

Aus dem Institut für Pathologie  
Direktor: Professor Dr. Christoph Röcken  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Einfluss der Reabsorption von Retinol-RBP-Komplexen auf die tubuläre  
renale Schädigung und Regeneration nach Ischämie-Reperfusion**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**VOLKER MAUS,**

aus

Marmagen

Kiel, 2011

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Bräsen, Institut für Pathologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bleich, Physiologisches Institut

Tag der mündlichen  
Prüfung: 09.01.2012

Zum Druck  
genehmigt, Kiel, den 09.01.2012

gez. \_\_\_\_\_

Meinen Eltern in Liebe gewidmet

## 1. Inhaltsverzeichnis

1.	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
1.	<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>i</b>
2.	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>iii</b>
3.	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
3.1.	<b>Retinoide</b> .....	<b>1</b>
3.1.1.	Retinol-Stoffwechsel .....	1
3.1.2.	Retinol-Bindeprotein (RBP).....	2
3.1.3.	Megalin (gp 330) .....	2
3.1.4.	Megalin-vermittelte Endozytose.....	4
3.1.5.	Die Rolle der Niere im Retinol-Stoffwechsel.....	4
3.2.	<b>Akutes Nierenversagen</b> .....	<b>5</b>
3.2.1.	Renale Ischämie-Reperfusion.....	6
3.2.1.1.	Die pathophysiologische Funktion der T-Lymphozyten.....	7
3.2.2.	Progression von Nierenerkrankungen .....	9
3.2.2.1.	Tubuläre Epithelial-Mesenchymale-Transdifferenzierung (TEMT) .....	9
3.3.	<b>Fragestellung der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>11</b>
4.	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
4.1.	Tierversuche.....	12
4.2.	Immunhistochemische Färbungen.....	12
4.2.1.	Färbeprotokolle.....	12
4.3.	Morphometrie .....	13
4.4.	Lasер- unterstützte Mikrodisektion.....	14
4.4.1.	Übertragung der Proben auf Objektträger.....	15
4.4.2.	Färbung der Schnittpräparate.....	15
4.4.3.	Dissektionsvorgang.....	15
4.4.4.	RNA-Isolation .....	16
4.4.5.	Qualitätskontrolle der RNA.....	16
4.5.	Zellkulturen.....	17
4.5.1.	Kultivierung der Zellen .....	17
4.5.2.	Zellzählung.....	17
4.5.3.	Inkubation mit Retinolsäure .....	18
4.5.4.	RNA-Isolation .....	18
4.5.5.	Quantifizierung der RNA .....	19
4.5.6.	Qualitätskontrolle der RNA.....	19
4.5.7.	cDNA-Synthese.....	20
4.5.8.	Polymerase-Kettenreaktion.....	20
4.5.9.	Agarosegel-Elektrophorese.....	23
4.6.	Statistik.....	23

---

<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
<b>5.1. Morphologische Ergebnisse</b> .....	<b>24</b>
5.1.1. Anzahl der Nephrone.....	24
5.1.2. Graduierung der tubulären Schädigung.....	25
<b>5.2. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen</b> .....	<b>27</b>
5.2.1. Caspase-3.....	27
5.2.2. Ki-67.....	31
5.2.3. CD3-positive T-Lymphozyten.....	35
5.2.4. TGF- $\beta$ -1.....	39
5.2.5. FoxP3-positive T-Lymphozyten.....	43
5.2.6. ICAM-1.....	47
<b>5.3. Laser- unterstützte Mikrodissektion</b> .....	<b>51</b>
5.3.1. RNA-Qualität.....	51
<b>5.4. Auswertungen der Zellkulturen</b> .....	<b>52</b>
5.4.1. Zellzahl nach Inkubation mit Retinolsäure.....	52
5.4.2. RNA-Qualität Retinoid-stimulierter TKPTS-Zellen.....	53
5.4.3. Gesamt-RNA-Konzentrationen Retinoid-stimulierter TKPTS-Zellen..	54
5.4.4. PCR-Gelelektrophorese.....	54
5.4.4.1. Stimulation mit 9-cis-Retinolsäure.....	54
5.4.4.2. Stimulation mit all-trans-Retinolsäure.....	56
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>57</b>
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>68</b>
<b>9. Anhang</b> .....	<b>80</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>81</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>83</b>
<b>Erklärung</b> .....	<b>85</b>

## 2. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
ANV	Akutes Nierenversagen
ATN	Akute Tubulusnekrose
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CAS	Casein
CCR1	CC Chemokinrezeptor-1
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Copy-Desoxyribonucleinacid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cre	Causes recombination
CRRT	Continuous renal replacement therapy
d	Tage
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylene Pyrocarbonate
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EtOH	Ethanol
ERC	Extracellular signal-related kinase
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fötale Kälberserum
FoxP3	Forkhead box P3

---

g	Gramm
GC-Gehalt	Guanin-Cytosin-Gehalt
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HGF	Hepatocyte growth factor
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPF	High power field
HRP	Horseradish peroxidase
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule 1
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IgG	Immunoglobulin G
IHD	Intermittent hemodialysis
Il-16	Interleukin-16
JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
LMD	Laser-Mikrodissektion
Ka	Kalium
kD	Kilo-Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
l	Liter
LDL	Low-density-Lipoprotein
M	Mol
MAP	Mitogen-activated protein
MDT	Magen- und Darmtrakt
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmHG	Millimeter Hydrargyrum
mRNA	Messenger-Ribonukleinacid
Na	Natrium

---

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Polyethylen-Tetraphthalate
PKC	Protein Kinase C
RAG	Recombinant activated gene
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RAR	Retinoic-acid-Rezeptor
RIN	RNA-Integrity-Number
RNA	Ribonucleinacid
rpm	Rounds per minute
RXR	Retinoic-x-Rezeptor
S	Svedberg
SE	Standardfehler
sec	Sekunde
SLED	Sustained low-efficiency dialysis
SMA	Smooth muscle actin
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1

### **3. Einleitung**

Retinoide spielen eine wichtige Rolle in der Organogenese (definieren unter anderem die Anzahl der Nephrone), der Differenzierung von Epithelien sowie deren Regeneration. Retinoid bindendes Protein (RBP) dient als Transportprotein im Blut. Retinol-RBP-Komplexe werden unter physiologischen Bedingungen glomerulär filtriert und vollständig im proximalen Tubulus mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose via Megalin rückresorbiert.

In der vorliegenden Dissertation wird untersucht, welche Auswirkungen die Reabsorption von Retinoiden in Form von Retinol-RBP-Komplexen auf die tubuläre renale Schädigung als auch auf die Regeneration der Epithelien nach Ischämie-Reperfusion hat. Schließlich stellt beispielsweise in der Transplantationsmedizin der Ischämie-Reperfusion-Schaden eine kritische Größe für die Transplantat-Funktion bzw. für das Transplantat-Überleben dar.

#### **3.1. Retinoide**

Retinoide sind laut internationaler chemischer Nomenklatur definiert als Vitamin A und seine Derivate, von denen hauptsächlich all-trans Retinolsäure und 9-cis-Retinolsäure metabolische Vorgänge im Körper vermitteln (Pino-Lagos et al. 2008).

Retinoide spielen eine zentrale Rolle bei der Proliferation und Differenzierung epithelialer und vaskulärer Zellen und sind dadurch bereits in der Embryogenese von großer Bedeutung (Chambon 1996; Stephensen 2001; Mark et al. 2006). Eine tragende Rolle spielen sie ebenfalls beim Sehvorgang, da sie Bestandteil des Sehpigments sind und die Photonenenergie in eine chemische Isomerisierung übersetzen, wodurch visuelle Signale generiert werden (Kusakabe et al. 2009). Des Weiteren regulieren sie die Ausbildung epithelialer Strukturen und garantieren die Barrierefunktion der Organe gegenüber Keimen (McCullough et al. 1999). Ferner sind sie in die Regulierung von Immunantworten involviert, indem sie die Bildung von regulatorischen T-Lymphozyten induzieren (Pino-Lagos et al. 2008).

##### **3.1.1. Retinol-Stoffwechsel**

Vitamin A wird aus der Nahrung in Form von Betacarotin oder Fettsäureester durch den Enterozyten aufgenommen und in Retinol metabolisiert. Nach Inkorporation in Chylomikronen gelangt Retinol in die Leber, wo es in Stellatumzellen gespeichert

wird. Die Leber speichert unter physiologischen Bedingungen 80% des im menschlichen Körper vorhandenen Vitamin A und weist eine Speicherkapazität von 200-500 mg auf (Senoo et al. 2007). Die Sekretion von Vitamin A aus der Leber erfolgt nach Bindung an das Transportprotein Retinol-Bindeprotein, das für den Transport im Blutkreislauf verantwortlich ist (Harrison 2005).

Innerhalb der Zelle bindet Retinol an RAR- und RXR- Rezeptoren, die als Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen binden und so u.a. die Expression von PKC und den MAP-Kinasen ERC1/2, JNK und p38 regulieren (Xu et al. 2004).

### **3.1.2. Retinol-Bindeprotein (RBP)**

RBP ist ein 21 kD großes Protein, das das lipophile Retinol in der Leber bindet und im Blutkreislauf transportiert (Christensen und Willnow 1999). Zusätzlich bindet das 55 kD große Transthyretin (TTR) an 95% der zirkulierenden Retinol-RBP-Komplexe, sodass die Molekülmasse vergrößert und so eine rasche renale Elimination verhindert wird (Christensen et al. 1999). Die übrigen 5% der Retinol-RBP-Komplexe werden vollständig im Glomerulum filtriert und im proximalen Tubulus via Megalin rückresorbiert (Usuda et al. 1983). Bei Megalin-defizienten Mäusen finden sich RBP und Retinol im Urin, wobei diese Substanzen im Urin von Wildtyp-Mäusen nicht gefunden werden (Christensen et al 1999). Ein Knockout des Retinol-Bindeproteins ist von Quadro et al. beschrieben worden: sie überführten einen spezifischen Inaktivitätsvektor aus einer mutierten Sequenz des RBP-Gens, einem Neomycinresistenzgen und einem Thymidinkinasegen, in embryonale Stammzellen eines murinen C57BL/6J-Stammes. Durch homologe Rekombination gelang ein Austausch des unversehrten Gensegments mit dem Inaktivitätsvektor, woraufhin der veränderte Genabschnitt nicht mehr transkribiert wurde (Quadro et al. 1999).

RBP tritt bei Proteinurien auf, deren Ursache eine verminderte Rückresorption im proximalen Tubulussystem ist und stellt so einen Marker für Schädigungen des proximalen Tubulussystems dar (Bernard und Lauwerys 1991).

### **3.1.3. Megalin (gp 330)**

Megalin ist ein 600 kD großes Membranprotein, das vor allem im Bürstensaum des proximalen Tubulusepithels der Niere lokalisiert ist (Zheng et al. 1994). Aufgrund seiner Funktion und strukturellen Eigenschaft gehört es zur Familie der LDL-

Rezeptoren (Hjalm et al. 1996). Megalin weist eine einzelne Transmembrandomäne auf sowie einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz und ein großes Amino-terminales Ende, das in den Extrazellulärraum ragt (Saito et al. 1994). Das extrazelluläre Ende besitzt 4 Zystin-reiche complement-type repeats als Ligandenbindungsdomänen und sogenannte epidermale Wachstumsfaktor Vorläufereinheiten (epidermal growth factor precursor homology domains), über die eine pH-Wert abhängige Ablösung der Liganden vom Rezeptor reguliert wird (Davis et al. 1987) (siehe Abb.1).

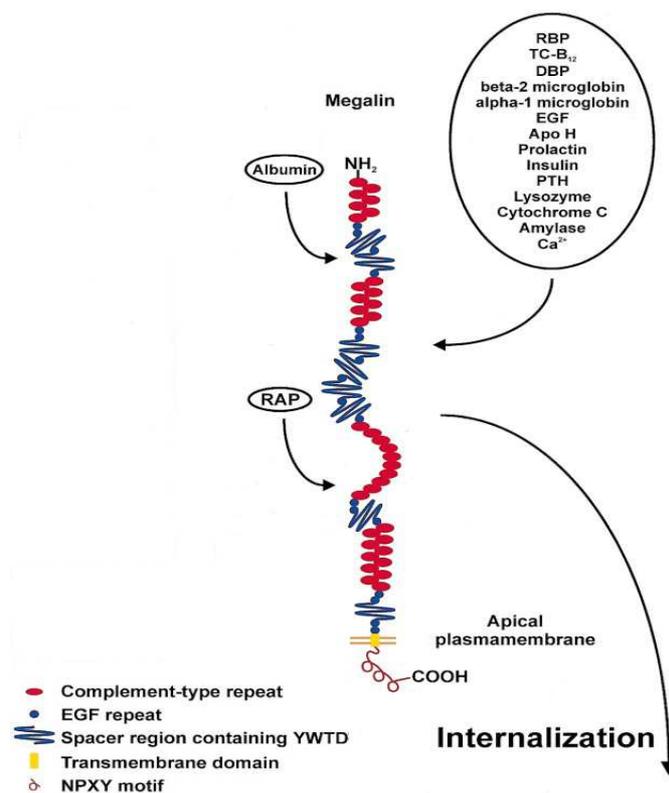


Abb.1: Darstellung der strukturellen Organisation von Megalin. Die NPXY-Motive im zytoplasmatischen Schwanz der Rezeptoren gibt die Aminosäuresequenz Asp-Pro-x-Tyr wieder, welche eine Bündelung des Rezeptors in clathrin- ausgekleideten Einsenkungen der Zelle (coated pits) vermittelt. Apo, Apolipoprotein; EGF, epidermal growth factor; PTH, Parathyroidhormon; RAP, receptor-associated protein; TC, Transcobalamin (modifiziert aus American Journal of Physiology ((Christensen und Birn 2001)).

Die Hauptfunktion von Megalin ist die Endozytose-vermittelte Rückresorption im proximalen Tubulusepithel der Niere (Christensen und Willnow 1999). Es existieren eine Vielzahl von Liganden, die an Megalin binden, u.a. Retinol-Bindeprotein (RBP) und Vitamin D-Bindeprotein (DBP) (siehe Abb.3.1).

Die Bedeutung von Megalin macht ein klassischer Knockout des Gens an Mäusen deutlich, bei dem es zur Inaktivierung von Megalin im gesamten Organismus kommt: Willnow et al. zeigten, dass der klassische Knockout zu einer ausgeprägten Holoprosenzephalie mit pulmonalen Entwicklungsstörungen führt, die eine gesteigerte perinatale Mortalität bedingen (Willnow et al. 1996). Durch das sogenannte Cre/loxP-System gelang Lehste et al. ein konditionierter Knockout, d.h.

eine gewebe-spezifische Inaktivierung von Megalin. Dabei wird das Zielgen Megalin lox-flankiert und das Gensegment durch die Cre-Rekombinase entfernt. Anschließend wird das veränderte Genom in murine embryonale apoE-CreVI-Stammzellen überführt. Der Einsatz eines gewebe-spezifischen Promoters garantiert dabei den Knockout im Zielorgan (Leheste et al. 2003). Ein konditionierter Knockout von Megalin in der Niere führte zu einer gesteigerten Ausscheidung von Transportproteinen wie z.B. RBP und DBP (Leheste et al. 1999).

Die Megalin-vermittelte Endozytose im Vitamin-D-Stoffwechsel wurde von verschiedenen Autoren dargelegt: nach Konversion und Isomerisierung von 7-Dehydrocholesterol in Vitamin D<sub>3</sub> durch UV-Licht in der Haut und Hydroxylierung in der Leber, wird 25-(OH)-D<sub>3</sub> an DBP gebunden und in der Niere mittels Megalin-vermittelter Endozytose reabsorbiert und DBP lysosomal durch die Endopeptidase Legumain degradiert (Holick et al. 1977; Okano et al. 1977; Yamane et al. 2002). Nach final aktivierender Hydroxylierung durch die mitochondriale  $\alpha$ -1-Hydroxylase bindet 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> an neu synthetisiertes DBP und wird basolateral dem Blutkreislauf zugeführt (Fraser und Kodicek 1970; Willnow und Nykjaer 2002).

#### **3.1.4. Megalin-vermittelte Endozytose**

Nachdem der Ligand an Megalin gebunden hat, kommt es über Konzentration der coated pits zur Endozytose dieses Komplexes. Man vermutet, dass der Retinol-RBP-Komplex in Lysosomen degradiert wird und es zur intrazellulären Freisetzung des Retinols kommt. Innerhalb der Zelle kommt es im rauen endoplasmatischen Retikulum zur Neusynthese von RBP, das basolateral an Retinol bindet und anschliessend dem Blutstrom zugeführt wird (Soprano et al. 1986; Makover et al. 1989; Christensen et al. 1999). Ein alternativer Weg wurde an Zellkulturen beschrieben, bei dem der Retinol-RBP-Komplex die proximalen Tubuli nach Megalin-vermittelter Endozytose mittels Transzytose passiert (Marino et al. 2001).

#### **3.1.5. Die Rolle der Niere im Retinol-Stoffwechsel**

Die Regulation des Retinol-Stoffwechsels wird renal gesteuert und hängt ab vom Ausmaß der Reabsorption des Retinol-RBP-Komplexes (Lewis et al. 1990). Raila et al. zeigten, dass es bei Ausschaltung der murinen renalen Retinol-RBP-Reabsorption zu einer Mobilisierung der Vitamin-A-Reserve aus der Leber kommt, wodurch die

hepatische Retinylesterkonzentration um 37% absinkt (Raila et al. 2005). Bei akutem Nierenversagen kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der Serum-Retinol-Konzentration (Gerlach und Zile 1990). Dies führen einige Autoren auf einen unvollständigen Abbau des Apo-RBP in der Niere zurück, das durch einen Rückkopplungsmechanismus zu einer vermehrten Freisetzung des hepatischen Retinols führt (Gerlach und Zile 1991).

### **3.2. Akutes Nierenversagen**

Es existieren zurzeit zwei Klassifikationen für das akute Nierenversagen. Die RIFLE-Klassifikation beinhaltet die Stadien „Risk“, „Injury“ und „Failure“, die Änderungen des Serum-Kreatinins und der Urin-Ausscheidung berücksichtigen sowie die Stadien „Loss“ und „End-stage“, die sich anhand der Dauer einer Nierenersatztherapie definieren (Bellomo et al. 2004). Die Acute Kidney Injury Network-Klassifikation ähnelt den ersten drei Stadien der RIFLE-Klassifikation. Zusätzlich wird ein Anstieg des Serum-Kreatinins um 0,3 mg/dL innerhalb von 48 h Stadium 1 zugeordnet und das Anwenden einer Nierenersatztherapie Stadium 3 zugeschrieben (Mehta et al. 2007).

Die häufigste Ursache eines akuten Nierenversagens in nativen als auch in transplantierten Nieren ist der Ischämie-Reperfusion-Schaden (Terasaki et al. 1995; Molitoris 1998). Bei einem Großteil der Patienten sind Hypovolämie bzw. Schockzustände die Auslöser, bei denen der systolische Blutdruck unter 80 mmHg absinkt. Zu den weiteren Ursachen gehören die maligne Hypertonie (Abuelo 1995), die Nierenarterienstenose (Tuttle 2001), Sepsis (Schrier und Wang 2004), Hyperkalzämie (Mahnensmith 1992), das hepato-renale Syndrom (Cardenas 2005) und die Gabe von Calcineurin-Inhibitoren (Klein et al. 2002) oder besonders jodhaltiger Kontrastmittel (Oudemans-van Straaten 2004).

Bei Nieren-Transplantaten können zusätzlich Konservierungsschäden, verlängerte Ischämie-Zeiten (> 24 Stunden zwischen Organentnahme und Implantation) sowie ein HLA-Mismatch zwischen Spender und Empfänger zu akuten Abstoßungsreaktionen führen, die in ein akutes Nierenversagen münden können (Cuturi et al. 1994; Auchincloss und Sultan 1996).

Die Nierenersatztherapie gilt als zentrale Behandlungsmaßnahme, da das ANV einhergeht mit refraktärer Hyperkaliämie, metabolischer Azidose, Hypervolämie und Urämie. Mit der IHD, SLED und CRRT existieren eine Vielzahl von Verfahren, die zur

Anwendung kommen. Allerdings ist die jährliche Gesamtsterblichkeit auch bei Dialyse-pflichtigen Patienten mit bis zu 28% sehr hoch (Schon et al. 2004).

### 3.2.1. Renale Ischämie-Reperfusion

Im Rahmen einer Nieren-Transplantation spielt der Ischämie-Reperfusion-Schaden eine wichtige Rolle, da eine verlängerte Ischämie-Zeit das Transplantatüberleben negativ beeinflusst (Terasaki et al. 1995). Eine Ischämie ist definiert als eine Verminderung der Durchblutung eines Organs infolge mangelnder arterieller Blutzufuhr. Im Rahmen einer Hypovolämie kommt es bei einem mittleren Blutdruck von unter 80 mmHg zu einer Vasokonstriktion der afferenten Gefäße, sodass der intraglomeruläre Druck erniedrigt ist und dadurch die GFR abfällt, wodurch der Blutfluss in den postglomerulären Kapillaren vermindert wird und die arterielle Sauerstoffversorgung des Parenchyms abfällt (Abuelo 2007). Dies führt zu einer Erniedrigung des ATP-Angebots, wodurch die Funktion der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase zum Erliegen kommt und das Membranpotential der Tubuluszelle nicht mehr aufrecht erhalten werden kann (Lameire et al 2005). Aufgrund dieses Zellschadens sezerniert das Tubulusepithel proinflammatorische und chemotaktische Zytokine, wodurch Abwehrzellen das Parenchym infiltrieren (Abuelo 2007). Hier ist besonders RANTES zu nennen, das vom geschädigten Epithel freigesetzt wird (Herrero-Fresneda et al. 2003). Ferner bewirkt die Zytokinproduktion des Tubulusepithels eine erhöhte Kapillarpermeabilität des Endothels, wodurch Leukozyten die Infiltration erleichtert wird (Burne-Taney und Rabb 2003).

Zusätzlich kommt es zur Sekretion von Hepatocyte growth factor (HGF), das die renale Entzündungsreaktion vermindert, indem die Expression proinflammatorischer Chemokine reduziert wird (Giannopoulou et al. 2008). Es wurde gezeigt, dass HGF in einem murinen Tiermodell die renale Infiltration von T-Lymphozyten und Makrophagen inhibiert und die Expression von RANTES vermindert. Ferner mindert HGF die Expression von Inter-cellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), was mit einer geringeren Infiltration von Leukozyten in der Niere einhergeht (Mizuno und Nakamura 2005).

Das Endothel exprimiert im Rahmen einer Ischämie Integrine, die Leukozyten die Infiltration ins Parenchym ermöglichen (Koo et al. 1999). Dabei exprimiert das Endothel der Niere aufgrund von Zytokinstimulation vermehrt ICAM-1 (Kelly et al. 1996). Rabb et al. bewies in einer Studie, dass die Blockade von ICAM-1 mittels

Antikörper das Ausmaß des Ischämie-Reperfusion-Schadens verringerte (Rabb et al. 1995).

Bei Wiederherstellung der Durchblutung (Reperfusion) kommt es unmittelbar nach Perfusion zu einer weiteren Schädigung der Tubuluszellen durch freigesetzte Proteasen und Phospholipide, die durch die verminderte ATP-Konzentration freigesetzt worden sind. Diese reagieren mit dem Sauerstoff aus den Gefäßen, wodurch sich freie Sauerstoffradikale bilden, die zur weiteren Zellschädigung führen (Lameire et al. 2005).

### **3.2.1.1. Die pathophysiologische Funktion der T-Lymphozyten**

Man geht davon aus, dass die Induktion einer Entzündungsreaktion eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Ausbildung eines Ischämie-Reperfusion-Schadens spielt (Burne-Taney und Rabb 2003). Den T-Lymphozyten wird dabei eine besondere Bedeutung zugeschrieben, da sie nach neuen Erkenntnissen sowohl in der akuten Phase als auch in der Spätphase eine Rolle spielen. Rabb et al. zeigten, dass T-Zell-defiziente (nu/nu) Mäuse keinen Gewebeschaden nach Ischämie aufwiesen (Rabb et al. 2000). Eine weitere Studie zeigte, dass T-Zell-defiziente (nu/nu) Mäuse einen verminderten renalen Schaden nach Ischämie aufzeigten, nach adoptivem Transfer von T-Lymphozyten sich in diesen Tieren jedoch ein renaler Schaden entwickelte (Burne et al. 2001).

Eine andere Studie zeigte, dass B- und T-Zell-defiziente (RAG-1-defiziente) Mäuse nicht vor Ischämie geschützt sind (Park et al. 2002). Auch die Applikation von Mycophenolat Mofetil wirkt sich negativ auf die Ausbildung eines Nierenschadens aus (Gonzalez et al. 2002), was den T-Lymphozyten eine protektive Rolle zuschreibt. Dafür spricht auch eine weitere Studie, bei der T-Zell-defizienten Mäusen nach renaler Ischämie Lymphozyten transferiert wurden, wodurch es zu einer Verbesserung des funktionellen und histologischen Schadens kam (Ascon et al. 2006). Dass einige Studien T-Lymphozyten als schädigend, andere als protektiv identifizieren verdeutlicht, dass T-Zellen offensichtlich eine komplexe Rolle im Rahmen des Ischämie-Reperfusion-Schadens spielen.

Die Rekrutierung von T-Lymphozyten ist durch die chemotaktische Aktivität von IL-16 bedingt. IL-16 wird im murinen Tiermodell nach renaler Ischämie-Reperfusion sowohl von Leukozyten als auch vom Tubulusepithel exprimiert (Wang et al. 2008). Dabei

produzieren CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten IL-16, wodurch CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten rekrutiert werden und das Nierenparenchym infiltrieren (Stabile et al. 2006).

Die Aktivierung von T-Lymphozyten läuft Antigen-unabhängig ab und wird durch freie Sauerstoffradikale (Chaudhri et al. 1986) und RANTES reguliert, dass sowohl während einer renalen Ischämie als auch bei akuter und chronischer Transplantatabstoßung vermehrt exprimiert ist (Lemay et al. 2000) und T-Lymphozyten direkt aktiviert (Bacon et al. 1995). Im murinen Tierversuch führt eine Blockade von RANTES zu einer verminderten Infiltration und Aktivierung von T-Lymphozyten sowie einer geringeren Transplantatabstoßung (Song et al. 2002).

Regulatorische T-Lymphozyten (Tregs) unterdrücken die Aktivierung von reaktiven T-Effektor-Lymphozyten in der Peripherie und wirken dadurch hemmend auf das Immunsystem (Fontenot und Rudensky 2005). Die regulatorische Aktivität der Tregs wird durch den intrazellulären Transkriptionsfaktor FoxP3 vermittelt (Hori et al. 2003). Es ist bekannt, dass zwei Wege der Regulation existieren. Zum einen werden „natürliche Tregs“ (nTregs) innerhalb des Thymus gebildet, die in sekundäre lymphatische Gewebe migrieren (Korn und Oukka 2007), wobei ihre suppressive Funktion durch Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) verstärkt wird (Zheng und Rudensky 2007). Zum anderen können naive CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der Peripherie unter Einfluß von TGF- $\beta$  und Retinolsäure in Tregs umgewandelt werden, wodurch „induzierte Tregs“ (iTregs) entstehen (Korn und Oukka 2007). In vivo ist hierbei die Präsentation von Antigenen obligat (Coombes et al. 2007; Sun et al. 2007).

Es ist bekannt, dass Retinolsäure in vitro zu einer gesteigerten TGF- $\beta$ -induzierten FoxP3 Expression führt (Xiao et al. 2008). In vivo wird Retinolsäure v.a. von CD103<sup>+</sup> dendritischen Zellen in der Mukosa des MDT produziert, die Vitamin A aus der Nahrung aufnehmen (Benson et al. 2007; Coombes et al. 2007; Sun et al. 2007). Parallel dazu gilt die Präsentation von aufgenommenen Antigenen durch die CD103<sup>+</sup> dendritischen Zellen sowie die Stimulierung mit TGF- $\beta$  als obligat, um naive T-Lymphozyten in regulatorische T-Lymphozyten umzuwandeln (von Boehmer 2007). Diese entfalten ihre Wirkung hauptsächlich im lymphatischen Gewebe der Mukosa des MDT („Homing“). Welchen Einfluss regulatorische T-Lymphozyten bei einem ischämischen Schaden in der Niere haben, ist unklar. Von Boehmer et al. zeigten,

dass sie eine protektive Wirkung nach Transplantation aufweisen (von Boehmer 2005).

### **3.2.2. Progression von Nierenerkrankungen**

Zunächst beschäftigte man sich hauptsächlich mit dem frühen Schaden nach Ischämie-Reperfusion, die ein akutes Nierenversagen verursachen können. Dabei korreliert das Ausmaß der entzündlichen Infiltrate mit dem Abfall der renalen Funktion (Segeer et al. 2000). Man geht davon aus, dass die Leukozyten zytotoxische Zytokine, Sauerstoffradikale und proteolytische Enzyme freisetzen, die zur Schädigung der Tubuluszellen führen (Devarajan 2006), sodass es zu Ablösungen des Bürstensaums sowie gesamter Tubulus-Zellverbände von der Basalmembran kommt, die das Tubuluslumen verlegen (Abuelo 2007). Die Funktion der Niere verschlechtert sich, wodurch es zu einem Anstieg des Serum-Kreatinins kommt (Burne-Taney et al. 2005).

