

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum für Innere Medizin
Medizinischen Klinik 4, Klinik für Nephrologie
Direktor: Prof. Dr. Timotheus Speer

***In vitro* Untersuchungen**
zum Einfluss des Eisentransportproteins Lipocalin-2
auf die akute Schädigung muriner renaler Tubulusepithelzellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Anne-Kathrin Stefanie Thiemens
aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main, 2023

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent: Prof. Dr. Patrick C. Baer
Korreferent: Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger
Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Zusammenfassung.....	X
Summary.....	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Akute Nierenschädigung	3
1.1.1 Definition und Klassifikation.....	3
1.1.2 Ätiologie und Pathomechanismus	4
1.1.3 Cisplatin-Nephrotoxizität.....	5
1.1.4 Biomarker im Rahmen der akuten Nierenschädigung	8
1.2 Lipocalin-2 (Lcn-2).....	11
1.2.1 Allgemeine Eigenschaften	11
1.2.2 Lcn-2 und Eisen im Rahmen einer akuten Nierenschädigung.....	12
1.2.3 Eisenbeladung von Lcn-2 als regenerative Funktion	14
1.2.4 Ursprung von Lcn-2 als Wegweiser der dualen Funktion	17
1.3 Makrophagen.....	18
1.3.1 Makrophagen in der Niere	18
1.3.2 Makrophagen-Phänotypen	21
1.3.3 Makrophagen und Eisen.....	23
1.4 Zielsetzung und Fragestellung.....	27
2 Material.....	28
2.1 Geräte und Zubehör	28
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.3 Chemikalien und Kits.....	31
2.3.1 Medien und Mediensupplemente.....	34
2.4 Puffer und Lösungen	35
2.4.1 Puffer/Lösungen für die Herstellung von rekombinanten Lcn-2.....	35

2.4.2	Puffer für die Immunpräzipitation (IP)	38
2.4.3	Puffer für den Enzyme Linked Immunosorbent Assay	38
2.4.4	Lösung für die RNA Isolation	38
2.4.5	Puffer/Lösung für die Western Blot Analyse	39
2.5	Antikörper	42
2.5.1	Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung	42
2.5.2	Antikörper für Protein- und Western Blot Analyse	42
2.6	Quantitative PCR Primer	43
2.7	Software	44
3	Methoden.....	45
3.1	Tiere	45
3.2	Zellkultur	45
3.2.1	Murine renale Tubuluspithelzellen (mTEZ)	45
3.2.2	Makrophagen aus dem Knochenmark (BMDM).....	48
3.3	<i>In vitro</i> Untersuchungen	49
3.3.1	Cisplatin-induzierte Schädigung der mTEZ	49
3.3.2	Etablierung eines Rescue Models an Cisplatin-geschädigten mTEZ ...	50
3.3.3	xCELLigence Proliferationsnachweis	51
3.4	Nachweismethoden	51
3.4.1	XTT-Zellvitalitätsassay	51
3.4.2	Phalloidin Färbung.....	52
3.4.3	Immunfluoreszenz Färbung	53
3.4.4	Proteinanalysen.....	53
3.4.5	RNA Analysen	60
3.5	Statistische Analysen	63
4	Ergebnisse	64
4.1	Primäre mTEZ sind <i>in vitro</i> durch einen epithelialen Phänotyp gekennzeichnet	64
4.1.1	Die Schädigung von mTEZ durch Inkubation mit Cisplatin ist dosisabhängig	66
4.2	IL-10-stimulierte Makrophagen bilden einen pro-regenerativen, Eisen-freisetzenden Phänotyp aus	67
4.2.1	Polarisierung von Makrophagen erzeugt einen pro-regenerativen Phänotyp	67
4.2.2	Pro-regenerative Makrophagen bilden einen Eisen-freisetzenden Phänotyp aus.....	68

