ein exakt auf die Fläche passendes Raster mit $391 \times 10 \text{ mm}^2$ großen Quadraten. Meanderförmig wurden die blau gefärbten Kollagenfasern im interstitiellen Raum zwischen den Nierentubuli ausgezählt und ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Rasterquadrate gesetzt. Somit ergab sich für jedes der Gesichtsfelder ein Fibroseggrad, welcher dann durch alle 10 Gesichtsfelder gemittelt wurde.

Immunhistochemie:

Die Auswertung der immunhistochemisch auf RASAL1 gefärbten Gewebeschnitte erfolgte in 10 Gesichtsfeldern durch Zählung RASAL1-positiver interstitieller Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl aller interstitiellen Zellen pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung.

Immunfluoreszenz:

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte ebenso in 10 Gesichtsfeldern durch Zählung RASAL1-positiver interstitieller Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl aller interstitiellen Zellen pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung.

PAS:

Die Auswertung der PAS-gefärbten Nierenschnitte liefen über zwei verschiedene Sichtweisen ab. Zum einen gibt es einen Score der den Tubulusschaden in 4 Stadien einteilt (Score 0-3), der sogenannte Tubular Damage Score. Dafür werden 10 Gesichtsfelder/Niere betrachtet und die Schädigung von 0-3 eingeteilt. In *Abbildung 9* ist diese Einteilung näher beschrieben.

2. Materialien und Methoden

Tubuläre Schädigung	
Score 0	Kein sichtbarer Tubulusschaden
Score 1	Leichter Tubulusschaden, abgerundete Epithelzellen, leichte Tubulusdilatation
Score 2	Moderater Tubulusschaden, abgeflachte Epithelzellen, Tubulusdilatation, Verlust Bürstensaum
Score 3	Tubulusschaden mit Nekrose, Verlust Basalmembran

Abbildung 10: Tubular Damage Score modifiziert nach HAMAR.

Die zweite Einteilung betrachtet die Schädigung der Glomeruli, den sogenannten Glomeruloskleroseindex, der in 5 Grade eingeteilt wird (Grade 0-4). Für diese Einteilung wurden 20 Glomeruli/Schnitt betrachtet und graduiert. *Abbildung 10* beschreibt die Einteilung näher.

Glomerulärer Schädigung	
Grade 0	Physiologischer Glomerulus
Grade 1	Beginnende mesangiale Expansion
Grade 2	Beginnende Glomerulosklerose <50%
Grade 3	Glomerulosklerose >50% oder glomeruläre Halbmondformation
Grade 4	Diffuse Glomerulosklerose mit kapillärer Verkümmernung

Abbildung 11: Glomeruloskleroseindex modifiziert nach El Nahas et al.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Darstellung durch Balkendiagramme ermöglichte die GraphPad Prism-Software Version 5.00. Zur Analyse der verschiedenen Mittelwerte wurde in paarweisen Vergleichen ein Student's t-Test durchgeführt, bei multiplen Vergleichen ein ANOVA mit post-hoc-Analyse nach Bonferroni. Der dazugehörige p-Wert war ab einem Wert unter 0,05 als signifikant zu werten. Die Graphen dieser Studie sind mit folgenden Markierungen gekennzeichnet:

- * = $p < 0,05$
- ** = $p < 0,01$
- *** = $p < 0,001$
- **** = $p < 0,0001$

3. Ergebnisse

3.1 *In-vitro*-Stimulationsversuch an primären Fibroblastenkulturen

Zunächst wurde das Verhalten aktivierter primärer Fibroblastenkulturen durch die Behandlung mit Hydralazin und Ramipril bezüglich der Zellproliferation *in vitro* betrachtet. Es wurden folgende Ansätze durchgeführt:

1. Kontrolle: keine Stimulation mit TGF- β 1, keine Medikamententherapie
2. TGF- β 1-Stimulation alle 48 h, Tag 5 Entfernung TGF- β 1 (20 ng/ml), keine Medikamententherapie
3. TGF- β 1-Stimulation alle 48 h, Tag 5 Entfernung TGF- β 1 (20 ng/ml), Zugabe Hydralazin (50 μ g/ml)
4. TGF β -1-Stimulation alle 48 h, Tag 5 Entfernung TGF- β 1 (20 ng/ml), Zugabe Ramipril (50 μ g/ml)

Die Ansätze wurden mit 20 ng/ml TGF- β 1 alle 48 Stunden über 5 Tage stimuliert, da vorherige Studien gezeigt haben, dass nach dieser Zeit TGF- β 1 nachweislich stabile *Rasall*-Methylierung induziert, welche zur transkriptionellen *Rasall*-Suppression und Fibroblastenaktivierung führt (Bechtel et al. 2010, Tampe et al. 2014 JASN, Tampe B et al. 2015). An Tag 5 wurden die Ansätze miteinander verglichen und wie *Abbildung 12* zeigt, induzierte TGF- β 1 eine starke Fibroblastenproliferation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Danach wurden die zwei jeweiligen Ansätze mit Hydralazin oder Ramipril behandelt, indem die angegebene Menge der Medikamente in das Medium gegeben und ab diesem Zeitpunkt der Zustand der Ansätze täglich fotodokumentiert wurde. Die Exposition mit Hydralazin führte zu einer Hemmung der weiteren Fibroblastenproliferation. Dagegen sieht man beim Ansatz mit Ramipril im Vergleich mit der unbehandelten Kontrollgruppe keinen Einfluss auf die intrinsische proliferative Aktivität. Daraus ist zu folgern, dass unter niedrig dosierter Hydralazintherapie Fibroblastenproliferation sichtlich regredient ist und somit Fibrose verringert vorliegt. Trotz der Entfernung vom TGF- β 1 am 5. Tag vermehrten sich die Fibroblasten weiter.

3. Ergebnisse

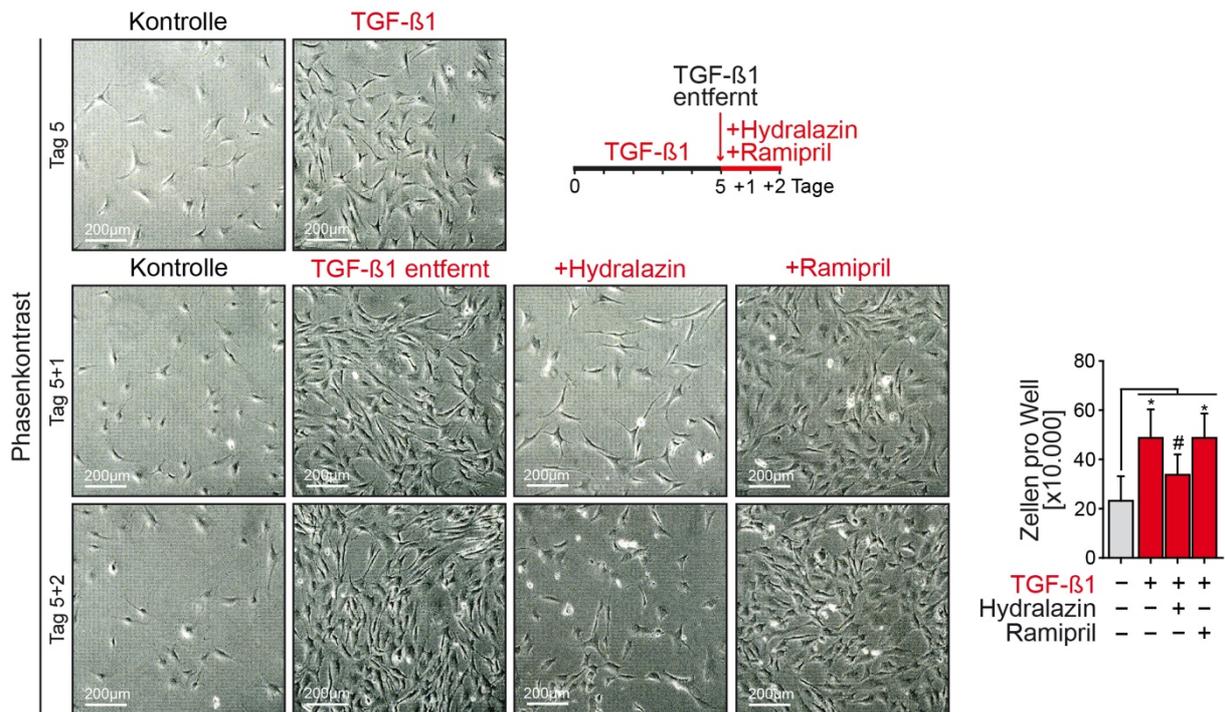


Abbildung 12: Stimmulationsversuch anhand TGF-β1-stimulierter Fibroblasten *in vitro*. Photomikrographische Darstellung (Messbalken 200 μm) der Medikamentenstimulation von TGF-β1-aktivierten primären Fibroblastenkulturen. 5 Tage Stimulation durch TGF-β1 alle 48 Stunden und ab Tag 5 einmalige Medikamentengabe. Daneben ist anhand der Zellzahl dargestellt, wie sich die Fibroblastproliferation unter den Medikamenten verhält (* p<0,05, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitige ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse zur unbehandelten, unstimulierten Zellkohorte). Unter niedrig dosiertem Hydralazin sistiert die Fibroblastenproliferation verglichen zur Ramipriltherapie.

