

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

Die Rolle des FK506 bei der Expression des BMP- Rezeptors BMPR1A

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Friederike Klöpfer

aus

Hildesheim

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichtstatter:	Prof. Dr. med. M. Zeisberg
II. Berichtstatter:	PD Dr. Dr. med. A. Neeße
III. Berichtstatter:	Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg
Tag der mündlichen Prüfung:	24.04.2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle des FK506 bei der Expression des BMP-Rezeptors BMPRI1A" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Chronisch progrediente Niereninsuffizienz.....	1
1.1.1 Ätiologie der chronischen und terminalen Niereninsuffizienz	2
1.1.2 Epidemiologische und sozioökonomische Aspekte	2
1.1.3 Klinischer Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz	3
1.1.4 Therapie der chronischen Niereninsuffizienz	4
1.2 Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz	4
1.2.1 Die renale Fibrogenese	4
1.2.2 Chronischer Tubulusepithelschaden.....	5
1.3 TGF- β -Superfamilie.....	6
1.3.1 Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1)	7
1.3.2 Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7)	7
1.3.3 BMP7-/TGF- β -Antagonismus	10
1.3.4 Bone Morphogenetic Protein Receptor 1A (BMPR1A)	12
1.4 Nierenersatztherapie	13
1.5 Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation	14
1.5.1 Transplantatabstoßung (Rejektion)	14
1.5.2 Wirkmechanismus der Calcineurininhibitoren (CNI)	15
1.5.3 Tacrolimus.....	16
1.6 Tacrolimus und BMPR1A.....	17
1.7 Zielsetzung.....	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20

2.1	Material	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Software und Datenbanken	21
2.1.3	Gebrauchsmaterialien.....	21
2.1.4	Chemikalien	21
2.1.5	Stimulanzien.....	23
2.1.6	Kitsysteme.....	23
2.1.7	Puffer und Lösungen.....	24
2.1.8	Antikörper	25
2.1.9	Oligonukleotide.....	26
2.1.9.1	Primer für die qRT-PCR	26
2.1.9.2	siRNA.....	27
2.1.10	Zelllinien.....	27
2.1.11	Murines Nierengewebe	28
2.1.12	Humanes Nierengewebe	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Zellkultur	29
2.2.2	Tiermodell und Studiendesign	29
2.2.3	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	30
2.2.4	Histologische Methoden	32
2.2.5	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	37
2.2.6	RT ² Profiler™ PCR-Array <i>Human Transcription Factors</i>	41
2.2.7	Western Blot	42
2.2.8	Transfektion von <i>small interfering RNA</i> (siRNA)	45
2.2.9	Statistische Auswertung	48
3.	ERGEBNISSE	49
3.1	Induktion des BMP7-Rezeptors BMPR1A nach FK506-Supplementation <i>in vitro</i>	49
3.1.1	Selektiv vermehrte Expression des BMPR1A unter FK506-Exposition in HK-2-Zellen.....	49
3.1.2	Effekt immunsuppressiver Substanzen auf die Regulation der BMP7-Rezeptoren <i>BMPR1B</i> und <i>BMPR2</i> in HK-2-Zellen.....	50
3.2	Spezifische FK506-abhängige Induktion des <i>Bmpr1a</i> <i>in vivo</i>	51
3.2.1	Vermehrte Expression des <i>Bmpr1a</i> im Mausmodell der unilateralen Ureterobstruktion ...	51
3.2.2	Verminderte Expression der <i>Bmpr1b</i> - und <i>Bmpr2</i> -Rezeptoren nach unilateraler Ureterobstruktion.....	52
3.2.3	FK506-abhängige <i>Bmpr1a</i> -Induktion in Assoziation mit aktivierter Smad1/5/8-Signalschaltungskaskade	54

3.2.4	Einfluss der FK506-Exposition auf die Expression des Bmpr1a- und der pSmad1/5/8-Proteine in <i>sham</i> -operierten Nieren.....	56
3.3	Milderung der experimentellen renalen Fibrogenese <i>in vivo</i> mittels FK506-assoziiierter Bmpr1a-Induktion	58
3.3.1	Effekt der FK506-Exposition auf die Histologie scheinoperierter Nieren.....	61
3.4	Pikomolarer FK506-Vollblutspiegel in FK506-supplementierten UUO-Mäusen.....	63
3.5	FK506-vermittelte BMPR1A-Induktion <i>in vitro</i> durch De-novo-Translation unbekannter Transkriptionsfaktoren.....	64
3.6	Detektion FK506-induzierter Transkriptionsfaktoren <i>in vitro</i> mittels RT ² Profiler™ PCR-Arrays	66
3.7	Validierung der ermittelten Transkriptionsfaktoren <i>in vivo</i>	68
3.8	Induktion des Bmpr1a und der pSmad1/5/8-Proteine unter FK506-Exposition in MCT-Zellen.....	69
3.9	Validierung der ermittelten Transkriptionsfaktoren <i>in vitro</i>	70
3.10	Spezifisches Gene Silencing der putativen Transkriptionsfaktoren <i>in vitro</i>	71
3.10.1	Effizienz des Gene Silencings in MCT-Zellen.....	71
3.10.2	Expression des Bmpr1a unter FK506-Exposition nach Gene Silencing in MCT-Zellen.....	72
3.11	Validierung des Transkriptionsfaktors Arnt <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	73
3.11.1	Vermehrte Expression von Arnt nach FK506-Stimulation in MCT-Zellen.....	73
3.11.2	Vermehrte Expression von Arnt nach FK506-Applikation in UUO-Nieren.....	74
3.12	Validierung der FK506-vermittelten ARNT-, BMRR1A- und pSMAD1/5/8-Induktion in humanen Transplantatnieren	76
4.	DISKUSSION	78
4.1	Quantitative Effektivitätsanalysen unter FK506-Exposition im Nierenparenchym	78
4.1.1	Spezifische Induktion des BMP7-Rezeptors BMPR1A nach FK506-Supplementation.....	78
4.1.2	Milderung der experimentellen renalen Fibrogenese <i>in vivo</i> mittels FK506-assoziiierter Bmpr1a-Induktion.....	80
4.1.3	Methodische Differenzen und Limitationen.....	82
4.2	Charakterisierung molekularer Induktionsmechanismen.....	83
4.2.1	FK506-modulierte BMPR1A-Induktion durch De-novo-Synthese von ARNT.....	83
4.2.2	Postulat der transkriptionellen <i>ARNT</i> -Aktivierung durch FK506-Mediation	85
4.3	Potentielle klinische Relevanz der FK506-vermittelten BMPR1A-Induktion.....	89

4.3.1	Übertragbarkeit generierter In-vivo-Resultate in einen klinischen Kontext	89
4.3.2	Ausblick und mögliche Therapieoptionen	90
5.	ZUSAMMENFASSUNG	96
6.	ANHANG	98
6.1	Genontologie-Analyse mittels webbasierter Datenbanken	98
6.2	Vollständige unbearbeitete Western Blot-Gele	100
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	104

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Prozessierung und Modulation des BMP78

Abbildung 2: Schematische Übersicht antagonistischer Signalwege von BMP7 und TGF- β 11

Abbildung 3: Wirkmechanismus der Calcineurininhibitoren..... 15

Abbildung 4: Strukturformel Tacrolimus 16

Abbildung 5: *BMPR1A*-Induktion in Nierentransplantatpatienten unter FK506-Therapie-
regime..... 17

Abbildung 6: RT² Profiler™ PCR-Array *Human Transcription Factors* (PAHS-075Z) 41

Abbildung 7: RNA-Interferenz..... 46

Abbildung 8: Selektiv vermehrte Expression des *BMPR1A in vitro* unter FK506-Exposition auf
Transkriptionsebene..... 49

Abbildung 9: Selektiv vermehrte Expression des *BMPR1A in vitro* unter FK506-Exposition auf
Proteinebene 50

Abbildung 10: Immunsuppressive Substanzen *in vitro* ohne Effekt auf die Regulation der BMP7-
Rezeptoren *BMPR1B* und *BMPR2*..... 51

Abbildung 11: Spezifische FK506-abhängige Induktion des *Bmpr1a* in UO-Nieren 53

Abbildung 12: Assoziation der FK506-abhängigen *Bmpr1a*-Induktion mit konsekutiv aktivierter
Smad1/5/8-Signaltransduktionskaskade in UO-Nieren 55

Abbildung 13: FK506-Exposition ohne Einfluss auf die *Bmpr1a*- und *pSmad1/5/8*-Expression in
sham-Nieren 57

Abbildung 14: Milderung der experimentellen renalen Fibrogenese mittels FK506-assoziiertes
Bmpr1a-Induktion im histopathologischen Korrelat der UO-Niere..... 59

Abbildung 15: Milderung der experimentellen renalen Fibrogenese *in vivo* durch FK506-
assoziiertes *Bmpr1a*-Induktion auf Transkriptionsebene 60

Abbildung 16: FK506-Exposition ohne Effekt auf die Histologie scheinoperierter Nieren..... 62

Abbildung 17: Pikomolarer FK506-Vollblutspiegel in FK506-supplementierten Versuchstieren 64

Abbildung 18: FK506-vermittelte *BMPR1A*-Induktion *in vitro* basiert auf der De-novo-
Translation unbekannter Transkriptionsfaktoren 65

Abbildung 19: Detektion FK506-induzierter Transkriptionsfaktoren *in vitro* mittels RT² Profiler™
PCR-Arrays 67

Abbildung 20: FK506-modulierte Induktion der Kandidatengene *Max* und *Arnt* in UO-Nieren..... 68

Abbildung 21: Induktion des *Bmpr1a* und der *pSmad1/5/8*-Proteine in FK506-supplementierten
MCT-Zellen..... 69

Abbildung 22: FK506-modulierte Induktion der putativen Transkriptionsfaktoren *in vitro*..... 71

Abbildung 23: Effizienz des Gene Silencings <i>in vitro</i>	72
Abbildung 24: siRNA-vermitteltes Arnt-Silencing evoziert <i>in vitro</i> die Suppression der Bmpr1a-Expression nach initialer FK506-Stimulation	73
Abbildung 25: Vermehrte Arnt-Expression unter FK506-Exposition <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> im UUO-Modell.....	74
Abbildung 26: Vermehrte Arnt-Expression unter FK506-Exposition <i>in vivo</i> im UUO-Modell.....	75
Abbildung 27: ARNT- und BMPR1A-Induktion mit konsekutiver pSMAD1/5/8-Aktivierung in humanen Transplantatnieren unter FK506-Therapie.....	77
Abbildung 28: (A) FKBP12-Interaktionsnetzwerk (B) FK506-modulierte Gene	87
Abbildung 29: Hypothetischer BMPR1A-Induktionsmechanismus durch FK506-Mediation	88
Abbildung 30: Systembiologische Datenanalyse in humanen Transplantatnieren	92
Abbildung 31: Inverse Korrelation von <i>BMPR1A</i> und <i>FKBP12/YY1</i> in verschiedenen Nierenerkrankungen.....	93
Abbildung 32: BMPR1A- und GAPDH-Expression in HK-2-Zellen nach pharmakologischer Präkonditionierung	100
Abbildung 33: Expression der Bmp-Rezeptoren und Haushaltsgene <i>in vivo</i>	100
Abbildung 34: pSmad1/5/8- und Gapdh-Expression <i>in vivo</i>	101
Abbildung 35: BMPR1A- und GAPDH-Expression in HK-2-Zellen nach Cycloheximid-Präkubation	101
Abbildung 36: Bmpr1a-, pSmad1/5/8- und Gapdh-Expression in MCT-Zellen nach FK506-Präkonditionierung	102
Abbildung 37: Bmpr1a- und Gapdh-Expression in MCT-Zellen nach RNAi-basiertem Silencing und FK506-Präkonditionierung.....	102
Abbildung 38: Arnt- und Gapdh-Expression in MCT-Zellen nach FK506-Präkonditionierung	103
Abbildung 39: Arnt- und Gapdh-Expression <i>in vivo</i>	103

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Anwendungsbeispiel zur Nomenklatur von Gensymbolen	X
Tabelle 2:	Diagnosekriterien einer CKD	1
Tabelle 3:	Tacrolimus-Zielspiegel nach Nierentransplantation.....	16
Tabelle 4:	Ziel-mRNA und Primersequenzen für die qRT-PCR	26
Tabelle 5:	Verwendete siRNA mit Zielsequenzen	27
Tabelle 6:	Kohorte von Nierentransplantierten mit klinischen und histologischen Charakteristika	28
Tabelle 7:	Zellkulturmedien und Enzymlösungen der einzelnen Zelllinien.....	29
Tabelle 8:	Angestrebte FK506-Medikamentendosis pro Maus sowie FK506-Konzentration im Trinkwasser.....	30
Tabelle 9:	Färbelösung Masson-Trichrom.....	33
Tabelle 10:	Verwendete Antikörper der Immunhistochemie	34
Tabelle 11:	Verwendete Antikörper der Immunfluoreszenz in murinen Gewebeproben.....	35
Tabelle 12:	Stimulationsschema von HK-2-Zellen für qRT-PCR und Western Blot	37
Tabelle 13:	Schema des DNA-Verdau	38
Tabelle 14:	Oligonukleotidansatz	39
Tabelle 15:	RNaseOut™-Ansatz	39
Tabelle 16:	Ansatz für den qRT-PCR-Mastermix	40
Tabelle 17:	Ansatz für den RT ² Profiler™ PCR-Array-Mastermix	42
Tabelle 18:	Verwendete Antikörper für den Western Blot.....	45
Tabelle 19:	Inverse Korrelation zwischen <i>ARNT</i> und <i>FKBP12/YY1</i> in humanen Organsystemen.....	94
Tabelle 20:	GEO-Zugangsdaten und korrespondierende Publikationen.....	99

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Nicht gesondert aufgeführt sind die im deutschen Sprachgebrauch üblichen Standardabkürzungen.

ACTA2	<i>actin, alpha 2 smooth muscle, aorta</i> (Genname von α SMA)	CTFG	<i>connective tissue growth factor</i>
ACTB	<i>beta-actin</i>	Δ CT/ $\Delta\Delta$ CT	delta-CT/delta delta-CT
ACTR	<i>activin A receptor</i>	CYP3A4/5	<i>cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4/polypeptide 5</i>
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
AK	Antikörper	DGfN	Deutsche Gesellschaft für Nephrologie
ALK	<i>activin receptor-like kinase</i>	DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
AR	<i>androgen receptor</i>	DTG	Deutsche Transplantationsgesellschaft
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>	ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
α SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i> (Genname: ACTA2)	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan	DMSO	Dimethylsulfoxid
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
BMP7	<i>bone morphogenetic protein 7</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
BMPR	<i>bone morphogenetic protein receptor</i>	ELISA	Enzym-gekoppelter Immun--adsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
bp	Basenpaare	ELITE	Efficacy Limiting Toxicity Elimination
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)	EMT	epithelial-mesenchymale Transition
°C	Grad Celsius	ESRD	terminales Nierenversagen (<i>end-stage renal disease</i>)
C ₀	Talspiegel	EtOH	Ethanol
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)	FK506	Tacrolimus
CEBPB	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta</i>	FKBP	FK506-Bindeprotein (<i>FK506-binding protein</i>)
CKD	chronisch progrediente Niereninsuffizienz (<i>chronic kidney disease</i>)	FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
CN	Calcineurin	FSP1	<i>fibroblast-specific protein 1</i>
CNI	Calcineurininhibitor	GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
COLLAGEN-1A1	<i>collagen type I alpha 1 chain</i>	GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
Co-SMAD	<i>common-mediator SMAD</i>		
CREB1	<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>		
CsA	Cyclosporin A		
Ct	<i>threshold cycle</i>		

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GFR	glomeruläre Filtrationsrate	NFW	nukleasefreies Wasser
H-2 ^S	MHC Haplotyp H2s	PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin	PAS	PER-ARNT-SIM
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor 1</i>	PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (<i>periodic acid-Schiff reaction</i>)
HK-2	<i>human kidney-2</i>	PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
HOPE	Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect	PBS-T	<i>phosphate-buffered saline Tween</i>
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)	pSMAD	phosphoryliertes SMAD
ID	<i>inhibitor of DNA binding</i>	qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
IL	<i>interleukin</i>	rhBMP7	rekombinantes humanes BMP7
Ig	Immunoglobulin	RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
I-SMAD	inhibitorisches SMAD	RNAi	RNA-Interferenz
kDa	Kilodalton	R-SMAD	regulatorisches SMAD
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes	scrRNA	nicht-genomische siRNA (<i>scrambled siRNA</i>)
LDS	Lithiumdodecylsulfat	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
MAX	<i>MYC associated factor X</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
MCT	<i>murine tubular epithelial cells</i>	SV40	Affenvirus 40 (<i>simian virus 40</i>)
MET	mesenchymal-epitheliale Transition	TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
MMF	Mycophenolat Mofetil	TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween</i>
MOPS	3-(N-Morpholino) propansulfonsäure	TGF-β1	<i>transforming growth factor-β1</i> (Genname: <i>TGFB1</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
MTS	Masson-Trichrom-Färbung (<i>Masson's trichrome stain</i>)	TSS	Transkriptionsstartpunkt (<i>transcription start site</i>)
NCBI	National Center for Biotechnology Information	USRDS	United States Renal Data System
NFAT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>	UO	unilaterale Ureterobstruktion
NF-κB	<i>nuclear factor of kappa light poly- peptide gene enhancer in B-cells 1</i>	YY1	<i>YIN YANG 1</i>
		ZO-1	<i>zonula occludens-1</i>

Weitere Abkürzungen sind an entsprechender Stelle im Text aufgeführt.

Nomenklatur von Gensymbolen

Die Nomenklatur von Gensymbolen entspricht den international festgelegten Konventionen (Wain et al. 2002).

- Bezeichnung humaner Gene/mRNA: in Großbuchstaben, Kursivsetzung
- Bezeichnung muriner Gene/mRNA: mit Großbuchstaben beginnend, gefolgt von Kleinbuchstaben
- Genprodukte/Proteine: Groß- und Kleinschreibung erfolgt nach denselben Richtlinien ihrer kodierenden Gene, keine Kursivsetzung

Tabelle 1: Anwendungsbeispiel zur Nomenklatur von Gensymbolen

Spezies	Gensymbol	Proteinsymbol
<i>Homo sapiens</i>	<i>BMPR1A</i>	BMPR1A
<i>Mus musculus</i>	<i>Bmpr1a</i>	Bmpr1a

1. EINLEITUNG

1.1 Chronisch progrediente Niereninsuffizienz

Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease*, CKD) korreliert mit einem fortschreitenden Funktionsverlust des Organs, dessen Filtrations- und Eliminationsaufgaben im Falle eines vollständigen Nierenversagens mittels Dialyse oder allogener Transplantation ersetzt werden müssen. Eine Früherkennung ist entscheidend für die Progression der Erkrankung, wird jedoch durch einen zunächst asymptomatischen Krankheitsverlauf und den bisherigen Mangel an etablierten Biomarkern, die eine Diagnose ungeachtet bestehender Grunderkrankungen ermöglichen, erschwert. Weiterhin fehlen derzeit kausale Therapiestrategien, die zur Restitution destrukturierter Organstrukturen beitragen.

Die CKD ist allgemein definiert als eine über mindestens drei Monate andauernde strukturelle oder funktionelle Anomalie der Niere bei bereits bestehender gesundheitlicher Beeinträchtigung des Patienten. Diese von der KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) im Jahr 2012 modifizierte Praxisleitlinie basiert dabei auf der Diagnose eines für einen Nierenschaden relevanten Markers oder einer auf unter 60 ml/min pro 1,73 m² Körperoberfläche reduzierten glomerulären Filtrationsrate (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Diagnosekriterien einer CKD

Ein/mehrere Marker positiv oder reduzierte GFR (modifiziert nach KDIGO CKD Work Group 2013, Seite 5).

Marker eines Nierenschadens (einer oder mehrere positiv)	Albuminurie (Albumin/Kreatin-Verhältnis ≥ 30 mg/g; ≥ 3 mg/mmol)
	Abnormitäten im Urinsediment
	Elektrolyt- und andere Störungen infolge tubulärer Schädigung
	Pathologische Anomalien, histologisch verifizierbar
	strukturelle Unregelmäßigkeiten innerhalb bildgebender Verfahren
	Zustand nach Nierentransplantation
Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	GFR < 60 ml/min/1,73 m ² (GFR-Kategorien G3a - G5)

Des Weiteren formulierte die KDIGO in Abhängigkeit von der Ätiologie der jeweiligen Nierenerkrankung (Cause) sowie unter Einbezug der Nierenparameter GFR (G1 - G5) und Albuminurie (A1 - A3) das deutlich präzisierete **CGA**-Klassifizierungsschema, auf dessen Grundlage eine ursachenspezifische Therapie fokussiert, vor allem aber eine umfangreiche Risikostratifizierung vorgenommen werden kann. Die über den Kalkulationsalgorithmus CKD-EPI (CKD-Epidemiology Collaboration) geschätzte GFR (*estimated GFR*, eGFR) optimiert zudem die in nunmehr sechs Stufen differenzierte GFR-Kategorie, wobei deren Level G5 mit einer eGFR unter 15 ml/min/1,73m² weiterhin den Zustand des terminalen Nierenversagens (*end-stage renal disease*, ESRD) mit der Notwendigkeit zur Nierenersatztherapie bezeichnet (KDIGO CKD Work Group 2013).

1.1.1 Ätiologie der chronischen und terminalen Niereninsuffizienz

Chronische Nierenerkrankungen gewinnen im Zuge des weltweiten demographischen und globalen Wandels, nicht zuletzt aber aufgrund der kontinuierlichen Progression der dem westlichen Lebensstil geschuldeten Volksleiden Diabetes mellitus, Hypertonie und Übergewicht immer mehr an Brisanz.

Als Hauptursache der chronischen und terminalen Niereninsuffizienz in den Industrienationen gilt das Vorliegen eines Diabetes mellitus Typ I und II, welcher bei rund 30 bis 40 % der Betroffenen eine sogenannte diabetische Nephropathie induziert (Whaley-Connell et al. 2009). Prognosen zufolge dürfte insbesondere die ansteigende Prävalenz der Diabetiker mit voraussichtlich 439 Millionen involvierten Patienten bis ins Jahr 2030 unweigerlich den globalen Wachstumstrend der CKD begünstigen (Jha et al. 2013). Die aufgrund eines diagnostizierten arteriellen Hypertonus bedingte hypertensive Nephropathie führte allein in Deutschland im Jahr 2006 in 24 % der Fälle zum terminalen Nierenversagen und stellt hierzulande wie auch in den USA den zweithäufigsten Risikofaktor einer Nierenersatztherapie dar (Frei und Schober-Halstenberg 2008, Bakris und Ritz 2009, USRDS 2013 Annual Data Report). Deutlich kausal hängt ferner die überalternde Gesellschaftsstruktur mit dem Beginn der chronischen Nierenersatztherapie zusammen: In Deutschland stieg der Altersmedian der inzidenten Patienten in den Jahren 1996 bis 2006 von 63 auf 70 Jahre, sodass rund 69 % der Betroffenen bei Aufnahme einer Behandlung 65 Jahre und älter waren (Frei und Schober-Halstenberg 2008). Primäre Nierenerkrankungen hingegen wie Glomerulo- und interstitielle Nephritiden oder Zystennieren spielen für das Entstehen einer terminalen Niereninsuffizienz eine vergleichsweise untergeordnete Rolle (Frei und Schober-Halstenberg 2008).

1.1.2 Epidemiologische und sozioökonomische Aspekte

Basierend auf den statistischen Erhebungen des fortlaufenden Forschungsprogramms NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) beziffert der USRDS (United States Renal Data System) Annual Data Report 2013 die aktuelle CKD-Prävalenz in den Vereinigten Staaten für den Untersuchungszeitraum 2005 bis 2010 auf 14 % der Gesamtbevölkerung. In der Population terminal nierenkranker Patienten bedingt die Verdopplung von Inzidenz und Prävalenz in den Jahren 1990 bis 2005 einen dramatischen Anstieg auf rund 430.000 Dialysepatienten sowie 190.000 Nierentransplantierte am Stichtag 31.12.2011 (USRDS 2013 Annual Data Report, St Peter 2007). Vergleichbare Daten gehen in Deutschland aus dem Jahresbericht 2006 des Bundesverbands QuaSi-Niere hervor, demzufolge 70.000 dialysepflichtige sowie 24.000 transplantierte Personen im Rahmen einer Nierenersatztherapie behandelt wurden. Innerhalb der letzten 10 Jahre lässt sich daraus ein jährlicher Prävalenz- und Inzidenzanstieg therapeutischer Maßnahmen infolge eines Nierenversagens von etwa 4 bis 5 % konstatieren (Frei und Schober-Halstenberg 2008). Weltweit wird die Prävalenz der chronisch Nierenkranken auf einen Anteil von 8 bis 16 % der Gesamtbevölkerung geschätzt (Jha et al. 2013) bei einer für das Jahr 2010 prognostizierten Anzahl von zwei Millionen terminal niereninsuffizienter Patienten (Lysaght 2002).

Vor diesem Hintergrund gewinnen insbesondere sozioökonomische sowie gesundheitspolitische Aspekte an Bedeutung. So veranschlagt die staatliche Krankenversicherung des amerikanischen Gesundheitssystems Medicare im Jahr 2011 allein für die Nierenersatztherapie Ausgaben in Höhe von 34,3 Milliarden Dollar (USRDS 2013 Annual Data Report). Laut der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie (DGfN) belaufen sich die Kosten eines Dialysepatienten in Deutschland auf etwa 40.000 Euro

pro Jahr, woraus sich für die gesetzlichen Krankenversicherungen eine geschätzte Auslage für ambulante Dialysebehandlungen von rund zwei Milliarden Euro jährlich ergibt und somit allein zwei Drittel des für die Nierenersatztherapie kumulierten Gesamtbetrages ausmacht (DGfN 2014, Potthoff et al. 2012, Nebel 2003). Für den operativen Eingriff einer Nierentransplantation wird eine Summe zwischen 50.000 bis 65.000 Euro kalkuliert. Bei funktionsfähigem Transplantat unterschreiten die jährlichen Nachsorgekosten mit 6.000 bis 12.500 Euro pro Patient allerdings bereits im zweiten Jahr postoperativ die durchschnittliche Vergütungshöhe der Dialyse (Kleophas und Reichel 2007, DGfN 2014).

Die sich zu den anfallenden Kosten der Nierenersatztherapie addierenden Aufwendungen für mildere CKD-Stadien befördern die immensen Belastungen der weltweiten Gesundheitssysteme und bekräftigen die Notwendigkeit zur Etablierung präventiver Therapiekonzepte.

1.1.3 Klinischer Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz

Eine diagnostizierte chronische Niereninsuffizienz erhöht substantiell Morbidität und Mortalität des betroffenen Patienten und bedingt ein entsprechend sensibles Screening zur Abschätzung ihrer Erstmanifestation und Progression. Prognostisch relevante Risikovariablen stellen dabei die Ursache der CKD, das Vorliegen bzw. der Grad einer GFR- und Albuminurie-Kategorie sowie zusätzliche Komorbiditäten dar. Ferner gelten u. a. Alter, Geschlecht, Ethnizität, arterielle Hypertonie, Adipositas, kardiovaskuläre Erkrankungen ebenso wie der Abusus von Nikotin und nephrotoxischen Substanzen als valide Prädiktoren eines fortschreitenden Nierenfunktionsverlustes (KDIGO CKD Work Group 2013). Da eine klinisch manifeste Symptomatik sich häufig erst in späten CKD-Stadien äußert, erfolgt die Diagnose oft nur zufällig im Rahmen von Routineuntersuchungen (Methven und MacGregor 2009).

Die renale Minderfunktion der Niere induziert Störungen des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes und verursacht infolge der sich ausweitenden Salz- und Wasserretention Ödeme in den unteren Extremitäten, im Zustand der Urämie auch in der Lunge. Die unzureichende Wahrnehmung endokriner Aufgaben führt aufgrund der defizitären Erythropoetin- und Calcitriolsynthese zur renalen Anämie und, im Zusammenspiel mit dem sekundären Hyperparathyreoidismus, zur renalen Osteodystrophie. Überdies verstärken arteriosklerotische Ablagerungen im Gefäßsystem der Niere die Deregulierung der Volumenhomöostase, in deren Folge sich ein arterieller Hypertonus auch sekundär entwickeln kann (Keller und Geberth 2010). Die zunehmend dekompensierte Retention harnpflichtiger Substanzen intensiviert sich mit dem Eintreten von Oligo- bzw. Anurie im Terminalstadium der Niereninsuffizienz und resultiert angesichts akkumulierender Urämietoxine im Blut des Patienten in einer endogenen Intoxikation. Als weitere schwerwiegende Komplikationen seien nephrogene Koagulopathien, Perikarditis, urämische Enzephalopathien, periphere Neuropathien sowie gastrointestinale und dermatologische Symptome zu nennen (Keller und Geberth 2010, Vanholder et al. 2008). Von besonderer prognostischer Relevanz ist die Manifestation kardiovaskulärer Erkrankungen, die als eigenständiges Ereignis oder infolge toxisch bedingter Organschäden im Kontext eines terminalen Nierenversagens auftreten und die häufigste Todesursache der ESRD darstellen (Levin 2003, Vanholder et al. 2008).

1.1.4 Therapie der chronischen Niereninsuffizienz

Therapieoptionen der chronischen Niereninsuffizienz implizieren die Behandlung einer diagnostizierten Grunderkrankung, die Restriktion nephrotoxischer Substanzen sowie die Reduktion bestehender Progressionsfaktoren. Vordergründig wird dabei die Normalisierung des systemischen Blutdrucks auf $\leq 140/90$ mmHg bzw. bei bestehender Proteinurie von ≥ 30 mg/Tag auf $\leq 130/80$ mmHg fokussiert, wobei gemäß der aktuellen klinischen Praxisleitlinie der KDIGO die Applikation von Inhibitoren des Angiotensin-Converting-Enzyms oder von Angiotensin-Rezeptorantagonisten empfohlen wird (KDIGO CKD Work Group 2013). Über die Unterdrückung des proliferativen Peptidhormons Angiotensin II vermitteln die beiden Antihypertensiva - neben der Senkung des intraglomerulären Drucks - antiproteinurische und damit zusätzlich nephroprotektive Wirksamkeit (Keller und Geberth 2010). Weitere allgemeine Maßnahmen umfassen eine moderate Proteinzufuhr, eine natrium-, kalium- und phosphatarme Diät sowie die Einstellung eines im Normbereich liegenden Body-Mass-Index (KDIGO CKD Work Group 2013).

Zwar können diese Optionen einen wesentlichen Beitrag zur Remission der Erkrankung leisten, jedoch keinesfalls gänzlich den progredienten Nierenfunktionsverlust unterbinden oder gar eine Restitution der zunehmenden Organdestruktion vermitteln (Turgut et al. 2010). Somit steht derzeit keine kausale Therapie in der klinischen Nephrologie zur Verfügung, welche den chronisch progredienten Nierenfunktionsverlust gänzlich aufhalten kann.

1.2 Pathophysiologie der chronischen Niereninsuffizienz

1.2.1 Die renale Fibrogenese

Das morphologische Korrelat der chronisch progredienten Niereninsuffizienz ist insgesamt durch das kombinierte Auftreten der tubulointerstitiellen Fibrose mit einhergehender Tubulusatrophie (IFTA), der Rarefizierung peritubulärer Kapillaren sowie einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) gekennzeichnet (Boor et al. 2010, Bröcker et al. 2010). Letztlich korrelieren gemäß der von Bohle bereits in den 1960er-Jahren aufgrund morphometrischer Analysen postulierten Theorie jedoch der Grad des interstitiellen Fibrosierungsprozesses und die Abnahme der Nierenfunktion signifikant miteinander (Bohle et al. 1977, Bohle et al. 1987), wohingegen sich primär glomeruläre Veränderungen prognostisch deutlich besser darstellen (Bohle et al. 1992). Dabei zeichnet die IFTA als gemeinsame Endstrecke pathogenetisch äußerst verschiedenartiger Nierenerkrankungen ein relativ uniformes Bild und ist die Folge eines fehlregulierten Reparaturmechanismus, der die natürliche Homöostase zwischen Matrixsynthese und -degradation außer Kraft setzt (Bröcker et al. 2010). Stattdessen wird ein arbiträrer Vernarbungsprozess, die sogenannte renale Fibrogenese, initiiert (Kuncio et al. 1991, Strutz und Neilson 2003), der initial in Analogie zur physiologischen Organheilung erfolgt und, wie im Tiermodell bereits belegt, eine *restitutio ad integrum* zulässt (Eddy 1996).

Zunächst setzen tubuläre Epithelzellen eine Reihe von Chemokinen und Wachstumsfaktoren frei, woraufhin mononukleäre Leukozyten, vorzugsweise T-Lymphozyten und Monozyten bzw. Makrophagen, Mastzellen sowie dendritische Zellen in das Interstitium migrieren und wiederum über die Induktion inflammatorischer Zytokine u. a. dem TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), dem TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*), dem FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) sowie verschiedener Interleukine einen weiteren profibrotischen

Stimulus liefern (Holdsworth und Summers 2008, John und Nelson 2007, Müller et al. 1992, Strutz und Neilson 1994, Strutz und Neilson 2003). Die kontinuierlich sezernierten Zytokine aus infiltrierten Entzündungs- und residenten Tubuluszellen evozieren in ihrer Komplexität die Aktivierung und Proliferation interstitieller Fibroblasten. Dies führt zur gesteigerten Synthese extrazellulärer Matrix (EZM) bei gleichzeitig reduziertem Matrixabbau, in dessen Konsequenz es zur massiven Deposition von EZM-Komponenten kommt (Jones et al. 1992, Strutz und Neilson 2003). Die sich reduzierende Leukozyteninfiltration bedingt zwar die Auflösung des primären Inflammationsprozesses, die Aktivierung der Fibroblasten, Hauptmediatoren der renalen Fibrogenese, bleibt jedoch angesichts der anhaltenden Zytokinsekretion des Tubulusepithels fortbestehen bzw. intensiviert sich infolge autokriner Proliferationsmechanismen von Fibroblasten und Myofibroblasten (Müller et al. 2000, Strutz und Neilson 2003). Die im exzessiven Ausmaß voranschreitende Ablagerung von Matrixproteinen in Verbindung mit der progredienten Schädigung tubulärer Epithelzellen und peritubulärer Kapillaren resultiert letztlich im Verlust von Organarchitektur und -funktion (Ng et al. 1998, Strutz und Neilson 2003, Müller et al. 2000).

1.2.2 Chronischer Tubulusepithelschaden

Die Rolle tubuloepithelialer Zellen während der renalen Fibrose wird im Wesentlichen durch den Verlust ihrer Regenerationsfähigkeit bestimmt. Dabei implizieren die zunächst protektiven, mit Progredienz der Erkrankung jedoch zunehmend maladaptiven Mechanismen den Arrest im Zellzyklus, Veränderungen im intrazellulären Zellmetabolismus sowie eine Aktivierung der Autophagozytose (Kang HM et al. 2015, Li L et al. 2010, Li L et al. 2014, Yang L et al. 2010).

Im Hinblick auf die Generierung von Fibroblasten wurde ferner das Phänomen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), eines Dedifferenzierungsprozesses, in dessen Verlauf adulte renale Tubuluszellen innerhalb eines pathogenen Milieus transformieren und einen zunehmend spindelförmigen Phänotyp ähnlich mesenchymalen Zellen entwickeln (Greenburg und Hay 1982, Liu 2004, Zuk et al. 1989), als wesentlich angenommen. LeBleu et al. gelang es allerdings, mittels *fate mapping*-Methoden im murinen Tubulusepithel, gekoppelt an genetische Reporter zum Tracking mesenchymaler Zellen, den Anteil der Myofibroblasten, die nach Durchlaufen eines vollständigen Transitionsprozesses originären Tubuluszellen entstammten, auf 5 % zu quantifizieren (LeBleu et al. 2013). Insbesondere die Hypothese, Epithelzellen könnten sich nach Degradation der Basalmembran mit einhergehendem Verlust ihrer apikal-basalen Polarität aus ihrem tubuloepithelialen Zellverband lösen und frei migrieren, wird inzwischen kontrovers diskutiert und festigte Zweifel an der Existenz der EMT *in vivo* (Humphreys et al. 2010, Kriz et al. 2011, Li L et al. 2010, Zeisberg M und Duffield 2010). Statt einer kompletten phänotypischen Konversion definiert sich die EMT indes durch die Entstehung eines hybriden, koexprimierenden und somit profibrotischen Zelltypus. Dabei bedingt die EMT die kontinuierliche Herunterregulation epithelialer Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin, ZO-1 (*zonula occludens-1*) und Cytokeratin zugunsten der mesenchymalen Markerproteine Vimentin, α SMA (α -*smooth muscle actin*), FSP1 (*fibroblast-specific protein 1*) und Kollagen vom Typ I (Collagen-1) (Lovisa et al. 2015, Strutz 1995, Zeisberg M und Neilson 2009). Darüber hinaus korreliert die Transdifferenzierung neben der rein morphologischen Alteration mit funktionellen Einbußen des Tubulusepithels, die wiederum durch die Depletion einiger spezifischer Transportergene ausgelöst werden. Parallel induziert die EMT selbst Zellzyklus-arretierende Signale und beeinträchtigt somit physiologische

Reparatur- und Regenerationsmechanismen. Weiterhin verstärkt sich mit der pathogenen Modifizierung des zellulären Sekretoms der Fibrosierungs- und Inflammationsprozess und nachfolgend die Rekrutierung des Immunsystems (Lovisa et al. 2015, Grande et al. 2015).

Letztlich beeinflussen sich die skizzierten Abläufe wechselseitig und evozieren somit das Fortbestehen eines exazerbierenden *Circulus vitiosus*. Die Suppression des EMT-Programms könnte daher ein vielversprechendes therapeutisches Konzept zur Protektion chronischer Schäden im Nierenparenchym darstellen (Lovisa et al. 2015).

1.3 TGF- β -Superfamilie

Dysbalancen von Wachstumsfaktoren leisten wesentliche Beiträge zur Entstehung der renalen Fibrogenese. In diesem Kontext ist die Superfamilie des *transforming growth factor- β* (TGF- β), ein Zusammenschluss strukturell ähnlicher Regulationsproteine, deren Namensgebung auf seinen Prototyp TGF- β 1 als erstes isoliertes Mitglied zurückzuführen ist, zu nennen (Massagué 1990). Im Rahmen der Organogenese beeinflussen die jeweiligen Mitglieder über Proliferation, Differenzierung und Apoptose verschiedenster Zelltypen die Strukturierungs- und Spezifikationsmechanismen einzelner Gewebe und modulieren darüber hinaus skelettales sowie neuronales Wachstum. Im adulten Organismus sorgen sie während der Wundheilung und Geweberegeneration für die Kontinuität der Gewebshomöostase und sind überdies Regulatoren des Immunsystems (Chang H et al. 2002, Ducky und Karsenty 2000, Herpin et al. 2004, Li MO et al. 2006, Massagué 2000). Allein in Vertebraten gehören der Ordnung der TGF- β -Superfamilie mittlerweile über 30 identifizierte Zytokine an, zu denen die Isoformen des TGF- β , *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *inhibin*, *activin*, *growth differentiation factors* (GDFs) wie *nodal* und *lefty* sowie das *anti-Muellerian hormone* (AMH) zählen (Gordon und Blobe 2008).

Signale an der Zielzelle werden bei den Mitgliedern der TGF- β -Superfamilie im Wesentlichen durch zwei Rezeptorklassen transduziert. Charakteristische Strukturmerkmale der bislang identifizierten, etwa 500 Aminosäuren umfassenden, sieben Typ I- und fünf Typ II-Rezeptoren stellen eine kurze extrazelluläre N-terminale Bindungsdomäne, eine transmembranäre Region sowie eine intrazelluläre C-terminale Serin/Threonin-Kinasedomäne dar (Shi und Massagué 2003). Die Bindung des dimeren Liganden führt zur Rekrutierung eines meist heterotetrameren Komplexes aus je zwei Typ I- und zwei Typ II-Rezeptoren und induziert über die daraufhin eintretende Konformationsänderung der intrazellulären Serin/Threonin-Kinase des Typ II-Rezeptors die Phosphorylierung der spezifischen glycin- und serinreichen Domäne (GS-Box) des Typ I-Rezeptors. Der anschließend aktivierte Typ I-Rezeptor initiiert durch die Phosphorylierung regulatorischer SMAD-Proteine (R-SMAD) eine intrazelluläre Signalkaskade, in deren Verlauf es zur Interaktion mit dem *common-mediator* SMAD4 (Co-SMAD) kommt. Die inhibitorischen SMAD-Proteine (I-SMAD) SMAD6 und 7 hingegen agieren in Blockadefunktion (Attisano und Wrana 2002, Shi und Massagué 2003, Yamashita et al. 1994). Determinanten für die Spezifität des jeweiligen Signalweges stellen korrespondierende Loop-Segmente des Typ I-Rezeptors sowie der R-SMAD-Proteine dar (Feng XH und Derynck 1997, Lo et al. 1998).

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

Bereits 1980 entdeckten Roberts et al. die Fähigkeit der *transforming growth factors* (TGFs), murinen Fibroblasten aus isolierten Geweben *in vitro* als Wachstumsstimulanz zu dienen (Roberts et al. 1980). Bisher konnte der Subtyp TGF- β in einer Vielzahl von Organen wie der Niere, Leber, Herz oder Lunge als das zentrale Schlüsselzytokin pathologischer Fibrosierungsprozesse identifiziert werden (Border und Noble 1994). In diesem Zusammenhang kommt von seinen drei im humanen Organismus existierenden Isoformen TGF- β 1, - β 2 und - β 3 insbesondere der aktivierten Variante des TGF- β 1 eine herausragende Rolle zu: Zum einen forciert der Faktor eine fortschreitende Deposition interstitieller und mesangialer Matrixkomponenten, indem er residente Fibroblasten und Mesangiumzellen zur verstärkten Produktion von Kollagen, Fibronectin und Proteoglykanen stimuliert. Andererseits verhindert TGF- β 1 über die Induktion des Proteaseinhibitors PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) bei gleichzeitiger Suppression extrazellulärer Proteasen die Degradation der Matrixproteine (Border et al. 1990, Peters et al. 1998, Strutz et al. 2001). Ferner gilt das TGF- β 1 als autonomer Mediator sukzessiver Transdifferenzierungsmechanismen in tubulären Epithelzellen, währenddessen sie mesenchymale Charakteristika entwickeln und in die Front EZM-produzierender Fibroblasten involviert werden (Liu 2006).

Neben dem Vorgang der EMT gilt die TGF- β -induzierte Apoptose in Podozyten, im tubulären Epithel sowie in der glomerulären und peritubulären Mikrovaskulatur als der grundlegende zelluläre Pathomechanismus fortschreitender Nierenerkrankungen. Daraus resultierende Geschehnisse wie Podozytendepletion, tubuläre Atrophie und Verlust der Kapillaren addieren sich zu den eingangs genannten Effekten und münden nach voranschreitender Glomerulosklerose und tubulointerstitieller Fibrose letztlich im Untergang der Nephrone (Böttinger und Bitzer 2002). Die dargestellten Zusammenhänge konnten auch im Rahmen zahlreicher tierexperimenteller Studien nachvollzogen werden. Kopp et al. erzielten beispielsweise in transgenen Mäusen infolge erhöhter systemischer Tgf- β 1-Plasmakonzentrationen Nierenschäden in Form einer tubulointerstitiellen Fibrose, atrophierter Tubuli und glomerulärer Abnormitäten (Kopp et al. 1996). Das TGF- β transduziert seine Effekte über die Bindung des Typ II-Rezeptors T β RII, woraufhin die Komplexierung des Typ I-Rezeptors T β RI (ALK5) eintritt und somit die anschließende Phosphorylierung der intrazellulären R-SMADs SMAD2/3 ermöglicht. Diese formieren einen Komplex mit SMAD4, das in den Zellkern transloziert und nach DNA-Bindung die Transkription TGF- β -assoziierter Gene moduliert (Heldin et al. 1997, Rahimi und Leof 2007, Shi und Massagué 2003).

1.3.2 Bone Morphogenetic Protein 7 (BMP7)

In den 1960er Jahren wurde das körpereigene BMP7 (*bone morphogenetic protein 7*) aufgrund seiner Eigenschaft, die ektope Knorpel- und Knochenformation zu induzieren, entdeckt und daraufhin mit dem ursprünglichen Terminus *osteogenic protein-1* (OP-1) bezeichnet (Urist 1965). Die strukturelle Charakterisierung des Polypeptids mittels Sequenzanalysen erlaubte schließlich die Zuordnung zur TGF- β -Superfamilie und führte zu seiner Umbenennung (Celeste et al. 1990, Ozkaynak et al. 1990, Wozney et al. 1988).

Zur Synthese der biologisch aktiven Form des BMP7 erfolgt nach Translation des aus 431 Aminosäuren bestehenden Präpropeptids seine Dimerisierung sowie die anschließende proteolytische Abspaltung von Signalsequenz und Prodomäne. Das prozessierte mature BMP7 liegt daraufhin als Homodimer mit einem

kalkulierten Molekulargewicht von 36 kDa vor, dessen beiden glykosylierten Untereinheiten je 139 Aminosäuren umfassen, etwa 16 kDa schwer und über Disulfidbrücken gekoppelt sind (siehe Abbildung 1 (A)) (Celeste et al. 1990, Sampath et al. 1992, Zeisberg M 2006).

Zur Übermittlung seiner Signale kann das BMP7 mit den drei membranständigen Typ II-Rezeptoren BMPR2, ACTRII, ACTRIIB sowie den Typ I-Rezeptoren ACTRI (ALK2), BMPR1A (ALK3) und BMPR1B (ALK6) interagieren (Kawabata et al. 1998, ten Dijke et al. 1994, Yamashita et al. 1996).

Nach erfolgter Rezeptorbindung des homodimeren Liganden formiert sich ein stabiler Rezeptorkomplex und induziert über die Phosphorylierung der zytoplasmatischen rezeptorregulierten Proteine SMAD1/5/8 zu pSMAD1/5/8 die Aktivierung der intrinsischen SMAD-Signalkaskade. Die phosphorylierten R-SMADs komplexieren nun mit dem SMAD4, das nach Translokation in den Zellkern die Expression seiner Zielgene reguliert (Derynck et al. 1998, Tamaki et al. 1998). In Bezug auf die Interaktionen zwischen dem BMP7 und seinen spezifischen Rezeptoren fungieren die extrazellulären Moleküle NOG (*noggin*), USAG1 (*uterine sensitization-associated gene-1*) und GREM1 (*gremlin 1*) als Inhibitoren, während das *kielin/chordin-like protein* (KCP) die biologische Aktivität des BMP7 über die Intensivierung der Rezeptorbindung stabilisiert (siehe Abbildung 1 (B)) (Bechtel und Zeisberg M 2009).

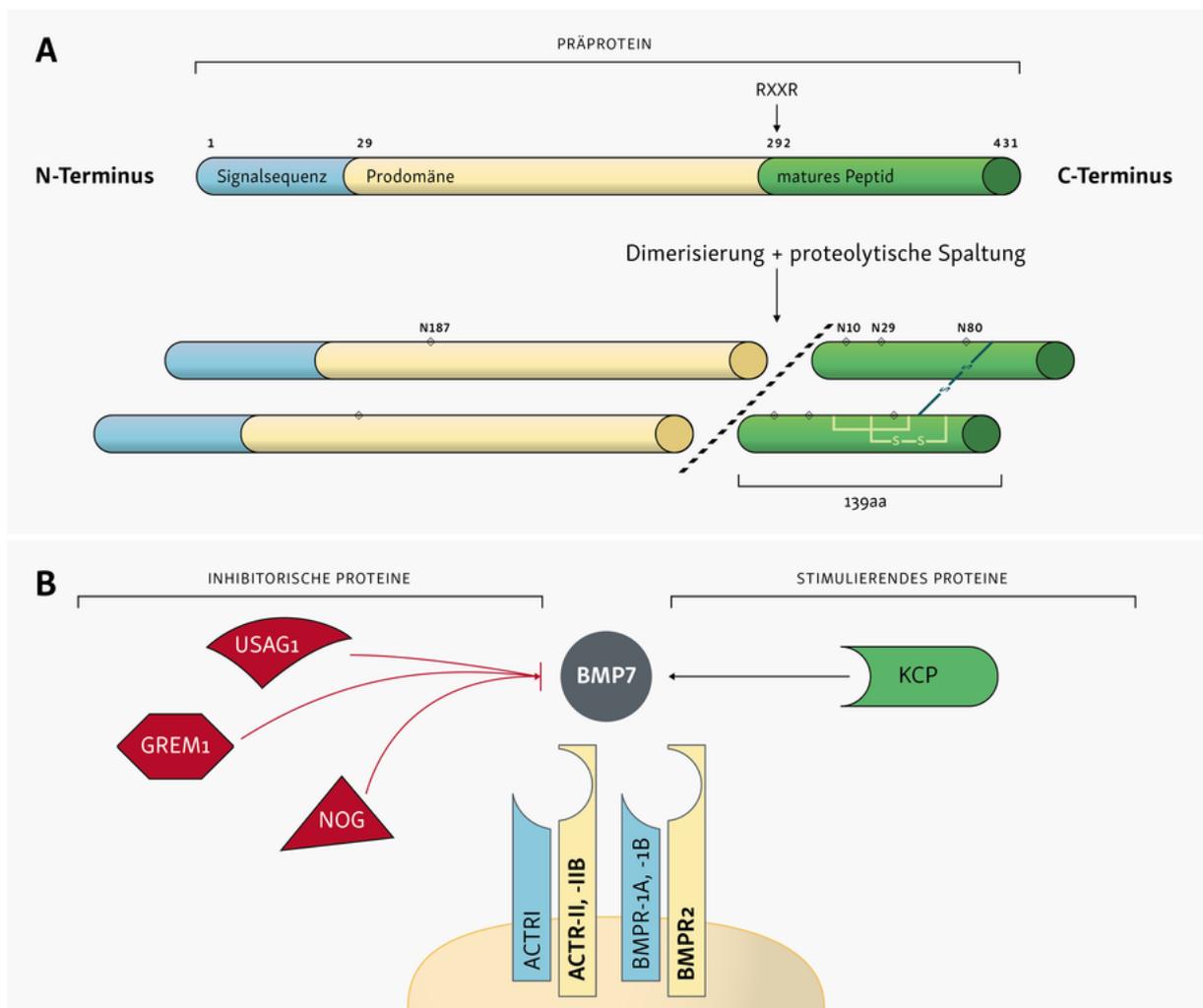


Abbildung 1: Prozessierung und Modulation des BMP7

(A) Prozessierung des Präpropeptids. Intra- und intermolekulare Disulfidbrücken bedingen dreidimensionale Molekülstruktur des aktivierten Homodimers. aa, *amino acid*; N, N-Glykosylierung; RXXR, konserviertes Signalmotiv; S-S, Disulfidbrücke (modifiziert nach Sampath et al. 1992, Seite 20355; Griffith DL et al. 1996, Seite 878).
 (B) Regulative Einflüsse exogener Modulatoren (modifiziert nach Bechtel und Zeisberg M 2009, Seite 1690).

Neben seiner elementaren Bedeutung für den Knochenstoffwechsel konnte dem BMP7 in einer Vielzahl morphogenetischer Prozesse eine zentrale Rolle zugesprochen werden. Erhöhte Expressionsmuster sind bereits während der frühen Embryogenese im viszeralem Entoderm, der Chorda dorsalis sowie im Kontext der Organogenese von Herz, Augen, Skelett und Nieren detektierbar. In der murinen Nephrogenese fungiert das Bmp7 als Mediator einer regelrechten Nierenentwicklung und lässt sich am Tag 11 *post conceptionem* im Epithel der Ureterknospe und nachfolgend in dessen Derivaten lokalisieren (Dudley und Robertson 1997, Vukicevic et al. 1996). Unter seinem Einfluss transdifferenziert das induzierte metanephrische Mesenchym über den Mechanismus der MET zu spezialisierten Zellen der Glomeruli und formiert erhebliche Teile des tubulären Apparats (Vukicevic et al. 1996). Homozygote *Bmp7*^{-/-}-defiziente Mäuse zeigen bei ihrer Geburt, neben Mikro- bzw. Anophthalmie und skelettalen Missbildungen, eine schwerwiegende bilaterale renale Dysplasie, sodass sie innerhalb von 24 Stunden infolge eines postnatalen Nierenversagens versterben (Godin et al. 1998). Ursächlich ist ein zunehmender Rückgang von Mesenchymzellen zwischen den Tagen 12,5 bis 14,5 *post conceptionem*, der letztlich die physiologisch stattfindende MET und somit den Differenzierungsprozess der Nephrone behindert (Dudley et al. 1995, Godin et al. 1998, Luo et al. 1995). Im gesunden adulten Organismus wird das BMP7 in Knochen und Knorpel exprimiert, primärer Syntheseort ist jedoch die Niere, vornehmlich das Sammelrohr, der distale Tubulus sowie die Podozyten (Ozkaynak et al. 1991, Gould et al. 2002). Allerdings korreliert sein Expressionsniveau deutlich negativ mit der Diagnose einer akuten oder chronischen Niereninsuffizienz, die systemische Applikation von exogenem rekombinantem humanem BMP7 (rhBMP7) hingegen resultiert in unterschiedlichen Tiermodellen in einer signifikant verbesserten Regenerationskapazität der beschädigten Nierenstruktur (Bramlage et al. 2010, Zeisberg M und Kalluri 2004 a). So zeigten Ratten infolge ischämisch bedingter akuter tubulärer Nekrosen eine reduzierte Zytokinsekretion bei konsekutiv geminderter Migration neutrophiler Granulozyten, wobei diese Reduktion vermutlich auf der supprimierten inflammatorischen Aktivität des Tubulusepithels basiert (Gould et al. 2002, Vukicevic et al. 1998). Die homozygote Deletion bzw. die Mutation selektiver Gene führt in Mausmodellen des Alport-Syndroms sowie der Lupusnephritis, ähnlich wie die Injektion von nephrotoxischem Serum und die unilaterale Ureterobstruktion (UUO), zu Formen der chronisch progredienten Niereninsuffizienz, deren charakteristische tubulointerstitielle Fibrose mit einhergehender Tubulusatrophie BMP7-abhängig gemildert wird (Hruska et al. 2000, Zeisberg M et al. 2003 a, Zeisberg M et al. 2003 b). Zurückzuführen sind diese Phänomene auf die Inhibition der TGF-β1-modulierten Fibroblastenproliferation, die sich nachfolgend in einer maßgeblichen Reduktion profibrotischer Moleküle sowie einer verstärkten Degradation akkumulierender Matrixkomponenten äußert (Zeisberg M et al. 2003 a, Zeisberg M und Kalluri 2004 a). Im Zusammenhang mit der Schädigung tubulärer Epithelzellen antagonisiert das BMP7 die TGF-β1-induzierte EMT und wirkt somit regenerativ auf die tubuloepitheliale Integrität (Zeisberg M et al. 2003 b). Einige Arbeitsgruppen sahen in Abhängigkeit vom jeweiligen

Tiermodell Anhaltspunkte eines zusätzlichen antiapoptotischen Effekts auf das betroffene Epithelium (Hruska et al. 2000, Vukicevic et al. 1998).