4.3	Die Regeneration von mTEZ nach Cisplatin Schädigung durch KM aus Makrophagen ist abhängig von Lcn-2 und Eisen.....	70
4.3.1	Rekombinant-hergestelltes Lcn-2 bindet Eisen über eine Eisen-Katecholbindung.....	70
4.3.2	Lcn-2 aus Makrophagen fördert die epitheliale Integrität von mTEZ	71
4.3.3	Die Induktion der Proliferation geschädigter mTEZ ist Lcn-2 vermittelt	74
4.3.4	Eisen-abhängiges Recovery durch Makrophagen-sezerniertes Lcn-2 .	76
5	Diskussion	79
5.1	Verlauf einer akuten Nierenschädigung.....	79
5.2	Regeneration in der Niere	83
5.2.1	Makrophagen-induzierte Nierenregeneration	84
5.2.2	Makrophagen und Eisen in der Nierenregeneration	87
5.3	Eisen-gebundenes Lcn-2 wirkt pro-regenerativ	89
5.4	Makrophagen-sezerniertes Lcn-2 bei der Nierenregeneration	93
5.5	Abschließendes Fazit	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Publikationen	121
8	Schriftliche Erklärung	122

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
Apo-Lcn-2	Eisen-unbeladene Form von Lcn-2
BMDM	Makrophagen (<i>Bone marrow-derived macrophage</i>)
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DAMPS	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DFO	Deferoxamin
Cis	Cisplatin
CK	<i>Cytokeratin</i> (Zytokeratin)
CO	Kohlenstoffmonoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
E.coli	Escherichia coli
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
Fe	Eisen
GFR	glomerulären Filtrationsrate
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GST	Glutathion S Transferase
Holo-Lcn-2	Eisen-beladene Form von Lcn-2
IF	Immunfluoreszenz
IFN-γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden
i.v.	intravenös
kDA	Kilodalton
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcome</i>
KIM-1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
KM	konditioniertes Medium
Lcn-2	Lipocalin-2

Lcn-2R	Lipocalin-2 Rezeptor
Lcn-2^{-/-}	Lipocalin-2-knockout
LIP	labiler Eisenpool
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMG	Matrix-Metalloproteinase
Mφ	Makrophagen
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
mTEZ	murine Tublusepithelzellen
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
NGAL	Neutrophil gelatinase assoziiertes Lipocalin, Lcn-2
NO	Stickstoffmonoxid
ng	Nanogramm
OD	optische Dichte
qPCR	Quantitative real-time Polymerasenkettenreaktion
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCNA	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>Reaktive oxygen species</i> (Sauerstoffradikale)
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAM	<i>tumor-associated macrophages</i>
TBP	TATA-bindendes Protein
TfR	Transferrin-Rezeptor
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-beta</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
WT	Wildtyp
ZO-1	Zona occludens-1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung.....	4
Abbildung 2: Eisenbeladung von Lcn-2 bestimmt die regenerative Funktion..	15
Abbildung 3: Einteilung des M ϕ Phänotyps gemäß klassischer oder alternativer Aktivierung.....	22
Abbildung 4: Experimenteller Aufbau zur Gewinnung eines konditionierten Mediums IL-10-stimulierter M ϕ	49
Abbildung 5: Experimenteller Aufbau zur Cisplatin-induzierten Schädigung der mTEZ	50
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Rescue Modells an Cisplatin-geschädigten mTEZ	50
Abbildung 7: Isolationsschritte zur Gewinnung primärer mTEZ.....	64
Abbildung 8: Kultivierung primärer mTEZ mit Darstellung eines epithelialen Phänotyps	65
Abbildung 9: Nachweis der dosis-abhängigen Zytotoxizität von Cisplatin	67
Abbildung 10: IL-10-stimulierte primäre M ϕ bilden einen anti-inflammatorischen Phänotyp aus.	68
Abbildung 11: IL-10-stimulierte primäre M ϕ bilden einen Eisen-freisetzenden Phänotyp aus, der sich durch eine vermehrte Freisetzung von Lcn-2-gebundenen Eisen auszeichnet.....	69
Abbildung 12: Eisenbindung des rekombinant-hergestellten Lcn-2	70
Abbildung 13: Lcn-2-vermittelte Regeneration der zellulären Integrität und des epithelialen Phänotyps	72
Abbildung 14: Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts wird durch Lcn-2 induziert.....	73
Abbildung 15: Zellschädigung und -regeneration auf Proteinebene mittels Analyse des Schädigungsmarkers KIM-1 und Protektivfaktors Klotho	74
Abbildung 16: Proliferation Cisplatin-geschädigter mTEZ durch Eisen-beladenes Lcn-2.....	75
Abbildung 17: Die Regeneration mTEZ ist abhängig von der Bereitstellung von Lcn-2-gebundenem Eisen aus M ϕ	77
Abbildung 18: M ϕ -sezerniertes Lcn-2 fördert die Überlebensfähigkeit mTEZ.	77
Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse und schematische Darstellung der Hypothese	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte	28
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 3: Chemikalien und Kits	31
Tabelle 4: Medien und Mediensupplemente	34
Tabelle 5: Verwendete Standardmedien mit Abkürzung und Zusammensetzung	35
Tabelle 6: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung	42
Tabelle 7: Antikörper für Protein- und Western Blot Analyse	42
Tabelle 8: Primer Sequenzen für Real-Time Quantitative PCR	43
Tabelle 9: Software	44
Tabelle 10: Zellzahlbestimmung und Aussaat von mTEZ	48
Tabelle 11: Zusammensetzung und Herstellung des SDS-Gels	60
Tabelle 12: Ablauf der cDNA-Synthese	61
Tabelle 13: Ablauf der real-time PCR	62