Die Mechanismen, die zur progressiven Fibrose führen und damit die Gefahr eines chronischen Organversagens erhöhen, sind nicht eindeutig verstanden. Eine permanente Schädigung peritubulärer Kapillaren durch Hypoxie sowie proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren werden diskutiert (Basile et al. 2001). Die Infiltration durch Entzündungszellen ist ebenfalls ein wesentlicher Faktor (Burne-Taney et al. 2005). Obwohl das Einwandern von T-Lymphozyten bereits unmittelbar nach Ischämie beobachtet wird, geht man davon aus, dass diese Zellen auch Auswirkungen auf Spätschäden der Niere haben (Burne-Taney et al. 2005; Ascon et al. 2009).

#### **3.2.2.1. Tubuläre Epithelial-Mesenchymale-Transdifferenzierung (TEMT)**

Eine Umwandlung von Tubulusepithelien in Myofibroblasten (tubuläre epithelial-mesenchymale-Transdifferenzierung) stellt bei der Ausbildung einer tubulointerstitialen Fibrose ein wichtiges Ereignis dar (Hay und Zuk 1995; Strutz et al. 1995; Ng et al. 1998). TEMT ist ein komplexer Vorgang, der charakterisiert ist durch einen Verlust epithelialer Zelladhäsion, De-novo-Expression von  $\alpha$ -SMA, Abbau der tubulären Basalmembran und vermehrter Migration der Tubuluszellen ins Interstitium. Nach Abschluss der Umwandlung weisen die Zellen ein typisch mesenchymales spindelförmiges Aussehen auf und kommen ihrer ursprünglichen Funktion nicht mehr nach (Yang und Liu 2001).

Der bedeutendste Wachstumsfaktor für die tubuläre epitheliale-mesenchymale-Transdifferenzierung ist TGF- $\beta$ , der zu einer verminderten Expression von E-Cadherin führt, der mit einem Polaritätsverlust der Epithelien einhergeht (Fan et al. 1999; Fan et al. 2001; Lan 2003). Des Weiteren induziert TGF- $\beta$  die Produktion von extrazellulärer Matrix sowie von Metalloproteinase II, die zur Spaltung von Kollagen Typ-IV Fasern führt, wodurch die Basalmembran zerstört und den Zellen eine Migration ins Interstitium ermöglicht wird (Ng et al. 1998; Lenz et al. 2000). Einen hemmenden Effekt auf die tubuläre epitheliale-mesenchymale-Transdifferenzierung hat HGF, das in der Lage ist die Fibrosereaktion zu verringern, wobei der Wirkmechanismus ungeklärt ist (Yang und Liu 2002).

### **3.3. Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Diese Dissertationsarbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob die Reabsorption von filtrierten Retinol-RBP-Komplexen Auswirkungen sowohl auf das Ausmaß der tubulären renalen Schädigung als auch auf die Regeneration der Epithelien nach Ischämie-Reperfusion hat.

Aufbauend auf dem Modell der renalen Rückresorption von Vitamin D-DBP-Komplexen wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen der verminderten Reabsorption von Retinol-RBP-Komplexen nach renaler Ischämie-Reperfusion untersucht, welche im Rahmen der Polaritäts- und Differenzierungsstörung auftreten. Da Retinoide nachgewiesen Proliferation und Differenzierung epithelialer und vaskulärer Zellen beeinflussen und als Retinol-RBP-Komplexe nach glomerulärer Filtration vollständig im proximalen Tubulus mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose via Megalin rückresorbiert werden, stellen wir die Hypothese auf, dass eine Retinol-Defizienz den tubulären renalen Schaden nach Ischämie-Reperfusion verstärkt und eine Regeneration der Epithelien verzögert.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Tierversuche**

RBP-knockout Mäuse (Quadro et al. 1999) und Megalin cre-lox knockout Mäuse sowie Wildtyp Kontrollen (Lehste et al. 2003) wurden unter Ketanest-Narkose median laparotomiert. Anschließend wurden die Nierenhili beidseitig mittels Mikroaneurysma-Gefäßclips für die Dauer von 45 Minuten okkludiert. Danach wurden die Clips entfernt und der Bauchraum mittels Muskel- und Hautnaht verschlossen und eine antibiotische OP-Nachsorge mittels Penicillin G 2000 U/kg KG durchgeführt. Nach zwei sowie sieben Tagen wurden Blutentnahmen durchgeführt und die Tiere einer tiefen Barbiturat-Narkose unterzogen, in der der Bauchraum eröffnet und die Exsanguination mittels Aortenpunktion erfolgte. Zur genaueren Untersuchung wurden beide Nieren entnommen und in Paraffin eingebettet („Med. Diss.“, Böckmann 2011). Jede Gruppe bestand aus zehn Tieren.

### **4.2. Immunhistochemische Färbungen**

An den Nieren wurden verschiedene immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dafür wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und in einem Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland) auf Objektträger (Superior, Marienfeld, Deutschland) aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht in einem Brutschrank (Haraeus, Hamburg, Deutschland) gelagert, wo sie bei einer Temperatur von 60°C getrocknet wurden. Die immunhistochemischen Färbungen wurden von Hand durchgeführt. Als Grundlage der Färbung diente die ABC-Methode (Bratthauer 2010).

#### **4.2.1. Färbeprotokolle**

Nach entparaffinieren (2x Xylol á 10 min) und wässern der Schnitte (3x100%, 3x95%, 1x70% EtOH, jeweils 10 min) erfolgte die Antigendemaskierung mittels Kochen in einem Dampfkochtopf. Dafür verweilten die Objektträger für 144 sec bei maximalem Druck im Citrat-Puffer (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland) und wurden hinterher in PBS (siehe Tab.10) gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase mittels Peroxidase-Block-Lösung (Dako, Glostrup, Dänemark) für 10 min und Spülung in PBS, schloss sich danach ein 30-minütiger Kasein-Block (Zymed, San Francisco,

USA) an. Nachdem in Vorversuchen die optimale Verdünnung eines jeden Antikörpers ermittelt wurde, wurde nun der Primär-Antikörper angesetzt (Tab.1). Dazu wurde der Antikörper mit entsprechender Menge PBS versetzt und je 100 µl auf einen Objektträger gegeben (Inkubationszeit: 60 min). Hinterher folgten zwei Spülungen mit PBS und die Applikation von 100 µl des sekundären Antikörpers mit einer 30-minütigen Inkubationszeit (siehe Tab.2). Nach erneuter PBS-Spülung erfolgte das Auftragen des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (Dako, Glostrup, Dänemark) für 30 min. Bei der Detektion von Caspase-3 und ICAM-1 kamen HRP-markierte Polymere zum Einsatz, die mit dem entsprechenden sekundären Antikörper konjugiert waren. Es folgten eine weitere Spülung und eine Inkubation mit DAB über 3 min (siehe Tab.11). Anschließend wurden die Objektträger zur Kerngegenfärbung für 1 sec in Hämalaun (Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht und unter fließendem Wasser für 1 min geschwenkt bevor sie der aufsteigenden Alkoholreihe zugeführt wurden, sodass die Präparate entwässerten. Abschließend wurden sie in Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben und mit Eukitt (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) eingedeckt.

Antigen	Primär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Caspase-3	Rabbit anti-Caspase-3, Cleaved (CPP32)	1:30	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Ki-67	Ki-67 rat monoclonal clone tec-3 M7249	1:10	Dako, Glostrup, Dänemark
CD3	Polyclonal rabbit anti-human CD3 (F7.2.38)	1:25	Dako, Glostrup, Dänemark
TGF-β-1	Polyclonal rabbit IgG TGF-β1 (sc-146)	1:200	Santa Cruz Biotech., Heidelberg, Deutschland
FoxP3	Purified anti-mouse/rat FoxP3 (FJK-16s)	1:20	eBioscience, San Diego, USA
ICAM-1	Purified anti-mouse ICAM-1 (AF796)	1:50	R&D Systems, Nordenstadt

Tab.1: Primäre Antikörper

Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller
SP1020B anti-rat IgG (H&L) Biotin-gekoppelt	1:100	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
R1454 anti-rabbit IgG (H&L) Biotin-gekoppelt	1:200	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
Polyclonal rabbit anti-goat Ig/HRP-gekoppelt	1:200	Dako, Glostrup, Dänemark
EnVision+ System-anti-rabbit Ig/HRP-gekoppelt	1:200	Dako, Glostrup, Dänemark

Tab.2: Sekundäre Antikörper

#### 4.3. Morphometrie

Das Gewebe wurde einerseits unter Verwendung eines Mikroskops (Typ BH-2, Olympus, Hamburg, Deutschland) bei 200-facher Vergrößerung begutachtet („medium-powerfield“). Dabei wurde neben der Anzahl der immunhistochemisch

gefärbten Zellen auch die Lokalisation der Zellen beurteilt. Die Zellzählung der Caspase-3-, Ki-67-, CD3- und ICAM-1-positiven Zellen erfolgte durch Auszählung von je zehn Gesichtsfeldern einer Niere. Anschließend wurde aus der Summe der immunhistochemisch-markierten Zellen ein Mittelwert gebildet. Die Zellzahl FoxP3-positiver Zellen wurde anhand gesamter Organ-Querschnitte ausgewertet. Bei den Caspase-3-positiven und Ki-67-positiven Zellen wurden ausschließlich Tubulusepithelzellen, bei der ICAM-1-Färbung nur peritubulär gelegene Kapillaren berücksichtigt. Die CD3-Zellen wurden anhand ihrer Zellkerne detektiert, da durch die teilweise erhebliche Konfluenz dieser Zellen eine Computer-gestützte Morphometrie nur bedingt möglich war. Die Auswertung der TGF-beta-positiven Tubulusepithelzellen erfolgte durch Intensitätsmessung mit Hilfe der interaktiv Computer-gestützten morphometrischen Software „AxioVision Release 4.7.1.“ (Carl Zeiss Mikrolmaging, Göttingen, Deutschland). Dabei wurden zunächst zehn Gesichtsfelder mit einer am Mikroskop (Axioskop, Carl Zeiss Mikrolmaging, Göttingen, Deutschland) befestigten Digitalkamera (Typ MC-3217P, Horn-Imaging, Aalen, Deutschland) digitalisiert und im Anschluss daran Tubulusepithelzellen mit der stärksten Färbungsintensität markiert. Mit Hilfe der Software konnten nun alle Tubuluszellen gleicher Intensität erfasst und deren relative Fläche zur Fläche des Gesichtsfeldes ermittelt werden.

Die tubuläre Schädigung wurde mittels einer semiquantitativen Graduierung quantifiziert. Als Kriterien dafür wurden Zellvakuolisierung, luminale abgeschilferte Epithelien, Bürstensaumabbrüche und die Ablösung der Tubulusepithelzellen von der Basalmembran herangezogen („Med. Diss.“, Boeckmann 2011).

#### **4.4. Laser- unterstützte Mikrodissektion**

Das Verfahren der Laser- unterstützten Mikrodissektion (LMD) ermöglicht die Isolation einzelner Zellen aus einer Gewebeprobe, einem zytologischen Präparat oder einer Zellkultur, wobei die Zellen mit Hilfe eines Lasers unter mikroskopischer Sicht aus Ihrer Umgebung heraus gelöst werden (Bonner et al. 1997). Die Dissektionseinheit des CellCut Plus System besteht aus einem invertierten binokularen Lichtmikroskop, einer Lasereinheit, einer Videokamera und einem Bildschirm (Molecular Machines & Industries, Haslett, USA). Zusätzlich ist ein

Computer angeschlossen, der sowohl die Steuerung des Lasers als auch die Dokumentation erlaubt.

#### **4.4.1. Übertragung der Proben auf Objektträger**

Beim CellCut Plus System muss das Gewebe zunächst auf spezielle Objektträger übertragen werden, die mit einer 1,4 µm dicken PET-Membran beschichtet sind (Molecular Machines & Industries, Haslett, USA). Um das Nierengewebe übertragen zu können, wurden die Paraffinblöcke zunächst bei -10° C gefroren. Anschließend wurden 7 µm dicke Gewebeschnitte der Paraffinblöcke in einem Mikrotom (Leica Industries, Nussloch, Deutschland) geschnitten. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland) übertragen, in dem eine Wassertemperatur von 45° C herrschte. Hier wurden je 4 Gewebeschnitte auf die Oberseite der PET-Membran gezogen und die Objektträger über Nacht im Brutschrank (Heraeus, Hamburg, Deutschland) bei 60° C getrocknet. Um eine Kontamination der Proben zu vermeiden wurden alle Arbeitsschritte unter einer RNase-freien Zellkulturbank (Köttermann, Uetze, Deutschland) durchgeführt.

#### **4.4.2. Färbung der Schnittpräparate**

Die Präparate wurden zunächst mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Die Färbung erfolgte nach einer etablierten Methode (Espina et al. 2006). Anschließend wurde der Objektträger umgedreht und auf einen Objektträger aus Glas (Superior, Marienfeld, Deutschland) gelegt. Dadurch wurde gewährleistet, dass die Proben während der Mikrodissektion nicht kontaminierten.

#### **4.4.3. Dissektionsvorgang**

Die Objektträger wurden auf einem motorisierten und Computergesteuerten Trägertisch des CellCut Plus Mikroskops fixiert. Oberhalb des Tisches befand sich ein Arm, an dem ein Deckel eines Caps (Molecular Machines & Industries, Haslett, USA) befestigt wurde, der mit einem thermolabilen adhäsiven Polymer beschichtet war.

Die am Mikroskop angebrachte Videokamera übertrug das Gesichtsfeld auf den Bildschirm, sodass die proximalen Tubuluszellen lokalisiert werden konnten. Der Arm wurde Computergesteuert abgesenkt, sodass der Deckel des Caps in Kontakt mit der

PET-Membran trat. Die Schnittränder wurden am Monitor festgelegt und der Laser aktiviert, worauf das thermolabile Polymer die Laserenergie absorbierte und sich erwärmte, sodass es mit den darunter liegenden Zellen verschmolz. Die Zellen hafteten am Deckel und wurden durch Anheben des Caps, das anschließend mit RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland) befüllt wurde, aus dem übrigen Zellverbund heraus gelöst.

#### **4.4.4. RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation der isolierten Zellen erfolgte mit dem Paradise Reverse Transkriptase Kit (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Es erfolgte zunächst die Extraktion der RNA mittels Proteinase K Verdau. Anschließend wurden die Zellextrakte auf 95° C erhitzt und nach Abkühlung Binding-Puffer sowie EtOH zugesetzt. Die Lösung wurde auf eine Säule gegeben und mehrmals zentrifugiert. Die RNA wurde dann mit zwei verschiedenen Wasch-Puffern gewaschen und eine DNase-Behandlung bei 37°C durchgeführt.

#### **4.4.5. Qualitätskontrolle der RNA**

Die Qualität der RNA wurde im Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) gemessen. Um eine lineare Struktur der RNA zu erhalten, musste die RNA zunächst im Thermocycler (Certified GeneTool, Milpitas, USA) für 2 min bei 70°C hitzedenaturiert werden. Anschließend wurden in die wells des Chips Gel-Dye-Mix, Marker und ladder sowie 1 µl der Probe pipettiert und der Chip in den Agilent Bioanalyzer eingelegt. Die Qualität der RNA konnte nun anhand eines Elektropherogramms und durch die RNA-Integrity-Number bewertet werden.

Das Elektropherogramm stellt einzelne Untereinheiten der Gesamt-RNA graphisch dar, wodurch ein Rückschluss auf die Qualität der Gesamt-RNA gezogen werden kann. Bei der RNA-Integrity-Number handelt es sich um eine Skala, mit der man die Interpretation der RNA-Qualität standardisiert hat, sodass die individuelle Interpretation ersetzt und damit die Vergleichbarkeit von Proben vereinfacht wird. Diese Skala basiert auf einem numerischen System von 1 bis 10, wobei 1 für ein stark degradiertes RNA-Profil und 10 für einen exzellenten RNA-Zustand steht. Dieses Verfahren wurde von Agilent Technologies entwickelt und ist weltweit verbreitet.

## 4.5. Zellkulturen

Bei der Zelllinie handelte es sich um TKPTS Zellen, die renale proximale Tubulusepithelien murinen Ursprungs darstellen (Ernest und Bello-Reuss 1995). TKPTS Zellen sind in der Nierenforschung etabliert und in mehreren Studien zum Einsatz gekommen (Tiwari et al. 2005; Arany et al. 2006; Buzder et al. 2009).

### 4.5.1. Kultivierung der Zellen

Die Zelllinie TKPTS wurde in einem Brutschrank (Heraeus, Hamburg, Deutschland) bei 37,5° C, 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert. DMEM / Ham's F-12 (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), dem 15 mM HEPES (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) und 7% FCS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) zugesetzt waren, stellte das Nährmedium für die Zellen dar. Zusätzlich wurde dem Medium SITE Liquid media Supplement zugegeben: ein Zusatz aus Kälberinsulin (1 mg/ml), humanem Tansferrin (0,55 mg/ml), Natriumselenit (0,5 µg/ml) und Ethanolamin (0,2 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Pasching, Österreich).

### 4.5.2. Zellzählung

Die Zellen wurden in ein Zellkulturröhrchen gefüllt und resuspendiert. Anschließend wurde anhand eines Tropfens Suspension die Zellzahl mittels einer Thoma-Zählkammer ermittelt. Es wurden alle Quadrate ausgezählt und anhand der gezählten Zellzahl die Gesamtzellzahl ermittelt (siehe Abb.2).

$$a : b = c$$
$$c : 4 = d, \text{ wobei}$$

a = Anzahl tatsächlich gezählter Zellen  
b = Anzahl ausgezählter Quadrate  
c = Zellen pro Quadrat  
d = Zellzahl \* 10<sup>6</sup>/ml

Abb.2: Ermittlung der Gesamtzellzahl mittels Thoma-Zählkammer

Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dem Zellpellet wurde nun frisches Medium zugesetzt.

#### **4.5.3. Inkubation mit Retinolsäure**

Bevor die Zellen mit Retinolsäure-Isomeren inkubiert wurden, wurden jeweils  $3 \cdot 10^6$  Zellen in einem Volumen von 15 ml auf 7 Zellkulturflaschen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) verteilt.

Für die Inkubation der Zellen mit 9-cis- und all-trans-Retinolsäure (Sigma-Aldrich, Hamburg, Deutschland) wurden zunächst verschiedene Stammlösungen angesetzt. Dazu wurden unter einer Zellkulturbank (Köttermann, Uetze, Deutschland) sowohl 100 mg 9-cis-Retinolsäure als auch 100 mg all-trans-Retinolsäure in 33,28 ml DMSO gelöst. Aus diesen 10 mM-Stammlösungen wurden jeweils 1 mM-, 100  $\mu$ M-, 10  $\mu$ M-, 1  $\mu$ M- und 100 nM-Stammlösungen angesetzt.

Jede Zellkultur wurde nun mit 15  $\mu$ l einer 9-cis-Retinol- bzw. all-trans-Retinol-Stammlösung inkubiert, sodass insgesamt sechs Zellpopulationen mit sechs verschiedenen Retinol-Endkonzentrationen pro Retinol-Isomer hergestellt wurden. Als Negativkontrolle wurde eine Zellpopulation ausschließlich mit 15  $\mu$ l DMSO inkubiert.

Nach Zugabe der Stammlösungen wurden die Zellkulturflaschen mit Alufolie ummantelt und die Zellen im Brutschrank (Heraeus, Hamburg, Deutschland) für 24 h inkubiert.

#### **4.5.4. RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation der gezüchteten Zellen erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Zellkulturbank (Köttermann, Uetze, Deutschland) und nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Zunächst wurden die adhärennten Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, indem ihnen 5 mL Trypsin zugeführt wurden. Anschließend wurde die Zelldichte bestimmt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen, bevor ihnen 350  $\mu$ l RLT-Puffer zugesetzt wurden. Zum Homogenisieren der Zellpellets wurden die Ansätze mehrmals in einer Einmalkanüle (Braun, Melsungen, Deutschland) resuspendiert. Nach Zugabe von 350  $\mu$ l EtOH (70%) wurden die Lösungen auf die RNeasy®-Säulen

verteilt und mit RW1-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte der DNase-Verdau mittels DNase-Set (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dazu wurde für 15 min 10 µl DNase und 70 µl RDD Puffer auf die Säule gegeben und hinterher erneut mit RW1-Puffer gewaschen. Nach zweimaliger Wiederholung des DNase-Verdau schlossen sich zwei Waschschrte mit RPE-Puffer an. Anschließend wurde die RNA in 30 µl DEPC-Wasser (Ambion, Austin, USA) eluiert.

#### **4.5.5. Quantifizierung der RNA**

Nach 1:15-Verdünnung der RNA-Ansätze wurde die Konzentration der gewonnenen RNA photometrisch bestimmt. Im geeichten Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurde anschließend mittels des molaren Extinktionskoeffizienten die RNA-Konzentration gemessen sowie eine mögliche Proteinverunreinigung bestimmt. Eine Aussage über die Proteinverunreinigung erlaubte die Berechnung des  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten. Dafür wurde die Extinktion der verdünnten RNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen und anhand der Messwerte ein Quotient berechnet. Ein  $A_{260}/A_{280}$ -Quotient zwischen 1,8 und 2,1 galt als Hinweis für eine hochreine RNA.

#### **4.5.6. Qualitätskontrolle der RNA**

Die Qualitätskontrolle wurde auf dieselbe Weise durchgeführt wie sie unter 4.4.5. beschrieben ist.

#### 4.5.7. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem High-Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Alle Schritte wurden nach Hersteller Angaben durchgeführt. Zunächst wurde der Master-Mix angesetzt (siehe Tab.3).

Reagenzien	Volume ( $\mu$ l)/Reaction Kit
10x RT Buffer	2,0
25x dNTP Mix (100mM)	0,8
10x RT Random Primers	2,0
MultiScribe Reverse Transcriptase	1,0
Rnase Inhibitor	1,0
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3,2

Tab.3: Master-Mix cDNA-Synthese

Anschließend wurde 1  $\mu$ g RNA jeder Zelllinie mit 10  $\mu$ l Master-Mix versetzt, für 2 h in den Thermocycler (Certified GeneTool, Milpitas, USA) gestellt und die cDNA synthetisiert (siehe Tab.4).

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [min]
25	10
37	120
85	2
4	$\infty$

Tab.4: Temperaturstufen cDNA-Synthese

#### 4.5.8. Polymerase-Kettenreaktion

##### Prinzip

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um ein Verfahren, das die Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnitts erlaubt. Entwickelt wurde die Methode erstmals 1985 von Kary Mullis, der seine Idee ein Jahr später veröffentlichte (Saiki et al. 1986). Dafür erhielt er im Jahre 1993 den Nobelpreis für Chemie.

Die PCR besteht aus drei Phasen: der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase. In der ersten Phase wird die DNA für zwei Minuten bei einer Temperatur von 95 $^{\circ}$  C denaturiert, d.h. in ihre Einzelstränge zerlegt. Dies ist

Voraussetzung für den zweiten Schritt des Prozesses, dem Anlagern sogenannter Primer. Dabei handelt es sich um einzelsträngige Oligonukleotide, die synthetisch hergestellt werden und deren Sequenzen komplementär zu einem definierten Bereich der DNA sind. Die Temperatur bei denen sich die Primer an die einzelsträngige DNA anlagern (Annealingtemperatur) war je nach Primer unterschiedlich und lag zwischen 45-60°C (siehe Tab.7). Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird durch das Anlagern der Primer (Hybridisierung) in der Annealingphase flankiert. Darauf folgt die Elongationsphase, in der es zur enzymatischen Neusynthese des Doppelstrangs kommt. Bei dem Enzym handelt es sich um die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei 72°C liegt. Der Vorteil dieses Enzyms ist, dass es selbst den hohen Temperaturen in der Denaturierungsphase stand hält. Da in den ersten beiden Zyklen sehr lange DNA-Abschnitte entstehen (Intermediärprodukte), erhält man erst ab dem dritten Zyklus die DNA-Fragmente der gewünschten Länge. Durch kontinuierliche Wiederholungen der Reaktionen kommt es dann zu einer exponentiellen Zunahme der DNA-Moleküle.

Zunächst wurden die Primer mit Hilfe des Primer3-design-tool-Programms (SourceForge, Mountain View, USA) ermittelt, indem anhand der mRNA-Sequenz des zu untersuchenden Gens die Sequenz der komplementären Oligonukleotide berechnet wurde. Des Weiteren wurden auch Primerlänge, GC-Gehalt und Amplifikatlänge ermittelt (siehe Tab.5). Mittels DNASTar (DNASTar, Madison, USA) wurde überprüft, ob die Primer für die Hybridisierung geeignet waren.

Gen	Primersequenz	GC-Gehalt [%]	Primerlänge [bp]	Amplifikatlänge [bp]
HGF	forward primer 5'-TGGGTTCTTACTGCAAGACAA-3'	40,91	22	153
	reverse primer 5'-GCCTTCAGGACCATAGACCA-3'	55,00	20	
ICAM-1	forward primer 5'-AGGGCTGGCATTGTTCTCTA-3'	50,00	20	158
	reverse primer 5'-CTTCAGAGGCAGGAAACAGG-3'	55,00	20	
IL-16	forward primer 5'-GCAAGACCAACTCGGTCACT-3'	55,00	20	155
	reverse primer 5'-ATAGGGCCGTAATGCTGTC-3'	50,00	20	
RANTES	forward primer 5'-CCCTCACCATCATCCTCACT-3'	55,00	20	154
	reverse primer 5'-GAGCACTTGCTGCTGGTGTA-3'	55,00	20	
TGF-β-1	forward primer 5'-CAACAATTCTGGCGTTACC-3'	50,00	20	158
	reverse primer 5'-TGCTGTCACAAGAGCAGTGA-3'	50,00	20	
β-Aktin (Positivkontrolle)	forward primer 5'-CCCTGAGGCTCTTTCCAG-3'	57,89	19	118
	reverse primer 5'-GTTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3'	50,00	22	

Tab.5: Primersequenzen, GC-Gehalt, Primer- und Amplifikatlänge

Die Durchführung der PCR erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zunächst wurde ein Master-Mix angesetzt (siehe Tab.6).

Reagenzien	Volume [ $\mu$ l]/Zelllinie
10x Puffer	2,5
dNTPs	0,5
forward primer	1
reverse primer	1
H <sub>2</sub> O	18,75
Taq-Polymerase	0,25

Tab.6: Master-Mix PCR

Anschließend wurden 24  $\mu$ l Master-Mix mit je 1  $\mu$ l cDNA jeder Zelllinie versetzt und in den Thermocycler (Certified GeneTool, Milpitas, USA) gegeben, in dem der entsprechende DNA-Abschnitt amplifiziert wurde. Die optimalen Annealingtemperaturen sowie die Anzahl der Zyklen wurden in Vorversuchen ermittelt und kann aus Tab.7 entnommen werden.

Gen	Annealingtemperatur [°C]	Zyklusanzahl
HGF	56	40
ICAM-1	56	35
IL-16	50	35
RANTES	56	30
TGF- $\beta$ -1	56	30

Tab.7: PCR-Programme

Zusätzlich zu den Retinoid-inkubierten Proben wurde eine negative und positive PCR-Kontrolle mitgeführt, wobei die Negativkontrolle keine cDNA beinhaltete und eine mögliche Kontamination von Fremd-DNA ausschloss; die Positivkontrolle, in der  $\beta$ -Aktin-Primer verwendet wurden, dokumentierte den Erfolg des PCR-Ablaufs. Die Versuche wurden als Triplikat durchgeführt.

#### **4.5.9. Agarosegel-Elektrophorese**

Für die Untersuchung der PCR-Produkte wurden 100 ml eines 1:10-verdünnten TPE-Puffers (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 1,5 g Agarose gemischt, im Mikrowellenherd verflüssigt und in eine Elektrophoresekammer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gegeben, in die 100 µl Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt, Deutschland) zugefügt wurde. Nach Erstarren des Gels wurden 12 µl Längenstandard (100 bis 3000 bp) und je 15 µl der Amplifikate gemischt mit 5 µl Ladepuffer in die Geltaschen überführt und die Kammer mit TPE-Puffer befüllt. Die Proben wurden bei einer Feldstärke von 100 Volt für 75 min aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht.

#### **4.6. Statistik**

Bei der statistischen Aufarbeitung der morphologischen und immunhistochemischen Ergebnisse wurden die Datensätze zunächst mit dem Kolmogorow-Smirnow-Test hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft (Statistik-Software StatSoft, Tulsa, USA). Bei entsprechender Verteilung wurden im Anschluss daran para- und nonparametrischen Testverfahren zur Gruppenanalyse durchgeführt. Dabei handelte es sich um den „t-Test für zwei unverbundene Stichproben“ und den „Mann-Whitney-U-Test“, mit denen statistisch signifikante Unterschiede ermittelt wurden. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem p-Wert  $< 0,05$  definiert. Dies bedeutete, dass die Wahrscheinlichkeit kleiner als 5% war, dass der gemessene Unterschied zwischen zwei Gruppen auf Zufall beruht.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Morphologische Ergebnisse

#### 5.1.1. Anzahl der Nephrone

Da Retinoide Einfluss auf die Organogenese haben und die Anzahl der Nephrone beeinflussen (Burrow 2000), wurde zunächst die Anzahl der Glomerula quantifiziert. Da ein Nephron definiert wird als ein Nierenkörperchen (Glomerulum und Bowman-Kapsel) mit angeschlossenem Tubulussystem, kann die Quantifizierung der Glomerula als repräsentativ für die Anzahl der Nephrone angesehen werden. Dafür wurden bei allen Tieren die Anzahl der Glomerula pro Organ-Querschnitt ermittelt. Es stellte sich ein nicht-signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen heraus, wobei der Wildtyp mit durchschnittlich 96 Glomerula im Vergleich zum Megalin-KO (88 Glomerula) und RBP-KO (85 Glomerula) eine höhere Zahl an Glomerula aufwies (vgl. Abbildung 1).