Da dem TGF- β 1 auch bei der Fibrogenese anderer parenchymatöser Organe die Rolle des Hauptinitiators zuteil wird, sind die dargestellten Mechanismen keineswegs eine renale Spezifität. Entsprechend beförderte rekombinantes BMP7 auch in tierexperimentellen Studien chronisch entzündlicher Darmerkrankungen sowie der chronischen Leber- und Herzfibrose eine substantielle Milderung inflammatorischer und fibrotischer Prozesse (Maric et al. 2003, Zeisberg EM et al. 2007, Zeisberg M et al. 2007).

1.3.3 BMP7-/TGF- β -Antagonismus

Wesentliche Effekte des BMP7 gegenüber seinem Antagonisten TGF- β 1 beruhen auf der engen Kopplung der SMAD-Signalkaskaden und vermitteln ihm im Unterschied zu direkten Inhibitoren wie neutralisierende Antikörper die Fähigkeit, komplexe intrazelluläre Interventionsmechanismen zu initiieren. In-vitro-Studien in unterschiedlichen Zellsystemen führen die intrinsische Aktivität des BMP7 auf sogenannte *inhibitor of DNA binding* (ID)-Proteine zurück, die im Verlauf des BMP7-spezifischen SMAD-Signalweges verstärkt exprimiert, durch TGF- β hingegen herunterreguliert werden (Derynck und Zhang 2003, Kang Y et al. 2003). Gemeinhin agieren die vier Mitglieder der ID-Familie als dominant negative Antagonisten der *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Transkriptionsfaktoren, sind in Proliferations- und Differenzierungsprozesse, den Zellzyklus, die Angiogenese sowie Tumorgenese involviert und besitzen zudem proapoptische Eigenschaften (Norton 2000, Ruzinova und Benezra 2003, Sikder et al. 2003). Die Inhibition der ID-Proteine durch TGF- β bzw. indirekt über dessen SMAD-Mediatoren behindert diese Funktionen in Epithelzellen und trägt stattdessen zum Wachstumsarrest bzw. zur terminalen Differenzierung bei (Derynck und Zhang 2003, Kang Y et al. 2003). Dagegen reprimiert insbesondere die BMP7-assoziierte ID2- und ID3-Induktion die Transkription der TGF- β -modulierten mesenchymalen, profibrotischen Gene *CTGF* (*connective tissue growth factor*), *ACTA2* (*actin, alpha 2 smooth muscle, aorta*; Gename von α SMA), *COLLAGEN-1A1*, *PAI-1* und *FSP1* (Izumi et al. 2006, Kinoshita et al. 2007, Weiskirchen und Meurer 2013, Zeisberg M et al. 2003 b). Gleichzeitig wird das endogene E-Cadherin als Schlüsselmolekül eines epithelialen Zellphänotyps nach ID-spezifischer Inaktivierung seines transkriptionellen Suppressors E2A hochreguliert, wohingegen die in Gegenwart des TGF- β vermittelte Hemmung der ID-Proteine zur Generierung von E2A führt und über die Inhibition des E-Cadherins der EMT Vorschub leistet (Kondo et al. 2004). Die nukleäre Kolo-kalisation phosphorylierter SMAD2/3-Proteine sowie des pSMAD1 weist zudem auf die Fähigkeit des BMP7, das physiologische Expressionsniveau des E-Cadherins trotz vorangegangener TGF- β 1-Stimulation bzw. in dessen Anwesenheit wiederherzustellen. Ähnliche Mechanismen obliegen ihm hinsichtlich der epithelialen Markerproteine ZO-1, Cytokeratin und Desmoplakin (Weiskirchen und Meurer 2013, Zeisberg M et al. 2003 b).

Ferner beeinflussen inhibitorische SMADs die wechselseitige Beziehung zwischen TGF- β und BMP7. Das über beide Signalkaskaden induzierte SMAD7 fungiert innerhalb der TGF- β -Signaltransduktion als negative Feedbackschleife, wobei dessen Überexpression mit einer substantiellen Milderung der EMT in Verbindung gebracht wird (Dooley et al. 2008, Hayashi et al. 1997, Nakao et al. 1997, Saika et al. 2004). Demgegenüber agiert das I-SMAD6 primär als autoregulativer Deaktivierungsschalter in der BMP-Signalkaskade, in deren

Verlauf es durch unterschiedliche Mechanismen mit dem BMP-Typ I-Rezeptor und den regulatorischen SMADs interferiert bzw. deren Degradation initiiert sowie in funktionelle Konkurrenz zum Co-SMAD4 tritt (Hata et al. 1998, Hazen et al. 2001, Imamura et al. 1997, Ishida et al. 2000, Murakami et al. 2003).

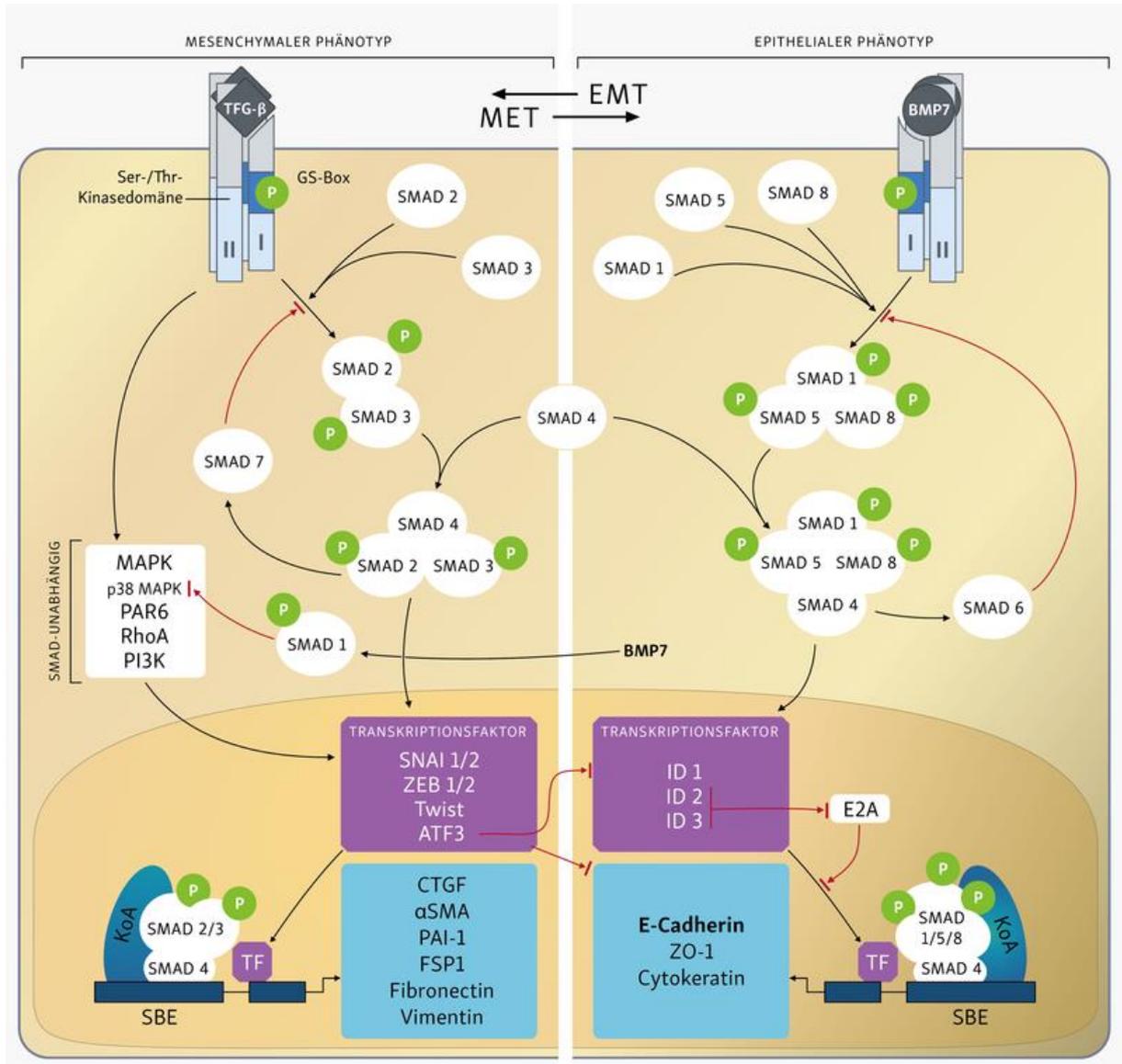


Abbildung 2: Schematische Übersicht antagonistischer Signalwege von BMP7 und TGF-β

Die Induktion der spezifischen Zielgene unterstützt eine epitheliale bzw. eine mesenchymale Zellmorphologie. ATF3, *activating transcription factor 3*; P, Phosphorylierung; KoA, Koaktivator; SBE, *SMAD binding element*; TF, Transkriptionsfaktor; ZEB, *zinc finger E-box binding homeobox* (modifiziert nach Willis und Borok 2007, Seite 528).

Es lässt sich diskutieren, ob das bemerkenswerte Regenerationspotential des BMP7 ein Relikt des embryonalen Entwicklungsprozesses darstellt und, angesichts der hohen Plastizität mesenchymaler und epithelialer Zellen, in Form einer endogenen Reprogrammierung die Reparatur der Niere unterstützen könnte (Zeisberg M und Kalluri 2004 b). Diesbezüglich zeigten Zeisberg M et al., dass adulte renale Fibroblasten *in vitro*

unter dem konstanten Einfluss des BMP7 befähigt sind, die mesenchymal-epitheliale Transition (MET) originärer embryonaler Mesenchymzellen zumindest in einem frühen Stadium zu imitieren (Zeisberg M et al. 2005).

1.3.4 Bone Morphogenetic Protein Receptor 1A (BMPR1A)

Einst unter dem noch heute gültigen Synonym *activin receptor-like kinase* (ALK3) identifiziert, erfolgte in Anbetracht seiner hohen BMP-Affinität alsbald die Umbenennung des auf etwa 53 bis 58 kDa bemessenen Typ I-Rezeptors in *bone morphogenetic protein receptor 1A* (BMPR1A) (ten Dijke et al. 1994). Dabei bestätigten quantitative In-vitro-Analysen BMP7-assoziiierter Rezeptoren die Prädominanz des BMPR1A in Tubulusepithelzellen und somit seine zentrale Bedeutung für die Niere (Wetzel et al. 2006). Da die konstitutive BMPR1A-Überexpression mit der Reproduktion BMP7-modulierter Charakteristika korreliert, ist eine lokal präferierte BMP7/BMPR1A-Interaktion für das renale Parenchym anzunehmen (Zeisberg M et al. 2003 b, Zeisberg M 2006).

In der murinen Embryonalentwicklung wird der *Bmpr1a* in nahezu allen Geweben exprimiert und kann bereits zwischen dem 9,5 und 12,5 Embryonaltag im meso- bzw. metanephrischen Epithelium und Mesenchym der sich formierenden Niere detektiert werden (Danesh et al. 2009, Dewulf et al. 1995, Di Giovanni et al. 2011). Eine Beteiligung an der Gastrulation scheint naheliegend, da Mausmutanten nach homozygoter *Bmpr1a*^{-/-}-Deletion zwar eine reguläre Prä- und initiale Postimplantationsphase zeigen, die folgende Differenzierung zum Mesoderm jedoch defizitär verläuft und die embryonale Letalität der Mutanten um den Tag 9,5 *post conceptionem* induziert (Mishina et al. 1995). Indes entwickeln transgene Mäuse unter Cre-Rekombinase-vermittelter konditioneller Inaktivierung von *Bmpr1a* im intermediären Mesoderm und der Ureterknospe zwar eine physiologische Gewebearchitektur, allerdings bedingt die *Bmpr1a*-Defizienz einen hypoplastischen Phänotyp, der sich in Form von reduzierter Nierengröße und Nephronenzahl manifestiert. Demzufolge beeinflusst die BMPR1A-abhängige Signaltransduktion regulativ die Spezifizierung renaler Progenitorzellen sowie Wachstum und Verzweigung des entstehenden Sammelrohrsystems während der Morphogenese der Niere (Di Giovanni et al. 2011, Hartwig et al. 2008). Untersuchungen in adulten Mausgeweben sind hinweisend für ein annähernd ubiquitäres Expressionsmuster von *Bmpr1a*, wobei insbesondere im Herzen, dem Gehirn, der Lunge, der Leber, dem Skelettmuskel und den Nieren relativ hohe Anteile nachweislich sind (Dewulf et al. 1995, Mishina et al. 1995).

Weiterhin vermittelt der BMPR1A protektive Wirksamkeit im pathogenen Vernarbungsprozess der Niere. So führt die nephrotoxische Serumnephritis (NTN) im entsprechenden Mausmodell zur konsekutiv erhöhten *Bmpr1a*-Expression, wohingegen das BMP7 sowie dessen übrigen Korezeptoren (*ActRI*, *Bmpr1b*, *Bmpr2*) einer effektiven Negativregulation unterliegen. Infolge des konditionellen *Bmpr1a*^{-/-}-Knockdowns im proximalen Tubulusepithel zeigen transgene Mäuse sechs Wochen nach NTN-Induktion in Relation zum Kontrollkollektiv eine sich mit deutlich größerer Progredienz entwickelnde interstitielle Fibrosierung. Wesentliche Merkmale stellen dabei die verstärkte nukleäre pSmad2-Expression als Beleg einer intensivierten Tgf- β -Signalkaskade, der exzessiven Makrophageninflux sowie eine ausgeprägte und für den epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierungsprozess indikative zelluläre Kolokalisation epithelialer und mesenchymaler Markerproteine dar (Sugimoto et al. 2012).

Entsprechend stellt die Induktion der endogenen BMP7-Signalkaskade über eine selektiv vermehrte BMPRII-Präsenz im Tubulusepithel eine aussichtsreiche Therapieoption zur Remission chronisch progredienter Nierenleiden dar.

1.4 Nierenersatztherapie

Im Falle eines hochgradigen oder vollständigen Organversagens im Stadium der terminalen Niereninsuffizienz wird die renale Filtrations- und Eliminationsfunktion entweder durch die Dialyse, einem medizinisch technischen Blutreinigungsverfahren, oder durch eine allogene Nierentransplantation ersetzt. Letztere gilt bei Eintritt einer terminalen Niereninsuffizienz derzeit als Therapie der Wahl (Kaplan und Meier-Kriesche 2004). Obwohl sie heute ein standardisiertes Verfahren darstellt, gelang es erst 1954 dem Bostoner Ärzteteam um Joseph Murray, zwischen eineiigen Zwillingen erfolgreich eine Niere mit langfristig bestehender Transplantatfunktion zu übertragen (Merrill et al. 1956). Neben der Entwicklung und Etablierung chirurgischer Routinetechniken stellte insbesondere die immunologische Abstoßungsreaktion des Empfängers eine zunächst unüberwindbare Barriere dar. Schließlich postulierten Schwartz und Dameshek 1958 die immunsuppressive Wirksamkeit des Antimetaboliten 6-Mercaptopurin und legten mit dieser innovativen Erkenntnis den Grundstein für die medikamentöse Rejektionsprophylaxe (Schwartz et al. 1958). In den frühen 1960er Jahren applizierte Starzl erfolgreich eine Kombination aus dessen Prodrug Azathioprin sowie hochdosierten Kortikosteroiden in nierentransplantierten Patienten und schuf damit die Basis für ein bis Ende der 70er Jahre geltendes klinisches immunsuppressives Therapiekonzept (Barker und Markmann 2013, Starzl et al. 1963). Die oft als „Meilenstein“ bezeichnete Markteinführung des zyklischen Undekapeptids Cyclosporin A Anfang der 80er Jahre revolutionierte schließlich die Transplantationschirurgie. Als Prototyp der Calcineurininhibitoren (CNI) zeichnet es sich vor allem durch eine weitaus höhere Spezifität aus und führte zum bemerkenswerten Anstieg der 1-Jahr-Überlebensraten von bisher 50 % auf 80 % (Calne 2004, Oka und Yoshimura 1996). Das dauerhafte Risiko einer Transplantatdysfunktion bleibt allerdings weiterhin bestehen und bedingt eine lebenslange, angesichts relevanter Nebenwirkungen nicht unproblematische, Immunsuppression.

Im Vergleich der bei vollständiger Niereninsuffizienz praktizierten Therapieoptionen zeigt sich die deutliche Überlegenheit der Nierentransplantation hinsichtlich Lebensqualität, Lebenserwartung und Mortalität gegenüber den Dialyseverfahren. Entsprechend betrug die adjustierte Fünf-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit eines inzidenten Dialysepatienten in Europa im Untersuchungszeitraum 2004 bis 2008 nur rund 54 %. Fünf Jahre nach Organtransplantation lebten in Abhängigkeit von der jeweiligen Spendenart, postmortal bzw. lebend, dagegen noch zwischen 92 bis 96 % der Transplantierten (ERA-EDTA Registry 2015). Trotz der signifikant höheren Überlebensraten standen in Deutschland die 2.128 im Jahr 2014 transplantierten Nieren im deutlichen Missverhältnis zu den 7.961 sich auf der aktiven Warteliste befindlichen Patienten, sind jedoch kennzeichnend für die seit Anfang der Dekade rückläufige Tendenz der durchgeführten Nierentransplantationen sowie eine mangelnde Organspendebereitschaft (DSO 2015). Angesichts der inhärenten Komplikationen von Dialysebehandlung bzw. Transplantation muss zukünftig die Ressourcenausschöpfung hinsichtlich regenerativer Therapiestrategien nachdrücklich forciert werden.

1.5 Immunsuppressive Therapie nach Nierentransplantation

Bei Notwendigkeit einer pharmakologischen Immunsuppression nach erfolgter Transplantation ist eine Vielzahl unterschiedlicher Wirkstoffklassen bekannt, die zur Reduktion der medikamentenassoziierten Nebenwirkungen meist im Rahmen einer fundierten Kombinationstherapie appliziert werden. In Deutschland stützt sich das aktuelle Therapieregime nierentransplantierte Patienten auf die im Konsens eines internationalen Expertenkomitees erarbeitete und publizierte *KDIGO - clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients* (KDIGO Transplant Work Group 2009). Speziell in der prä-, peri- und postoperativ stattfindenden Induktionstherapie zur Reduktion akuter Rejektionen fungieren IL2-Rezeptorantagonisten als Firstline-Therapeutika. In der folgenden initialen und langfristigen Erhaltungstherapie bewährte sich die kombinierte Gabe eines Calcineurininhibitors mit einem Antimetaboliten, wobei eine eigens formulierte Stellungnahme der DGfN und der Deutschen Transplantationsgesellschaft (DTG) aus dem Jahr 2012 in Anlehnung an die KDIGO-Leitlinie explizit Tacrolimus als Mittel der Wahl unter den Calcineurininhibitoren empfiehlt (Stellungnahme DGfN und DTG 2012, KDIGO Transplant Work Group 2009). Diese Vorgabe basiert auf den Ergebnissen des Efficacy Limiting Toxicity Elimination (ELITE)-Symphony-Projekts, einer 12-monatigen, prospektiven, randomisierten Multicenterstudie. In dessen Verlauf manifestierte sich eine signifikante Überlegenheit der Kombinationstherapie aus geringdosiertem Tacrolimus und antiproliferativem Mycophenolat Mofetil (MMF) hinsichtlich renaler Funktionalität, Überleben des Alлотransplantats (94,2 % nach 12 Monaten) und der Rate akuter Rejektionen (Ekberg et al. 2007).

In der gemeinsamen Erklärung von DGfN und DTG wird der Anteil der gemäß KDIGO-Richtlinien behandelten De-novo-Nierentransplantierten indes auf etwa 70 % beziffert (DGfN und DTG 2012). Ein ähnliches Bild zeichnet der USRDS 2013 Annual Data Report der USA. Seit seiner Einführung 1994 stieg der Anteil der initial nach Nierentransplantation mit Tacrolimus behandelten Patienten kontinuierlich auf mittlerweile rund 91 % im Jahr 2011 (USRDS 2013 Annual Data Report).

1.5.1 Transplantatabstoßung (Rejektion)

Das zentrale Problem der Transplantationsmedizin stellt die Abstoßungsreaktion des Empfängerorganismus dar, weshalb die immunsuppressive Therapie auf die Unterdrückung der transplantatspezifischen Immunantwort, also auf eine fortdauernde Immuntoleranz abzielt. Ursächlich für diesen Rejektionsprozess sind im Wesentlichen die über den Major-Histokompatibilitätskomplex (MHC)-präsentierten Fremdartigene, die durch den T-Zell-Rezeptor (TZR) spezialisierter CD4⁺-T-Zellen erkannt werden. Zur vollständigen Aktivierung der naiven T-Lymphozyten ist überdies die Bindung ihres kostimulatorischen CD28-Rezeptors an professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) erforderlich (Denton et al. 1999). Die nachfolgende Rekrutierung unterschiedlicher Tyrosinkinase sowie die Phosphorylierung der Phospholipase C (PLC) induziert über die Bildung von IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Crabtree und Olson 2002, Duplay et al. 1994).

Die anschließende Bindung von Calciumionen (Ca²⁺) an das zytoplasmatische multifunktionelle Calmodulin-Protein (CaM) sowie die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin (CN) führen zur Ablösung der autoinhibitorischen Domäne vom nun konformationsveränderten Calcineurin, woraufhin dessen Bindemotiv mit dem Calmodulin/Ca²⁺-Komplex interagiert und sich ein aktiviertes Holoenzym formiert.

Dieses wiederum initiiert die Dephosphorylierung des Transkriptionsfaktors NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*), der nach nukleärer Translokation die Transkription diverser immunregulativer Zielgene moduliert (Crabtree und Olson 2002, Klee et al. 1998). Insbesondere durch die De-novo-Synthese von IL2 (*interleukin 2*) als das unmittelbare Ereignis einer effizienten antigenspezifischen T-Zellaktivierung wird die künftige T-Zell-abhängige Immunantwort organisiert (Malek und Bayer 2004). Die auto- und parakrinen Effekte dieses potenten Wachstumsfaktors induzieren die Proliferation und klonale Vervielfältigung der CD4⁺-T-Zellen, sodass sie im Zuge dieser Fremdaktivierung über direkten Zellkontakt und Zytokinsekretion zur Interaktion mit den Effektorzellen der Abstoßungsreaktion befähigt sind. Insgesamt begünstigen die Aktivitäts- und Funktionalitätssteigerung der beteiligten Lymphozyten und Makrophagen die Produktion von Alloantikörpern, die antigenspezifische Zellyse und letztlich auch die verzögert eintretende hypersensitive Reaktion. Die finale Konsequenz all dieser Mechanismen stellt letztlich die Zerstörung des Transplantats dar (Denton et al. 1999).

1.5.2 Wirkmechanismus der Calcineurininhibitoren (CNI)

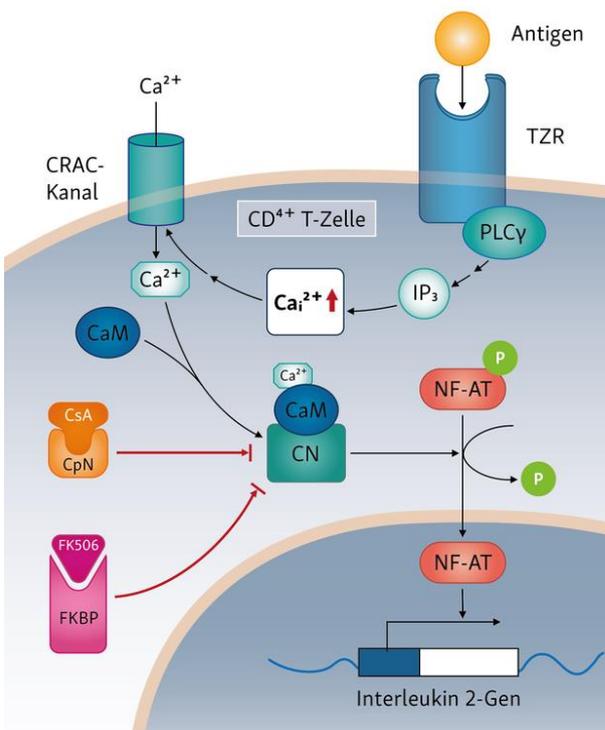


Abbildung 3: Wirkmechanismus der Calcineurininhibitoren. CRAC, Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (Becknell et al. 2012, Seite 1050).

Im Kontext einer permanenten medikamentösen Rejektionsprophylaxe etablierten sich die mikrobiellen, chemisch jedoch völlig differenten Pharmaka, Cyclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) als besonders effektive Immunsuppressiva, indem sie die eingangs skizzierte Signaltransduktionskaskade durch Inhibition des Schlüsselenzyms Calcineurin unterbinden. Der Wirkmechanismus beruht dabei auf einer Komplexbildung mit endogenen ubiquitären Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen, sogenannten Immunophilinen, die daraufhin die Ca²⁺/Calmodulin-aktivierte Phosphatase Calcineurin sterisch blockieren und ferner die Translokation des Transkriptionsfaktors NFAT sowie die T-Zell-abhängige Produktion von IL2 hemmen. Während CsA spezifisch mit dem Immunophilin Cyclophilin (CpN) interagiert, stellt Tacrolimus, vermutlich aufgrund einer höheren Bindungsaffinität zu seinem charakteristischen Rezeptor FKBP12 (*FK506-binding protein*) das 10- bis 100-fach

potentere Therapeutikum dar (Crabtree und Olson 2002, Denton et al. 1999, Griffith JP et al. 1995, Oka und Yoshimura 1996).

1.5.3 Tacrolimus

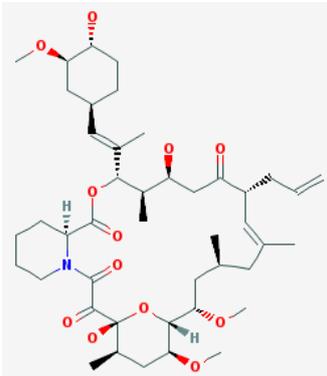


Abbildung 4: Strukturformel Tacrolimus (PubChem Substance Database, NCBI 2015).

Das 23-gliedrige makrocyclische Polyketid Tacrolimus wurde erstmalig 1984 von Wissenschaftlern der Fujisawa Pharmaceutical Co. Ltd (Osaka, Japan) aus den Fermentationsprodukten des grampositiven Bakteriums *Streptomyces tsukubaensis*, eines ubiquitären pilzähnlichen Bodenmikroorganismus, isoliert und im Jahre 1994 aufgrund seiner potenten immunsuppressiven Eigenschaften in der Transplantatmedizin sowie zur therapeutischen Anwendung bei Autoimmunerkrankungen zugelassen (Barbarino et al. 2013, Barreiro et al. 2012, Kino et al. 1987).

Trotz eines bereits ein bis zwei Stunden nach oraler Applikation eintretenden Blutkonzentrationsmaximums bedingen die physikochemischen Charakteristika des Tacrolimus wie ausgeprägte Lipophilie mit einhergehender Wasserunlöslichkeit äußerst niedrige Absorptionsraten. Die orale Bioverfügbarkeit des Pharmakons beträgt aufgrund eines umfangreichen präsystemischen Metabolismus näherungsweise 25 %, kann intra- und interindividuell jedoch in einem Bereich zwischen 4 und 89 % variieren. Angesichts seiner ausgeprägten Bindungsaffinität zu Erythrozyten ist der messbare Tacrolimusspiegel im Vollblut signifikant etwa 15-fach höher als korrespondierende Konzentrationen im Plasma, wo der Wirkstoff bis zu 99 % gebunden an spezifische Plasmaproteine vorliegt (Nagase et al. 1994, Wallemacq und Verbeeck 2001, Venkataramanan et al. 1995). Das somit wenig prädiktive pharmakologische Profil wird wesentlich durch die gastrointestinalen Isoenzyme CYP3A4 und CYP3A5 der Cytochrom P450 (CYP) 3A-Subfamilie und das P-Glykoprotein, ein in den Zottenspitzen der Dünndarmenterozyten ansässigen Effluxtransporter, bestimmt (Benet et al. 1999, Hebert 1997, Iwasaki 2007). Die durchschnittliche Halbwertszeit von 12 Stunden zeigt mit Abweichungen von 3,5 bis 40,5 Stunden ebenfalls starke Heterogenität (Wallemacq und Verbeeck 2001). Infolge des insgesamt äußerst umfangreichen Detoxifikationsprozesses werden weniger als 0,5 bis 1 % des Tacrolimus unverändert über Urin und Fäkes abgesondert, wohingegen die Elimination der bislang rund 15 identifizierten Metabolite zu über 95 % biliär erfolgt (Barbarino et al. 2013, Möller et al. 1999). Da auch

zahlreiche weitere Wirkstoffe einem CYP3A4/5- bzw. P-Glykoprotein-abhängigen Firstpass-Effekt unterliegen, evoziert deren Koadministration relevante Arzneiwechselwirkungen und erfordert eine entsprechende Dosisanpassung (Christians et al. 2002).

Tabelle 3: Tacrolimus-Zielspiegel nach Nierentransplantation (modifiziert nach Wallemacq et al. 2009, Seite 142).

Tacrolimus	
Monate nach Transplantation	C ₀ -Zielspiegel (ng/ml) ¹
0 – 3	10 – 15
3 – 12	5 – 15
> 12	5 – 10

¹ Ohne Induktionstherapie

Die Kontrolle des Medikamentenspiegels basiert in der Klinik auf der Bestimmung des Talspiegels (C₀), der signifikant mit Effektivität und Toxizität des Tacrolimus korreliert (Venkataramanan et al. 2001). Die etablierten Standards nach erfolgter Nierentransplantation empfehlen initial einen Zielspiegel von 10 bis 15 ng/ml, wohingen in der Erhaltungstherapie die therapeutische Dosis des Talspiegels auf 5 bis 10 ng/ml reduziert wird (siehe Tabelle 3). Pharmakokinetische, -dynamische sowie -genetische Variabilitäten bedingen jedoch eine stark

individualisierte Langzeittherapie unter engmaschigem Monitoring (Laskow et al. 1996, Wallemacq et al. 2009).

Wie sich bereits frühzeitig in umfangreichen Dosisfindungsstudien zeigte, entstehen die mehrheitlich im initialen Intervall der immunsuppressiven Therapie konstatierten Nebenwirkungen dosisabhängig und gehen infolge der angestrebten Wirkstoffreduktion und der damit einhergehenden restringierten Plasmakonzentration im Verlauf der Behandlung zurück (Kershner und Fitzsimmons 1996, Laskow et al. 1996). Als bedeutende, sowohl unter Tacrolimus als auch unter Cyclosporin auftretende Nebenwirkungen sind Neuro- und Nephrotoxizität, arterielle Hypertonie, Hyperglykämie, gastrointestinale Störungen, Infektionen sowie Malignome zu nennen. Indes zählen zu frequenten Tacrolimus-assoziierten Symptomen Alopezie, Tremor und Parästhesien sowie diabetogene Effekte (Barbarino et al. 2013, Grimm et al. 2006, Pirsch et al. 1997, Tricot et al. 2005).

Trotz ähnlicher Nebenwirkungsprofile bestehen weiterhin Kontroversen hinsichtlich des nephrotoxischen Potentials der Calcineurininhibitoren, welches den häufigsten dosislimitierenden Faktor der beiden Pharmakone darstellt und als „Achillesferse“ der modernen immunsuppressiven Therapie den Begriff CNI-Nephrotoxizität prägte (Naesens et al. 2009). Da entsprechende Daten überwiegend auf der Evaluation nierentransplantierte Patienten basieren, kann allerdings schwerlich zwischen medikamenteninduzierten Organschäden und anderen pathogenetischen Faktoren renaler Dysfunktionen differenziert werden (Barbarino et al. 2013). Zudem leisten lokale Gegebenheiten wie Variabilitäten der CYP3A4/5-Isoenzym-sowie der P-Glykoprotein-Expression, das Alter der transplantierten Niere, Salzdepletion, die Einnahme nichtsteroidaler Antirheumatika oder Polymorphismen im *TGFB1*-Gen einen weitaus wichtigeren Beitrag für die Suszeptibilität einer CNI-Nephrotoxizität als die systemische Exposition durch Calcineurininhibitoren selbst. Letztlich lieferten zahlreiche human- und tierexperimentelle Vergleichsstudien substantielle Hinweise für die geringeren nephrotoxischen Eigenschaften des Tacrolimus gegenüber dem Cyclosporin A (Naesens et al. 2009).

1.6 Tacrolimus und BMPR1A

Einen konkreten Zusammenhang zwischen dem Immunsuppressivum Tacrolimus sowie dem Typ I- Rezeptor BMPR1A stellt die Datenbank Nephroseq her (*nephroseq.org*). Die integrative Plattform erlaubt durch funktionale Annotation nierenrelevante Transkriptomdaten im Kontext spezifischer klinischer Phänotypen zu betrachten und somit generierte Daten speziesübergreifend zu konsolidieren (Mayer 2012). Der Abruf dieser Ressource lieferte eine umfassende Genexpressionsanalyse, in deren Rahmen die Stimulation des epithelialen Zelltypus MCF7 mit dem Pharmakon FK506 erfolgte und anschließend den *BMPR1A* als einer der 1 % signifikant hochregulierten Gene identifi-

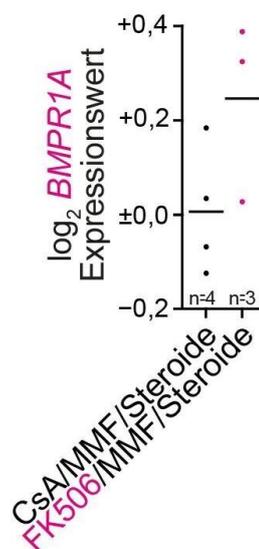


Abbildung 5: BMPR1A-Induktion in Nierentransplantatpatienten unter FK506-Therapie-regime
 n, Anzahl der Patienten; Daten als alignierte Dotplots nach log₂-Transformation mit Mittelwert dargestellt (GEO-Zugangsnummer GSE1563, Flechner et al. 2004).

zierte. Der daraufhin erfolgte Abgleich mit assoziierten klinischen Studien führte schließlich auf die Publikation der Arbeitsgruppe Flechner et al., die mittels DNA-Mikroarray das Genexpressionsprofil transplan-
tierter und nachfolgend biopsierter Patienten unter verschiedenen immunsuppressiven Therapieregimen
bestimmt hatten (Fletcher et al. 2004). Bei der Betrachtung von Patienten, die zum Zeitpunkt der Biopsie
einen Serumkreatininwert von ungefähr 2 mg/dl aufwiesen, manifestierte sich im Kollektiv der mit Ta-
crolimus behandelten Patienten im Vergleich zu denjenigen unter alternativer Calcineurininhibitortherapie
mit Cyclosporin eine deutliche Hochregulation von *BMPR1A*.¹

¹ Angaben zu Material und Methodik von genontologischen Analysen mittels webbasierter Datenbanken befin-
den sich im Anhang (siehe 6.1, S. 98/99)

1.7 Zielsetzung

Unterschiedliche tierexperimentelle Studien der akuten und chronischen Niereninsuffizienz konnten nach Applikation des rekombinanten humanen BMP7 (rhBMP7) das renoprotektive sowie das über den direkten TGF- β 1-Antagonismus vermittelte regenerative Potential des Wachstumsfaktors bestätigen. Hierzu bindet das Morphogen an spezifische BMP-Typ I- und Typ II-Rezeptoren, die wiederum über Induktion einer intrinsischen SMAD-Signalkaskade die Transkription BMP7-spezifischer Zielgene vermitteln. Im Tubulusepithel zeigten sich erhöhte Expressionsmuster des *bone morphogenetic protein receptor 1A* (BMPR1A) und bedingen die lokal präferierte BMP7-Interaktion mit BMPR1A. Überdies implizieren die selektive Induktion des *Bmpr1a* im fibrotischen Nierenparenchym ebenso wie die nach *Bmpr1a*-Deletion im proximalen Tubulusepithel konstatierte Exazerbation der renalen Fibrogenese die nephroprotektive Wirksamkeit von BMPR1A. Gleichzeitig ergaben systembiologische Datenanalysen über die webbasierte Plattform Nephroseq fundierte Hinweise auf eine Tacrolimus-abhängige *BMPR1A*-Induktion in epithelialen Zellentitäten.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den hypothetisch angenommenen Einfluss des Immunsuppressivums auf die Expression des BMP7-Rezeptors BMPR1A sowohl *in vitro* als auch *in vivo* im Tubulusepithel zu determinieren und zugrundeliegende molekulare Induktionsmechanismen näher zu charakterisieren. Als zentrales Moment wurden insbesondere die Sensibilisierung des Tubulusepithels für die antifibrotische Wirkung des BMP7 sowie die Intensivierung der BMP7-Signaltransduktion fokussiert und daraus die folgende Fragestellung abgeleitet:

- (a) Inwiefern gelingt es, durch die Gabe des Immunsuppressivums Tacrolimus (sowie anderer immunsuppressiver Pharmaka) den BMP7-Rezeptor BMPR1A sowohl *in vitro* in der humanen proximalen Tubulusepithelzelllinie HK-2 als auch *in vivo* in fibrotischen murinen Nieren zu induzieren?
- (b) Welchen Einfluss hat die hier diskutierte Tacrolimusexposition auf die Expression der BMP7-Rezeptoren BMPR2 und BMPR1B? Lässt sich gegebenenfalls die Spezifität des Pharmakons hinsichtlich der BMPR1A-Modulation konkretisieren?
- (c) Mildert die Supplementation von geringdosiertem Tacrolimus effektiv die experimentell induzierte renale Fibrosierung im Mausmodell der unilateralen Ureterobstruktion? In welchem Maße lässt sich durch Applikation des Immunsuppressivums der Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition inhibieren?
- (d) Welche molekularen Mechanismen können bei der postulierten Hochregulation des Rezeptors etabliert werden?
- (e) Lassen sich mögliche charakteristische Induktionsphänomene des Tacrolimus auch in humanen Transplantatnieren nachweisen?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Ausgießstation Leica EG 1120H	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Autoklav	INTEGRA Biosciences, Fernwald, Deutschland
BRAUN Dampfgerar 3216	BRAUN, Kronberg, Deutschland
CO ₂ -Inkubator BB 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
ChemiDoc™ MP System	Bio-Rad, München, Deutschland
Digitalkamera OLYMPUS SC30	OLYMPUS, Hamburg, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Fastblot™	Biometra, Göttingen, Deutschland
CCD-Kamera OLYMPUS XM10	OLYMPUS, Hamburg, Deutschland
Gewebeinfiltrationsautomat Leica TP1020	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kühl- (+4 °C), Gefrierschrank (-20 °C)	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Kühlzentrifuge 3-18KS	Sigma, Osterode am Harz, Deutschland
Mikroliterzentrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop OLYMPUS BX43	OLYMPUS, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert S100 TV	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom Leica RM 2165	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraffin-Streckbad GFL 1052	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Rollermixer SRT6	Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK
Spannungsgerät MS 300V Power Supply	Major Science, Saratoga, USA
Sterilbank NuAire Biological Safety Cabinets	NuAire, Plymouth, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR-System	Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, USA
Stickstofftank APOLLO	Messer Griesheim, Krefeld, Deutschland
Thermocycler Mastercycler ep gradient S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ThermoMixer® comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
TissueLyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Trockenschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Ultratiefkühlgerät (-80 °C)	SANYO Electric Biomedical Co., Osaka, Japan
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Wärmebad GFL 1083	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge PerfectSpin P	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland

2.1.2 Software und Datenbanken

BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
cellSens Dimension 1.6	OLYMPUS SIS, Münster, Deutschland
cell [^] D	OLYMPUS SIS, Münster, Deutschland
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ImageJ 1.49n	http://imagej.nih.gov/ij/
MS Office	Microsoft, Redmond, USA
StepOne™-Software v2.3	Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, USA
TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites (ver 1.3)	http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html

2.1.3 Gebrauchsmaterialien

CELLSTAR® 6-Well-Zellkulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
CELLSTAR® Tubes, 15/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Eindeckgläser SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Filterpapier	Bio-Rad, München, Deutschland
MicroAmp® Fast 8-Tube Strip (0,1 ml)	Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, USA
MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, USA
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, USA
Microscope Cover Slips, 24*40 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Mikroliterpipetten, 10/100/1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zählkammer Neubauer improved	Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland
Nunc™ CryoTube™ Vials (1,8 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NuPAGE® Novex® 4 – 12 % Bis-Tris-Proteingel (1,5 mm, 10 well bzw. 1,5 mm, 15 well)	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
Pipetten, 5/10/25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® Filterspitzen, 10/100/1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Rotilabo®-Einbettkassetten für Biopsien, 500 Stück	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Safe Lock Tubes (1,5/2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Skalpelle	FEATHER Safety Razor Co., Osaka, Japan
Stainless Steel Beads, 5 mm	Qiagen, Hilden, Deutschland
Tissue-Tek® Cryomold® Intermediate	SAKURA, Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tissue-Tek O.C.T. Compound, 125 ml	SAKURA, Alphen aan den Rijn, Niederlande
XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
Zellkulturflasche mit Luftfilter T75	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.4 Chemikalien

Accutase® solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
AEC Substrate-Chromogen	Dako, Glostrup, Dänemark
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Amphotericin B, lyophilisiert	BIOCHROM, Berlin, Deutschland
Bouin's solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
cOmplete ULTRA Tablets, EDTA-free	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Chloroform $\geq 99,8\%$ (CHCl_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM, low glucose	Gibco (Life Technologies), Carlsbad, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's PBS	Gibco (Life Technologies), Carlsbad, USA
Thermo Scientific™ Shandon™ Immu-Mount™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eosin G-Lösung 0,5 % wässrig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Entellan®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 100 % ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol $\geq 99,8\%$ ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 99 %	Chemie-Vertrieb, Hannover, Deutschland
Fast SYBR® Green Mastermix	Applied Biosystems (Life Technologies), Carlsbad, USA
Forene® 100 % (V/V), Wirkstoff: Isofluran	AbbVie, Ludwigshafen, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium, 25000 I.E./5 ml	ROTEXMEDICA, Trittau, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Kaliumphosphat-Trihydrat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Mercaptoethanol 99 % ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
10 mM dNTP Mix	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hybond™-ECL Nitrocellulose Membran	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Novex® Sharp Pre-stained Protein Standard	Novex (Life Technologies), Carlsbad, USA
NP40 Cell Lysis Buffer	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden, Deutschland
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Novex (Life Technologies), Carlsbad, USA
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Novex (Life Technologies), Carlsbad, USA
Oligo (dt) 12 - 18 Primer	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
PEG 40 Castor Oil	Spectrum Chemical Mfg. Corp., New Brunswick, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Perjodsäurelösung 1 % ($\text{H}_5\text{IO}_6 + \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphataseinhibitor Cocktail 2	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pierce™ Fast Semi-Dry Transfer Buffer (10X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Quantum 286	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNaseOut™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
Roti®-Histofix, Formaldehydlösung 4 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RT ² SYBR Green ROX qRT-PCR-Mastermix	Qiagen, Hilden, Deutschland

Schiffs Reagenz	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
1-Step™ NBT/ BCIP Substrate Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Target Retrieval Solution, pH 9 (10X)	Dako, Glostrup, Dänemark
Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
TRIS PUFFERAN®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol® Reagent	Ambion (Life Technologies), Carlsbad, USA
Tween® 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI	VECTOR LABORATORIES, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30 % (H ₂ O ₂)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Xylol > 98 % (C ₈ H ₁₀)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Stimulanzen

Cycloheximide ≥ 93,0 % (HPLC), (C ₁₅ H ₂₃ NO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Cyclosporin A ≥ 95 % (HPLC), (C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FK506 monohydrate ≥ 98 % (HPLC), (C ₄₄ H ₆₉ NO ₁₂ x H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FK506 ≥ 99 %	abcam, Cambridge, UK
Mycophenolate mofetil ≥ 98 % (HPLC), (C ₂₃ H ₃₁ NO ₇)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.6 Kitsysteme

DNase I, Amplification Grade	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
FK506-ELISA Kit [HRP]	Novus Biologicals LCC, Littleton, USA
20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide	Cell Signaling, Danvers, USA
PureLink® RNA Mini-Kit	Ambion (Life Technologies), Carlsbad, USA
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RT ² Profiler™ PCR-Array <i>Human Transcription Factors</i> (PAHS-075Z)	Qiagen, Hilden, Deutschland
SuperScript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen (Life Technologies), Carlsbad, USA
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trichrome Stain (Masson) Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Weigert's iron hematoxylin solution (Set)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
VECTASTAIN Elite ABC Kit (Universal)	VECTOR LABORATORIES, Burlingame, USA

2.1.7 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer und Lösungen

10x PBS (phosphate-buffered saline), pH7,5			10X TBS (Tris-buffered saline)		
<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration (10x)</i>	<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration (10x)</i>
80,00 g	NaCl	140 mM	87,00 g	NaCl	1,5 M
2,00 g	KCl	2,5 mM	24,23 g	Tris	200 mM
11,50 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	6,5 mM	1000 ml	ddH ₂ O	
2,00 g	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	1,5 mM			
1000 ml	ddH ₂ O				

Puffer und Lösungen (Western Blot)

Zelllysispuffer			Laufpuffer		
<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>		<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
1 Tablette	cOmplete ULTRA Tablets (Proteaseinhibitor)		9950 ml	ddH ₂ O	
10 µl	Phosphataseinhibitor Cocktail 2		50 ml	NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	1X
10 ml	NP40 Cell Lysis Buffer		1 ml	β-Mercaptoethanol ¹	

¹zusätzlich in innere Elektrophoresekammer enthalten

Sample Buffer			Transferpuffer		
<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>
200 µl	NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	2X	5 ml	Pierce™ Fast Semi-Dry Transfer Buffer (10X)	1X
120 µl	ddH ₂ O		50 ml	ddH ₂ O	
80 µl	β-Mercaptoethanol				

Waschpuffer

Blockier- und Antikörperverdünnungslösung

TBS Tween (TBS-T)		BSA (2 bzw. 5 %)		Milch (2 bzw. 5 %)	
<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>	<i>Menge</i>	<i>Substanz</i>
999 ml	TBS (1X)	1 g bzw. 2,5 g	BSA	1 g bzw. 2,5 g	Milch
1 ml	Tween 20 %	50 ml	TBS-T	50 ml	TBS-T
		Primär-AK:	BMPr1A, Bmpr2, GAPDH, Arnt, pSmad1/5/9	Primär-AK:	Bmpr1b, Arnt (Block) ¹ , pSmad1/5/9 (Block) ¹

¹Anwendung gemäß Herstellerprotokoll (Cell Signaling): Blockierlösung 5%ige Milch; Verdünnung von Primär- und Sekundär-AK in 2%igem bzw. 5%igem BSA; bei übrigen primären AK stimmen Basis von Blockier- und Antikörperverdünnungslösung überein

Entwicklerlösung

20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide			SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate		
Menge	Substanz	Konzentration	Menge	Substanz	
0,5 ml	LumiGLO® (20X)	1X	0,5 ml	SuperSignal™ Peroxide Solution	
0,5 ml	Peroxide (20X)	1X	0,5 ml	SuperSignal™ Luminol Solution	
9,0 ml	ddH ₂ O				

Puffer und Lösungen (Immunhistochemie/Immunfluoreszenz)

Blocklösung			Peroxidaseblock		
Menge	Substanz	Konzentration	Menge	Substanz	Konzentration
1 Tropfen (50µl)	VECTASTAIN® Normal Horse Serum	1:100	10 ml	H ₂ O ₂ 30 %	0,3 %
5 ml	PBS		990 ml	ddH ₂ O	

Citratpuffer			ABC-Lösung		
Menge	Substanz	Konzentration	Menge	Substanz	Konzentration
10 ml	Target Retrieval Solution, pH 9 (10X)	1X	2 Tropfen	VECTASTAIN® Reagent A ¹	1:50
90 ml	ddH ₂ O		2 Tropfen	VECTASTAIN® Reagent B ²	1:50
			5 ml	PBS	

¹ Reagent A → Avidin DH

² Reagent B → Biotinylated Horseradish Peroxidase H

2.1.8 Antikörper

Alexa Fluor® 488 Esel anti-Kaninchen polyklonal IgG
 Alexa Fluor® 568 Esel anti-Kaninchen polyklonal IgG
 HRP-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus polyklonal IgG
 HRP-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen polyklonal IgG
 Kaninchen-anti-Maus pSmad 1/5/9 polyklonal IgG
 Kaninchen-anti-Maus-αSMA polyklonal IgG
 Kaninchen-anti-Maus-Collagen-1 polyklonal IgG
 Kaninchen-anti-Maus-Fsp1 polyklonal IgG
 Kaninchen-anti-Mensch/Maus-ARNT polyklonal IgG
 Kaninchen-anti-Mensch/Maus-BMP1A polyklonal IgG
 Kaninchen-anti-Maus-Bmpr1a polyklonal IgG

Invitrogen, Carlsbad, USA
 Invitrogen, Carlsbad, USA
 Dako, Glostrup, Dänemark
 Dako, Glostrup, Dänemark
 Cell Signaling, Danvers, USA
 LifeSpan BioSciences, Seattle, USA
 abcam, Cambridge, UK
 Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
 Cell Signaling, Danvers, USA
 Merck Millipore, Billerica, USA
 Santa Cruz, Dallas, USA

Kaninchen-anti-Maus-Bmpr1b polyklonal IgG
 Kaninchen-anti-Maus-Bmpr2 polyklonal IgG
 Maus-anti-Kaninchen-GAPDH monoklonal IgG

Merck Millipore, Billerica, USA
 abcam, Cambridge, UK
 HyTest Ltd., Turku, Finnland

2.1.9 Oligonukleotide

2.1.9.1 Primer für die qRT-PCR

Tabelle 4: Ziel-mRNA und Primersequenzen für die qRT-PCR

Ziel-mRNA	Primer Vorwärtsstrang	Primer Rückwärtsstrang	Hersteller
<i>BMPR1A</i>	GGA CAT TGC TTT GCC ATC ATA G	GGG CTT TTG GAG AAT CTT TGC	Primerdesign, Southampton, UK
<i>BMPR1B</i>	AGG TAA TTT GCT CTT GTG TTG TAA G	TTT CTT TGT GCT TCT GAG ATT GG	Primerdesign, Southampton, UK
<i>BMPR2</i>	CAA AGA TAG GTC CCA GTT TAA CAC	TCT CTA TGG AAA TGA AAT AAC AAG GC	Primerdesign, Southampton, UK
<i>GAPDH</i>	Nicht einsehbar	Nicht einsehbar	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Acta2</i>	CTC TTC CAG CCA TCT TTC ATT G	GTT GTT AGC ATA GAG ATC CTT CCT	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Actb</i>	Nicht einsehbar	Nicht einsehbar	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Arnt</i>	CCT TCA GTG CTA TGT CTC TTC C	CAG TCT CAG GAG GAA AGT TGG A	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Ar</i>	AAG AGC CGC TGA AGG GAA A	GAG ACG ACA AGA TGG GCA ATT	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Bmpr1a</i>	TGT CAT TCT AGC CAT GTT TTA CC	ACC AAG GAT CAG ATG TGA GAC	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Bmpr1b</i>	GCG GCC TAT GCC ATT TAC AC	AGT CTC GAT GGG CGA TTG C	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, DE
<i>Bmpr2</i>	TCC ACC TGG GTC ATC TCC A	CCC TGT CAC TGC CAT TGT TG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, DE
<i>Cebpb</i>	ACG GGA CTG ACG CAA CAC	AAC AAA AAC AAA ACC AAA AAC ATC AAC	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Collagen-1a1</i>	ATG GAT TCC CGT TCG AGT ACG	TCA GCT GGA TAG CGA CAT CG	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, DE
<i>Creb1</i>	TTG AGT AAG GCT GAG CAT GAT C	TCT TAA CTT TAA ACT GCG GAA CAC	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Gapdh</i>	Nicht einsehbar	Nicht einsehbar	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Gata3</i>	GAA GAC TTT ATT GTA CCT GGA TAG C	TGG ACA TCA GAC TTA GTG GTT TC	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Max</i>	GTG AGT GAG TGA GCG AGT GA	GGA GGG GTG GAG GGA AGG	Primerdesign, Southampton, UK
<i>Fsp1</i>	AGA AGT GAA GAC TCC TCA GAT GA	TGT GCG AAG AAG CCA GAG T	Primerdesign, Southampton, UK

2.1.9.2 siRNA

Tabelle 5: Verwendete siRNA mit Zielsequenzen (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)

Gen	siRNA-Sequenz ¹	
<i>Arnt</i>	5'- GCAACACCUACAACAAUGA <i>dttd</i> -3'	5'- CCCUUGACUUGCUGAAGAA <i>dttd</i> -3'
	3'- <i>dttd</i> CGUUGUGGAUGUUGUUACU -5'	3'- <i>dttd</i> GGGAACUGAACGACUUCUU -5'
	5'- CACCUACAACAAUGAAGAA <i>dttd</i> -3'	
	3'- <i>dttd</i> GUGGAUGUUGUUACUUCUU -5'	
<i>Ar</i>	5'- CAGUCCCACUUGUGUCAA <i>dttd</i> -3'	5'- GUCGUCUUCGGAAAUGUUA <i>dttd</i> -3'
	3'- <i>dttd</i> GUCAGGGUGAACACAGUUU -5'	3'- <i>dttd</i> CAGCAGAAGCCUUUACAAU -5'
	5'- CCUGAUCUGUGGAGAUGAA <i>dttd</i> -3'	5'- GACAGUGUCACACAUUGAA <i>dttd</i> -3'
	3'- <i>dttd</i> GGACUAGACACCUCUACUU -5'	3'- <i>dttd</i> CUGUCACAGUGUGUAAACUU -5'
<i>Cebpb</i>	5'- CUACGCAACACACGUGUAA <i>dttd</i> -3'	5'- GCGUAUGUAUUUUGAGAA <i>dttd</i> -3'
	3'- <i>dttd</i> GAUGCGUUGUGUGCACAUI -5'	3'- <i>dttd</i> CGCAUACAUAUAAACUCUU -5'
	5'- GAGGCGUAUGUAUUUUGA <i>dttd</i> -3'	
	3'- <i>dttd</i> CUCCGCAUACAUAUAAACU -5'	
<i>Creb1</i>	5'- CCAACAAAUGACAGUUCAA <i>dttd</i> -3'	5'- CAACGCCAGGAAUCAUGAA <i>dttd</i> -3'
	3'- <i>dttd</i> GGUUGUUUACUGUCAAGUU -5'	3'- <i>dttd</i> GUUGCGGUCCUUAGUACUU -5'
	5'- CCACAACCUGAAAGACAAA <i>dttd</i> -3'	
	3'- <i>dttd</i> GGUGUUGGACUUUCUGUUU -5'	
<i>Gata3</i>	5'- CUGC GGCCUCUAUCACAAA <i>dttd</i> -3'	5'- CCUGUAAUUGUUGUUUGUA <i>dttd</i> -3'
	3'- <i>dttd</i> GACGCCGAGAUAGUGUUU -5'	3'- <i>dttd</i> GGACAUUAACAACAACAU -5'
	5'- GCCAAGAAGUUUAAGGAU <i>dttd</i> -3'	
	3'- <i>dttd</i> CGGUUCUUCAAAUCUUUA -5'	
<i>Max</i>	5'- GCAACCGAGGUUCAUCU <i>dttd</i> -3'	5'- CCACAUCAAGACAGCUUU <i>dttd</i> -3'
	3'- <i>dttd</i> CGUUGGCCUCAAAGUUAGA -5'	3'- <i>dttd</i> GGUGUAGUUUCUGCGAAA -5'
	5'- CAAACGGGCUCAUCAUAAU <i>dttd</i> -3'	
	3'- <i>dttd</i> GUUUGCCCGAGUAGUAUUA -5'	

Control
siRNA-A

Nicht-genomische siRNA-Sequenzen nicht einsehbar

¹ Sinn
Gegensinn

2.1.10 Zelllinien

HK-2-Zellen

Die von Ryan et al. etablierte Zelllinie *human kidney-2* (HK-2) leitet sich von proximalen Tubulusepithelzellen des nicht infizierten humanen Nierenkortex ab und wird von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) mittels eines rekombinanten Retrovirusvektors, der die Gene *E6* und *E7* des humanen Papillomavirus 16 (HPV 16) transduziert, erzeugt. Die Immortalisierung gewährleistet die bessere Kultivierbarkeit einer stabilen Zellreihe mit kürzerer Generationsdauer unter Erhalt phäno- und funktionstypischer Charakteristika. Als Ausdruck einer signifikanten tubuloepithelialen Morphologie zeigen sich lange, dicht stehende Mikrovilli, junctionale Komplexe sowie die Expression typischer Enzyme des Bürstensaums wie die alkalische und die saure Phosphatase, die γ -Glutamyltranspeptidase und die Leucin-Aminopeptidase. Ferner sind die Moleküle Cytokeratin, $\alpha_3\beta_1$ -Integrin, Fibronectin sowie die Reagibilität gegenüber Parathyrin nachweislich (Ryan et al. 1994).