3.2 Epigenetische Therapie mit niedrig-dosiertem Hydralazin verringert den Übergang vom akuten ins chronische Nierenversagen und die intrarenale Fibroblastenakkumulation

Die Mausstudie erfolgte wie im vorangegangenen Methodenteil beschrieben. Ziel der Studie war es, das Fibroseverhalten von geschädigten Nieren unter niedrig-dosiertem Hydralazin und Ramipril zu untersuchen. *Abbildung 13* zeigt in der obersten Reihe eine Übersichtsaufnahme der Nieren jeder Mausekohorte. Es ist zu sehen, dass verglichen mit der DMSO-behandelten Kontrollniere, die DMSO-Ischämieniere makroskopische Veränderungen aufzeigen. Das Nierenparenchym ist stark aufgehellt, und das renale Gesamtvolumen ist reduziert, was eine fortgeschrittene Fibrosierung zeigt. Im Vergleich dazu sieht man in der Hydralazin-behandelten Ischämieniere eine deutliche Abschwächung dieser pathologischen Veränderungen. Sie sieht nahezu unverändert zur Kontrollniere aus, woraus geschlossen werden kann, dass unter niedrig dosiertem Hydralazin der renale Fibrosierungsprozess aufgehalten wird. Dagegen zeigt die Applikation von Ramipril keinen Einfluss auf diese histopathologischen Veränderungen.

Im Vergleich dazu sind unterhalb der Übersichtsaufnahmen nach 42 Tagen postoperativ die unbehandelten Kontrollnieren und die operierten Nierenschnitte dargestellt. In der MTS-Färbung wird dies in der vermehrten interstitiellen Kollagenablagerung der Nieren sichtbar, welche unter Hydralazin signifikant verringert vorliegt. In den Immunfluoreszenzfärbungen alpha-SMA und Kollagen-1 sieht man sowohl eine signifikante Zunahme interstitieller Extrazellulärmatrix als auch alpha-SMA-positiver Myofibroblasten, welche durch die Applikation von Hydralazin reduziert wird. Dagegen zeigt Ramipril keinen Einfluss auf diese zuvor genannten Veränderungen.

3. Ergebnisse

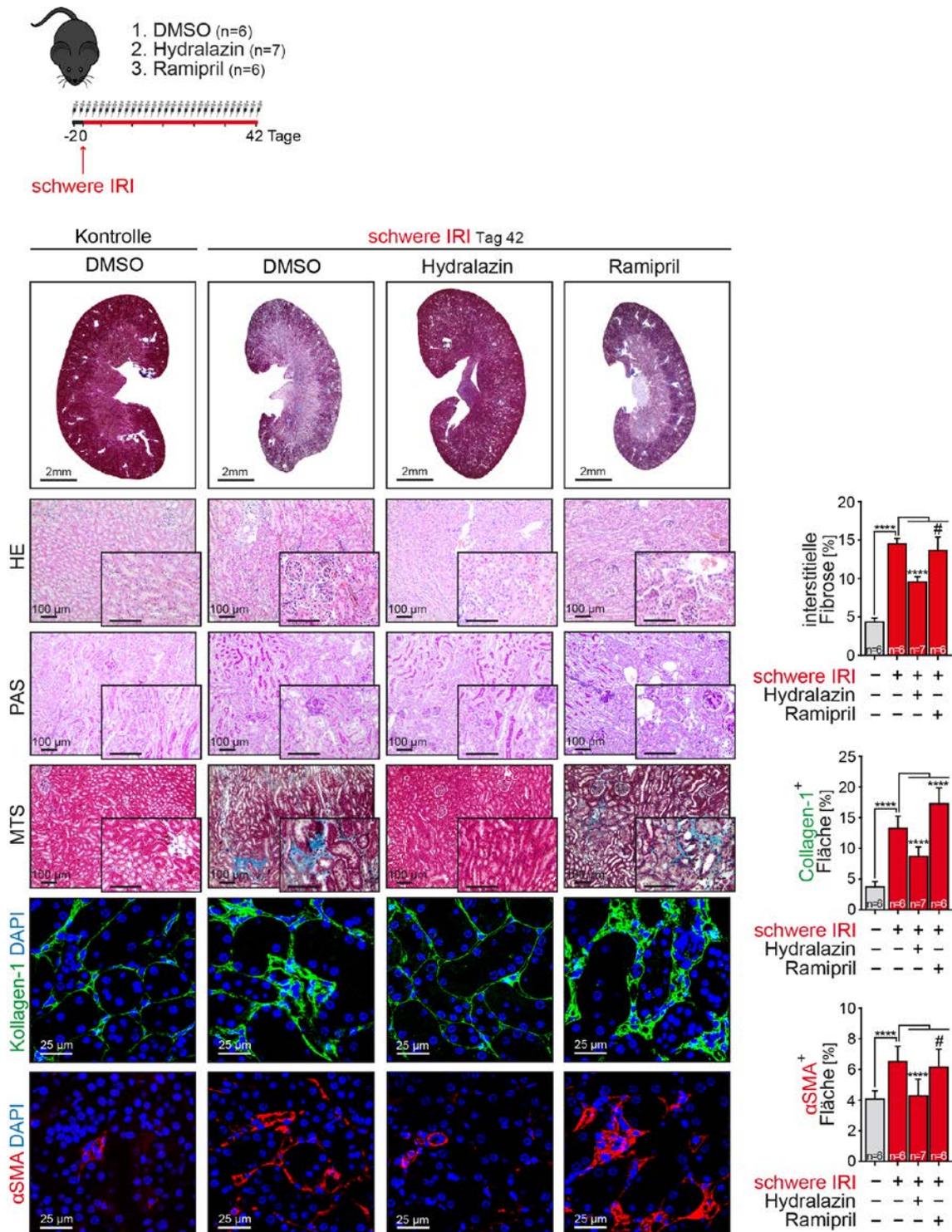


Abbildung 13: Severe IRI Mausmodell mit renaler Übersichtsdarstellung. In der obersten Reihe ist eine Übersichtsdarstellung des severe IRI-Modells abgebildet. 2 Tage präoperativ begann die intraperitoneale Injektion von DMSO, niedrig dosiertem Hydralazin (5 mg/kg KG/Tag) und Ramipril (10 mg/kg KG/Tag). An Tag Null wurden die Mäuse operiert und nach 42 Tagen zur Analyse getötet. Rechts ist eine Gesamtübersicht der MTS-Färbung einer Niere aus jeder Kohorte gezeigt (Messbalken 2 mm). In der hydralazinbehandelten Kohorte ist ein verringerter Parenchymverlust zu erkennen. Unterhalb sind Mikrophotographien der Hämatoxylin-Eosin (HE), Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) und Masson's Trichrom (MTS) renalen Färbungen (Messbalken 100 µm) sowie Immunfluoreszenzfärbungen gegen Col-1 und alpha-SMA (Messbalken 25 µm) von nicht behandelten kontralaterale Kontrollnieren und operierten severe IRI Nieren jeder Medikamentenkohorte dargestellt. Rechts erkennt man die morphometrische Quantifizierung der jeweiligen Färbungen. Als erstes der interstitielle Fibroseanteil anhand der MTS Färbung (Auswertung durch 10 Gesichtsfelder pro Nierenschnitt bei 200-facher Vergrößerung, n=6 in Ramipril und DMSO, n=7 in Hydralazin, ****p<0,0001, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitige ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse verglichen zur kontralateralen Kontrollnieren). Darunter ist die Immunfluoreszenzanalyse

3. Ergebnisse

der Fibrosemarker Col-1- und alpha-SMA-Expression dargestellt (Auswertung erfolgte durch Betrachtung 10 Gesichtsfelder pro Niere in 400-facher Vergrößerung, n=6 in Ramipril und DMSO, n=7 in Hydralazin, ****p<0,0001, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitige ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse verglichen zur kontralateralen Kontrollniere.)

Die in *Abbildung 14* gezeigte Tubulus-Beurteilung zeigt einen Anstieg der Anzahl geschädigter Tubuli im Mausmodell der schweren IRI an Tag 42. Die Beurteilung des Tubulusschadens wird anhand des Tubular Damage Scores eingeteilt. Somit erfolgt dieser in 4 Stadien beginnend mit Grad 0, der keinen sichtbaren Tubulusschaden aufweist. Mit Grad 1 beginnt leichter tubulärer Schaden, Grad 2 moderate Veränderung mit Tubulusdilatation und Verlust des Bürstensaums bishin zu Grad 3, welcher nekrotische Areale und den Verlust der Basalmembran aufweist. Die Administration von Hydralazin zeigt hierbei keine signifikanten Effekte, dagegen ist der Tubulusepithelschaden unter Ramiprilbehandlung akzeleriert. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass der Schaden aller Nieren nicht stärker als Score 2 war, das heißt, es kam in keiner Kohorte zur Nekrosebildung oder vollständigem Verlust der Basalmembran.