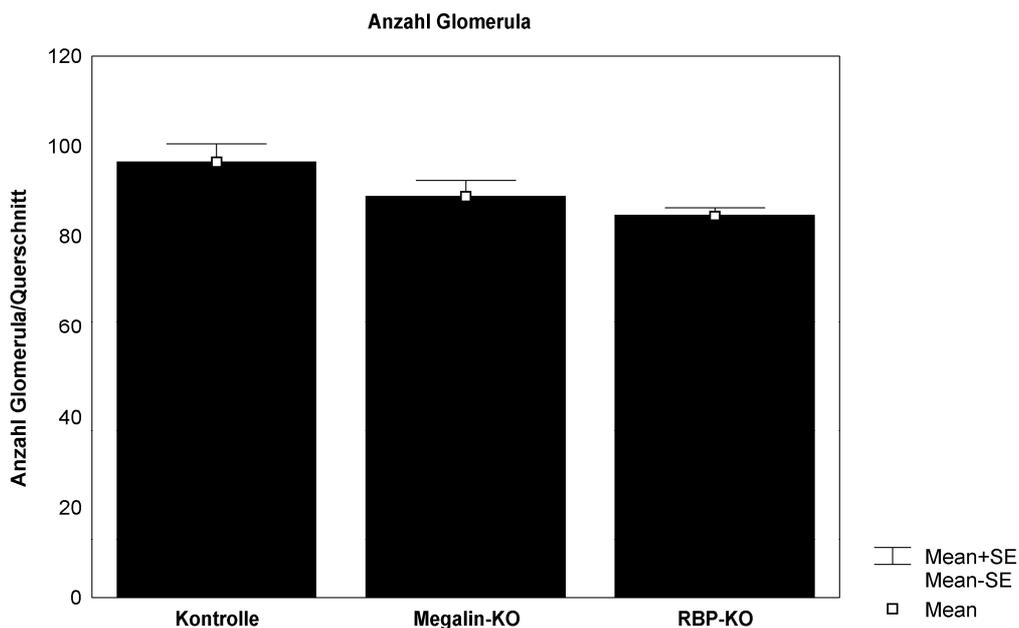


Abbildung 1: Anzahl der Glomerula/Querschnitt.

### 5.1.2. Graduierung der tubulären Schädigung

Die Graduierung der tubulären Schädigung wurde anhand der Parameter Zellschwellung, luminale abgeschilferte Epithelien, Bürstensaumabbrüche, Ablösung der Epithelien von der Basalmembran sowie dem Kreatininwert im Serum als Parameter für die renale Funktion („Med. Diss.“, Boeckmann 2011) analysiert.

Die RBP-KO-Gruppe wies sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion signifikant seltener keine oder leichte und signifikant häufiger schwere tubuläre Schäden auf im Vergleich zur Kontroll- und Megalin-KO- Gruppe (vgl. Abbildung 2). Zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion konnten in allen Gruppen erhöhte Kreatininwerte gemessen werden (RBP-Gruppe nicht signifikant höher). Nach sieben Tagen wiesen RBP-KO-Mäuse signifikant höhere Kreatininwerte auf als die Kontroll-Gruppe (vgl. Abbildung 3).

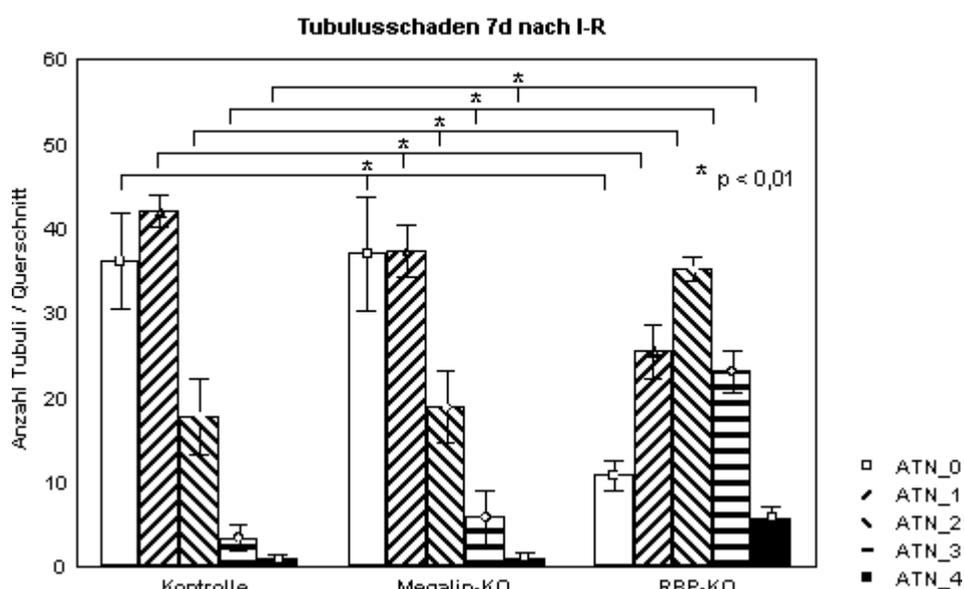


Abbildung 2: Ausmaß des akuten Tubulusschadens sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion (ATN 0 = kein morphologischer Schaden zu ermitteln, ATN 4 = schwerstgradiger Schaden, aus „Med. Diss.“, Boeckmann 2011)

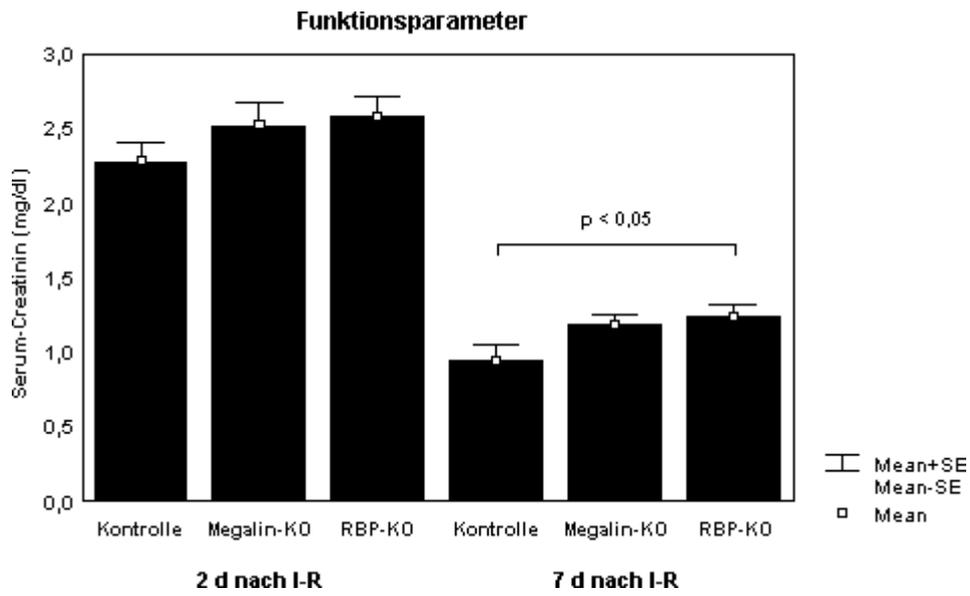


Abbildung 3: Serum-Kreatinin zwei und sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion (Normbereich bei der Maus < 0,22 mg/dL, aus „Med. Diss.“, Boeckmann 2011)

## 5.2. Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

### 5.2.1. Caspase-3

Die Bindung des Antikörpers gegen aktivierte cleaved-Caspase-3 markiert Zellen, in denen Apoptose induziert wurde. Bei der Auswertung wurden ausschließlich Caspase-3-positive Tubuluszellen berücksichtigt. Beim ersten Zeitpunkt (t=2d) war die Anzahl apoptotischer Tubuluszellen in allen drei Gruppen gering. Dabei wiesen die Kontroll-Tiere (durchschnittlich 3,8 Zellen/HPF) sowie die Tiere der Megalin-KO-Gruppe (2,4 Zellen/HPF) eine geringfügig höhere Anzahl an apoptotischen Tubulusepithelien auf im Vergleich zu den RBP-KO-Tieren (1,8 Zellen/HPF). Diese Unterschiede waren nicht signifikant (Kontrolle vs. RBP-KO  $p=0,135$ ; Kontrolle vs. Megalin-KO  $p=0,3$ ; Megalin-KO vs. RBP-KO  $p=0,116$ , vgl. Abbildung 4 und Abbildung 5).

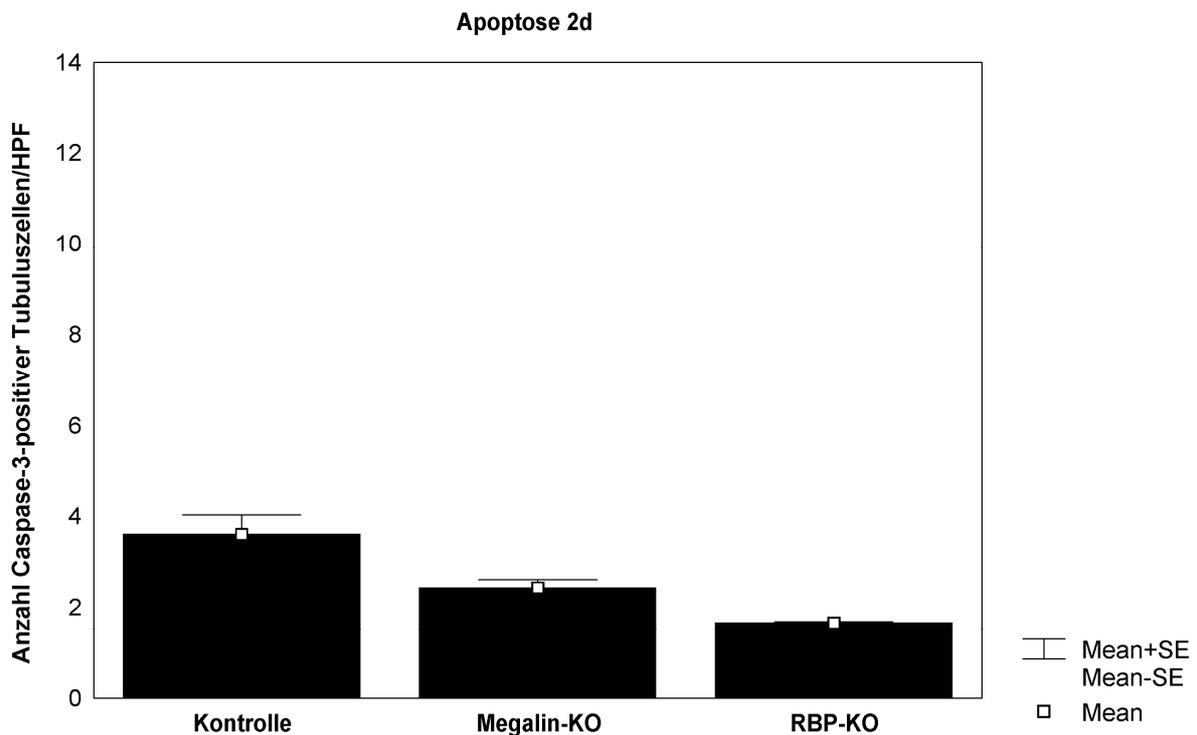


Abbildung 4: Apoptose Caspase-3-positiver Tubulusepithelien zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion

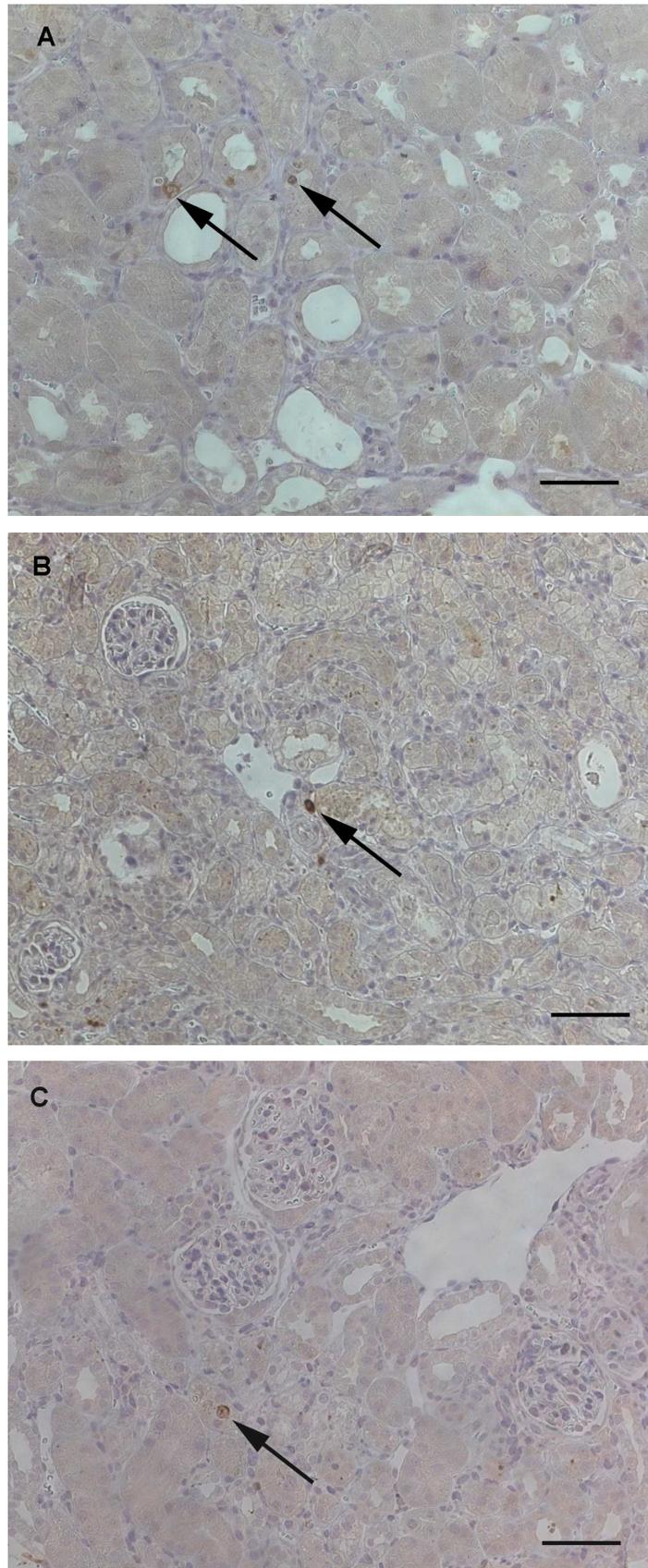


Abbildung 5: Apoptotische Caspase-3-positive Tubuluszellen (→) zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50  $\mu$ m)

Beim zweiten Zeitpunkt (t=7d) fand sich eine doppelt so hohe Anzahl an apoptotischen Tubulusepithelien sowohl in der Wildtyp- als auch in der Megalin-KO-Gruppe (Kontrolle: durchschnittlich 8,2 Zellen/HPF, Megalin-KO: 8 Zellen/HPF). Bei den RBP-KO-Tieren war nur ein schwacher Anstieg der Apoptose zu verzeichnen (2,1 Zellen/HPF). Zwischen Kontroll- und RBP-KO-Tieren war ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ) ebenso wie zwischen Megalin-KO- und RBP-KO-Tieren ( $p < 0,05$ ). Der Unterschied zwischen Kontroll- und Megalin-KO-Tieren war nicht signifikant ( $p = 0,259$ , vgl. Abbildung 6 und Abbildung 7).

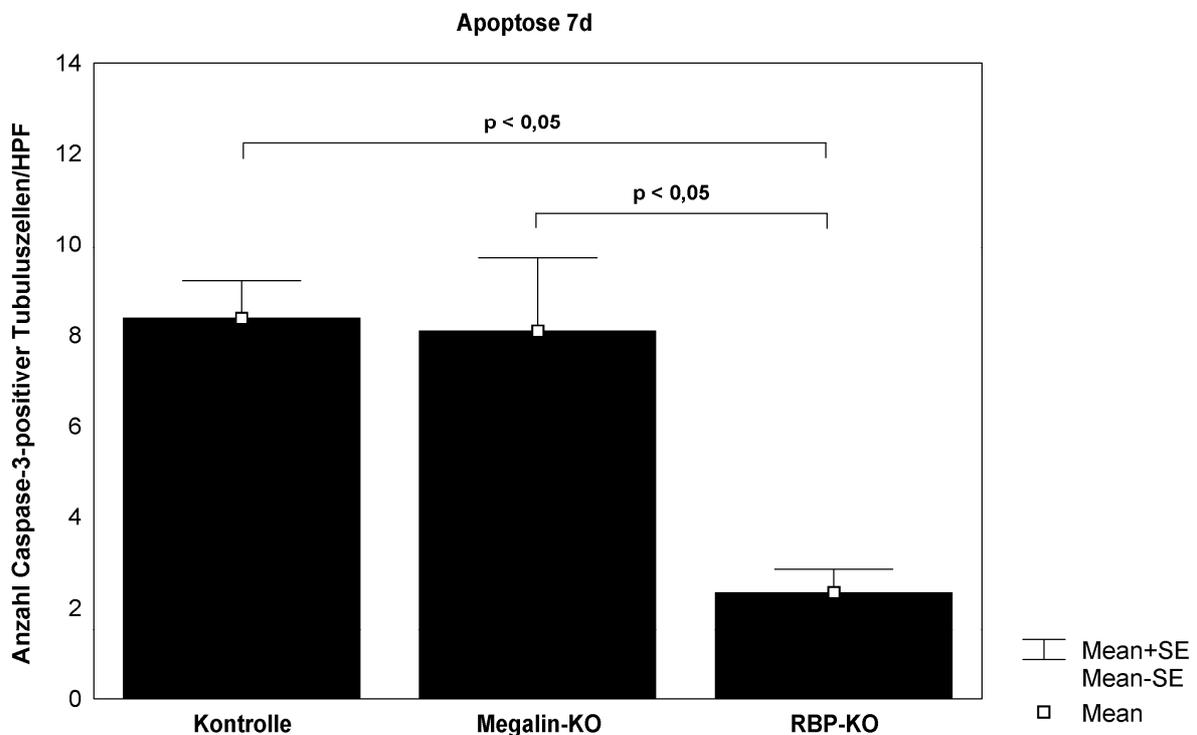


Abbildung 6: Apoptose Caspase-3-positiver Tubulusepithelien sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion

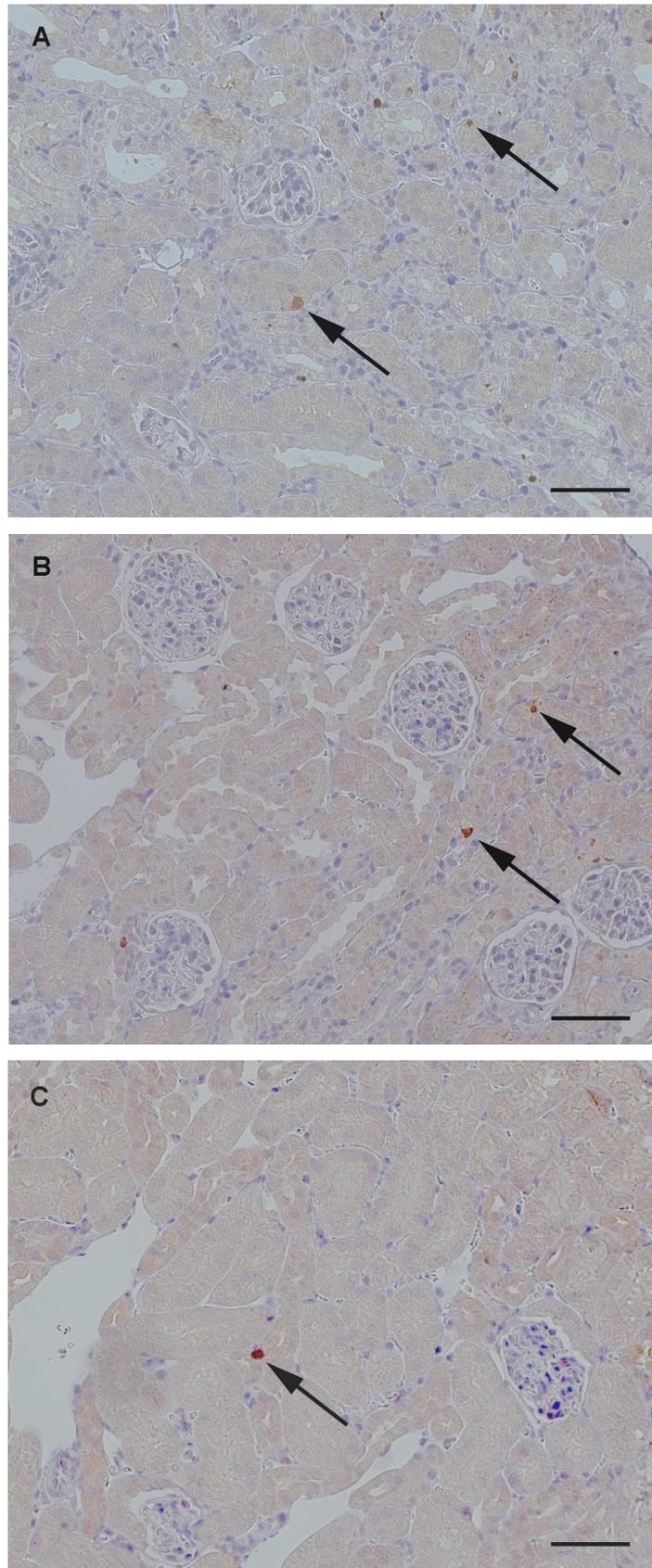


Abbildung 7: Apoptotische Caspase-3-positive Tubuluszellen (→) sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50  $\mu$ m)

### 5.2.2. Ki-67

In den immunhistochemischen Färbungen wurden positiv angefärbte proliferierende Tubulusepithelzellen ausgezählt. Beim ersten Zeitpunkt (t=2d) fiel auf, dass die Tubuluszellen der Wildtyp-Gruppe am stärksten proliferierten (24 Zellen/HPF). Das Epithel der Megalin-KO- und RBP-KO-Tiere proliferierte im Vergleich zum Kontroll-Gruppe geringer (Megalin-KO: 18 Zellen/HPF, RBP-KO: 17 Zellen/HPF). Die Unterschiede waren nicht signifikant (Kontrolle vs. RBP-KO  $p=0,526$ ; Kontrolle vs. Megalin-KO  $p=0,479$ ; Megalin-KO vs. RBP-KO  $p=0,914$ , vgl. Abbildung 8 und Abbildung 9).

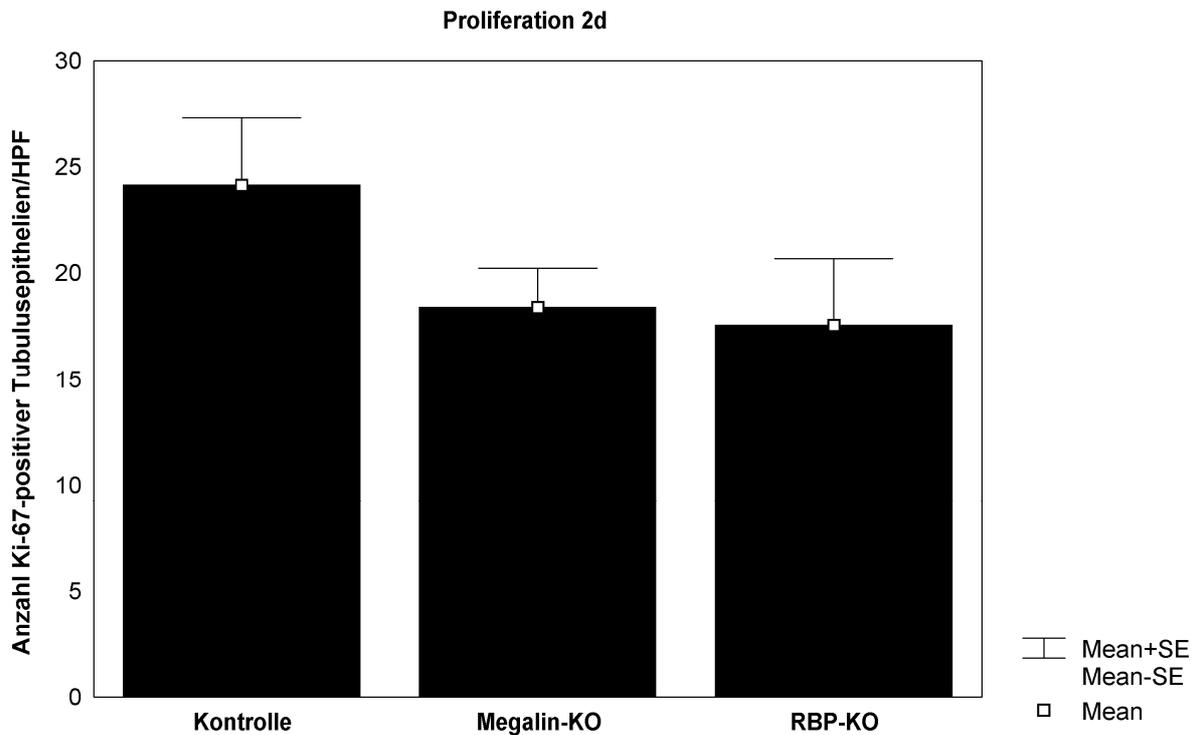


Abbildung 8: Proliferation (Ki-67-Positivität) von Tubulusepithelien zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion

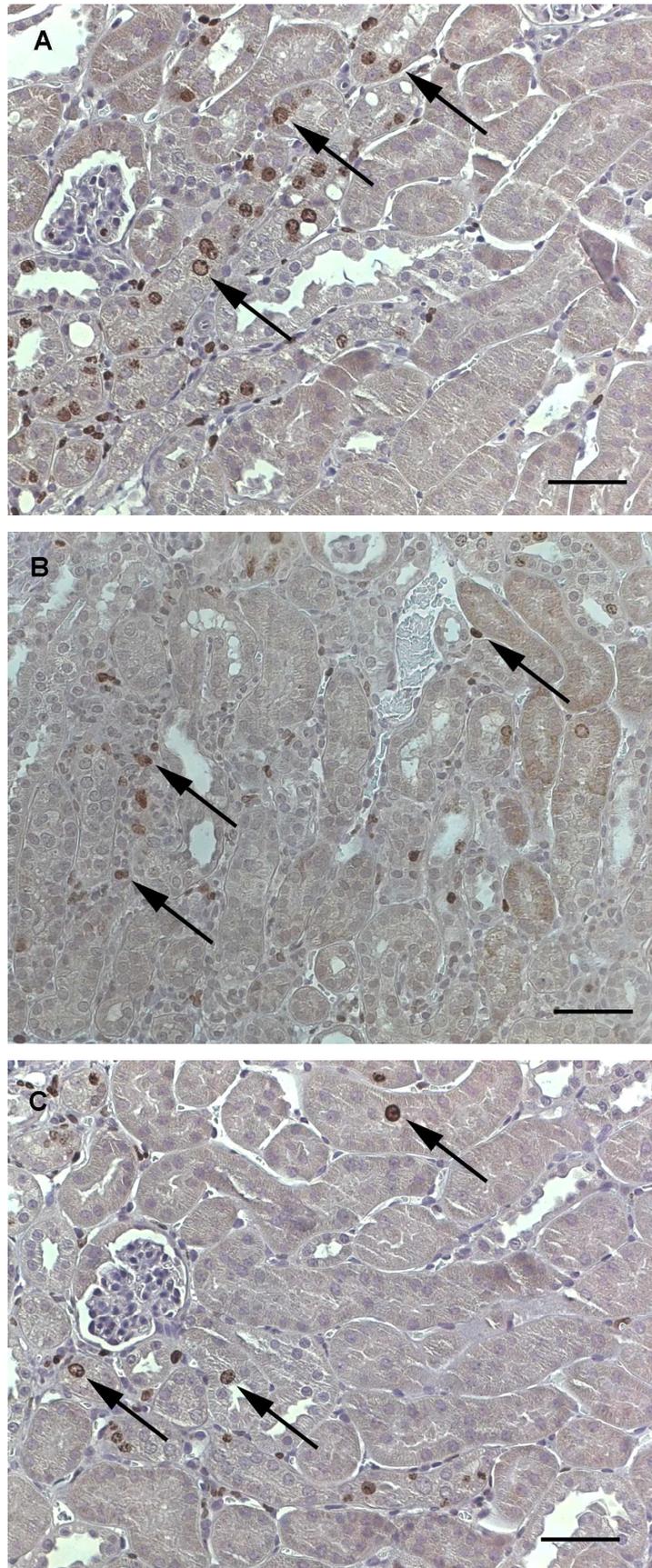


Abbildung 9: Proliferation Ki-67-positiver Tubulusepithelien (→) zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50  $\mu$ m)

Zum 7-Tage-Zeitpunkt ging die Proliferationsrate bei der Kontroll-Gruppe auf 21 Zellen/HPF zurück, bei den RBP-KO-Tieren verminderte sie sich drastisch auf 6 Zellen/HPF, wodurch sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen ergab ( $p < 0,0005$ ). Die Megalin-KO-Tiere zeigten im Vergleich zum ersten Zeitpunkt keine Veränderung der Proliferation (18 Zellen/HPF). Zwischen Megalin-KO- und RBP-KO-Gruppe ebenfalls war ein hochsignifikanter Unterschied festzustellen ( $p < 0,005$ ). Der Unterschied zwischen Kontroll- und Megalin-KO-Gruppe war nicht signifikant ( $p = 0,148$ , vgl. Abbildung 10 und Abbildung 11).