MCT-Zellen

Die murine proximale tubuloepitheliale Zelllinie MCT wurde aus dem mikrodisssezierten renalen Kortex 8 bis 10 Wochen alter naiver Swiss Jim Lambert (SJL)/J (H-2^s) Mäuse isoliert und zur Generierung einer kontinuierlichen Zellkultur *in vitro* mit einem replikationsdefizienten *simian virus 40* (SV40) immortalisiert (Haverty et al. 1988). Transformierte MCT-Zellen weisen als deutliches morphologisches Charakteristikum proximaler Tubulusepithelzellen einen ausgeprägten Bürstensaum auf, dessen Membran die dort typischerweise lokalisierte alkalische Phosphatase enthält. Diese als adhärenter Monolayer wachsende Zellreihe exprimiert weiterhin Rezeptoren des Parathyrins und des Angiotensin II sowie spezifische, in die apikale Membran integrierte, Transportsysteme. Ferner gelangen die Detektion des epithelialen Markerproteins Cytokeratin und des für die tubuläre Basalmembran spezifische 3M-1 Glykoproteins sowie die Identifikation hochaffiner *epidermal growth factor* (EGF)-Bindungsstellen (Haverty et al. 1988, Wolf et al. 1993).

2.1.11 Murines Nierengewebe

Tierexperimentelle Studien erfolgten an 8 bis 12 Wochen alten C57BL/6J-Mäusen aus der Zucht der Arbeitsgruppe Zeisberg, Abteilung Nephrologie und Rheumatologie, Universitätsmedizin Göttingen. Die erforderliche Genehmigung zur Durchführung eines Tierversuchsvorhabens wurde von der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) erteilt (Antragsnummer G14/1565).

2.1.12 Humanes Nierengewebe

Weiterhin wurden bioptisch gewonnene Gewebepräparate aus den Jahren 2004 bis 2008 von Transplantatpatienten verschiedener immunsuppressiver Therapieregime analysiert. Die Charakterisierung der durch HOPE-Technik fixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten Resektate erfolgte mittels immunhistologischer Methoden. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen bezüglich des Forschungsvorhabens an humanem Gewebematerial ist vorliegend (Antragsnummer DOK_128_2015).

Tabelle 6: Kohorte von Nierentransplantierten mit klinischen und histologischen Charakteristika

ID#	Fibrosierungsgrad [%]	Prämedikation	Histologische Diagnose	Kreatinine [mg/dL]	BUN [mg/dL]	eGFR [mL/min]
S3542	20 - 25	MMF+Cortison	Nephrosklerose, FSGS	3,4	92	20
S3752	25 - 30	CsA	CNI-Nephrotoxizität	3,3	56	25
S3696	25	Cortison	FSGS	5,2	72	12
S3564	20	FK506	Nephrosklerose	3,2	74	16
S3896	15 - 20	FK506	ADPKD ¹	3,03	97	23

¹ADKD: Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung (*autosomal dominant polycystic kidney disease*)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeitsschritte in der Zellkultur vollzogen sich unter der Sterilbank und waren von gründlicher Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion begleitet. Sowohl HK-2- als auch MCT-Zellen wuchsen als Monolayer in T75-Zellkulturflaschen in einem 37 °C warm temperierten CO₂-Inkubator bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Begasung. Die kontinuierliche Kultur beider Zelllinien erfolgte in 10 ml Nährmedium pro Zellkulturflasche bis zu einer etwa 80%igen Konfluenz. Zur Subkultivierung wurde der Zellrasen in 10 ml PBS gewaschen und die adhärennten Zellen mit 3 ml der jeweiligen Enzymlösung vom Kulturflaschenboden abgelöst (Zellkulturmedien und Enzymlösungen siehe Tabelle 7). Anschließend wurde die Zellsuspension durch Hinzugabe von 10 ml PBS verdünnt, in ein 15-ml-Falcon überführt und ein Zellpellet durch fünfminütige Zentrifugation bei 1200 U/min gewonnen. Dieses konnte nun in neue Zellkulturflaschen mit frischem Vollmedium resuspendiert werden. War im Rahmen der ausgeführten Experimente eine kontinuierliche Zellzahl erforderlich, erfolgte vor der Aussaat eine Auszählung in der Neubauer-Zählkammer.

Tabelle 7: Zellkulturmedien und Enzymlösungen der einzelnen Zelllinien

Zelllinie	HK-2	MCT
	Quantum 286	DMEM, low glucose
Zellkulturmedium (+Zusätze)	+ 100 Units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 2,5 µg/ml Amphotericin B	+ 100 Units/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 2,5 µg/ml Amphotericin B + 10 % FCS
Enzymlösung	Accutase	Trypsin-EDTA solution

Überschüssige Zellen wurden als 500 µl Zellsuspension mit einem gleichen Volumen Einfriermedium (FCS + DMSO; 1 zu 5) versetzt, in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend im Stickstofftank bei -196 °C kryokonserviert.

2.2.2 Tiermodell und Studiendesign

Weiterhin wurde der Einfluss des Pharmakons Tacrolimus auf die Expression von Bmpr1a *in vivo* in fibrotischen Nieren unter Anwendung des etablierten nicht-proteinurischen Mausmodells UUO untersucht. Die im European Neuroscience Institute Göttingen (ENI-G) untergebrachten C57BL/6J-Mäuse wurden bei konstanter Temperatur in Käfigen gehalten und unterlagen einem kontinuierlichem 12-Stunden-Licht- und 12-Stunden-Dunkelzyklus. Die insgesamt 24 Tiere wurden vier Untersuchungsgruppen mit jeweils sechs Tieren zugewiesen. Bereits zwei Tage vor der Operation erfolgte in drei Gruppen die Gabe von FK506 *per os*. Als Kontrollkollektiv fungierte eine mit einem *vehicle* (5%ige Glucoselösung) behandelte Gruppe.

Berechnung der Medikamentendosierung

In den drei behandelten Kollektiven betragen die angestrebten Medikamentendosierungen 0,02, 0,075 und 0,2 mg/kg KG/Tag Tacrolimus. Je Maus wurde ein Gewicht von 20 g sowie eine durchschnittliche Trinkmenge von 3 ml pro Tag kalkuliert. Zur Herstellung einer oral applizierbaren Suspension wurde zunächst

das als kristallines Pulver erhältliche Medikament FK506 (Reinheitsgrad $\geq 98\%$) mit einer isotonischen Kochsalzlösung, die als weitere Komponenten 1,25 % PEG 40 Castor Oil sowie 2 % Ethanol enthielt, vermengt. Vor Verabreichung konnte die daraus resultierende Stocklösung (0,2 mg/ml) mit 5%iger Glucoselösung auf die zuvor errechneten Konzentrationen Tacrolimus im Trinkwasser verdünnt werden (siehe Tabelle 8). Eine Lagerung der Suspension erfolgte als Aliquot bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabelle 8: Angestrebte FK506-Medikamentendosis pro Maus sowie FK506-Konzentration im Trinkwasser

	Kontrollkollektiv	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
FK506 [mg/kg KG/Tag]	0	0,02	0,075	0,2
FK506/Trinkwasser [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	0	0,13	0,5	1,3

Tiermodell

Zur Induktion einer experimentellen renalen Fibrogenese mittels unilateraler Ureterobstruktion (UUO) wurden die C57BL/6J-Mäuse zunächst per subkutaner Buprenorphinjektion (0,1 mg/kg KG) analgosediert und anschließend durch Inhalation von Isofluran (2 bis 3 %) anästhesiert. Sämtliche Operationen wurden vom stellvertretenden Leiter des Tierversuchsvorhabens, Herrn Dr. med. Björn Tampe, durchgeführt. Nach sorgfältiger Desinfektion des Abdomens und Inzision des Peritoneums konnte der Ureter der linken Niere vom umliegenden Gewebe freipräpariert und durch zwei Ligaturen im Abstand von etwa 5 mm in den oberen zwei Dritteln des Ureters abgebunden werden. Die kontralaterale Niere galt als scheinoperiert (*sham*) und fungierte demzufolge als Kontrolle.

Präparation der Versuchstiere

Im Anschluss an die zehntägige Harnleiterokklusion wurde den mit Isofluran narkotisierten Versuchstieren zunächst 500 μl arterielles Blut mithilfe von Heparin-getränkten Glaspipetten aus dem Auge entnommen, in ein Eppendorf tube überführt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Die Sektion der Tiere umfasste deren Tötung mittels zervikaler Dislokation sowie die Eröffnung der Peritonealhöhle zur Entnahme von Herz, Milz sowie beider Nieren. Die herauspräparierten Organe wurden zu gleichen Teilen gedrittelt, je ein Teil in ein Kryoröhrchen, ein weiteres in Tissue-Tek® Cryomold®-Einbettformen überführt, übergangsweise in flüssigem Stickstoff gelagert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert. Das letzte Gewebepräparat wurde auf eine Einbettkassette verteilt und mittels einer phosphatgepufferten 4%igen Formaldehydlösung (Roti®-Histofix) fixiert. Die anschließende Entsorgung entsprach den allgemeinen Richtlinien.

2.2.3 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Immunanalytische Nachweismethoden beruhen im Wesentlichen auf der Antigen-Antikörper-Komplexierung, einer grundlegenden Reaktion der funktionierenden adaptiven Immunabwehr, und ermöglichten bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts erste immunchemische Analysen zu quantitativen Zwecken (Arrhenius 1907). Grundstein für eine heutzutage vielseitige Anwendung legten schließlich Yalow und Berson durch die Etablierung der Radioimmunoassays (Yalow und Berson 1960). Mit dem Ersatz der kurzlebigen Radio-

isotope durch enzymmarkierte Antikörper, die ein auf der Oberfläche immobilisiertes Analytmolekül konjugieren, gelang schließlich die kommerzielle Ausbreitung des Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstests (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) insbesondere als serologisches Nachweisverfahren in der klinischen Diagnostik (Engvall und Perlmann 1971, Van Weemen und Schuurs 1971). Gemäß der zugrundeliegenden Mechanismen erfolgt eine Klassifizierung in kompetitive und nonkompetitive Assays, wobei ersterer in der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der Tacrolimuskonzentration im Vollblut entsprechend behandelte Versuchstiere genutzt wurde.

Direkter kompetitiver ELISA (cELISA)

Das Prinzip des kompetitiven ELISA (cELISA) basiert auf der Konkurrenz zwischen Analyt und Analyt-Protein-Konjugat um eine limitierte Anzahl freier Antikörperbindungsstellen. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten direkten Testformat fungiert das Analyt-Protein-Konjugat synchron als Kompetitor und Enzymtracer, da sein signalerzeugendes Label, die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), auch die Detektion und Quantifizierung des fraglichen Analyten erlaubt. Folglich korrelieren Serumpositivität und die Intensität der Farbreaktion negativ miteinander und bedingen geringe bzw. keine Farbreaktionen bei hohen Analytkonzentrationen. *Vice versa* überwiegt in negativen Seren die Bindung des Enzymtracers, woraus eine verstärkte Signalerzeugung resultiert.

Unter Verwendung des handelsüblichen spezifizierten FK506 ELISA Kits [HRP] wurden zunächst 25 µL der Standardreihe bzw. der murinen Vollblutprobe auf eine bereits mit dem absorbierten Anti-FK506-Antikörper vorbeschichtete 96-well-Mikrotiterplatte aufgebracht und unter leichtem Schütteln gleichmäßig verteilt. Daraufhin erfolgte die Zugabe des FK506-HRP-Konjugats. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Mikrotiterwells mittels PBS-T-Puffer dreimalig gewaschen und somit ungebundene Bestandteile entfernt. Infolge der Zugabe und Einwirkung (15 min) der 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-haltigen Substratlösung (100 µL) katalysiert die Meerrettichperoxidase in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) die Oxidation des Chromogens TMB, was in einer deutlichen Blaufärbung resultiert. Der Zusatz eines salzsäurebasierten Reagenz (100 µL) führt zur Denaturierung der Peroxidase und induziert damit die Bildung eines gelben Endproduktes mit höherem Extinktionskoeffizienten. Die Messung der optischen Dichte (OD) per Photometer erfolgte abschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Quantitative Auswertung

Zunächst wurde die durchschnittliche Absorption (OD_s) der internen Standards mit bekannter FK506-Konzentration sowie diejenige des negativen Kontrollserums (OD₀) berechnet, deren Relation zueinander wiederum die prozentuale Inhibition (PI) der Kontrollseren ausdrückt.

$$PI [\%] = 100 - \frac{OD_s}{OD_0} * 100$$

Die graphische Darstellung des Hemmungsprozentsatzes gegen die jeweils korrespondierende logarithmierte FK506-Konzentration (log₁₀) ergibt die sigmoidale Kalibrierkurve, sodass mittels linearer Interpolation auf den Tacrolimusspiegel im murinen Vollblut geschlossen werden konnte.

2.2.4 Histologische Methoden

Anfertigung und Vorbereitung der Gewebeschnitte

Die bei der Sektion in der gebrauchsfertigen Formaldehydlösung (Roti®-Histofix) gelagerten murinen Organpräparate verblieben dort zur Fixierung über Nacht. Zur Auswaschung des Fixiermittels wurden sie am Folgetag zunächst unter laufendem Leitungswasser 4 h lang gewässert. Es folgte die eigentliche Dehydrierung im Gewebeeinfiltrationsautomaten mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe, die Inkubation im Intermediärmedium Chloroform sowie die Durchtränkung mit Paraffin. Innerhalb der Ausgießstation wurde das Gewebe nun mit 56 °C warmem, flüssigem Paraffin in Blöcke gegossen und auf der Kühlplatte des Gerätes abgekühlt, sodass mit einem Mikrotom Gewebeschnitte in einer Schnittdicke von 3 µm angefertigt werden konnten. Diese wurden zur Entfaltung in ein Paraffinstreckbad überführt, glatt auf Objektträger platziert und anschließend über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

Die humanen Gewebepräparate wurden nach der von Olert et al. etablierten Fixierungsmethode HOPE (Hepes-glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect), deren Prinzip auf der formaldehydfreien Prozessierung der Resektate sowie einer anschließenden Acetonentwässerung basiert, konserviert und nach der Einbettung in Paraffin mittels Mikrotom geschnitten (Olert et al. 2001).

Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach Mayer

Zunächst erfolgte sowohl in humanen als auch murinen Nierenpräparaten eine Übersichtsfärbung mittels Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung nach Mayer. Eingangs wurden entsprechende Paraffinschnitte in Xylol (2x 10 min) entparaffiniert und innerhalb einer absteigenden Alkoholreihe (2x 5 min in EtOH 100 %, 1x 5 min in EtOH 95 %, 1x 5 min in EtOH 70 %, 1x 5 min in EtOH 50 %, 1x 5 min in EtOH 30 %) sowie in bidestilliertem Wasser (1x 5 min) rehydriert. Es folgte die sechsminütige Inkubation mit Hämalun sauer nach Mayer und das alkalische Bläuen unter lauwarmem fließendem Leitungswasser (10 min) zur spezifischen Darstellung basophiler Strukturelemente, insbesondere des Zellkernchromatins. Nach kurzem Verweilen der Gewebeschnitte in ddH₂O wurde durch Anwendung der sauren Eosin G-Lösung 0,5 % (1 bis 2 min) die Kontrastfärbung des eosinophilen Zytoplasmas erzielt. Abschließend konnten die gefärbten Präparate wiederholt dreimalig in ddH₂O gespült, mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 1 min in EtOH 96 %, 1x 4 min in EtOH) sowie Xylol (2x 5 min) dehydriert und definitiv mit dem Schnelldeckmittel Entellan® eingedeckt werden.

Perjodsäure-Schiff-Reaktion

Der histochemische Nachweis kohlenhydratreicher Strukturen des Kollagens, der Basalmembranen oder der Glykokalyx gelingt mittels Perjodsäure-Schiff-Reaktion (*periodic acid-Schiff reaction*, PAS) und eignet sich insbesondere zur differenziellen Charakterisierung glomerulärer sowie tubuloepithelialer Strukturen in den humanen und murinen Nierenbiopsien.

Der Entparaffinierung in Xylol (2x 10 min) und Inkubation in einer alkoholischen Rehydrierungsreihe (2x 5 min in EtOH 100 %, 1x 5 min in EtOH 95 %, 1x 5 min in EtOH 70 %, 1x 5 min in EtOH 50 %, 1x 5 min in EtOH 30 %) sowie in ddH₂O (1x 5 min) folgte die Oxidation nicht-substituierter Glykolgruppen durch die wässrige 1%ige Perjodsäurelösung (1x 10 min) zu Aldehyden. Nach dem anschließenden Spülen in Leitungswasser (1x 10 min) und bidestilliertem Wasser vermittelte die im Schiffs Reagenz enthaltene fuchsin-schwef-

lige Säure (Inkubation 1x 20 min) über die Komplexbildung der zuvor oxidierten Aldehydgruppen den chromogenen Farbumschlag in magentarot. Zur Stabilisierung bzw. weiteren Differenzierung der Reaktion wurde das gefärbte Gewebe anschließend 5 min in warmem Leitungswasser gewaschen. Die nukleäre Gegenfärbung erfolgte mittels Hämalan sauer nach Mayer (1x 5 min) und zehnmütiger Bläuung unter laufendem Leitungswasser. Der Dehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe (1x 1 min in EtOH 96 %, 1x 4 min in EtOH) und Xyol (2x 5 min) schloss sich letztlich das blasenfreie Eindecken der Präparate mit dem Schnelldeckmittel Entellan® an.

Masson-Trichrom-Färbung

Die Masson-Trichrom-Färbung (*Masson's trichrome stain*, MTS) dient der differenzierten Bindegewebsdarstellung. Charakteristisch ist neben der bräunlich-schwarzen Darstellung der Zellkerne und dem ziegelroten Zytoplasma insbesondere die sich kontrastierend von der Umgebung abhebende Blaufärbung des Kollagens.

Zunächst verblieben die fertigen Paraffinschnitte zur Deparaffinierung zweimal für je 10 min in Xyol, durchliefen im Anschluss eine alkoholische Rehydrierungsreihe (2x 5 min in EtOH 100 %, 1x 5 min in EtOH 95 %, 1x 5 min in EtOH 70 %, 1x 5 min in EtOH 50 %, 1x 5 min in EtOH 30 %) und verblieben für 5 min in bidestilliertem Wasser. Die Präparate wurden nun bei 56 °C durch 15-minütige Inkubation in der vorgewärmten Bouin'schen Lösung fixiert, danach für 10 min in Leitungswasser abgekühlt und schließlich bis zur Entfernung der gelben Farben unter fließendem Leitungswasser belassen. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Gewebeschnitte 5 min lang in Weigert's Eisenhämatoxylin-Lösung (siehe Tabelle 9) eingetaucht, unter fließendem Leitungswasser über 5 min gebläut und abschließend dreimal mit bidestilliertem Wasser gespült. Daraufhin erfolgte das Einbringen der Präparate in die Biebrich-Scharlachrot-Säurefuchsin-Lösung des Trichrom Stain Kits für 5 min sowie eine weitere Spülung (3x) mit ddH₂O. Nach einer fünfminütigen Behandlung mit einer Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdän-Arbeitslösung (siehe Tabelle 9) wurden die Schnitte zum Kollagennachweis in Anilinblau (Trichrom Stain Kit) inkubiert, zur deutlicheren Abstufung der Farben zunächst kurz in 1%iger Essigsäure und daraufhin in bidestilliertem Wasser eingetaucht. Nach dem Färbeprozess wurden die Präparate jeweils kurz mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (1x 1 min in EtOH 96 %, 1x 4 min in EtOH) dehydriert sowie in Xyol (2x 5 min) geklärt. Abschließend konnten die gefärbten Gewebeschnitte blasenfrei mit dem Schnelleindeckmittel Entellan® eingedeckt werden.

Tabelle 9: Färbelösung Masson-Trichrom

Färbelösung	Ansatz	
Weigert's Hämatoxylin-Lösung ¹	100 ml	Part A
(Weigert's iron hematoxylin solution, Sigma Aldrich)	100 ml	Part B
Phosphorwolframsäure-/Phosphormolybdänsäure-Arbeitslösung ¹	50 ml	Phosphorwolframsäure
(Trichrome Stain (Masson) Kit, Sigma Aldrich)	50 ml	Phosphormolybdänsäure
	100 ml	ddH ₂ O

¹ Hinweis: beide Färbelösungen sind für den jeweiligen Färbeprozess frisch anzusetzen

Immunhistochemie

Die Anwendung immunhistologischer Färbemethoden erlaubt die Visualisierung im Gewebe vorhandener Makromoleküle im Lichtmikroskop, indem deren antigene Determinante (Epitop) durch gezielt erzeugte Antikörper spezifisch markiert und mithilfe eines zweiten enzymkonjugierten Antikörpers detektiert werden.

Die dazu vorliegenden humanen und murinen Paraffinschnitte wurden zunächst in Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (2x 5 min in EtOH 100 %, 1x 5 min in EtOH 95 %, 1x 5 min in EtOH 70 %, 1x 5 min in EtOH 50 %, 1x 5 min in EtOH 30 %) sowie die fünfminütige Inkubation in bidestilliertem Wasser rehydriert. Dem anschließenden zweimaligen Waschen in PBS über je 5 min schloss sich die Antigendemas- kierung im Citratpuffer an. Hierzu verweilten die Gewebeschnitte für 40 min bei 95 °C im Dampfgarer, kühl- ten für weitere 10 min auf Raumtemperatur ab und wurden nochmals zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden endogene Peroxidasen durch den 0,3%igen Peroxidaseblock 30 min lang neutralisiert. Nach drei erneuten Waschschr- itten in PBS à 5 min erfolgte zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindun- gen die 20-minütige Inkubation der Blocklösung bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Der Block wurde schließlich abgeklopft und die Gewebeschnitte vollständig mit dem primären Antikörper benetzt, der über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubierte (Verdünnung primärer Antikörper siehe Ta- belle 10). Am darauffolgenden Tag wurde der in der Blocklösung verdünnte biotinylierte Sekundärantikör- per (VECTASTAIN Elite ABC Kit) auf die Gewebeschnitte aufgebracht und dort für 30 min bei Raumtempe- ratur belassen (Sekundärantikörper siehe Tabelle 10). Dieser Schritt wurde von drei Waschgängen in PBS für 5 min jeweils vor und nach der Inkubation begleitet. Zur Bildung des mit einer Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplexes erfolgte nun für 30 min die Inkubation mit der ABC-Lösung aus dem VECTASTAIN Elite ABC Kit bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Die Gewebeschnitte wurden nach erneutem Wa- schen in PBS (3x 5 min) mit dem Chromogen 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) über etwa 6 min inkubiert, wel- ches nach Oxidation durch die Peroxidase den roten Farbumschlag vermittelte. Weiteren drei Waschschr- itten folgten die Gegenfärbung durch sechsminütiges Verweilen in der Hämalanlösung sauer nach Mayer sowie die Bläuung unter warmem fließendem Leitungswasser über 5 min. Anschließend konnten die Gewe- beschnitte blasenfrei mit dem wässrigen Eindeckmedium Thermo Scientific™ Shandon™ Immu-Mount™ eingedeckt werden.

Tabelle 10: Verwendete Antikörper der Immunhistochemie

Primärantikörper			Sekundärantikörper ¹		
Antigen	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
BMPR1A ²	Kaninchen	1:50	Pferd	Biotin	1:50
Smad1/5/8 ¹	Kaninchen	1:50	Pferd	Biotin	1:50
ARNT ³	Kaninchen	1:100	Pferd	Biotin	1:50

¹ aus VECTASTAIN Elite ABC Kit: VECTASTAIN® Biotinylated, Universal (Anti-Mouse IgG/Rabbit IgG) Antibody

² Anti-BMPR1A und Anti-Smad1/5/8 sowohl für humane als auch murine Gewebeschnitte verwendet

³ Anti-ARNT ausschließlich für humane Gewebeschnitte verwendet

Immunfluoreszenz

Ähnlich dem Prinzip der Immunhistochemie gelingt die Detektion des spezifisch an das Epitop des Zielantigens bindenden Primärantikörpers erst durch Anwendung eines zweiten fluorochromkonjugierten Antikörpers, der wiederum nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge Fluoreszenzsignale emittiert. Hierzu wurden die murinen Paraffinschnitte durch zweimaliges Verweilen in Xylol für 10 min entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Ethanolreihe (2x 5 min in EtOH 100 %, 1x 5 min in EtOH 95 %, 1x 5 min in EtOH 70 %, 1x 5 min in EtOH 50 %, 1x 5 min in EtOH 30 %) sowie durch fünfminütige Inkubation in bidestilliertem Wasser rehydriert. Nach zwei Waschschritten in PBS für je fünf weitere Minuten wurden die Objektträger in den Citratpuffer überführt und zur Antigendemaskierung für 40 min bei 95 °C im Dampfgarer belassen. Die Gewebeschnitte verblieben zunächst zur Abkühlung 10 min bei Raumtemperatur und wurden erneut zweimal für 5 min auf der Kippe gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu reduzieren, erfolgte nun zur Absättigung freier Bindungsstellen bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer die 30-minütige Inkubation mittels einer Blocklösung. Im Anschluss wurden die in der Blocklösung verdünnten primären Antikörper (siehe Tabelle 11) aufgebracht und über Nacht bei 4 °C in der Feuchtkammer inkubiert. Am Folgetag wurde nach dreimaliger Waschung der Gewebeschnitte für jeweils 5 min der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 11) hinzugefügt und für 45 min bei Raumtemperatur in der Dunkelkammer belassen. Nach weiteren drei Waschgängen à 5 min unter Lichtausschluss erfolgte die Kernfärbung sowie das gleichzeitige Eindecken unter Verwendung des mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau) versehenen Eindeckmediums VECTASHIELD Mounting Medium.

Tabelle 11: Verwendete Antikörper der Immunfluoreszenz in murinen Gewebeproben

Primärantikörper			Sekundärantikörper		
Antigen	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
α SMA	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Fluor 568	1:400
Fsp1	Kaninchen	1:100	Esel	Alexa Fluor 568	1:400
Collagen-1	Kaninchen	1:500	Esel	Alexa Fluor 488	1:400

Anfertigung histologischer Abbildungen

Die Aufnahmen der HE-, PAS-, MTS- und immunhistologischen Färbungen wurden am Lichtmikroskop OLYMPUS BX43 mit der installierten Digitalkamera OLYMPUS SC30 in 400-facher Vergrößerung erstellt. Die Anfertigung repräsentativer Abbildungen der Immunfluoreszenz-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte am konfokalen Lasermikroskop ZEISS LSM480 der Universitätsmedizin Göttingen in 630-facher Vergrößerung. Dessen 405-nm-Diode ermöglicht durch Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs DAPI die Darstellung der Zellkerne in blauer Farbe. Weitere im Konfokalmikroskop integrierte Laser emittieren Licht größerer Wellenlängen, die nach Absorption durch Alexa Fluor®488- und Alexa Fluor®568-konjugierte Antikörper zur Realisierung grüner bzw. roter Fluoreszenzsignale führen. Das anschließende computergestützte Zusammenlegen der einzelnen Farbkanäle erlaubt die digitale Rekonstruktion des Gesamt ereignisses und somit die Lokalisation der jeweiligen Zielantigene.

Morphometrische Quantifizierung histologischer Präparate

In PAS-, MTS- und immunhistologischen Färbungen erfolgten die morphometrischen Bildanalysen der murinen Gewebepreparate unter Anwendung der Software cellSens Dimension 1.6. Hierzu wurden zunächst mit der am Lichtmikroskop OLYMPUS BX43 installierten Digitalkamera OLXMPUS SC30 in jedem zu quantifizierenden Schnitt zehn zufällig ausgewählte und sich nicht überlappende Gesichtsfelder am Übergang von Nierenkortex zu Medulla in 200-facher Vergrößerung abfotografiert.

PAS-Färbung

Im Zuge der unilateralen Ureterligation manifestieren sich massive hämodynamische und metabolische Veränderungen, die u. a. zum apoptotischen und nekrotischen Zelluntergang, Minderung des proximalen Bürstensaums und zur Auflösung der kontinuierlich ausgeprägten Basalmembran führen. Als weiteres morphologisches Korrelat ist neben einer ausgeprägten tubulären Dilatation die Formation hyaliner Zylinder (*cast*) charakteristisch (Chevalier et al. 2009). Diese entstehen infolge der konsekutiven Desquamation des Tubulusepithels sowie durch gelartige Polymerisierung des von Tubuluszellen sezernierten Tamm-Horsfall-Glykoproteins und induzieren die intraluminäre Verlegung entsprechender Tubuli (Wangsiripaisan et al. 2001). Die Ausprägung derartiger histopathologischer Veränderungen wurde in PAS-gefärbten Gewebeschnitten anhand des folgenden semiquantitativen Graduierungsschemas bemessen: 0 = normal, 1 = mild, 2 = moderat, 3 = schwerwiegend.

Masson-Trichrom-Färbung

Zur histopathologischen Beurteilung der interstitiellen Fibrose wurden nach Anlegen eines exakt die Fläche bedeckenden Rasters mit insgesamt $391 \times 10 \text{ mm}^2$ großen Quadraten alle zehn Gesichtsfelder mäanderförmig abgefahren, spezifisch blau gefärbte Kollagenfasern des Interstitiums als positive Fläche identifiziert und ausgezählt. Bereiche wie die sich ebenfalls blau darstellende Adventitia der lokalen Gefäße sowie die Glomeruli selbst wurden nicht quantifiziert. Der Fibrosierungsgrad in Prozent ergab sich schließlich aus dem arithmetischen Mittel der aufsummierten positiven Fläche in Relation zur Gesamtanzahl vorhandener Rasterquadrate.

Immunhistochemie

Die Evaluierung der visualisierten Zielantigene in ihrer zellulären und subzellulären Lokalisation erfolgte gemäß der in der MTS-Färbung etablierten bildanalytischen Systematik. Nach der Fotografie von je zehn Gesichtsfeldern pro histologischem Schnitt wurden die spezifisch durch das AEC-Chromogen rot gefärbten Flächenanteile mittels der $391 \times 10 \text{ mm}^2$ großen Rasterquadrate morphometrisch quantifiziert. Aus dem Verhältnis des pro Niere errechneten Mittelwertes zur insgesamt vorhandenen Bildpunktanzahl ließ sich die prozentuale Proteinexpression ermitteln.

Immunfluoreszenz

Die morphometrische Validierung des Expressionsmusters profibrotischer Antigene wurde am Mikroskop Axiovert S100TV in 400-facher Vergrößerung realisiert. Hierzu wurden je Präparat zunächst zehn zufällig ausgewählte und sich nicht überschneidende Areale am Übergang von renalem Kortex zur Medulla mit der

CCD-Kamera OLYMPUS XM10 abgebildet und anschließend durch die Software cell[^]D und ein zum Bildausschnitt kongruentes individualisiertes Raster mit 638 x 10 mm² Quadraten analysiert. Vor der systematischen Quantifizierung wurde das Farbschwellenintervall durch das Programm automatisch festgelegt und der Blaufilter zur Darstellung der Zellkerne verwendet. Glomeruli sowie Areale um lokale Blutgefäße wurden nicht ausgezählt. Die relative Expression des Antigens in Prozent ergab sich aus dem Mittelwert der positiv quantifizierten Flächenanteile dividiert durch die Gesamtzahl der Rasterquadrate.

Bildanalyse humaner Gewebepräparate

Im Falle der aus humanen Biopsien gewonnenen Gewebeschnitten ließ sich aufgrund der teilweise unzureichend erhaltenen Gewebemorphologie keine vollständige Rasterdeckung erstellter Abbildungen realisieren. Statistisch signifikante Bilddatensätze der PAS-, MTS- und immunhistologischen Färbungen konnten dementsprechend nicht generiert werden.

2.2.5 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Stimulation von HK-2-Zellen *in vitro*

Zunächst wurden die HK-2-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten zu je 0,6 x 10⁵ Zellen pro Well ausgesät und in 2 ml Quantum 286 bis zu einer etwa 80%igen Konfluenz kultiviert. Die zu untersuchenden Immunsuppressiva CsA, FK506 und MMF wurden in DMSO gelöst und auf die in der Tabelle 12 näher aufgeführten Konzentrationen verdünnt. Die Stimulationsdauer in den entsprechend konzentrierten Substanzen belief sich auf 30 min und 6 h, wobei die gleichzeitige Inkubation je eines Wells in reinem DMSO als Kontrolle diente.

Tabelle 12: Stimulationsschema von HK-2-Zellen für qRT-PCR und Western Blot

Medikament	Konzentration (ng/ml)						Stimulationsdauer
FK506	1500	150	15	1,5	0,15		
Cyclo A	1500	150	15	1,5	0,15	30 min/	
MMF	1500	150	15	1,5	0,15	6 h	

Um den Einfluss des Tacrolimus auf die Translation des BMPR1A zu untersuchen, erfolgte die Aussaat und Kultivierung der HK-2-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten wie eingangs beschrieben. Zunächst wurden die Zellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid für 1 h in den Konzentrationen 2, µg/ml, 5 µg/ml sowie 10 µg/ml inkubiert und anschließend mit DMSO und Tacrolimus in den Verdünnungen 0,15 ng/ml und 150 ng/ml für einen Zeitraum von 6 h stimuliert. Als Kontrolle fungierte eine mit DMSO behandelte Probe, der zuvor kein Cycloheximid beigefügt worden war.

Beiden Stimulationsvorgängen schloss sich ein dreimaliger Waschgang an. Nach Hinzugabe von je 1 ml Trizol pro Well konnten die Zellen mittels Zellschaber vom Boden der 6-Well-Kulturplatte gelöst und in ein Eppendorftube überführt werden.

Murines Nierengewebe

Um einen sicheren Probenaufschluss der kryokonservierten nativen Mausnieren zu erreichen, wurde zunächst ein etwa 3 mm³ großes Gewebestück abgetrennt, in ein Eppendorftube mit 1 ml Trizol überführt

und in Gegenwart einer Edelstahlkugel im TissueLyser LT mittels hochfrequentem Schütteln (50 Hz) für 5 min homogenisiert. Zur direkten Weiterverarbeitung wurde 1 ml des in Trizol befindlichen Lysats in eine neue Eppendorf-tube pipettiert.

Isolation der mRNA

Die auf der *single step*-Methode nach Chomczynski (Chomczynski und Sacchi 1987) basierende Isolation der mRNA wurde im modifizierten säulenchromatographischen *spin column*-Verfahren unter Verwendung des Kitsystems PureLink® RNA Mini realisiert. Die zuvor gewonnenen Zell- und Gewebelysate wurden zur optimalen Phasentrennung mit 200 µl Chloroform versetzt und für 15 min bei 12.000 U/min zentrifugiert. Anschließend konnten 500 µl der oberen wässrigen Phase vorsichtig abpipettiert und die RNA durch Zugabe einer äquivalenten Menge 70%igen Ethanols auf der Silicagelmembran einer Spin-Säule präzipitiert werden. Anschließend wurde die Säule für 15 s bei 12.000 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur weiteren Aufbereitung wurden verschiedene Pufferlösungen (1x 700 µl Wash Buffer I, 2x 500 µl Wash Buffer II) für je 15 s bei 12.000 U/min hinzugefügt. Nach einer weiteren Trockenzentrifugation für 2 min konnte die RNA schließlich mit 50 µl nukleasefreiem Wasser durch einminütige Zentrifugation aus der Membran eluiert werden.

Die Konzentration der extrahierten RNA wurde mithilfe des NanoDrop™ 2000 Spektralphotometers quantifiziert. Hierzu wurde die Absorption von 1 µl Eluat im Verhältnis zu einem Leerwert bestimmt. Der relative Reinheitsgrad der RNA wird grundsätzlich durch den Quotienten der Absorptionskoeffizienten bei 260 und 280 nm definiert, wobei ein Wert von 2,0 reiner RNA entspricht, ein deutlich niedrigerer hingegen auf Protein-, Phenol- oder andere Kontaminationen hinweist.

cDNA-Synthese mittels Reverser Transkription der RNA

Standardmäßig wurde vor der Umschreibung der aufgereinigten mRNA ein DNA-Verdau in das Protokoll integriert, um Kontaminationen durch genomische DNA zu eliminieren und somit Artefakte und unspezifische Amplifikate in der nachfolgenden qRT-PCR auszuschließen. Die hierzu verwendete DNase I wurde mit 400 ng eluierter mRNA über 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nach Zugabe von EDTA 10 min bei 65 °C im Thermocycler Mastercycler ep gradient S inaktiviert (Pipettierschema des DNA-Verdaus siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Schema des DNA-Verdaus

DNA-Verdau	
<i>Pro Probe</i>	
Volumen	Reagenz
1 µl	10X DNase I Reaction Buffer
1 µl	DNase I, Amp Grade (100 U)
15 min bei Raumtemperatur	
1 µl	25 nM EDTA (pH 8,0)
10 min bei 65 °C	

Im Folgenden wurde die verdaute mRNA in die sogenannte cDNA (*complementary DNA*) revers transkribiert, wozu sie zunächst mit 2 µl des Oligonukleotidansatzes (siehe Tabelle 14) versetzt und zur Anlagerung eines Primers für 5 min bei 65 °C belassen wurde. Um die Degradation der mRNA sowie deren Abbau durch endogene Ribonukleasen zu verringern, wurde der mRNA-Probe der Ribonukleaseinhibitor RNaseOut™ (Ansatz siehe Tabelle 15) beigefügt und dieses Gemisch für weitere 2 min bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl der reversen Transkriptase SuperScript® II erfolgte während der 50-minütigen

Inkubationszeit bei 42 °C die Synthese eines zur mRNA komplementären DNA-Stranges. Nach anschließender Inaktivierung der Polymerase bei 70 °C über 15 min konnten die Proben nun mit 80 µl NFW auf eine cDNA-Endkonzentration von 4 ng/µl verdünnt und als Template zur Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR verwendet bzw. bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 14: Oligonukleotidansatz

Oligonukleotidansatz	
<i>Pro Probe</i>	
Volumen	Reagenz
1 µl	Oligo(dt) 12-18 Primer
1 µl	10 mM dNTP Mix
5 min bei 65 °C, Pause bei 4 °C	

Tabelle 15: RNaseOut™-Ansatz

RNaseOut™-Ansatz	
<i>Pro Probe</i>	
Volumen	Reagenz
4 µl	5xFirst Strand Buffer
2 µl	0,1 M DTT ¹
1 µl	RNaseOUT™
2 min bei 42 °C	

¹ DTT (1,4-Dithiothreitol)

Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) stellt eine In-vitro-Technik zur gezielten Amplifikation von DNA-Fragmenten dar (Mullis und Faloona 1987). Dabei dissoziiert die doppelsträngige DNA (dsDNA) durch Hitzedenaturierung in eine Einzelstrangmatrize, an die sich nach Abkühlung auf eine definierte Annealingtemperatur ein zur Zielsequenz komplementäres Primerpaar anlagert (Annealing). Die Bindung dieser beiden spezifischen Oligonukleotide an den Vorwärts- und Rückwärtsstrang der Template-DNA nutzt die Taq-Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus*, als Startpunkt und synthetisiert in Anwesenheit freier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und Magnesiumionen einen komplementären DNA-Strang (Saiki et al. 1988). Die nach der Elongation entstandenen Amplifikate stehen nun den folgenden Zyklen als Matrize zur Verfügung.

Unter Berücksichtigung dieses Vervielfältigungsprinzips erlaubt die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) die Detektion des Amplikons während des Reaktionszyklus in Echtzeit. Diese von Higuchi et al. etablierte Methode beruht auf der Interkalation von Fluoreszenzfarbstoffen mit doppelsträngiger DNA, woraufhin sich unter UV-Licht die Emission sichtbaren Lichts verstärkt (Higuchi et al. 1992). Das generierte Fluoreszenzsignal ist letztlich proportional zur vorhanden dsDNA-Konzentration.

Amplifikationsprotokoll

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte stets auf einer MicroAmp® Fast Optical 96-Well-Reaktionsplatte, wobei jede Probe sowohl für das Ziel- als auch für das Haushaltsgen (GAPDH, ACTB) als Triplet pipettiert wurde. Letztlich enthielt jedes Well 5 µl cDNA der Endkonzentration 20 ng sowie 15 µl des Mastermixes (Ansatz siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Ansatz für den qRT-PCR-Mastermix

qRT-PCR-Mastermix	
<i>Pro Probe</i>	
Volumen	Reagenz
10 µl	Fast SYBR® Green Mastermix
0,5 µl	Vorwärtsprimer (4 pmol/µl) ¹
0,5 µl	Rückwärtsprimer (4 pmol/µl)
3 µl	Nukleasefreies Wasser (NFW)

¹ Angaben bezogen auf Eurofins-Produkte, finale Primer-Konzentration pro Reaktion = 200 nM; Primerdesign liefert ein Vorwärts- und Rückwärtsprimer enthaltenes Assay (Primer-Konzentration/Reaktion = 300 nM)

Unter Nutzung des StepOnePlus™ Real-Time PCR-Systems begann nach einer initialen Phase über 20 s bei 95 °C zur Aktivierung der DNA-Polymerase ein 40-Zyklus-Modus. Dieser umfasste die Denaturierung des cDNA-Doppelstranges für 3 s bei 95 °C, die Primer-Hybridisierung sowie die Elongation der entstandenen Amplifikate bei durchschnittlicher Annealingtemperatur von 60 °C. Zur Determination der Reaktionskinetik wurde die Einstellung *Quantitation - comparative C_T* ($\Delta\Delta C_T$) der StepOne™-Software gewählt. Die Synthese verwendeter Primer erfolgte nach Abgleich mit dem Algorithmus Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, USA) und Spezifitätsprüfung der Firma Primerdesign. Bei erstmaliger Primerverwendung diente eine Schmelzpunktanalyse im Anschluss der qRT-PCR dazu, zwischen artifiziell amplifiziertem Primerdimer und dem Zielfragment zu differenzieren und entsprechend quantitative Aussagen hinsichtlich der Oligonukleotidspezifität zu treffen. Etablierte Sequenzen wurden vom Hersteller Eurofins MWG Operon bezogen (Sequenzen siehe Tabelle 4, Seite 26).

Relative Quantifizierung des Probenmaterials

Zur Analyse der absoluten Expression wurde ein bestimmter Fluoreszenzschwellenwert (*threshold*) definiert, der für alle zu detektierenden PCR-Produkte in der exponentiellen Phase des Amplifikationsplots lag. Die jeweilige Zykluszahl, bei der der Fluoreszenzgraph den *threshold* schneidet, wird als *threshold cycle* (Ct) bezeichnet und dient aufgrund seiner reziproken Proportionalität zum Logarithmus der DNA-Ausgangsmenge als Bezugsgröße (Higuchi et al. 1993). Der für das Zielgen aufgezeichnete Ct-Wert kann im Anschluss auf den Ct-Wert eines konstant exprimierten Haushaltsgens normalisiert werden (Radonić et al. 2004). Eine quantitative Aussage über die Expression verschiedener Proben ergibt sich letztlich, indem der ΔC_t -Wert des Zielgens in Relation zu einer Kalibratorprobe gesetzt wird und der aus der Differenz ermittelte $\Delta\Delta C_t$ -Wert in die folgende Formel zur Berechnung der relativen Expression einfließt:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Als Kalibratorprobe fungierte bei allen Zellexperimenten die gewonnene cDNA der mit DMSO stimulierten Zellen, während im Rahmen der Mausstudie die unbehandelten *sham*-Nieren des Kontrollkollektivs zur Kalibrierung hinzugezogen wurden. Die Auswertung der Ct-Rohdaten erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Microsoft Excel.

2.2.6 RT² Profiler™ PCR-Array *Human Transcription Factors*

Weiterhin sollte der molekulare Aktivierungsmechanismus durch Tacrolimus im Hinblick auf eine mögliche transkriptionelle *BMP1A*-Induktion näher charakterisiert werden. Dabei erlaubt die Anwendung des RT² Profiler™ PCR-Arrays in Kombination mit der hochsensitiven qRT-PCR-Technologie, die Expression von 84 humanen Transkriptionsfaktoren zu quantifizieren und somit involvierte Faktoren zu identifizieren (Transkriptionsfaktoren siehe Abbildung 6).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	AR	ARNT	ATF1	ATF2	ATF3	ATF4	CEBPA	CEBPB	CEBPG	CREB1	CREBBP	CTNNB1
B	DR1	E2F1	E2F6	EGR1	ELK1	ESR1	ETS1	ETS2	FOS	FOXA2	FOXG1	FOXO1
C	GATA1	GATA2	GATA3	GTF2B	GTF2F1	HAND1	HAND2	HDAC1	HIF1A	HNF1A	HNF4A	HOXA5
D	HSF1	ID1	IRF1	JUN	JUNB	JUND	MAX	MEF2A	MEF2C	MYB	MYC	MYF5
E	MYOD1	NFAT5	NFATC1	NFATC2	NFATC3	NFATC4	NFKB1	NFYB	NR3C1	PAX6	POU2AF1	PPARA
F	PPARG	RB1	REL	RELA	RELB	SMAD1	SMAD4	SMAD5	SMAD9	SP1	SP3	STAT1
G	STAT2	STAT3	STAT4	STAT5A	STAT5B	STAT6	TBP	TCF7L2	TFAP2A	TGIF1	TP53	YY1
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

■ Haushaltsgene
■ Genomische DNA-Kontrolle
■ Reverse Transkriptionskontrolle
■ Positive PCR-Kontrolle

Abbildung 6: RT² Profiler™ PCR-Array *Human Transcription Factors* (PAHS-075Z) (modifiziert nach <http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAHS-075>).

Wie bereits unter den vorangehenden Punkten ausführlich erläutert, wurden zunächst HK-2-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten mit DMSO und FK506 in der Dosis 150 ng/ml über 6 h inkubiert, deren RNA isoliert und anschließend in cDNA transkribiert. Die gewonnene cDNA der Proben wurde auf eine einheitliche Endkonzentration von 25 ng/μl gepoolt und zum RT² SYBR Green ROX qRT-PCR-Mastermix hinzugegeben (Ansatz siehe Tabelle 17). Zur Durchführung des RT² Profiler™ PCR-Arrays wurden gemäß Herstellerprotokoll 25 μl des Mastermixes in jedes Well einer speziellen 96-Well-Reaktionsplatte, die die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren in getrockneter Form enthielt, pipettiert. Im StepOnePlus™ Real-Time PCR-Thermocycler durchliefen die Reaktionsansätze daraufhin ein zehninütiges Intervall bei 95 °C, gefolgt von einem 40-Zyklus-Modus, der kontinuierlich von 15 s bei 95 °C zu 1 min bei 60 °C wechselte. Um die Spezifität der Amplifikate zu bestimmen, erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Zudem gewährleistete die Reaktionsplatte eine interne Qualitätsprüfung der eingesetzten cDNA durch Aufzeichnung von genomischer DNA-, reverser Transkriptions- sowie positiver PCR-Kontrolle.

Anschließend wurden die detektierten Ct-Werte als Rohdatensatz im Excel-Format in die webbasierte RT² Profiler™ PCR-Array Data Analysis-Software der Firma Qiagen transferiert (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Unter Angabe von DMSO- bzw. Tacrolimus-stimulierter Probe berechnete das Portal daraufhin automatisch den $\Delta\Delta$ Ct-Wert und stellte die kalkulierten Daten tabellarisch sowie in Form graphischer Plots dar.

Tabelle 17: Ansatz für den RT² Profiler™ PCR-Array-Mastermix

RT ² Profiler™ PCR-Array-Mastermix	
<i>Pro Probe</i>	
Volumen	Reagenz
1350 µl	RT ² SYBR Green ROX qRT-PCR-Mastermix
102 µl	cDNA
1248 µl	Nukleasefreies Wasser (NFW)

Identifikation putativer Transkriptionsfaktoren in der *BMPR1A*-Promotorregion

Um putative Bindungsstellen von unter FK506-induzierten Transkriptionsfaktoren im *BMPR1A*-Promotor zu identifizieren, wurden, ausgehend vom humanen *BMPR1A*-Gen, 5000 bp *upstream* des Transkriptionsstartpunkts (*transcription start site*, TSS) mit dem internetbasierten Analyseprogramm TFSEARCH version 1.3 (Yutaka Akiyama, Kyoto University, Japan) der Datenbank TRANSFAC (TRANScription FACTor database, Heinemeyer et al. 1998) auf übereinstimmende Bindungsmotive geprüft. Die entsprechende Nukleotidsequenz des *BMPR1A*-Gens lieferte das bioinformatische Softwaresystem Ensembl (Flicek et al. 2014).

2.2.7 Western Blot

Stimulation und Proteinextraktion von HK-2-Zellen *in vitro*

Zunächst erfolgte die Aussaat von je $0,7 \times 10^6$ HK-2-Zellen in T75-Zellkulturflaschen in 10 ml Quantum 286 bis zum Erreichen einer Konfluenz von nahezu 90 %. Anschließend wurden die Zellen mit den in DMSO gelösten Stimulanzien CsA, FK506 und MMF der Konzentrationen 0,15, 1,5, 15 und 150 ng/ml 6 h lang behandelt (Stimulationsschema siehe Tabelle 12, Seite 37).

Zur weiteren Spezifizierung Tacrolimus-assoziiierter Mechanismen erfolgte die kontrollierte Translationshemmung durch Präinkubation mit Cycloheximid (2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml) sowie die konsekutive Stimulation mit DMSO und FK506 (0,15 ng/ml, 150 ng/ml) über 6 h. Als Kontrolle dienten in beiden Versuchsaufbauten unbehandelte sowie mit DMSO behandelte Zellen.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Zellen in PBS gewaschen, mittels Zellschaber mechanisch vom Zellkulturflaschenboden gelöst, zentrifugiert und das gewonnene Pellet je Probe in 200 µl eines proteaseinhibitorhaltigen Zelllysispuffers resuspendiert. Zur Lysathomogenisierung und Trennung zellulärer Bestandteile folgten die 30-minütige Lagerung auf Eis unter regelmäßigem Vortexen alle 10 min sowie ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (12.000 U/min, 4 °C). Die sich im Überstand befindliche Proteinfraction konnte direkt weiterverarbeitet bzw. bei -80 °C kryokonserviert werden.