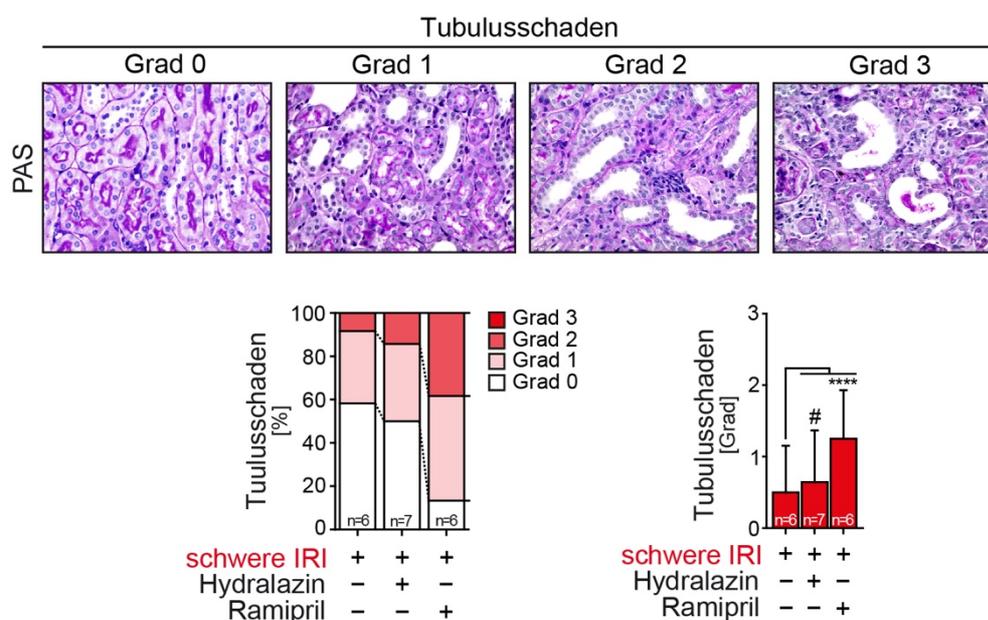


Abbildung 14: Darstellung tubulären Schadens durch *Tubular Damage Score* aller Medikamentenkohorten. Semiquantitative Darstellung des *Tubular Damage Scores* mithilfe der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) gefärbten Gewebeschnitte (0=gesund, 1=leicht, 2=moderat, 3=stark). Niedrig-dosiertes Hydralazin zeigt keinen Effekt auf tubulären Schaden, Ramipril verstärkt die Schädigung nach *severe IRI* (Betrachtung 10 Gesichtsfelder pro Gewebeschnitt mit 200-facher Vergrößerung, n=6 in Ramipril und DMSO, n=7 in Hydralazin, ****p<0,0001, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitige ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse verglichen zur kontralateralen Kontrollniere).

Betrachtet man die Glomeruli in *Abbildung 15*, weist Hydralazin hier ebenso eine anti-fibrotische Wirkung auf. Hier erfolgt die Einteilung ebenfalls mithilfe eines von El Nahas et al. etablierten 5- gradigen Scores. Grad 0 stellt einen physiologischen Glomerulus dar, der in Grad 1 beginnende mesangiale Expansion zeigt. Die darauffolgenden Grade unterscheiden sich

3. Ergebnisse

am Glomerulosklerose Anteil von erst <50% und dann >50%. Im letzten Grad 4 entwickelt sich eine diffuse Sklerosierung mit kapillärer Verkümmernung. Selbst im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigt die Hydralazin-behandelte Kohorte eine signifikante Abnahme der Glomerulosklerose. Unter Ramipril weisen die Glomeruli sowohl starken vasalen Schaden als auch sklerosierende Veränderungen der Bowmannkapsel auf.

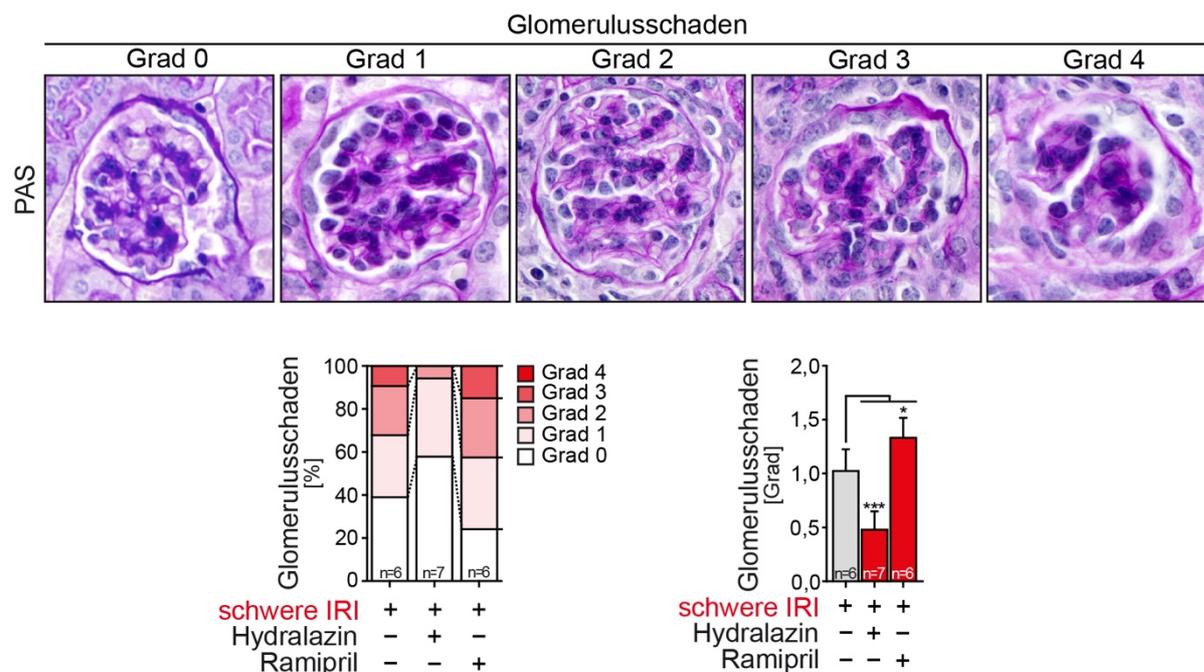


Abbildung 15: Darstellung glomerulärer Schädigung mithilfe des Glomeruloskleroseindex aller Medikamentenkohorten. Semiquantitative Darstellung des Glomeruloskleroseindex mithilfe der Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) gefärbten Gewebeschnitte (0=gesund, 1=leicht, 2=mittel, 3=stark, 4=defekt). Niedrig-dosierte Hydralazintherapie zeigt geringeren Skleroseanteil als unter Ramipril (Betrachtung 20 Glomeruli pro Gewebeschnitt, n=6 in Ramipril und DMSO, n=7 in Hydralazin, ****p<0,0001, *p<0,05, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitige ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse verglichen zur kontralateralen Kontrollniere).

Für diese Studie war es ebenso wichtig zu zeigen, dass die verwendeten Medikationen Hydralazin und Ramipril keine renalen Nebeneffekte aufweisen. *Abbildung 15* zeigt deshalb die nicht-ischämischen kontralateralen Kontrollnieren. In den Übersichtsfärbungen MTS, PAS, HE als auch in den Kollagen-1- und alpha-SMA-Immunfluoreszenzen sieht man keine Veränderungen, die auf eine Nierenfibrose oder anderen Nierenschaden hinweisen könnten. Auch im Vergleich der verschiedenen Medikamentengruppen zueinander sieht man keine prägenden Unterschiede. In der PAS-Färbung wurden die Glomeruli und Tubuli betrachtet, in der ebenfalls keine Veränderung der einzelnen Medikamentenkohorten zu erkennen ist.