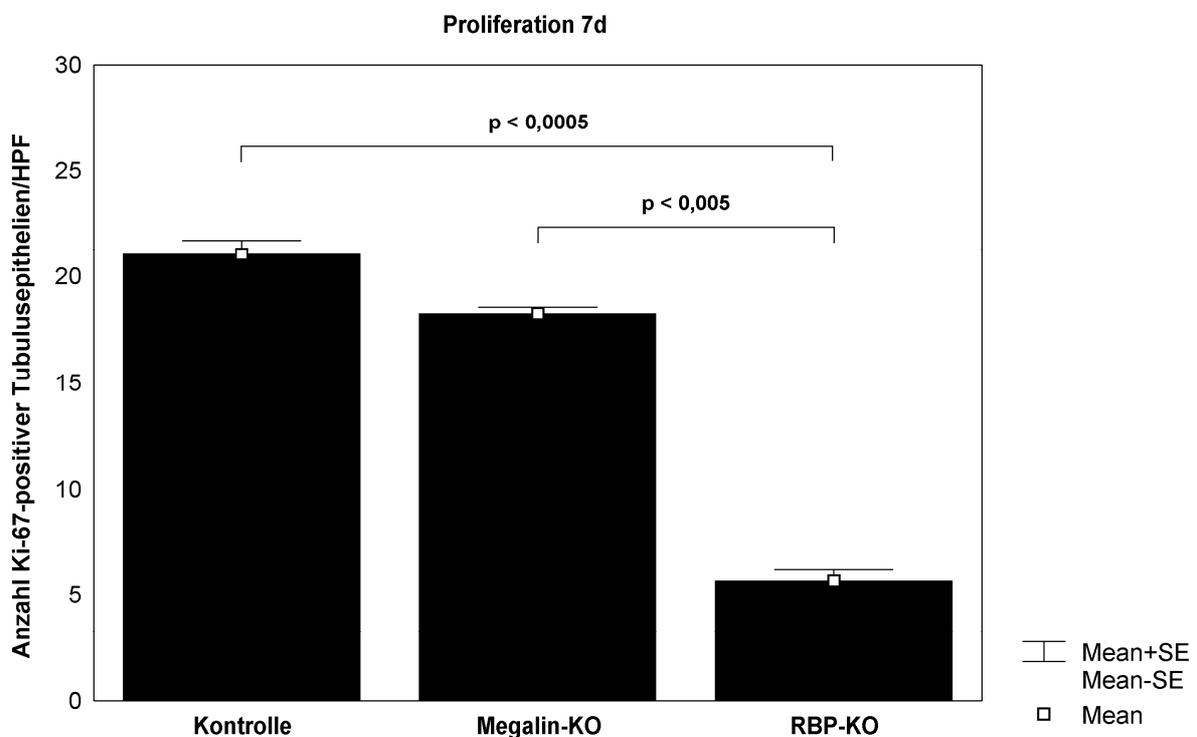


Abbildung 10: Proliferation (Ki-67-Positivität) von Tubulusepithelien 7 Tage nach Ischämie-Reperfusion

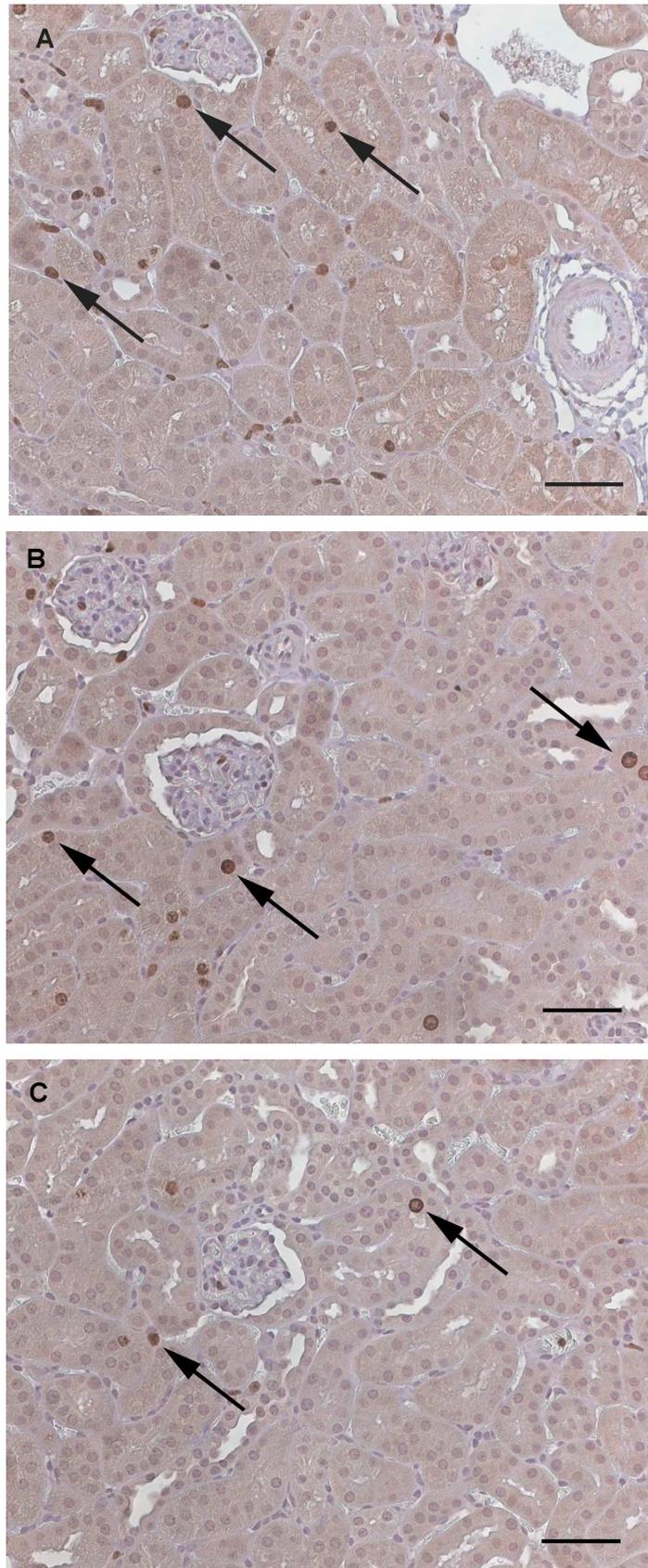


Abbildung 11: Proliferation Ki-67-positiver Tubulusepithelien (→) sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50  $\mu$ m)

### 5.2.3. CD3-positive T-Lymphozyten

Hier wurde die absolute Zahl an interstitiellen CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten pro Gesichtsfeld gezählt. Beim 2-Tage-Zeitpunkt wiesen die Wildtyp-Tiere im Vergleich zu den RBP-KO-Tieren eine höhere Infiltration von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten auf (Kontrolle: 74 Zellen/HPF, RBP-KO: 40 Zellen/HPF). Dieser Unterschied war hochsignifikant ( $p < 0,005$ ). Die Megalin-KO-Tiere (67 Zellen/HPF) wiesen ebenfalls eine signifikant höhere T-Zellzahl auf als die RBP-KO-Tiere ( $p < 0,05$ ). Der Unterschied zwischen der Wildtyp-Kontrolle und Megalin-KO-Gruppe war nicht signifikant ( $p = 0,468$ , vgl. Abbildung 12 und Abbildung 13).

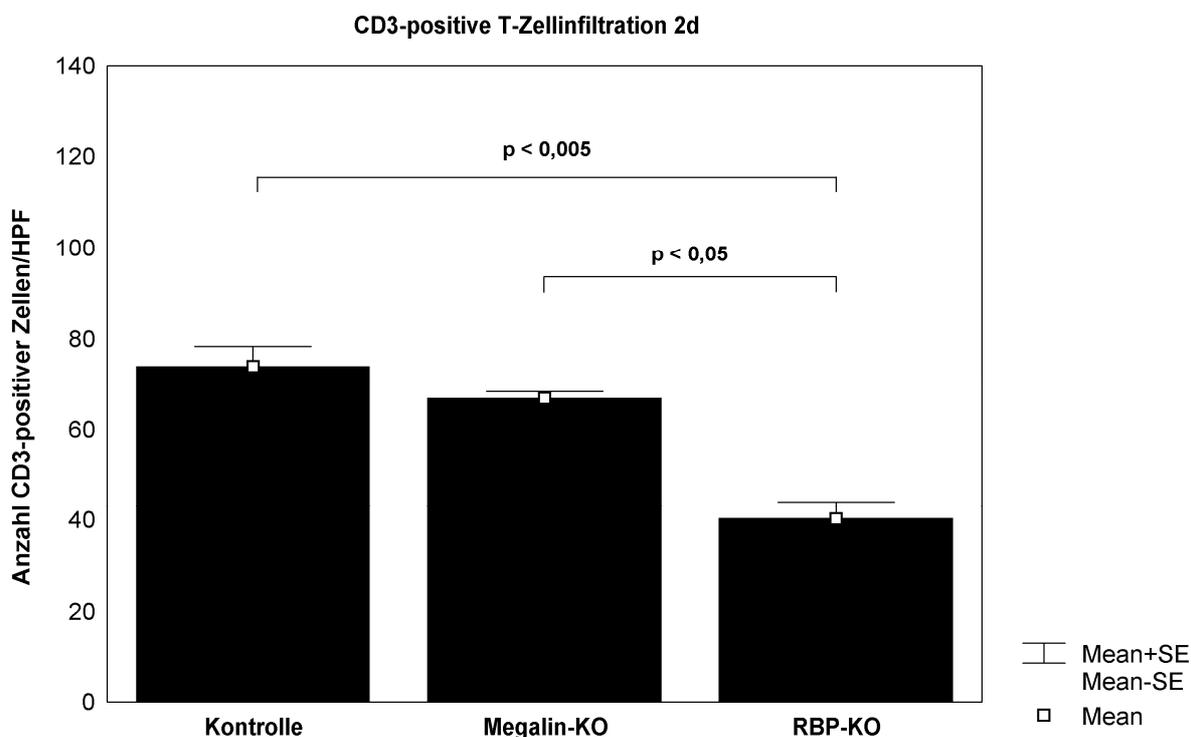


Abbildung 12: Infiltration von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion

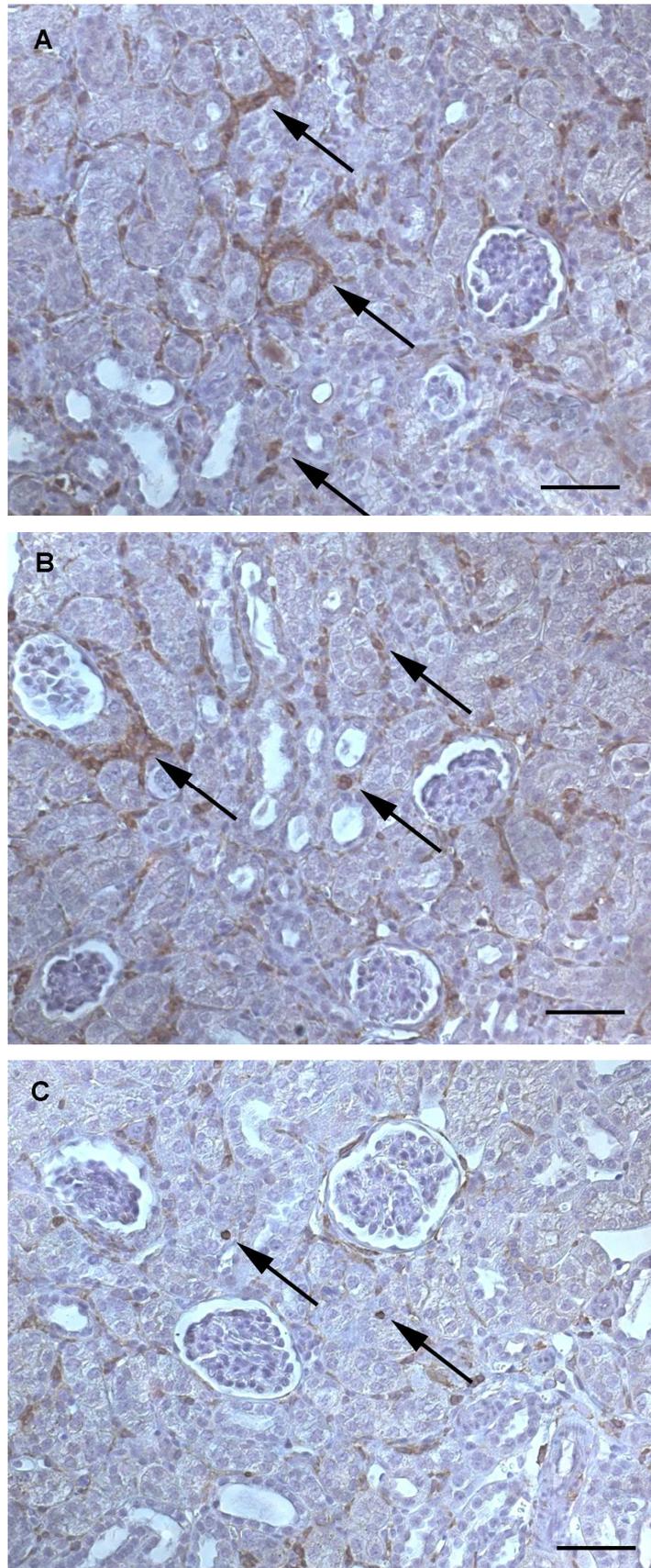


Abbildung 13: Infiltration renaler CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (→) zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50 µm)

Sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion stieg die Zahl der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten bei Wildtyp- und Megalin-KO-Tieren stark an (Kontrolle: 107 Zellen/HPF, Megalin-KO: 96 Zellen/HPF). Die RBP-KO-Gruppe zeigte nur geringe Veränderungen (45 Zellen/HPF). Es ergab sich sowohl ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Wildtyp- und RBP-KO-Tieren ( $p < 0,01$ ) als auch ein signifikanter Unterschied zwischen Megalin-KO- und RBP-KO-Tieren ( $p < 0,05$ ). Die Unterschiede zwischen den Wildtyp-Kontrollen und der Megalin-KO-Gruppe waren nicht signifikant ( $p = 0,662$ , vgl. Abbildung 14 und Abbildung 15).

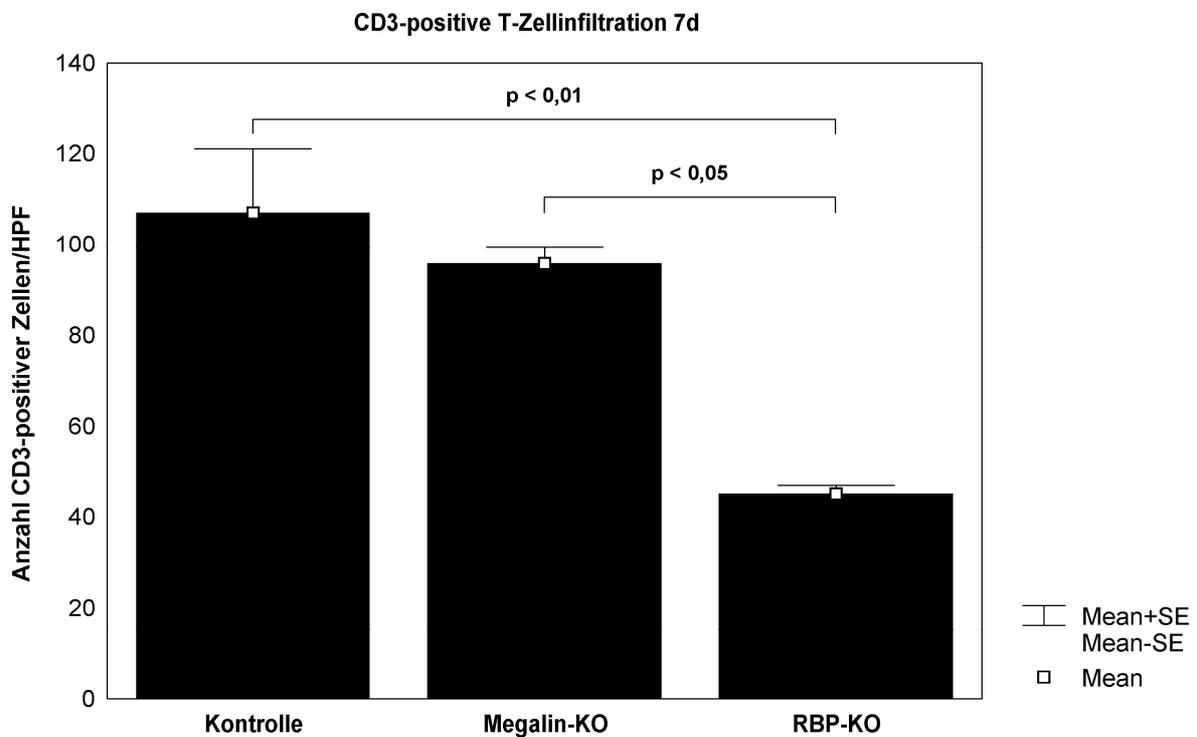


Abbildung 14: Infiltration von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion

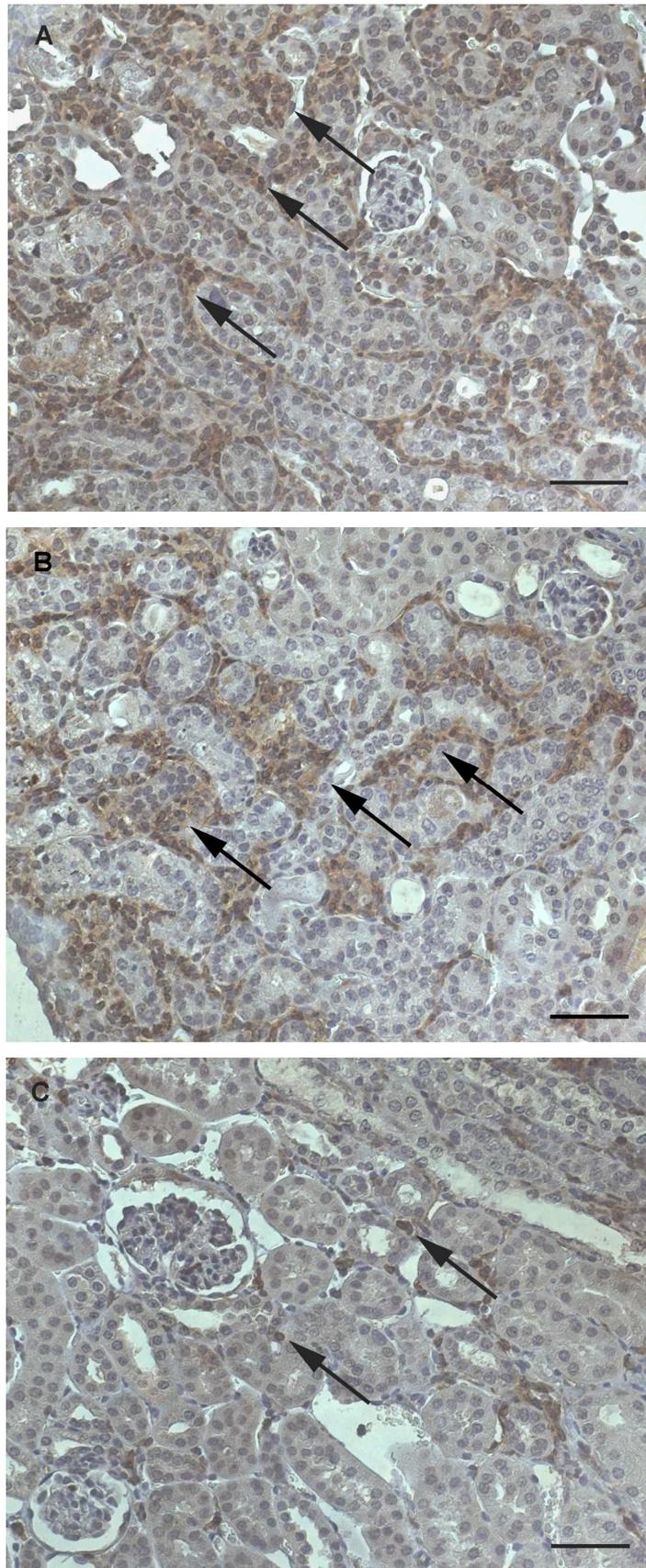


Abbildung 15: Infiltration renaler CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (→) sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50  $\mu$ m)

### 5.2.4. TGF- $\beta$ -1

Hier wurde die tubuläre Expression von TGF- $\beta$ -1 Computer-gestützt morphometrisch quantifiziert, indem aus der Gesamtheit der immunhistochemisch gefärbten Flächen ein relativer Flächenwert (in Prozent für jedes Gesichtsfeld) ermittelt wurde. Die tubuläre renale Expression von TGF- $\beta$ -1 nahm zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion bei den Kontroll-Tieren eine Fläche von 4,2% ein, bei der Megalin-KO (3,1% Fläche) und die RBP-KO-Gruppe (2,2% Fläche) war die Expression geringer. Ein signifikanter Unterschied ergab sich nicht (Kontrolle vs. RBP-KO  $p=0,133$ ; Kontrolle vs. Megalin-KO  $p=0,393$ ; Megalin-KO vs. RBP-KO  $p=0,499$ , vgl. Abbildung 16). Es fiel auf, dass die Expression des Signalmoleküls durch das Tubulusepithel vor allem basal lokalisiert war. Eine apikale Expression von TGF- $\beta$ -1 fand sich nicht (vgl. Abbildung 17).

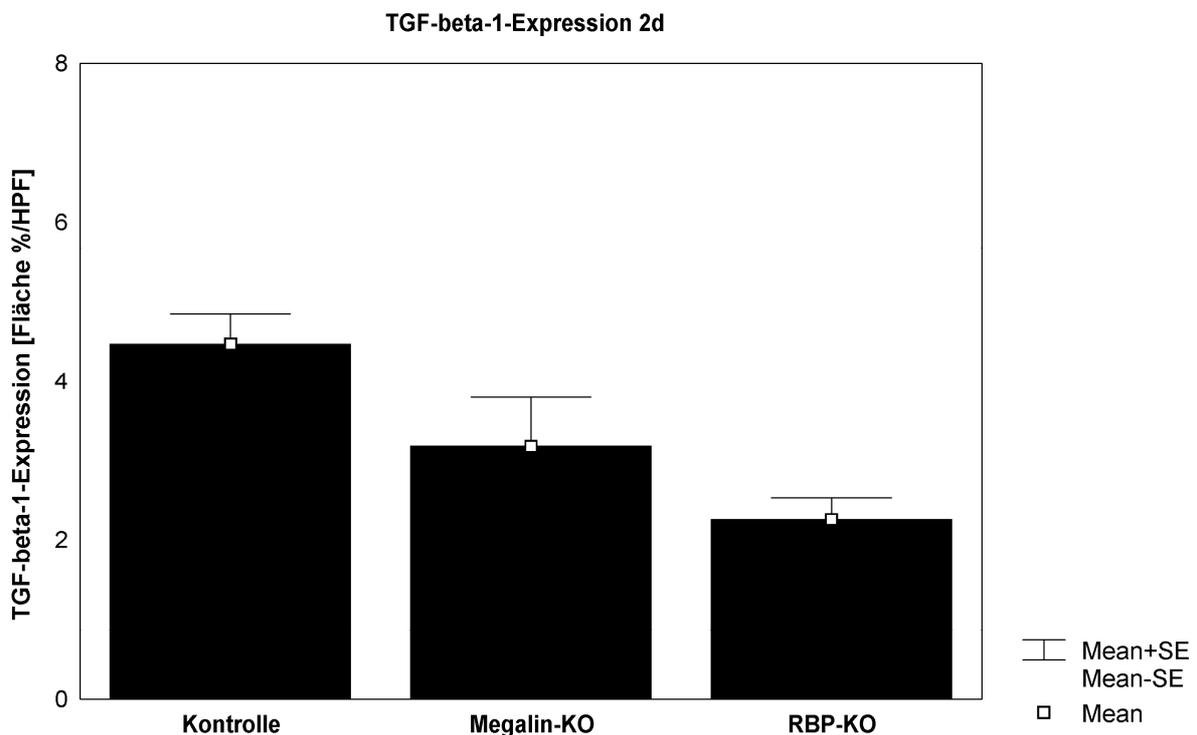


Abbildung 16: Renale TGF- $\beta$ -1-Expression zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion

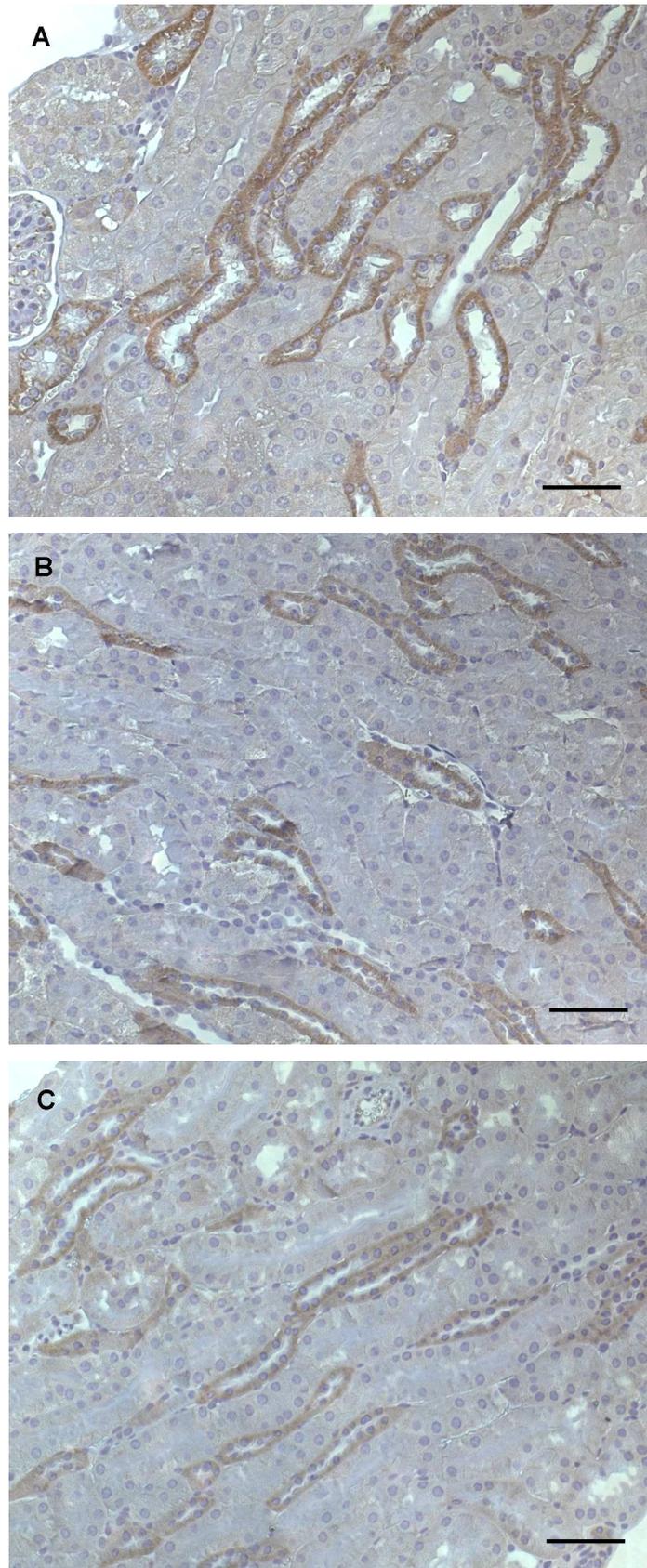


Abbildung 17: TGF- $\beta$ -1-exprimierende renale Tubulusepithelien zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50  $\mu$ m)

Sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion zeigte sich, dass im Vergleich zum 2-Tage-Zeitpunkt sowohl Kontroll- als auch Megalin-Tiere vermehrt TGF- $\beta$ -1 exprimierten (Kontrolle: 5,1% Fläche, Megalin-KO: 3,8% Fläche). Die RBP-KO-Gruppe veränderte die Expression mit 2,1% Fläche kaum. Der Unterschied zwischen Kontroll- und RBP-KO-Tieren war signifikant ( $p < 0,05$ ), ebenso der Unterschied zwischen Megalin-KO- und RBP-KO-Tieren ( $p < 0,05$ ). Zwischen Kontroll- und Megalin-KO-Tieren gab es keine Signifikanz ( $p = 0,234$ , vgl. Abbildung 18 und Abbildung 19).