Proteinextraktion aus murinem Nierengewebe

Zur Proteinextraktion wurde von den kryokonservierten nativen Mausnieren ein etwa 3 mm³ großes Gewebestück abgetrennt, in ein Eppendorftube überführt und in 300 µl Zelllysispuffer aufgenommen. Letzterer beinhaltet zusätzlich zum Protease- einen Phosphataseinhibitor, um im Folgenden die Detektion phosphorylierter Proteine zu gewährleisten. Die Homogenisierung erfolgte über 5 min im TissueLyser LT in Gegenwart einer Edelstahlkugel bei einer konstanten Hochfrequenz von 50 Hz. Das Gewebelysat wurde für weitere 30 min auf Eis belassen, dabei alle 10 min gevortext und zur zellulären Fraktionierung 15 min (12.000 U/min, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand konnte abgenommen und die darin enthaltenen Proteine wie oben beschrieben gelagert werden.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach der BCA-Methode

Die Messung von Proteinen nach der von Smith PK et al. etablierten BCA-Methode basiert auf der Reduktion eines zweiwertigen Kupferions (Cu²⁺) durch anwesende Peptidbindungen innerhalb eines alkalischen Mediums (Biuret-Reaktion), woraufhin das reduzierte Kupferion (Cu¹⁺) mit zwei Molekülen der Bicinchoninsäure (BCA) zu einem violettfarbenen lichtabsorbierenden Chelatkomplex reagiert (Smith PK et al. 1985). Die Bildung dieses Farbkomplexes steht im proportionalen Zusammenhang zur vorhandenen Proteinkonzentration und kann bei einem Extinktionskoeffizienten von 562 nm mit dem Spektralphotometer NanoDrop™ 2000 detektiert werden.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden unter Verwendung des Kitsystems Pierce™ BCA™ Protein Assay je 25 µl der Gesamtproteinlösung bzw. 25 µl des gemäß Herstellerprotokolls verdünnten Albuminstandards (Arbeitsbereich 25 bis 2000 µg/ml) mit 200 µl des Arbeitsreagenz (BCA™ Reagent A + BCA™ Reagent B; 50 zu 1) versetzt und 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Quantifizierung der Proteinproben erfolgte nach Etablierung einer Standardkurve bei 562 nm.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die analytische Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgt in Anlehnung an die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli 1970). Dabei wird durch Hinzugabe des anionischen Detergens SDS im Überschuss und entsprechende Erhitzung der Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur der Polypeptide fokussiert. Zudem bindet das SDS an die kationischen Reste des linearisierten Proteins und sorgt somit für die Überdeckung der Eigenladung, sodass der nun konstant negativ geladene Protein-SDS-Komplex entsprechend seiner Polypeptidkettenlänge vom dreidimensionalen Porennetzwerk der Gelmatrix aufgetrennt wird.

Zur Durchführung der SDS-PAGE gemäß dem durch die Firma Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, USA) modifizierten Lithiumdodecylsulfat (LDS)-NuPAGE® Elektrophoresesystem wurden die Proteinlösungen zunächst auf eine einheitliche Konzentration verdünnt, mit einem gleichen Volumen Sample Buffer (Ansatz siehe 2.1.7, Seite 24) versetzt und dessen native Polypeptidstrukturen durch Inkubation über 5 min bei 95 °C im Thermomixer denaturiert. Dabei enthielt der Probenpuffer neben dem Detergens LDS das Thiol β-Mercaptoethanol, welches die Reduktion der Disulfidbrücken vermittelte. Nach Befüllen der inneren und äußeren Elektrophoresekammern mit den entsprechenden Laufpuffern (Ansatz siehe 2.1.7, Seite 24) konnten die dissoziierten Proteine im Sammelgel (4 % Polyacrylamid) des industriell gefertigten (sog. *precast*) NuPAGE® Novex® 4 – 12 % Bis-Tris-Proteingels konzentriert werden. Das neutrale Milieu der Puffersubstanz

Bis-Tris erhöht dabei die Stabilität von Gel und Proteinen. Durch Anlegen einer initialen Gleichstromspannung von 80 V über 20 min und einem anschließenden etwa zweistündigen Intervall bei 120 V erfolgte die Auftrennung der Proteine im Trenngel mit 12%igem Polyacrylamidgehalt. Als Größenreferenz dienten 10 µl des Novex® Sharp Pre-stained Proteinstandards, sodass sich Molekulargewichte zwischen 3,5 bis 260 kDa differenzieren ließen.

Semi-Dry-Western Blot

Der gewichtsspezifischen Auftrennung der Proteine mittels LDS-PAGE folgte der elektrophoretische Transfer auf eine Nitrozellulosemembran nach einer von Towbin et al. etablierten Technik (Towbin et al. 1992). Hierzu wurde das LDS-Gel auf eine zuvor im Transferpuffer äquilibrierte Membran gelegt und anschließend zwischen jeweils drei mit Transferpuffer getränkte Filterpapiere angeordnet. Die, ähnlich eines Sandwiches, gebetteten Komponenten sind dabei zwingend luftblasenfrei auf die Anode (+) der Fastblot-Apparatur zu stapeln. Der Transfer der Proteine senkrecht zur Trennrichtung des LDS-Gels auf die Membran erfolgte nach Anschluss des als Kathode (-) fungierenden Deckels zunächst über 15 min bei einer Stromstärke von 150 mA und für weitere 45 min bei 250 mA.

Immunodetektion

Nach dem Transfer wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels Chemilumineszenzreaktion visualisiert. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran in ein 50-ml-Tube überführt, zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h in der entsprechenden 5%igen Blockierlösung (BSA bzw. Milch) belassen und anschließend mit dem in BSA oder Milch (jeweils 2 %) verdünnten Primärantikörper über Nacht bei +4 °C inkubiert. Ungebundene Primärantikörper konnten am Folgetag durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 min mit dem Waschpuffer TBS-T entfernt werden. Es folgten die Inkubation der Membran mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in der 5%igen Blockierlösung über 1 h bei Raumtemperatur sowie drei Waschschritte à 5 min in TBS-T (Verdünnung siehe Tabelle 18).

Zur Detektion von Primärantikörpern anderer Ursprungsspezies wurde die Membran über 30 min mit dem Restore™ Western Blot Stripping Buffer behandelt und bereits gebundene Immunkomplexe entfernt. Nach dreimaligem Waschen über 5 min in TBS-T mussten freie Bindungsstellen erneut durch 5%iges BSA geblockt und die Membranen mit den jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern, wie eingangs beschrieben, inkubiert werden. Um eine gleichmäßige Benetzung zu gewährleisten, wurden die in den 50-ml-Tubes befindlichen Membranen während des Blockierens sowie der Anwendung von Primär- und Sekundärantikörpern konstant auf der Rollermixer-Apparatur rotiert. Die Basis von Waschpuffern (TBS-T) und Blockierlösungen (BSA bzw. Milch) richtete sich nach der Herstellerempfehlung des jeweiligen Primärantikörpers (siehe 2.1.7, Seite 24).

Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte mithilfe der Kitsysteme 20X LumiGLO® Reagent and 20X Peroxide oder SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate. Hierzu wurden die Komponenten gemäß Herstellerangaben miteinander vermischt (siehe 2.1.7, Seite 25) und gleichmäßig auf die Membran in Höhe der zu erwartenden Bande pipettiert. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysierte daraufhin die Oxidation des in der Entwicklerlösung enthaltenen Luminols (Chemilumineszenzreaktion), sodass das entstandene lichtemittierende Reaktionsprodukt durch die hochauflösende CCD-Kamera des ChemiDoc™ MP Imaging Systems digital erfasst werden konnte. Die Länge der

Expositionszeit sowie die Verwendung des jeweiligen Kitsystems wurden individuell in Abhängigkeit von der Stärke des detektierten Signals gewählt.

Tabelle 18: Verwendete Antikörper für den Western Blot

Primärantikörper				Sekundärantikörper		
Antigen	Gewicht(kDa) ¹	Ursprung	Verdünnung	Ursprung	Markierung	Verdünnung
BMPRI1A (human/mouse)	75	Kaninchen	1:1000	Ziege	HRP	1:2000
Bmpr1b	50	Kaninchen	1:1000	Ziege	HRP	1:2000
Bmpr2	115	Kaninchen	1:1000	Ziege	HRP	1:2000
GAPDH	36	Maus	1:2500	Kaninchen	HRP	1:2000
Arnt	87	Kaninchen	1:625	Ziege	HRP	1:20000
pSmad	60	Kaninchen	1:500	Ziege	HRP	1:20000

¹Gewichtsangaben der Antikörper nach Herstellerangaben; Differenzen bei Anwendung im Ergebnisteil vermerkt

Auswertung

Die densitometrische Auswertung erfolgte durch optometrische Dichtemessung der jeweils prominentesten Einzelbande mithilfe der Bildverarbeitungssoftware ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA). Anschließend konnte der für das Zielprotein quantifizierte Wert gegen das detektierte Signal eines konstant exprimierten Haushaltsgens (GAPDH) normalisiert werden. Für statistische Analysen wurde die ermittelte relative Expression der jeweiligen Kontrolle arbiträr auf den Wert eins festgelegt.

2.2.8 Transfektion von *small interfering RNA* (siRNA)

RNA-Interferenz (RNAi)

Der von Andrew Fire und Craig Mello 1998 in der eukaryotischen Zelle etablierte Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) basiert auf dem Vorhandensein doppelsträngiger RNA (dsRNA), die sequenzkomplementäre mRNA spezifisch degradiert und somit die posttranskriptionelle „Stummschaltung“ (engl. *gene silencing*) eines Gens induziert (Fire et al. 1998). Während dieser evolutionär konservierte Prozess in der Zelle selbst als physiologisches Regulationssystem der Genexpression, u. a. zum Schutz vor viraler Infektion fungiert und damit dem Erhalt der Genomintegrität dient (Sioud 2005), erlaubt die experimentelle Anwendung des zielgerichteten Knockdowns homologer Gene, mittels In-vitro-Studien die Funktion ihrer kodierenden Proteine im Organismus zu charakterisieren. Initial führt die lange dsRNA zur Aktivierung der Endoribonuklease Dicer, deren funktionelle Untereinheiten den langen Doppelstrang ATP-abhängig in die kürzere

21 bis 23 Nukleotide umfassende siRNA (*small interfering RNA*) prozessieren (Bernstein et al. 2001, Tuschl und Borkhardt 2002). Diese Fragmente involvieren eine zentrale doppelsträngige Region, die von einem phosphorylierten 5'-Ende sowie zwei bis drei unpaaren Nukleotidüberhängen am unphosphorylierten 3'-Ende flankiert werden (Elbashir et al. 2001). Im Folgenden wird die interferierende RNA in den Multienzymkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*) integriert, dessen Helikase-Domäne unter ATP-Verbrauch den Doppelstrang entwindet und den Abbau des *sense*-Stranges initiiert (Nykänen et al. 2001). Der *antisense*-Strang hingegen verbleibt im RISC und interagiert mittels komplementärer Basenpaarung mit der homologen Ziel-mRNA, woraufhin die Endonukleaseaktivität des RISC deren Degradation einleitet (Sledz und Williams 2005).

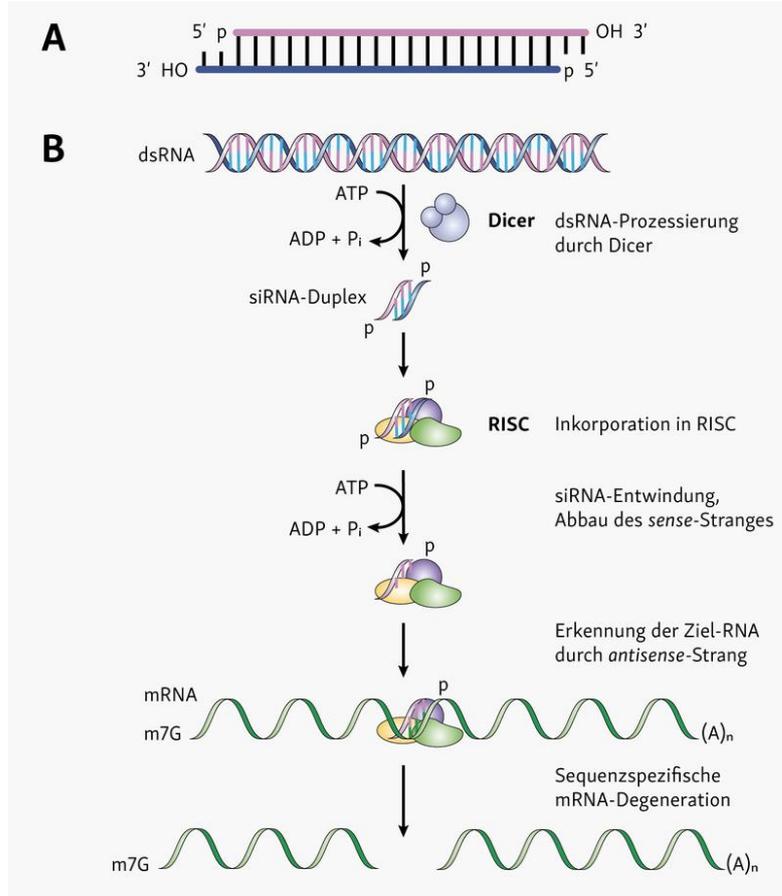


Abbildung 7: RNA-Interferenz

(A) Molekulare Kennzeichen einer siRNA. (B) Mechanismus der RNAi (Dykxhoorn et al. 2003, Seite 458).

Verwendete siRNA und *scrambled siRNA* (scrRNA)

Im Folgenden sollte gezielt die Inhibition selektiver Gene forciert werden. Die Inkorporation von langen dsRNA-Molekülen (> 30 bp) triggert im Zytoplasma der eukaryotischen Zelle allerdings die Freisetzung von Interferon als Teil der Immunantwort und induziert letztlich eine globale mRNA-Degradation sowie den Arrest der Proteinsynthese. Um die Spezifität des Gene Silencings zu optimieren, bietet sich daher die Verwendung chemisch synthetisierter kurzkettiger siRNA an. Zu berücksichtigende Kriterien implizieren u. a. die Entfernung möglicher Sequenzhomologien zu anderen Genen, die Beachtung des Angriffsorts in der Ziel-mRNA, des GC-Gehalts sowie der Duplexstabilität, die entscheidend für die Integration des *antisense*-Stranges in den RISC-Komplex ist (Reynolds et al. 2004, Sandy et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die kommerziell hergestellte *small interfering RNA* der Firma Santa Cruz Biotechnology verwendet, die ein Gemisch bestehend aus drei bis fünf RNA-Doppelsträngen der Länge 19 bis 25 nt in einem äquivalenten Verhältnis liefert (Sequenzen siehe Tabelle 5, Seite 27). Zur Überprüfung der Knockdown-Effizienz fungierte eine nicht-genomische, sogenannte *scrambled siRNA* (scrRNA), deren Sequenz keine bekannte Homologie zum Transkriptom von Eukaryoten und damit keinerlei Funktionalität hinsichtlich interferierender Effekte aufweist. Ein Instrument zum zusätzlichen Sequenzabgleich stellt der

BLAST-Algorithmus dar, indem er die statistische Signifikanz möglicher Übereinstimmungen berechnet und somit die Spezifität der Nukleotide sichert.

Prinzip der transienten Transfektion

Der nicht-virale Transfer genetischer Information in Eukaryoten wird als Transfektion bezeichnet. Allerdings stellt die aktive Aufnahme von Nukleinsäuren in die Zelle ein überaus seltenes Ereignis dar, weshalb zur Überwindung der Zellmembran deren temporäre Permeabilisierung mittels etablierter physikalischer oder biochemischer Methoden fokussiert wird. Da eine Integration des inkorporierten Nukleotidduplex in das Genom der Zelle und somit die Amplifikation des übermittelten Impulses nach dessen enzymatischer Degradation ausbleibt, handelt es sich bei der Transfektion von siRNA allenfalls um ein transientes Phänomen. Der im Folgenden erfolgte Nukleotidtransfer wurde nach dem von Felgner beschriebenen Prinzip der Lipofektion durchgeführt (Felgner et al. 1987). Die dabei verwendeten kationischen Transfektionsreagenzien formen aufgrund ihrer lipo- und hydrophilen Eigenschaften im wässrigen Milieu micellenähnliche dreidimensionale Kugeln. Werden diese Liposomen nun mit den anionischen Nukleinsäuren der siRNA inkubiert, komplexieren sie deren Phosphatrückgrat. Dieser den Aufbau der Zellmembran imitierende Lipoplex vermittelt nun über die Fusion mit der Zellmembran die Inkorporation der Fremd-RNA in die eukaryotische Zelle.

Liposomale Transfektion von siRNA in MCT-Zellen

Zunächst wurden MCT-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten zu je $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well in 2 ml Wachstumsmedium ohne antibiotische Zusätze ausgesät und über einen Zeitraum von 18 bis 24 h bis zu einer Konfluenz von 60 bis 70 % kultiviert. Die Ausnutzung der exponentiellen Wachstumsphase führt zu einer erhöhten Transfektionseffizienz, wohingegen die durch eine intakte Monolayer-Kultur induzierte Kontaktinhibition die Aufnahme der Nukleotide behindert.

Die nachfolgend eingesetzten Mengenverhältnisse beziehen sich auf je eine Vertiefung einer 6-Well-Zellkulturplatte. Zur Vorbereitung des Transfektionsansatzes wurden 245 μ l des vorgewärmten Opti-MEM® I Reduced Serum Mediums mit 5 μ l des kationischen Reagenz Lipofectamine® 2000 versetzt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen konnten 60 pmol der jeweiligen siRNA-Sequenz in 250 μ l Opti-MEM® verdünnt und anschließend im Lipidgemisch aufgenommen werden. Als Kontrolle dienten mit nicht-genomischer scrRNA transfizierte Zellen. Zur Erzeugung der Liposomenkomplexe erfolgte über 20 min die erneute Inkubation der präparierten Komponenten bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die MCT-Zellen mit 500 μ l des jeweiligen Transformationsansatzes für 4 h im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂-Gehalt) kultiviert und regenerierten nach vollzogenem Mediumwechsel mit supplementiertem antibiotikafreiem Medium über Nacht. Am Folgetag konnten die mit siRNA transfizierten Zellen mit Tacrolimus in den Konzentrationen 150 ng/ml und 1500 ng/ml für 3 h stimuliert werden, wobei die parallele Inkubation je eines Wells mit DMSO als Kontrolle fungierte. Um neben dem posttranskriptionellen Gene Silencing auch den Effekt des Tacrolimus auf die Expression der einzelnen Gene zu charakterisieren, wurden zuvor mit unfunktionaler scrRNA transfizierte MCT-Zellen mit FK506 in unterschiedlichen Dosen (15 ng/ml, 150 ng/ml, 1500 ng/ml, 3000 ng/ml, 4500 ng/ml) sowie DMSO für 6 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in PBS gewaschen, deren gewonnenen Lysate der Protein- und RNA-Isolation zugeführt und Expressionsanalysen mittels PCR und Western Blot-Methoden vollzogen.

2.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der experimentell gewonnenen Datensätze erfolgte unter Verwendung der GraphPad Prism-Software, Version 5.00. Die mindestens als Triplikate generierten Untersuchungsergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung und Signifikanzniveau angegeben. Hierzu wurde zunächst eine Testung von Mittelwertunterschieden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-Way-ANOVA) durchgeführt und nachfolgend signifikante Globaleffekte mit auf dem T-Test basierendem multiplem Vergleichsverfahren nach Bonferroni (Bonferroni-Post-Hoc-Analyse) korrigiert. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert und entsprechende Graphen wie folgt gekennzeichnet: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$.

3. ERGEBNISSE

3.1 Induktion des BMP7-Rezeptors BMPR1A nach FK506-Supplementation *in vitro*

3.1.1 Selektiv vermehrte Expression des BMPR1A unter FK506-Exposition in HK-2-Zellen

Zunächst sollte der Einfluss der immunsuppressiven Substanzen Mycophenolat Mofetil (MMF), Cyclosporin A (CsA) und FK506 auf die Expression des BMP-Typ I-Rezeptors *BMPR1A* in der humanen proximalen Tubulusepithelzelllinie HK-2 innerhalb eines zeitabhängigen Versuchs mittels qRT-PCR analysiert werden. Während sich nach 30-minütiger Inkubation der niedrigkonzentrierten Pharmaka (0,15, 1,5, 15, 150, 1500 ng/ml) kein Effekt auf die relative *BMPR1A*-Expression im Tubulusepithel manifestierte, zeigte die sechsstündige FK506-Exposition in äquivalenten Stoffmengen eine signifikante dosisabhängige Induktion des Zielgens. Hingegen führte auch die längerfristige Stimulation mit den immunsuppressiven Therapeutika CsA und MMF zu keinen relevanten Veränderungen des *BMPR1A*-Expressionsniveaus. Sämtliche Werte wurden gegen parallel mit DMSO inkubierte HK-2-Zellen normalisiert.

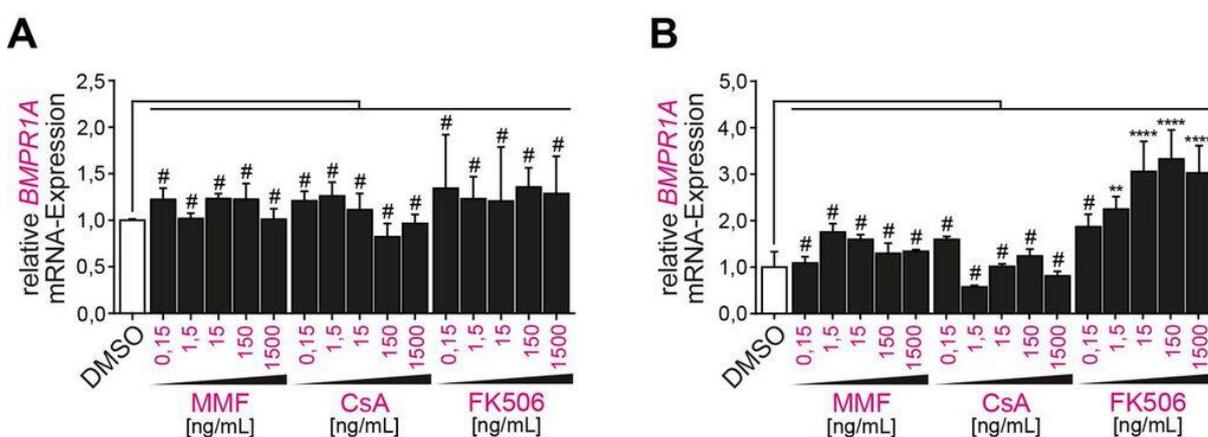


Abbildung 8: Selektiv vermehrte Expression des *BMPR1A* *in vitro* unter FK506-Exposition auf Transkriptionsebene

(A+B) Analyse der *BMPR1A*-Expression mittels qRT-PCR in humanen proximalen Tubulusepithelzellen (HK-2) nach 30-minütiger (A) bzw. sechsstündiger Stimulation (B) mit den immunsuppressiven Pharmazeutika MMF, CsA und FK506. Für statistische Analysen wurde die relative Expression parallel mit DMSO behandelten Zellen arbiträr auf den Wert eins festgelegt (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten HK-2-Zellen).

Die Validierung der auf mRNA-Ebene detektierbaren Tendenzen erfolgte anschließend auf Proteinebene durch die Western Blot-Methodik. Die diesbezüglich angestrebte Densitometrie unter Zuhilfenahme der Analysesoftware ImageJ bestätigte nach sechsstündiger Inkubation FK506 als potentes Stimulanz einer effizienten *BMPR1A*-Induktion. Demgegenüber ließ sich ein signifikanter Einfluss der Pharmaka MMF und CsA auf die Expression des BMP-Rezeptors nicht eruieren.

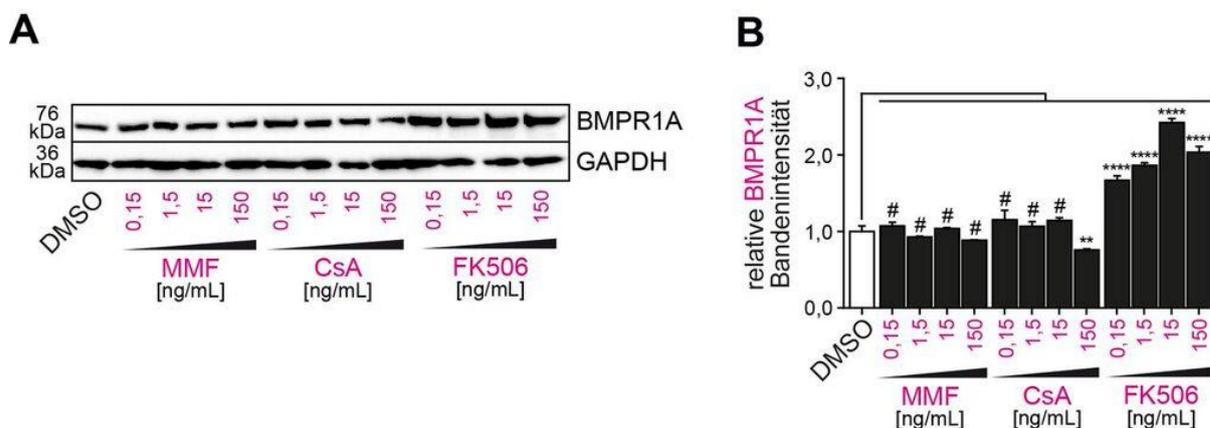


Abbildung 9: Selektiv vermehrte Expression des BMPR1A *in vitro* unter FK506-Exposition auf Proteinebene
(A) Western Blot präsentiert die Induktion des BMPR1A in HK-2-Zellen nach sechsstündiger Inkubation mit den immunsuppressiven Pharmaka MMF, CsA und FK506. **(B)** Densitometrische Auswertung des Western Blots auf BMPR1A. Für statistische Analysen erfolgte eine optometrische Dichtemessung an drei prominenten Einzelbanden sowie die Normalisierung des für das Zielprotein BMPR1A quantifizierten Wertes gegen das detektierte Signal des Haushaltsgens GAPDH. Die relative Expression DMSO-behandelter Zellen wurde arbiträr auf den Wert eins festgelegt (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorierlicher ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten HK-2-Zellen).²

3.1.2 Effekt immunsuppressiver Substanzen auf die Regulation der BMP7-Rezeptoren *BMPR1B* und *BMPR2* in HK-2-Zellen

Die folgenden Untersuchungen fokussierten den weiterhin kritischen Aspekt, inwiefern die konsekutive BMPR1A-Induktion unter FK506 auf weitere BMP7-spezifische Rezeptoren übertragbar sein könnte.

Hierzu initial für den *BMPR1B* realisierte qRT-PCR-Analysen führten nach sechs Stunden andauernder Inkubation tubuloepithelialer HK-2-Zellen mit entsprechenden Dosen MMF, CsA sowie FK506 (0,15, 1,5, 15, 150, 1500 ng/ml) zu keinen signifikanten Divergenzen im Expressionsprofil des Typ I-Rezeptors.

Während die im Anschluss erfolgte Determination der relativen *BMPR2*-Expression für die Pharmaka MMF und CsA eine geringfügige, jedoch nicht repräsentativ konsistente Repression des Rezeptors ergab, zeigte die FK506-Supplementation einen leicht stabilisierenden, allerdings ebenfalls nicht signifikanten Effekt auf die *BMPR2*-Expression. Eine generalisierte rezeptorassoziierte Wirksamkeit der immunsuppressiven Stimulanzen darf demzufolge ausgeschlossen werden.

² Die vollständigen unbearbeiteten Western Blot-Gele befinden sich im Anhang (siehe 6.2, Seite 100 ff., Abbildung 32 bis 39).

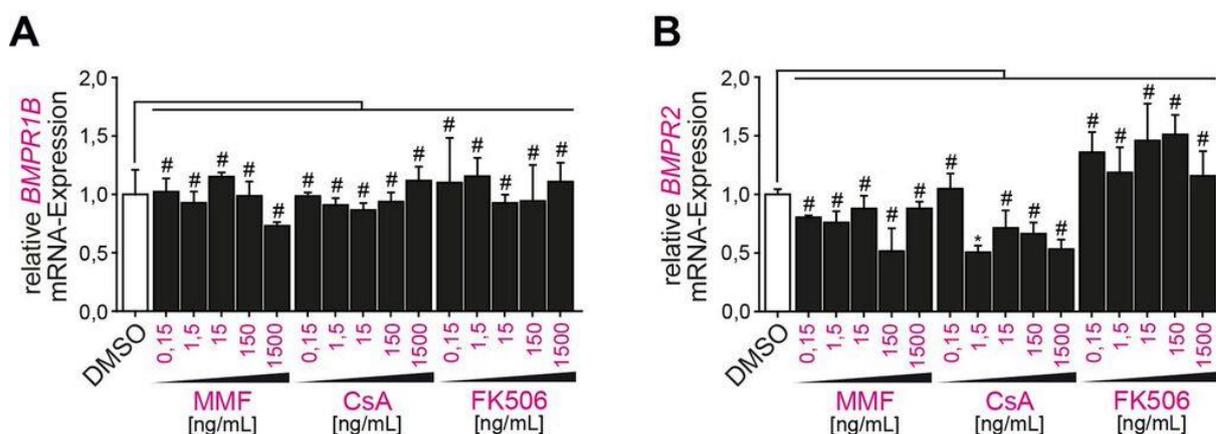


Abbildung 10: Immunsuppressive Substanzen *in vitro* ohne Effekt auf die Regulation der BMP7-Rezeptoren *BMPR1B* und *BMPR2*

(A+B) Analyse der *BMPR1B*- (A) bzw. der *BMPR2*-Expression (B) mittels qRT-PCR in humanen Tubulusepithelzellen (HK-2) nach sechsstündiger Stimulation der immunsuppressiven Substanzen MMF, CsA und FK506 (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, * $p < 0,05$, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorier ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten HK-2-Zellen).

3.2 Spezifische FK506-abhängige Induktion des *Bmpr1a* *in vivo*

3.2.1 Vermehrte Expression des *Bmpr1a* im Mausmodell der unilateralen Ureterobstruktion

Die in humanen tubuloepithelialen Zellen (HK-2) quantifizierbare signifikante Hochregulation des *Bmpr1a* durch niedrigkonzentriertes FK506 sollte anschließend im Mausmodell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) nach Induktion einer experimentellen Nierenfibrose untersucht werden. Hierzu erhielten die aus je sechs Tieren bestehenden Kohorten bereits einen Tag präoperativ entweder einen unveränderten (*vehicle*) bzw. einen mit drei unterschiedlichen Dosen FK506 supplementierten 5%igen Glucosepuffer. Als Kontrollen sämtlicher folgender Untersuchungen fungierte die kontralaterale „scheinoperierte“ (*sham*) Niere. Die Quantifizierung des relativen *Bmpr1a*-Expressionsmusters erfolgte zunächst mithilfe der qRT-PCR- sowie der Western Blot-Technik.

Die mittels qRT-PCR durchgeführten mRNA-Analysen zeigten im Kollektiv der zehn Tage lang mit UUO behandelten Kontrollmäuse eine signifikante, um 2,7-fach erhöhte relative Expression von *Bmpr1a* gegenüber den *sham*-Nieren *vehicle*-behandelter Mäuse. Insgesamt ließ sich jedoch durch die zusätzliche orale Applikation von FK506 eine weitaus effizientere Hochregulation realisieren, wobei die höchste FK506-Dosierung (0,2 mg/kg KG/Tag) den potentesten Stimulus der Rezeptorexpression darstellte. Eine generelle Dosisabhängigkeit manifestierte sich jedoch nicht.

Der Einfluss des FK506 hinsichtlich der *Bmpr1a*-Expression konnte anschließend auf Proteinebene durch Anwendung der Western Blot-Methodik verifiziert werden. Während sich in UUO-Nieren des Kontrollkollektivs zwar eine geringe, jedoch nicht signifikant erhöhte Expression des *Bmpr1a* im Vergleich zur kontralateralen Niere verdeutlichte, führte die orale Administration von FK506 zu einer potenten dosisabhängigen Stimulation des Rezeptors. Dabei zeigte das Pharmakon seine effektivste Wirksamkeit in Tieren, denen mittlere Dosen (0,075 mg/kg KG/Tag) verabreicht worden waren.

3.2.2 Verminderte Expression der Bmpr1b- und Bmpr2-Rezeptoren nach unilateraler Ureterobstruktion

In welchem Maße das Pharmakon FK506 während der renalen Fibrogenese auch die Expression der BMP-Rezeptoren Bmpr1b und Bmpr2 beeinflusst, wurde im Weiteren mittels qRT-PCR und Western Blot in ureterligierten Nieren entsprechender Versuchstiere analysiert.

Die zehn Tage andauernde permanente Harnleiterokklusion führte in den präparierten Nieren der *vehicle*- sowie der FK506-behandelten Mäuse zu einer deutlich signifikanten Reduktion der durch qRT-PCR ermittelten relativen *Bmpr1b*-Expression in Relation zu scheinoperierten Nieren des Kontrollkollektivs. Der Vergleich der UUO-Nieren untereinander zeigte unabhängig von einer FK506-Supplementation keine relevanten Unterschiede.

Weiterführende Western Blot-Analysen auf Grundlage renaler Proteinlysate untermauerten die markante Herunterregulation der Bmpr1b-Expression in obstruierten Nieren gegenüber normierten kontralateralen Nieren und ließen keinen Rückschluss auf eine FK506-abhängige Regulation zu.

Auch bei der anschließenden Determination der Bmpr2-Expression verdeutlichte sich sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine signifikante Reduktion des Typ II-Rezeptors im Parenchym der ligierten Nieren im Vergleich zur *sham*-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse, wobei die Gabe von FK506 das relative Expressionsniveau des Bmpr2 in UUO-Nieren unbeeinflusst ließ.

Die Ergebnisse korrelieren mit den aus stimulierten HK-2-Zellen generierten qRT-PCR-Daten und legen einen Bmpr1a-spezifischen Regulationsmechanismus nahe, der durch FK506-Exposition potenziert wird.

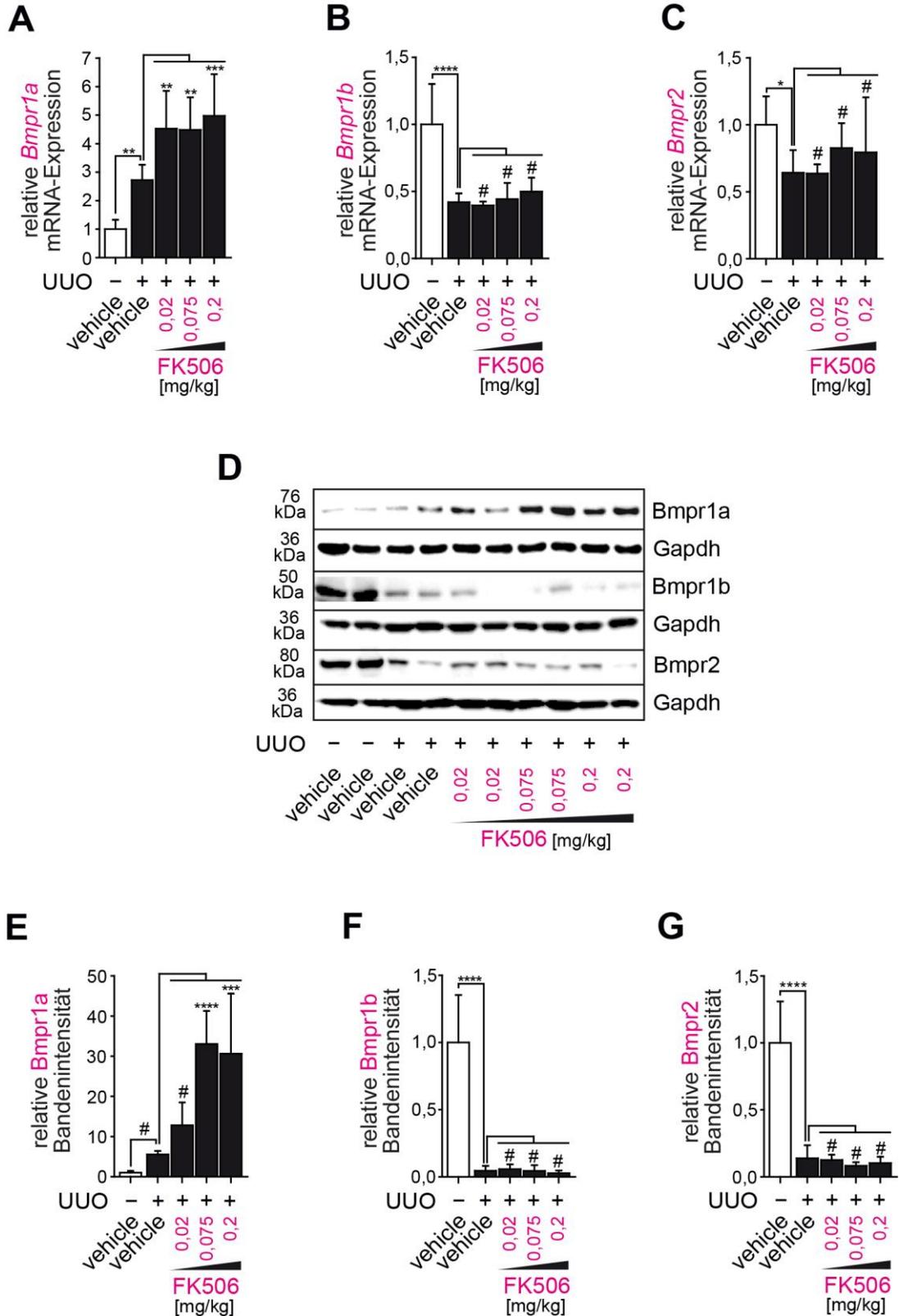


Abbildung 11: Spezifische FK506-abhängige Induktion des Bmpr1a in UUO-Nieren

(A-C) Analyse der *Bmpr1a*- (A), *Bmpr1b*- (B) und *Bmpr2*-Expression (C) mittels qRT-PCR nach RNA-Isolation aus murinen Nierenbiopsaten nach zehntägiger UUO. Für statistische Analysen wurde die relative Expression von sham-operierten Nieren des Kontrollkollektivs arbiträr auf den Wert eins festgelegt (Messung der Proben als

Triplikate, $n = 4$ in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere bzw. zur UUO-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse). (D) Western Blot präsentiert die Bmpr1a-, Bmpr1b- und Bmpr2-Expression in *sham*- und UUO-Nieren *vehicle*- bzw. FK506-behandelter Mäuse. (E-G) Densitometrische Analyse des Western Blots auf Bmpr1a (E), Bmpr1b (F) und Bmpr2 (G). Der für das jeweilige Zielgen quantifizierte Wert wurde gegen das detektierte Signal des Haushaltsgens Gapdh normalisiert und aus den beiden pro Gruppe generierten Werten ein Mittelwert berechnet. Für statistische Analysen wurde die absolut optometrisch quantifizierbare Expression von *sham*-operierten Nieren des Kontrollkollektivs arbiträr auf den Wert eins festgelegt (Messung der Proben als Triplikate, $n = 2$ in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, **** $p < 0,0001$; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere bzw. zur UUO-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse).

3.2.3 FK506-abhängige Bmpr1a-Induktion in Assoziation mit aktivierter Smad1/5/8-Signaltransduktionskaskade

Im Folgenden sollte die im UUO-Modell eruierte Hochregulation des Bmpr1a insbesondere nach der Applikation von FK506 auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Diese impliziert die Bmpr1a-induzierte Phosphorylierung der zytoplasmatischen rezeptorregulierten Smad1/5/8-Proteine zu pSmad1/5/8 und ist somit ein Ausdruck für die effektive Aktivierung der intrinsischen Signalkaskade und der sich anschließenden Genregulation. Hierzu erfolgten in allen Mauskollektiven quantitative Expressionsanalysen des Bmpr1a sowie der pSmad1/5/8-Proteine mittels immunhistochemischer Färbungen sowie auf Proteinebene mittels Western Blot.

Nach zehntägiger einseitiger obstruktiver Nephropathie zeigten immunhistochemisch mit Anti-Bmpr1a markierte UUO-Nieren des Kontrollkollektivs nur einen geringfügig erhöhten Anteil lokalisierbarer Bmpr1a⁺-Tubulusepithelzellen, wohingegen sich signifikante und sogar dosisabhängige Unterschiede infolge einer systemischen FK506-Exposition manifestierten.

Einen ersten Anhaltspunkt für eine signifikante Induktion der intrinsischen Signaltransduktion nach FK506-Applikation lieferte zunächst die morphometrische Flächenanteilbestimmung immunhistochemisch auf pSmad1/5/8 gefärbter Nierenpräparate. Während sowohl in *sham*- wie auch in UUO-Nieren *vehicle*-behandelter Mäuse äquivalente Areale phosphorylierter Smad1/5/8-Proteine quantifizierbar waren, manifestierte sich im Tubulusepithel der mit FK506 supplementierten Mäuse infolge der permanenten Harnleiterokklusion eine signifikant erhöhte dosisabhängige Steigerung der Zielproteine pSmad1/5/8.

Der Western Blot bestätigte die wirkungsvolle Hochregulation phosphorylierter Smad1/5/8-Proteine in UUO-Nieren FK506-behandelter Kohorten, wobei dieser induktive Effekt, analog zu den mittels Immunmarkierung vollzogenen bildanalytischen Messungen durch kontinuierliche Konzentrationssteigerung des Pharmakons potenziert werden konnte. Demgegenüber reduzierte sich in obstruierten Nieren der Kontrollgruppe die relative Expression der Zielproteine pSmad1/5/8 und somit das Aktivitätsniveau der rezeptorassoziierten intrazellulären Signalkaskade.

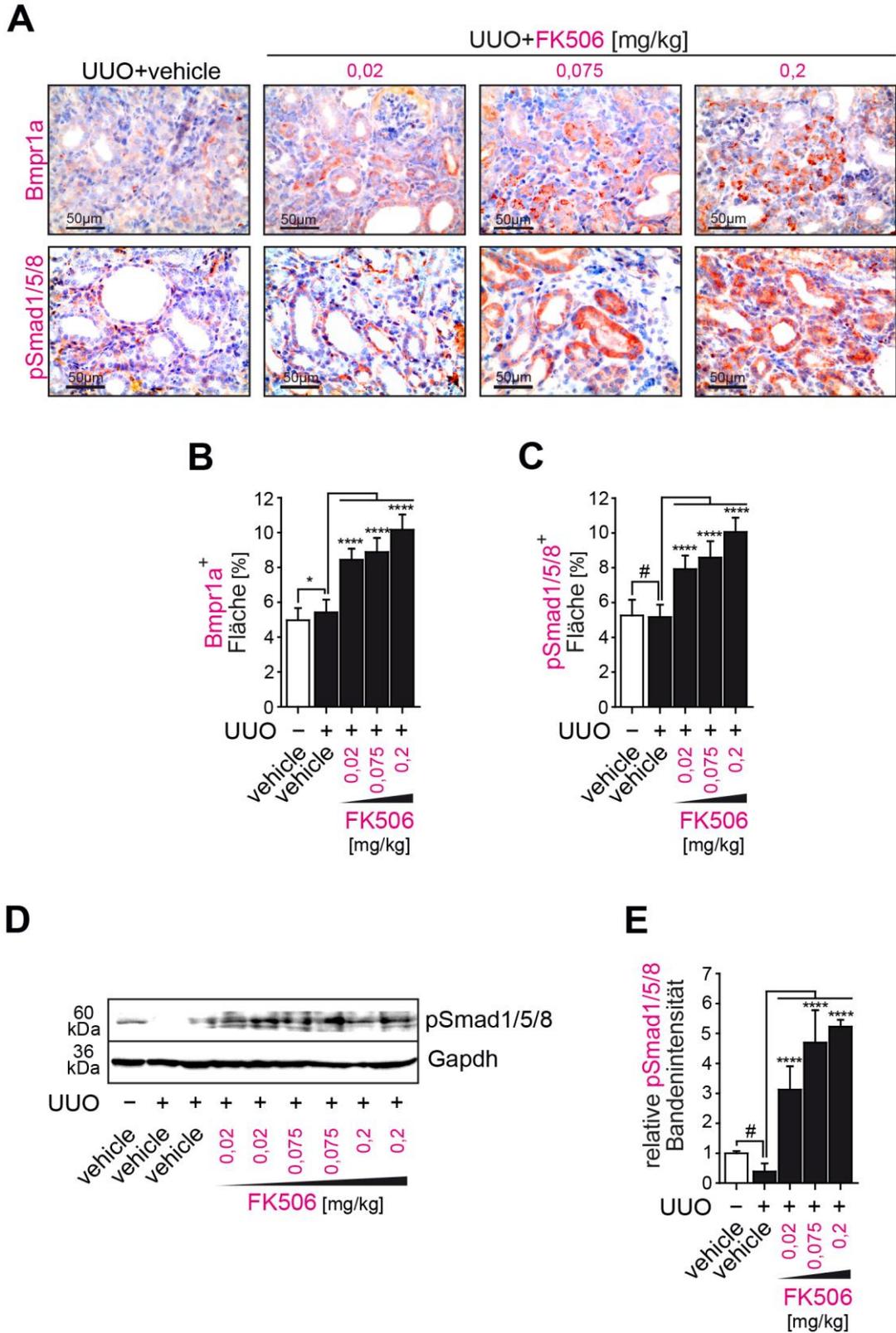


Abbildung 12: Assoziation der FK506-abhängigen Bmpr1a-Induktion mit konsekutiv aktivierter Smad1/5/8-Signaltransduktionskaskade in UUO-Nieren

(A) Repräsentative Mikrophotographie von immunhistochemisch mit primären Antikörpern gegen Bmpr1a und

pSmad1/5/8 markierten Nierenpräparaten (Messbalken 50 μm). Die Bildausschnitte zeigen UUO-Nieren von *vehicle*- und FK506-behandelten Mäusen zehn Tage nach unilateraler Ureterobstruktion. **(B+C)** Morphometrische Quantifizierung der Bmpr1a- **(B)** und pSmad1/5/8-Expression **(C)** in immunhistochemisch markierten Nierengewebeschnitten (Bildanalytische Messung erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n = 6 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, * p<0,05, **** p<0,0001, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere bzw. zur UUO-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse). **(D)** Western Blot zeigt die Expression der pSmad1/5/8-Proteine in *sham*- und UUO-Nieren *vehicle*- bzw. FK506-behandelter Mäuse. **(E)** Densitometrische Analyse des Western Blots auf pSmad. Für statistische Analysen wurde der für das Zielgen quantifizierte Wert gegen das detektierte Signal des Haushaltsgens Gapdh normalisiert und aus den beiden pro Gruppe generierten Werten ein Mittelwert berechnet. Aus technischen Gründen wurde für die *sham*-operierte Niere des Kontrollkollektivs eine Probe aufgetragen und somit nur ein Wert generiert (Messung der Proben als Triplikate, n = 2 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere bzw. zur UUO-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse).

3.2.4 Einfluss der FK506-Exposition auf die Expression des Bmpr1a- und der pSmad1/5/8-Proteine in *sham*-operierten Nieren

Weiterhin sollte die Wirkung von FK506 auf die Expression des Bmpr1a sowie die als Kennzeichen seiner Funktionalität zu interpretierende Phosphorylierung der Smad1/5/8-Proteine im gesunden Nierenparenchym analysiert werden. Entsprechende Untersuchungen erfolgten in immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitten scheinoperierter Nieren, die Versuchstieren infolge der üblichen *vehicle*- bzw. FK506-Applikation entnommen worden waren. Dabei betragen die morphometrisch quantifizierbaren Bmpr1a⁺- und pSmad1/5/8⁺-Flächenanteile in allen *sham*-Nieren durchschnittlich etwa 5 % und gaben aufgrund der fehlenden Signifikanz keinen Hinweis auf einen FK506-abhängigen Effekt. Übereinstimmendes zeigte auch die anschließende mittels qRT-PCR vollzogene Verifizierung der *Bmpr1a*-Expression.

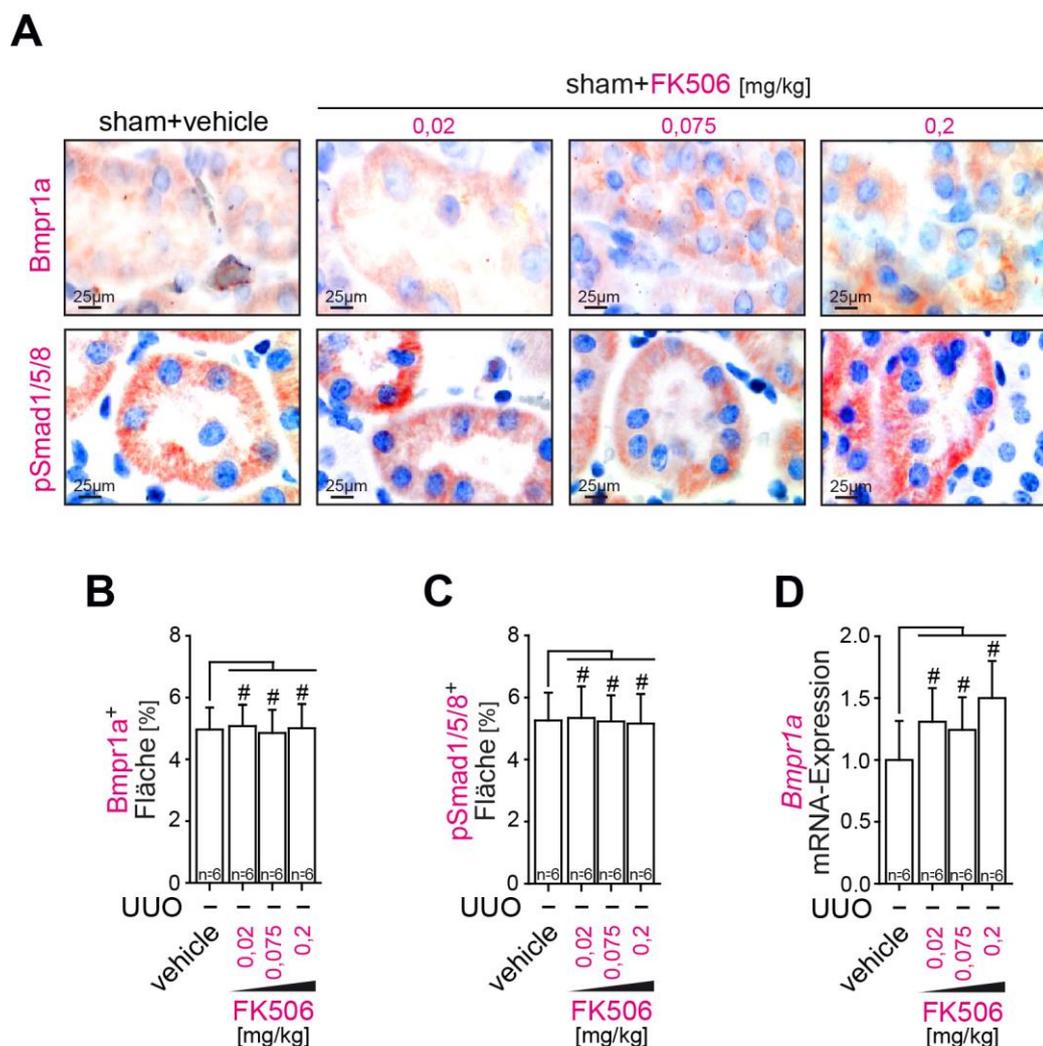


Abbildung 13: FK506-Exposition ohne Einfluss auf die Bmpr1a- und pSmad1/5/8-Expression in sham-Nieren
(A) Repräsentative Mikrophotographie von immunhistochemisch mit primären Antikörpern gegen Bmpr1a und pSmad1/5/8 markierten Nierenpräparaten (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen sham-operierte Nieren von vehicle- und FK506-behandelten Mäusen. **(B+C)** Morphometrische Quantifizierung der Bmpr1a- **(B)** und pSmad1/5/8-Expression **(C)** in immunhistochemisch markierten Nierengewebeschnitten (Bildanalytische Messung erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n = 6 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur sham-Niere vehicle-behandelter Mäuse). **(D)** Analyse der Bmpr1a-Expression mittels qRT-PCR nach RNA-Isolation aus murinen sham-Nieren (Messung der Proben als Triplikate, n = 4 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur sham-Niere vehicle-behandelter Mäuse).

Somit lassen die molekularbiologische und immunhistologische Charakterisierung des fibrotischen Nierengewebes auf eine effiziente Induktion von Bmpr1a mit implizierter Phosphorylierung der zytoplasmatischen R-Smads 1/5/8 nach geringdosierter Gabe des immunsuppressiven Therapeutikums Tacrolimus schließen und sprechen daher für den Erhalt der Rezeptorfunktionalität.

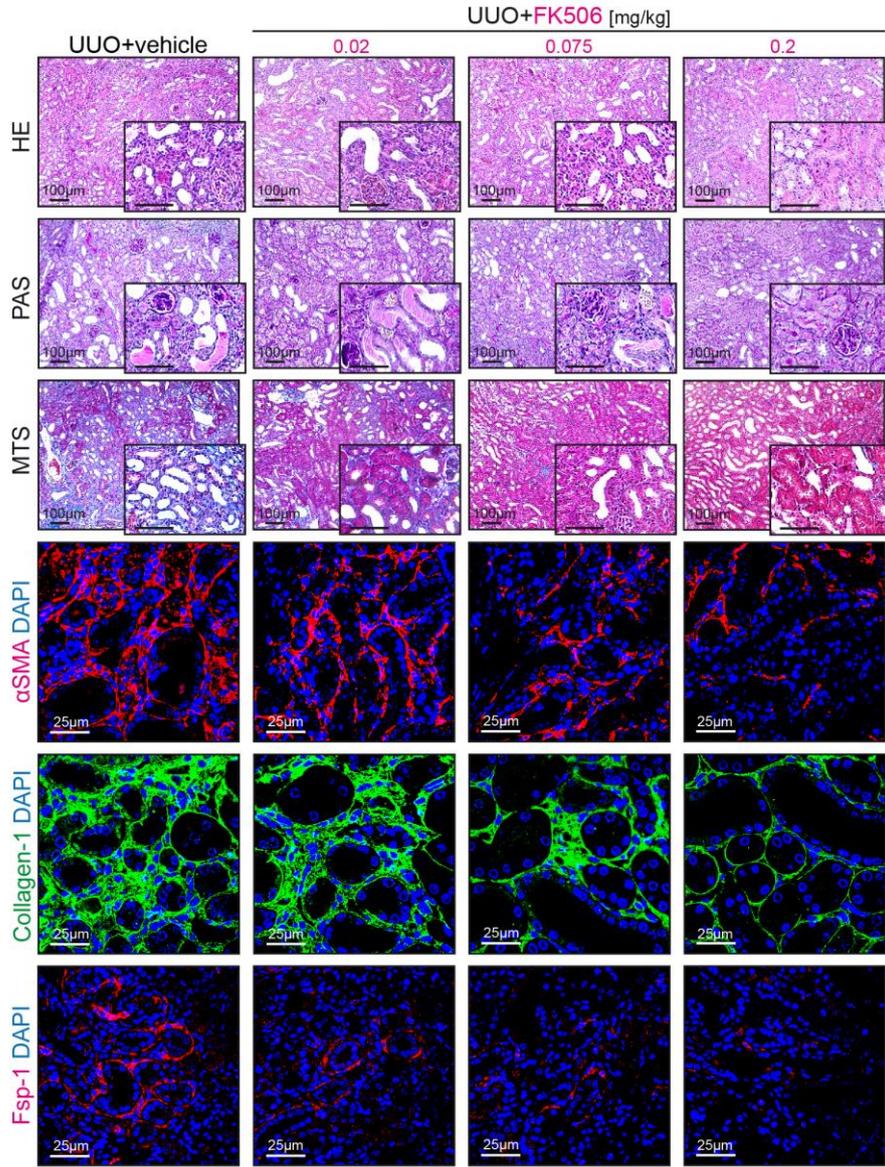
3.3 Milderung der experimentellen renalen Fibrogenese *in vivo* mittels FK506-assoziiierter Bmpr1a-Induktion

Inwiefern die FK506-assoziierte Bmpr1a-Induktion mit der Repression profibrotischer Stimuli korreliert, sollte im UUO-Mausmodell durch morphometrische Quantifizierung histologisch gefärbter Nierenpräparate sowie durch mRNA-Expressionsanalysen spezifischer mesenchymaler Markerproteine mithilfe der qRT-PCR validiert werden.