3. Ergebnisse

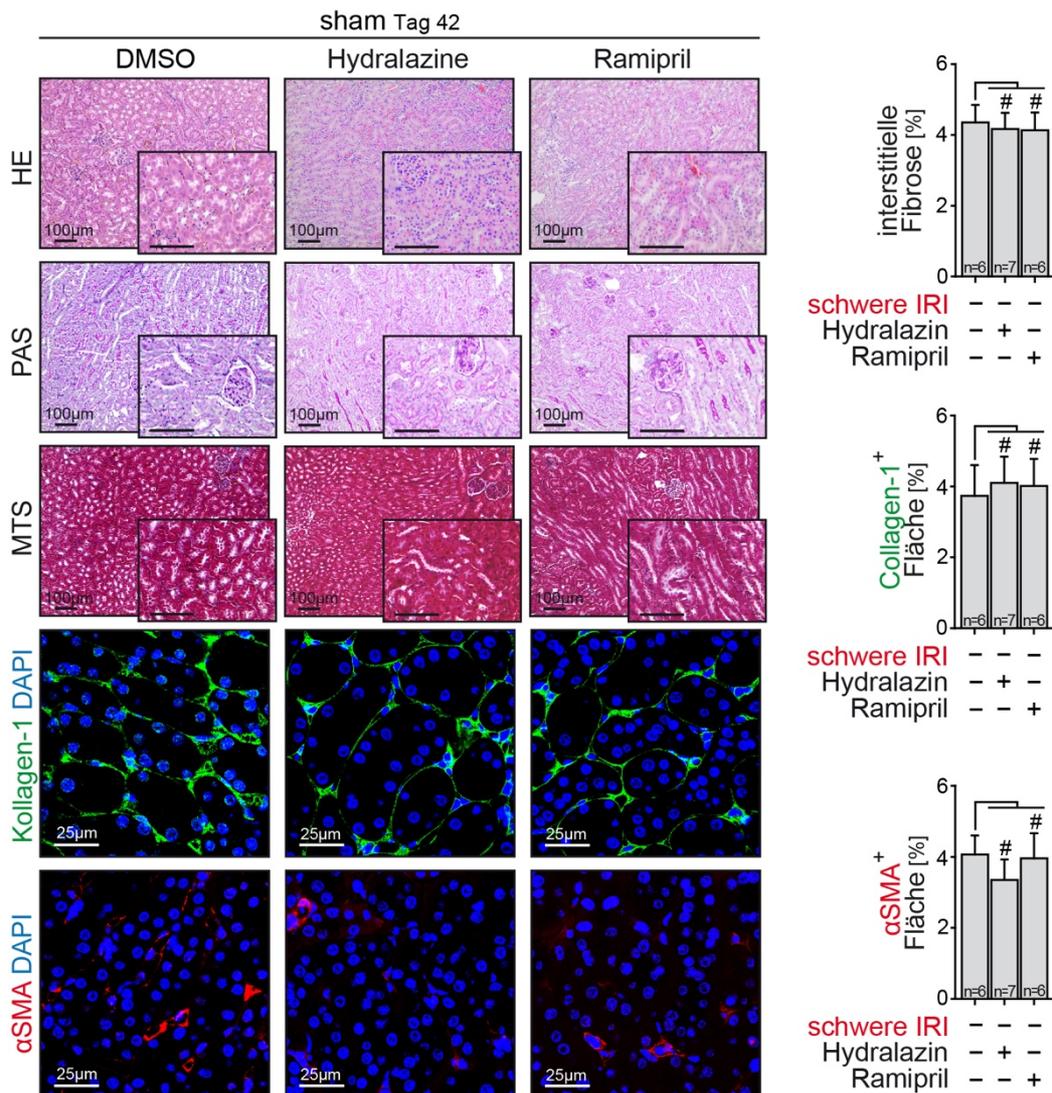


Abbildung 16: Darstellung kontralateraler Kontrollnieren zur Beurteilung des Medikamenteneinflusses. In dieser Abbildung werden die kontralateralen Kontrollnieren zur Beurteilung des Medikamenteneffekts auf gesundes Gewebe ausgewertet. Niedrig-dosiertes Hydralazin zeigt in keinen Färbungen einen Effekt auf das gesunde Nierengewebe. Mikrophotographien zeigen kontralaterales Nierengewebe in Hämatoxylin-Eosin (HE), Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS), Masson's Trichrom (MTS) (Messsbalken 100 µm) und Immunfluoreszenzfärbungen gegen Col-1 und alpha-SMA (Messbalken 25 µm). Daneben ist als erstes der interstitielle Fibroseanteil anhand der MTS Färbung gezeigt (Auswertung durch 10 Gesichtsfelder pro Nierenschnitt bei 200-facher Vergrößerung, n=6 in Ramipril und DMSO, n=7 in Hydralazin, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitige ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse verglichen zur unbehandelten kontralateralen Kontrollnieren). Darunter sind Immunfluoreszenz Auswertung der Fibrosemarker Kollagen-1- und alpha-SMA-Expression dargestellt (Auswertung erfolgte durch Betrachtung 10 Gesichtsfelder pro Niere in 400-facher Vergrößerung, n=6 in Ramipril und DMSO, n=7 in Hydralazin, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitige ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse verglichen zur unbehandelten kontralateralen Kontrollnieren).

3.3 Übergang vom akuten ins chronische Nierenversagen unter schwerer IRI ist mit *Rasal1*-Promotermethylierung assoziiert

3.3.1 Aberrante *Rasal1*-Promotermethylierung als epigenetischer Faktor der Fibroseregulation

Aufbauend auf Vorarbeiten vorangegangener Studien betreffend des *moderate* und *severe* IRI Modellen wird von einem gewissen Maße der renalen Geweberegeneration ausgegangen (Yang et al. 2010). Diese Regeneration wird mit der *Rasal1*-Promotermethylierung assoziiert, wie im Folgenden deutlich wird.

Zum Nachweis der Fibroseprogression unter schwerer IRI wurde durch die Methylierungsanalyse von *Rasal1* festgestellt, dass dessen Methylierung stark ansteigt. Die Hydralazin-behandelten Gewebe zeigten dagegen eine Reduktion der intrarenalen *Rasal1*-Methylierung. Zum Nachweis einer transkriptionellen Veränderung der *Rasal1*-Expression wurde intrarenales *Rasal1* immunhistochemisch gefärbt. In *Abbildung 17* wird deutlich, dass Nierenfibrose mit verminderter *Rasal1*-Expression im interstitiellen Kompartiment assoziiert ist. Effektive Normalisierung der *Rasal1*-Methylierung unter Hydralazin-Behandlung ist dagegen mit Restauration der *Rasal1*-Expression assoziiert. Ramipril zeigt hier weder auf *Rasal1*-Methylierung oder dessen Expression einen Einfluss.

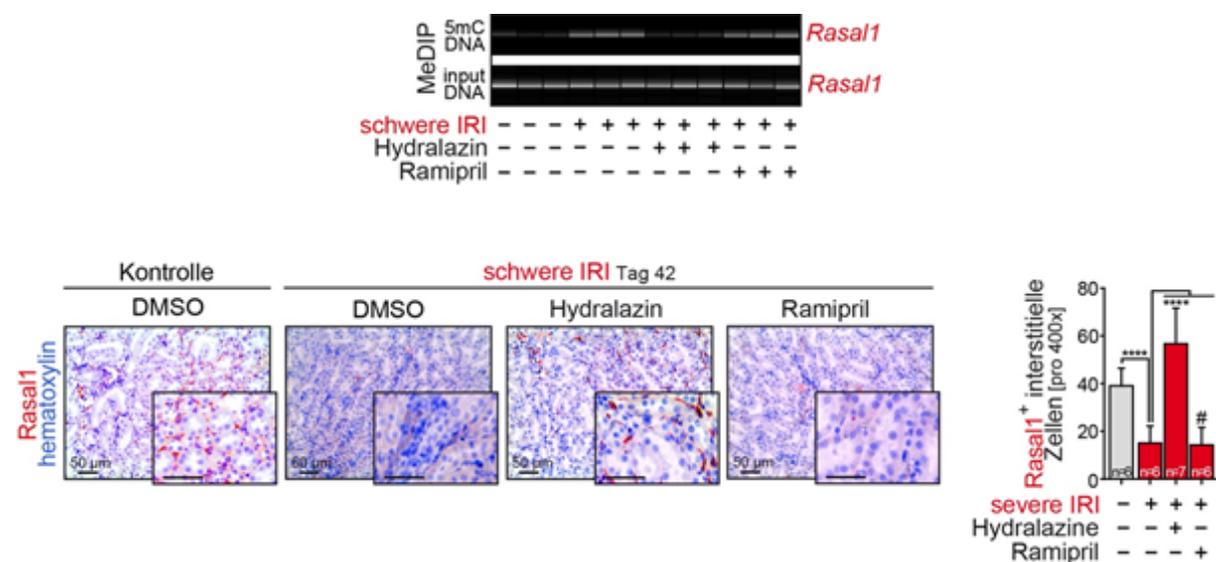


Abbildung 17: *Rasal1*-Promotermethylierung unter schwerer IRI mit folgender Regeneration *Rasal1*-Expression unter niedrig- dosierter Hydralazinthherapie. Intrarenale *Rasal1*-Promotermethylierung wurden durch DNA Immunoprecipitation der Nierengewebe beurteilt. Es wurden virtuelle Gelbilder angefertigt um die methylierten *Rasal1* Anteile sichtbar zu machen. Man erkennt starke *Rasal1*-Promotermethylierung der ramiprilbehandelten Kohorte, wobei unter Hydralazin diese Methylierung vermindert ausgeprägt ist. Zusätzlich wurden die Mikrophotographien der immunhistochemische Färbung von *Rasal1* (Messbalken 50 µm) der kontralateralen Kontrollniere und schwere IRI Gewebe aller Medikamentenkohorte dargestellt. Daneben erfolgte die Beurteilung interstitiellem *Rasal1* (10 Gesichtsfelder pro Niere, 400-facher Vergrößerung, n=6 in Ramipril und DMSO, n=7 in Hydralazin, ****p<0,0001, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitige ANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse verglichen zur unbehandelten kontralateralen Kontrollniere).