Zusammenfassung

Die akute Nierenschädigung ist ein häufiges klinisches Erscheinungsbild, das trotz der heutigen Erkenntnisse über pathophysiologische Abläufe in der Niere mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert ist. Die eigene Fähigkeit der Niere zur Regeneration stellt ein Potenzial dar, das durch die Unterstützung pro-regenerativer Faktoren das Patientenüberleben verbessern kann. Das Wissen, dass die akute Nierenschädigung ein reversibles Ereignis darstellt, bestärkt den Einsatz der Forschung pro-regenerative Einflussfaktoren zu bestimmen, deren Zusammenhang darzustellen und eine mögliche Strategie zur innovativen Therapie zu entwickeln. Um eine akute Nierenschädigung darzustellen und anschließend auf regenerative Prozesse zu untersuchen, wurde ein Cisplatin-induziertes *in vitro*-Schädigungsmodell an primären Tubulusepithelzellen (mTEZ) aus Wildtyp Mäusen etabliert. Nach Isolation und Kultivierung primärer mTEZ erfolgte die Schädigung mit Cisplatin, die anhand eines Zytotoxizitätsnachweises quantifiziert wurde. Makrophagen zeichnen sich durch ihre funktionale Vielfalt in physiologischen als auch pathophysiologischen Abläufen aus. Ihre Plastizität ermöglicht es ihnen, sich entsprechend des umgebenden Milieus mit ihrem Phänotyp anzupassen und folglich in Form eines pro-regenerativen Makrophagen Proliferation und Reparaturprozesse zu unterstützen. Für die Untersuchung einer Makrophagen-vermittelten, pro-regenerativen Wirkung auf geschädigte mTEZ wurden primäre Zellen aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert und zu Makrophagen differenziert. Zur Ausprägung eines pro-regenerativen Makrophagen Phänotyps erfolgte die Stimulation der kultivierten Makrophagen durch Inkubation mit Interleukin-10 (IL-10) und die Herstellung eines konditionierten Mediums (KM). Lipocalin-2 (Lcn-2) ist bekannt als früher Biomarker im Rahmen der akuten Nierenschädigung, aber zeichnet sich zusätzlich durch seine pro-proliferative Wirkung und regenerative Funktion aus. Lcn-2 ist ein Protein, das Eisen mit hoher Affinität bindet und in Makrophagen als alternativer Eisen-Transportmechanismus dient. In der vorliegenden Untersuchung stellte sich bei Stimulation mit IL-10 ein pro-regenerativer Makrophagen Phänotyp dar, der sich durch eine erhöhte Eisenfreisetzung und dem erhöhten Nachweis von Eisen-beladenen Lcn-2 im KM auszeichnete (holo-Lcn-2). Um den Zusammenhang von Lcn-2 aus IL-10-stimulierten Makrophagen und die regenerativen Eigenschaften auf mTEZ zu untersuchen, wurde ein Versuchsaufbau etabliert, indem mTEZ mit Cisplatin geschädigt und anschließend