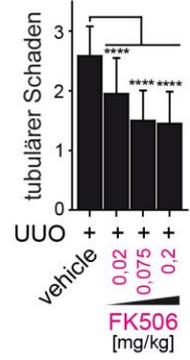
Nach zehntägiger unilateraler Ureterobstruktion stellten die in der PAS-Färbung als Ausdruck progredienter Nierenschädigung reproduzierbare tubuläre Dilatation ebenso wie die Formierung hyaliner Zylinder schwerwiegende Komplikationen dar. Demgegenüber zeigte das mit FK506 behandelte Kollektiv dosisabhängig eine substantielle Milderung derartiger pathohistologischer Phänomene. Entsprechend betrug der mittels MTS-Färbung quantifizierbare Fibrosierungsgrad in UUO-Nieren *vehicle*-behandelter Mäuse bis zu 17 %, konnte jedoch durch die Applikation steigender FK506-Konzentrationen signifikant supprimiert werden.

Weiterhin erfolgte der immunfluoreszenzoptische Nachweis des α SMA (*α -smooth muscle actin*), des Collagen-1 sowie des Fsp1 (*fibroblast-specific protein 1*), deren Synthese eng an die Akkumulation von (Myo-)Fibroblasten gekoppelt ist. Als Merkmal ihrer potenten Hochregulation nahm der quantifizierbare Anteil spezifisch fluoreszierender Areale des Interstitiums in ligierten Nieren der Kontrollgruppe signifikant zu, während im ipsilateralen Nierengewebe von Mäusen unter sukzessiv steigender FK506-Exposition eine Reduktion der mesenchymalen Markerproteine zu beobachten war.

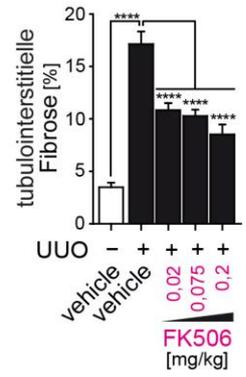
A



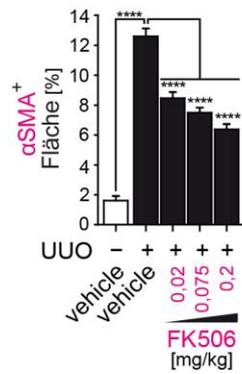
B



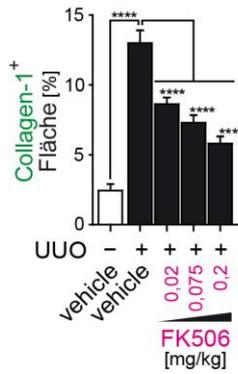
C



D



E



F

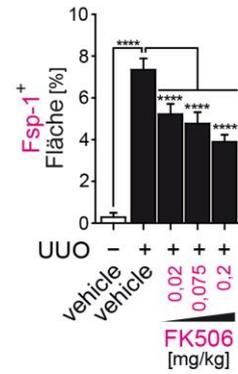


Abbildung 14: Milderung der experimentellen renalen Fibrogenese mittels FK506-assoziiertes Bmpr1a-Induktion im histopathologischen Korrelat der UUO-Niere

(A) Repräsentative Mikrophotographie von mittels Hämatoxylin-Eosin (HE), Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) und Masson-Trichrom (MTS) gefärbten Nierenpräparaten (Messbalken 100 µm) sowie von Gewebeschnitten nach Immunfluoreszenzmarkierung gegen αSMA, Collagen-1 und Fsp1 (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen fibrotische UUO-Nieren von *vehicle*- und FK506-behandelten Mäusen zehn Tage nach unilateraler Ureter-obstruktion. (B) Semiquantitative Graduierung tubulärer Schäden in PAS-gefärbten Nierengewebeschnitten (0 = normal, 1 = mild, 2 = moderat, 3 = schwerwiegend, Bewertung erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n = 6 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur UUO-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse). (C) Morphometrische Quantifizierung der interstitiellen Fibrose in MTS-gefärbten Nierengewebeschnitten (Bildanalytische Messung erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 200x Vergrößerung, n = 6 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere bzw. zur UUO-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse). (D-F) Morphometrische Quantifizierung der αSMA- (D), Collagen-1- (E) und Fsp1-Expression (F) zur Validierung der Fibroblasten-Akkumulation in fluoreszenzmarkierten Nierengewebeschnitten (Bildanalytische Messung erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n = 6 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere bzw. zur UUO-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse).

Die aufgezeigten Tendenzen ließen sich in daraufhin erfolgten Analysen der *Acta2* (αSMA)-, *Collagen-1a1*- sowie der *Fsp1*-Expression mittels qRT-PCR verifizieren.

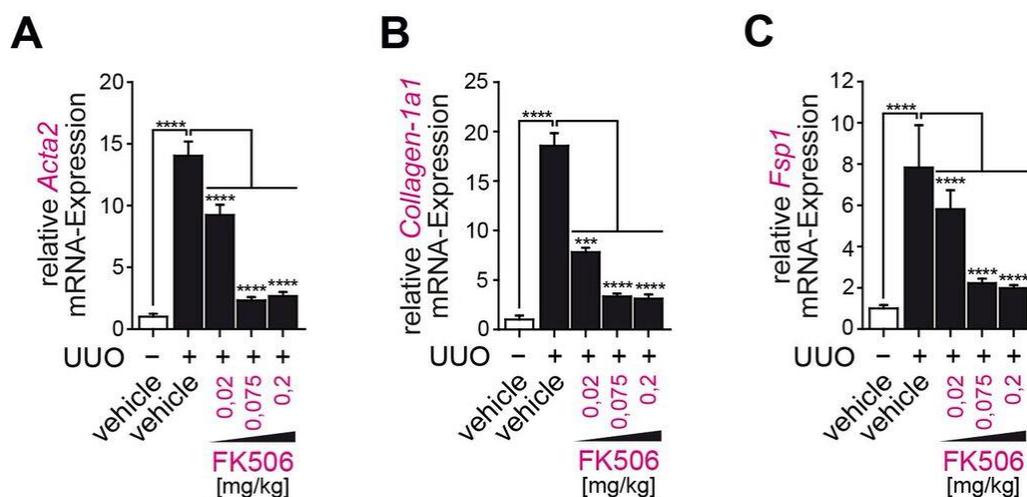


Abbildung 15: Milderung der experimentellen renalen Fibrogenese *in vivo* durch FK506-assoziierte *Bmpr1a*-Induktion auf Transkriptionsebene

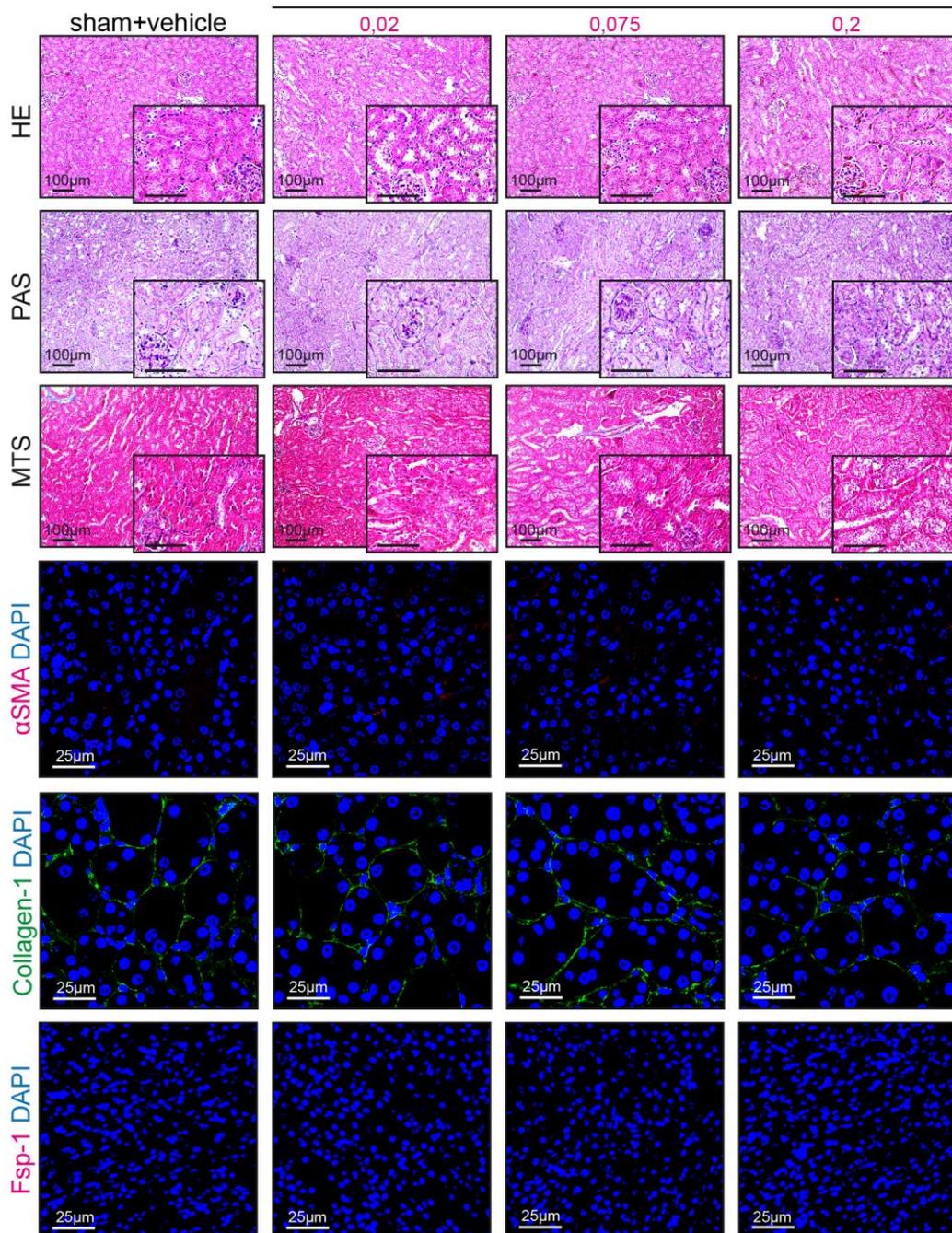
(A-C) Analyse der *Acta2*- (A), *Collagen-1a1*- (B), und *Fsp1*-Expression (C) mittels qRT-PCR nach RNA-Isolation aus murinen Nierenbiopsaten nach zehntägiger UUO (Messung der Proben als Triplikate, n = 4 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, *** p<0,001, **** p<0,0001; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere bzw. zur UUO-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse).

3.3.1 Effekt der FK506-Exposition auf die Histologie scheinoperierter Nieren

Nachfolgend sollte der Einfluss von FK506 auf die sensible Architektur des gesunden Nierenparenchyms nachvollzogen werden. In hierzu herangezogenen Gewebeschnittpräparaten von nicht-ligierten Nieren *vehicle*- und FK506-behandelter Mäuse konnte nach PAS-Färbung zunächst ein unter Pharmakonapplikation induzierter Tubulusepithelschaden ausgeschlossen werden. Weiterhin ergaben weder die morphometrische Quantifizierung der tubulointerstitiellen Fibrosierung in MTS-gefärbtem Gewebe noch die mittels Immunfluoreszenzmarkierung visualisierte α SMA⁺-, Collagen-1⁺- und Fsp⁺-Fläche signifikante Unterschiede zwischen *sham*-Nieren der einzelnen Kollektive.

A

sham+FK506 [mg/kg]



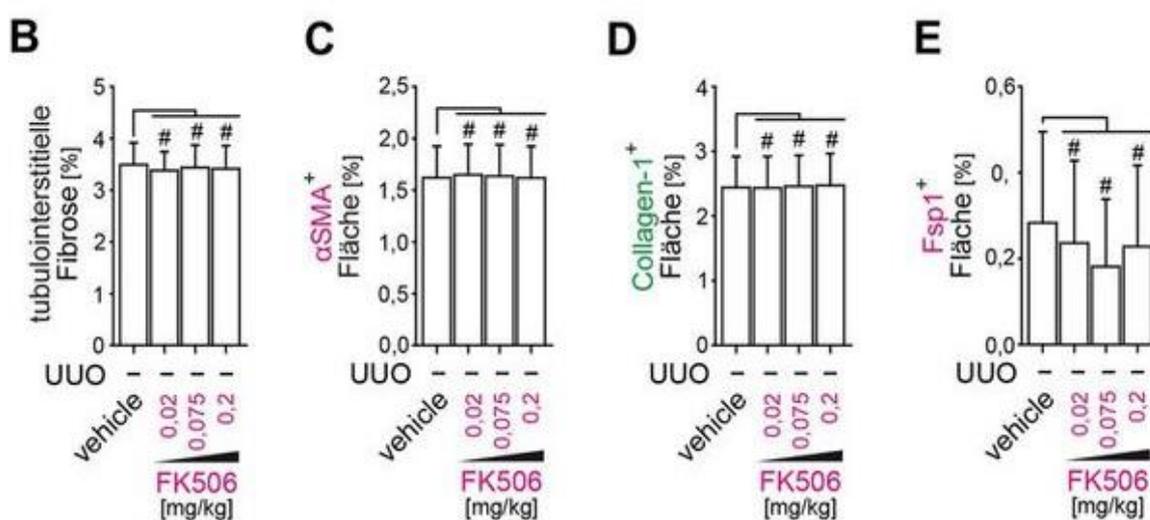


Abbildung 16: FK506-Exposition ohne Effekt auf die Histologie scheinoperierter Nieren

(A) Repräsentative Mikrophotographie von HE-, PAS- und MTS-gefärbten Nierenpräparaten (Messbalken 100 µm) sowie von fluoreszenzmarkierten Gewebeschnitten gegen αSMA, Collagen-1 und Fsp1 (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen *sham*-operierte Nieren von *vehicle*- und FK506-behandelten Mäusen. (B) Morphometrische Quantifizierung der interstitiellen Fibrose in MTS-gefärbten Nierengewebeschnitten (Bildanalytische Messung erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 200x Vergrößerung, n = 6 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse). (C-E) Morphometrische Quantifizierung der αSMA- (C), Collagen-1- (D) und Fsp1-Expression (E) zur Validierung der Fibroblasten-Akkumulation in fluoreszenzmarkierten Nierengewebeschnitten (Bildanalytische Messung erfolgte in je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n = 6 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse).

3.4 Pikomolarer FK506-Vollblutspiegel in FK506-supplementierten UUU-Mäusen

Unter Anwendung eines kommerziellen kompetitiven Enzym-gekoppelten Immunadsorptionstests (cELISA) erfolgte die Bestimmung des FK506-Spiegels im Vollblut der mit unterschiedlichen Dosen FK506 behandelten Mauskollektive. Die messbaren Konzentrationen lagen im pikomolaren Bereich zwischen 0,4 ng/ml in der niedrigsten Applikationsdosis (0,02 mg/kg KG/Tag) bzw. 0,6 ng/ml in den beiden höher supplementierten Untersuchungsgruppen (0,075 und 0,02 mg/kg KG/Tag).

In Relation zu dem bei einer immunsuppressiven FK506-Langzeittherapie angestrebten C₀-Zielspiegel (5 bis 10 ng/ml) manifestiert sich somit eine rund 10- bis 20-fach geringere murine Blutkonzentration des Markolid-Lactons (Wallemacq et al. 2009).

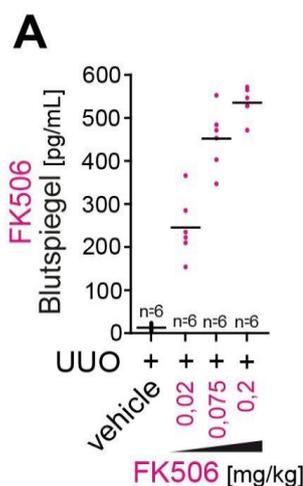


Abbildung 17: Pikomolarer FK506-Vollblutspiegel in FK506-supplementierten Versuchstieren

(A) Bestimmung der FK506-Konzentration mittels cELISA in Vollblutproben der UUU-Mäuse, die einen Tag präoperativ bis zehn Tage nach UUU mit einem *vehicle* oder FK506 in den Dosen 0,02, 0,075, 0,2 mg/kg KG/Tag behandelt wurden (Messung der Proben als Triplikate, n = 6 in jeder Gruppe, Daten als alignierte Dotplots mit Mittelwert dargestellt).

3.5 FK506-vermittelte BMPR1A-Induktion *in vitro* durch De-novo-Translation unbekannter Transkriptionsfaktoren

Die sowohl *in vitro* im humanen Tubulusepithel wie auch *in vivo* im Mausmodell der unilateralen Ureterobstruktion quantifizierbare signifikante Induktion der BMPR1A-Expression durch FK506 stellt die Frage nach möglichen, zugrundeliegenden molekularen Aktivierungsmechanismen. Für eine weiterführende Spezifizierung erfolgte in tubuloepithelialen HK-2-Zellen die kontrollierte Translationshemmung durch Präinkubation mit der antibiotischen Substanz Cycloheximid. Entsprechende Expressionsanalysen auf das Zielgen BMPR1A wurden nach erneuter sechsständiger FK506-Stimulation (0,15 ng/ml bzw. 150 ng/ml) zunächst mittels qRT-PCR sowie anschließend im Rahmen des Western Blot-Verfahrens vollzogen.

Dabei führte die Applikation von unterschiedlich hochkonzentriertem Cycloheximid (2,5, 5, 10 µg/ml) in mit DMSO bzw. mit geringsten Stoffmengen FK506 (0,15 ng/ml) stimulierten HK-2-Zellen zu keinen statistisch relevanten Unterschieden hinsichtlich der relativen Rezeptorexpression, wohingegen höhere Dosen FK506 (150 ng/ml) trotz Präinkubation von niedrigkonzentriertem Cycloheximid (2,5 bzw. 5 µg/ml) eine signifikante Hochregulation des *BMPR1A* bewirkten. Dieser Effekt konnte allerdings durch die Gabe von 10 µg/ml des Translationsinhibitors unterbunden werden.

Die daraufhin erfolgte Western Blot-Analyse ergab unabhängig von der jeweils applizierten Dosis Cycloheximid die Blockade einer FK506-spezifischen Rezeptorinduktion, die jedoch durch alleinige Stimulation des Immunsuppressivums vollständig aufgehoben wurde.

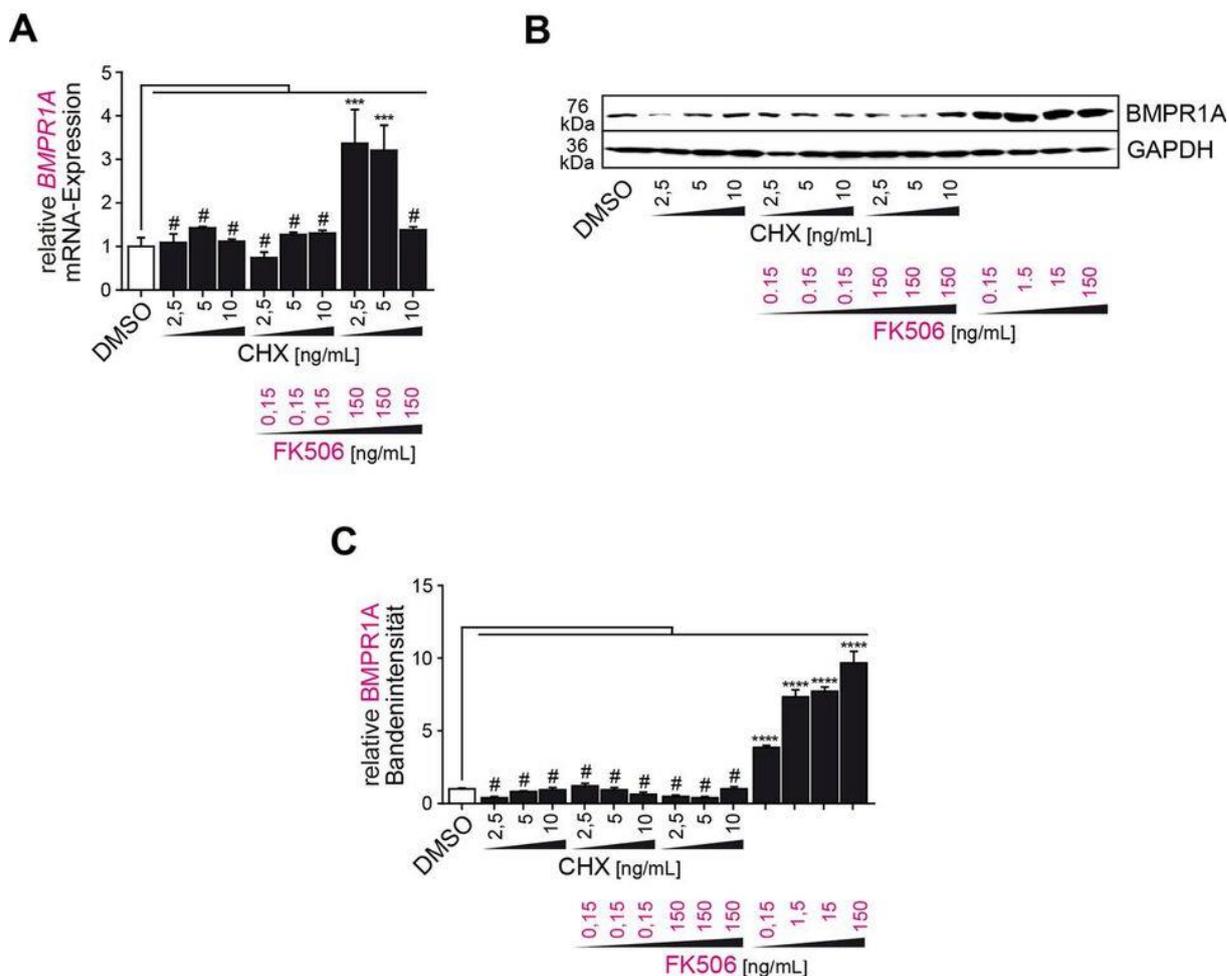


Abbildung 18: FK506-vermittelte BMPR1A-Induktion *in vitro* basiert auf der De-novo-Translation unbekannter Transkriptionsfaktoren

(A) Analyse der *BMPR1A*-Expression mittels qRT-PCR in humanen Tubulusepithelzellen (HK-2) nach Präinkubation (1 h) des Translationsinhibitors Cycloheximid sowie darauffolgender FK506-Stimulation über 6 h (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, *** $p < 0,001$, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten Zellen). (B) Western Blot auf BMPR1A unter Anwendung des in (A) erläuterten Stimulationsschemas. (C) Densitometrische Auswertung der relativen BMPR1A-Expression. Für statistische Analysen erfolgte eine optometrische Dichtemessung an drei prominenten Einzelbanden sowie die Normalisierung des für das Zielprotein BMPR1A quantifizierten Wertes gegen das detektierte Signal des Haushaltgens GAPDH (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten Zellen).

Den In-vitro-Ergebnissen zufolge wird die FK506-assoziierte BMPR1A-Induktion somit nicht durch eine direkte Induktion des *BMPR1A*-Promotors vermittelt. Hingegen lässt sich auf eine FK506-abhängige De-novo-Translation eines bislang unbekanntem Transkriptionsfaktors schließen, der wiederum die Transkription des BMP-Typ I-Rezeptors durch Bindung entsprechender Sequenzmotive in der Promotorregion initiiert.

3.6 Detektion FK506-induzierter Transkriptionsfaktoren *in vitro* mittels RT² Profiler™ PCR-Arrays

Ferner sollte unter Anwendung des kommerziell erhältlichen RT² Profiler™ PCR-Arrays die Expression 84 verschiedener Transkriptionsfaktoren in DMSO- und FK506-behandelten humanen HK-2-Zellen quantifiziert und über den unmittelbaren Vergleich ihrer Expressionsprofile ein putativer Transkriptionsfaktor im postulierten Modell des indirekten Induktionsmechanismus identifiziert werden.

Daneben führte die Supplementation von FK506 zu einer mindestens zweifachen Induktion diverser Transkriptionsfaktoren, unter denen der bioinformatische Sequenzabgleich auf Basis der internetgestützten Datenbanken TFSEARCH version 1.3 (Heinemeyer et al. 1998) und Ensembl (Flicek et al. 2014) die folgenden sechs potentiellen Kandidatengene mit putativen Bindungsmotiven in der Promotorregion des humanen *BMPR1A*-Gens identifizierte: *CAMP responsive element binding protein 1 (CREB1)*, *GATA binding protein 3 (GATA3)*, *androgen receptor (AR)*, *CCAAT/enhancer binding protein beta (CEBPB)*, *MYC associated factor X (MAX)* und *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT)*.

Diese sowie die übrigen infolge der FK506-Stimulation differentiell exprimierten Transkriptionsfaktoren sind der Heatmap (siehe Abbildung 19 (A)) zu entnehmen.

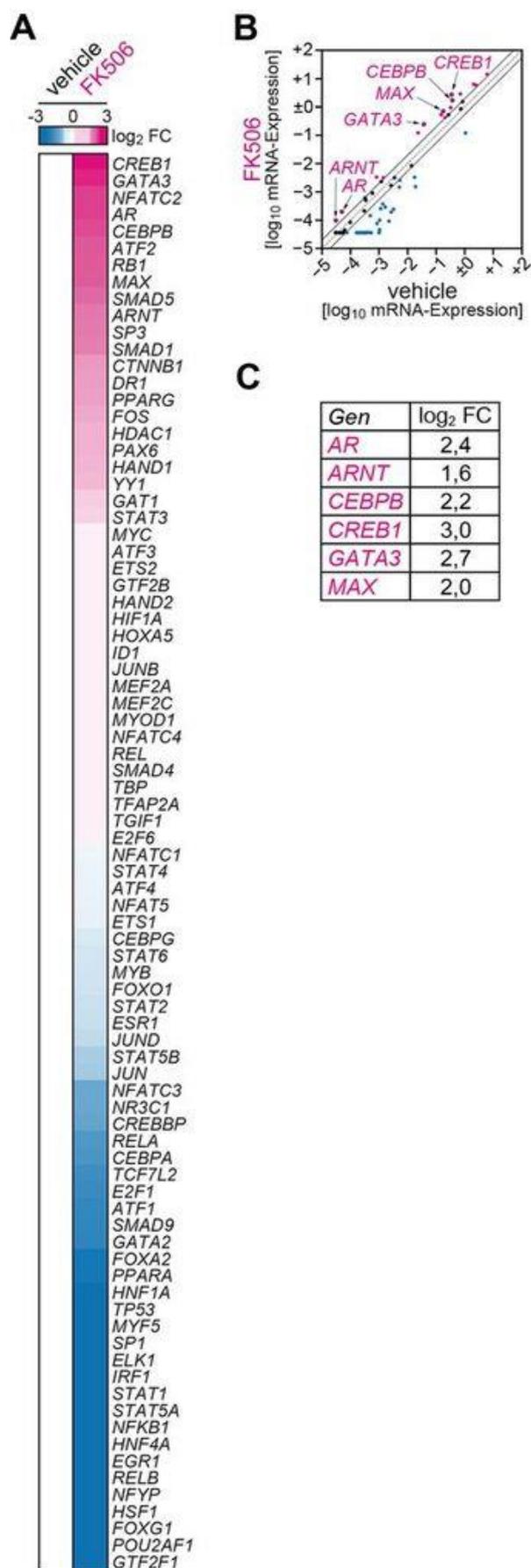


Abbildung 19: Detektion FK506-induzierter Transkriptionsfaktoren *in vitro* mittels RT² Profiler™ PCR-Arrays

(A) Heatmap zeigt vermehrt bzw. reduziert exprimierte humane Transkriptionsfaktoren in tubuloepithelialen HK-2-Zellen nach sechsständiger FK506-Stimulation gegenüber den mit DMSO behandelten Zellen. Eine Normalisierung erfolgte über das quantifizierte Expressionsniveau verschiedener Haushaltsgene (\log_2 FC).

(B,C) FK506-induzierte Faktoren mit putativen Bindungsdomänen *upstream* der TSS des humanen *BMPR1A*-Gens. FC, fold change.

3.7 Validierung der ermittelten Transkriptionsfaktoren *in vivo*

Die Expression der sechs Kandidatengene mit Bindungsdomänen im humanen *BMPR1A*-Gen zur putativen Aktivierung seines Promotors wurde zunächst *in vivo* in ureterligierten Nieren FK506-supplementierter Mäuse mittels qRT-PCR validiert.

Insgesamt ergaben die mRNA-Analysen in präparierten Nieren sämtlicher Kollektive eine effiziente Induktion aller zu untersuchender Transkriptionsfaktoren in Relation zur kontralateralen *sham*-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse. Eine im Zusammenhang mit der FK506-Applikation stehende signifikant erhöhte Expression konnte in fibrotischen UO-Nieren nur für die Kandidatengene *Max* und *Arnt* eruiert werden, wobei die proportional zur applizierten Menge FK506 verlaufende Hochregulation des Transkriptionsfaktors *Arnt* einen dosisabhängigen Effekt mutmaßen lässt.

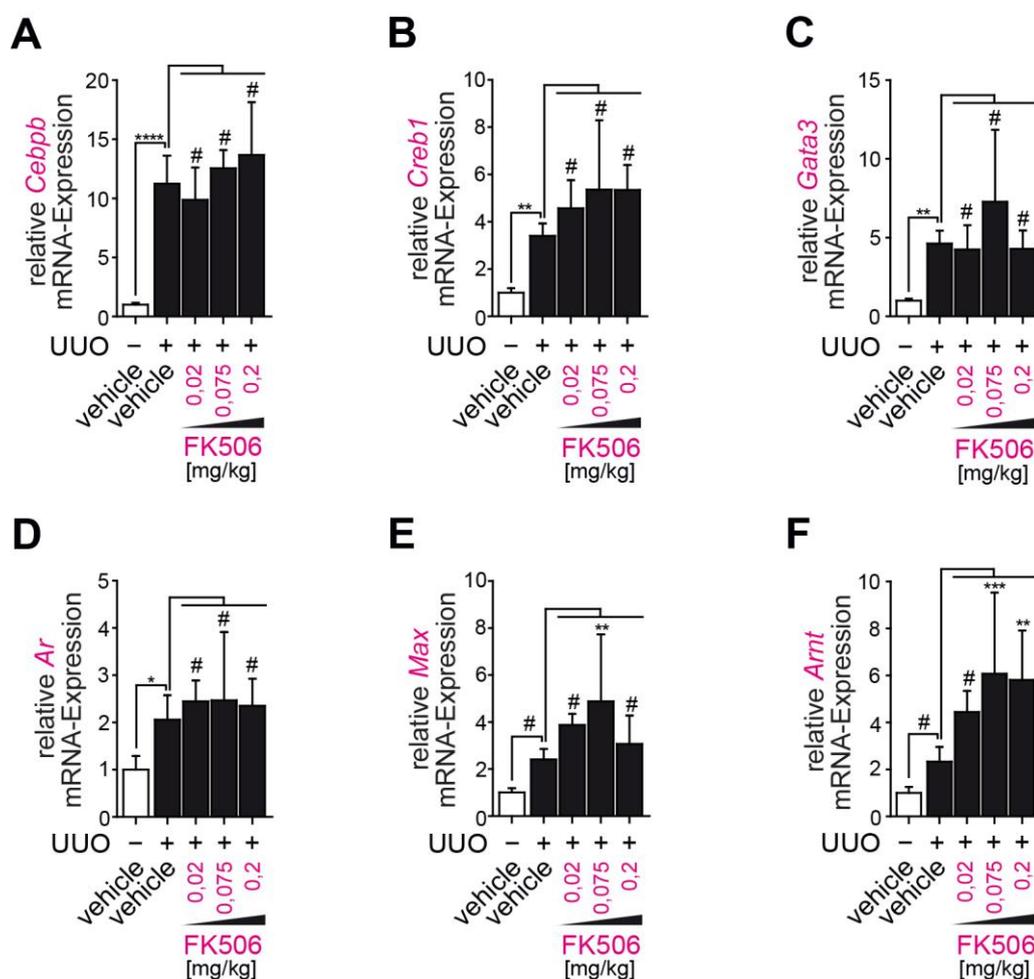


Abbildung 20: FK506-modulierte Induktion der Kandidatengene *Max* und *Arnt* in UO-Nieren

(A-F) mRNA-Expressionsanalysen der Kandidatengene mittels qRT-PCR nach RNA-Isolation aus murinen Nierenlysaten nach zehntägiger UO (Messung der Proben als Triplikate, n = 4 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse).

3.8 Induktion des *Bmpr1a* und der pSmad1/5/8-Proteine unter FK506-Exposition in MCT-Zellen

Das postulierte Modell der FK506-abhängigen BMPR1A-Induktion impliziert einen indirekten Aktivierungsprozess, in dessen Verlauf ein durch FK506 regulierter putativer Transkriptionsfaktor mit Bindungsmotiv in der *BMPR1A*-Promotorregion involviert ist. Die Funktionalität eines derartigen Prozesses sollte im Weiteren in der murinen proximalen tubuloepithelialen Zelllinie MCT näher charakterisiert werden. Zur Verifizierung geeigneter Medikamentendosen und Zeitpunkte erfolgten zunächst *Bmpr1a*-Expressionsanalysen mittels qRT-PCR bzw. der Western Blot-Methodik. Eine signifikante Induktion des Rezeptors in MCT-Zellen ließ sich auf mRNA-Ebene bereits nach dreistündiger, auf Proteinebene hingegen nach sechstündiger Inkubation mit FK506 eruieren. Charakteristikum einer funktionellen BMP-Rezeptoraktivierung stellt die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Smad1/5/8-Proteine zu pSmad1/5/8 als Teil der intrinsischen Signalkaskade und Grundlage der anschließenden Genregulation dar. Dementsprechend wurde anschließend das Expressionsniveau phosphorylierter Smad1/5/8-Proteine quantifiziert, deren Expression nach FK506-Inkubation signifikant hochreguliert wurde. Eine Dosisabhängigkeit ließ sich hingegen weder im Falle von *Bmpr1a* noch für die regulatorischen pSmad-Proteine bestätigen.

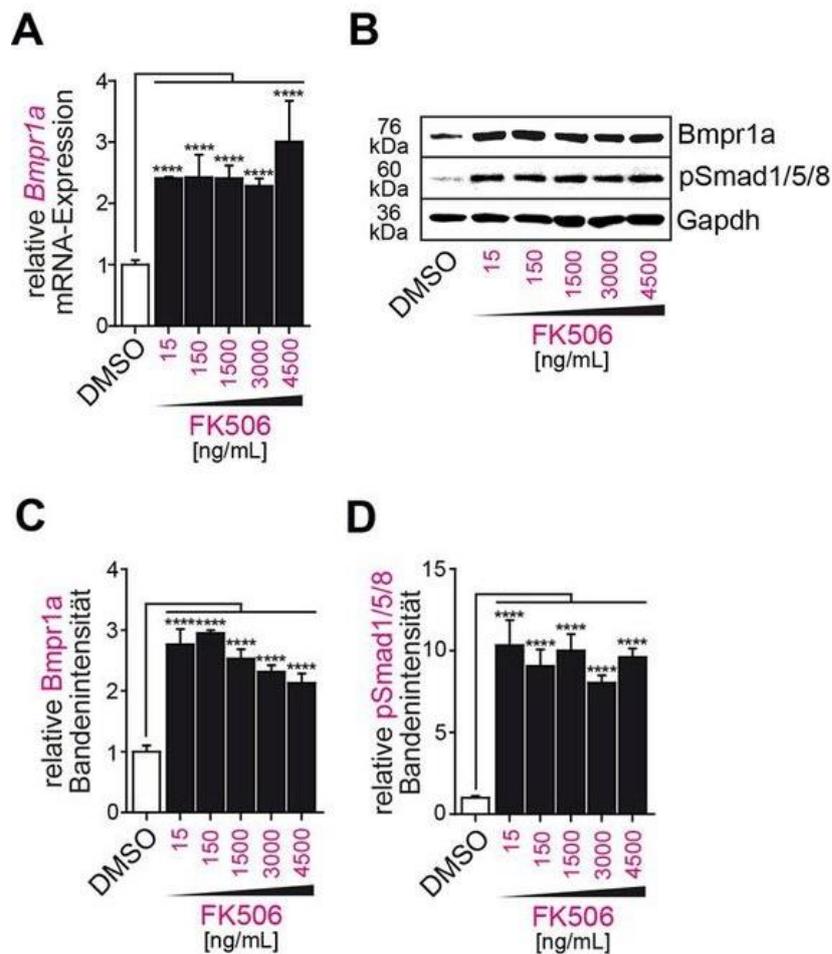


Abbildung 21: Induktion des Bmpr1a und der pSmad1/5/8-Proteine in FK506-supplementierten MCT-Zellen

(A) Analyse der *Bmpr1a*-Expression mittels qRT-PCR in murinen Tubulusepithelzellen (MCT) nach dreistündiger DMSO- bzw. FK506-Stimulation (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten Zellen). (B) Western Blot zeigt die Expression des Bmpr1a bzw. der phosphorylierten Proteine pSmad1/5/8 nach sechsständiger DMSO- bzw. FK506-Inkubation in bezeichneten Dosen in MCT-Zellen. (C+D) Densitometrische Auswertung der relativen Bmpr1a-Expression. (C) bzw. der Proteine pSmad1/5/8 (D). Für statistische Analysen erfolgte eine optometrische Dichtemessung an drei prominenten Einzelbanden sowie die Normalisierung der für die Zielproteine Bmpr1a bzw. pSmad1/5/8 quantifizierten Werte gegen das detektierte Signal des Haushaltsgens *Gapdh* (Messung in Triplikaten, Mittelwert, Standardabweichung, **** $p < 0,0001$; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten Zellen).

3.9 Validierung der ermittelten Transkriptionsfaktoren *in vitro*

Zunächst wurde das Expressionsmuster der durch den RT² Profiler™ PCR-Array identifizierten Kandidatengene nach dreistündiger FK506-Inkubation in murinen proximalen Tubulusepithelzellen (MCT) mittels qRT-PCR analysiert. Lediglich *Ar* (*androgen receptor*) wurde infolge der Stimulation mit FK506 nicht explizit induziert. Bei den übrigen potentiellen Transkriptionsfaktoren (*Cebpb*, *Creb1*, *Gata3*, *Max*, *Arnt*) manifestierte sich hingegen eine signifikante Hochregulation unter FK506-Exposition, die insbesondere für die Gene *Max* und *Arnt* einen dosisabhängigen Effekt implizierte.

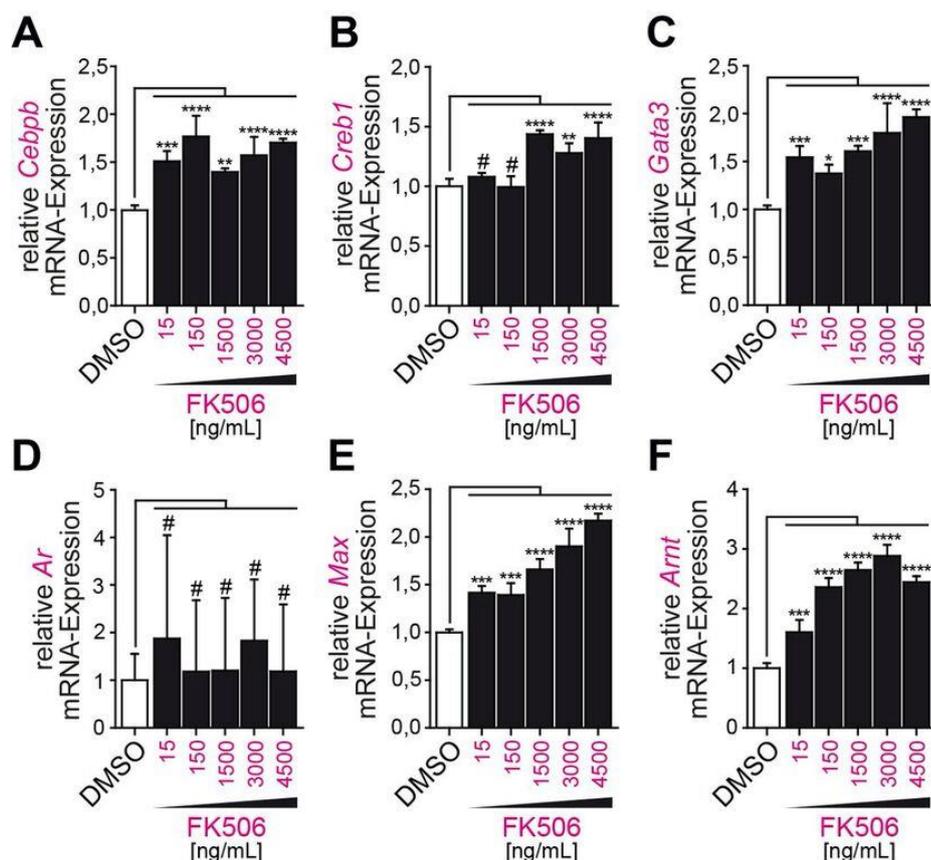


Abbildung 22: FK506-modulierte Induktion der putativen Transkriptionsfaktoren *in vitro*

(A-F) Mittels qRT-PCR analysierte mRNA-Expression der putativen Transkriptionsfaktoren *Cebpb* (A), *Creb1* (B), *Gata3* (C), *Ar* (D), *Max* (E) und *Arnt* (F) in murinen Tubulusepithelzellen (MCT) nach dreistündiger DMSO- bzw. FK506-Inkubation (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorier ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten Zellen).

3.10 Spezifisches Gene Silencing der putativen Transkriptionsfaktoren *in vitro*

3.10.1 Effizienz des Gene Silencings in MCT-Zellen

Der Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi) erlaubt über die Inkorporation kurzer doppelsträngiger siRNA in die eukaryotische Zelle die zielgerichtete posttranskriptionelle Stummschaltung (engl. *gene silencing*) sequenzkomplementärer mRNA und somit die Funktion, ihrer kodierenden Proteine im Organismus zu definieren. Unter Ausnutzung dieses Prinzips sollte im Folgenden die selektive Inhibition der sechs Kandidatengene (*Cebpb*, *Creb1*, *Gata3*, *Ar*, *Max*, *Arnt*) in MCT-Zellen forciert und anschließend die FK506-abhängige *Bmpr1a*-Expression zur Etablierung eines oder mehrerer involvierter Transkriptionsfaktoren eruiert werden.

Hierzu erfolgte nach Einschleusung der interferierenden RNA-Sequenzen in die murinen Tubulusepithelzellen sowie der dreistündigen DMSO- bzw. FK506 (150, 1500 ng/ml)-Stimulation zunächst die Effizienzprüfung des spezifischen Gene Silencings mittels qRT-PCR. Als Kontrolle dienten in allen folgenden RNAi-Experimenten MCT-Zellen, die mit *scrambled siRNA* (scrRNA) transfiziert und in DMSO inkubiert worden waren.

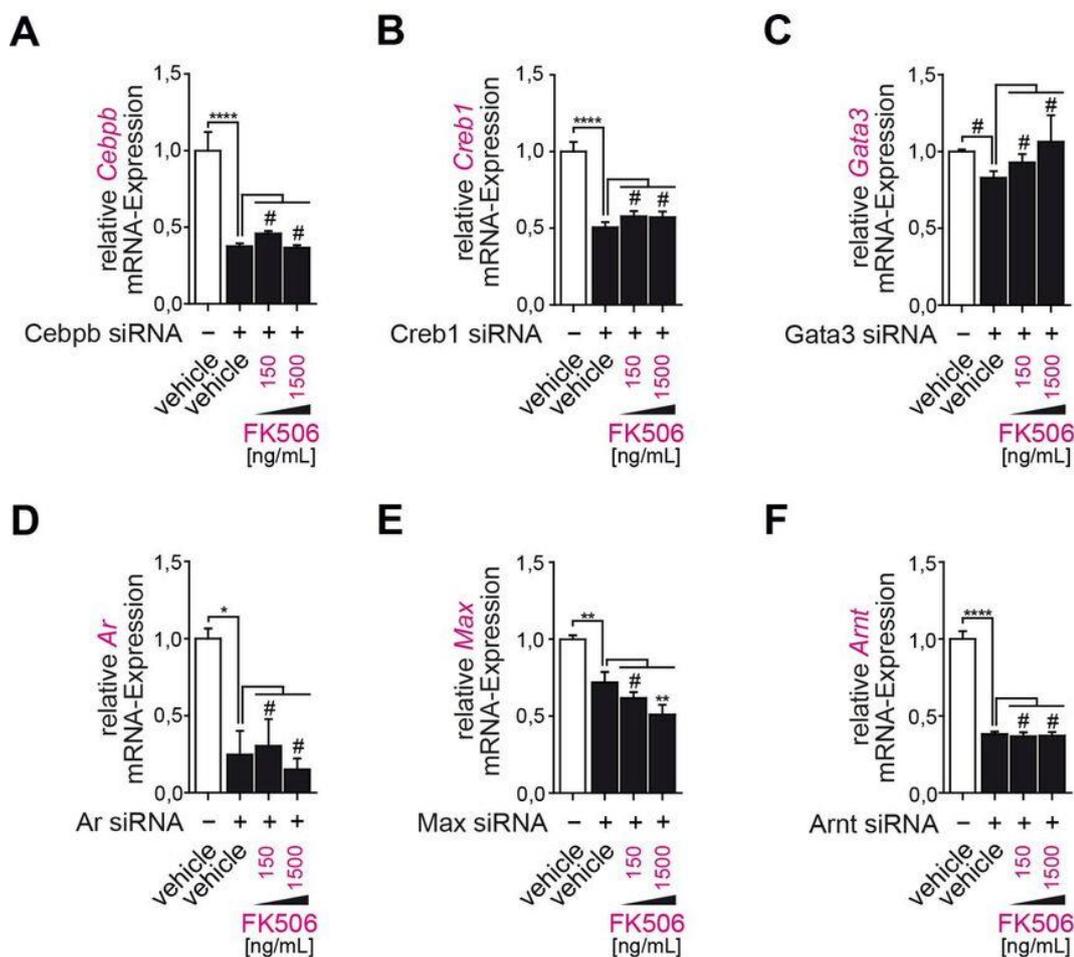


Abbildung 23: Effizienz des Gene Silencings *in vitro*

(A-F) Effizienzanalyse mittels qRT-PCR in murinen Tubulusepithelzellen (MCT) nach Transfektion mit unfunktionaler scrRNA und siRNA zur Inaktivierung der Gene *Cebpb* (A), *Creb1* (B), *Gata3* (C), *Ar* (D), *Max* (E) und *Arnt* (F). Der Graph zeigt die mRNA-Expression nach DMSO- bzw. FK506-Inkubation über drei Stunden (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten Zellen).

3.10.2 Expression des *Bmpr1a* unter FK506-Exposition nach Gene Silencing in MCT-Zellen

Nach Validierung des RNAi-vermittelten Gene Silencings sollte im Folgenden die Expression von *Bmpr1a* in siRNA-transfizierten und FK506-stimulierten MCT-Zellen durch das Western Blot-Verfahren quantifiziert werden.

Nach sechsständiger FK506-Inkubation (1500 ng/ml) zeigten die tubuloepithelialen Zellen trotz transients RNAi-basierender Stummschaltung je eines der zuvor identifizierten Kandidatengene eine signifikante Induktion der relativen Rezeptorexpression, die vergleichbar mit dem quantifizierbaren Niveau von parallel scrRNA-transfizierter und FK506-supplementierter Zellen war.

Demgegenüber führte das selektive siRNA-vermittelte Arnt-Silencing zu einer geringfügig signifikanten Suppression der Bmpr1a-Expression und kann als Indiz seiner rezeptorregulatorischen Funktionalität aufgefasst werden.

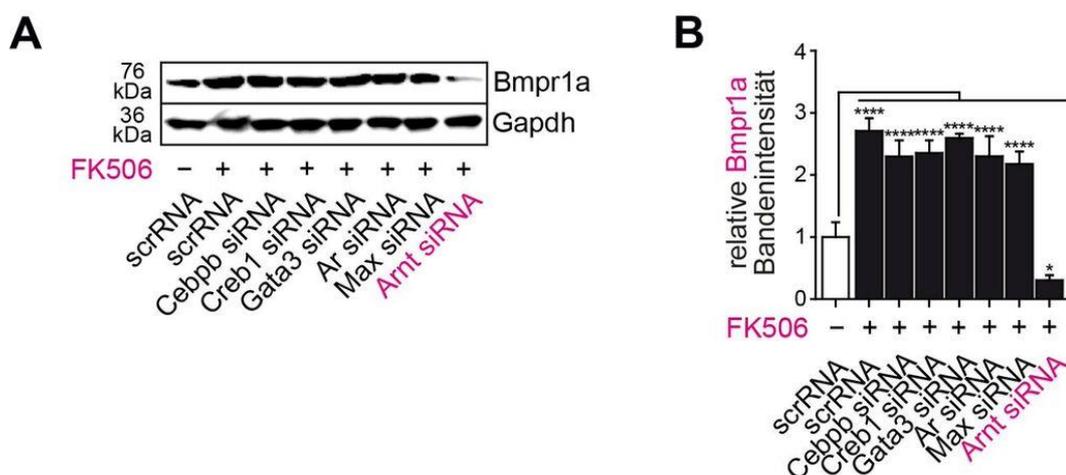


Abbildung 24: siRNA-vermitteltes Arnt-Silencing evoziert *in vitro* die Suppression der Bmpr1a-Expression nach initialer FK506-Stimulation

(A) Western Blot präsentiert die Expression von Bmpr1a im transienten siRNA-basierenden Knockdown-System nach sechsständiger DMSO- bzw. FK506-Inkubation in MCT-Zellen. (B) Densitometrische Auswertung der relativen Bmpr1a-Expression. Für statistische Analysen erfolgte eine optometrische Dichtemessung an drei prominenten Einzelbanden sowie die Normalisierung des für das Zielprotein Bmpr1a quantifizierten Wertes gegen das detektierte Signal des Haushaltsgens Gapdh (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorier ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten Zellen).

3.11 Validierung des Transkriptionsfaktors Arnt *in vitro* und *in vivo*

3.11.1 Vermehrte Expression von Arnt nach FK506-Stimulation in MCT-Zellen

Um die funktionale Relevanz des Transkriptionsfaktors Arnt als mutmaßlichen Initiator der indirekten FK506-abhängigen BMPR1A-Induktion etablieren zu können, wurde seine Proteinexpression zunächst *in vitro* im murinen Tubulusepithel (MCT) sowie anschließend *in vivo* im UUO-Mausmodell der experimentellen Nierenfibrose verifiziert und mittels Densitometrie quantifiziert. In diesem Zusammenhang ließ sich nach sechsständiger FK506-Stimulation in MCT-Zellen eine effiziente konzentrationsabhängige Arnt-Induktion gegenüber dem mit DMSO behandelten Tubulusepithel dokumentieren.

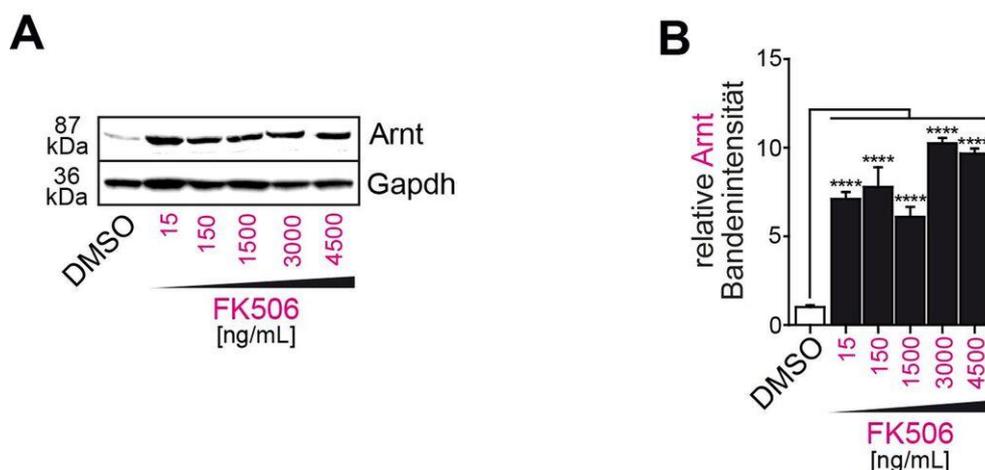


Abbildung 25: Vermehrte Arnt-Expression unter FK506-Exposition *in vitro* und *in vivo* im UUO-Modell

(A) Western Blot zeigt die Expression von Arnt nach sechsstündiger DMSO- und FK506-Inkubation in MCT-Zellen. (B) Densitometrische Auswertung der relativen Arnt-Expression. Für statistische Analysen erfolgte eine optometrische Dichtemessung an drei prominenten Einzelbanden sowie die Normalisierung des für das Zielprotein Arnt quantifizierten Wertes gegen das detektierte Signal des Haushaltsgens Gapdh (Messung der Proben als Triplikate, Mittelwert, Standardabweichung, **** $p < 0,0001$; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zu DMSO-behandelten Zellen).