3. Ergebnisse

3.3.2 Nachweis eines TET3-vermittelten Demethylierungsmechanismus unter niedrig dosierter Hydralazinthherapie

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Hydralazin-vermittelte Demethylierung auf der Induktion von *Ten-Eleven Translocation 3* (Tet3) beruht (Tampe et al. 2015). Darin wird beschrieben, dass Methylierung durch weitere Modifikation, nämlich Hydroxymethylierung, demethyliert wird (Tampe et al. 2015). Daher erfolgte der Nachweis von Tet3 und dessen Lokalisation in Kontrollnieren sowie Nieren mit schwerer IRI. Im Vergleich zu Kontrollnieren zeigte sich in fibrotischen Nieren ein deutlicher Verlust von Tet3 in interstitiellen Zellen (*Abbildung 18*). Dieser Verlust wurde durch die Administration von Hydralazin verhindert, wogegen Ramipril keine Effekte auf die Tet3-Expression hatte. Die Hydralazin-vermittelte Tet3-Induktion war mit dem Nachweis von hydroxymethyliertem *Rasal1* assoziiert, indikativ für einen aktiven Demethylierungsmechanismus.

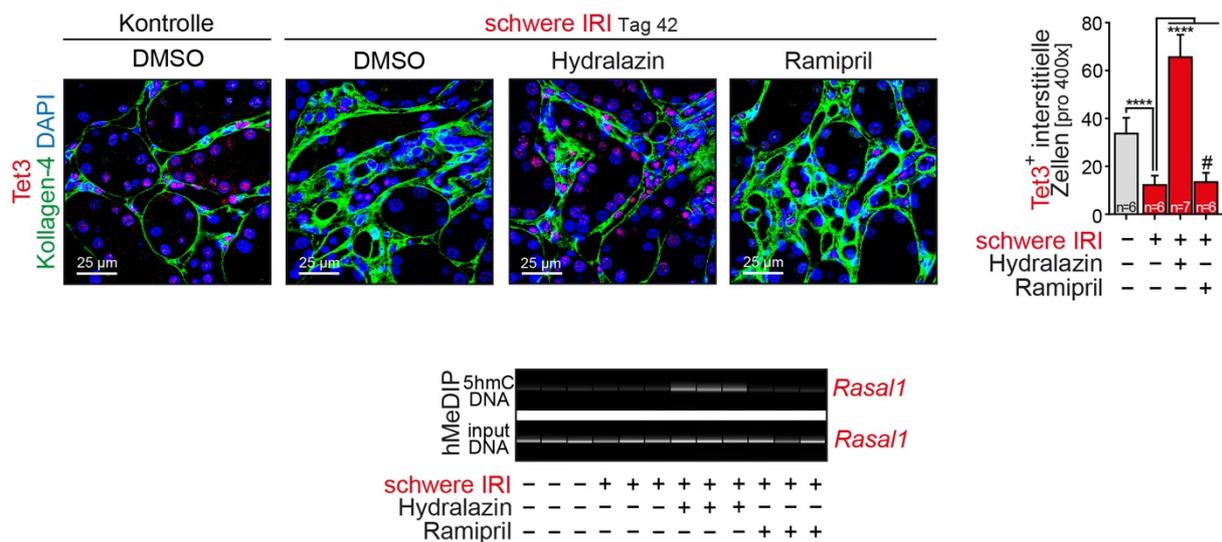


Abbildung 18: Tet3-vermittelter Demethylierungsmechanismus durch niedrig-dosiertes Hydralazin auf *Rasal1*-Promotormethylierung. Als erstes wurden die Mikrophotographien der Immunfluoreszenzfärbung von Tet3 (Messbalken 25 µm) der kontralateralen Kontrollniere und schwere IRI Gewebe aller Medikamentenkhornten dargestellt. Daneben erfolgte die Beurteilung interstitiellem Tet3 (10 Gesichtsfelder pro Niere, 400-facher Vergrößerung, n=6 in Ramipril und DMSO, n=7 in Hydralazin, ****p<0,0001, # keine Signifikanz, p-Wert durch einseitigerANOVA mit Bonferroni post-hoc-Analyse verglichen zur unbehandelten kontralateralen Kontrollniere). Intrarenale Hydroxymethylierung durch Tet3 wurde durch DNA Immunoprecipitation der Nierengewebe beurteilt. Es wurden virtuelle Gelbilder angefertigt um hydroxymethyliertes *Rasal1* darzustellen. Unter niedrig-dosierter Hydralazinthherapie wird hydroxymethyliertes *Rasal1* detektierbar, was unter Ramipril ausbleibt.

4. Diskussion

4.1 *RASALI*-Promotermethylierung als Schlüsselrolle der Progression vom akuten ins chronische Nierenversagen

In dieser Studie zeigte sich im einseitigen Ischämiemodell, dass die *RASALI*- Promotormethylierung eine Schlüsselrolle im weiteren Verlauf des akuten Nierenversagens spielt. Aberrente *RASALI*-Promotermethylierung war im reversiblen akuten Nierenversagen (*moderate* IRI) nicht detektierbar, dagegen beim Übergang ins chronische Nierenversagen (*severe* IRI). Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass *RASALI*-Methylierung eine grundlegende Bedeutung beim Übergang vom akuten ins chronische Nierenversagen hat. Diese Beobachtung wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben, in denen die *RASALI*-Methylierung am chronischen Versagen in Nieren und anderen Organen gezeigt wurde (Bechtel et al. 2010; Tao et al. 2011, S. 2; Kim et al. 2014; Xu et al. 2015), jedoch nicht anhand von Modellen des akuten Nierenversagens (Bechtel et al. 2010).

4.2 Hydralazin als therapeutische Intervention mit Induktion Tet3-vermittelter Hydroxymethylierung

Im *severe* IRI-Modell sowie auch in Zellkulturen konnte nachgewiesen werden, dass Hydralazin durch einen spezifischen, Tet3-vermittelten Demethylierungsprozess Fibroblastenaktivierung und renale Fibrogenese verhindert. Wie schon erwähnt, zeigten dies auch Nagermodelle vorangegangener Studien (Tampe et al. 2014; Tampe et al. 2015, S. 3), wie auch diverse Krebsstudien über das Cervixkarzinom (Zambrano et al. 2005; Coronel et al. 2011). Wenn man die Progression vom akuten ins chronische Nierenversagen betrachtet, vermittelt Hydralazin eine Normalisierung der DNA-Methylierung im Kontext aberranter Promotormethylierung mit Spezifität hinsichtlich von Tet3-Zielgenen. Dies macht eine klinische Applikation auch im Hinblick auf unerwünschte Wirkungen oder Langzeitfolgen attraktiv. Zusätzlich ist bekannt, dass Hydralazin die Nierenperfusion im chronischen Nierenversagen verbessert, ohne die Proteinurie zu beeinflussen (Cogan et al. 1980). Außerdem gibt es einige Berichte über die Verbesserung der Nierenfunktion unter renaler Krise in systemischer Sklerosierung (Woods et al. 1974; Mitnick und Feig 1978), und unabhängige Ergebnisse in Nagern, in denen die Applikation von Hydralazin die renale Fibrosierung antagonisiert (Hartono et al. 2014; Eriguchi et al. 2015). Obwohl die zugrundeliegenden Mechanismen einer nephroprotektiven Wirkung von Hydralazin oder auch die Mechanismen der Promotormethylierung zu diesem Zeitpunkt nicht verstanden waren, konnte man davon ausgehen, dass die demethylier-

4. Diskussion

rende Aktivität von Hydralazin dabei eine entscheidende Rolle spielte. Das erneute Interesse an Hydralazin in der Behandlung chronischer Herzinsuffizienz (McMurray et al. 2012; Farag et al. 2015) führt zu der Annahme, dass das nebenwirkungsarme Medikament Hydralazin ähnlich protektive Eigenschaften in der Behandlung von Niereninsuffizienz aufweist. Dies wird insbesondere dadurch verstärkt, dass der demethylierende Effekt von Hydralazin bereits bei nicht blutdruckrelevanten Dosen erreicht wird. Fraglich bleibt dennoch, ob weitere Gene von Hydralazin modifiziert werden, was in der Zukunft mit Rasal1-knockout-Mäusen analysiert werden könnte.