ein KM von IL-10-stimulierten Wildtyp (WT) oder Lcn-2 knockout (Lcn-2^{-/-}) Makrophagen hinzugefügt wurde. Zusätzlich wurde ein rekombinantes holo-Lcn-2 hergestellt, das als Zugabe zu KM von Lcn-2^{-/-} Makrophagen der Wiederherstellung und der Untersuchung eines Lcn-2-abhängigen Mechanismus diente. Als Merkmal einer Zellregeneration wurden die epitheliale Integrität und die Reorganisation des Zytoskeletts bestimmt. Ergänzend konnte mit Hilfe der Expression von Proliferationsmarkern sowie einer Echtzeitmessung der Proliferationsrate eine zunehmende Proliferation geschädigter mTEZ nach Zugabe von KM aus Makrophagen in Abhängigkeit von Lcn-2 bewiesen werden. Anschließend wurde eine Analyse des Eisengehalts im Zelllysat von mTEZ durchgeführt. Hierbei konnte ein signifikanter Anstieg des Eisengehaltes in mTEZ nach Zugabe von KM aus WT Makrophagen als auch durch Ergänzung von rekombinanten holo-Lcn-2 zu KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen nachgewiesen werden. In der Korrelation zwischen Eisenmenge im Zelllysat der mTEZ und der Proliferationsrate ergab sich eine zunehmende Proliferation mit Anstieg des Eisengehaltes der Zelle. Zusammenfassend ergaben unsere Untersuchungen, dass KM aus pro-regenerativen Makrophagen die Überlebensfähigkeit von mTEZ nach Cisplatin-Schädigung steigert. Es zeigte sich auch eine durch Lcn-2 geförderte epitheliale Integrität sowie ein pro-proliferativer Effekt. Die regenerativen Effekte an mTEZ wurden durch Lcn-2 aus KM von IL-10-stimulierten Makrophagen über seine Eisen-bindende Funktion vermittelt. Über die Ausschüttung von Lcn-2 vermitteln pro-regenerative Makrophagen vermutlich die Zell-Regeneration von mTEZ, indem Lcn-2 toxisches Eisen von geschädigten und apoptotischen Zellen aus der Umgebung bindet, es Zielzellen als holo-Lcn-2 zur Verfügung stellt und hierdurch die Proliferation induziert.

Summary

Despite current knowledge of pathophysiological processes in the kidney, the acute kidney injury is a frequent clinical manifestation and associated with high morbidity and mortality. The kidney's own ability to regenerate represents a potential to improve patients' outcome by supporting underlying pro-regenerative factors in the context of therapeutic treatment. Considering that acute kidney injury is a reversible event encourages the research on pro-regenerative factors, their interconnections and develop innovative therapeutic options. To demonstrate acute damage of kidney injury and subsequently examine regenerative processes, a cisplatin-induced model was established consisting of primary murine tubule epithelial cells derived from wild-type mice (mTEC) *in vitro*. Isolation and culturing of primary mTEC was followed by cisplatin-induced injury, which was quantified by survival assays. Macrophages are characterized by their functional diversity in both physiological and pathophysiological processes. Their influence on the course of acute kidney injury includes the onset of damage as well as the later regenerative phase. Their plasticity allows them to adapt their phenotype according to the environment and, consequently, to support proliferation and repair as pro-regenerative macrophages. To investigate a macrophage-mediated pro-regenerative effect on damaged kidney cells, primary bone marrow-derived cells were isolated and differentiated into macrophages. Stimulation of cultured macrophages was performed by incubation with IL-10 to express a pro-regenerative macrophage phenotype and to collect the conditioned medium (CM). In addition, macrophages fulfill a central role in iron metabolism by storage and supply of iron through the regulation of their iron gene profile and the production of iron specific proteins. Lcn-2 is an early biomarker in the context of acute kidney injury but is also characterized by its pro-proliferative effect and regenerative function. Lcn-2 is an iron-binding protein that binds iron with high affinity and serves as an alternative iron transport mechanism in macrophages. In the present study a pro-regenerative, iron-release macrophage phenotype depending on macrophage IL-10-stimulation was confirmed. In addition, pro-regenerative macrophages were characterized by increased release of iron-loaded Lcn-2. The next survey was to investigate the effect of Lcn-2 from IL-10-stimulated macrophages on damaged kidney cells and the assessment of its regenerative and proliferative properties in response to iron. In this context, an experimental setup was established by damaging mTEC with cisplatin and