3.11.2 Vermehrte Expression von Arnt nach FK506-Applikation in UUO-Nieren

Die nach zehntägiger chronischer Harnstauung durchgeführten densitometrischen sowie morphometrischen Expressionsanalysen im fibrotischen Nierenparenchym verdeutlichten in sämtlichen Kollektiven die signifikante Hochregulation des Transkriptionsfaktors Arnt in Relation zur normierten kontralateralen *sham*-Niere. In Abhängigkeit vom gewählten Analyseverfahren zeigte sich in UUO-Nieren der FK506-supplementierten Mäuse nach der Applikation niedrigster Dosen (0,02 mg/kg KG/Tag) eine geringfügige bis deutliche Hochregulation des zu untersuchenden Proteins, wobei sich dieser stimulierende Effekt durch kontinuierliche Dosissteigerung des Pharmakons potenzierte und in höchster Konzentration (0,2 mg/kg KG/Tag) seine größte Wirksamkeit erzielte.

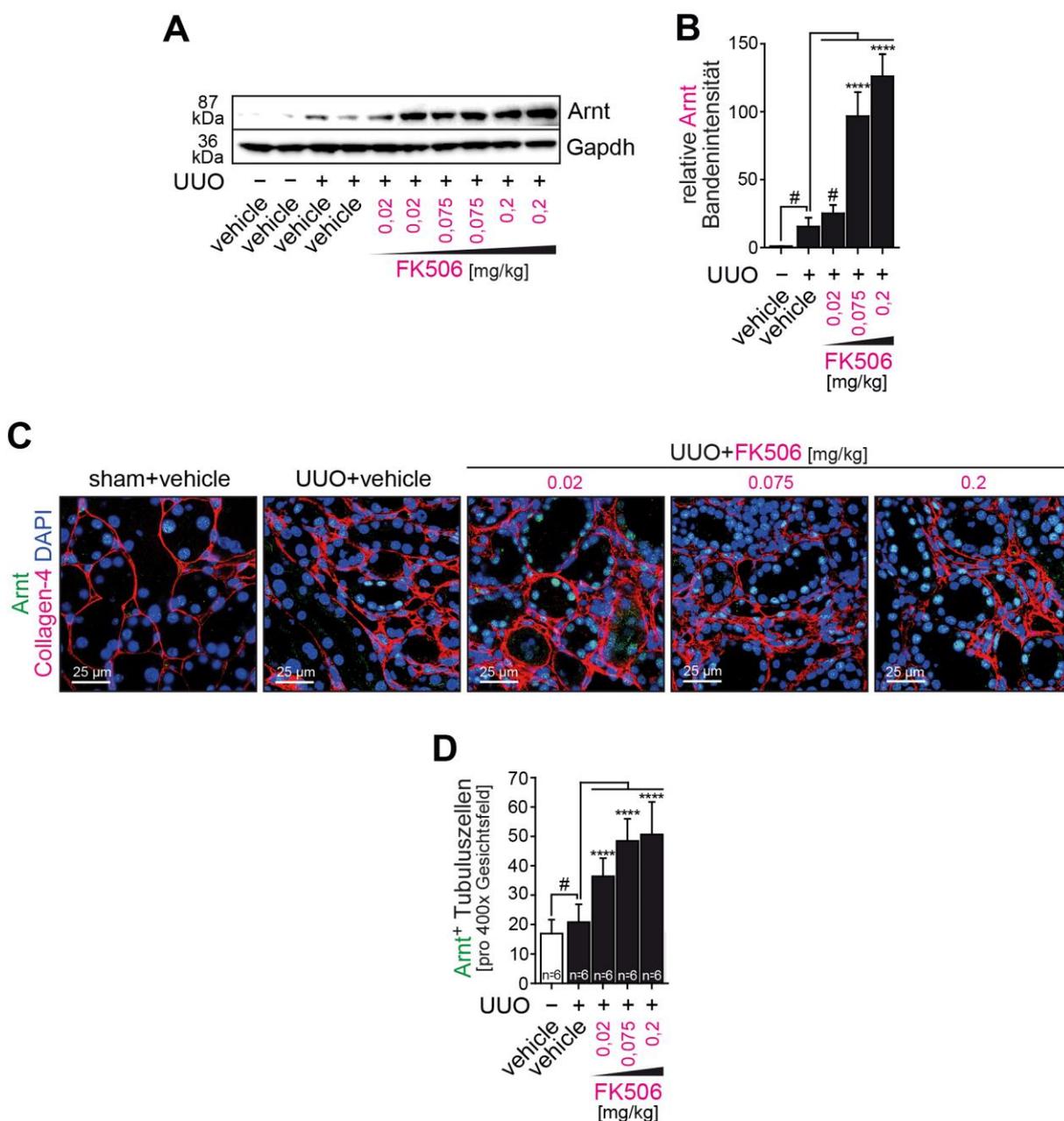


Abbildung 26: Vermehrte Arnt-Expression unter FK506-Exposition *in vivo* im UUO-Modell

(A) Western Blot präsentiert die Induktion von Arnt nach *vehicle*- bzw. FK506-Applikation in *sham*-Nieren und in fibrotischen UUO-Nieren *vehicle*- bzw. FK506-behandelter Mäuse. (B) Densitometrische Analyse des Western Blots auf Arnt. Für statistische Analysen wurde der für das Zielgen quantifizierte Wert gegen das detektierte Signal des Haushaltgens Gapdh normalisiert und aus den beiden pro Gruppe generierten Werten ein Mittelwert berechnet (Messung der Proben als Triplikate, n = 2 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, **** p<0,0001, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse). (C) Repräsentative Mikrophotographie von Gewebeschnitten nach Immunfluoreszenzmarkierung gegen Arnt (Messbalken 25 µm). Die Bildausschnitte zeigen *sham*-operierte Nieren von *vehicle*-behandelten Mäusen und fibrotische UUO-Nieren von *vehicle*- und FK506-behandelten Mäusen zehn Tage nach unilateraler Ureterobstruktion. (D) Morphometrische Quantifizierung der Arnt-Expression in fluoreszenzmarkierten Nierengewebeschnitten (Bildanalytische Messung erfolgte in

je zehn Gesichtsfeldern pro Niere bei 400x Vergrößerung, n = 6 in jeder Gruppe, Mittelwert, Standardabweichung, **** p<0,0001, # nicht signifikant; Kalkulation der p-Werte mittels einfaktorieller ANOVA mit Bonferroni-Post-Hoc-Analyse in Relation zur *sham*-Niere *vehicle*-behandelter Mäuse).

3.12 Validierung der FK506-vermittelten ARNT-, BMRR1A- und pSMAD1/5/8-Induktion in humanen Transplantatnieren

Ferner wurden in Transplantatnieren von Patienten unterschiedlicher immunsuppressiver Therapieregime (MMF+Cortison, CsA, Cortison, FK506) die Expression von ARNT und BMPR1A sowie die nachfolgend induzierte Phosphorylierung der SMAD-Proteine SMAD1/5/8 als Charakteristikum einer funktionalen Rezeptoraktivität morphometrisch validiert. Um eine gemeinsame Vergleichsbasis des inhomogenen humanen Untersuchungsguts zu erzielen, erfolgte in entsprechenden MTS-gefärbten Gewebeschnitten zunächst die quantitative Flächenanteilbestimmung der interstitiellen Fibrose. Anschließend wurden komparative Analysen in immunhistochemisch gegen ARNT, BMPR1A und pSMAD markierten Nierenpräparaten mit äquivalenten Fibrosierungsgraden (15 bis 20 %) forciert. Im Vergleich zu den übrigen immunsuppressiven Therapiestrategien ließen sich im Tubulusepithel der unter systemischer FK506-Exposition stehender Patienten deutlich komplexere ARNT⁺- und BMPR1A⁺-gefärbte Areale lokalisieren, die in Assoziation mit einer nachträglichen Aktivierung der pSMAD1/5/8-Signaltransduktionskaskade standen.

A

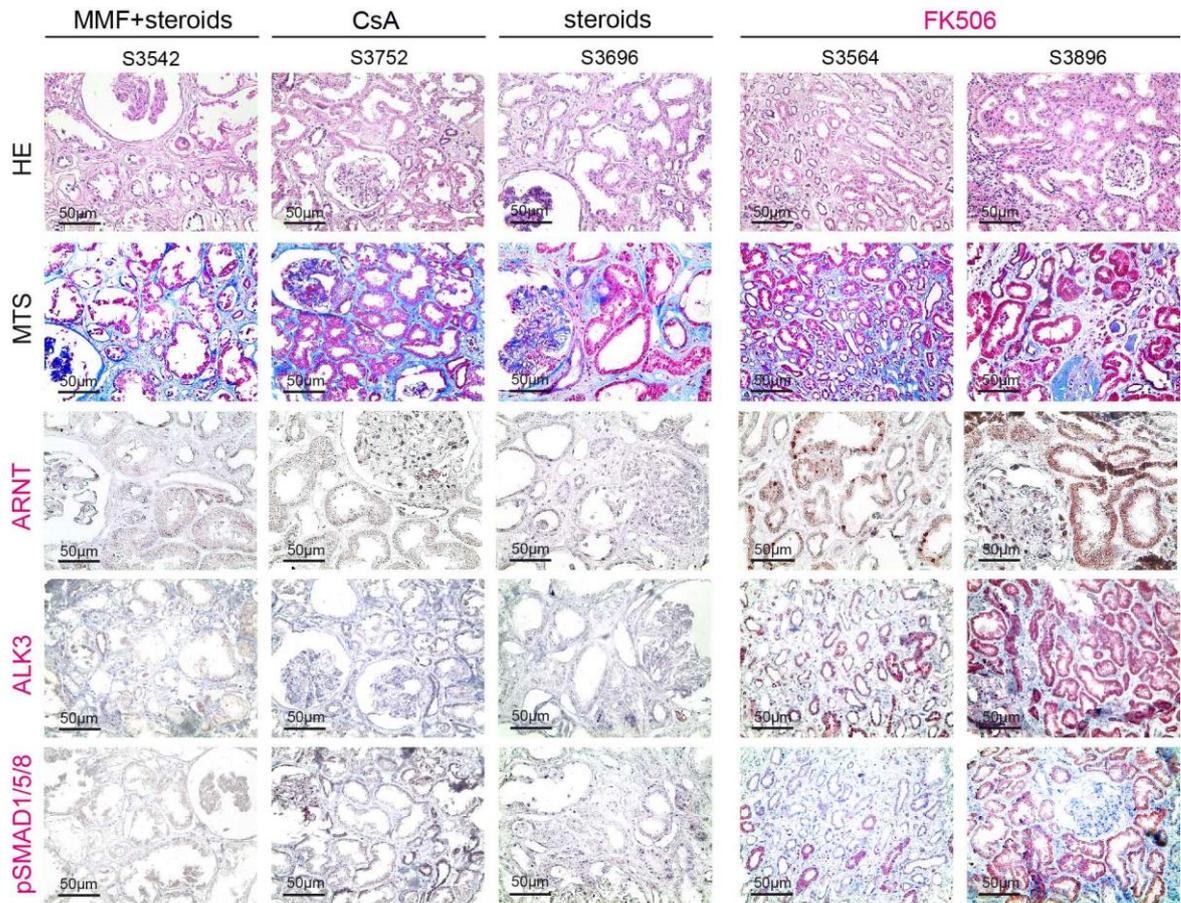


Abbildung 27: ARNT- und BMPR1A-Induktion mit konsekutiver pSMAD1/5/8-Aktivierung in humanen Transplantatnieren unter FK506-Therapie

(A) Repräsentative Mikrophotographie von HE- und MTS-gefärbten Nierenpräparaten sowie von immunhistochemisch mit Anti-BMPR1A, Anti-ARNT und Anti-pSMAD1/5/8 markierten Gewebeschnitten (Messbalken 50 µm). Die Bildausschnitte zeigen eine kleine Kohorte nierentransplantierte Patienten unter verschiedenen immunsuppressiven Therapieregimen (MMF+Cortison, CsA, Cortison, FK506).

4. DISKUSSION

In der Vergangenheit dokumentierten zahlreiche tierexperimentelle Studien die zentrale Bedeutung des Morphogens BMP7 innerhalb der renalen Fibrogenese, während der es die Protektion und Regeneration des beschädigten Nierenparenchyms vermittelt und somit die Progredienz der jeweiligen Erkrankung unterbindet (Zeisberg M und Kalluri 2004 a). Allerdings unterliegt der endogene Wachstumsfaktor im Zuge fortschreitender funktioneller und struktureller Veränderungen einer effektiven Negativregulation (Bramlage et al. 2010, Bramlage et al. 2011, Furic-Cunko et al. 2015, Hruska et al. 2000, Ivanac-Janković et al. 2015, Jia et al. 2015, Lin J et al. 2005, Morrissey et al. 2002, Neuwirt et al. 2014, Sugimoto et al. 2007, Sugimoto et al. 2012, Tampe B et al. 2014, Tampe D und Zeisberg M 2014, Wang S und Hirschberg 2003, Wang S et al. 2003, Wang S et al. 2006, Wang SN et al. 2001, Zeisberg M et al. 2003 a, Zeisberg M et al. 2003 b, Zeisberg M et al. 2005), wohingegen sein wesentlicher Signaltransduktor BMPR1A nachhaltig induziert wird. Gleichzeitig korreliert dessen Defizienz im Tubulusepithel mit der Progression fibrotischer Prozesse (Sugimoto et al. 2012). In diesem Kontext liefert die webbasierte Datenbank Nephroseq fundierte Anhaltspunkte einer Tacrolimus-modulierten *BMPR1A*-Induktion (*nephroseq.org*, Flechner et al. 2004). Inwiefern der Einfluss des Makrolid-Lactons sich auf die BMPR1A-Expression im proximalen Tubulusepithel bzw. innerhalb der renalen Fibrogenese reproduziert und nachfolgend renoprotektive Wirksamkeit zeigt, war, ebenso wie zugrundeliegende molekulare Mechanismen, bislang völlig unbekannt.

4.1 Quantitative Effektivitätsanalysen unter FK506-Exposition im Nierenparenchym

4.1.1 Spezifische Induktion des BMP7-Rezeptors BMPR1A nach FK506-Supplementation

Die angestrebten Untersuchungen im humanen proximalen Tubulusepithel (HK-2) implizierten Effektivitätsvergleiche unterschiedlicher immunsuppressiver Therapeutika und ergaben die selektiv vermehrte Expression von BMPR1A ausschließlich unter geringdosierter FK506-Exposition. Demgegenüber zeigten äquivalente Mengen des Antimetaboliten MMF bzw. des Calcineurininhibitors CsA allenfalls geringe Wirksamkeit. Diese Ergebnisse decken sich mit In-vitro-Studien der Arbeitsgruppe Spiekerkoetter et al., die mittels Hochdurchsatz-Screening in stabil mit BMP-responsiven *ID1*-Promotorelementen transfizierten C2C12-Zellen die deutliche Überlegenheit des Tacrolimus gegenüber zahlreichen FDA (*Food and Drug Administration*)-geprüften Pharmazeutika bestätigten (Spiekerkoetter et al. 2013). Gleichzeitig konnte in den tubuloepithelialen HK-2-Zellen ein Einfluss der verschiedenen immunsuppressiven Therapeutika auf weitere BMP7-spezifische Rezeptoren, den *BMPR1B* und den *BMPR2*, ausgeschlossen werden.

Um die Effektivität des Tacrolimus im Kontext der progredienten tubulointerstitiellen Fibrose näher zu beleuchten, wurden In-vivo-Untersuchungen im nicht-proteinurischen Schädigungsmodell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) angestrebt. Die zunächst in ligierten Nieren entsprechend präparierter C57BL/6J-Mäuse durchgeführten Expressionsanalysen bekräftigten die bereits von Sugimoto et al. verifizierte *Bmpr1a*-Induktion, wie auch die signifikante Repression des *Bmpr1b* und des *Bmpr2* (Sugimoto et al. 2012). Darüber hinaus gelang es, einen zusätzlich stimulierenden Effekt des immunsuppressiven Pharmakons Ta-

rolimus auf die Bmpr1a-Expression im fibrotisch destruierten Nierenparenchym unter Anwendung verschiedener molekularbiologisch etablierter Verfahren wie der Western Blot-Methodik und der qRT-PCR sowie mittels immunhistologischer Gewebecharakterisierung nachzuweisen. In Korrelation zu den aus humanen proximalen Tubulusepithelzellen generierten mRNA-Analysen ließ sich eine globale Wirkung des Makrolid-Lactons auf weitere substantielle Bindungspartner (Bmpr1b und Bmpr2) des Bmp7 nicht eruieren, so dass insgesamt die zunächst hypothetisch angenommene Spezifität der FK506-modulierten BMPR1A-Positivregulation untermauert werden konnte. Die Möglichkeit, den BMPR1A selektiv ohne eine simultane Rekrutierung weiterer BMP7-Rezeptoren zu induzieren, ist insofern von großer Relevanz, als dass das Morphogen während der embryonalen Chondro- und Osteogenese wie auch der postnatalen Knochenbildung seine regulative Funktionalität über die Bindung des BMPR1B realisiert (Chen D et al. 1998, Haaijman et al. 2000, Yi et al. 2000, Zhao et al. 2002). Der Ausschluss zusätzlicher BMP7-spezifischer BMPR1B-Interaktionen gewährleistet bei Applikation von rekombinantem humanem BMP7 (rhBMP7) eine bessere Kontrollierbarkeit hinsichtlich der diskutierten ektopen Knochenformation. Neben der Niere bestehen auch im Herzen, im Gehirn, in den Lungen, der Leber und im Skelettmuskel des adulten murinen Organismus nachweislich ausgeprägte Bmpr1a-Expressionsmuster (Dewulf et al. 1995, Mishina et al. 1995). Bedeutsam wäre daher, die Bmpr1a-Expression in genannten Organen im CKD-Tiermodell nach FK506-Supplementation zu determinieren, um die Option eines systemischen FK506/Bmpr1a-Zusammenspiels faktisch auszuschließen. Im Rahmen dieser Arbeit ergaben allerdings weder histomorphologische noch mRNA-Rezeptoranalysen scheinoperierter Nieren Anhaltspunkte eines FK506-induktiven Einflusses und sprechen für einen ausschließlich fibroseassoziierten Effekt.

Ein weiterhin drängender Aspekt fokussiert die Frage, inwiefern die dokumentierte Rezeptorinduktion mit einem Funktionserhalt interferiert, da die rein quantitative Erhöhung eines passiven BMPR1A kein probates Instrument darstellt, das nephroprotektive und regenerative Potential des BMP7 zu transduzieren. Entscheidend für die effektive Modulation BMP7-vermittelter Signale ist die Formierung eines heterotetrameren Rezeptorkomplexes nach erfolgter extrazellulärer Ligandenbindung. Der konformationsveränderte Typ II-Rezeptor aktiviert daraufhin den Typ I-Rezeptor, der wiederum zytoplasmatische regulatorische SMAD-Proteine zu pSMAD1/5/8 phosphoryliert und somit eine intrinsische Signaltransduktionskaskade initiiert (Shi und Massagué 2003, Tamaki et al. 1998). Folglich lässt sich nur indirekt über die Quantifizierung phosphorylierter R-SMAD-Proteine auf die Aktivität des Typ I-Rezeptors rückschließen. Die hierzu angestrebten Analysen auf Protein- und lichtmikroskopischer Ebene ergaben eine im Kontext der Bmpr1a-Induktion stehende Phosphorylierung rezeptorregulierter Smad1/5/8-Proteine in ureterligierten Nieren FK506-behandelter Mäuse sowie *in vitro* im FK506-stimulierten proximalen Tubulusepithel (MCT). Übereinstimmende Resultate dokumentierten auch Spiekerkoetter und Kollegen in humanen pulmonalen Endothelzellen, wobei bestehende Differenzen hinsichtlich der Inkubationszeit und der supplementierten Dosis Tacrolimus vermutlich durch zellspezifische Charakteristika, das jeweilige Untersuchungsmodell sowie methodische Divergenzen bedingt sind (Spiekerkoetter et al. 2013). Insgesamt lässt die Konservierung der Rezeptorfunktionalität auf die Interaktion mit dem *common-mediator* SMAD4 und - im Zuge der nukleären Translokation - auf die Transkription BMP7-spezifischer Gene schließen (Derynck et al. 1998, Tamaki et al. 1998).

Letztlich geht die BMP7-modulierte Aktivierung intrinsischer Transduktionskomponenten mit der Antagonisierung TGF- β 1-assoziiierter Effektoren einher. Im Wesentlichen beruhen diese indirekten komplexen Interventionsmechanismen auf der über die pSMAD1/5/8-Signalkaskade regulierte konsekutive Induktion der ID-Proteine, welche *vice versa* durch SMAD-Mediatoren des TGF- β gehemmt werden (Kang Y et al. 2003, Korchynskyi und ten Dijke 2002, López-Rovira et al. 2002, Tampe D und Zeisberg M 2014). Als Ausdruck der wechselseitigen Beziehung manifestiert sich infolge der BMP7-initiierten ID-Aktivierung beispielhaft die transkriptionelle Repression der TGF- β 1-gesteuerten profibrotischen Gene *CTFG*, *ACTA2* (α SMA), *COLLAGEN-1A1*, *PAI-1* oder *FSP1* (Izumi et al. 2006, Kinoshita et al. 2007, Weiskirchen und Meurer 2013, Zeisberg M et al. 2003 b). Weiterhin unterbindet das BMP7 das orchestrierte TGF- β 1-abhängige Phänomen der EMT und entsprechend den ID-spezifischen Verlust des epithelialen Markerproteins E-Cadherin. Als Ausdruck der interagierenden Funktionskaskaden manifestiert sich entsprechend die nukleäre Kolo-kalisation von TGF- β 1- und BMP7-modulierten pSMAD-Proteinen (Kondo et al. 2004, Yang J und Liu 2001, Zeisberg M et al. 2003 b). Ferner bedingt die BMP7-induzierte SMAD1-Phosphorylierung die Inhibition des nicht-kanonischen TGF- β 1-regulierten p38-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweges sowie die damit korrelierende Reduktion der Fibronectin-Sekretion (siehe Abbildung 2, Seite 11) (Motazed et al. 2008). Zusammenfassend lässt sich infolge der Tacrolimus-vermittelten BMP7-Induktion zwar eine Sensibilisierung des Tubulusepithels für die antifibrotische Wirkung des Morphogens BMP7 konstatieren, diskutabel bleibt jedoch zunächst, inwiefern die nachweisliche Signalintensivierung mit der skizzierten Antagonisierung des TGF- β 1, Hauptmediator der EMT, einhergeht und damit letztlich der renalen Fibrogenese Aufschub leistet.

4.1.2 Milderung der experimentellen renalen Fibrogenese *in vivo* mittels FK506-assoziiierter Bmpr1a-Induktion

Gemeinhin kennzeichnet die tubulointerstitielle Fibrose mit einhergehender Tubulusatrophie sowie glomerulärer Sklerosierung eine homogene Endstrecke pathogenetisch divergenter progressiver Nierenerkrankungen (Boor et al. 2010, Bröcker et al. 2010). Die Reproduktion derartiger struktureller Veränderungen durch einseitige Ureterligatur in geeigneten Versuchstieren erlaubt die während der renalen Fibrogenese auftretenden Phasen des arbiträren Vernarbungsprozesses experimentell nachzuvollziehen (Chevalier et al. 2009, Eddy et al. 2012). Der Verzicht auf exogene tubulotoxische Noxen, die Kontrollierbarkeit der Methode unter Funktionserhalt der kontralateralen Niere, die somit als adäquates Kontrollorgan fungiert, sowie der komparable Ausprägungsgrad morphologischer Merkmale in den stenosierten Nieren sind als wesentliche Vorteile der obstruktiven Nephropathie zu nennen (Chevalier et al. 2009).

Insgesamt manifestierte sich in obstruierten Nieren des FK506-behandelten Mauskollektivs eine deutliche Remission des progredienten Nierenschadens, der sich in der PAS-Färbung durch die Reduktion dilatierter Tubuli und die gemilderte Synthese hyaliner Zylinder (*cast*) äußert. Unter Anwendung eines vergleichbaren semiquantitativen Graduierungsschemas lieferten Wang L et al. in konditionellen transgenen Mäusen nach Induktion einer Puromycin-Aminonukleosid-Nephrose (PAN) sowie infolge der FK506-Applikation diesbezüglich übereinstimmende Resultate (Wang L et al. 2015). Eine Linderung des tubulointerstitiellen Inflammations- und Fibrosierungsprozesses konnten sie entgegen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht

eruierten. Hierzu erfolgte morphometrische Bildanalysen Masson-Trichrom-gefärbten Nierenschnittpräparate verdeutlichten allerdings anschaulich die unter der chronischen Harnstauung symptomatische Zunahme der tubulointerstitiellen Fibrose sowie deren deutlich signifikante Suppression unter dosisabhängiger Tacrolimussupplementation. Differenzen zu Erkenntnissen der Arbeitsgruppe Wang L et al. finden insbesondere im divergenten Mausmodell, welches morphologisch eher einer fokal-segmentalen Glomerulosklerose entspricht, sowie in der Integration eines binären mittels Doxyzyklin induzierbaren Transgens ihre Begründung. Weitere methodische Diskrepanzen sind maßgeblich in der über 50-fach (10 mg/kg KG) höheren Dosierung des subkutan injizierten Makrolid-Lactons zu sehen mit dem vorrangigen Ziel, renoprotektive Effekte über die direkte pharmakologische Inhibition des Calcineurins zu modulieren. Dementsprechend führten die Autoren die signifikante Abnahme tubulärer Strukturschäden auf die über die Calcineurinhemmung vermittelte Blockade der Mitochondrien-Fragmentierung zurück, aus der letztlich ein antiapoptotischer Effekt auf das proximale Tubulusepithel resultiert (Cho et al. 2010, Wang L et al. 2015). Dieser molekulare Mechanismus mag gewiss Teil komplexer CNI-assoziiertes Induktionsprogramme sein und ist dementsprechend sowohl unter CsA- als auch FK506-Applikation zu eruieren. Allerdings gibt dieses weitgehend theoriebasierte Verständnis nur unzureichend Antwort auf in der Fortführung dieses Projektes generierte Daten, aus denen explizit die selektiv Tacrolimus-vermittelte Remission der renalen Fibrogenese hervorgeht, wohingegen eine CsA-Exposition eng mit der Exazerbation derartiger Prozesse korrelierte. Demzufolge lassen sich die unter FK506-Gabe verifizierten protektiven Effekte auf das Tubulusepithel nicht ausschließlich auf eine Calcineurinhemmung zurückführen, sondern finden vielmehr in divergenten konzeptionellen Modellen eine Erklärung.

Der progrediente Charakter der renalen Fibrogenese ist nicht ausschließlich in der Aktivierung und Proliferation residenter EZM-produzierender Bindegewebszellen zu sehen: Adäquate profibrotische Stimuli spezifischer Zytokine und Wachstumsfaktoren induzieren im tubuloepithelialen Zellverband den Verlust ihrer Integrität sowie die kontinuierliche Herunterregulation charakteristischer Adhäsionsmoleküle. Im Zuge dieses sukzessiven als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) bezeichneten Dedifferenzierungsprozesses erlangen sie neben einem zunehmend spindelförmigen Phänotyp, die Fähigkeit zur De-novo-Expression mesenchymaler Marker wie α SMA, FSP1 und Collagen-1 (Kalluri und Weinberg 2009, Strutz und Neilson 2003). Der molekulare Mechanismus der EMT findet seinen Ursprung in der hohen Plastizität adulter Epithelzellen (Zeisberg M und Kalluri 2004 b), wobei mehrere Arbeitsgruppen übereinstimmend seinen signifikanten Beitrag zur Progression der renalen Destruktion in ureterligierten murinen Nieren nachwiesen (Grande et al. 2015, Iwano et al. 2002, Lovisa et al. 2015, Yang J et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde über den immunfluoreszenzoptischen Nachweis der genannten spezifischen Markerproteine sowie die morphometrische Validierung ihrer Expressionsmuster auf aktivierte (Myo-)Fibroblasten-Populationen und die Rekrutierung transformierter adulter Tubulusepithelzellen rückgeschlossen. Dabei ließ sich die unter der obstruktiven Nephropathie dokumentierte Akkumulation der fokussierten Indikatoren im Zuge einer sukzessiv zunehmenden Tacrolimusexposition dosisabhängig supprimieren.

Nachweislich fungiert die exogene Applikation des rhBMP7 auch im UO-Mausmodell als kritischer Faktor der renalen Homöostase, indem es durch sein antiapoptotisches und antiinflammatorisches Potential die

phänotypische tubuloepitheliale Zellstruktur konserviert, die Transformation aktivierter interstitieller Fibroblasten inhibiert und somit die transkriptionelle Aktivierung profibrotischer Moleküle unterdrückt (Hruska et al. 2000). Demnach lieferte der signifikante Rückgang dieser vornehmlich vom EMT-Schlüsselytokin TGF- β 1 modulierten Effektoren einen weiteren zentralen Anhaltspunkt für eine über die Tacrolimus-assoziierte BMPR1A-Induktion realisierbare Intensivierung von BMP7-spezifischen Signalen. Neben der durch Antagonisierung zentraler Gegenspieler vermittelten Inhibition bzw. Umkehrung des EMT-Prozesses (vgl. Kapitel 4.1) lassen sich weitere BMP7-assoziierte antifibrotische Effekte auch in mesenchymalen Zellen beobachten. So sind die reprimierte α SMA- und Collagen-1-Expression auch hinweisend für ein verringertes Aktivitätsniveau residenter Fibroblasten sowie eine möglicherweise verstärkte Degradation pathologisch angehäufter Matrixkomponenten (Zeisberg M et al. 2003 a).

Demgegenüber ist ein Tubulusepithelschaden eng mit dem endogenen Verlust des Morphogens BMP7 verknüpft, wobei die systemische rhBMP7-Supplementation abgesehen von rein kompensatorischen Effekten, auch zur Normalisierung seines eigenen Expressionsniveaus beiträgt (Bramlage et al. 2010, Bramlage et al. 2011, Furic-Cunko et al. 2015, Hruska et al. 2000, Ivanac-Janković et al. 2015, Jia et al. 2015, Lin J et al. 2005, Morrissey et al. 2002, Neuwirt et al. 2014, Sugimoto et al. 2007, Sugimoto et al. 2012, Tampe B et al. 2014, Tampe D und Zeisberg M 2014, Wang S und Hirschberg 2003, Wang S et al. 2003, Wang S et al. 2006, Wang SN et al. 2001, Zeisberg M et al. 2003 a, Zeisberg M et al. 2003 b, Zeisberg M et al. 2005). Diese intrinsische Protektion durch BMP7 basiert vermutlich auf dem inhibierten Morphologieverlust des Tubulusepithels und könnte umgekehrt auch über die Tacrolimus-vermittelte BMPR1A-Expression wirksam werden. Inwiefern die supplementierten Niedrigdosen des Immunsuppressivums mit der Konservierung des Morphogens einhergehen, sollte im Rahmen zukünftiger Arbeiten Berücksichtigung finden. Ferner bedarf es der Klärung, in welchem Maße sich über eine simultane Applikation von FK506 und rhBMP7 synergistische Effekte erzielen lassen. Als Optimum wäre die Potenzierung BMP7-regulierter nephroprotektiver und regenerativer Wirkmechanismen anzunehmen.

Insgesamt wird die postulierte Schutzfunktion von BMPR1A über den Dualismus zweier experimenteller Herangehensweisen gestützt: Während in der vorliegenden Arbeit die In-vivo-Induktion des Rezeptors in Einklang mit der signifikanten Repression tubulärer Schäden, des Fibrosegrades sowie der reduzierten Expression profibrotischer Marker gebracht werden konnten, demonstrierten Sugimoto et al. infolge einer *Bmpr1a*-Deletion im proximalen Tubulusepithel die Aktivitätssteigerung der TGF- β -Signalkaskade und des EMT-Programms. Entsprechend unterstreicht der identifizierte Zusammenhang von *Bmpr1a*-Defizienz und Exazerbation der renalen Fibrogenese die Bedeutung des Rezeptors für den Erhalt der physiologischen Nierenarchitektur und -funktion (Sugimoto et al. 2012).

4.1.3 Methodische Differenzen und Limitationen

Da sich mittels unilateraler Ureterobstruktion die einzelnen Phasen des arbiträren Fibrosierungsprozesses im histomorphologischen Korrelat rekonstruieren lassen, erscheinen Methodenwahl und Tiermodell für Studien der chronisch progredienten Niereninsuffizienz prinzipiell geeignet. Limitationen implizieren die unter der permanenten Harnleiterokklusion mit verhältnismäßig abnormer Aggressivität voranschreitende renale Destruktion gegenüber regulär im chronisch nierenkranken Patienten auftretenden Pathomechanismen. Die frühzeitig persistierende renale Vasokonstriktion in Korrelation mit einer signifikant reprimierten

Nierenperfusion sind bei der Verabreichung exogener Therapeutika und der Übertragbarkeit applizierter Dosen zu kalkulieren (Eddy et al. 2012, Klahr und Morrissey 2002). Kritisch lässt sich zudem der gewählte Beobachtungszeitpunkt der Studie diskutieren: Zwar erfolgte die morphometrische Quantifizierung der interstitiellen Fibrose in MTS-gefärbten Nierenschnittpräparaten sowohl drei, sieben und zehn Tage nach der Ureterobstruktion, histopathologische Bild- sowie detaillierte Expressionsanalysen wesentlicher Zielgene, zu späteren Zeitpunkten waren jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Anzumerken sei, dass signifikante Differenzen der unter Tacrolimusexposition eruierten Rezeptorinduktion möglicherweise zu früheren oder späteren Stichtagen nicht mehr reproduzierbar sein könnten (Eddy et al. 2012).

Limitationen sind überdies in der fehlenden Standardisierung histologischer Validierungsmethoden zu sehen, die trotz vorheriger Festlegung definierter Kriterien die Subjektivität des Betrachters, speziell bei Anwendung semiquantitativer Verfahren, nicht ausschließt. Insbesondere immunhistochemische Nachweisreaktionen erschweren aufgrund von Variabilitäten zugrundeliegender Färbeprotokolle und handelsüblicher Antikörper eine prinzipielle Normierung. Ferner können unspezifische Bindungen oder Kreuzreaktivitäten zu unerwünschten nieder- und mittelaffinen Interaktionen und Hintergrundsignalen führen und durch falsche Positivität Fehler in der Interpretation bedingen. Obgleich auch etablierte molekularbiologische Technologien wie die quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) und die Western Blot-Methodik generellen inhärenten Interferenzen unterliegen, ist eine zusätzliche Prüfung in Anbetracht höherer Spezifitäten und Sensitivitäten ratsam (Chang MM und Lovett 2011, Deepak et al. 2007). Infolge posttranskriptioneller und posttranslationaler Modifikationen sowie differenter Proteinhalbwertszeiten korrelieren die detektierten DNA-Amplifikate allerdings nicht zwangsläufig mit der Menge exprimierter Proteine und erklären die sich auch in der vorliegenden Studie manifestierenden Diskrepanzen zwischen den beiden Verfahren (Greenbaum et al. 2003, Pascal et al. 2008). Weiterhin repräsentiert die Densitometrie ein teils eingeschränkt reliables Messinstrument und limitiert aufgrund einer fehlenden allgemeingültigen Vereinheitlichung eine universelle Reproduzierbarkeit (Gassmann et al. 2009). Für das Aufzeigen genereller Tendenzen ist die quantitative Proteinanalytik allerdings durchaus praktikabel.

Die angeführten Aspekte müssen bei der Auswertung generierter Daten und der Planung zukünftiger Projekte entsprechende Berücksichtigung finden. Zudem ist die Inklusion eines zusätzlichen CKD-Mausmodells empfehlenswert.

4.2 Charakterisierung molekularer Induktionsmechanismen

4.2.1 FK506-modulierte BMPR1A-Induktion durch De-novo-Synthese von ARNT

Über das FK506-Bindeprotein FKBP12, ein zytosolisches Immunophilin, konnte bereits eine Beziehung zwischen dem Immunsuppressivum Tacrolimus sowie der Signalfunktion der zur TGF- β -Superfamilie gehörenden Typ I-Rezeptoren nachgewiesen werden (Charng et al. 1996, Wang T et al. 1996). Dabei interagiert FKBP12 mit einem konservierten Motiv der GS-Box des unstimulierten Typ I-Rezeptors, woraufhin dessen Phosphorylierung durch den Typ II-Rezeptor inhibiert und ein passiver Konformationszustand stabilisiert wird (Charng et al. 1996, Chen YG et al. 1997, Huse et al. 1999). Die nachfolgend gehemmte Signalübertragung korreliert mit einem reduzierten Niveau phosphorylierter SMAD-Proteine und fungiert als eine Art Sicherheitsmechanismus, um eine konstitutive ligandenunabhängige Signalaktivierung zu unterbinden

(Chen YG et al. 1997). Tacrolimus wiederum konkurriert mit dem Typ I-Rezeptor um die Bindung des FKBP12, da beide mit derselben hydrophoben Tasche des Immunophilins interagieren (Chen YG et al. 1997, Huse et al. 1999). Dabei geht die Bildung des binären FKBP12/FK506-Komplexes, analog einer Rezeptorligandenbindung, mit der Dissoziation des FKBP12 vom Typ I-Rezeptor einher (Chen YG et al. 1997, Wang T et al. 1996), woraufhin die Phosphorylierung des Rezeptors sowie die pSMAD-abhängige Transduktionskaskade initiiert wird (Chen YG et al. 1997, Spiekerkoetter et al. 2013, Stockwell und Schreiber 1998). In diesem Zusammenhang identifizierten Spiekerkoetter et al. niedrigdosiertes Tacrolimus als ein wirkungsvolles ID1-Stimulanz, das in entsprechender Konzentration die potente Aktivierung von BMP-Typ I-Rezeptoren induziert, ohne gleichzeitig ein signifikantes TGF- β -Signal zu rekrutieren. Die Autoren mutmaßten ein duales Wirkprinzip, welches auf der Fähigkeit des Tacrolimus, sowohl mit dem FKBP12 zu interagieren als auch die Phosphatase Calcineurin sterisch zu blockieren, basiert (Spiekerkoetter et al. 2013).

Im Rahmen von In-vitro-Untersuchungen der vorliegenden Studie konnte hingegen durch Präinkubation des Translationsinhibitors Cycloheximid die Rezeptorspezifische Induktion von *BMPR1A* vollständig unterbunden werden, woraus sich wiederum die Tacrolimus-abhängige De-novo-Translation eines bislang unbekanntes Transkriptionsfaktors ableitet. Entsprechend wurde der Beitrag einer potentiellen transkriptionellen *BMPR1A*-Induktion direkt durch FK506 nicht weiter verfolgt. Mittels RT² Profiler™ PCR-Array und bioinformatischem Sequenzabgleich auf Basis internetgestützter Datenbanken konnten sechs potentielle Kandidatengene mit putativer Bindungsdomäne in der Promotorregion des humanen *BMPR1A*-Gens detektiert werden. Da im FK506-stimulierten murinen Tubulusepithel (MCT) nach transientem RNAi-basierendem posttranskriptionellem Gene Silencing allein die selektive Stummschaltung des Transkriptionsfaktors Arnt zu keiner effizienten *Bmpr1a*-Induktion führte, kann auf dessen zentrale Funktionalität geschlossen werden. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in obstruierten Nieren entsprechender Versuchstiere resultierte die Inkubation bzw. Applikation des Makrolid-Lactons in einer signifikanten Induktion des Transkriptionsfaktors und untermauert dementsprechend seine hypothetische Bedeutung. Die im Wesentlichen konzentrationsabhängigen und insbesondere in den beiden höheren FK506-Stimulationsdosen eindeutig evidenten In-vivo-Effekte sind dahingehend bemerkenswert, als dass die anderen fünf putativen Kandidatengene infolge der chronischen Harnstauung zwar ebenfalls einer Hochregulation unterlagen, ihnen jedoch aufgrund der ausbleibenden Tacrolimus-assoziierten Wirkung ein mechanistischer Einfluss während der *Bmpr1a*-Induktion abgesprochen werden musste. Vor diesem Hintergrund scheint die sich nach FK506-Exposition in MCT-Zellen manifestierende verstärkte Expression der übrigen potentiellen Transkriptionsfaktoren nicht im Kontext einer Rezeptorregulation zu stehen. Einen weiteren Anhaltspunkt für eine mögliche relevante Mediatorfunktion von ARNT ergab der erneute Abgleich mit dem bereits zu Beginn der Studie abgerufenen Transkriptomarray der integrativen *disease platform* Nephroseq: Basierend auf Genexpressionsanalysen in der humanen epithelialen Mammakarzinomzelllinie MCF7 befand sich unter den 1 % signifikant durch FK506 induzierten Genen analog zum *BMPR1A* auch der Transkriptionsfaktor *ARNT* (nephroseq.org).

Zwar erfuhren die bislang generierten Resultate durch die Kopplung mit bioinformatischen Verfahren eine zusätzliche Konsolidierung, der auf transkriptioneller RNA-Interferenz beruhende Nachweis konnte jedoch bislang einzig mittels Immunoblot erbracht werden. Demgegenüber stellt die Etablierung eines Plasmidvektors mit integriertem *BMPR1A*-Promotorkonstrukt sowie seine anschließende transiente Transfektion in die tubuloepitheliale Zielzelle eine valide Möglichkeit dar, die postulierte Tacrolimus-abhängige De-novo-

Translation des Transkriptionsfaktors ARNT sowie dessen folgende Bindung in der *BMPR1A*-Promotorregion eindeutig nachzuvollziehen. Letztlich bedingt dieser Transfer zusätzlicher genetischer Information eine hohe Kopienzahl des sich im Nukleus befindlichen extrachromosomalen Transgens und führt nachfolgend zur Überexpression der klonierten *BMPR1A*-Promotorsequenz. Inwiefern nun sowohl eine Tacrolimusstimulation als auch das selektive siRNA-vermittelte ARNT-Silencing mit der transkriptionellen Aktivität der inserierten *BMPR1A*-Promotorregion interferieren, kann anschließend durch ein der multiplen Klonierungsstelle (*multiple cloning site*, MCS) nachgeschaltetes hochsensitives Reporter-gen (Bsp. *firefly luciferase*, *green fluorescent protein*) quantitativ validiert werden (Schenborn und Groskreutz 1999). Demgegenüber erlaubt das bislang genutzte proteinanalytische Nachweisverfahren erst im Anschluss der Translation auf die Initiation der Gentranskription rückzuschließen. Folglich sind Interferenzen durch die Prozessierung von Proteinen zu bedenken. Prinzipiell korrelieren die emittierten Lumineszenzsignale der erwähnten Reporter-genkonstrukte direkt mit der Promotoraktivierung. Da das *green fluorescent protein* in Anbetracht seiner autofluoreszenten Eigenschaft und im Gegensatz zu den häufig verwendeten dualen Luciferase-Reporter-genassays keiner weiteren enzymatischen Reaktion unterliegt, ermöglicht seine fluoreszenzmikroskopische Detektion eine Beurteilung der Transkriptionsregulation im intakten Zellsystem kontinuierlich in Echtzeit und gestattet somit Aussagen über kinetische Aspekte der Tacrolimusstimulation (Lu et al. 2004, Soboleski et al. 2005). Folgt im Idealfall dem zielgerichteten ARNT-Knockdown die Repression des auf dem Vektor kodierenden und durch FK506-Exposition induzierten *BMPR1A*-Steuerelements, erlaubt die episomal erhöhte Promotorpräsenz den interagierenden Synergismus in einem separierten Minimalsystem zu analysieren und entsprechende Signale unter Ausschluss exogener Komponenten explizit aufeinander zu beziehen. Zudem erhöht die Klonierung einer bekannten Promotorsequenz von definierter Länge in das Plasmid die Spezifität der Ereignisse und offeriert zukünftig das *ARNT*-Bindungsmotiv zu lokalisieren. Einschränkungen der transienten Transfektionsmethodik beruhen auf der fehlenden Genomintegration bzw. einer allenfalls partiellen nukleosomalen Konfiguration des Plasmids und sind durch Generierung stabil transfizierter Klone zu umgehen (Smith CL und Hager 1997).

Letztlich liefert die theoretisierte Funktionalität des Transkriptionsfaktors ARNT ein plausibles Erklärungsmodell für die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* detektierbare Spezifität der FK506-modulierten *BMPR1A*-Induktion und gegen den von Spiekerkoetter et al. postulierten Wirkungsdualismus.

4.2.2 Postulat der transkriptionellen *ARNT*-Aktivierung durch FK506-Mediation

Gemeinhin stellt der Transkriptionsfaktor ARNT die konstitutiv exprimierte β -Untereinheit des heteromeren *hypoxia inducible factor 1* (HIF-1) dar, welche im Nukleus zahlreicher Gewebe lokalisiert ist (Eguchi et al. 1997, Hirose et al. 1996). Bereits während der murinen Embryogenese manifestiert sich seine biologisch essentielle Bedeutung, da die homozygote *Arnt*^{-/-}-Deletion einen embryonal letalen Phänotyp bedingt (Kozak et al. 1997, Maltepe et al. 1997). Seine strukturelle Architektur inkludiert ein aminoterminales DNA-bindendes bHLH-Motiv angrenzend an die hochkonservierte PAS (PER-ARNT-SIM)-Domäne sowie eine potente, im Carboxyterminus integrierte Transaktivierungsfunktion (Whitelaw et al. 1994). Daher obliegt es ihm, über die Dimerisierung mit anderen Mitgliedern der bHLH/PAS-Proteinsubfamilie ihre charakteristischen Signale zu transduzieren. Seine Komplexierung mit dem ligandengebundenen *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) begünstigt etwa die Transkription der Xenobiotika-responsiven Elemente (Poland und Knutson

1982, Rowlands und Gustafsson 1997). Ebenso bindet die unter hypoxischen Konditionen stabilisierte HIF-1 α -Untereinheit erst nach Heterodimerisierung mit ARNT das *hypoxia response*-Element, was über die Transaktivierung der HIF-1-Zielgene zur Regulation der Sauerstoffhomöostase beiträgt (Déry et al. 2005, Semenza et al. 1997). Weiterhin ist eine Interaktion mit *single-minded* (SIM)-Proteinen bekannt, die die Repression der initial beschriebenen Mechanismen bedingt (Woods und Whitelaw 2002). Seine Relevanz als zentrales Partnerprotein der bHLH/PAS-Familienmitglieder ist demnach seit Jahren etabliert. Hingegen bestehen weiterhin Kontroversen hinsichtlich der Formation homodimerer ARNT-Komplexe, deren Funktion während der transkriptionellen Aktivierung sowie der in diesem Kontext regulierten Zielgene (Hirose et al. 1996, Sogawa et al. 1995, Wang F et al. 2006). Dabei könnte eine derartige Homodimerisierung durchaus zur *BMPR1A*-Promotorbindung beitragen. Wie Tacrolimus die in dieser Arbeit eruierte ARNT-Induktion evoziert, bleibt abschließend jedoch ungeklärt.

In den Fokus der Überlegungen rückten daher die *FK506-binding proteins*, ihrerseits ubiquitäre Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen, an deren gemeinsame annähernd sequenzhomologe FKBP-Domäne (*FKBD*, *FK506-like binding domain*) der Immunmodulator FK506 bindet und nachfolgend die Inhibition der Rotamase-Aktivität bedingt (Galat 2013, Rulten et al. 2006, Van Duyne et al. 1991). Während der Archetyp FKBP12 ausschließlich eine Monodomäne besitzt, weisen höhermolekulare Multidomänenproteine neben einer größeren Zahl an konsekutiven FKBDs weitere funktionelle Bindemotive auf. In Anbetracht dieser strukturellen Charakteristika sowie ihrer intrazellulären Omnipräsenz sind die hochkonservierten Immunophilinen in zahlreiche regulative Prozesse des Zytoplasmas und des Nukleus involviert. Entsprechend können selbst zytosolische FKBDs mit der DNA assoziieren und über die Regulation von Transkriptionsfaktoren sowie die Modifikation des Chromatins an der Genexpression partizipieren (Galat 2013, Yao et al. 2011). Das FKBP12 reguliert beispielsweise über die Interaktion mit dem ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor YY1 (*YY1*, *YY1*), einem zur GLI-Krüppel-Genfamilie gehörendem Zinkfingerprotein (Shi et al. 1991), in Abhängigkeit vom jeweiligen Promotorkontext dessen transkriptionelle Aktivität. Die Integration der 5'-YY1-Bindungsdomäne in die Kontrollregion des frühen SV40-Promotor/Enhancer etwa führt bei Überexpression des FKBP12 zur Formation eines transkriptionellen Repressorkomplexes, wobei diese FKBP12/YY1-Wechselwirkungen *in vitro* durch Applikation von FK506 konzentrationsabhängig inhibiert werden (Yang WM et al. 1995). Im Zuge weiterführender Studien bestätigte zudem eine Protein-Interaktionsnetzwerk-Analyse über die Software STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) YY1 als relevanten FKBP12-Bindungspartner (siehe Abbildung 28 (A)) (Szkarczyk et al. 2015). Mittels Nephroseq wurden überdies Motivanalysen von differentiell unter FK506-Supplementation induzierten Genen in genomweiten Transkriptionsdatensätzen bioaktiver *small molecules* implementiert, welche in Korrelation zu akkumulierenden ARNT- auch eine Anreicherung von YY1-Motiven eruierten (siehe Abbildung 28 (B)) (Hieronymus et al. 2006, Lamb et al. 2006, Roeder et al. 2007).

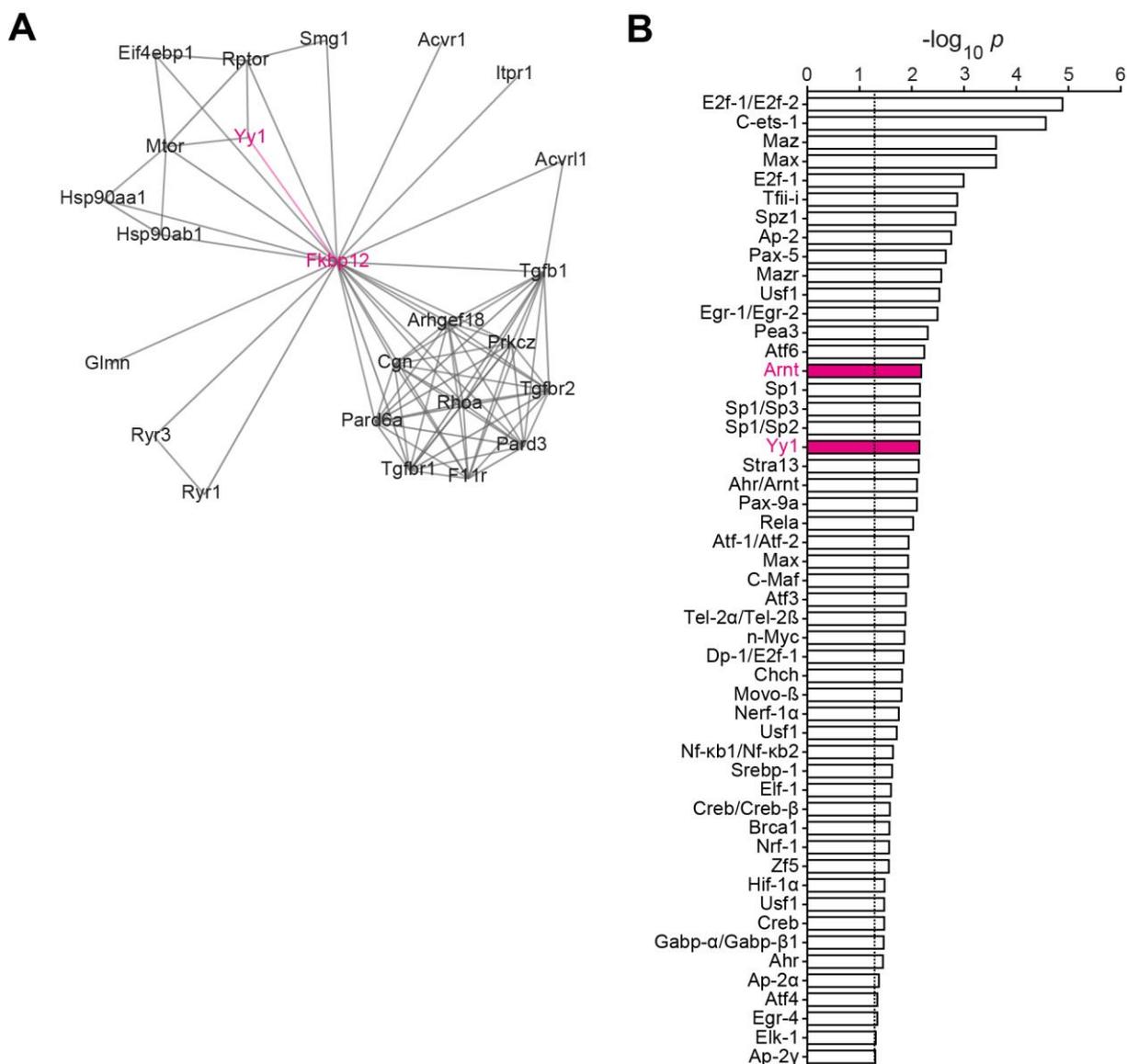


Abbildung 28: (A) FKBP12-Interaktionsnetzwerk. Bindungsaffinitäten von FKBP12 zu interagierenden Proteinen einschließlich YY1, dargestellt als Netzwerk (Szklarczyk et al. 2015). **(B) FK506-modulierte Gene.** Basierend auf genomweiten Transkriptionsdatensätzen bioaktiver *small molecules* (GEO-Zugangsnummer GSE5258) ergab die Motivanalyse von differentiell mittels FK506 induzierten Genen eine Anreicherung von *ARNT*- und *YY1*-Motiven. Angaben als Prozessanalysen der Anreicherung nach $-\log_{10} p$ -Transformation (Hieronymus et al. 2006, Lamb et al. 2006, Roeder et al. 2007).