4.3 Darstellung der Korrelation von Fibrosierungskomponenten nierenkranker Patienten

Es stellt sich natürlich die Frage, inwiefern RASAL1 mit TET3 und Fibrosierungskomponenten im Menschen zusammenhängt. Dies wird anhand *Abbildung 20* veranschaulicht, die eine Heatmap der drei Hauptkomponenten der Studie beinhaltet: Diese umfasst eine Expressionsanalyse von nierenkranken Patienten (n=243) (Ju et al. 2015). Der intrarenale Verlust der *RASAL1*-Expression ist hierbei mit Akkumulation von Fibrosekomponenten (beispielsweise dem Typ I-Kollagen *COL1A1*) assoziiert. Eine in diesem Kontext positive Korrelation zwischen *RASAL1* und *TET3* impliziert hierbei einen ähnlichen positiven Einfluss von TET3 auf die *RASAL1*-Expression.

4. Diskussion

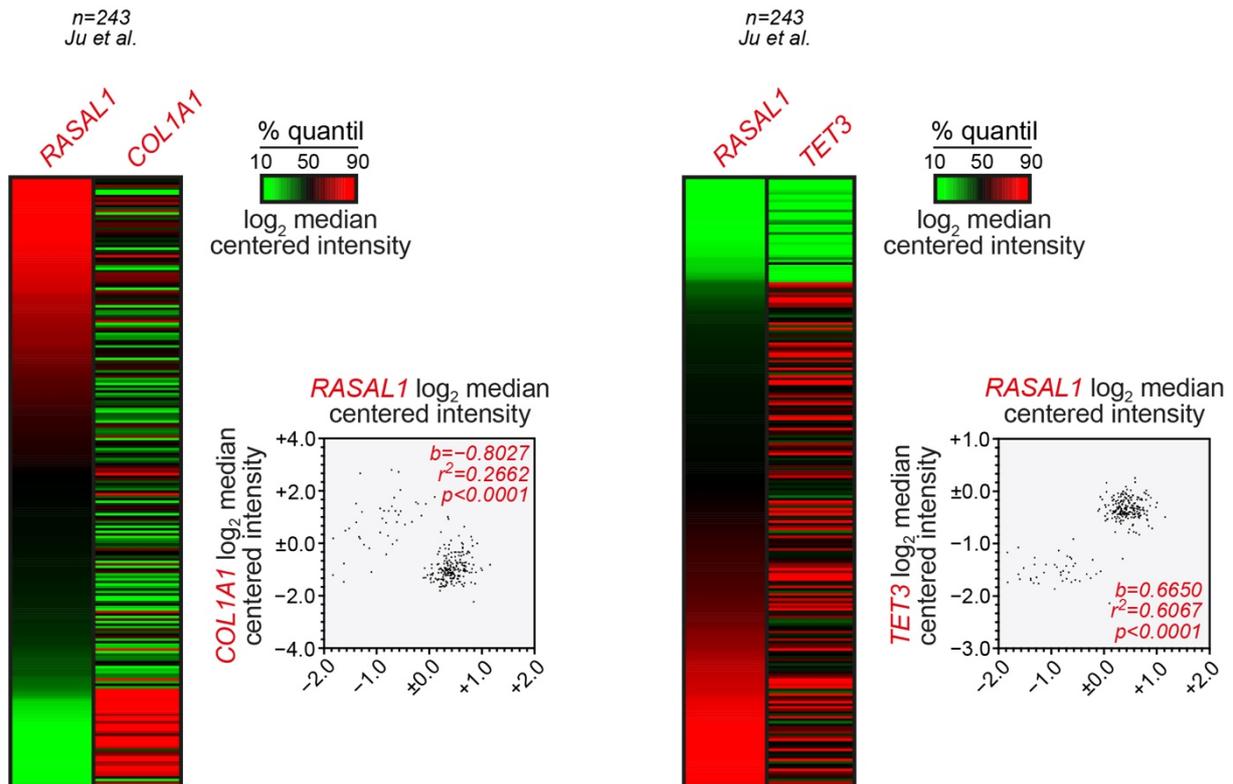


Abbildung 19: Heatmap intrarenales RASAL1 zu TET3 und COL1A1.

Die Abbildung zeigt die Korrelation intrarenales Genexpression von RASAL1 zu TET3 und COL1A1 (grün=niedrig exprimiert, rot=hoch exprimiert) anhand einer Clusterheatmap nierenkranker Patienten ($n=243$) (Ju et al. 2015)

Die durch Hydralazin induzierte Demethylierung von Zielgenen, wie beispielsweise *RASAL1*, weist eine gewisse Spezifität hinsichtlich der Präsenz eines TET3-Bindungsmotifs im Promotor dieser Zielgene auf (Zambrano et al. 2005; Xu et al. 2012; Tampe et al. 2014; Xu et al. 2015). Es ist allerdings anzumerken, dass zusätzliche Gene anderer Zelltypen, die bis heute noch nicht identifiziert wurden, ebenso durch Hydralazin-vermittelte TET3-Induktion beeinflusst werden (Rangel et al. 2014; Marumo et al. 2015; Reddy und Natarajan 2015). Diese biologischen Nebeneffekte müssen in zukünftigen Studien erforscht werden.

4.4 Medikamentöser Eingriff ins Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und sein Einfluss auf das akute Nierenversagen

In dieser Studie konnte man keinen demethylierenden Effekt auf *RASALI* oder Nephroprotektion durch die Applikation des ACE-Hemmers Ramipril beobachten, wenn dieser im akuten Nierenversagen gegeben wird. Es wurde in experimentellen und in klinischen Studien gezeigt, dass eine Inhibition des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems beim proteinurischen, chronischen Nierenversagen eine protektive Rolle spielt (Remuzzi und Bertani 1998; Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy 2016).

Obwohl herausgefunden wurde, dass eine Abnahme der glomerulären Filtrationsrate in Bezug auf das chronische Nierenversagen in gewissem Grade toleriert werden kann (Jaber und Madias 2006), ist der Effekt beim akuten Nierenversagen und dem renalen Ausgang schon lange Teil vieler Diskussionen (Okusa und Davenport 2014). Übereinstimmend mit unseren Studien haben einige klinische Studien über den negativen Effekt in Form von Nierenfunktionsverschlechterung von ACE-Hemmern und Angiotensinrezeptor-Blockern während des akuten Nierenversagens berichtet. Daher wird im Allgemeinen empfohlen, RAAS-Inhibitoren nicht nur im akuten Nierenversagen, sondern auch präventiv bei Patienten mit erhöhtem Risiko für ein akutes Nierenversagen abzusetzen (Efrati et al. 2012; Tomlinson et al. 2013; Harty 2014). Infolge der tragenden Rolle der Hemmstoffe des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in Betracht auf ihre nephroprotektiven Eigenschaften im chronischen Nierenversagen lässt sich mutmaßen, dass es spezifische Unterschiede in den Zelltypen gibt.

5. Zusammenfassung

Die Progression chronischer Nierenerkrankungen stellt ein imminentes Problem in der klinischen Nephrologie dar, da effektive Therapiestrategie bislang nicht zur Verfügung stehen. Die gemeinsame Endstrecke nahezu aller chronischen Nierenerkrankungen ist die progrediente Fibrosierung, welche durch Aktivierung von Fibroblasten und exzessiver Bildung von Extrazellulärmatrix verursacht wird. Epigenetische Veränderungen tragen hierbei mechanistisch zur Aktivierung von Fibroblasten bei und stellen daher einen therapeutischen Ansatz dar. Vorarbeiten konnten bereits etablieren, dass der RAS-Suppressor RASAL1 durch eine epigenetische Veränderung, die sogenannte aberrante Promotormethylierung, transkriptionell supprimiert wird und durch die RAS-Stimulierung zur gesteigerten Fibroblastenproliferation und Fibrose in der Niere führt. Zudem konnte bereits etabliert werden, dass die Normalisierung aberranter Methylierung durch Hydralazin Fibroseprozesse in multiplen Mausmodellen des chronischen Nierenversagens gehemmt werden kann. Mechanistisch beruht dies auf Induktion der DNA-Dioxygenase TET3, welche den wichtigen Schritt für aktive Demethylierung, sog. Hydroxymethylierung, vermittelt.

In dieser Arbeit wurde aufbauend auf diesen Erkenntnissen untersucht, ob Hydralazin in einem Mausmodell des akuten Nierenversagens mit Übergang in eine chronische Niereninsuffizienz die Niere gleichsam schützen kann. Dazu wurde das *severe* IRI-Ischämiemodell bei Mäusen angewandt und zwei Tage präoperativ niedrig dosiert Hydralazin injiziert. Dahingegen erhielten die Kontrollgruppen entweder Kontrollpuffer oder Ramipril. Nach 42 Tagen wurden die Nierengewebe histopathologisch untersucht, dazu wurden unter Anwendung verschiedener Färbemethoden Fibrosemarker und Übersichtsfärbungen der Nierenschnitte angefertigt und ausgewertet.