then adding CM of IL-10-stimulated WT or Lcn-2^{-/-} macrophages. Further, a recombinant holo-Lcn-2 was produced and used in addition to CM from Lcn-2^{-/-} macrophages to restore and investigate an Lcn-2-dependent mechanism. As a feature of cell regeneration, epithelial integrity and reorganization of cell structures as functional cytoskeleton were determined. Additionally, expression of proliferative markers and real-time measurement of proliferation rate demonstrated increasing proliferation of damaged mTEC after addition of CM from macrophages in a Lcn-2-dependent manner. Knowing that macrophages with their iron-releasing activity and Lcn-2 as an iron transport protein actively influence the available iron in the microenvironment, an analysis of the iron content in the cell lysate of mTEC was then performed. Here, a significant increase in iron content in mTEC was demonstrated after addition of CM from WT macrophages as well as by supplementation of recombinant holo-Lcn-2 to CM from Lcn-2^{-/-} macrophages. In the correlation between the iron amount in cell lysate of mTEC and the proliferation rate, the extent of iron content resulted in increasing proliferation. In summary, our studies revealed that CM derived from pro-regenerative macrophages increased mTEC survival after cisplatin injury in a Lcn-2 dependent manner. Here, Lcn-2 promoted epithelial integrity and showed a pro-proliferative effect. The regenerative effect on mTEC was mediated by Lcn-2 from CM of IL-10-stimulated macrophages via its iron-binding function. Through the release of Lcn-2, pro-regenerative macrophages presumably mediate regeneration by Lcn-2 binding of toxic iron from damaged cells and providing it to target cells as holo-Lcn-2, thereby inducing proliferation.

1 Einleitung

Im Verlauf eines Krankenhausaufenthaltes ist die akute Nierenschädigung ein häufiges Ereignis. Mit einer schwankenden Inzidenz von 5 - 20 % erleiden Krankenhauspatienten im Rahmen ihres Aufenthaltes eine akute Nierenschädigung.^{1,2} Die Inzidenz in der Gesamtbevölkerung beträgt schätzungsweise 0,5 %.³ Die Letalität hospitalisierter Patienten variiert je nach Stadium zwischen 5 und 25 %, ansteigend mit zunehmenden Krankheitsstadium und deutlich erhöht bei dialysepflichtigen Patienten.^{1,4} Trotz weitreichenden Entwicklungen in der diagnostischen und therapeutischen Medizin stellt sich die Behandlung der akuten Nierenschädigung im klinischen Kontext vielfältigen Herausforderungen. Die akute Nierenschädigung tritt jedoch nicht nur in Zusammenhang mit nephrologischen Erkrankungen auf. Auch im Rahmen von kardiovaskulären, pulmonalen oder infektiologischen Entitäten sowie als Folge von chirurgischen Eingriffen ist eine akute Abnahme der Nierenfunktion eine häufige Komplikation.⁵ Im Hinblick auf einen steigenden demografischen Wandel der Gesellschaft verzeichnet man zudem eine Zunahme von Multimorbidität, die im klinischen Alltag eine Behandlung von schwerkranken Menschen notwendig macht. Somit steht die Behandlung der akuten Nierenschädigung häufig der Problematik von Co-Morbidität, dem Risiko von Langzeitfolgen und Mortalität gegenüber.^{6,7} In einer retrospektiven Studie an über 100.000 Patienten am Charité-Universitätsklinikum in Berlin zeigte sich in Zusammenhang mit einer akuten Nierenschädigung eine Verlängerung des Krankenhausaufenthaltes, eine erhöhte Gefahr einer langfristigen Nierenerkrankung und eine Assoziation mit dem Langzeitüberleben.⁴ Zusammengefasst bilden diese Faktoren zudem eine Belastung für das Gesundheitssystem, die sich auch in einem damit assoziierten Anstieg der Kosten darstellen lässt.⁸