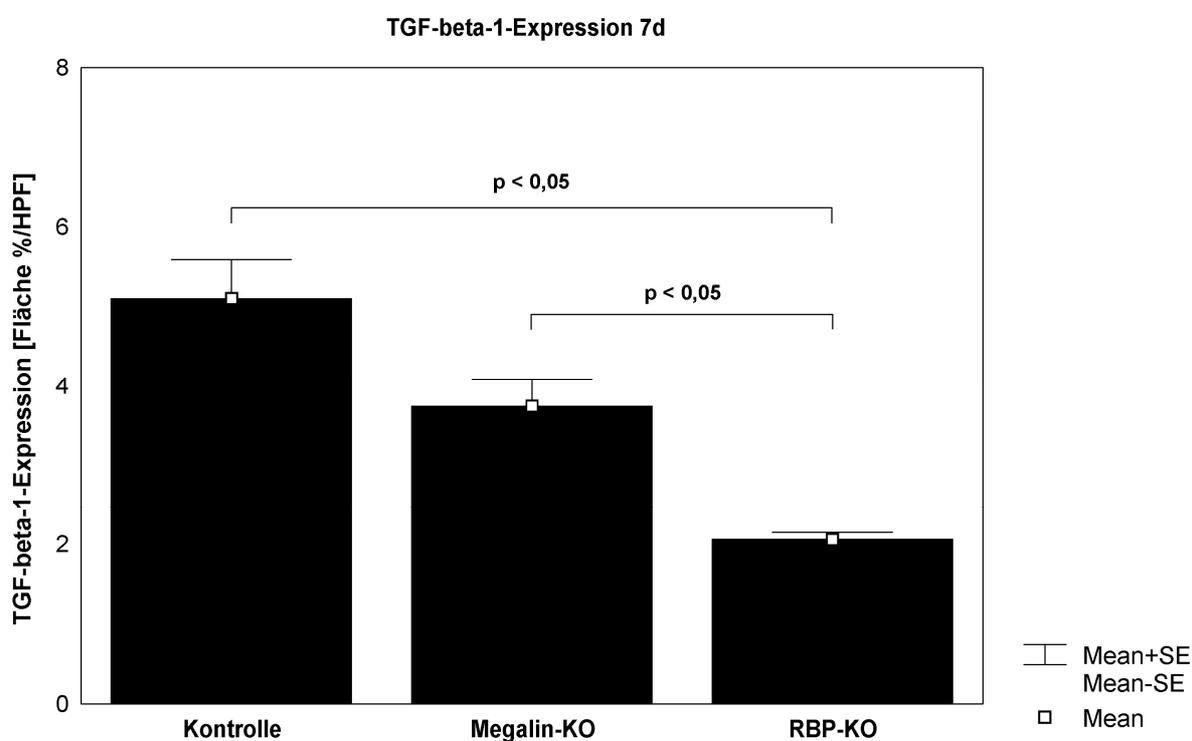


Abbildung 18: Renale TGF- $\beta$ -1-Expression sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion

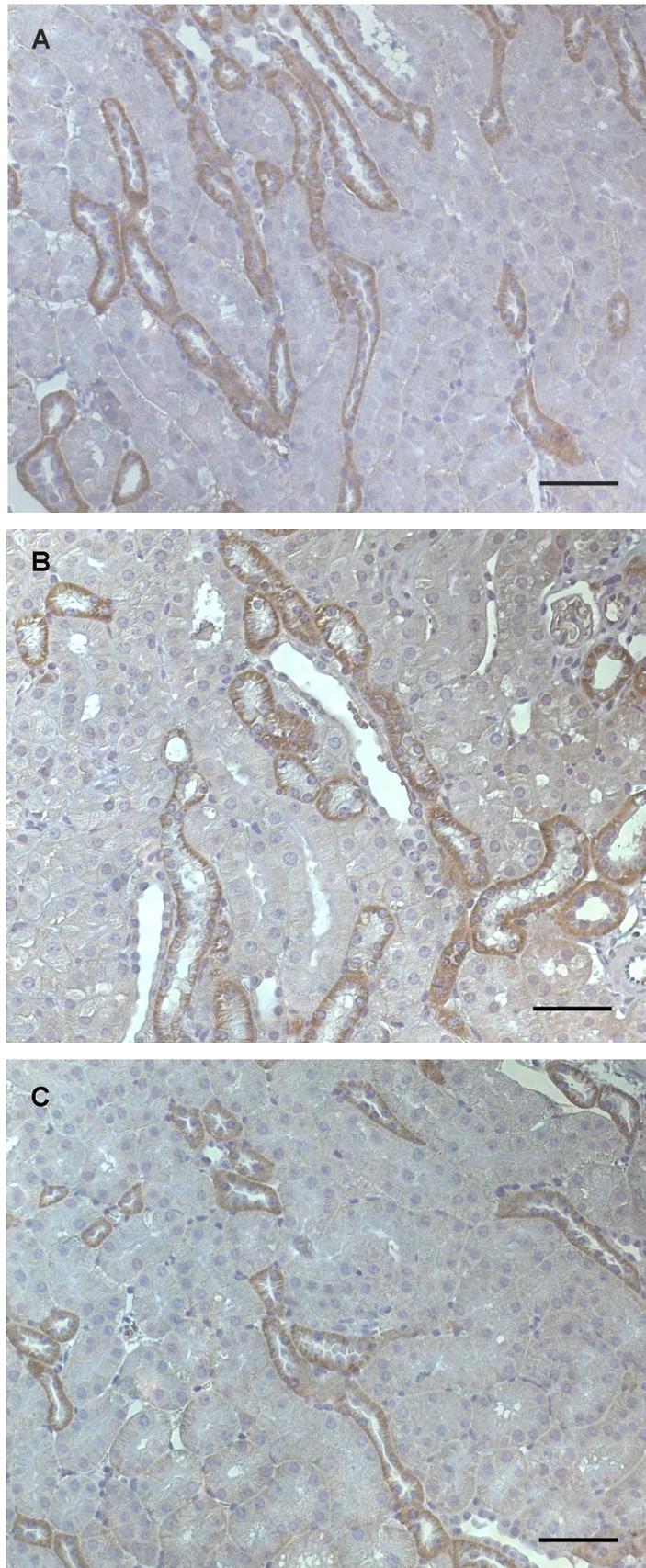


Abbildung 19: TGF- $\beta$ -1-exprimierende renale Tubulusepithelien sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50  $\mu$ m)

### 5.2.5. FoxP3-positive T-Lymphozyten

Aufgrund der geringen Anzahl regulatorischer FoxP3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden anstatt Gesichtsfeldern gesamte Organ-Querschnitte ausgewertet. Zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion zeigte sich, dass die Kontroll-Gruppe die höchste Infiltration von regulatorischen FoxP3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aufwies (22 Zellen/Querschnitt) und sich signifikant unterschied von der RBP-KO-Gruppe (8 Zellen,  $p < 0,05$ ). Die Unterschiede zwischen Kontroll- und Megalin-KO-Gruppe (11 Zellen) waren nicht signifikant ( $p = 0,077$ ), ebenso der Unterschied zwischen Megalin-KO- und RBP-KO-Tieren ( $p = 0,245$ , vgl. Abbildung 20 und Abbildung 21).

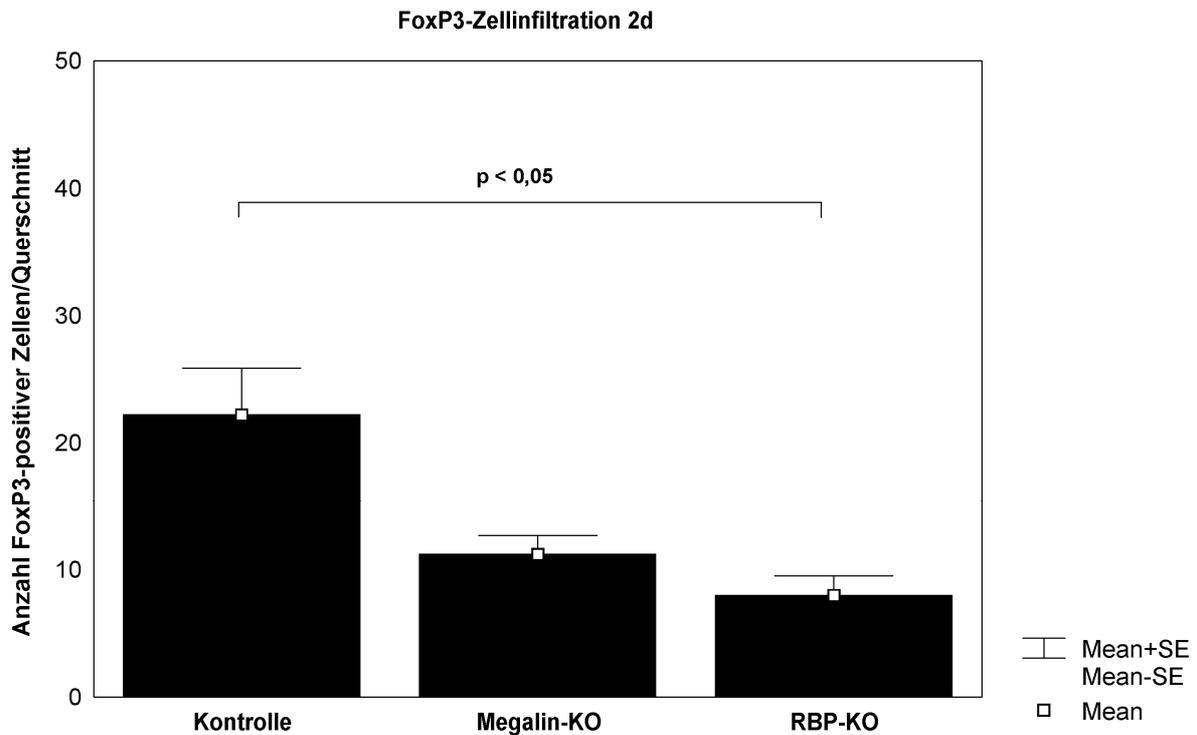


Abbildung 20: Infiltration regulatorischer FoxP3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion

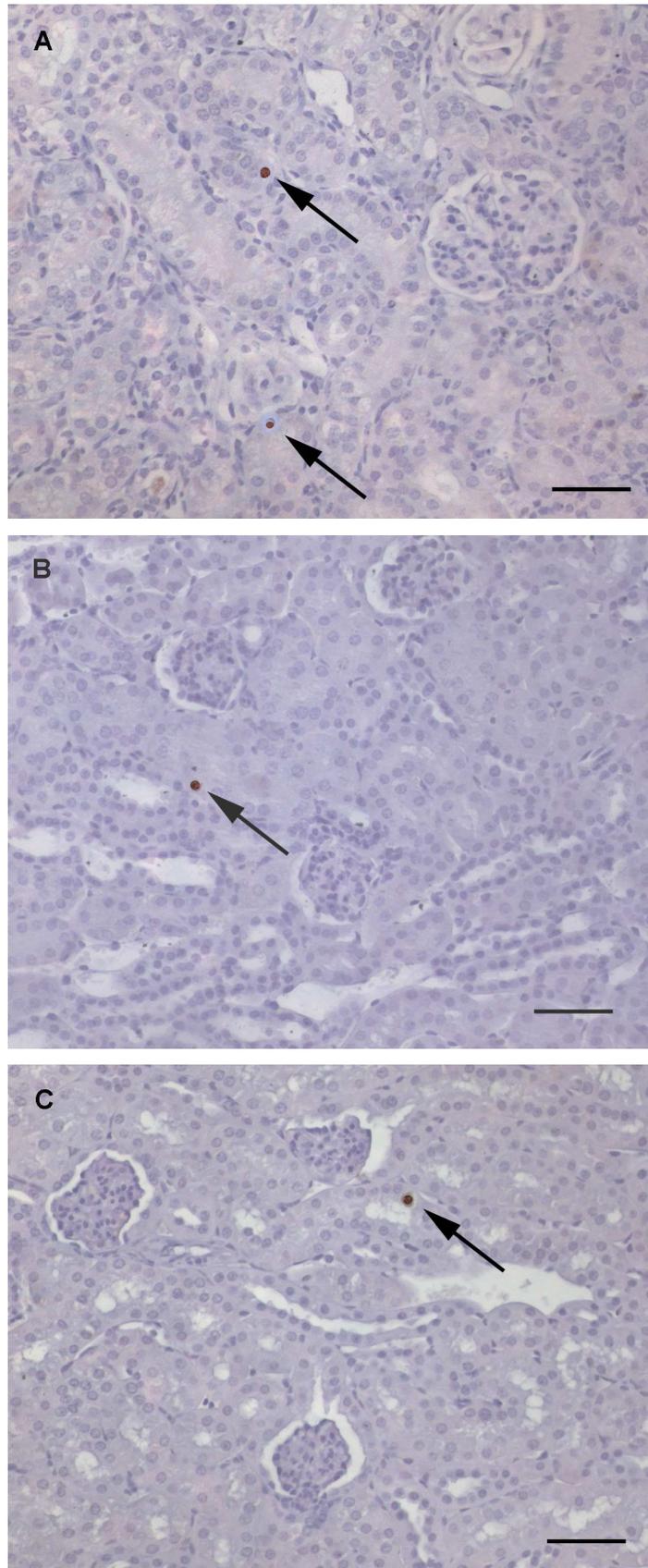


Abbildung 21: Infiltration renaler FoxP3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (→) zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50  $\mu$ m)

Zum 7-Tage-Zeitpunkt stieg die Zahl an regulatorischen FoxP3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in allen Gruppen an (Wildtyp: 35 Zellen/Querschnitt, Megalin-KO: 32 Zellen, RBP-KO: 15 Zellen). Der Unterschied zwischen Kontroll- und RBP-KO-Tieren war hochsignifikant ( $p < 0,005$ ), der Unterschied zwischen Megalin-KO- und RBP-KO-Gruppe war signifikant ( $p < 0,05$ ). Zwischen Kontroll- und Megalin-KO-Gruppe war kein signifikanter Unterschied zu eruieren ( $p = 0,762$ , vgl. Abbildung 22 und Abbildung 23).

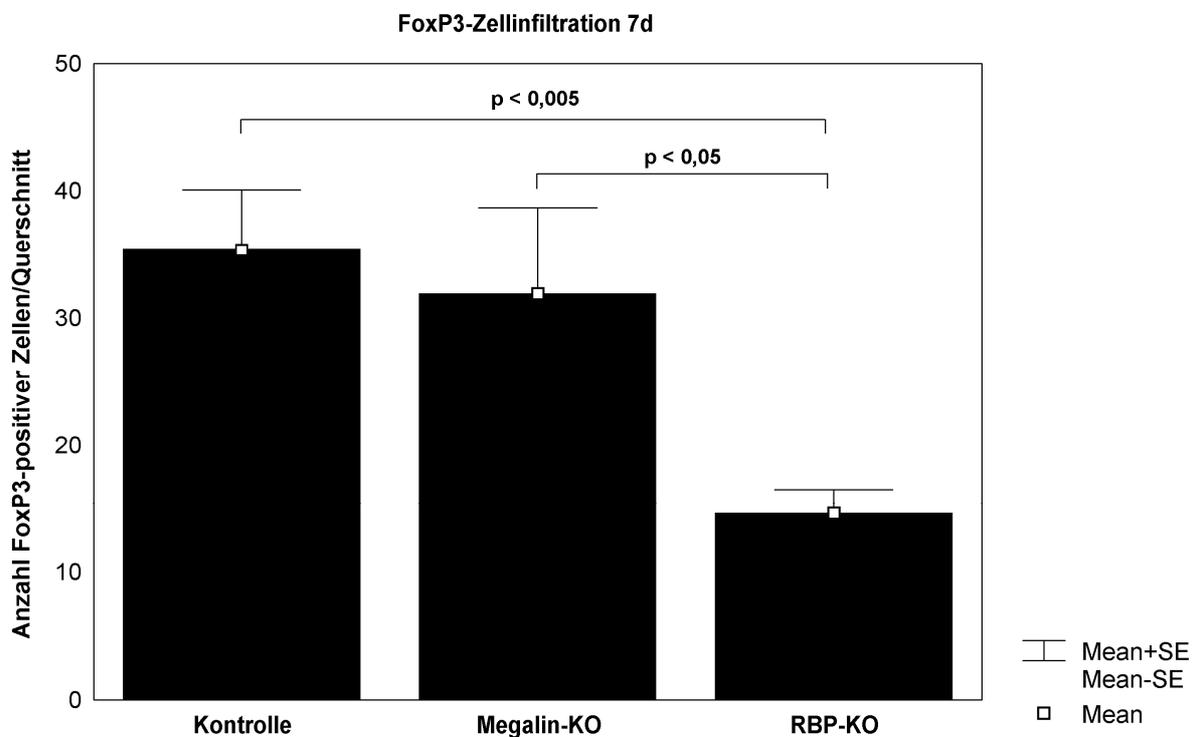


Abbildung 22: Infiltration regulatorischer FoxP3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion

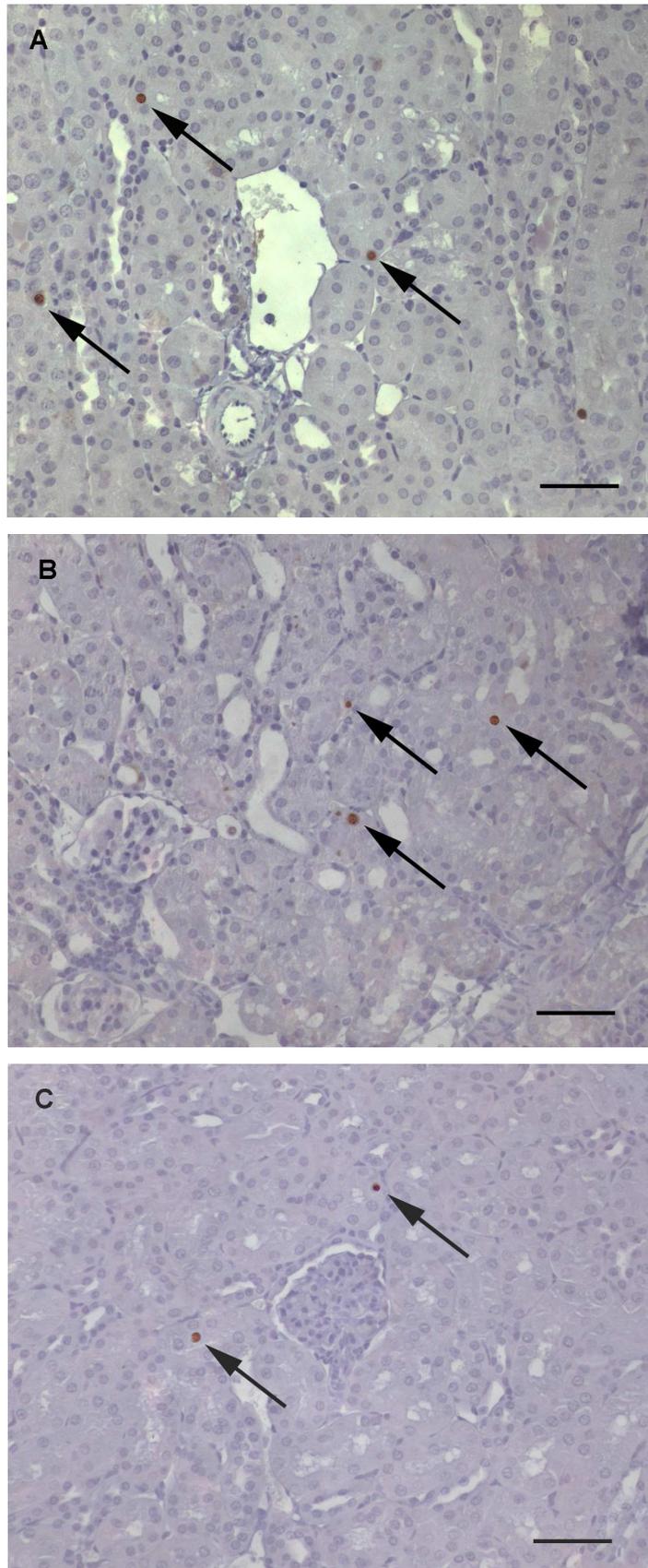


Abbildung 23: Infiltration renaler FoxP3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (→) sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout. Balken = 50 μm)

### 5.2.6. ICAM-1

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 ist wesentlicher Mediator der Invasion von Leukozyten in das geschädigte Gewebe und wird vom Endothel exprimiert. Abwehrzellen können an ICAM-1 binden, wodurch ihnen die Passage durch das Endothel ermöglicht wird und sie ins Parenchym eindringen können. Anhand dieser Färbung wurden ausschließlich peritubuläre Kapillaren dargestellt. Es wurde pro Gesichtsfeld die absolute Anzahl von ICAM-1-positiven Kapillaren gezählt. Dabei fiel auf, dass sowohl zwei Tage als auch sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion die Expression des Adhäsionsmoleküls in den Gruppen konstant war. Ferner unterschieden sich die Gruppen in ihrer Expression nur geringfügig voneinander. Nach zwei Tagen zeigten die Kontroll-Tiere durchschnittlich 49 Kapillaren/HPF, die Megalin-Tiere 45 Kapillaren/HPF und die RBP-KO-Tiere 41 Kapillaren/HPF (vgl. Abbildung 24 und Abbildung 25). Nach sieben Tagen wies die Kontroll-Gruppe 50 Kapillaren/HPF, die Megalin-KO-Gruppe 47 Kapillaren und die RBP-KO-Gruppe 44 Kapillaren/HPF auf (vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27). Signifikante Abweichungen waren nicht festzustellen.

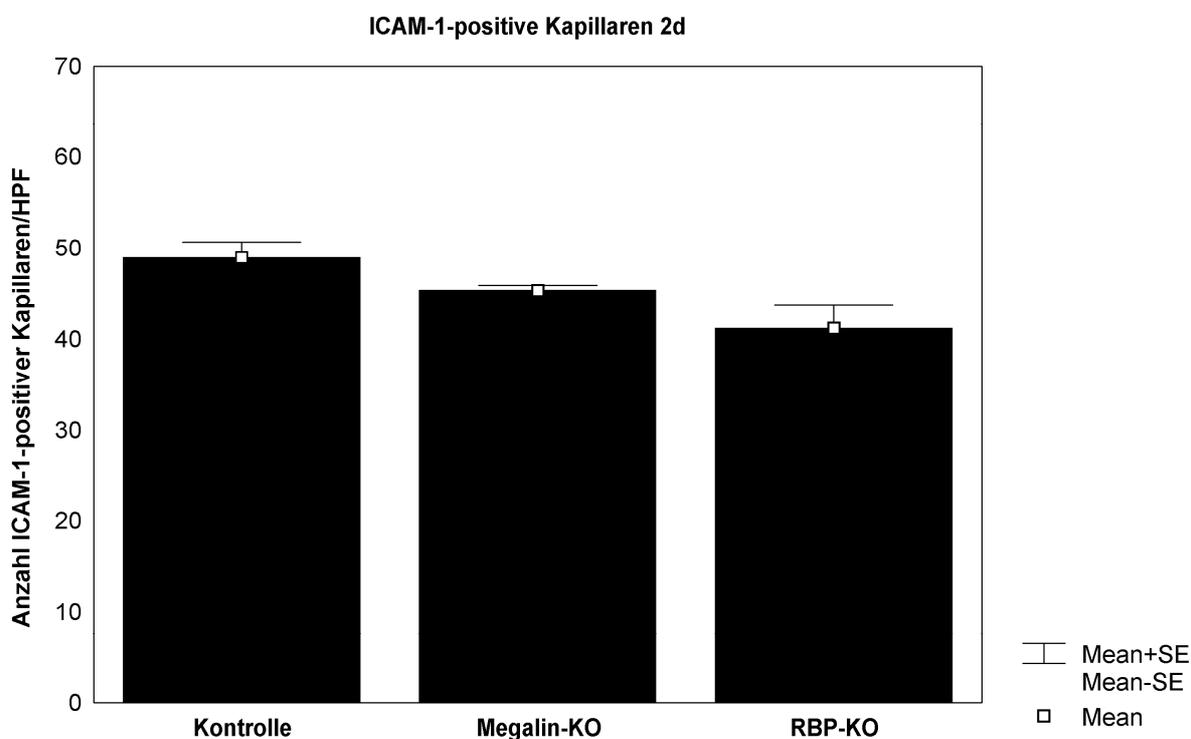


Abbildung 24: Peritubuläre ICAM-1-positive-Kapillaren zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion

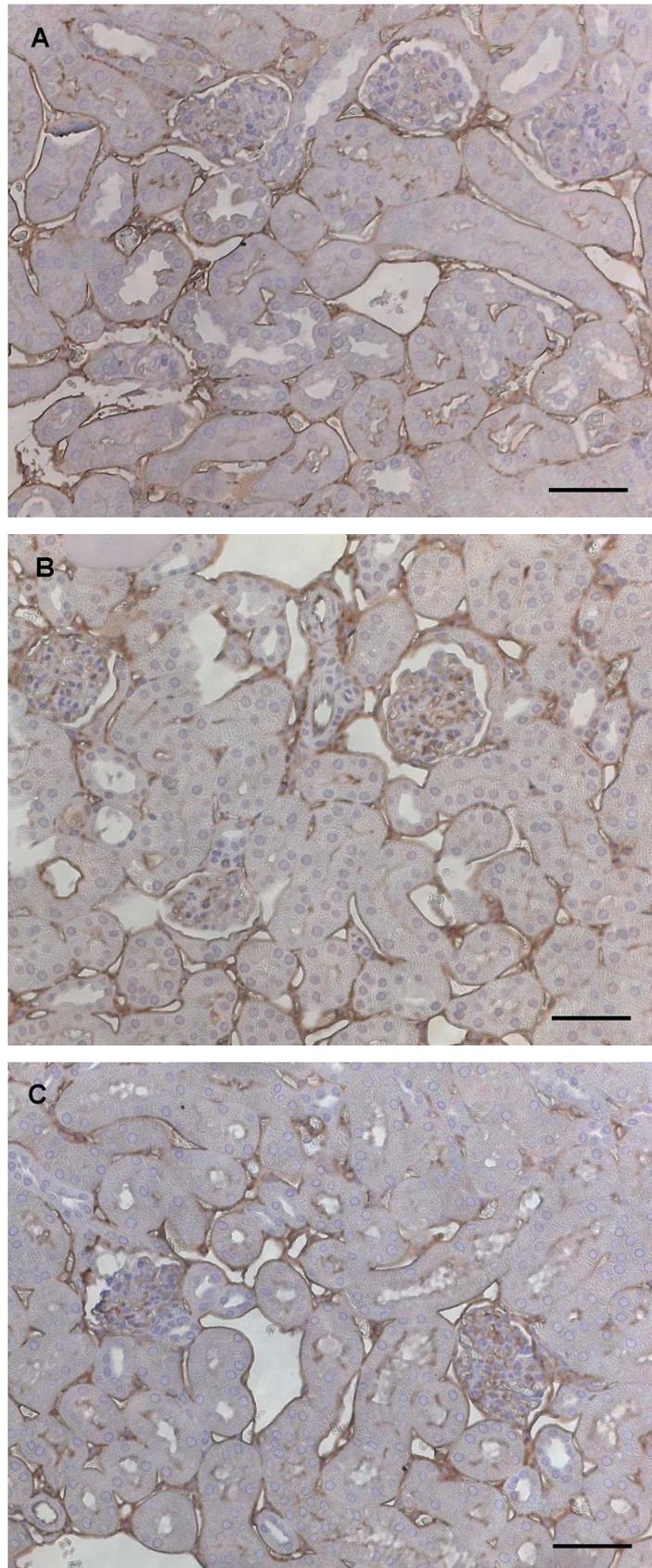


Abbildung 25: Renales ICAM-1-positives Endothel zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout.