Die Ergebnisse wiesen signifikante Verbesserungen von Fibrosemarkern und Übersichtsfärbungen unter niedrig-dosierter Hydralazintherapie auf. Zudem zeigte sich ebenfalls eine Restauration der RASAL1-Expression, welche auf Normalisierung aberranter RASAL1-Promotormethylierung beruht. Dieser Demethylierungsprozess wurde durch TET3-vermittelte Hydroxymethylierung induziert, welches ebenso unter Hydralazin detektierbar ist. Außerdem wurde eine Zellkultur mit primären Fibroblasten aus murinen Nieren angelegt, diese erlaubten die genauen Analysen von Proliferationsraten unter Hydralazin. Es wurden Fibroblastenkulturen fünf Tage mit dem pro-fibrotischen Faktor TGF- β 1 stimuliert, welcher bei Nierenfibrose vermehrt vorliegt und anschließend mit Hydralazin und Ramipril behandelt. Es wurde ein

5. Zusammenfassung

deutlicher Rückgang der Zelldichte unter Hydralazin sichtbar, Ramipril zeigte hingegen keine signifikanten Effekte.

Fasst man zusammen, so wurden durch diese Arbeit Einblicke in die möglichen therapeutischen Ansätze des akuten Nierenversagens mit Übergang in eine chronische Niereninsuffizienz erlangt. Dies könnte in zukünftigen Studien beitragen, Behandlungsstrategien in diesem Patientenkollektiv zu erarbeiten.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AB	Antibody
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ADH	Antidiuretisches Hormon
AKI	acute kidney injury
Alpha- SMA	alpha-smooth muscle actin
BSA	bovines Serumalbumin
CDK	chronic kidney disease
cDNA	Desoxyribonucleinsäure
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRB	DNA Release Buffer
ESRD	endstage renal dysfunction
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HS	hydroxyMeDIP Solution
min	Minute
NFW	nukleasefreies Wasser
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Rasal1	Ras protein activator like 1
RNA	Ribonukleinsäure
Tdg	thymine DNA glucosylase
Tet3	ten-eleven translocation 3
TGF-beta 1	Transforming Growth Factor- beta 1
UIRI	unilateral ischemia reperfusion injury
WB	Washbuffer

6.2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: ENTWICKLUNG EINES CHRONISCHEN NIERENVERSAGENS NACH DEN KDIGO KRITERIEN.....	5
ABBILDUNG 2: URSACHEN DES AKUTEN NIERENVERSAGENS MODIFIZIERT NACH JOHN HARTY (HARTY 2014).....	6
ABBILDUNG 3: EINTEILUNG DES AKUTEN NIERENVERSAGENS BASIEREND AUF KDIGO KRITERIEN.....	7
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE VERLÄUFE DES AKUTEN NIERENVERSAGENS MODIFIZIERT NACH JOHN HARTY (HARTY 2014)	7
ABBILDUNG 5: RENIN-ANGIOTENSIN-SYSTEM	9
ABBILDUNG 6: RASAL1 FIBROBLASTENAKTIVIERUNG	10
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE GEGENÜBERSTELLUNG DES MODERATE UND SEVERE IRI.....	13
ABBILDUNG 8: KREATININVERLAUF UND MTS-FÄRBUNGSÜBERSICHT BEIDER <i>ISCHEMIA REPERFUSION INJURY</i> MODELLE (YANG ET AL. 2010B)	14
ABBILDUNG 9: : ABLAUF MAUSSTUDIE IRI	32
ABBILDUNG 10: TUBULAR DAMAGE SCORE MODIFIZIERT NACH HAMAR	34
ABBILDUNG 11: GLOMERULOSKLEROSEINDEX MODIFIZIERT NACH EL NAHAS ET AL	34
ABBILDUNG 12: IN VITRO-STIMULATIONSVERSUCH ANHAND TGF- β 1-STIMULIERTER FIBROBLASTEN.....	36
ABBILDUNG 13: <i>SEVERE IRI</i> MAUSMODELL MIT RENALER ÜBERSICHTSDARSTELLUNG	38
ABBILDUNG 14: DARSTELLUNG TUBULÄREN SCHADENS DURCH <i>TUBULAR DAMAGE SCORE</i> ALLER MEDIKAMENTENKOHORTEN	39
ABBILDUNG 15: DARSTELLUNG GLOMERULÄRER SCHÄDIGUNG MITHILFE DES GLOMERULOSKLEROSEINDEX ALLER MEDIKAMENTENKOHORTEN.....	40
ABBILDUNG 16: DARSTELLUNG KONTRALATERALER KONTROLLNIERE ZUR BEURTEILUNG DES MEDIKAMENTENEINFLUSS.....	41
ABBILDUNG 17: RASAL1-PROMOTORMETHYLIERUNG UNTER SCHWERER IRI MIT FOLGENDER REGENERATION RASAL1-EXPRESSION UNTER NIEDRIG DOSIERTER HYDRALAZINTHERAPIE	42
ABBILDUNG 18: TET3-VERMITTELTEN DEMETHYLIERUNGSMECHANISMUS DURCH NIEDRIG DOSIERTES HYDRALAZIN AUF RASAL1-PROMOTORMETHYLIERUNG	43
ABBILDUNG 19: HEATMAP KORRELATION INTRARENEM RASAL1 ZU TET3 UND COL1A146	

6.3 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: PRIMÄR-UND SEKUNDÄRANTIKÖRPER.	24
TABELLE 2: ANTIKÖRPER RASAL1.	25
TABELLE 3 : PRIMERSEQUENZEN RASAL1.	31

7. Literaturverzeichnis

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

Bonventre JV (2014): Primary proximal tubule injury leads to epithelial cell cycle arrest, fibrosis, vascular rarefaction, and glomerulosclerosis. *Kidney Int Suppl* 4, 39–44

Candelaria M, Gallardo-Rincón D, Arce C, Cetina L, Aguilar-Ponce J, Arrieta O, Serrano A, Perez-Plasencia C, Gonzalez-Fierro A, de la Cruz-Hernandez E, et al. (2007): A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *BMC Cancer* 7, A27

Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL (2014): Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med* 371, 58–66

Christman JK (2002): 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483–5495

Cogan JJ, Humphreys MH, Carlson CJ, Rapaport E (1980): Renal effects of nitroprusside and hydralazine in patients with congestive heart failure. *Circulation* 61, 316–323

Coronel J, Cetina L, Pacheco I, Trejo-Becerril C, González-Fierro A, de la Cruz-Hernandez E, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Arias-Bofill D, Candelaria M, et al. (2011): A double-blind, placebo-controlled, randomized phase III trial of chemotherapy plus epigenetic therapy with hydralazine valproate for advanced cervical cancer. Preliminary results. *Med Oncol* 28 Suppl 1, S540–546

Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin (DGAI), Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Deutsche Gesellschaft für Chirurgie (DGCH), Zwissler B (2017): Preoperative evaluation of adult patients before elective, noncardiothoracic surgery: Joint recommendation of the German Society of Anesthesiology and Intensive Care Medicine, the German Society of Surgery, and the German Society of Internal Medicine. *Anaesthesist*

Dries DL, Exner DV, Gersh BJ, Cooper HA, Carson PE, Domanski MJ (1999): Racial differences in the outcome of left ventricular dysfunction. *N Engl J Med* 340, 609–616

Efrati S, Berman S, Hamad RA, Siman-Tov Y, Ilgiyaev E, Maslyakov I, Weissgarten J (2012): Effect of captopril treatment on recuperation from ischemia/reperfusion-induced acute renal injury. *Nephrol Dial Transplant* 27, 136–145

Eriguchi M, Tsuruya K, Haruyama N, Yamada S, Tanaka S, Suehiro T, Noguchi H, Masutani K, Torisu K, Kitazono T (2015): Renal denervation has blood pressure-independent protective effects on kidney and heart in a rat model of chronic kidney disease. *Kidney Int* 87, 116–127

Farag M, Mabote T, Shoaib A, Zhang J, Nabhan AF, Clark AL, Cleland JG (2015): Hydralazine and nitrates alone or combined for the management of chronic heart failure: A systematic review. *Int J Cardiol* 196, 61–69