Im Rahmen von Sequenzanalysen ließen sich weiterhin DNA-Bindungsmotive des Transkriptionsfaktors YY1 in der *ARNT*-Promotorregion identifizieren und führten zur Formulierung eines weitaus komplexeren hypothetischen Induktionsmechanismus, beruhend auf der transkriptionellen *ARNT*-Repression durch Ausbildung eines FKBP12/YY1-Synergismus an dessen Promotor. Die mit der Exposition des kompetitiven FKBP-Liganden FK506 einhergehende Dissoziation der FKBP12/YY1-Komplexierung könnte über die Freisetzung der spezifischen YY1-Bindungsdomäne im *ARNT*-Promotor die transkriptionelle Induktion von *ARNT* initiie-

ren. Als finaler Schritt dieser Transaktivierungskaskade ist letztlich die eingangs postulierte ARNT-Interaktion mit entsprechenden Sequenzmotiven des *BMPR1A*-Promotors zu sehen, die die Induktion des Rezeptors inkludiert.

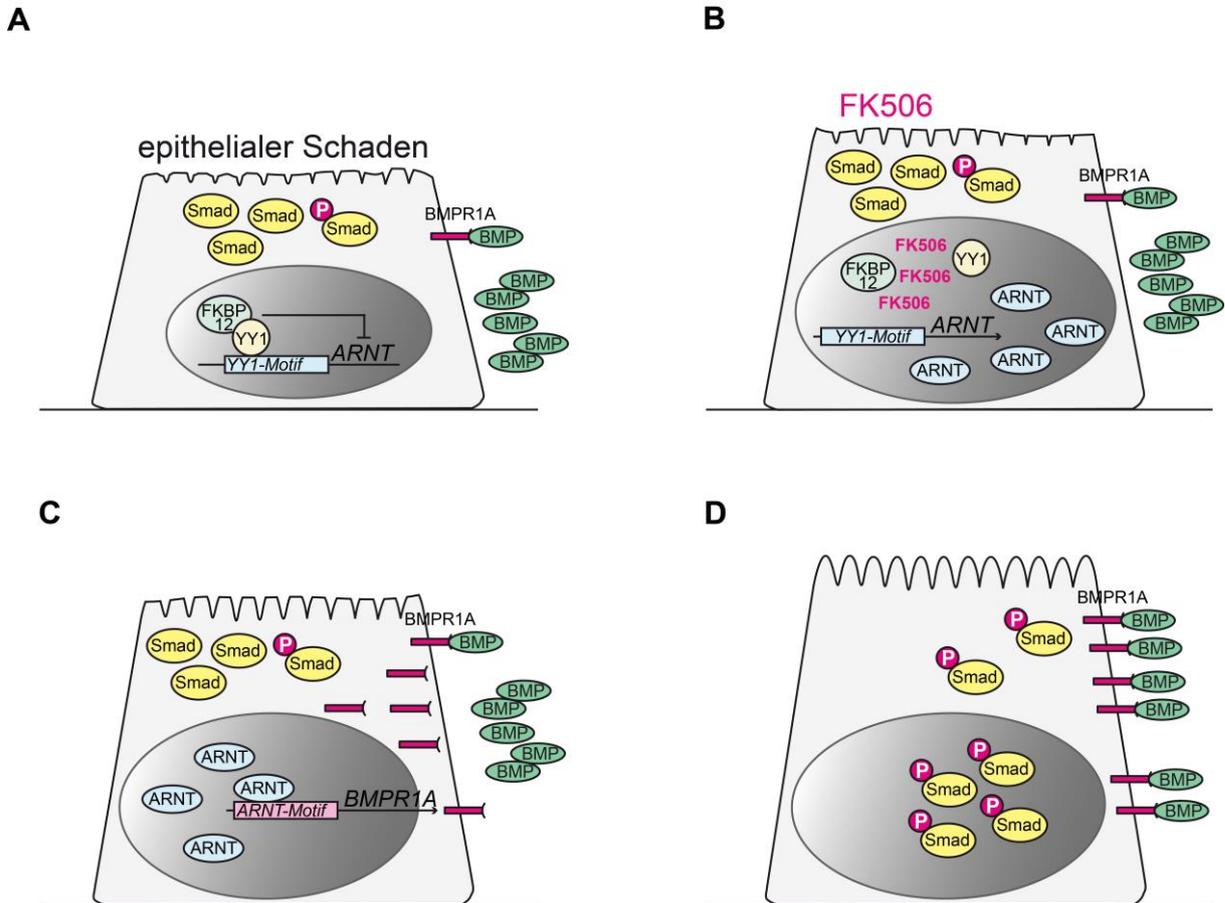


Abbildung 29: Hypothetischer BMPR1A-Induktionsmechanismus durch FK506-Mediation

(A) Transkriptionelle *ARNT*-Repression durch FKBP12/YY1-Synergismus. (B) Der Dissoziation des FKBP12/YY1-Repressorkomplexes durch Supplementation pikomolarer Tacrolimusmengen folgt die transkriptionelle *ARNT*-Aktivierung (C) mit konsekutiver *ARNT*-Bindung in der *BMPR1A*-Promotorregion. (D) Die nachfolgende Rezeptorinduktion korreliert mit einer verstärkten Rekrutierung der Signaltransduktionskaskade und der Protektion des renalen Tubulusepithels.

In der Fortführung des Projekts gelang es, durch pikomolare Tacrolimusmengen sowohl die FKBP12/YY1-Interaktion zu blockieren als auch eine verminderte YY1-Bindung an den *ARNT*-Promotor zu initiieren. Zudem ließ sich infolge des Yy1- bzw. des Fkbp12-Knockdowns, basierend auf injizierten *Vivo*-Morpholino-modifizierten *antisense*-Oligonukleotiden (Gene Tools, Philomath, USA), ein erhöhtes *Bmpr1a*-Expressionsniveau bei gleichzeitiger Milderung des renalen Fibrosierungsprozesses in ureterligierten murinen Nieren detektieren. Additive Effekte durch FK506-Supplementation blieben hingegen aus. Als weiteres Indiz für die funktionale Bedeutung des FKBP12/YY1-Repressorkomplexes und *ARNT* innerhalb der FK506-modulierten Induktionskaskade kann die Aufhebung der Tacrolimuswirkung nach *Vivo*-Morpholino-induzierter *Arnt*-Suppression in UO-Nieren entsprechender Versuchstiere interpretiert werden.

4.3 Potentielle klinische Relevanz der FK506-vermittelten BMPR1A-Induktion

4.3.1 Übertragbarkeit generierter In-vivo-Resultate in einen klinischen Kontext

In Anlehnung an klinische Dosisfindungsstudien ermöglichte die Applikation verschiedener Konzentrationen des Calcineurininhibitors Tacrolimus die optimale Wirksamkeitsspanne des Medikaments zu identifizieren. Dabei verdeutlichte sich in den experimentellen Analysen ein offenkundig konzentrationsabhängiger Effekt, wobei Mauskohorten der höheren Stimulationsdosen (0,075 und 0,2 mg/kg KG/Tag) mit deutlicher Tendenz den größten Profit aus dem Wirkungspotential des Immunsuppressivums zogen. Fraglich bleibt an dieser Stelle allerdings, in welchem Maße eine Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse auf den niereninsuffizienten Patienten realistisch erscheint. Obwohl sich mit der Sequenzierung des murinen Transkriptoms und Epigenoms erhebliche phänotypische Differenzen zum Menschen offenbarten (Lin S et al. 2014), repräsentiert die Hausmaus (*Mus musculus*) noch immer ein etabliertes Untersuchungsgut, um die Ätiopathogenese humaner Erkrankungen sowie die Wirksamkeit eines Pharmakons im Säugetierorganismus näher zu charakterisieren (Rossant und McKlerlie 2001, Zambrowicz und Sands 2003). In definierten experimentellen Konstellationen stellen Versuchstiere jedoch eine genetisch identische Population dar, die wiederum konstanten, nahezu sterilen, äußeren Rahmenbedingungen und kontinuierlichen Zyklen unterliegt. Demgemäß kann die Heterogenität des fokussierten Patientenkollektivs in ihrer Komplexität nur schwerlich nachvollzogen bzw. in das Studiendesign integriert werden. Um dennoch einen direkten klinischen Bezug herstellen zu können, erfolgte die Determination der verfügbaren Pharmakonkonzentration im murinen Vollblut. Interessanterweise lagen messbare Vollblutspiegel von Versuchstieren etwa 10- bis 20-fach niedriger als der nach Nierentransplantation empfohlene C_0 -Zielspiegel (5 bis 10 ng/ml) einer FK506-Erhaltungstherapie (Wallemacq et al. 2009).

Gemeinhin ist die therapeutische Gabe des Makrolids mit einer Reihe von relevanten Nebenwirkungen assoziiert, welche allerdings einer deutlichen Dosisabhängigkeit unterliegen und demnach im Verlauf einer Langzeitbehandlung durch Anstreben einer Wirkstoffreduktion effektiv gemildert werden (Laskow et al. 1996, Venkataramanan et al. 2001). Obwohl Ekberg et al. in einer fundierten prospektiven Multicenterstudie (ELITE-Symphony-Studie) nierentransplantierte Patienten niedrigdosiertes Tacrolimus in Einklang mit signifikant verbesserter renaler Funktion und Überlebensraten des Allotransplantats bringen konnten (Ekberg et al. 2007), steht das propagierte nephrotoxische Potential der Calcineurininhibitoren immer wieder im Spektrum kontroverser Diskussionen. Faktisch bleibt die zugrundeliegende Ätiopathogenese dieser offenkundigen, jedoch recht unspezifischen histologischen Strukturveränderungen allerdings ungeklärt, da sowohl primär mittels Calcineurininhibition vermittelte systemische Effekte als auch lokale Ursachen eine manifeste Rolle zu spielen scheinen. Erstere finden weitgehend in der Blockade der NFAT-Signalkaskade ihren Ursprung, sind jedoch in ihrer Komplexität noch weitgehend unerforscht und teilweise rein spekulativer Natur (Naesens et al. 2009). Trotz allem waren diese Aspekte Motivation genug, um in bislang unveröffentlichten Folgestudien dieser Arbeitsgruppe die Expression des Transkriptionsfaktors NF- κ B, eines wesentlich durch Calcineurin regulierten Effektors, zu analysieren (Palkowitsch et al. 2011, Vafadari et al. 2013). Demzufolge war dieses ubiquitäre Regulatorprotein sowohl im Blut als auch im Nierenparenchym FK506-behandelter Mäuse nicht substantiell verändert. Entsprechend lässt sich folgern, dass die kalkulierten Tacrolimusdosen bzw. der damit erreichte Konzentrationsspiegel im murinen Vollblut zwar ausreichend

waren, um die Induktion von Bmpr1a, nicht jedoch eine wirkungsvolle Calcineurininhibition zu modulieren. Ergo könnten bei derart geringen Stoffmengen des Makrolids CNI-assoziierte Nebenwirkungen nicht zum Tragen kommen, wohingegen die durch den Off-Label-Use vermittelten renoprotektiven Effekte dominieren.

Das Wirkprofil des Tacrolimus ist aufgrund starker pharmakokinetischer, -dynamischer sowie genetischer Variabilitäten wenig prädiktiv und bedingt ein engmaschiges Monitoring sowie die starke Individualisierung der Erhaltungstherapie (Wallemacq et al. 2009). Dabei sind diese signifikanten intra- und interindividuellen Diskrepanzen im Wesentlichen auf die inkonsistente lokale Expression und Aktivität der metabolisierenden Enzyme CYP3A4/5 und des Effluxtransporters P-Glykoprotein bzw. auf Polymorphismen ihrer kodierender Gene zurückzuführen und können bei regulär konzentrierten CNI-Dosen manifeste nephrotoxische Reaktionen verursachen (Barbarino et al. 2013, Naesens et al. 2009). Zwar sind derlei Effekte im vorliegenden Studiendesign in Anbetracht der gemessenen murinen Tacrolimus-Vollblutspiegel mit hoher Wahrscheinlichkeit vernachlässigbar, jedoch limitieren die erwähnten arzneimittelspezifischen Schwankungen die direkte Übertragbarkeit ermittelter Dosisgrößen von der Maus auf den Menschen. Angesichts dessen sowie im Hinblick auf das multivariable Patientenprofil sei auf die Dringlichkeit prospektiver humaner Kohortenstudien verwiesen, zumal es durch eindeutige Definition des sehr engen optimalen Wirkfensters die simultane Calcineurininhibition und entsprechend deren assoziierte Nebenwirkungen zu vermeiden gilt.

Abschließende morphometrische Untersuchungen konnten in humanen Transplantatnieren von Patienten unter therapeutischer FK506-Exposition die effiziente Induktion des Transkriptionsfaktors ARNT, des Typ I-Rezeptors BMPR1A sowie der phosphorylierten SMAD1/5/8-Proteine als Kennzeichen einer funktionalen Rezeptoraktivität bestätigen und stützen somit die Existenz postulierter Mechanismen im menschlichen Tubulusepithel. Allerdings untersagt die Anzahl verfügbarer Biopsate sowie die ausschließliche Anwendung immunhistologischer Nachweisverfahren die Generierung signifikanter Daten. In Anbetracht der angeführten Limitationen erfolgte eine fundierte Datenkonsolidierung mittels der integrativen *disease platform Nephroseq* (*nephroseq.org*).

4.3.2 Ausblick und mögliche Therapieoptionen

Trotz ihrer ätiologischen Vielschichtigkeit unterliegt die CKD nahezu ausnahmslos einem gemeinsamen histopathologischen Mechanismus, der tubulointerstitiellen Fibrose (Boor et al. 2010, Floege und Gröne 1995). Dies führte zu der Annahme mittels spezifisch antifibrotischen Konzepten, wie beispielsweise der exogenen BMP7-Supplementation, die Regeneration der Niere befördern und damit einen substantiellen Durchbruch hinsichtlich der „Untherapierbarkeit“ der CKD erzielen zu können (Bechtel und Zeisberg M 2009).

Obwohl zahlreiche tierexperimentelle Modelle akuter und chronischer Nierenerkrankungen die propagierte Regenerationskapazität des Morphogens bestätigten (Hruska et al. 2000, Vukicevic et al. 1998, Wang S et al. 2003, Zeisberg M et al. 2003 a, Zeisberg M et al. 2003 b) und damit die klinische Anwendung des rhBMP7 am Patienten nahelegten, bestanden massive Vorbehalte, rhBMP7 befördere die ektope Knochenbildung, und verzögerten somit zunächst die therapeutische Applikation. Trotz eines etablierten Einsatzes als topisch injizierbares osteoanaboles Präparat in Oralchirurgie und Orthopädie, konnte dem rhBMP7 in der intraperitonealen und intravenösen Verabreichungsform jegliche osteoinduktive Aktivität nachweislich abgespro-

chen werden (Bechtel und Zeisberg M 2009, Sampath et al. 1992, Zeisberg M et al. 2003 a). Als problematisch erwiesen sich jedoch die Synthese von biologisch aktivem BMP7, seine bei systemischer Applikation relevante relative Instabilität sowie die komplexe Pharmakokinetik, sodass die Herstellung sogenannter *small molecules*, synthetischer Proteine, die die Funktion des rekombinanten BMP7 reproduzieren, in den Fokus rückte (Bechtel und Zeisberg M 2009). Sugimoto et al. gelangen es, mittels dreidimensionaler Strukturanalysen des BMP7 putative Rezeptorbindungsstellen zu identifizieren und daraufhin das zyklische Peptidanalogue THR-123 mit selektiver Bindungskapazität zum BMPRI1A zu konstruieren. Die orale Gabe des THR-123 zeigte in verschiedenen akuten und chronischen Niereninsuffizienzmodellen der Maus ein ähnliches renoprotektives Wirksamkeitsspektrum wie sein natives Äquivalent BMP7, ohne dabei osteogenes Potential zu entwickeln (Sugimoto et al. 2012).

An dieser Stelle erscheint die Wirkstoffkombination mit niedrigkonzentriertem Tacrolimus die logische Konsequenz: Basierend auf der identifizierten FK506-modulierten BMPRI1A-Induktion sowie der selektiven BMPRI1A-Affinität des THR-123 ergibt sich ein möglicher additiver Synergismus, der wiederum in der Potenzierung BMP7-assoziiierter Effekte resultieren und auf Grundlage der impliziten Selektivität beider Prozesse ein mutmaßlich recht nebenwirkungsarmes Therapeutikum der renalen Fibrogenese darstellen könnte.

Während das erste synthetische BMP-Analogue THR-184 zur Therapie des akuten Nierenversagens nach operativen Interventionen bereits erfolgreich die klinische Phase I abgeschlossen hat und derzeit im Rahmen einer klinischen Phase II-Studie hinsichtlich Tolerierbarkeit, Effektivität und Dosierung am Patienten geprüft wird (*ClinicalTrials.gov* - Kennung: NCT01830920), befindet sich die THR-500-Serie für die Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz noch in der Produktentwicklung (Thrasos Therapeutics 2015).

Unter Nutzung bioinformatischer Methoden wurde initial das deskriptive molekulare Konzept der FK506-abhängigen BMPRI1A-Induktion entwickelt. Dabei implementiert die Datenbank Nephroseq durch nachfolgende Verschneidung mit klinischen Studien eine Möglichkeit zur In-silico-Evaluierung assoziierter Biomarkerkandidaten (Mayer 2012). Dementsprechend ließ sich in humanen Transplantatnieren von Patienten unterschiedlicher immunsuppressiver Therapieregime sowohl auf das Expressionsprofil des *BMPRI1A* als auch auf jenes des Transkriptionsfaktors *ARNT* rückschließen. Die vorherige Definition klinischer Laborparameter (Serumkreatininwert von ungefähr 2 mg/dl) stellte dabei die gemeinsame Basis aller inkludierter Patienten sicher. Auf Grundlage eines umfassenden DNA-Mikroarrays der Arbeitsgruppe Flechner et al. war eingangs bereits eine signifikante *BMPRI1A*-Hochregulation nachgewiesen worden. Im Hinblick auf die neuen wissenschaftlichen Befunde konnten nun folgende systembiologische Datenanalysen die Induktion des putativen Kandidatengens *ARNT* und damit die in dieser Arbeit in einer kleinen Patientenkohorte verifizierten Resultate untermauern (siehe Abbildung 30 (A)). Weiterhin verdeutlichte sich im FK506-behandelten Patientenkollektiv eine signifikante Korrelation zwischen der *ARNT*-Expression in peripheren Leukozyten des Bluts und des korrespondierenden Nierenparenchyms (siehe Abbildung 30 (B)) und könnte somit die Möglichkeit offerieren, den Transkriptionsfaktor als potentiellen prognostisch relevanten Indikator im Rahmen eines therapeutischen Monitoring zu etablieren. Die BMP-Rezeptoren *BMPRI1B* und *BMPRI2* blieben hingegen von den induktiven Effekten des Tacrolimus unbeeinflusst, womit sich die diskutierte BMPRI1A-Spezifität auch für die humane Niere bestätigte (Flechner et al. 2004).

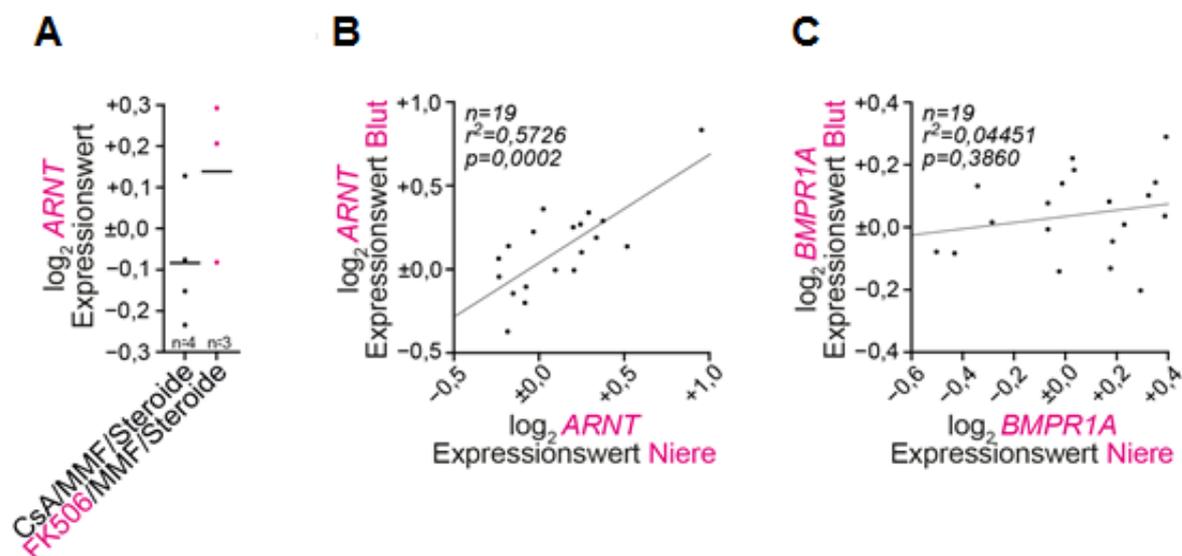


Abbildung 30: Systembiologische Datenanalyse in humanen Transplantatnieren

(A) *ARNT*-Induktion in nierentransplantierten Patienten (GEO-Zugangsnummer GSE1563) unter FK506-Therapie (n, Anzahl der Patienten; Daten als alignierte Dotplots nach \log_2 -Transformation des Expressionswertes mit Mittelwert dargestellt). (B+C) Während die *ARNT*-Expression (B) signifikant in peripheren Leukozyten des Bluts und des korrespondierenden Nierenparenchyms korreliert, ließ sich ein ähnlicher Zusammenhang hinsichtlich der *BMPR1A*-Expression (C) nicht validieren. Dies unterstreicht die potentielle prognostische Relevanz von *ARNT* im Rahmen eines therapeutischen Monitoring. n, Anzahl der Patienten; Kalkulation der r^2 - und p-Werte mittels linearer Regression (Flechner et al. 2004).

Ferner gelang es, die inverse Korrelation zwischen *FKBP12/YY1* und der *ARNT/BMP*-Signaltransduktion sowohl im Kontext verschiedener Nierenerkrankungen (siehe Abbildung 31) (Flechner et al. 2004, Ju et al. 2015, Nakagawa et al. 2015, Reich et al. 2010, Schmid et al. 2006, Woroniecka et al. 2011) als auch im kardiovaskulären, gastrointestinalen und zentralen Nervensystem nachzuweisen (siehe Tabelle 19) (Roth et al. 2006).

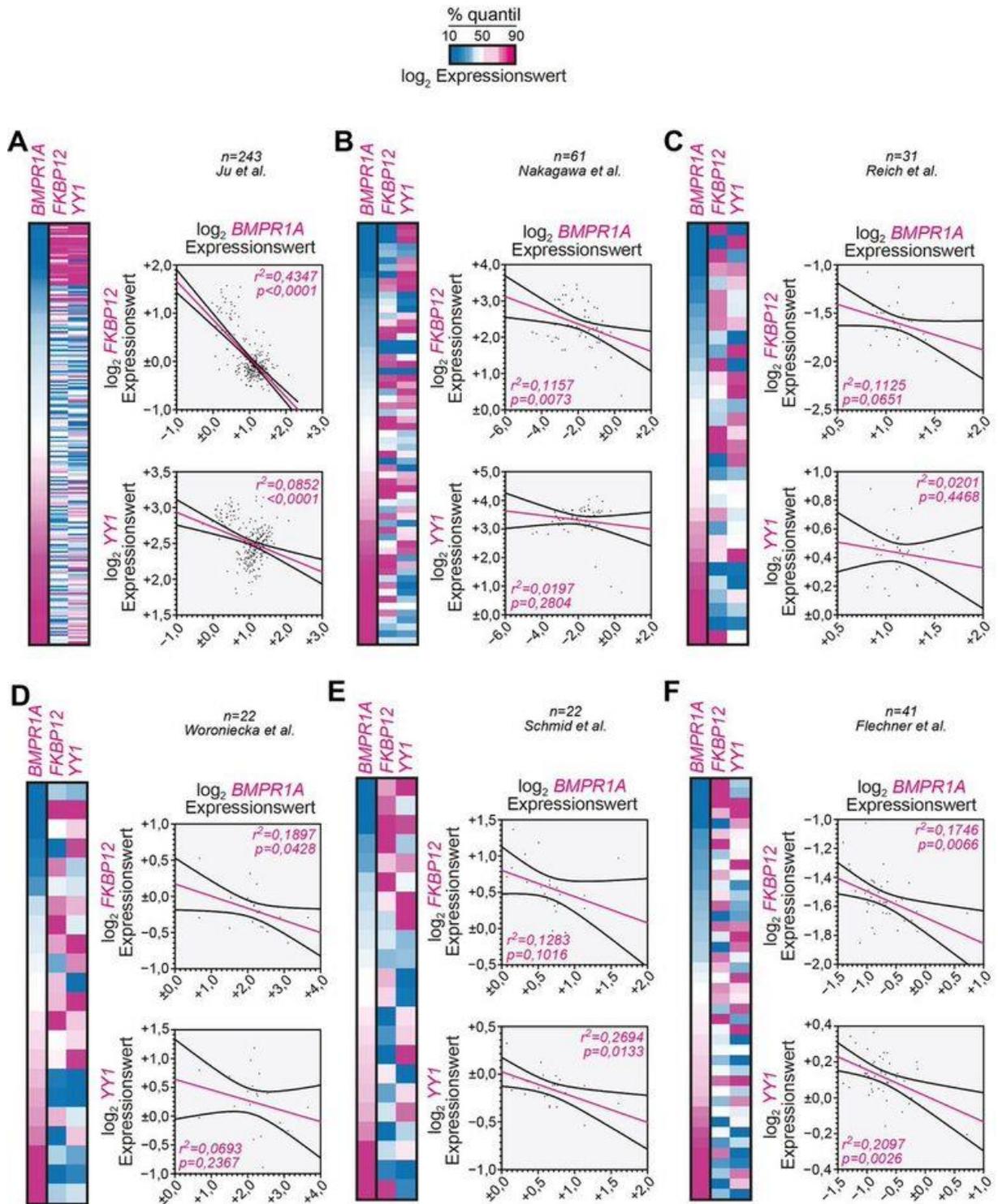


Abbildung 31: Inverse Korrelation von *BMPR1A* und *FKBP12/YY1* in verschiedenen Nierenerkrankungen

(A-F) In-silico-Evaluierung nierenrelevanter Transkriptom-Arraydaten mittels Nephroseq bestätigt inverse Expressionskorrelation zwischen *BMPR1A* und *FKBP12/YY1* in verschiedenen CKD-Kohorten (GEO-Zugangsnummer GSE69438, Ju et al. 2015 (A); GEO-Zugangsnummer GSE66494, Nakagawa et al. 2015, (B)), im Kontext der IgA-Nephritis (GEO-Zugangsnummer GSE35487, Reich et al. 2010, (C)) und der diabetischen Nephropathie (GEO-Zugangsnummern GSE30566, Woroniecka et al. 2011, (D); GEO-Zugangsnummer GSE21785, Schmid et al. 2006, (E)) sowie in Transplantatnieren (GEO-Zugangsnummer GSE1563, Flechner et al. 2004, (F)). *n*, Anzahl der Patienten;

Präsentation der Daten als Heatmap in %-Quantil mit entsprechender Korrelationsanalyse nach \log_2 -Transformation des Expressionswertes; Kalkulation der r^2 - und p-Werte mittels linearer Regression.

Tabelle 19: Inverse Korrelation zwischen ARNT und FKBP12/YY1 in humanen Organsystemen

Systembiologische Datenanalyse in humanen Transkriptomarrays (GEO-Zugangsnummer GSE3526) verdeutlicht evidente inverse Expressionskorrelation von ARNT in Relation zum FKBP12/YY1-Komplex in der Niere und darüber hinaus im kardiovaskulären, gastrointestinalen und zentralen Nervensystem. Kalkulation der Steigung, der r^2 - und p-Werte mittels linearer Regression (Roth et al. 2006).

System	Vergleich	Steigung	r^2	p-Wert
Renaler Kortex	ARNT vs. FKBP12	-2.6±0.4	0.9618	0.0193
	ARNT vs. YY1	-0.6±0.0	0.9922	0.0039
Kardiovaskulär	ARNT vs. FKBP12	-1.8±0.8	0.2843	0.0606
	ARNT vs. YY1	-1.1±0.5	0.3012	0.0521
Gastrointestinal	ARNT vs. FKBP12	-1.2±0.5	0.1439	0.0093
	ARNT vs. YY1	-0.7±0.3	0.1152	0.0210
Zentrales Nervensystem	ARNT vs. FKBP12	-0.9±0.3	0.0590	0.0015
	ARNT vs. YY1	-1.1±0.2	0.2368	< 0.0001

Da die Fibrogenese einen in sämtlichen parenchymatösen Organen existenten komplexen Inflammationsprozess darstellt, in dem das zentrale Mediatorzytokin TGF- β 1 über die intrinsische Kopplung der SMAD-Signaltransduktionskaskaden mit seinem natürlichen Gegenspieler BMP7 eine effektive Antagonisierung erfährt (Border und Noble 1994, Spiekerkoetter et al. 2013, Weiskirchen und Meurer 2013, Zeisberg EM et al. 2007, Zeisberg M et al. 2007), sind die antifibrotischen Effekte der mit einer BMPR1A-Induktion assoziierten FKBP12/YY1/ARNT-Signalkaskade nicht ausschließlich als renale Spezifität anzunehmen (Liang et al. 2013). Die deutliche Remission des chronischen Vernarbungsprozesses infolge einer Depletion des Transkriptionsfaktors Yy1 ist auch im Lungengewebe detektierbar (Lin X et al. 2011) und untermauert somit die Theorie eines ubiquitär existenten Induktionsmechanismus mit therapeutischem Potential hinsichtlich einer Vielzahl von fibroseassoziierten Erkrankungen.

Weiterhin bestehen relevante Zusammenhänge zum Verfahren der ischämischen Präkonditionierung, eines seit 1986 bekannten endogenen Schutzimpulses, bei dem kurze intermittierende Ischämie-Reperusionsphasen die Toleranz, Reparatur- und Regenerationsfähigkeit des Gewebes gegenüber Auswirkungen eines konsekutiven irreversiblen Organschadens erhöhen. Es stellt ein in Niere, Herz, Lunge, Leber, Darm, Haut und Gehirn dokumentiertes Phänomen dar, dessen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bislang jedoch nicht abschließend geklärt werden konnten (Aksöyek et al. 2002, Clavien et al. 2000, Iliodromitis et al. 2007, Jensen et al. 2011, Kapitsinou und Haase 2015, Ma et al. 2009, Murry et al. 1986, Soncul et al. 1999, Yoon et al. 2015, Zahir et al. 1998). Interessanterweise fungiert das HIF-1 mit seiner β -Untereinheit ARNT über die Reprogrammierung des zellulären Energiemetabolismus und die Organisation zytoprotektiver antiapoptotischer Mediatoren sowie reaktiver Sauerstoffspezies als ein zentraler Modulator und wird insofern als eine potentielle Therapiestrategie zur Protektion akuter ischämischer Organschäden gehandelt (Bishop und Ratcliffe 2015, Guo et al. 2015, Hadjipanayi und Schilling 2013, Kapitsinou und Haase 2015, Murry et al. 1986). Um prinzipiell eine bessere Kontrollierbarkeit der Präkonditionierungsmethodik zu realisieren, versuchte man endogene Signalkaskaden pharmakologisch zu imitieren. In diesem Kontext zeigte

die Vorbehandlung mit niedrigdosiertem FK506 in verschiedenen In-vitro- und In-vivo-Modellen des akuten Organversagens signifikante Prävention gegenüber experimentell induzierten Ischämie-Reperfusionsschäden (IRI, *ischemia-reperfusion injury*) (Cicora et al. 2012, Feng X et al. 2011, Hüser et al. 2009, Labrande et al. 2006, Spiekerkoetter et al. 2013, Stringa et al. 2016, Yang CW et al. 2001). Basierend auf der in vielfachen präklinischen Versuchsmodellen dargelegten Effektivität der FK506-Präkonditionierung werden derzeit marginale Lebertransplantate im Rahmen einer randomisierten Multicenterstudie vor Transplantation *ex vivo* mit dem Pharmakon perfundiert, mit der Intention zukünftig den komplexe Inflammationsprozess des IRI sowie eine mögliche Transplantatdysfunktion wirkungsvoll zu inhibieren (*ClinicalTrials.gov* - Kennung: NCT01564095, Pratschke et al. 2013).

Da auch in der vorliegenden Arbeit einen Tag vor Induktion eines irreversiblen Parenchymschadens die zu untersuchenden Mausekollektive mit dem Immunmodulator präkonditioniert wurden, darf spekuliert werden, inwiefern die explizit verfrühte Supplementation pikomolarer FK506-Dosen unabhängig von einer Calcineurininhibition die Resistenz des Tubulusepithels gegenüber den Pathomechanismen des chronischen Fibrosierungsprozesses steigert. Diskutabel bleibt die Rolle des Transkriptionsfaktors ARNT, der sowohl physiologisch über ein hypoxiebedingtes zelluläres Adaptationsprogramm als auch exogen über pikomolare Mengen FK506 - und damit weitaus spezifischer - zukünftig die Restitution der beschädigten Gewebearchitektur modulieren könnte.

Insgesamt stellt die Dissoziation des FKBP12/YY1-Repressorkomplexes durch Präkonditionierung mit pikomolaren Tacrolimusmengen bzw. durch Repression von FKBP12 oder YY1 und die konsekutive transkriptionelle *ARNT*-Aktivierung mit *ARNT*-Bindung in der *BMPR1A*-Promotorregion ein in zahlreichen parenchymatösen Organen existentes Phänomen dar und könnte damit eine aussichtsreiche Therapieoption zur Protektion des chronischen Organversagens offerieren. In welchem Maße die Tacrolimus-assoziierte BMP-Signaltransduktion als positiver Regulator einer phänotypischen epithelialen Integrität fungiert, müssen zukünftige (prä-)klinische Studien unter Berücksichtigung der hier diskutierten Limitationen beantworten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Progression der chronischen und terminalen Niereninsuffizienz stellt aufgrund mangelnder regenerativer Therapiestrategien ein globales sozioökonomisches und gesundheitspolitisches Problem dar. Mit Etablierung ihres renoprotektiven Potentials eröffnen das BMP7 und seine sich bereits in der klinischen Phase II-Prüfung befindlichen Wirkstoffanaloga nun erstmals die Möglichkeit eines zielgerichteten antifibrotischen Behandlungskonzepts. Der fortschreitende Strukturverlust der Niere resultiert allerdings in einer effektiven Negativregulation des Morphogens, wohingegen der Typ I-Rezeptor *Bmpr1a*, wesentlicher Transduktor der BMP7-spezifischen SMAD1/5/8-Signalkaskade im Tubulusepithel, im murinen Niereninsuffizienzmodell selektiv induziert wird. Weiterhin korreliert die tubuloepitheliale *Bmpr1a*-Defizienz der Maus mit einer Exazerbation des renalen Destruktionsprozesses. Der Calcineurininhibitor Tacrolimus (FK506) gilt als Firstline-Therapeutikum nach erfolgter Nierentransplantation. Diesbezüglich ergaben systembiologische Datenanalysen unter Abruf der webbasierten *disease platform Nephroseq* Hinweise auf eine durch den Immunmodulator vermittelte BMPR1A-Stimulation in epithelialen Zellentitäten. Überdies ist die protektive Triggerfunktion einer pharmakologischen FK506-Präkonditionierung im Zusammenhang akuter Organschäden hinreichend untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss des Pharmakons auf die BMPR1A-Expression *in vitro* in immortalisierten proximalen Tubulusepithelzelllinien (HK-2-, MCT-Zellen), *in vivo* im murinen Fibrosemodell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) sowie in Biopsaten humaner Transplantatnieren zu determinieren. Ferner erforderten die hypothetisierten Induktionsmechanismen eine nähere Charakterisierung.

Molekularbiologische Analysen bestätigten in der Zellkultur infolge einer Präkonditionierung mit verschiedenen immunsuppressiven Therapeutika (MMF, CsA, FK506) die Spezifität einer FK506-modulierten BMPR1A-Induktion. Indes zeigte FK506 keine Wirksamkeit auf die Expression der BMP7-Rezeptoren BMPR1B und BMPR2.

Die Effektivität von geringdosiertem Tacrolimus (0,02, 0,075, 0,2 mg/kg KG/Tag) auf den arbiträren Pathomechanismus der renalen Fibrogenese wurde nach zehntägiger einseitiger Harnleiterokklusion in C57BL/6J-Mäusen untersucht. Im Vergleich zum *vehicle*-behandelten Kontrollkollektiv manifestierte sich unter FK506-Exposition die signifikante dosisabhängige *Bmpr1a*-Hochregulation in Assoziation mit einer konsekutiven Phosphorylierung der Smad1/5/8-Proteine als Charakteristikum einer funktionalen Rezeptoraktivität. Demgegenüber unterlagen die Typ I- und Typ II-Rezeptoren *Bmpr1b* bzw. *Bmpr2* in sämtlichen Behandlungsgruppen einer deutlichen Suppression und untermauerten die Selektivität der detektierten FK506/BMPR1A-Interaktion. Weiterhin waren die sich als Ausdruck progredienter Nierenschädigung darstellende interstitielle Fibrose mit simultaner tubulärer Atrophie sowie die Akkumulation der profibrotischen Markerproteine α SMA, *Fsp1* und Collagen-1 im histomorphologischen Korrelat der ureterligierten Niere durch Tacrolimusapplikation sukzessiv reprimiert. Dagegen konnte in jeglichen Mauskollektiven mittels analog vollzogener Expressionsanalysen ein FK506-spezifischer Effekt auf die kontralaterale scheinoperierte Niere ausgeschlossen werden. Bei der ELISA-basierten Spiegelmessung lag die Tacrolimuskonzentration im murinen Vollblut etwa 10- bis 20-fach niedriger als der nach Nierentransplantation empfohlene

immunsuppressive Talspiegel. Folglich geht die FK506-evozierte Nephroprotektion nicht mit einer pharmakologischen Calcineurininhibition und deren assoziierten Nebenwirkungen einher.

Die zur Spezifizierung zugrundeliegender Induktionsmechanismen erfolgte kontrollierte zellexperimentelle Translationshemmung ließ auf die De-novo-Translation eines unbekanntes Transkriptionsfaktors schließen, welcher durch Bindung von Sequenzmotiven in der *BMPR1A*-Promotorregion dessen Transkription initiiert. Mittels RT² Profiler PCR Array und nachfolgendem Sequenzabgleich konnten sechs potentielle Kandidaten mit Bindungsmotiven in der *BMPR1A*-Promotorregion identifiziert werden. Während der RNAi-vermittelten Stummschaltung putativer Transkriptionsfaktoren führte einzig das transiente Arnt-Silencing zu keiner potenten FK506-assoziierten *Bmpr1a*-Induktion und stützt dessen funktionelle rezeptorspezifische Relevanz. Zudem gelang bei Validierung ermittelter Transkriptionsfaktoren *in vitro* im proximalen Tubulusepithel sowie *in vivo* in obstruierten Mäusen der Nachweis einer signifikanten FK506-abhängigen Arnt-Induktion. Abschließende morphometrische Analysen in Transplantatnieren von Patienten unterschiedlicher immunsuppressiver Therapieregime zeigten im FK506-behandelten Kollektiv verstärkte Expressionsmuster der Zielgene *BMPR1A* und *ARNT*, die in Assoziation mit einer konsekutiven Aktivierung der pSMAD1/5/8-Signaltransduktionskaskade standen. In diesem Kontext erlaubte die in Nephroseq implementierte nachträgliche Verschneidung mit klinischen Phänotypen, die generierten Resultate *in silico* in weiteren Transplantatnieren zu konsolidieren. Gleichzeitig ließ sich durch die funktionale Annotation eine signifikante Korrelation zwischen der FK506-modulierten transkriptionellen *ARNT*-Reprogrammierung in peripheren Leukozyten des Bluts und des korrespondierenden Nierenparenchyms determinieren. Als potentieller nierenrelevanter Biomarker offeriert *ARNT* somit die Option auf ein therapeutisches Monitoring. Zusammenfassend konnte sich die Tacrolimus-assoziierte *BMPR1A*-Induktion als positiver Regulator der tubuloepithelialen Integrität bestätigen. Dabei sensibilisiert die konservierte Rezeptorfunktionalität die beschädigte Gewebearchitektur für die antifibrotische Wirkung des Morphogens *BMP7* und bedingt die Remission des tubulointerstitiellen Fibrosierungsprozesses. Kausale molekulare Mechanismen inkludieren die De-novo-Synthese des Transkriptionsfaktors *ARNT*, wobei dessen Induktion vermutlich auf der FK506-modulierten Dissoziation eines transkriptionellen Repressorkomplexes aus dem Immunophilin *FKBP12* und dem Transkriptionsfaktor *YY1* beruht. Diese reziproke Korrelation von *FKBP12/YY1* einerseits und der *ARNT/BMP*-Signaltransduktion andererseits ist ferner in zahlreichen parenchymatösen Organen determinierbar, sodass die über FK506-Präkonditionierung vermittelte endogene Toleranzerhöhung insgesamt eine vielversprechende Therapiestrategie zur Protektion des chronischen Organversagens darstellen könnte. Entsprechende Zusammenhänge bedürfen einer weiteren Präzision im Rahmen humaner Kohortenstudien.

6. ANHANG

6.1 Genontologie-Analyse mittels webbasierter Datenbanken

Material

Software und Datenbanken

GEO	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
Nephroseq	https://www.nephroseq.org/resource/login.html
PASTAA	http://trap.molgen.mpg.de/PASTAA.htm
STRING	http://string-db.org/

Methoden

Die Datensätze wurden gemäß allgemeinen Empfehlungen und Richtlinien analysiert (Rung und Brazma 2013) und sind in der Gene Expression Omnibus (GEO)-Datenbank unter Angabe der jeweiligen GEO-Zugangsnummer (GSE) öffentlich zugänglich.

Prädiktion FK506-regulierter Transkriptionsfaktoren

Durch Abruf der *disease platform* Nephroseq ([nephroseq.org](http://www.nephroseq.org)) wurden die 5 % der unter FK506-Exposition signifikant höchst induzierten Gene identifiziert. Die Analyse von Bindungsaffinitäten inkludierte genomweite Transkriptionsdatensätze bioaktiver *small molecules* (GEO-Zugangsnummer GSE5258) und erfolgte 200 bp *upstream* der TSS des jeweiligen Gens unter Zuhilfenahme des Algorithmus PASTAA (Predicting ASSociated Transcription factors from Annotated Affinities) bei maximalen Zugehörigkeitsniveau und einem Signifikanzniveau von $p < 0.05$ (Hieronymus et al. 2006, Lamb et al. 2006, Roider et al. 2007).

Erstellen eines funktionalen Gen-Netzwerk-Diagramms

Die Protein-Interaktionsnetzwerk-Analyse und die Darstellung der Protein-Protein-Interaktionen wurden mittels der Software STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) unter Benutzung des höchsten Konfidenzniveaus (0,900) vollzogen (Szklarczyk et al. 2015).

Analyse von humanen Transkriptom-Arraydaten

Humane Transkriptomarrays wurden der webbasierten Datenbank Nephroseq entnommen und \log_2 -transformiert. Die GEO-Zugangsnummern sowie die jeweils korrespondierenden Publikationen sind in der Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: GEO-Zugangsdaten und korrespondierende Publikationen

GEO-Zugangsnummer	Publikation
GSE1563	Flechner et al. 2004
GSE69438	Ju et al. 2015
GSE66494	Nakagawa et al. 2015
GSE35487	Reich et al. 2010
GSE3526	Roth et al. 2006
GSE21785	Schmid et al. 2006
GSE30566	Woroniecka et al. 2011

Statistische Auswertung

Mittels linearer Regressionsanalysen erfolgte der Vergleich der jeweils forcierten Parameter. Angaben bezüglich der Größe des Korrelationskoeffizienten (r), des Gruppenumfangs (n) sowie des Signifikanzniveaus (p -Wert) sind den korrespondierenden Graphen und Tabellen zu entnehmen.

Die in Einleitung und Diskussion dargestellten systembiologischen Datenanalysen wurden von Herrn Dr. med. Björn Tampe durchgeführt.

6.2 Vollständige unbearbeitete Western Blot-Gele

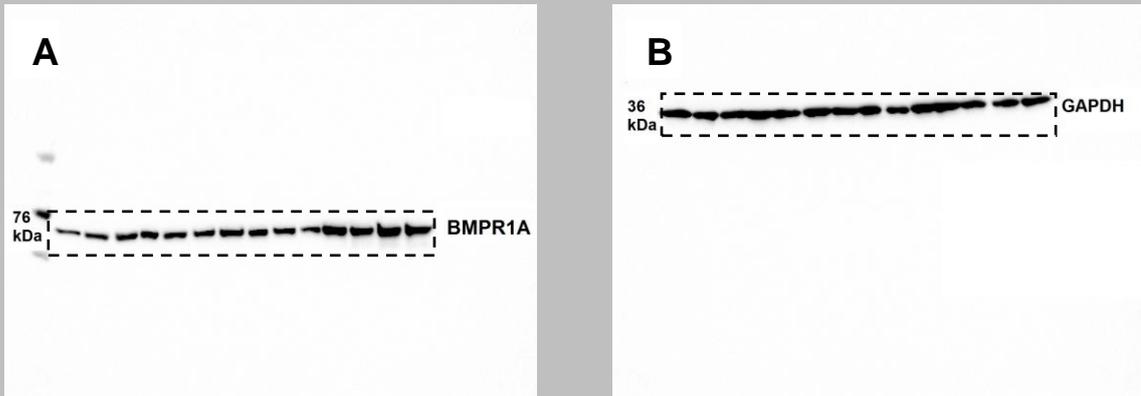
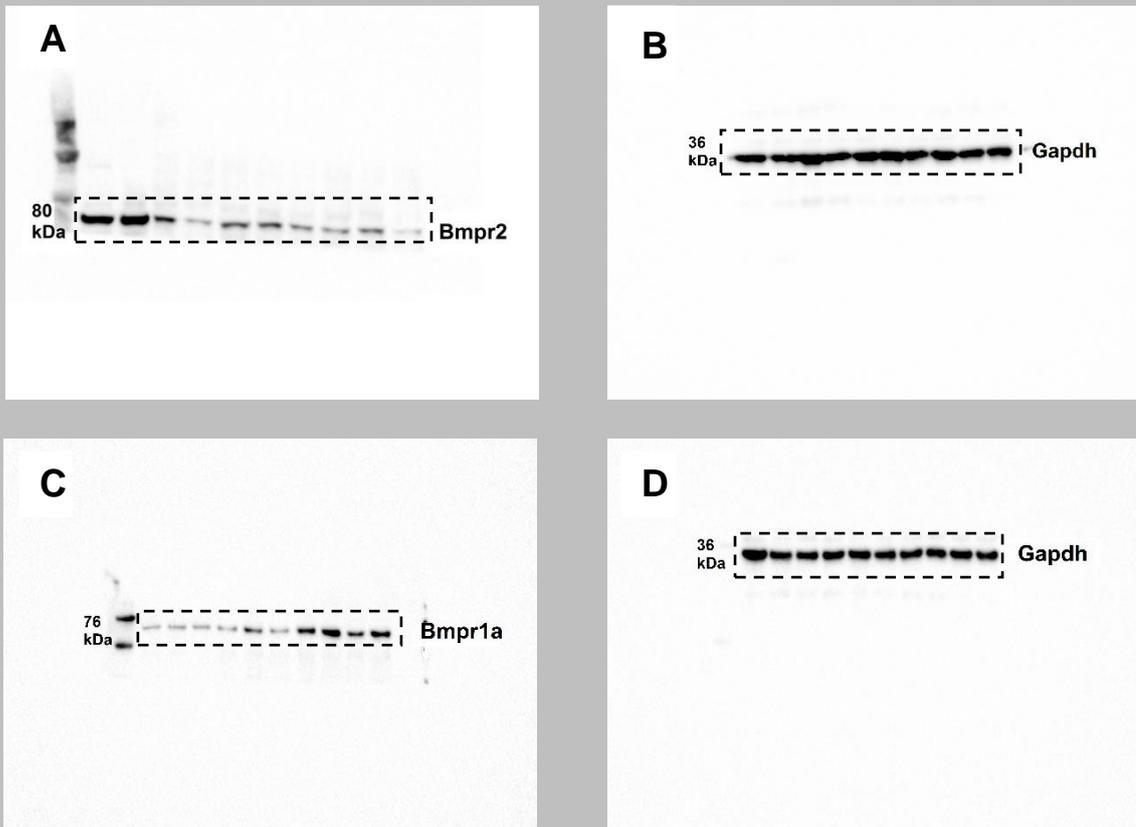


Abbildung 32: BMPR1A- (A) und GAPDH-Expression (B) in HK-2-Zellen nach pharmakologischer Präkonditionierung. Gele korrespondieren zu Abbildung 9 (A).



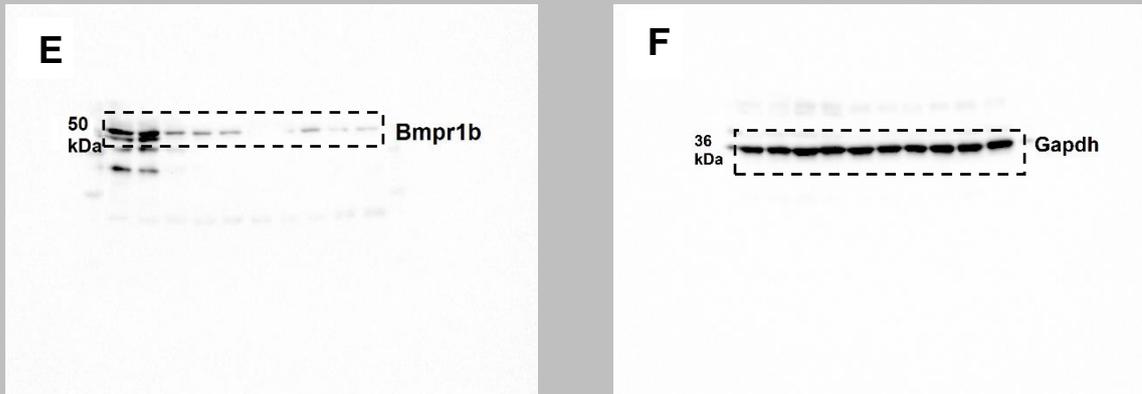


Abbildung 33: Expression der Bmp-Rezeptoren (A,C,E) und Haushaltsgene (B,D,F) *in vivo*. Gele korrespondieren zu [Abbildung 11 \(D\)](#).

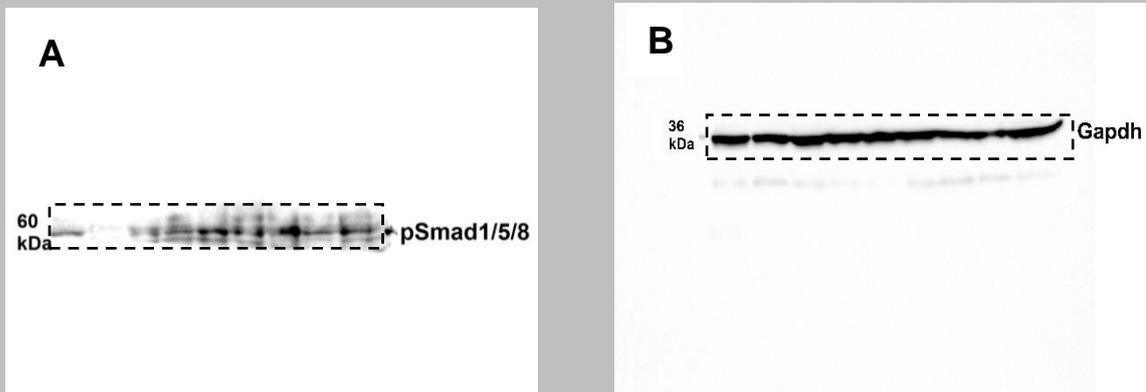


Abbildung 34: pSmad1/5/8- (A) und Gapdh-Expression (B) *in vivo*. Gele korrespondieren zu [Abbildung 12 \(D\)](#).

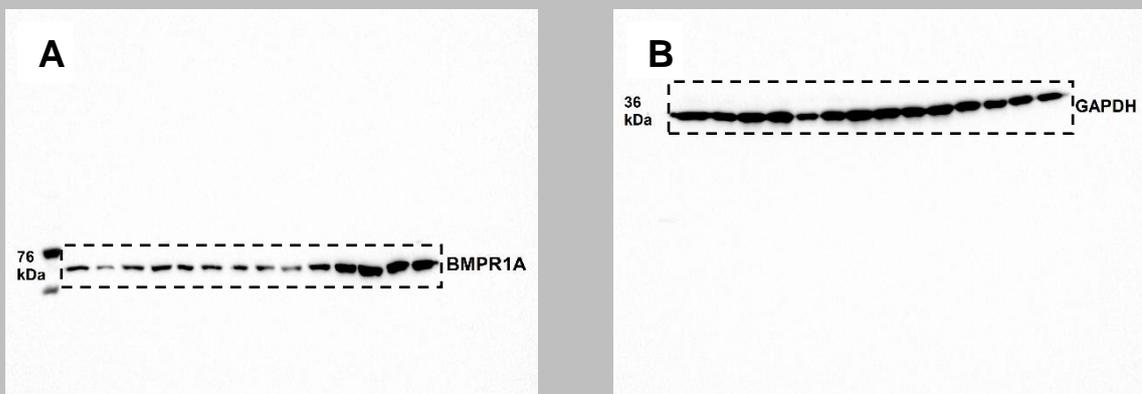


Abbildung 35: BMPR1A- (A) und GAPDH-Expression (B) in HK-2-Zellen nach Cycloheximid-Präinkubation. Gele korrespondieren zu [Abbildung 18 \(B\)](#).