Balken = 50  $\mu$ m)

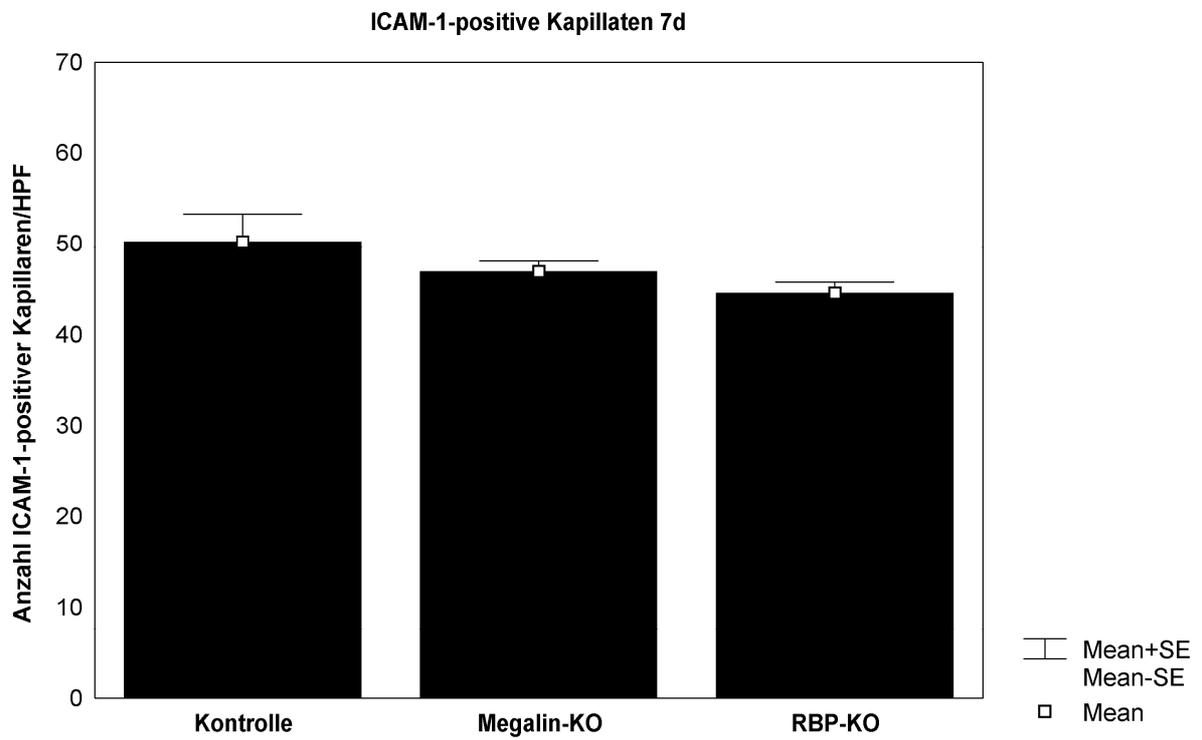


Abbildung 26: Peritubuläre ICAM-1-positive-Kapillaren sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion

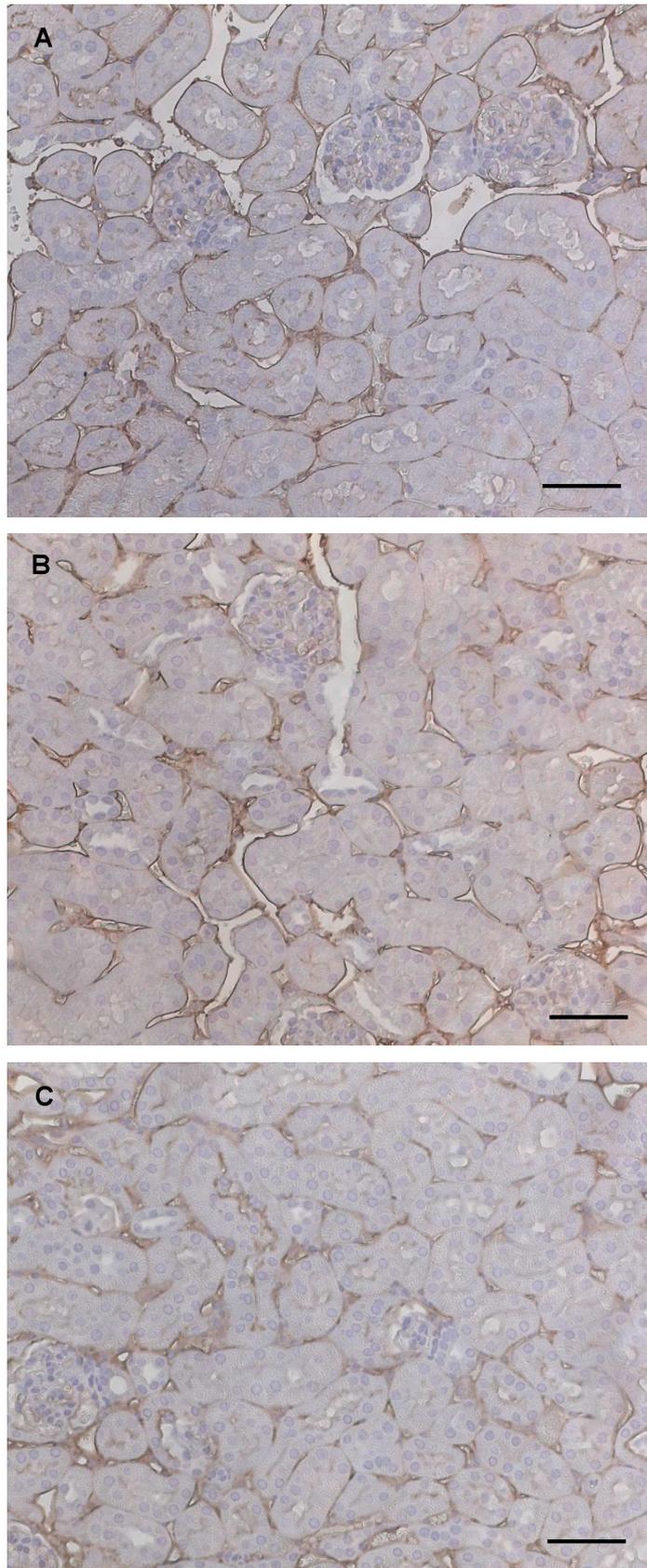


Abbildung 27: Renales ICAM-1-positives Endothel sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion (A Wildtyp-Kontrolle, B Megalin cre-lox knockout, C RBP-knockout.

Balken = 50  $\mu$ m)

### 5.3. Laser- unterstützte Mikrodisektion

#### 5.3.1. RNA-Qualität

Die bei der Mikrodisektion gewonnene RNA wies im Agilent Bioanalyzer eine RNA Integrity Number von 2,3 auf, was für eine vollständige Degradierung der RNA sprach. Des Weiteren zeigte das Elektropherogramm typische Zeichen einer Degradierung: die Grundlinie war erhöht und eine Darstellung der 18S- und 28S-Untereinheit nicht möglich (Abbildung 28). Daher waren weitere molekularbiologische Untersuchungen mit diesen Proben unmöglich.

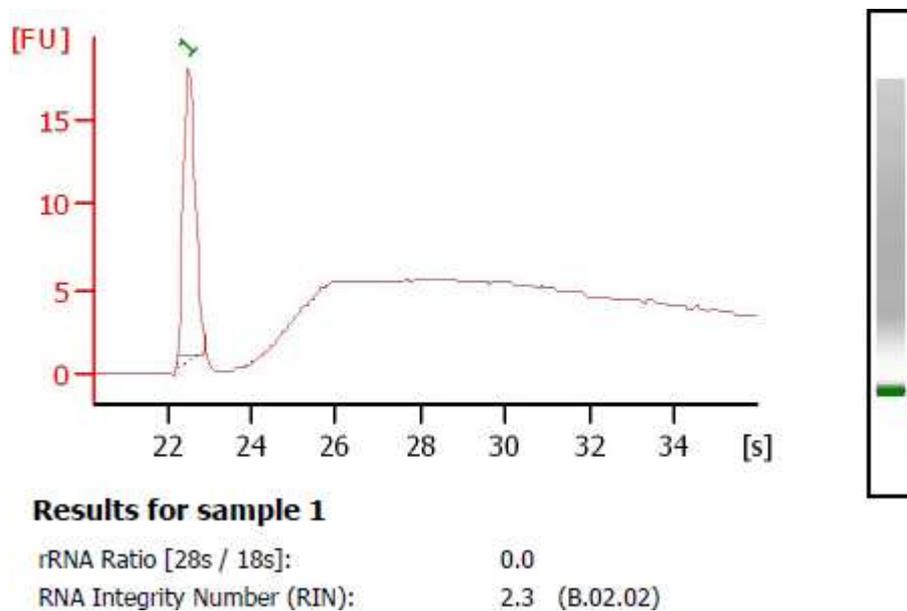


Abbildung 28: RNA-Qualitätskontrolle mikrodisezierter Tubuluszellen

## 5.4. Auswertungen der Zellkulturen

### 5.4.1. Zellzahl nach Inkubation mit Retinolsäure

Alle Zelllinien bestanden vor der Inkubation mit all-trans-Retinolsäure (ATRA) bzw. 9-cis-Retinolsäure (9CRA) aus  $3 \cdot 10^6$  Zellen. Nach Inkubation über 24 h wurde die Zellzahl erneut bestimmt. Es fiel auf, dass sowohl die ATRA- als auch die 9CRA-stimulierten Zellkulturen ein ähnliches Wachstumsverhalten zeigten: die unstimulierten Zellen (TKPTS Kontrolle) zeigten in beiden Gruppen eine mäßige Vermehrung der Zellen (TKPTS Kontrolle:  $4,38 \cdot 10^6$  Zellen bzw.  $3,5 \cdot 10^6$  Zellen). Je stärker nun die Retinolsäure-Isomere konzentriert waren, desto höher waren auch die Zellzahlen der Zelllinien (TKPTS 9CRA  $10^{-5}$  M:  $5,58 \cdot 10^6$  Zellen, TKPTS 9CRA  $10^{-6}$  M:  $5,5 \cdot 10^6$  Zellen, TKPTS 9CRA  $10^{-7}$  M:  $4,8 \cdot 10^6$ ; TKPTS ATRA  $10^{-5}$  M:  $4,29 \cdot 10^6$  Zellen, TKPTS ATRA  $10^{-6}$  M:  $5,47 \cdot 10^6$  Zellen, TKPTS ATRA  $10^{-7}$  M:  $5,47 \cdot 10^6$  Zellen). Mit schwächer werdenden Konzentrationen der Retinolsäure-Isomere ( $<10^{-8}$  M) verringerten sich die Zellzahlen wieder und näherten sich der Zahl der Kontroll-Zelllinie an (Abbildung 29).

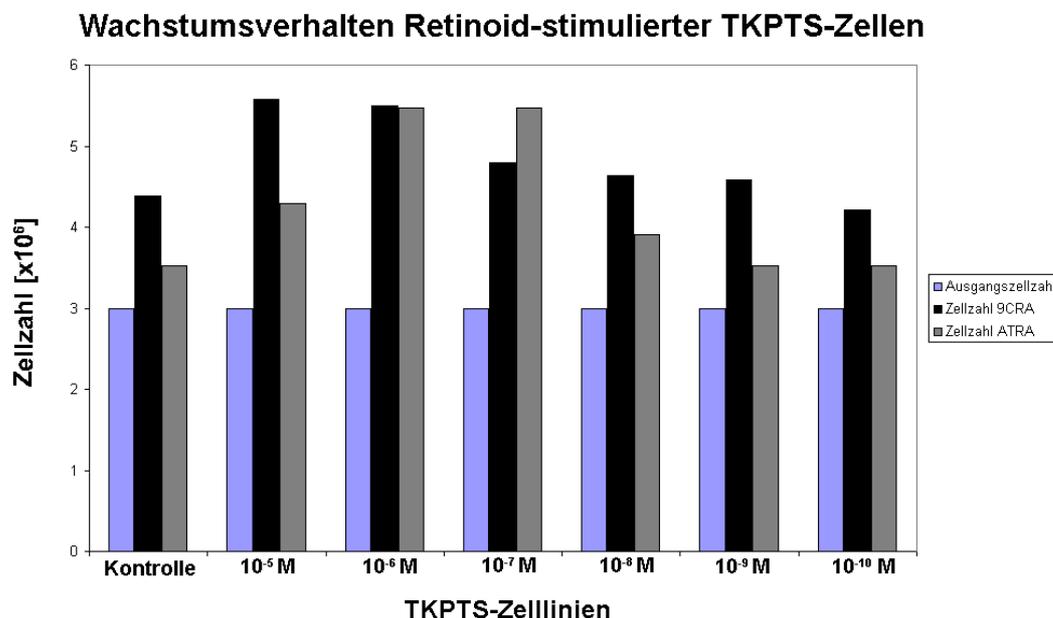


Abbildung 29: Wachstumsverhalten stimulierter TKPTS-Zellen bei Inkubation mit fallenden Retinoid-Konzentrationen

### 5.4.2. RNA-Qualität Retinoid-stimulierter TKPTS-Zellen

Die Gesamt-RNA der kultivierten TKPTS-Zellen wurde mit Hilfe des Agilent Bioanalyzers gemessen und war von sehr guter Qualität. Die RNA Integrity Number lag sowohl bei den Zellkulturen, die mit 9-cis-Retinolsäure inkubiert waren, als auch bei den Kulturen, die mit all-trans-Retinolsäure inkubiert waren, zwischen 9,9 und 10,0 (Abb. 30a & 30b). Die Elektropherogramme zeigten eine ideale Darstellung der 18S- und 28S-Untereinheit mit einer konstanten Grundlinie. Des Weiteren wurde eine mögliche Proteinverunreinigung der RNA ausgeschlossen, indem der  $A_{260}/A_{280}$ -Quotient gemessen wurde. Die  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten aller Proben lagen zwischen 1,8 und 2,1 und bestätigten somit die Reinheit der gewonnenen RNA (Tab. 8a & b).

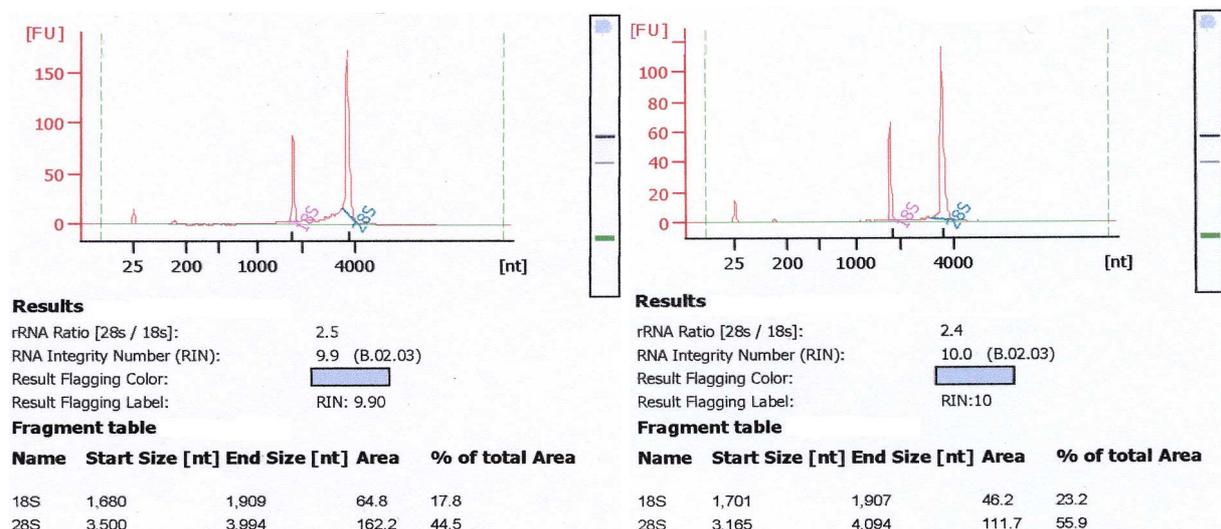


Abbildung 30a: RNA-Qualitätskontrolle  
9CRA-stimulierter TKPTS-Zellen

Abbildung 30b: RNA-Qualitätskontrolle  
ATRA-stimulierter TKPTS-Zellen

Zelllinie	$A_{260}/A_{280}$ -Quotient
TKPTS Kontrolle	2,07
TKPTS 9CRA $10^{-5}$ M	2,00
TKPTS 9CRA $10^{-6}$ M	2,00
TKPTS 9CRA $10^{-7}$ M	2,04
TKPTS 9CRA $10^{-8}$ M	2,02
TKPTS 9CRA $10^{-9}$ M	1,96
TKPTS 9CRA $10^{-10}$ M	2,01

Tab.8a:  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten  
9CRA-stimulierter TKPTS-Zellen

Zelllinie	$A_{260}/A_{280}$ -Quotient
TKPTS Kontrolle	1,94
TKPTS ATRA $10^{-5}$ M	2,00
TKPTS ATRA $10^{-6}$ M	2,00
TKPTS ATRA $10^{-7}$ M	2,01
TKPTS ATRA $10^{-8}$ M	2,01
TKPTS ATRA $10^{-9}$ M	2,01
TKPTS ATRA $10^{-10}$ M	2,01

Tab.8b:  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten  
ATRA-stimulierter TKPTS-Zellen

### 5.4.3. Gesamt-RNA-Konzentrationen Retinoid-stimulierter TKPTS-Zellen

Die Gesamt-RNA-Konzentrationen lagen bei allen Zellkulturen im Bereich zwischen 110 und 460 ng/ $\mu$ l (Tab. 9a & b). Entsprechend stand aus den eluierten RNA-Lösungen mit einem Gesamtvolumen von 30  $\mu$ l genügend RNA für die cDNA-Synthese zur Verfügung.

Zelllinie	RNA-Konzentration [ng/ $\mu$ l]	Zelllinie	RNA-Konzentration [ng/ $\mu$ l]
TKPTS Kontrolle	215,39	TKPTS Kontrolle	366,40
TKPTS 9CRA $10^{-5}$ M	265,93	TKPTS ATRA $10^{-5}$ M	430,10
TKPTS 9CRA $10^{-6}$ M	269,13	TKPTS ATRA $10^{-6}$ M	255,00
TKPTS 9CRA $10^{-7}$ M	114,30	TKPTS ATRA $10^{-7}$ M	328,80
TKPTS 9CRA $10^{-8}$ M	240,78	TKPTS ATRA $10^{-8}$ M	305,00
TKPTS 9CRA $10^{-9}$ M	300,63	TKPTS ATRA $10^{-9}$ M	237,50
TKPTS 9CRA $10^{-10}$ M	455,60	TKPTS ATRA $10^{-10}$ M	201,70

Tab.9a: Gesamt-RNA-Konzentrationen 9CRA-stimulierter TKPTS-Zellen

Tab.9b: Gesamt-RNA-Konzentrationen ATRA-stimulierter TKPTS-Zellen

### 5.4.4. PCR-Gelelektrophorese

#### 5.4.4.1. Stimulation mit 9-cis-Retinolsäure

Bei der Stimulation der Zellkulturen mit absteigenden Konzentrationen von 9-cis-Retinolsäure zeigten sich für das Target RANTES unterschiedlich starke Banden (Abbildung 31). Bei der unstimulierten Zelllinie (TKPTS Kontrolle) fiel eine Grundexpression des Gens auf ( $\uparrow$ ). Die Zelllinie TKPTS 9CRA  $10^{-5}$  M, die mit der stärksten Retinolsäure-Konzentration inkubiert wurde, wies eine stärkere Bande auf im Vergleich zur unstimulierten Zelllinie (\*). Die schwächer stimulierten Zelllinien TKPTS 9CRA  $10^{-6}$  M – TKPTS 9CRA  $10^{-10}$  M zeigten eine ähnlich starke Expression wie der unstimulierte Ansatz ( $\uparrow$ ). Wurde die Ausgangstemplatmenge halbiert (0,5  $\mu$ l) bzw. verdoppelt (2  $\mu$ l) oder änderte man die Zyklenanzahl von 30 auf 35 Zyklen veränderte sich das elektrophoretische Gelbild nicht.

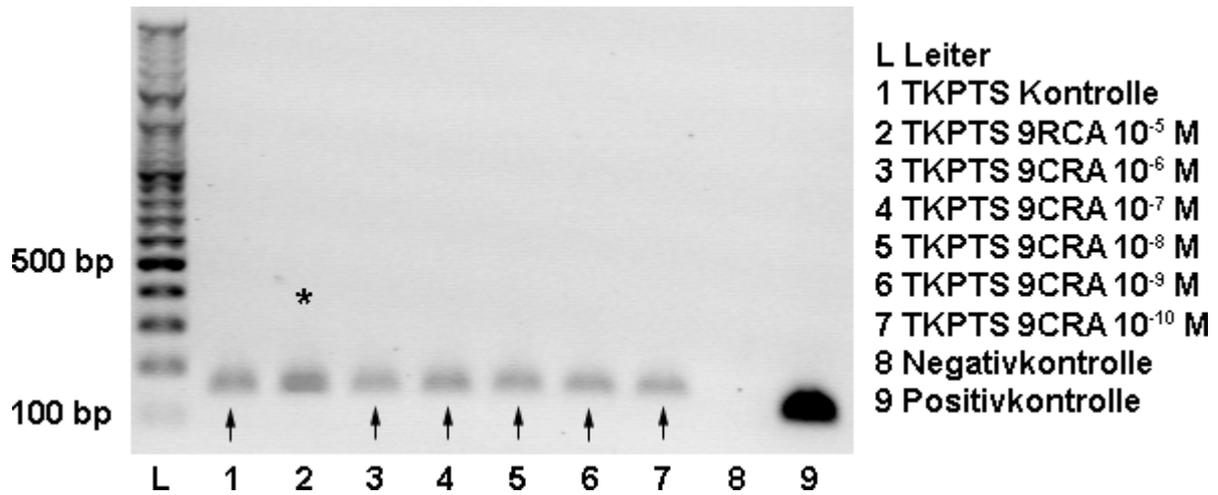


Abbildung 31: RANTES-Expression 9CRA-stimulierter TKPTS-Zellen.

Bei der Untersuchung des Targets TGF- $\beta$ -1 zeigten sowohl die unstimulierten als auch die 9CRA-stimulierten Zellen intensive Banden. Eine unterschiedliche Bandenstärke zwischen den einzelnen Zelllinien war nicht zu registrieren (vgl. Abb.32, A). Dieses Ergebnis galt ebenfalls für das Target ICAM-1 (vgl. Abb.32, B). Bei HGF zeigte sich im Vergleich zu TGF- $\beta$ -1 und ICAM-1 eine schwächere Intensität der Banden. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien war nicht zu detektieren (vgl. Abb.32, C). Das Amplifikat von IL-16 konnte nicht abgebildet werden, obwohl insgesamt vier verschiedene Primerpaare zum Einsatz kamen (vgl. Abb.32, D.).

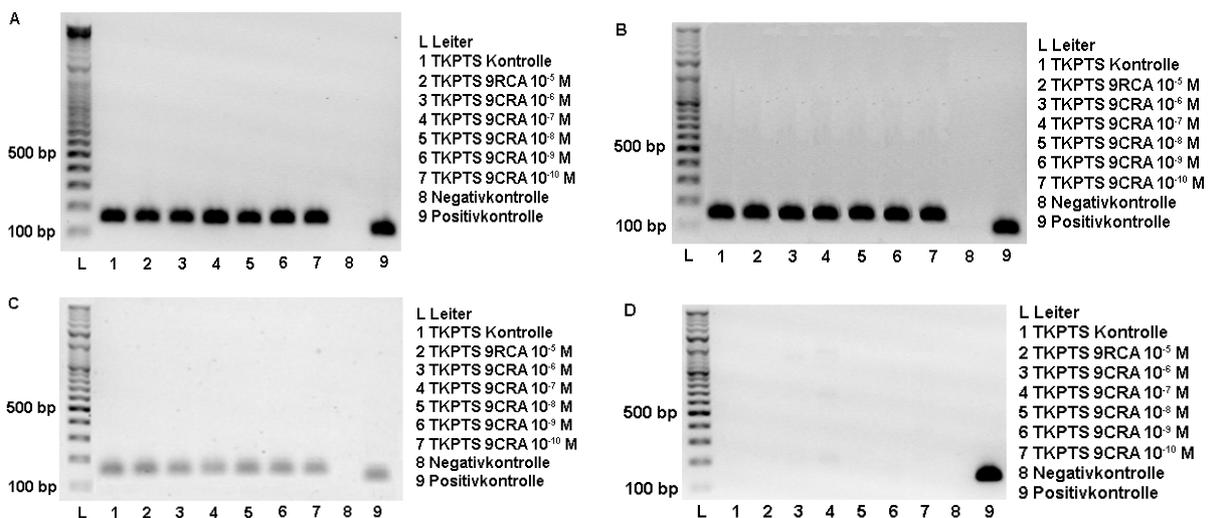


Abbildung 32: Gelelektrophoresebilder; A TGF- $\beta$ -1, B ICAM-1, C HGF, D IL-16

### 5.4.4.2. Stimulation mit all-trans-Retinolsäure

Bei der Stimulation der Zellkulturen mit absteigenden Konzentrationen von all-trans-Retinolsäure zeigten die unstimulierten sowie stimulierten Zellen für die Targets RANTES, TGF- $\beta$ -1 und ICAM-1 Banden von starker Intensität. Bei keinem Target waren Unterschiede in der Bandenstärke zwischen den einzelnen stimulierten Zelllinien zu ermitteln (vgl. Abb.33, A-C). Bei HGF war insgesamt eine schwächere Bandenstärke im Vergleich zu den oben genannten Targets zu beobachten. Ein Unterschied zwischen den stimulierten Zelllinien war für dieses Gen nicht nach zu weisen (vgl. Abb.33, D). Das Amplifikat von IL-16 konnte erneut nicht dargestellt werden (vgl. Abb.33, E).

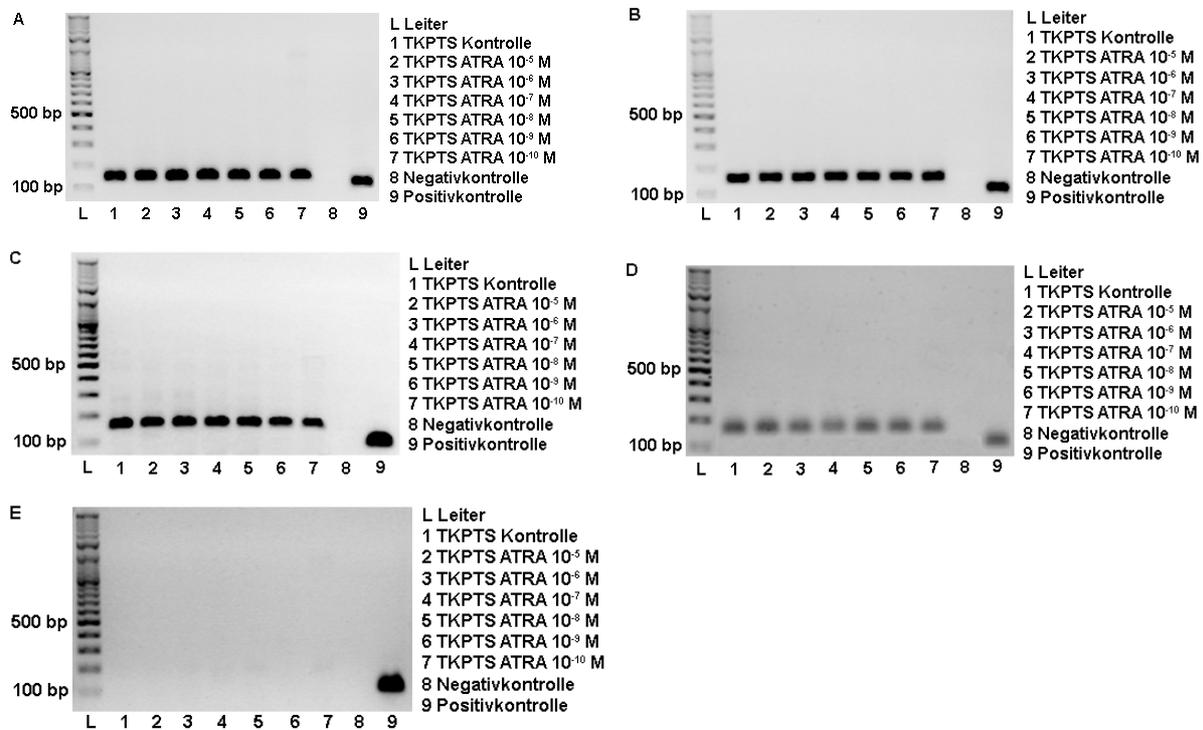


Abbildung 33: Gelelektrophoresebilder;  
 A RANTES, B TGF- $\beta$ -1, C ICAM-1, D HGF, E IL-16

## 6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss reabsorbierte Retinol-RBP-Komplexe auf die tubuläre renale Schädigung als auch auf die Regeneration der Tubulusepithelien nach Ischämie-Reperfusion haben.

Die Retinol-Bindeprotein-knockout Mäuse zeigten sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion signifikant häufiger schwere tubuläre Schäden und gleichsinnig signifikant höhere Kreatininwerte im Vergleich zu Kontroll- und Megalin-knockout Mäusen. Die prolongierte renale Schädigung in dieser Gruppe entspricht einer eingeschränkten Regenerationskapazität des renalen Tubulusepithels nach Ischämie-Reperfusion. Überraschenderweise zeigte diese Gruppe auch eine signifikant geringere T-Zell-Infiltration.

Retinoide sind bereits bei der renalen Organogenese wichtig, da sie die Anzahl der Nephrone determinieren (Lelievre-Pegorier et al. 1998). So kommt es bei erheblicher Vitamin-A-Defizienz zu einer renalen Hypo-/Aplasie (Xu et al. 2004). Ferner ist bewiesen, dass bei einer milden Vitamin-A-Defizienz die Anzahl der Nephrone reduziert ist. Dies führt man u.a. auf eine verminderte Expression des Protoonkogens c-Ret in der Ureterknospe zurück, das Retinoid-abhängig reguliert wird (Balmer und Blomhoff 2002). Daraus resultiert eine Entwicklungsstörung der Ureterknospe, bei der die epithelial-mesenchymale Differenzierung gestört ist. Dies bedingt die genannte reduzierte Anzahl der Nephrone, wodurch die Niere potentiell susceptibler für Schäden ist (Batourina et al. 2001; Batourina et al. 2002; Moritz et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte eine reduzierte Nephronenzahl in der RBP-KO-Gruppe nachgewiesen werden, welche allerdings die beobachteten Effekte nicht ausreichend erklärt.

Im Rahmen einer Ischämie kommt es sowohl zum Phänomen der Nekrose als auch der Apoptose (Shimizu und Yamanaka 1993). Als spezifischer Marker der Apoptose wurde in den vorliegenden Untersuchungen ein Antikörper gegen cleaved Caspase-3 verwendet, eine aktivierte Protease, die im Rahmen der Apoptose verantwortlich ist für Chromatinkondensation und DNA-Fragmentation (Porter und Janicke 1999). Bislang ist nicht geklärt, ob die Induktion von Caspase-3 allein durch Ischämie (Benchoua et al. 2001) oder die darauf folgende Reperfusion induziert wird (Zhao et

al. 2000; Wolfs et al. 2005). Allerdings scheint Apoptose in der frühen Phase nach Ischämie-Reperfusion einzutreten und für den Zelltod einiger weniger Zellen verantwortlich zu sein, wobei der Großteil der geschädigten Zellen durch Nekrose zugrunde geht (Wiegele et al. 1998). In unseren Untersuchungen waren zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion in allen Gruppen apoptotische Zellen nachweisbar, ferner zeigte sich ein Anstieg des Serum-Kreatinins („Med. Diss.“, Boeckmann 2011). Diese Beobachtungen wurden analog von Jani et al. berichtet, die zwei Tage nach renaler Ischämie-Reperfusion bei Mäusen eine Zunahme von Caspase-3-positiven Tubulusepithelien feststellten (Jani et al. 2004). Zwei Tage nach Ischämie-Reperfusion war ebenfalls eine hohe Anzahl an proliferierenden Tubulusepithelien zu beobachten, wobei die Kontroll-Gruppe die stärkste Proliferation aufwies. Die renale tubuläre Zellerneuerung ist in der Literatur häufig beschrieben und unterscheidet sich von kardialer und neuronaler Zellerneuerung, da sie in der Lage ist, sich komplett von einem ischämischen Schaden zu regenerieren (Bonventre 2003; Nony und Schnellmann 2003; Duffield et al. 2005). Die Mechanismen sind noch nicht geklärt, man vermutet, dass nicht-geschädigte Tubulusepithelien in der Lage sind in geschädigte Areale zu migrieren, zu proliferieren und dort zu differenzieren (Toback 1992; Abbate und Remuzzi 1996; Molitoris und Marris 1999).

Sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion war in allen Gruppen ein Abfall des Serum-Kreatinins zu beobachten. Ferner waren in Kontroll- und Megalin-KO-Gruppe signifikant mehr apoptotische Tubulusepithelien nachweisbar im Vergleich zur RBP-KO-Gruppe („Med. Diss.“, Boeckmann 2011). Kontroll- und Megalin-KO-Tiere wiesen zudem eine fast unverändert hohe Proliferationsrate von Tubulusepithelien auf, die RBP-KO-Tiere jedoch einen signifikant niedrigeren Anteil an proliferierenden Tubuluszellen. Dies korreliert morphologisch mit dem signifikant erhöhten tubulären Schaden sowie der schlechteren Nierenfunktion der RBP-KO-Gruppe im Vergleich zur Kontroll- und Megalin-KO-Gruppe. Dadurch zeigt sich, dass aufgrund der fehlenden reabsorbierten Retinolsäure in RBP-KO-Mäusen das regenerative Tubulusepithel nur ungenügend proliferieren kann und somit die regenerationsfähige Kapazität vermindert ist. Die verminderte Apoptose- und Proliferationsfähigkeit der RBP-KO-Gruppe sowie die schwereren nekrotischen Tubulusschäden sind als formaler Beweis für die Bedeutung der reabsorbierten Retinol-RBP-Komplexe bei der Ausbildung eines Gewebeschadens bzw. im Sinne einer verminderten Regenerationskapazität nach renaler Ischämie-Reperfusion zu werten. Diese

Beobachtung wird durch die Megalin-KO-Gruppe untermauert, die aufgrund einer geringen Restexpression des Megalinrezeptors eine reduzierte Kapazität aufweist, Retinol-RBP-Komplexe zu reabsorbieren. Dies kommt dadurch zum Ausdruck, dass die Ergebnisse der Megalin-KO-Gruppe konsistent zwischen der Wildtyp- und RBP-KO-Gruppe lagen.

In der Literatur wurde nachgewiesen, dass das Molekül TGF- $\beta$ -1 die tubuläre Epithelproliferation und -differenzierung nach renaler Ischämie-Reperfusion zu stimulieren vermag und dadurch positiv fördernd auf die Regeneration der Tubulusepithelien wirkt (Docherty et al. 2002). In unseren immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion eine signifikant verminderte tubuläre TGF- $\beta$ -1-Expression in der RBP-KO-Gruppe im Vergleich zur Wildtyp- und Megalin-KO-Gruppe, was den Verdacht nahe legt, dass Proliferation und Differenzierung der Tubuluszellen abhängig ist von TGF- $\beta$ -1. Die verminderte Proliferation und Differenzierung der Tubuluszellen in der RBP-KO-Gruppe könnte damit erklärt werden, dass durch die verringerte tubuläre TGF- $\beta$ -1-Expression die Produktion von Proteoglykanen vermindert und die Organisation des Zytoskeletts renaler Tubuluszellen erschwert wird (Humes et al. 1993).

TGF- $\beta$ -1 ist ferner ein bedeutender Mediator der tubulären epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung (TEMT) und wird im Rahmen einer Ischämie-Reperfusion vom Tubulusepithel exprimiert (Basile et al. 1996; Spurgeon et al. 2005). Da sich in unseren Vorexperimenten kein Anhalt für eine vermehrte Transdifferenzierung oder Fibrosierung des renalen Gewebes ergab (Daten nicht gezeigt), wurde das Phänomen der TEMT nicht näher untersucht.

Zusammenfassend ergaben die vorliegenden Untersuchungen bei der RBP-KO-Gruppe eine protrahierte tubuläre Schädigung und eine verminderte Apoptose- sowie Proliferationsrate, woraus geschlossen werden kann, dass reabsorbierte Retinol-RBP-Komplexe in der Niere einen direkten Einfluss auf das Tubulusepithel im Sinne einer verminderten Regenerationskapazität nach Ischämie-Reperfusion haben.

Unerwartet war bei der immunhistochemischen Darstellung der CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten eine im Vergleich zur Wildtyp- und Megalin-KO-Gruppe (hoch-) signifikant verminderte T-Zell-Infiltration in der RBP-KO-Gruppe zu beobachten, die sowohl zwei als auch sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion bestand. Die Kombination von einer vermehrten renalen histologischen Schädigung und der verminderten Infiltration von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten lässt die Schlussfolgerung einer protektiven Rolle von T-Lymphozyten bei renaler Ischämie-Reperfusion zu. Der Mechanismus ist weitgehend ungeklärt, man vermutet, dass CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten das Potential besitzen die renal vaskuläre Permeabilität zu erhöhen indem sie die Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  sezernieren, wodurch sie in der Lage sind postischämisch eine weitere T-Zell-Infiltration zu beeinflussen (Liu et al. 2009). Des Weiteren wurde durch Kuroiwa et al. nachgewiesen, dass die Interaktion von rekrutierten T-Lymphozyten mit intaktem Tubulusepithel zu einer weiteren tubulären Produktion von Chemokinen wie z.B. RANTES führt, wodurch die Permeabilität ebenfalls beeinflusst wird (Kuroiwa et al. 2000). In unseren Experimenten wiesen wir in der RBP-KO-Gruppe eine verminderte Rekrutierung und Aktivierung von T-Lymphozyten nach. Ob eine verringerte renal vaskuläre Permeabilität ursächlich das reduzierte Ausmaß der Infiltration von CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der RBP-KO-Gruppe bedingt, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Schlussfolgerung einer protektiven Rolle von T-Lymphozyten wird von zahlreichen Studien untermauert: Eine Studie an RAG-1-defizienten Mäusen zeigte, dass Mäuse, denen B- sowie T-Lymphozyten fehlen, nicht vor Ischämie geschützt sind (Park et al. 2002). Ein Transfer von T-Lymphozyten in diese Tiere führte zum Schutz der Niere vor Ischämie (Burne-Taney et al. 2005). Des Weiteren zeigte sich in einem murinen Modell, dass die Applikation von Mycophenolat Mofetil das Ausmaß eines ischämischen Nierenversagens verschlimmert (Gonzalez et al. 2002). Durch den zytostatischen Wirkmechanismus von Mycophenolat Mofetil auf T-Lymphozyten weist dies auf einen protektiven Effekt der T-Zellen hin. In einer weiteren Studie wurden T-Lymphozyten 24 h nach renaler Ischämie aus der Niere isoliert und diese mittels adoptivem Transfer in T-Zell-defiziente (nu/nu) Mäuse injiziert (Ascon et al. 2006). 24 h nach Transfer wurde an diesen Mäusen eine renale Ischämie induziert, die eine verbesserte renale Funktion sowie eine signifikante Reduktion des renalen Gewebes Schadens im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zeigte. Ein ähnliches

Studiendesign findet sich bei Burne-Taney et al, die Leukozyten fünf Tage nach renaler Ischämie aus der Milz gewannen und diese in T-Zell-defiziente (nu/nu) Mäuse transferierten (Burne-Taney et al. 2006). Diese Mäuse wurden sieben Tage nach Transfer einer renalen Ischämie unterworfen und wiesen einen signifikant verminderten renalen Schaden auf. Auch bei hepatischer Ischämie-Reperfusion gibt es Hinweise auf eine protektive Rolle der T-Lymphozyten, da CD4<sup>+</sup>-T-Zell-defiziente (CD4<sup>-/-</sup>) Mäuse verminderte hepatische Gewebeschäden nach Ischämie-Reperfusion aufwiesen (Caldwell et al. 2005).

All diesen Ergebnissen stehen einige Studien gegenüber, die T-Lymphozyten einen schädigenden Effekt nach Ischämie-Reperfusion zuschreiben. So beobachteten Rabb et al. einen fehlenden Gewebeschaden bei T-Zell-defizienten (nu/nu) Mäusen nach renaler Ischämie (Rabb et al. 2000). Ein adoptiver Transfer von T-Lymphozyten in diese Tiere verschlimmerte den Schaden (Burne et al. 2001).

Letztlich kann derzeit keine definitive Aussage zur genauen Funktion der T-Lymphozyten bei renaler Ischämie-Reperfusion getroffen werden, möglicherweise sind Subpopulationen von T-Lymphozyten in gegensätzlicher Richtung aktiv.

T-Lymphozyten, die neben dem Transkriptionsfaktor FoxP3 die Oberflächenstrukturen CD 4 und CD 25 exprimieren, gehören zu den regulatorischen Abwehrzellen, die immunologische Reaktionen modulieren. In unseren immunhistochemischen Färbungen fiel zwei bzw. sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion eine signifikant bzw. hochsignifikant verminderte renale FoxP3<sup>+</sup>-T-Zell-Infiltration bei der RBP-KO-Gruppe im Vergleich zum Wildtyp auf. Aufgrund der vermehrten renalen Schädigung der RBP-KO-Tiere scheinen regulatorische T-Lymphozyten eine protektive Wirkung zu spielen. Da besonders sieben Tage nach Ischämie-Reperfusion eine starke FoxP3<sup>+</sup>-T-Zell-Infiltration bei Kontroll- und Megalin-KO-Gruppe zu beobachten war, folgern wir, dass diese Zellen vor allem langfristig einen protektiven Effekt vermitteln.

Unsere Schlussfolgerung protektiver regulatorischer T-Lymphozyten wird ebenfalls in aktuellen Publikationen beschrieben: Gandolfo et al beschrieben, dass die Hemmung regulatorischer T-Lymphozyten durch einen Antikörper gegen CD25 zu einem ausgedehnten tubulären Schaden sowie zu einer Reduktion tubulärer regenerativer Proliferation 24 h nach Ischämie-Reperfusion führt (Gandolfo et al. 2009). Des Weiteren transferierten sie FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen in Mäuse, die einer renalen Ischämie

unterzogen wurden, wodurch sich eine Verminderung der Nierenschädigung und eine erhöhte Proliferationsrate von Tubulusepithelien einstellte. Kinsey et al. inhibierten regulatorische T-Zellen mittels Antikörper vor einer Ischämie, was postischämisch zu einem vermehrten renalen Schaden führte (Kinsey et al. 2009). Daher wird regulatorischen FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen eine protektive Wirkung in der akuten Ischämie-Situation zugeschrieben. Weitere Hinweise auf die protektive Wirkung FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen wurden sowohl an murinen Tiermodellen als auch an humanen Transplantationsbiopsaten gezeigt, in denen eine hohe Anzahl regulatorischer T-Lymphozyten in Nierentransplantaten mit einer Verminderung von sowohl akuten als auch chronischen Abstoßungsreaktionen einhergingen (Brown et al. 2007; Zuber et al. 2009). Akute Abstoßungsreaktionen von murinen Nierentransplantaten zeigten hingegen eine verminderte Anzahl an regulatorischen T-Lymphozyten (Wang et al. 2008). Wie genau regulatorische FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen ihre protektive Funktion vermitteln ist derzeit noch nicht geklärt.

Aufbauend auf dem Modell des Vitamin-D-Stoffwechsels haben wir die Bedeutung der Megalin-vermittelten Endozytose im Retinolstoffwechsel bei renaler Ischämie-Reperfusion untersucht. Im Gegensatz zum Vitamin-D-Stoffwechsel, bei dem ein 25-(OH)-D<sub>3</sub>-DBP-Komplex in der Niere mittels Megalin-vermittelter Endozytose reabsorbiert wird, DBP lysosomal durch die Endopeptidase Legumain degradiert und 25-(OH)-D<sub>3</sub> nach einer final aktivierender Hydroxylierung an neu synthetisiertes DBP gebunden und basolateral aus der Zelle dem Blutkreislauf zugeführt wird, ist die Rolle der Megalin-vermittelten Endozytose für den Retinol-Stoffwechsel noch nicht bekannt. Dadurch, dass die RBP-KO-Gruppe bei unseren Versuchen einen verstärkten Gewebeschaden aufwies, folgern wir, dass sich an RBP-gebundene Retinoide, die unter physiologischen Bedingungen glomerulär filtriert und vollständig im proximalen Tubulus mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose via Megalin rückresorbiert werden, protektiv auf die Ausbildung eines Gewebeschadens nach renaler Ischämie-Reperfusion auswirken.

Eine protektive Wirkung von Retinoiden bei Ischämie-Reperfusion ist in einigen Studien belegt: Shen et al. wiesen in einem murinen Tierversuch nach, dass 9-cis-Retinolsäure den ischämischen Gehirnschaden reduziert (Shen et al. 2009). Auch all-

trans-Retinolsäure vermag das zerebrale Infarktausmaß zu verringern (Sato et al. 2008). Ebenfalls nachgewiesen ist eine protektive Wirkung von Retinolsäure in der Niere, da sowohl 9-cis- als auch 13-cis-Retinolsäure den renalen Schaden bei akuter Transplantatabstoßung im Tiermodell vermindern und die Progression der chronischen Transplantatnephropathie abschwächen (Kiss et al. 2003; Adams et al. 2005; Wen et al. 2005). Hu et al. wiesen eine renoprotektive Wirkung von all-trans-Retinolsäure bei muriner Glomerulosklerose nach (Hu et al. 2010).

Im Rahmen eines renalen Ischämie-Reperfusion-Ereignis scheint Retinoiden bei der Beeinflussung der T-Zell-Infiltration eine besondere Bedeutung zuzukommen. Da die CD3<sup>+</sup>-T-Zell-Infiltration in der RBP-KO-Gruppe zu beiden Zeitpunkten vermindert war, kann man den Schluss ziehen, dass die Rekrutierung und Aktivierung von T-Lymphozyten abhängig ist von Retinoiden. In Zellkultur-Experimenten konnten wir zeigen, dass die Inkubation von kultivierten proximalen Tubulusepithelzellen mit 9-cis-Retinolsäure eine Expressionssteigerung des Chemokins RANTES induzierte. Da RANTES in der Lage ist, Antigen-unabhängig T-Lymphozyten zu rekrutieren und zu aktivieren (Bacon et al. 1995; Krensky und Ahn 2007), lässt dies den Schluss zu, dass das proximale Tubulusepithel die Aktivierung und Infiltration der T-Lymphozyten Retinoid-abhängig steuert. Unsere Ergebnisse werden von Kim et al. bekräftigt, die humane Monozyten mit 9-cis-Retinolsäure inkubierten, was zu einer vermehrten Expression des RANTES-abhängigen Rezeptors CCR1 führte, woraus eine gesteigerte chemotaktische Aktivität resultierte (Kim et al. 2004). In unseren Zellkulturexperimenten führte die Inkubation der proximalen Tubuluszellen mit all-trans-Retinolsäure nicht zu einer Expressionssteigerung von RANTES, sodass wir vermuten, dass Retinoide ihre Funktion bei der Rekrutierung und Aktivierung von T-Lymphozyten ausschließliclich über 9-cis-Retinolsäure vermitteln.

Eine Retinoid-abhängige tubuläre Expression von IL-16, das nach Wang et al. die Rekrutierung von T-Lymphozyten nach renaler Ischämie-Reperfusion bedingen soll (Wang et al. 2008), konnte in unseren Zellkulturexperimenten nicht nachgewiesen werden. Zugleich konnte für HGF, das die Fähigkeit besitzt die renale Infiltration von T-Lymphozyten sowie die Expression von RANTES zu inhibieren (Giannopoulou et al. 2008) und darüber hinaus einen antifibrotischen Effekt aufweist (Yang und Liu 2002), ebenfalls keine Retinoid-abhängige Regulierung in renalen Tubulusepithelien in der Zellkultur nachgewiesen werden. Ferner ergab sich in der Zellkultur für das

Adhäsionsmolekül ICAM-1, das hauptsächlich endothelial exprimiert wird und die Rekrutierung von Leukozyten über eine Interaktion an  $\beta$ 2-Integrinen ins renale Parenchym vermittelt (Patarroyo et al. 1990), kein Nachweis einer Retinoid-abhängigen Regulation. Damit scheint eine Retinoid-abhängige Expression von ICAM-1 als Ursache der verminderten T-Zell-Infiltration unwahrscheinlich zu sein. Bekräftigt wird dies durch unsere immunhistochemische Darstellung von ICAM-1, die keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen in vivo ergab. Ferner vertreten auch andere Autoren die Ansicht einer Retinoid-unabhängigen Regulation von ICAM-1 (Gille et al. 1997; Manzano et al. 2000).

Retinoide sind an der peripheren Konversion von naiven T-Zellen zu regulatorischen  $CD4^+CD25^+$ -FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen (iTregs) im sekundär lymphatischen Gewebe beteiligt. Dabei bindet TGF- $\beta$  an eine Serin/Threonin-Kinase der naiven T-Zelle, wodurch es zu einer Phosphorylierung der Signalproteine Smad2 und Smad3 kommt, die anschließend mit Smad4 heterodimerisieren und nach Eindringen in den Zellkern dort die Expression von FoxP3 fördern (von Boehmer 2007). Der stimulierende Effekt der Retinoide beruht nach Bindung an den Retinoic-acid-Rezeptor (RAR) auf der Phosphorylierung von Smad3, wodurch die periphere Konversion getriggert wird (Xiao et al. 2008). Ferner stimuliert TGF- $\beta$  die Expression von RAR (Schambach et al. 2007). Für eine Konversion naiver T-Lymphozyten in iTregs ist in vivo zusätzlich die Präsentation von Antigenen obligat, die vor allem in der Mukosa des Magen-Darm-Traktes von  $CD103^+$  dendritischen Zellen übernommen wird (Coombes et al. 2007; Sun et al. 2007). Die verminderte Infiltration regulatorischer T-Lymphozyten bei der RBP-KO-Gruppe lässt zum einen den Schluss zu, dass aufgrund des verringerten Angebots an Retinolsäure die periphere Konversion nur ungenügend stattfinden konnte. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Rekrutierung und Aktivierung der FoxP3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten aufgrund einer verminderten tubulären Expression von RANTES nur ungenügend abläuft.

Ein weiterer Aspekt ist eine mögliche Beeinflussung der infiltrierten FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen durch das Tubulusepithel selbst, da dieses in der Lage ist durch Expression von TGF- $\beta$  die Aktivität der FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen zu regulieren (Nguan und Du 2009). Die verminderte tubuläre TGF- $\beta$ -1-Expression in der RBP-KO-Gruppe unserer Experimente lässt den Schluss einer Retinoid-abhängigen Regulierung von TGF- $\beta$ -

1 zu, wodurch eine verminderte FoxP3<sup>+</sup>-T-Zell-Aktivierung resultieren würde. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass TGF- $\beta$ -1 in der Lage ist durch Stimulation FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen sich protektiv auf die Ausbildung eines Ischämie-Reperfusion-Schadens auszuwirken. Dies wird von Özdemir et al. untermauert, die zeigten, dass eine vermehrte TGF- $\beta$ -Expression des Tubulusepithels nach Nierentransplantation mit einer verbesserten Organfunktion einhergeht (Ozdemir et al. 2005). Eine verminderte TGF- $\beta$ -1-Expression bei Retinolsäure-Defizienz zeigten bereits Bavik et al., die bei murinen Embryos durch Dottersack-Injektionen mit Antisense-Oligodesoxynukleotiden für RBP die RBP-Synthese inhibierten und damit eine Herabregulierung des TGF- $\beta$ -Gens erzielten (Bavik et al. 1996). Die TGF- $\beta$ -abhängige Regulation von FoxP3<sup>+</sup>-T-Zellen in der Niere wurde durch Mahajan et al. dargestellt, die die protektive Wirkung regulatorischer T-Zellen bei einer Adriamycin-induzierten Nephropathie durch Applikation eines TGF- $\beta$ -Antikörpers inhibierten (Mahajan et al. 2006). Die Inkubation kultivierter TKPTS-Zellen sowohl mit 9-cis- als auch all-trans-Retinolsäure in unseren Zellkulturexperimenten erbrachte dagegen keinen Expressionsunterschied für TGF- $\beta$ -1, sodass hier möglicherweise eine Beeinflussung der posttranslationalen Modifikation durch Retinoide vorliegt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die renale Reabsorption von Retinol-RBP-Komplexen über eine Megalin-vermittelte Endozytose eine bedeutende Rolle nach renaler Ischämie-Reperfusion spielt. Ein Knockout des Retinol-Bindeproteins führt durch eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des renalen Tubulusepithels zu einer prolongierten renalen Schädigung und einer verminderten regenerativen Kapazität nach Ischämie-Reperfusion. Die Kombination aus einem vermehrten renalen Schaden und einer verminderten Infiltration von T-Lymphozyten in der RBP-KO-Gruppe lässt zum einen den Schluss zu, dass die Infiltration von T-Lymphozyten in das renale Parenchym Retinoid-abhängig reguliert wird und zum anderen, dass T-Lymphozyten eine protektive Rolle nach Ischämie-Reperfusion einnehmen. Aufgrund der Expressionssteigerung des Chemokins RANTES nach Inkubation mit 9-cis-Retinolsäure in unseren Zellkulturexperimenten folgern wir, dass die tubuläre Sekretion von RANTES Retinoid-abhängig reguliert wird und verantwortlich ist für die Infiltration und Aktivierung von T-Lymphozyten nach renaler Ischämie-Reperfusion.

## 7. Zusammenfassung

Retinoide spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Epithelien sowie deren Regeneration. Retinoid bindendes Protein (RBP) - Retinol-Komplexe werden unter physiologischen Bedingungen glomerulär filtriert und vollständig im proximalen Tubulus mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose via Megalin rückresorbiert. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen die Reabsorption von Retinol-RBP-Komplexen auf die tubuläre renale Schädigung als auch auf die Regeneration der Tubulusepithelien nach Ischämie-Reperfusion hat. Hierfür wurden RBP knockout und cre-lox Megalin knockout Mäuse sowie Wildtyp Kontrollen einer renalen Ischämie mit nachfolgender Reperfusion unterzogen und die Nieren anschließend mittels histochemischer, immunhistochemischer, morphometrischer und molekularer Methoden untersucht.

Es zeigte sich, dass RBP-KO-Mäuse eine signifikant eingeschränkte tubuläre Regenerationsfähigkeit nach ischämischer Schädigung aufwiesen als die Kontrolltiere. Megalin-KO-Mäuse wiesen eine etwa 50%ige Restexpression des Endozytoserezeptors auf und bestätigten diese Daten, indem sie hinsichtlich der erhobenen Parameter konsistent zwischen der Wildtyp- und RBP-KO-Gruppe lagen. Überraschend war darüber hinaus, dass die Infiltration von CD3<sup>+</sup>- sowie regulatorischen T-Lymphozyten in der RBP-KO-Gruppe signifikant vermindert war. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass Retinoide über die protektive Wirkung am Tubulusepithel direkt auch längerfristige Organ-weite Effekte durch eine gesteigerte Rekrutierung von T-Lymphozyten und darüber hinaus regulatorischen T-Lymphozyten vermitteln.

Im Zellkulturexperiment mit proximalen Tubulusepithelzellen konnten wir unter Einsatz von 9-cis-Retinolsäure eine Expressionssteigerung des Chemokins RANTES zeigen, das Antigen-unabhängig T-Lymphozyten rekrutiert und aktiviert.

Aufgrund dieser Ergebnisse folgern wir, dass die Megalin-vermittelte Reabsorption von Retinol-RBP-Komplexen in den proximalen Tubulusepithelien der Niere bei einem Ischämie-Reperfusion-Schaden eine protektive Rolle einnimmt, indem es zu einer gesteigerten Expression von RANTES durch das Tubulusepithel kommt, wodurch die Infiltration und Aktivierung von T-Lymphozyten gesteigert wird.

Da das geschädigte Tubulusepithel aufgrund von Polaritäts- und Differenzierungsstörungen (welche wiederum Retinoid-abhängig sind) filtrierte Retinol-RBP-Komplexe nur eingeschränkt aufnimmt, stellen Retinoide eine Therapieoption bei tubulärer renaler Schädigung durch Ischämie-Reperfusion und möglicherweise anderen Schädigungsmechanismen dar.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Abbate, M. Remuzzi, G. (1996): Acceleration of recovery in acute renal failure: from cellular mechanisms of tubular repair to innovative targeted therapies. *Ren Fail*, 18, 377-88
2. Abuelo, J. G. (1995): Diagnosing vascular causes of renal failure. *Ann Intern Med*, 123, 601-14
3. Abuelo, J. G. (2007): Normotensive ischemic acute renal failure. *N Engl J Med*, 357, 797-805
4. Adams, J., Kiss, E., Arroyo, A. B., Bonrouhi, M., Sun, Q., Li, Z., Gretz, N., Schnitger, A., Zouboulis, C. C., Wiesel, M., Wagner, J., Nelson, P. J. Grone, H. J. (2005): 13-cis retinoic acid inhibits development and progression of chronic allograft nephropathy. *Am J Pathol*, 167, 285-98
5. Arany, I., Megyesi, J. K., Nelkin, B. D. Safirstein, R. L. (2006): STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells. *Kidney Int*, 70, 669-74
6. Ascon, D. B., Lopez-Briones, S., Liu, M., Ascon, M., Savransky, V., Colvin, R. B., Soloski, M. J. Rabb, H. (2006): Phenotypic and functional characterization of kidney-infiltrating lymphocytes in renal ischemia reperfusion injury. *J Immunol*, 177, 3380-7
7. Ascon, M., Ascon, D. B., Liu, M., Cheadle, C., Sarkar, C., Racusen, L., Hassoun, H. T. Rabb, H. (2009): Renal ischemia-reperfusion leads to long term infiltration of activated and effector-memory T lymphocytes. *Kidney Int*, 75, 526-35
8. Auchincloss, H., Jr. Sultan, H. (1996): Antigen processing and presentation in transplantation. *Curr Opin Immunol*, 8, 681-7
9. Bacon, K. B., Premack, B. A., Gardner, P. Schall, T. J. (1995): Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science*, 269, 1727-30
10. Balmer, J. E. Blomhoff, R. (2002): Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res*, 43, 1773-808
11. Basile, D. P., Donohoe, D., Roethe, K. Osborn, J. L. (2001): Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281, F887-99
12. Basile, D. P., Rovak, J. M., Martin, D. R. Hammerman, M. R. (1996): Increased transforming growth factor-beta 1 expression in regenerating rat renal tubules following ischemic injury. *Am J Physiol*, 270, F500-9
13. Batourina, E., Choi, C., Paragas, N., Bello, N., Hensle, T., Costantini, F. D., Schuchardt, A., Bacallao, R. L. Mendelsohn, C. L. (2002): Distal ureter morphogenesis depends on epithelial cell remodeling mediated by vitamin A and Ret. *Nat Genet*, 32, 109-15

14. Batourina, E., Gim, S., Bello, N., Shy, M., Clagett-Dame, M., Srinivas, S., Costantini, F. Mendelsohn, C. (2001): Vitamin A controls epithelial/mesenchymal interactions through Ret expression. *Nat Genet*, 27, 74-8
15. Bavik, C., Ward, S. J. Chambon, P. (1996): Developmental abnormalities in cultured mouse embryos deprived of retinoic by inhibition of yolk-sac retinol binding protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3110-4
16. Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J. A., Mehta, R. L. Palevsky, P. (2004): Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*, 8, R204-12
17. Benchoua, A., Guegan, C., Couriaud, C., Hosseini, H., Sampaio, N., Morin, D. Onteniente, B. (2001): Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci*, 21, 7127-34
18. Benson, M. J., Pino-Lagos, K., Roseblatt, M. Noelle, R. J. (2007): All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med*, 204, 1765-74
19. Bernard, A. Lauwerys, R. R. (1991): Proteinuria: changes and mechanisms in toxic nephropathies. *Crit Rev Toxicol*, 21, 373-405
20. Boeckmann, P. (2011): Morphologische Untersuchungen tubulärer Schädigung nach Ischämie-Reperfusion. "Med.Diss.", Kiel
21. Bonner, R. F., Emmert-Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S. Liotta, L. A. (1997): Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science*, 278, 1481,1483
22. Bonventre, J. V. (2003): Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 14 Suppl 1, S55-61
23. Bratthauer, G. L. (2010): The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. *Methods Mol Biol*, 588, 257-70
24. Brown, K., Moxham, V., Karegli, J., Phillips, R., Sacks, S. H. Wong, W. (2007): Ultra-localization of Foxp3+ T cells within renal allografts shows infiltration of tubules mimicking rejection. *Am J Pathol*, 171, 1915-22
25. Burne-Taney, M. J., Liu, M., Baldwin, W. M., Racusen, L. Rabb, H. (2006): Decreased capacity of immune cells to cause tissue injury mediates kidney ischemic preconditioning. *J Immunol*, 176, 7015-20
26. Burne-Taney, M. J. Rabb, H. (2003): The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12, 85-90