7. Literaturverzeichnis

- Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W (2011): Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 473, 398–402
- Hartono SP, Knudsen BE, Lerman LO, Textor SC, Grande JP (2014): Combined effect of hyperfiltration and renin angiotensin system activation on development of chronic kidney disease in diabetic db/db mice. *BMC Nephrol* 15, 58
- Harty J (2014): Prevention and management of acute kidney injury. *Ulster Med J* 83, 149–157
- Herold G (Verlag): Innere Medizin 2013: Köln 2013
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993): Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology* 11, 1026–1030
- Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy (2016) *N Engl J Med* 374, 991–993
- Jaber BL, Madias NE (2006): Benazepril for advanced chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 354, 1530–1531; author reply 1530–1531
- James PA, Oparil S, Carter BL, Cushman WC, Dennison-Himmelfarb C, Handler J, Lackland DT, LeFevre ML, MacKenzie TD, Ogedegbe O, et al. (2014): 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *JAMA* 311, 507–520
- Jones PA, Taylor SM (1980): Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20, 85–93
- Ju W, Nair V, Smith S, Zhu L, Shedden K, Song PXX, 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
- Keller CK, Geberth SK: Praxis der Nephrologie. Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2007
- Kim KH, Ryu HM, Oh SH, Oh EJ, Ahn JS, Lee JH, Choi JY, Cho JH, Kim CD, Kim YL, Park SH (2014): Effect of DNA demethylation in experimental encapsulating peritoneal sclerosis. *Ther Apher Dial* 18, 628–636
- Le Clef N, Verhulst A, D’Haese PC, Vervaet BA (2016): Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice. *PloS One* 11, e0152153
- Leonetti G, Cuspidi C, Sampieri L, Ambrosioni E, Malini PL, Pessina A, Semplicini A, Cinotti G, Morabito S, Rappelli A (1990): Evaluation of the efficacy and safety of enalapril plus hydrochlorothiazide plus methyldopa vs standard triple therapy in the treatment of moderate to severe hypertension: results from a multicentre study. *J Hum Hypertens* 4, 5–11

7. Literaturverzeichnis

- Levey AS (2012): A Decade After the KDOQI CKD Guidelines. *Am J Kidney Dis* 60, 683–685
- Lo LJ, Go AS, Chertow GM, McCulloch CE, Fan D, Ordoñez JD, Hsu C (2009): Dialysis-requiring acute renal failure increases the risk of progressive chronic kidney disease. *Kidney Int* 76, 893–899
- Marumo T, Yagi S, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Watanabe A, Ueda K, Hirahashi J, Hishikawa K, Sakurai H, et al. (2015): Diabetes Induces Aberrant DNA Methylation in the Proximal Tubules of the Kidney. *J Am Soc Nephrol JASN* 26, 2388–2397
- Massagué J (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* 6, 597–641
- Massagué J, Blain SW, Lo RS (2000): TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295–309
- McMurray JJV, Adamopoulos S, Anker SD, Auricchio A, Böhm M, Dickstein K, Falk V, Filippatos G, Fonseca C, Gomez-Sanchez MA, et al. (2012): ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J* 33, 1787–1847
- Meng XM, Tang PMK, Li J, Lan HY (2015): TGF- β /Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol* 6, 82
- Meno C, Saijoh Y, Fujii H, Ikeda M, Yokoyama T, Yokoyama M, Toyoda Y, Hamada H (1996): Left-right asymmetric expression of the TGF beta-family member lefty in mouse embryos. *Nature* 381, 151–155
- Mitnick PD, Feig PU (1978): Control of hypertension and reversal of renal failure in scleroderma. *N Engl J Med* 299, 871–872
- Okusa MD, Davenport A (2014): Reading between the (guide)lines--the KDIGO practice guideline on acute kidney injury in the individual patient. *Kidney Int* 85, 39–48
- Pacurari M, Kafoury R, Tchounwou PB, Ndebele K (2014): The Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Vascular Inflammation and Remodeling. *Int J Inflamm* 2014, 1–13
- Rangel M, dos Santos JC, Ortiz PHL, Hirata M, Jasiulionis MG, Araujo RC, Ierardi DF, Franco M do C (2014): Modification of epigenetic patterns in low birth weight children: importance of hypomethylation of the ACE gene promoter. *PloS One* 9, e106138
- Reddy MA, Natarajan R (2015): Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases. *Kidney Int* 88, 250–261
- Remuzzi G, Bertani T (1998): Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med* 339, 1448–1456

7. Literaturverzeichnis

- Rockey DC, Bell PD, Hill JA (2015): Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med* 372, 1138–1149
- Rodemann HP, Müller GA (1991): Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 17, 684–686
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491
- Schlondorff DO (2008): Overview of factors contributing to the pathophysiology of progressive renal disease. *Kidney Int* 74, 860–866
- Shames DS, Minna JD, Gazdar AF (2007): DNA methylation in health, disease, and cancer. *Curr Mol Med* 7, 85–102
- Sproul D, Meehan RR (2013): Genomic insights into cancer-associated aberrant CpG island hypermethylation. *Brief Funct Genomics* 12, 174–190
- Strutz F, Zeisberg M (2006): Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol JASN* 17, 2992–2998
- Tampe B, Tampe D, Müller CA, Sugimoto H, LeBleu V, Xu X, Müller GA, Zeisberg EM, Kalluri R, Zeisberg M (2014): Tet3-mediated hydroxymethylation of epigenetically silenced genes contributes to bone morphogenic protein 7-induced reversal of kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol JASN* 25, 905–912
- Tampe B, Tampe D, Zeisberg EM, Müller GA, Bechtel-Walz W, Koziolok M, Kalluri R, Zeisberg M (2015): Induction of Tet3-dependent Epigenetic Remodeling by Low-dose Hydralazine Attenuates Progression of Chronic Kidney Disease. *EBioMedicine* 2, 19–36
- Tao H, Huang C, Yang JJ, Ma TT, Bian EB, Zhang L, Lv XW, Jin Y, Li J (2011): MeCP2 controls the expression of RASAL1 in the hepatic fibrosis in rats. *Toxicology* 290, 327–333
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV (1996): Acute renal failure. *N Engl J Med* 334, 1448–1460
- Tomlinson LA, Abel GA, Chaudhry AN, Tomson CR, Wilkinson IB, Roland MO, Payne RA (2013): ACE Inhibitor and Angiotensin Receptor-II Antagonist Prescribing and Hospital Admissions with Acute Kidney Injury: A Longitudinal Ecological Study. *PLoS ONE* 8, e78465
- Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, Geng H, Saikumar P, Bidani AK (2010): Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F1078–1094
- Wenzel RR (2005): Renal protection in hypertensive patients: selection of antihypertensive therapy. *Drugs* 65 Suppl 2, 29–39
- Woods JW, Blythe WB, Huffines WD (1974): Management of Malignant Hypertension Complicated by Renal Insufficiency: A Follow-up Study. *N Engl J Med* 291, 10–14

7. Literaturverzeichnis

Wu H, Zhang Y (2011): Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. *Genes Dev* 25, 2436–2452

Xu X, Tan X, Tampe B, Nyamsuren G, Liu X, Maier LS, Sossalla S, Kalluri R, Zeisberg M, Hasenfuss G, Zeisberg EM (2015): Epigenetic balance of aberrant Rasal1 promoter methylation and hydroxymethylation regulates cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* 105, 279–291

Xu Y, Xu C, Kato A, Tempel W, Abreu JG, Bian C, Hu Y, Hu D, Zhao B, Cerovina T, et al. (2012): Tet3 CXXC domain and dioxygenase activity cooperatively regulate key genes for *Xenopus* eye and neural development. *Cell* 151, 1200–1213

Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV (2010): Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med* 16, 535–543, 1p following 143

Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, Chavez-Blanco A, Angeles E, Cabrera G, Sandoval K, et al. (2005): A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC Cancer* 5, 44

Zeisberg EM, Zeisberg M (2013): The role of promoter hypermethylation in fibroblast activation and fibrogenesis. *J Pathol* 229, 264–273

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

Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2000): Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol* 13 Suppl 3, S111–120

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

Lebenslauf

Ich, Ulrike Steinle, bin am 30.11.1990 in Heilbronn geboren. Nach meinem Abitur im Herbst 2010 habe mich dazu entschlossen, Humanmedizin zu studieren. Nach einem 6-monatigen Praktikum in einem Kinderheim in der Dominikanischen Republik begann im April 2011 mein Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen.

Im April 2015 begann ich diese experimentelle Doktorarbeit, für die ich ein Freisemester investierte. Am 07.11.2017 absolvierte ich erfolgreich mein Studium und bin approbierte Ärztin. Seit April 2018 arbeite ich als Assistenzärztin der Urologie am Städtischen Klinikum Braunschweig.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. M. Zeisberg für die stetige Betreuung meiner Promotion und das Erlernen methodischen Wissens im experimentellen Arbeiten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. B. Tampe für die Verteilung des Themas und seine konstante Betreuung. Zu jeder Zeit stand er für all meine Fragen zur Verfügung und hat mein wissenschaftliches Arbeiten wesentlich geprägt.

Herrn Prof. Dr. med. G.A. Müller möchte ich für die Möglichkeit danken, in seiner Abteilung der Nephrologie und Rheumatologie zu promovieren.

Großer Dank geht natürlich auch an die medizinisch-technischen Assistentinnen Sarah Rinkl-eff, Annika Faust und Anika Krüger für ihre geduldige und liebenswerte Einarbeitung und Unterstützung.