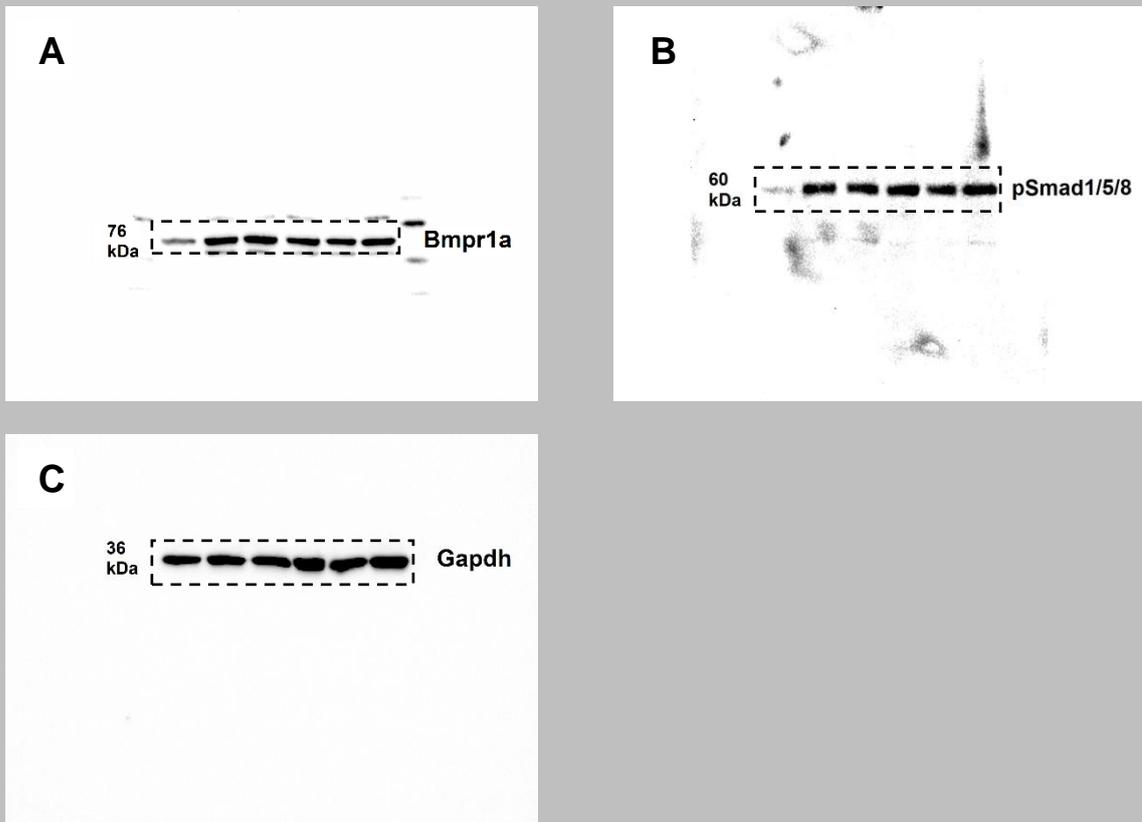


Abbildung 36: Bmpr1a- (A), pSmad1/5/8- (B) und Gapdh-Expression (C) in MCT-Zellen nach FK506-Präkonditionierung. Gele korrespondieren zu [Abbildung 21 \(B\)](#).

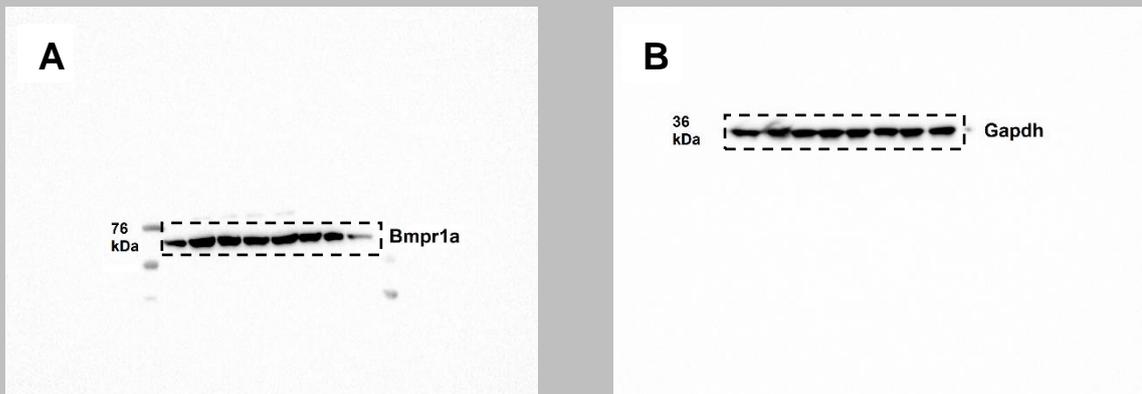


Abbildung 37: Bmpr1a- (A) und Gapdh-Expression (B) in MCT-Zellen nach RNAi-basiertem Silencing und FK506-Präkonditionierung. Gele korrespondieren zu [Abbildung 24 \(A\)](#).

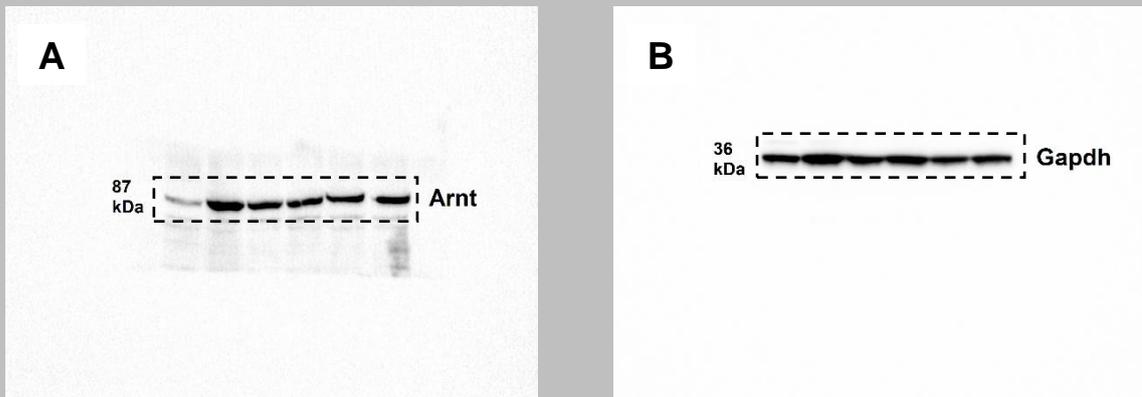


Abbildung 38: Arnt- (A) und Gapdh-Expression (B) in MCT-Zellen nach FK506-Präkonditionierung. Gele korrespondieren zu [Abbildung 25 \(A\)](#).

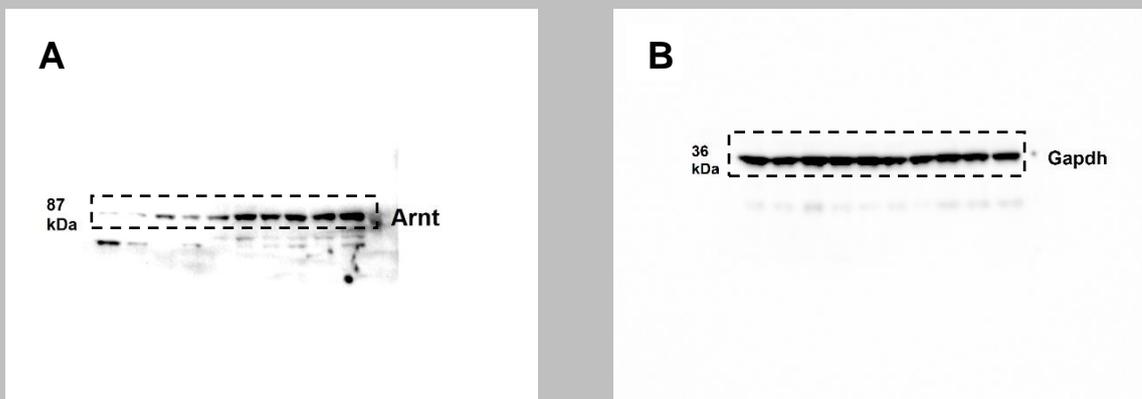


Abbildung 39: Arnt- (A) und Gapdh-Expression (B) *in vivo*. Gele korrespondieren zu [Abbildung 26 \(A\)](#).

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Aksöyek S**, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Oztürk C, Gürbüz P, Nayci A, Oral U (2002): Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock* 18, 476-480
- Arrhenius S**: Immunochemie. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1907
- Attisano L**, Wrana JL (2002): Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296, 1646-1647
- Bakris GL**, Ritz E; World Kidney Day Steering Committee (2009): The message for World Kidney Day 2009: hypertension and kidney disease, a marriage that should be prevented. *Iran J Kidney Dis* 3, 7-10
- Barbarino JM**, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB (2013): PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics* 10, 563-585
- Barker CF**, Markmann JF (2013): Historical overview of transplantation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3, a014977
- Barreiro C**, Prieto C, Sola-Landa A, Solera E, Martínez-Castro M, Pérez-Redondo R, García-Estrada C, Aparicio JF, Fernández-Martínez LT, Santos-Aberturas J (2012): Draft Genome of *Streptomyces tsukubaensis* NRRL 18488, the Producer of the Clinically Important Immunosuppressant Tacrolimus (FK506). *J Bacteriol* 194, 3756-3757
- Bechtel W**, Zeisberg M (2009): Bone Morphogenic Protein-7 (BMP7) and the kidneys: insights into the future management of chronic kidney diseases. *Dtsch Med Wochenschr* 134, 1688-1691
- Becknell B**, Greenbaum LA, Smoyer WE (2012): A new 'tac' for childhood nephrotic syndrome. *Kidney Int* 82, 1049-1051
- Benet LZ**, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wachter VJ (1999): Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release* 62, 25-31
- Bernstein E**, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366
- Bishop T**, Ratcliffe PJ (2015): HIF hydroxylase pathways in cardiovascular physiology and medicine. *Circ Res* 117, 65-79
- Böttinger EP**, Bitzer M (2002). TGF- β signaling in renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13, 2600-2610
- Bohle A**, Grund KE, Mackensen S, Tolon M (1977): Correlations between renal interstitium and level of serum creatinine. Morphometric investigations of biopsies in perimembranous glomerulonephritis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 373, 15-22
- Bohle A**, Mackensen-Haen S, von Gise H (1987): Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution. *Am J Nephrol* 7, 421-433
- Bohle A**, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Vogl W, Schmitt H, Müller CA, Müller GA (1992): The long-term prognosis of the primary glomerulonephritides. A morphological and clinical analysis of 1747 cases. *Pathol Res Pract* 188, 908-924
- Boor P**, Ostendorf T, Floege J (2010): Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6, 643-656
- Border WA**, Noble NA (1994): Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *New Engl J Med* 331, 1286-1292
- Border WA**, Okuda S, Languino LR, Ruoslahti E (1990): Transforming growth factor-beta regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int* 37, 689-695

- Bramlage** CP, Tampe B, Koziolok M, Maatouk I, Bevanda J, Bramlage P, Ahrens K, Lange K, Schmid H, Cohen CD (2010): Bone Morphogenetic Protein (BMP)-7 expression is decreased in human hypertensive nephrosclerosis. *BMC Nephrol* 11, 31
- Bramlage** CP, Müller GA, Tampe B, Bevanda J, Maatouk I, Koziolok M, Lange K, Ahrens K, Schmid H, Cohen CD (2011): The role of bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) in human nephrosclerosis. *J Nephrol* 24, 647-655
- Bröcker** V, Kreipe H, Haller H (2010): Tubulointerstitielle Fibrose. Endstrecke aller Nierenerkrankungen, prognostischer Faktor oder Pathomechanismus? *Nephrologe* 5, 284-292
- Calne** R (2004): Cyclosporine as a milestone in immunosuppression. *Transplant Proc* 36, 135-155
- Celeste** AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM (1990): Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9843-9847
- Chang** H, Brown CW, Matzuk MM (2002): Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 23, 787-823
- Chang** MM, Lovett J (2011): A laboratory exercise illustrating the sensitivity and specificity of Western blot analysis. *Biochem Mol Biol Educ* 39, 291-297
- Charnig** MJ, Kinnunen P, Hawker J, Brand T, Schneider MD (1996): FKBP-12 recognition is dispensable for signal generation by type I transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 271, 22941-22944
- Chen** D, Ji X, Harris MA, Feng JQ, Karsenty G, Celeste AJ, Rosen V, Mundy GR, Harris SE (1998): Differential roles for bone morphogenetic protein (BMP) receptor type IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages. *J Cell Biol* 142, 295-305
- Chen** YG, Liu F, Massagué J (1997): Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J* 16, 3866-3876
- Chevalier** RL, Forbes MS, Thornhill BA (2009): Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and nephropathy. *Kidney Int* 75, 1145-1152
- Cho** SG, Du Q, Huang S, Dong Z (2010): Drp1 dephosphorylation in ATP depletion induced mitochondrial injury and tubular cell apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F199-206
- Chomczynski** P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159
- Christians** U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A (2002): Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 41, 813-851
- Cicora** F, Roberti J, Vasquez D, Guerrieri D, Lausada N, Cicora P, Palti G, Chuluyan E, Gonzalez P, Stringa P (2012): Preconditioning donor with a combination of tacrolimus and rapamycin to decrease ischaemia-reperfusion injury in a rat syngenic kidney transplantation model. *Clin Exp Immunol* 167, 169-177
- Clavien** PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC (2000): Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 232, 155-162
- ClinicalTrials.gov**, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA. Kennung: NCT01830920. A Study of THR-184 in Patients at Risk of Developing Cardiac Surgery Associated-Acute Kidney Injury (CSA-AKI). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01830920?term=NCT01830920&rank=1> (Zugriff im April 2016)
- ClinicalTrials.gov**, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA. Kennung: NCT01564095. TOP-Study (Tacrolimus Organ Perfusion): Treatment of Ischemia Reperfusion Injury in Marginal Organs With an ex Vivo Tacrolimus Perfusion (TOP). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01564095?term=NCT01564095&rank=1> (Zugriff im April 2016)
- Crabtree** GR, Olson EN (2002): NFAT signaling: choreographing the social lives of cells. *Cell* 109 Suppl, S67-79
- Danesh** SM, Villasenor A, Chong D, Soukup C, Cleaver O (2009): BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis. *Gene Expr Patterns* 9, 255-265

- Deepak S**, Kottapalli K, Rakwal R, Oros G, Rangappa K, Iwahashi H, Masuo Y, Agrawal G (2007): Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics* **8**, 234-251
- Denton MD**, Magee CC, Sayvegh MH (1999): Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* **353**, 1083-1091
- Déry MA**, Michaud MD, Richard DE (2005): Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 535-540
- Derynck R**, Zhang YE (2003): Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-584.
- Derynck R**, Zhang Y, Feng XH (1998): Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* **95**, 737-740
- Dewulf N**, Verschueren K, Lonnoy O, Morén A, Grimsby S, Vande Spiegle K, Miyazono K, Huylebroeck D, Ten Dijke P (1995): Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for bone morphogenetic proteins during mouse embryogenesis. *Endocrinology* **136**, 2652-2663
- DGFN**, Deutsche Gesellschaft für Nephrologie (2014): Daten und Fakten zur Nephrologie. <http://www.dgfn.eu/presse/downloadbereich.html> (Zugriff im September 2015)
- DGFN und DTG** (2012): Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie und der Deutschen Transplantationsgesellschaft zur Erstattungsfähigkeit der immunsuppressiven Kombination von Tacrolimus mit Mycophenolat Mofetil oder Mycophenolsäure nach Nierentransplantation. <http://www.dgfn.eu/presse/aktuelles/meldungen/artikel/erstattungsfahigkeit-der-immunsuppressiven-kombination-von-tacrolimus-mit-mycophenolat-mofetil-oder.html> (Zugriff im September 2015)
- Di Giovanni V**, Alday A, Chi L, Mishina Y, Rosenblum ND (2011): Alk3 controls nephron number and androgen production via lineage-specific effects in intermediate mesoderm. *Development* **138**, 2717-3727
- Dooley S**, Hamzavi J, Ciucan L, Godoy P, Ilkavets I, Ehnert S, Ueberham E, Gebhardt R, Kanzler S, Geier A (2008): Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-beta-mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology* **135**, 642-659
- DSO**, Deutsche Stiftung Organtransplantation: Organspende und Transplantation in Deutschland - Jahresbericht 2014. Frankfurt/Main 2015. http://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/JB_2014_Web_1.pdf (Zugriff im September 2015)
- Ducy P**, Karsenty G (2000): The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* **57**, 2207-2214
- Dudley AT**, Robertson EJ (1997): Overlapping expression domains of bone morphogenetic protein family members potentially account for limited tissue defects in BMP7 deficient embryos. *Dev Dyn* **208**, 349-362
- Dudley AT**, Lyons KM, Robertson EJ (1995): A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* **9**, 2795-2807
- Duplay P**, Thome M, Hervé F, Acuto O (1994): p56lck interacts via its src homology 2 domain with the ZAP-70 kinase. *J Exp Med* **179**, 1163-1172
- Dyxhoorn DM**, Novina CD, Sharp PA (2003): Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 457-67
- Eddy AA** (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* **7**, 2495-2508
- Eddy AA**, López-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I (2012): Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol* **27**, 1233-1247
- Enguchi H**, Ikuta T, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K (1997): A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1beta is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *J Biol Chem* **272**, 17640-17647
- Ekberg H**, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vítko S, Nashan B, Gürkan A, Margreiter R, Hugo C, Grinyó JM, Frei U (2007): Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. *N Engl J Med* **357**, 2562-2575

- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001):** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200
- Engvall E, Perlmann P (1971):** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874
- ERA-EDTA Registry:** ERA-EDTA Registry Annual Report 2013. Academic Medical Center, Department of Medical Informatics, Amsterdam 2015.
<http://www.era-edta-reg.org/files/annualreports/pdf/AnnRep2013.pdf> (Zugriff im September 2015)
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987):** Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413-7417
- Feng X, Li J, Liu J, Jin M, Liu X, Du H, Zhang L, Sun Z, Li X (2011):** Protective effect of FK506 on myocardial ischemia/reperfusion injury by suppression of CaN and ASK1 signaling circuitry. *Cardiovasc Toxicol* 11, 18-27
- Feng XH, Derynck R (1997):** A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J* 16, 3912-3923
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998)** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811
- Flechner SM, Kurian SM, Head SR, Sharp SM, Whisenant TC, Zhang J, Chismar JD, Horvath S, Mondala T, Gilmarin T (2004):** Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant* 4, 1475-1489
- Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Billis K, Brent S, Carvalho-Silva D, Clapham P, Coates G, Fitzgerald S (2014):** Ensembl 2014. *Nucleic Acids Res* 42, D749-755
- Floege J, Gröne HJ (1995):** Progression of renal failure: what is the role of cytokines? *Nephrol Dial Transplant* 10, 1575-1586
- Frei U, Schober-Halstenberg HJ:** Nierenersatztherapie in Deutschland: Bericht über die Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. QuaSi-Niere gGmbH, Berlin 2008.
http://www.bundesverband-niere.de/fileadmin/user_upload/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf (Zugriff im September 2015)
- Furic-Cunko V, Kes P, Coric M, Hudolin T, Kastelan Z, Basic-Jukic N (2015):** Expression of bone morphogenetic proteins 4, 6 and 7 is downregulated in kidney allografts with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *Int Urol Nephrol* 47, 1219-1229
- Galat A (2013):** Functional diversity and pharmacological profiles of the FKBP5 and their complexes with small natural ligands. *Cell Mol Life Sci* 70, 3243-3275
- Gassmann M, Grenacher B, Rohde B, Vogel J (2009):** Quantifying Western blots: pitfalls of densitometry. *Electrophoresis* 30, 1845-1855
- Godin RE, Robertson EJ, Dudley AT (1998):** Role of BMP family members during kidney development. *Int J Dev Biol* 43, 405-411
- Gordon KJ, Blobel GC (2008):** Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782, 197-228
- Gould SE, Day M, Jones SS, Dorai H. (2002):** BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells. *Kidney Int* 61, 51-60
- Grande MT, Sánchez-Laorden B, López-Blau C, De Frutos CA, Boutet A, Arévalo M, Rowe RG, Weiss SJ, López-Novoa JM, Nieto MA (2015):** Snail1-induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* 21, 989-997
- Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003):** Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biol* 4, 117

- Greenburg G**, Hay ED (1982): Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95, 333-339
- Griffith DL**, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC, Carlson WD (1996): Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 878-883
- Griffith JP**, Kim JL, Kim EE, Sintchak MD, Thomson JA, Fitzgibbon MJ, Fleming MA, Caron PR, Hsiao K, Navia MA (1995): X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* 82, 507-522
- Grimm M**, Rinaldi M, Yonan NA, Arpesella G, Arizón Del Prado JM, Pulpón LA, Villemot JP, Frigerio M, Rodriguez Lambert JL, Crespo-Leiro MG (2006): Superior prevention of acute rejection by tacrolimus vs. cyclosporine in heart transplant recipients - a large European trial. *Am J Transplant* 6, 1387-1397
- Guo Y**, Feng L, Zhou Y, Sheng J, Long D, Li S, Li Y (2015): Systematic review with meta-analysis: HIF-1 α attenuates liver ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando)* 29, 127-134
- Haaijman A**, Burger EH, Goei SW, Nelles L, ten Dijke P, Huylebroeck D, Bronckers AL (2000): Correlation between ALK-6 (BMP-7) distribution and responsiveness to osteogenic protein-1 (BMP-7) in embryonic mouse bone rudiments. *Growth Factors* 17, 177-192
- Hadjipanayi E**, Schilling AF (2013): Hypoxia-based strategies for angiogenic induction: the dawn of a new era for ischemia therapy and tissue regeneration. *Organogenesis* 9, 261-272
- Hartwig S**, Bridgewater D, Di Giovanni V, Cain J, Mishina Y, Rosenblum ND (2008): BMP receptor ALK3 controls collecting system development. *J Am Soc Nephrol* 19, 117-124
- Hata A**, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A (1998): Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 186-197
- Haverty TP**, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, Kefalides NA, Neilson EG (1988): Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. *J Cell Biol*. 107, 1359-1368
- Hayashi H**, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA Jr, Wrana JL (1997): The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF β receptor and functions as an antagonist of TGF β signaling. *Cell* 89, 1165-1173
- Hazen VM**, Phan KD, Hudiburgh S, Butler SJ (2001): Inhibitory Smads differentially regulate cell fate specification and axon dynamics in the dorsal spinal cord. *Dev Biol* 356, 566-575
- Hebert MF** (1997): Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 27, 201-214
- Heinemeyer T**, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA (1998): Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 26, 362-367
- Heldin CH**, Miyazono K, ten Dijke P (1997): TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465-471
- Herpin A**, Lelong C, Favrel P (2004): Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol* 28, 461-485
- Hieronymus H**, Lamb J, Ross KN, Peng XP, Clement C, Rodina A, Nieto M, Du J, Stegmaier K, Raj SM (2006): Gene expression signature-based chemical genomic prediction identifies a novel class of HSP90 pathway modulators. *Cancer Cell* 10, 321-330
- Higuchi R**, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* 10, 413-417

- Higuchi R**, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993): Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 11, 1026-1030
- Hirose K**, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y (1996): cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* 16, 1706-1713
- Holdsworth SR**, Summers SA (2008): Role of mast cells in progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 19, 2254-2261
- Hruska KA**, Guo G, Wozniak M, Martin D, Miller S, Liapis H, Loveday K, Klahr S, Sampath TK, Morrissey J (2000): Osteogenic protein-1 prevents renal fibrogenesis associated with ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol* 279, F130-143
- Humphreys BD**, Lin SL, Kobayashi A, Hudson TE, Nowlin BT, Bonventre JV, Valerius MT, McMahon AP, Duffield JS (2010): Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Am J Pathol* 176, 85-97
- Huse M**, Chen YG, Massagué J, Kuriyan J (1999): Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12. *Cell* 96, 425-436
- Hüser N**, Doll D, Altomonte J, Werner M, Kriner M, Preissel A, Thorban S, Matevosian E (2009): Graft preconditioning with low-dose tacrolimus (FK506) and nitric oxide inhibitor aminoguanidine (AGH) reduces ischemia/reperfusion injury after liver transplantation in the rat. *Arch Pharm Res* 32, 215-220
- Iliodromitis EK**, Lazou A, Kremastinos DT (2007): Ischemic preconditioning: protection against myocardial necrosis and apoptosis. *Vasc Health Risk Manag* 3, 629-637
- Imamura T**, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, Miyazono K (1997): Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* 389, 622-626
- Ishida W**, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K. (2000): Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem* 275, 6075-6079
- Ivanac-Janković R**, Ćorić M, Furić-Čunko V, Lovičić V, Bašić-Jukić N, Kes P (2015): BMP-7 protein expression is downregulated in human diabetic nephropathy. *Acta Clin Croat* 54, 164-168
- Iwano M**, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG (2002): Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 110, 341-345
- Iwasaki K** (2007): Metabolism of tacrolimus (FK 506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet* 22, 328-335.
- Izumi N**, Mizuguchi S, Inagaki Y, Saika S, Kawada N, Nakajima Y, Inoue K, Suehiro S, Friedman SL, Ikeda K (2006): BMP-7 opposes TGF-beta1-mediated collagen induction in mouse pulmonary myofibroblasts through Id2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L120-126
- Jensen HA**, Loukogeorgakis S, Yannopoulos F, Rimpiläinen E, Petzold A, Tuominen H, Lepola P, Macallister RJ, Deanfield JE, Mäkelä T (2011): Remote ischemic preconditioning protects the brain against injury after hypothermic circulatory arrest. *Circulation* 123, 714-721
- Jha V**, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY, Yang CW (2013): Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet* 382, 260-272
- Jia Z**, Johnson AC, Wang X, Guo Z, Dreisbach AW, Lewin JR, Kyle PB, Garrett MR (2015): Allelic Variants in Arhgef11 via the Rho-Rock Pathway Are Linked to Epithelial-Mesenchymal Transition and Contributes to Kidney Injury in the Dahl Salt-Sensitive Rat. *PLoS One* 10, e0132553
- John R**, Nelson PJ (2007): Dendritic cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 18, 2628-2635
- Jones CL**, Buch S, Post M, McCulloch L, Liu E, Eddy AA (1992): Renal extracellular matrix accumulation in acute puromycin aminonucleoside nephrosis in rats. *Am J Pathol* 141, 1381-1396

- Ju W, Nair V, Smith S, Zhu L, Shedden K, Song PX, Mariani LH, Eichinger FH, Berthier CC, Randolph A (2015):** Tissue transcriptome-driven identification of epidermal growth factor as a chronic kidney disease biomarker. *Sci Transl Med* 7, 316ra193
- Kalluri R, Weinberg RA (2009):** The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428
- Kang HM, Ahn SH, Choi P, Ko YA, Han SH, Chinga F, Park AS, Tao J, Sharma K, Pullman J (2015):** Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. *Nat Med* 21, 37-46
- Kang Y, Chen CR, Massagué J (2003):** A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell* 11, 915-926
- Kapitsinou PP, Haase VH (2015):** Molecular mechanisms of ischemic preconditioning in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 309, F821-834
- Kaplan B, Meier-Kriesche HU (2004):** Renal transplantation: a half century of success and the long road ahead. *J Am Soc Nephrol* 15, 3270-3271
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998):** Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 49-61
- KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) CKD Work Group (2013):** KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney inter Suppl* 3, 1-150
- KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) Transplant Work Group (2009):** KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 9 Suppl 3, S1-155
- Keller CK, Geberth SK: Praxis der Nephrologie. 3. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2010**
- Kershner RP, Fitzsimmons WE (1996):** Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 62, 920- 926
- Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H (1987):** FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J Antibiot (Tokyo)* 40, 1249-1255
- Kinoshita K, Imuro Y, Otagawa K, Saika S, Inagaki Y, Nakajima Y, Kawada N, Fujimoto J, Friedman SL, Ikeda K (2007):** Adenovirus-mediated expression of BMP-7 suppresses the development of liver fibrosis in rats. *Gut* 56, 706-714
- Klahr S, Morrissey J (2002):** Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F861-875
- Klee CB, Ren H, Wang X (1998):** Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* 273, 13367-13370
- Kleophas W, Reichel H (2007):** International study of health care organization and financing: development of renal replacement therapy in Germany. *Int J Health Care Finance Econ* 7, 185-200
- Kondo M, Cubillo E, Tobiume K, Shirakihara T, Fukuda N, Suzuki H, Shimizu K, Takehara K, Cano A, Saitoh M (2004):** A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ* 10, 1092-1101
- Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Böttinger EP, Klotman PE, Thorgeirsson SS (1996):** Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Lab Invest* 74, 991-1003
- Korchynskyi O, ten Dijke P (2002):** Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* 277, 4883-4891
- Kozak KR, Abbott B, Hankinson O (1997):** ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol* 191, 297-305
- Kriz W, Kaissling B, Le Hir M (2011):** Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest* 121, 468-474
- Kuncio GS, Neilson EG, Haverly T (1991):** Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int* 39, 550-556

- Labrande C**, Velly L, Canolle B, Guillet B, Masméjean F, Nieoullon A, Pisano P (2006): Neuroprotective effects of tacrolimus (FK506) in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate uptake and FK506 binding protein 12 kDa. *Neuroscience* 137, 231-239
- Laemmli UK** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lamb J**, Crawford ED, Peck D, Modell JW, Blat IC, Wrobel MJ, Lerner J, Brunet JP, Subramanian A, Ross KN (2006): The Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease. *Science* 313, 1929-1935
- Laskow DA**, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R, Matas A (1996): An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation* 62, 900-905
- LeBleu VS**, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R (2013): Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 19, 1047-1053
- Levin A** (2003): Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis. *Semin Dial* 16, 101-105
- Li L**, Zepeda-Orozco D, Black R, Lin F (2010): Autophagy is a component of epithelial cell fate in obstructive uropathy. *Am J Pathol* 176, 1767-1778
- Li L**, Wang ZV, Hill JA, Lin F (2014): New autophagy reporter mice reveal dynamics of proximal tubular autophagy. *J Am Soc Nephrol* 25, 305-315
- Li MO**, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AL, Flavell RA (2006): Transforming growth factor- β regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 24, 99-146
- Liang S**, Cuevas G, Tizani S, Salas T, Liu H, Li B, Habib SL (2013): Novel mechanism of regulation of fibrosis in kidney tumor with tuberous sclerosis. *Mol Cancer* 12, 49
- Lin J**, Patel SR, Cheng X, Cho EA, Levitan I, Ullenbruch M, Phan SH, Park JM, Dressler GR (2005): Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease. *Nat Med* 11, 387-393
- Lin S**, Lin Y, Nery JR, Urich MA, Breschi A, Davis CA, Dobin A, Zaleski C, Beer MA, Chapman WC (2014): Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 17224-17229
- Lin X**, Sime PJ, Xu H, Williams MA, LaRussa L, Georas SN, Guo J (2011): Yin yang 1 is a novel regulator of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 183, 1689-1697
- Liu Y** (2004): Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15, 1-12
- Liu Y** (2006): Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 69, 213-217
- Lo RS**, Chen YG, Shi Y, Pavletich NP, Massagué J (1998): The L3 loop: a structural motif determining specific interactions between SMAD proteins and TGF-beta receptors. *EMBO J* 17, 996-1005
- López-Rovira T**, Chalaux E, Massagué J, Rosa JL, Ventura F (2002): Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* 277, 3176-3185
- Lovisa S**, LeBleu VS, Tampe B, Sugimoto H, Vadnagara K, Carstens JL, Wu CC, Hagos Y, Burckhardt BC, Pentcheva-Hoang T (2015): Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* 21, 998-1009
- Lu C**, Bentley WE, Rao G (2004): A high-throughput approach to promoter study using green fluorescent protein. *Biotechnol Prog* 20, 1634-1640

- Luo G**, Hofmann C, Bronckers AL, Sohocki M, Bradley A, Karsenty G (1995): BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev* **9**, 2808–2820
- Lysaght MJ** (2002): Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol* **13 Suppl 1**, S37-40
- Ma D**, Lim T, Xu J, Tang H, Wan Y, Zhao H, Hossain M, Maxwell PH, Maze M (2009): Xenon preconditioning protects against renal ischemic-reperfusion injury via HIF-1 α activation. *J Am Soc Nephrol* **20**, 713-720
- Malek TR**, Bayer AL (2004): Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* **4**, 665-674
- Maltepe E**, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC (1997): Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* **386**, 403-407
- Maric I**, Poljak L, Zoricic S, Bobinac D, Bosukonda D, Sampath KT, Vukicevic S (2003): Bone morphogenetic protein-7 reduces the severity of colon tissue damage and accelerates the healing of inflammatory bowel disease in rats. *J Cell Physiol* **196**, 258-264
- Massagué J** (1990): The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 597-641
- Massagué J** (2000): How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 169-178
- Mayer B** (2012): Disease platforms als Grundlage integrativer Analyse in der nephrologischen Forschung. *NephroScript* **1**, 34-38.
http://www.niere-hochdruck.at/fileadmin/Dokumente/Wir_ueber_Uns/Nephro_1_2012_online.pdf (Zugriff im September 2015)
- Merrill JP**, Murray JE, Harrison JH, Guild WR (1956): Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins. *J Am Med Assoc* **160**, 277-282
- Methven S**, MacGregor MS (2009): Clinical management of chronic kidney disease. *Clin Med (Lond)* **9**, 269-272
- Mishina Y**, Suzuki A, Ueno N, Behringer RR (1995): Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev* **9**, 3027-3037
- Möller A**, Iwasaki K, Kawamura A, Teramura Y, Shiraga T, Hata T, Schäfer A, Undre NA (1999): The disposition of ¹⁴C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos* **27**, 633-636
- Morrissey J**, Hruska K, Guo G, Wang S, Chen Q, Klahr S (2002): Bone morphogenetic protein-7 improves renal fibrosis and accelerates the return of renal function. *J Am Soc Nephrol* **13 Suppl 1**, S14-21
- Motazed R**, Colville-Nash P, Kwan JT, Dockrell ME (2008): BMP-7 and proximal tubule epithelial cells: activation of multiple signaling pathways reveals a novel anti-fibrotic mechanism. *Pharm Res* **25**, 2440-2446
- Müller GA**, Markovic-Lipkovski J, Frank J, Rodemann HP (1992): The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J Am Soc Nephrol* **2**, S198-205
- Müller GA**, Zeisberg M, Strutz F (2000): The importance of tubulointerstitial damage in progressive renal disease. *Nephrol Dial Transplant* **15 Suppl 6**, 76-77
- Mullis KB**, Faloona FA (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-350
- Murakami G**, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T (2003): Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell* **14**, 2809-2817
- Murry CE**, Jennings RB, Reimer KA (1986): Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**, 1124-1136
- Naesens M**, Kuypers DR, Sarwal M (2009): Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 481-508
- Nagase K**, Iwasaki K, Nozaki K, Noda K (1994): Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes. *J Pharm Pharmacol* **46**, 113-117

- Nakagawa S**, Nishihara K, Miyata H, Shinke H, Tomita E, Kajiwara M, Matsubara T, Iehara N, Igarashi Y, Yamada H (2015): Molecular Markers of Tubulointerstitial Fibrosis and Tubular Cell Damage in Patients with Chronic Kidney Disease. *PLoS One* 10, e0136994
- Nakao A**, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH (1997): Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* 389, 631-635
- Nebel M**: Kosten der Nierenersatztherapie. In: Dialyseverfahren in Theorie und Praxis; hrsg. v. Hörl WH, Waner C; 6. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2003, 619-629
- Neuwirt H**, Perco P, Kainz A, Mühlberger I, Leierer J, Braniff SJ, Mayer B, Mayer G, Rudnicki M (2014): A 3-bio-marker-panel predicts renal outcome in patients with proteinuric renal diseases. *BMC Med Genomics* 7, 75
- Ng YY**, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Lan HY (1998): Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int* 54, 864-876
- Norton JD** (2000): ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J Cell Sci* 113, 3897-3905
- Nykänen A**, Haley B, Zamore PD (2001): ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*. 107, 309- 321
- Oka T**, Yoshimura N (1996): Immunosuppression in organ transplantation. *Jpn J Pharmacol* 71, 89-100
- Olert J**, Wiedorn KH, Goldmann T, Kühl H, Mehraein Y, Scherthan H, Niketeghad F, Vollmer E, Müller AM, Müller-Navia J (2001): HOPE fixation: a novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract* 197, 823-826.
- Ozkaynak E**, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK, Oppermann H (1990): OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family. *EMBO J* 9, 2085-2093
- Ozkaynak E**, Schnegelsberg PN, Oppermann H. (1991): Murine osteogenic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophysical Res Commun* 179, 116-123
- Palkowitsch L**, Marienfeld U, Brunner C, Eitelhuber A, Krappmann D, Marienfeld RB (2011): The Ca²⁺-dependent phosphatase calcineurin controls the formation of the Carma1-Bcl10-Malt1 complex during T cell receptor-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem*, 286, 7522-7534
- Pascal LE**, True LD, Campbell DS, Deutsch EW, Risk M, Coleman IM, Eichner LJ, Nelson PS, Liu AY (2008): Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics* 9, 246
- Peters H**, Border WA, Noble NA (1998): Targeting TGF-β overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int* 54, 1570-1580
- Pirsch JD**, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS (1997): A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 63, 977-983
- Poland A**, Knutson JC (1982): 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22, 517-554
- Potthoff F**, Münscher C, Berendes A : Jahresbericht Datenanalyse Dialyse für den Gemeinsamen Bundesausschuss. Berichtsjahr: 2011. Medical Netcare GmbH, Münster 2012.
https://www.g-ba.de/downloads/17-98-3294/2012-08-16_QSD-RL_Datenanalyt-Jahresbericht_2011_Bericht.pdf
(Zugriff im September 2015)
- Pratschke S**, Eder M, Heise M, Nadalin S, Pascher A, Schemmer P, Scherer MN, Ulrich F, Wolters H, Jauch KW (2013): Protocol TOP-Study (tacrolimus organ perfusion): a prospective randomized multicenter trial to reduce ischemia reperfusion injury in transplantation of marginal liver grafts with an ex vivo tacrolimus perfusion. *Transplant Res* 2, 3

- PubChem Substance Database**, National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/210280598#section=2D-Structure> (Zugriff im September 2015)
- Radonić A**, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004): Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 856-862
- Rahimi AR**, Leof EB (2007): TGF- β Signaling: A tale of two responses. *J Cell Biochem* 102, 593-608
- Reich HN**, Tritchler D, Cattran DC, Herzenberg AM, Eichinger F, Boucherot A, Henger A, Berthier CC, Nair V, Cohen CD (2010): A molecular signature of proteinuria in glomerulonephritis. *PLoS One* 5, e13451
- Reynolds A**, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004): Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22, 326-330
- Roberts AB**, Lamb LC, Newton DL, Sporn MB, De Larco JE, Todaro GJ (1980): Transforming growth factors: isolation of polypeptides from virally and chemically transformed cells by acid/ethanol extraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 3494-3498
- Roider HG**, Kanhere A, Manke T, Vingron M (2007): Predicting transcription factor affinities to DNA from a biophysical model. *Bioinformatics* 23, 134-141
- Rossant J**, McKerlie C (2001): Mouse-based phenogenomics for modelling human disease. *Trends Mol Med* 7, 502-507
- Roth RB**, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Lechner SM, Foster AC, Zlotnik A (2006): Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics* 7, 67-80
- Rowlands JC**, Gustafsson JA (1997): Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 27, 109-134
- Rulten SL**, Kinloch RA, Tateossian H, Robinson C, Gettins L, Kay JE (2006): The human FK506-binding proteins: characterization of human FKBP19. *Mamm Genome* 17, 322-331
- Rung J**, Brazma A (2013): Reuse of public genome-wide gene expression data. *Nat Rev Genet* 14, 89-99
- Ruzinova MB**, Benezra R (2003): Id proteins in development, cell cycle and cancer. *Trends Cell Biol* 13, 410-418
- Ryan MJ**, Johnson G, Kirk J, Fuerstenberg SM, Zager RA, Torok-Storb B (1994): HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney Int* 45, 48-57
- Saika S**, Ikeda K, Yamanaka O, Sato M, Muragaki Y, Ohnishi Y, Ooshima A, Nakajima Y, Namikawa K, Kiyama H (2004): Transient adenoviral gene transfer of Smad7 prevents injury-induced epithelial-mesenchymal transition of lens epithelium in mice. *Lab Invest* 84, 1259-1270
- 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
- Sampath TK**, Maliakal JC, Hauschka PV, Jones WK, Sasak H, Tucker RF, White KH, Coughlin JE, Tucker MM, Pang RH (1992): Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *J Biol Chem* 267, 20352-20362
- Sandy P**, Ventura A, Jacks T (2005): Mammalian RNAi: a practical guide. *Biotechniques* 39, 215-224
- Schenborn E**, Groskreutz D (1999): Reporter gene vectors and assays. *Mol Biotechnol* 13, 29-44
- Schmid H**, Boucherot A, Yasuda Y, Henger A, Brunner B, Eichinger F, Nitsche A, Kiss E, Bleich M, Gröne HJ (2006): Modular activation of nuclear factor-kappaB transcriptional programs in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 55, 2993-3003
- Schwartz R**, Stack J, Dameshek W (1958): Effect of 6-mercaptapurine on antibody production. *Proc Soc Exp Biol Med* 99, 164-167
- Semenza GL**, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A (1997): Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int* 51, 553-555

- Shi Y, Massagué J (2003):** Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700
- Shi Y, Seto E, Chang LS, Shenk T (1991):** Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Krüppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* **67**, 377-388
- Sikder HA, Devlin MK, Dunlap S, Ryu B, Alani RM (2003):** Id proteins in cell growth and tumorigenesis. *Cancer Cell* **3**, 525-530
- Sioud M (2005):** Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* **348**, 1079–1090
- Sledz CA, Williams BR (2005):** RNA interference in biology and disease. *Blood* **106**, 787-794
- Smith CL, Hager GL (1997):** Transcriptional regulation of mammalian genes in vivo. A tale of two templates. *J Biol Chem* **272**, 27493-27496
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goetze NM, Olson BJ, Klenk DC (1985):** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**, 76-85
- Soboleski MR, Oaks J, Halford WP (2005):** Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells. *FASEB J* **19**, 440-442
- Sogawa K, Nakano R, Kobayashi A, Kikuchi Y, Ohe N, Matsushita N, Fujii-Kuriyama Y (1995):** Possible function of Ah receptor nuclear translocator (Arnt) homodimer in transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1936-1940
- Soncul H, Oz E, Kalaycioglu S (1999):** Role of ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury of the lung. *Chest* **115**, 1672-1677
- Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, El-Bizri N, Sawada H, Haghghat R, Chan R (2013):** FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest* **123**, 3600-3613
- Starzl TE, Marchioro TL, Waddell WR (1963):** The reversal of rejection in human renal homografts with subsequent development of homograft tolerance. *Surg Gynecol Obstet* **117**, 385-395
- Stockwell BR, Schreiber SL (1998):** TGF-beta-signaling with small molecule FKBP12 antagonists that bind myristoylated FKBP12-TGF-beta type I receptor fusion proteins. *Chem Biol* **5**, 385-395
- St Peter WL (2007):** Introduction: chronic kidney disease: a burgeoning health epidemic. *J Manag Care Pharm* **13**, S2-5
- Stringa P, Lausada N, Romanin D, Portiansky E, Zanuzzi C, Machuca M, Gondolesi G, Rumbo M (2016):** Pretreatment Combination Reduces Remote Organ Damage Secondary to Intestinal Reperfusion Injury in Mice: Follow-up Study. *Transplant Proc* **48**, 210-216
- Strutz F (1995):** Novel aspects of renal fibrogenesis. *Nephrol Dial Transplant* **10**, 1526-1532
- Strutz F, Neilson EG (1994):** The role of lymphocytes in the progression of interstitial disease. *Kidney Int Suppl* **45**, S106-110
- Strutz F, Neilson EG (2003):** New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* **24**, 459-476
- Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, Raschke B, Becker V, van Kooten C, Müller G (2001):** TGF-beta1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* **59**, 579-592
- Sugimoto H, Grahovac G, Zeisberg M, Kalluri R (2007):** Renal fibrosis and glomerulosclerosis in a new mouse model of diabetic nephropathy and its regression by bone morphogenetic protein-7 and advanced glycation end product inhibitors. *Diabetes* **56**, 1825-1833
- Sugimoto H, LeBleu VS, Bosukonda D, Keck P, Taduri G, Bechtel W, Okada H, Carlson W Jr, Bey P, Rusckowski M (2012):** Activin-like kinase 3 is important for kidney regeneration and reversal of fibrosis. *Nat Med* **18**, 396-404

- Szklarczyk** D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Roth A, Santos A, Tsafou KP (2015): STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* 43, D447-452
- Tamaki** K, Souchelnytskyi S, Itoh S, Nakao A, Sampath K, Heldin CH, ten Dijke P (1998): Intracellular signaling of osteogenic protein-1 through Smad5 activation. *J Cell Physiol* 177, 355-363
- 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* 25, 905-912
- Tampe** D, Zeisberg M (2014): Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 10, 226-237
- ten Dijke** P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH, Miyazono K (1994): Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 269, 16985-16988
- Thrasos Therapeutics**, Montreal QC, Kanada: <http://www.thrasos.com> (Zugriff im September 2015)
- Towbin** H, Staehelin T, Gordon J (1992): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24, 145-149
- Tricot** L, Lebbe C, Pillebout E, Martinez F, Legendre C, Thervet E (2005): Tacrolimus-induced alopecia in female kidney-pancreas transplant recipients. *Transplantation* 80, 1546-1549
- Turgut** F, Balogun RA, Abdel-Rahman EM (2010): Renin-angiotensin-aldosterone system blockade effects on the kidney in the elderly: benefits and limitations. *Clin J Am Soc Nephrol* 5, 1330-1339
- Tuschl** T, Borkhardt A (2002): Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2, 158-167
- Urist** MR (1965): Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899
- USRDS** (United States Renal Data System) **2013 Annual Data Report**: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2013. <http://www.usrds.org/atlas13.aspx> (Zugriff im September 2015)
- Vafadari** R, Kraaijeveld R, Weimar W, Baan CC (2013): Tacrolimus inhibits NF- κ B activation in peripheral human T cells. *PLoS One* 8, e60784
- Van Duyne** GD, Standaert RF, Karplus PA, Schreiber SL, Clardy J (1991): Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. *Science* 252, 839-842
- Vanholder** R, Van Laecke S, Glorieux G (2008): What is new in uremic toxicity? *Pediatr Nephrol* 23, 1211-1221
- Van Weemen** BK, Schuurs AH (1971): Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15, 232-236
- Venkataramanan** R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, Starzl T (1995): Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 29, 404-430
- Venkataramanan** R, Shaw LM, Sarkozi L, Mullins R, Pirsch J, MacFarlane G, Scheller D, Ersfeld D, Frick M, Fitzsimmons WE (2001): Clinical utility of monitoring tacrolimus blood concentrations in liver transplant patients. *J Clin Pharmacol* 41, 542-551
- Vukicevic** S, Kopp JB, Luyten FP, Sampath TK (1996): Induction of nephrogenic mesenchyme by osteogenic protein 1 (bone morphogenetic protein 7). *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9021-9026
- Vukicevic** S, Basic V, Rogic D, Basic N, Shih MS, Shepard A, Jin D, Dattatreya Murthy B, Jones W, Dorai H (1998): Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. *J Clin Invest* 102, 202-214
- Wain** HM, Bruford EA, Lovering RC, Lush MJ, Wright MW, Povey S (2002): Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79, 464-470.

- Wallemacq PE, Verbeeck RK (2001):** Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet* 40, 283-295
- Wallemacq P, Armstrong VW, Brunet M, Haufroid V, Holt DW, Johnston A, Kuypers D, Le Meur Y, Marquet P, Oellerich M (2009):** Opportunities to optimize tacrolimus therapy in solid organ transplantation: report of the European consensus conference. *Ther Drug Monit* 31, 139-152
- Wang F, Shi S, Zhang R, Hankinson O (2006):** Identifying target genes of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt) using DNA microarray analysis. *Biol Chem* 387, 1215-1218
- Wang L, Jirka G, Rosenberg PB, Buckley AF, Gomez JA, Fields TA, Winn MP, Spurney RF (2015):** Gq signaling causes glomerular injury by activating TRPC6. *J Clin Invest* 125, 1913-1926
- Wang S, Hirschberg R (2003):** BMP7 antagonizes TGF-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F1006-1013
- Wang S, Chen Q, Simon TC, Strebeck F, Chaudhary L, Morrissey J, Liapis H, Klahr S, Hruska KA (2003):** Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7), a novel therapy for diabetic nephropathy. *Kidney Int* 63, 2037-2049
- Wang S, de Caestecker M, Kopp J, Mitu G, Lapage J, Hirschberg R (2006):** Renal bone morphogenetic protein-7 protects against diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17, 2504-2512
- Wang SN, Lapage J, Hirschberg R (2001):** Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 12, 2392-2399
- Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK (1996):** The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell* 86, 435-444
- Wangsiripaisan A, Gengaro PE, Edelstein CL, Schrier RW (2001):** Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney Int* 59, 932-940
- Weiskirchen R, Meurer SK (2013):** BMP-7 counteracting TGF-beta1 activities in organ fibrosis. *Front Biosci (Landmark Ed)* 18, 1407-1434
- Wetzel P, Haag J, Câmpean V, Goldschmeding R, Atalla A, Amann K, Aigner T (2006):** Bone morphogenetic protein-7 expression and activity in the human adult normal kidney is predominantly localized to the distal nephron. *Kidney Int* 70, 717-723
- Whaley-Connell A, Sowers JR, McCullough PA, Roberts T, McFarlane SI, Chen SC, Li S, Wang C, Collins AJ, Bakris GL (2009):** Diabetes mellitus and CKD awareness: the Kidney Early Evaluation Program (KEEP) and National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES). *Am J Kidney Dis* 53, S11-21
- Whitelaw ML, Gustafsson JA, Poellinger L (1994):** Identification of transactivation and repression functions of the dioxin receptor and its basic helix-loop-helix/PASpartner factor Arnt: inducible versus constitutive modes of regulation. *Mol Cell Biol* 14, 8343-8355
- Willis BC, Borok Z (2007):** TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293, L525-534
- Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN (1993):** Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 92, 1366-1372
- Woods SL, Whitelaw ML (2002):** Differential activities of murine single minded 1 (SIM1) and SIM2 on a hypoxic response element. Cross-talk between basic helix-loop-helix/per-Arnt-Sim homology transcription factors. *J Biol Chem* 277, 10236-10243
- Woroniecka KI, Park AS, Mohtat D, Thomas DB, Pullman JM, Susztak K (2011):** Transcriptome analysis of human diabetic kidney disease. *Diabetes* 60, 2354-2369
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988):** Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242, 1528-1534
- Yalow RS, Berson SA (1960):** Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 39, 1157-1175

- Yamashita H**, ten Dijke P, Franzen P, Miyazono K, Heldin CH (1994): Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 269, 20172-20178
- Yamashita H**, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K (1996): Bone morphogenetic protein receptors. *Bone* 19, 569-574
- Yang CW**, Ahn HJ, Han HJ, Kim WY, Li C, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YS, Moon IS (2001): Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation* 72, 1753-1759
- Yang J**, Liu Y (2001): Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 159, 1465-1475
- Yang J**, Shultz RW, Mars WM, Wegner RE, Li Y, Dai C, Nejak K, Liu Y (2002): Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 110, 1525-1538
- 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
- Yang WM**, Inouye CJ, Seto E (1995): Cyclophilin A and FKBP12 interact with YY1 and alter its transcriptional activity. *J Biol Chem* 270, 15187-15193
- Yao YL**, Liang YC, Huang HH, Yang WM (2011): FKBP in chromatin modification and cancer. *Curr Opin Pharmacol* 11, 301-307
- Yi SE**, Daluiski A, Pederson R, Rosen V, Lyons KM (2000): The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Development* 127, 621-630
- Yoon YE**, Lee KS, Choi KH, Kim KH, Yang SC, Han WK (2015): Preconditioning strategies for kidney ischemia reperfusion injury: implications of the "time-window" in remote ischemic preconditioning. *PLoS One* 10, e0124130
- Zahir KS**, Syed SA, Zink JR, Restifo RJ, Thomson JG (1998): Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flaps in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 102, 140-150; discussion 151-152
- Zambrowicz BP**, Sands AT (2003): Knockouts model the 100 best-selling drugs--will they model the next 100? *Nat Rev Drug Discov* 2, 38-51
- Zeisberg EM**, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB (2007): Endothelial-to-mesenchymal-transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13, 952-961
- Zeisberg M** (2006): Bone morphogenetic protein-7 and the kidney: current concepts and open questions. *Nephrol Dial Transplant* 21, 568-573
- Zeisberg M**, Kalluri R (2004 a): Experimental strategies to reverse chronic renal disease. *Blood Purif* 22, 440-445
- Zeisberg M**, Kalluri R (2004 b): The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med (Berl)* 82, 175-181
- Zeisberg M**, Neilson EG (2009): Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119, 1429-1437
- Zeisberg M**, Duffield JS (2010): Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 21, 1247-1253
- Zeisberg M**, Bottiglio C, Kumar N, Maeshima Y, Strutz F, Müller GA, Kalluri R (2003 a): Bone morphogenetic protein-7 inhibits progression of chronic renal fibrosis associated with two genetic mouse models. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F1060-1067
- Zeisberg M**, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R (2003 b): BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9, 964-968
- Zeisberg M**, Shah AA, Kalluri R (2005): Bone morphogenetic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280, 8094-8100
- Zeisberg M**, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R (2007): Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282, 23337-23347

Zhao M, Harris SE, Horn D, Geng Z, Nishimura R, Mundy GR, Chen D (2002): Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J Cell Biol* 157, 1049-1060

Zuk A, Matlin KS, Hay ED (1989): Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and lose apical-basal polarity. *J Cell Biol* 108, 903-919

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und Umständen das Möglichste getan hat.“

Johann Wolfgang von Goethe, „Italienische Reise“, 1787

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Zeisberg für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitstellung erforderlicher Materialien und Geräte, die konstruktiven Ratschläge sowie die konstante Betreuung danken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt Frau Dr. med. Désirée Tampe und Herrn Dr. med. Björn Tampe. Ohne ihr persönliches Engagement, die intensive Unterstützung bei der Planung, Umsetzung und Auswertung der Versuche wäre eine Arbeit in solchem Rahmen nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin danke ich für die hervorragende Hilfestellung bei der Verfassung und Korrektur der Dissertation.

Insbesondere danke ich den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Anika Krüger und Frau Sarah Rinkleff für die kompetente Einarbeitung, ihren fachlichen und mentalen Beistand bei der Durchführung vieler Experimente auch außerhalb ihrer regulären Arbeitszeiten sowie den täglichen kollegialen Austausch. Ein weiterer Dank kommt Frau Annika Faust für die allseits reibungslose Organisation ungeliebter externer Modalitäten, vor allem für so manchen außerplanmäßigen Bestellauftrag zu.