27. Burne-Taney, M. J., Yokota-Ikeda, N. Rabb, H. (2005): Effects of combined T- and B-cell deficiency on murine ischemia reperfusion injury. *Am J Transplant*, 5, 1186-93
28. Burne-Taney, M. J., Yokota, N. Rabb, H. (2005): Persistent renal and extrarenal immune changes after severe ischemic injury. *Kidney Int*, 67, 1002-9
29. Burne, M. J., Daniels, F., El Ghandour, A., Mauiyyedi, S., Colvin, R. B., O'Donnell, M. P. Rabb, H. (2001): Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest*, 108, 1283-90
30. Burrow, C. R. (2000): Retinoids and renal development. *Exp Nephrol*, 8, 219-25
31. Buzder, T., Yin, X., Wang, X., Banfalvi, G. Basnakian, A. G. (2009): Uptake of foreign nucleic acids in kidney tubular epithelial cells deficient in proapoptotic endonucleases. *DNA Cell Biol*, 28, 435-42
32. Caldwell, C. C., Okaya, T., Martignoni, A., Husted, T., Schuster, R. Lentsch, A. B. (2005): Divergent functions of CD4+ T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 289, G969-76
33. Cardenas, A. (2005): Hepatorenal syndrome: a dreaded complication of end-stage liver disease. *Am J Gastroenterol*, 100, 460-7
34. Chambon, P. (1996): A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *Faseb J*, 10, 940-54
35. Chaudhri, G., Clark, I. A., Hunt, N. H., Cowden, W. B. Ceredig, R. (1986): Effect of antioxidants on primary alloantigen-induced T cell activation and proliferation. *J Immunol*, 137, 2646-52
36. Christensen, E. I. Birn, H. (2001): Megalin and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280, F562-73
37. Christensen, E. I., Moskaug, J. O., Vorum, H., Jacobsen, C., Gundersen, T. E., Nykjaer, A., Blomhoff, R., Willnow, T. E. Moestrup, S. K. (1999): Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol*, 10, 685-95
38. Christensen, E. I. Willnow, T. E. (1999): Essential role of megalin in renal proximal tubule for vitamin homeostasis. *J Am Soc Nephrol*, 10, 2224-36
39. Coombes, J. L., Siddiqui, K. R., Arancibia-Carcamo, C. V., Hall, J., Sun, C. M., Belkaid, Y. Powrie, F. (2007): A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204, 1757-64
40. Cuturi, M. C., Blancho, G., Josien, R. Souillou, J. P. (1994): The biology of allograft rejection. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 3, 578-84

41. Davis, C. G., Goldstein, J. L., Sudhof, T. C., Anderson, R. G., Russell, D. W. Brown, M. S. (1987): Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature*, 326, 760-5
42. Devarajan, P. (2006): Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*, 17, 1503-20
43. Docherty, N. G., Perez-Barriocanal, F., Balboa, N. E. Lopez-Novoa, J. M. (2002): Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1): a potential recovery signal in the post-ischemic kidney. *Ren Fail*, 24, 391-406
44. Duffield, J. S., Park, K. M., Hsiao, L. L., Kelley, V. R., Scadden, D. T., Ichimura, T. Bonventre, J. V. (2005): Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest*, 115, 1743-55
45. Ernest, S. Bello-Reuss, E. (1995): Expression and function of P-glycoprotein in a mouse kidney cell line. *Am J Physiol*, 269, C323-33
46. Espina, V., Wulfkuhle, J. D., Calvert, V. S., VanMeter, A., Zhou, W., Coukos, G., Geho, D. H., Petricoin, E. F., 3rd Liotta, L. A. (2006): Laser-capture microdissection. *Nat Protoc*, 1, 586-603
47. Fan, J. M., Huang, X. R., Ng, Y. Y., Nikolic-Paterson, D. J., Mu, W., Atkins, R. C. Lan, H. Y. (2001): Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro. *Am J Kidney Dis*, 37, 820-31
48. Fan, J. M., Ng, Y. Y., Hill, P. A., Nikolic-Paterson, D. J., Mu, W., Atkins, R. C. Lan, H. Y. (1999): Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. *Kidney Int*, 56, 1455-67
49. Fontenot, J. D. Rudensky, A. Y. (2005): A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol*, 6, 331-7
50. Fraser, D. R. Kodicek, E. (1970): Unique biosynthesis by kidney of a biological active vitamin D metabolite. *Nature*, 228, 764-6
51. Gandolfo, M. T., Jang, H. R., Bagnasco, S. M., Ko, G. J., Agreda, P., Satpute, S. R., Crow, M. T., King, L. S. Rabb, H. (2009): Foxp3+ regulatory T cells participate in repair of ischemic acute kidney injury. *Kidney Int*, 76, 717-29
52. Gerlach, T. H. Zile, M. H. (1990): Upregulation of serum retinol in experimental acute renal failure. *Faseb J*, 4, 2511-7
53. Gerlach, T. H. Zile, M. H. (1991): Effect of retinoic acid and apo-RBP on serum retinol concentration in acute renal failure. *Faseb J*, 5, 86-92

54. Giannopoulou, M., Dai, C., Tan, X., Wen, X., Michalopoulos, G. K. Liu, Y. (2008): Hepatocyte growth factor exerts its anti-inflammatory action by disrupting nuclear factor-kappaB signaling. *Am J Pathol*, 173, 30-41
55. Gille, J., Paxton, L. L., Lawley, T. J., Caughman, S. W. Swerlick, R. A. (1997): Retinoic acid inhibits the regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 by cultured dermal microvascular endothelial cells. *J Clin Invest*, 99, 492-500
56. Gonzalez, N., Alvarez, V., Pons, H., Parra, G., Quiroz, Y. Rodriguez-Iturbe, B. (2002): Mycophenolate mofetil aggravates postischemic acute renal failure in rats. *Transplant Proc*, 34, 43-4
57. Harrison, E. H. (2005): Mechanisms of digestion and absorption of dietary vitamin A. *Annu Rev Nutr*, 25, 87-103
58. Hay, E. D. Zuk, A. (1995): Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am J Kidney Dis*, 26, 678-90
59. Herrero-Fresneda, I., Torras, J., Cruzado, J. M., Condom, E., Vidal, A., Riera, M., Lloberas, N., Alsina, J. Grinyo, J. M. (2003): Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol*, 162, 127-37
60. Hjalms, G., Murray, E., Crumley, G., Harazim, W., Lundgren, S., Onyango, I., Ek, B., Larsson, M., Juhlin, C., Hellman, P., Davis, H., Akerstrom, G., Rask, L. Morse, B. (1996): Cloning and sequencing of human gp330, a Ca(2+)-binding receptor with potential intracellular signaling properties. *Eur J Biochem*, 239, 132-7
61. Holick, M. F., Frommer, J. E., McNeill, S. C., Richtand, N. M., Henley, J. W. Potts, J. T., Jr. (1977): Photometabolism of 7-dehydrocholesterol to previtamin D3 in skin. *Biochem Biophys Res Commun*, 76, 107-14
62. Hori, S., Nomura, T. Sakaguchi, S. (2003): Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299, 1057-61
63. Hu, P., Qin, Y. H., Pei, J., Lei, F. Y., Hu, B. Lu, L. (2010): Beneficial effect of all-trans retinoic acid (ATRA) on glomerulosclerosis rats via the down-regulation of the expression of alpha-smooth muscle actin: a comparative study between ATRA and benazepril. *Exp Mol Pathol*, 89, 51-7
64. Humes, H. D., Nakamura, T., Cieslinski, D. A., Miller, D., Emmons, R. V. Border, W. A. (1993): Role of proteoglycans and cytoskeleton in the effects of TGF-beta 1 on renal proximal tubule cells. *Kidney Int*, 43, 575-84
65. Jani, A., Ljubanovic, D., Faubel, S., Kim, J., Mischak, R. Edelstein, C. L. (2004): Caspase inhibition prevents the increase in caspase-3, -2, -8 and -9 activity and apoptosis in the cold ischemic mouse kidney. *Am J Transplant*, 4, 1246-54
66. Kelly, K. J., Williams, W. W., Jr., Colvin, R. B., Meehan, S. M., Springer, T. A., Gutierrez-Ramos, J. C. Bonventre, J. V. (1996): Intercellular adhesion molecule-1-

- deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest*, 97, 1056-63
67. Kim, I. S., Kim, Y. S., Jang, S. W., Sung, H. J., Han, K. H., Na, D. S. Ko, J. (2004): Differential effects of 9-cis retinoic acid on expression of CC chemokine receptors in human monocytes. *Biochem Pharmacol*, 68, 611-20
68. Kinsey, G. R., Sharma, R., Huang, L., Li, L., Vergis, A. L., Ye, H., Ju, S. T. Okusa, M. D. (2009): Regulatory T cells suppress innate immunity in kidney ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1744-53
69. Kiss, E., Adams, J., Grone, H. J. Wagner, J. (2003): Isotretinoin ameliorates renal damage in experimental acute renal allograft rejection. *Transplantation*, 76, 480-9
70. Klein, I. H., Abrahams, A., van Ede, T., Hene, R. J., Koomans, H. A. Ligtenberg, G. (2002): Different effects of tacrolimus and cyclosporine on renal hemodynamics and blood pressure in healthy subjects. *Transplantation*, 73, 732-6
71. Koo, D. D., Welsh, K. I., McLaren, A. J., Roake, J. A., Morris, P. J. Fuggle, S. V. (1999): Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation. *Kidney Int*, 56, 1551-9
72. Korn, T. Oukka, M. (2007): Dynamics of antigen-specific regulatory T-cells in the context of autoimmunity. *Semin Immunol*, 19, 272-8
73. Krensky, A. M. Ahn, Y. T. (2007): Mechanisms of disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. *Nat Clin Pract Nephrol*, 3, 164-70
74. Kuroiwa, T., Schlimgen, R., Illei, G. G., McInnes, I. B. Boumpas, D. T. (2000): Distinct T cell/renal tubular epithelial cell interactions define differential chemokine production: implications for tubulointerstitial injury in chronic glomerulonephritides. *J Immunol*, 164, 3323-9
75. Kusakabe, T. G., Takimoto, N., Jin, M. Tsuda, M. (2009): Evolution and the origin of the visual retinoid cycle in vertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364, 2897-910
76. Lameire, N., Van Biesen, W. Vanholder, R. (2005): Acute renal failure. *Lancet*, 365, 417-30
77. Lan, H. Y. (2003): Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 12, 25-9
78. Leheste, J. R., Melsen, F., Wellner, M., Jansen, P., Schlichting, U., Renner-Muller, I., Andreassen, T. T., Wolf, E., Bachmann, S., Nykjaer, A. Willnow, T. E. (2003): Hypocalcemia and osteopathy in mice with kidney-specific megalin gene defect. *Faseb J*, 17, 247-9
79. Leheste, J. R., Rolinski, B., Vorum, H., Hilpert, J., Nykjaer, A., Jacobsen, C., Aucouturier, P., Moskaug, J. O., Otto, A., Christensen, E. I. Willnow, T. E. (1999):

- Megalyn knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol*, 155, 1361-70
80. Lelievre-Pegorier, M., Vilar, J., Ferrier, M. L., Moreau, E., Freund, N., Gilbert, T., Merlet-Benichou, C. (1998): Mild vitamin A deficiency leads to inborn nephron deficit in the rat. *Kidney Int*, 54, 1455-62
81. Lemay, S., Rabb, H., Postler, G. Singh, A. K. (2000): Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*, 69, 959-63
82. Lenz, O., Elliot, S. J. Stetler-Stevenson, W. G. (2000): Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *J Am Soc Nephrol*, 11, 574-81
83. Lewis, K. C., Green, M. H., Green, J. B. Zech, L. A. (1990): Retinol metabolism in rats with low vitamin A status: a compartmental model. *J Lipid Res*, 31, 1535-48
84. Liu, M., Chien, C. C., Grigoryev, D. N., Gandolfo, M. T., Colvin, R. B. Rabb, H. (2009): Effect of T cells on vascular permeability in early ischemic acute kidney injury in mice. *Microvasc Res*, 77, 340-7
85. Mahajan, D., Wang, Y., Qin, X., Wang, Y., Zheng, G., Wang, Y. M., Alexander, S. I. Harris, D. C. (2006): CD4+CD25+ regulatory T cells protect against injury in an innate murine model of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 17, 2731-41
86. Mahnensmith, R. L. (1992): Hypercalcemia, hypernatremia, and reversible renal insufficiency. *Am J Kidney Dis*, 19, 604-8
87. Makover, A., Soprano, D. R., Wyatt, M. L. Goodman, D. S. (1989): Localization of retinol-binding protein messenger RNA in the rat kidney and in perinephric fat tissue. *J Lipid Res*, 30, 171-80
88. Manzano, V. M., Munoz, J. C., Jimenez, J. R., Puyol, M. R., Puyol, D. R., Kitamura, M. Cazana, F. J. (2000): Human renal mesangial cells are a target for the anti-inflammatory action of 9-cis retinoic acid. *Br J Pharmacol*, 131, 1673-83
89. Marino, M., Andrews, D., Brown, D. McCluskey, R. T. (2001): Transcytosis of retinol-binding protein across renal proximal tubule cells after megalin (gp 330)-mediated endocytosis. *J Am Soc Nephrol*, 12, 637-48
90. Mark, M., Ghyselinck, N. B. Chambon, P. (2006): Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46, 451-80
91. McCullough, F. S., Northrop-Clewes, C. A. Thurnham, D. I. (1999): The effect of vitamin A on epithelial integrity. *Proc Nutr Soc*, 58, 289-93
92. Mehta, R. L., Kellum, J. A., Shah, S. V., Molitoris, B. A., Ronco, C., Warnock, D. G. Levin, A. (2007): Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*, 11, R31

93. Mizuno, S. Nakamura, T. (2005): Prevention of neutrophil extravasation by hepatocyte growth factor leads to attenuations of tubular apoptosis and renal dysfunction in mouse ischemic kidneys. *Am J Pathol*, 166, 1895-905
94. Molitoris, B. A. (1998): Ischemic acute renal failure: exciting times at our fingertips. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 7, 405-6
95. Molitoris, B. A. Marrs, J. (1999): The role of cell adhesion molecules in ischemic acute renal failure. *Am J Med*, 106, 583-92
96. Moritz, K. M., Dodic, M. Wintour, E. M. (2003): Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays*, 25, 212-20
97. Ng, Y. Y., Huang, T. P., Yang, W. C., Chen, Z. P., Yang, A. H., Mu, W., Nikolic-Paterson, D. J., Atkins, R. C. Lan, H. Y. (1998): Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int*, 54, 864-76
98. Nguan, C. Y. Du, C. (2009): Renal tubular epithelial cells as immunoregulatory cells in renal allograft rejection. *Transplant Rev (Orlando)*, 23, 129-38
99. Nony, P. A. Schnellmann, R. G. (2003): Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther*, 304, 905-12
100. Okano, T., Yasumura, M., Mizuno, K. Kobayashi, T. (1977): Photochemical conversion of 7-dehydrocholesterol into vitamin D<sub>3</sub> in rat skins. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 23, 165-8
101. Oudemans-van Straaten, H. M. (2004): Contrast nephropathy, pathophysiology and prevention. *Int J Artif Organs*, 27, 1054-65
102. Ozdemir, B. H., Ozdemir, F. N., Demirhan, B. Haberal, M. (2005): TGF-beta1 expression in renal allograft rejection and cyclosporine A toxicity. *Transplantation*, 80, 1681-5
103. Park, P., Haas, M., Cunningham, P. N., Bao, L., Alexander, J. J. Quigg, R. J. (2002): Injury in renal ischemia-reperfusion is independent from immunoglobulins and T lymphocytes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 282, F352-7
104. Patarroyo, M., Prieto, J., Rincon, J., Timonen, T., Lundberg, C., Lindbom, L., Asjo, B. Gahmberg, C. G. (1990): Leukocyte-cell adhesion: a molecular process fundamental in leukocyte physiology. *Immunol Rev*, 114, 67-108
105. Pino-Lagos, K., Benson, M. J. Noelle, R. J. (2008): Retinoic acid in the immune system. *Ann N Y Acad Sci*, 1143, 170-87
106. Porter, A. G. Janicke, R. U. (1999): Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*, 6, 99-104

107. Quadro, L., Blaner, W. S., Salchow, D. J., Vogel, S., Piantedosi, R., Gouras, P., Freeman, S., Cosma, M. P., Colantuoni, V. Gottesman, M. E. (1999): Impaired retinal function and vitamin A availability in mice lacking retinol-binding protein. *Embo J*, 18, 4633-44
108. Rabb, H., Daniels, F., O'Donnell, M., Haq, M., Saba, S. R., Keane, W. Tang, W. W. (2000): Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279, F525-31
109. Rabb, H., Mendiola, C. C., Saba, S. R., Dietz, J. R., Smith, C. W., Bonventre, J. V. Ramirez, G. (1995): Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in severe ischemic reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 211, 67-73
110. Raila, J., Willnow, T. E. Schweigert, F. J. (2005): Megalin-mediated reuptake of retinol in the kidneys of mice is essential for vitamin A homeostasis. *J Nutr*, 135, 2512-6
111. Saiki, R. K., Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B. Erlich, H. A. (1986): Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324, 163-6
112. Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A. K. Farquhar, M. G. (1994): Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9725-9
113. Sato, Y., Meller, R., Yang, T., Taki, W. Simon, R. P. (2008): Stereo-selective neuroprotection against stroke with vitamin A derivatives. *Brain Res*, 1241, 188-92
114. Schambach, F., Schupp, M., Lazar, M. A. Reiner, S. L. (2007): Activation of retinoic acid receptor-alpha favours regulatory T cell induction at the expense of IL-17-secreting T helper cell differentiation. *Eur J Immunol*, 37, 2396-9
115. Schon, S., Ekberg, H., Wikstrom, B., Oden, A. Ahlmen, J. (2004): Renal replacement therapy in Sweden. *Scand J Urol Nephrol*, 38, 332-9
116. Schrier, R. W. Wang, W. (2004): Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*, 351, 159-69
117. Segerer, S., Nelson, P. J. Schlondorff, D. (2000): Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol*, 11, 152-76
118. Senoo, H., Kojima, N. Sato, M. (2007): Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm*, 75, 131-59
119. Shen, H., Luo, Y., Kuo, C. C., Deng, X., Chang, C. F., Harvey, B. K., Hoffer, B. J. Wang, Y. (2009): 9-Cis-retinoic acid reduces ischemic brain injury in rodents via bone morphogenetic protein. *J Neurosci Res*, 87, 545-55

- 
120. Shimizu, A. Yamanaka, N. (1993): Apoptosis and cell desquamation in repair process of ischemic tubular necrosis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 64, 171-80
121. Song, E., Zou, H., Yao, Y., Proudfoot, A., Antus, B., Liu, S., Jens, L. Heemann, U. (2002): Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney Int*, 61, 676-85
122. Soprano, D. R., Soprano, K. J. Goodman, D. S. (1986): Retinol-binding protein messenger RNA levels in the liver and in extrahepatic tissues of the rat. *J Lipid Res*, 27, 166-71
123. Spurgeon, K. R., Donohoe, D. L. Basile, D. P. (2005): Transforming growth factor-beta in acute renal failure: receptor expression, effects on proliferation, cellularity, and vascularization after recovery from injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 288, F568-77
124. Stabile, E., Kinnaird, T., la Sala, A., Hanson, S. K., Watkins, C., Campia, U., Shou, M., Zbinden, S., Fuchs, S., Kornfeld, H., Epstein, S. E. Burnett, M. S. (2006): CD8+ T lymphocytes regulate the arteriogenic response to ischemia by infiltrating the site of collateral vessel development and recruiting CD4+ mononuclear cells through the expression of interleukin-16. *Circulation*, 113, 118-24
125. Stephensen, C. B. (2001): Vitamin A, infection, and immune function. *Annu Rev Nutr*, 21, 167-92
126. Strutz, F., Okada, H., Lo, C. W., Danoff, T., Carone, R. L., Tomaszewski, J. E. Neilson, E. G. (1995): Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol*, 130, 393-405
127. Sun, C. M., Hall, J. A., Blank, R. B., Bouladoux, N., Oukka, M., Mora, J. R. Belkaid, Y. (2007): Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*, 204, 1775-85
128. Terasaki, P. I., Cecka, J. M., Gjertson, D. W. Takemoto, S. (1995): High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *N Engl J Med*, 333, 333-6
129. Tiwari, M. M., Prather, P. L. Mayeux, P. R. (2005): Mechanism of bradykinin-induced Ca<sup>2+</sup> mobilization in murine proximal tubule epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 798-805
130. Toback, F. G. (1992): Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int*, 41, 226-46
131. Tuttle, K. R. (2001): Ischemic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 10, 167-73

- 
132. Usuda, N., Kameko, M., Kanai, M. Nagata, T. (1983): Immunocytochemical demonstration of retinol-binding protein in the lysosomes of the proximal tubules of the human kidney. *Histochemistry*, 78, 487-90
133. von Boehmer, H. (2005): Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*, 6, 338-44
134. von Boehmer, H. (2007): Oral tolerance: is it all retinoic acid? *J Exp Med*, 204, 1737-9
135. Wang, S., Diao, H., Guan, Q., Cruikshank, W. W., Delovitch, T. L., Jevnikar, A. M. Du, C. (2008): Decreased renal ischemia-reperfusion injury by IL-16 inactivation. *Kidney Int*, 73, 318-26
136. Wang, S., Jiang, J., Guan, Q., Lan, Z., Wang, H., Nguan, C. Y., Jevnikar, A. M. Du, C. (2008): Reduction of Foxp3-expressing regulatory T cell infiltrates during the progression of renal allograft rejection in a mouse model. *Transpl Immunol*, 19, 93-102
137. Wen, X., Li, Y., Hu, K., Dai, C. Liu, Y. (2005): Hepatocyte growth factor receptor signaling mediates the anti-fibrotic action of 9-cis-retinoic acid in glomerular mesangial cells. *Am J Pathol*, 167, 947-57
138. Wiegele, G., Brandis, M. Zimmerhackl, L. B. (1998): Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK). *Nephrol Dial Transplant*, 13, 1158-67
139. Willnow, T. E., Hilpert, J., Armstrong, S. A., Rohlmann, A., Hammer, R. E., Burns, D. K. Herz, J. (1996): Defective forebrain development in mice lacking gp330/megalin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 8460-4
140. Willnow, T. E. Nykjaer, A. (2002): Pathways for kidney-specific uptake of the steroid hormone 25-hydroxyvitamin D3. *Curr Opin Lipidol*, 13, 255-60
141. Wolfs, T. G., de Vries, B., Walter, S. J., Peutz-Kootstra, C. J., van Heurn, L. W., Oosterhof, G. O. Buurman, W. A. (2005): Apoptotic cell death is initiated during normothermic ischemia in human kidneys. *Am J Transplant*, 5, 68-75
142. Xiao, S., Jin, H., Korn, T., Liu, S. M., Oukka, M., Lim, B. Kuchroo, V. K. (2008): Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol*, 181, 2277-84
143. Xu, Q., Lucio-Cazana, J., Kitamura, M., Ruan, X., Fine, L. G. Norman, J. T. (2004): Retinoids in nephrology: promises and pitfalls. *Kidney Int*, 66, 2119-31
144. Yamane, T., Takeuchi, K., Yamamoto, Y., Li, Y. H., Fujiwara, M., Nishi, K., Takahashi, S. Ohkubo, I. (2002): Legumain from bovine kidney: its purification, molecular cloning, immunohistochemical localization and degradation of annexin II and vitamin D-binding protein. *Biochim Biophys Acta*, 1596, 108-20

- 
145. 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, 1465-75
146. Yang, J. Liu, Y. (2002): Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol*, 13, 96-107
147. Zhao, Z. Q., Nakamura, M., Wang, N. P., Wilcox, J. N., Shearer, S., Ronson, R. S., Guyton, R. A. Vinten-Johansen, J. (2000): Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res*, 45, 651-60
148. Zheng, G., Bachinsky, D. R., Stamenkovic, I., Strickland, D. K., Brown, D., Andres, G. McCluskey, R. T. (1994): Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem*, 42, 531-42
149. Zheng, Y. Rudensky, A. Y. (2007): Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*, 8, 457-62
150. Zuber, J., Brodin-Sartorius, A., Lapidus, N., Patey, N., Tosolini, M., Candon, S., Rabant, M., Snanoudj, R., Panterne, C., Thervet, E., Legendre, C. Chatenoud, L. (2009): FOXP3-enriched infiltrates associated with better outcome in renal allografts with inflamed fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*, 24, 3847-54

## 9. Anhang

Reagenz	Menge	Hersteller
Aqua dest.	2 l	DeltaSelect, Dreieich, Deutschland
NaCl	14,02 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,62 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,82 g	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 80	1 ml	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tab.10: PBS-Puffer (pH 7,3)

Reagenz	Menge	Hersteller
Aqua dest.	2 ml	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Puffer	40 µl	Vector Laboratories, Burlingame, USA
DAB	40 µl	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Hydrogenperoxidase	40 µl	Vector Laboratories, Burlingame, USA

Tab.11: DAB-Komplex

## Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Jan Hinrich Bräsen danken, der mir das Thema für diese Arbeit überlassen hat, mir immer mit kompetentem Rat zur Seite stand und mir ferner die Möglichkeit gab die Ergebnisse dieser Arbeit auf der 93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie in Freiburg vorzustellen.

Herrn Professor Dr. Christoph Röcken möchte ich dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gab in seinem Institut zu promovieren.

Ferner bedanke ich mich bei Professor Dr. Wolfram Klapper für die Möglichkeit in seinem Labor molekularpathologische Untersuchungen durchzuführen.

Für das Bereitstellen der Megalin cre-lox knockout Mäuse bedanke ich mich bei Professor Dr. Thomas Willnow, in dessen Abteilung die Tierversuche durchgeführt wurden (Max Delbrück Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin); für das Bereitstellen der RBP-knockout Mäuse bedanke ich mich bei Professor Dr. Max Gottesman (Institute of Cancer Research, Columbia University, College of Physicians and Surgeons, New York).

Für die Betreuung der Tiere danke ich Frau Susanne Schütze, für die medizinische Versorgung bedanke ich mich bei Dr. Karin Jacobi.

Ein besonderer Dank gilt Frau Melina Nieminen (AG Prof. Dr. Duska Dragun, Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität, Campus Virchow) für die experimentell-chirurgische Durchführung der Tierversuche.

Ein herzlicher Dank gilt Frau Philine Boeckmann für die Zusammenarbeit, da sich diese Dissertationsarbeit aufbauend auf ihren Daten entwickelt hat.

Weiter bedanke ich mich bei Frau Hanne Jacobsen, die mir die Faszination der Zellkulturen nahe brachte.

Frau Hanna Köhler-Mindack, Frau Silvia Holz und Frau Maike Pacena danke ich für die technische Unterstützung.

Ganz besonderer Dank gilt Dipl.-Biol. Jan Sperveslage, der mich bei der Durchführung der molekularpathologischen Untersuchungen unterstützte, mir mit seinem Fachwissen immer beiseite stand und mir bei der Korrektur meiner Arbeit half.

Ferner bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Monika Szczepanowski für Ihre wertvolle fachliche Unterstützung im Labor.

Für ihre Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt für ihre moralische Unterstützung möchte ich mich bei Frau Olivera Batic bedanken.

Schlussendlich geht ein großes Dankeschön an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Volker Maus  
Geburtsdatum: 01.07.1984  
Geburtsort: Mechernich  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung

August 1991 – Juni 1995	Gemeinschaftsgrundschule Marmagen
August 1995 – Juni 2004	Hermann-Josef-Kolleg, Steinfeld
Juni 2004	Allgemeines Abitur

### Studium der Humanmedizin (vorklinischer Abschnitt)

April 2005 – April 2007	Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen
Oktober 2006 – Januar 2007	Hilfswissenschaftler im Anatomischen & Embryologischen Institut der Universität Göttingen (Leitung: Prof. Dr. K. Krieglstein)
April 2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Studium der Humanmedizin (klinischer Abschnitt)**

Seit April 2007	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel
August 2007	Famulatur: Allgemein Chirurgie im Städtischem Krankenhaus Kiel (Leitung: Prof. Dr. I. Vogel)
September 2007	Praxisfamulatur: Allgemeinarztpraxis Dr. C. Menges in Kiel
Februar – März 2008	Famulatur: Neurochirurgie im Universitätsspital Zürich (Leitung: Prof. Dr. H. Bertalanffy)
März 2009	Famulatur: Pathologie im UKSH, Campus Kiel (Leitung: Prof. Dr. G. Klöppel)
September 2009	Famulatur: Neurochirurgie im UKSH, Campus Kiel (Leitung: Prof. Dr. H.M. Mehdorn)
Februar – Mai 2010	1. Tertial des Praktischen Jahres: Chirurgie im Kantonsspital St. Gallen (Leitung: Prof. Dr. J. Lange)
Juni – September 2010	2. Tertial des Praktischen Jahres: Neurochirurgie im UKSH, Campus Kiel (Leitung: Prof. Dr. H.M. Mehdorn)
Oktober 2010 – Januar 2011	3. Tertial des Praktischen Jahres: Innere Medizin im Städtischen Krankenhaus Kiel (Leitung: Prof. Dr. J. Strotmann)

**Dissertation**

Seit April 2008	Dissertationsarbeit „ Einfluss der Reabsorption von Retinol-RBP-Komplexen auf die tubuläre renale Schädigung und Regeneration nach Ischämie-Reperfusion“ im Institut für Pathologie im UKSH, Campus Kiel, PD Dr. J.H. Bräsen
-----------------	--

**Erklärung**

„Ich, Volker Maus, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Volker Maus