Eine Prävention der Erkrankung selbst sowie ihrer Folgeerscheinungen und Komplikationen, könnte sich positiv auf die Morbidität und Mortalität der Erkrankten auswirken. Mit der Auseinandersetzung von Ursachen, Einflüssen und Pathomechanismen sollten beeinflussende Faktoren identifiziert und ein frühzeitiges Erkennen ermöglicht werden.⁹ Jedoch ist es aktuell nur unzureichend möglich anhand der festgelegten Diagnosekriterien und mit Hilfe klassischer

Nierenfunktionsmarker ein frühzeitiges Erkennen einer akuten Nierenschädigung zu gewährleisten.^{10,11} Eine von behandelnden Ärzten geforderte Evaluation und Aktualisierung der durch die Kidney Disease: Improving Global Outcome (KIDGO)¹² festgelegten Diagnosekriterien führte zur Erforschung neuer Biomarker, die neben einem hohem diagnostischen auch einen prognostischen Wert besitzen.¹³ Insofern ist es ein stetiges Ziel der aktuellen Forschung, zur Behandlung der akuten Nierenschädigung neue prognostische Marker zu ermitteln sowie Therapieansätze zu verbessern. Ein vielversprechender Biomarker ist Lcn-2, welches sensitiv eine Nierenschädigung anzeigt.¹⁴ Lcn-2 ist als Transportprotein in einer Vielzahl von biologischen Abläufen involviert und vor allem als Eisentransportprotein bekannt.¹⁵ Zellen der Immunabwehr reduzieren durch die Ausschüttung von Lcn-2 die Eisenverfügbarkeit als Abwehrstrategie gegen eindringende Erreger. Aber nicht nur bakterielle Erreger, sondern auch der menschliche Organismus ist auf Eisen angewiesen und die Eisenhomöostase unterliegt einer strengen Kontrolle. Da der Mensch keinen bekannten Mechanismus für die Ausscheidung von Eisen besitzt,¹⁶ kann ein Überschuss an Eisen dem Körper schaden. Im Rahmen von Nierenerkrankungen ist die Niere großen Mengen an Eisen einerseits durch die erhöhte Filtration von Eisen und Eisen-haltigen Proteinen und andererseits durch geschädigte glomeruläre und tubuläre Nierenzellen ausgesetzt.¹⁷ Durch den Einsatz von Eisen-Chelatoren konnte die schädigende Wirkung von redox-aktivem Eisen reduziert werden,¹⁸ sodass die Anwendung Eisen-bindender Proteine ein viel versprechender Therapieeinsatz sein könnte. Im Hinblick darauf, dass die akute Nierenschädigung ein reversibles Ereignis ist, richtet sich das Augenmerk der Wissenschaft auf die Fähigkeit des Nierengewebes sich zu regenerieren.¹⁹ Da es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine spezifische medikamentöse Therapie bei der Behandlung der akuten Nierenschädigung gibt, erfolgt sie meist symptomatisch. Eine kausale Therapie ist häufig nicht möglich, sodass mit zunehmendem Schweregrad eine invasive Nierenersatztherapie kurz- als auch langfristig notwendig ist.⁴ Unter Berücksichtigung dieser Reparaturfähigkeit könnte eine sich darauf beziehende, spezifische Therapie das Regenerationspotenzial der Niere einleiten oder unterstützen. Somit könnten schwere Verläufe verhindert und das Behandlungsergebnis verbessert werden. Bemerkenswert ist, dass Lcn-2 neben seiner Funktion als Biomarker, die Proliferation und Differenzierung von

epithelialen Zellen in der Niere²⁰ beeinflusst und dort regenerative Prozesse unterstützt.²¹ Zusammengenommen präsentieren sich das Protein Lcn-2 sowie die Eisenkonzentration des Niereneithels als maßgebliche Faktoren für das Überleben nach tubulärer Nierenschädigung, sodass die Verbindung beider Elemente eine mögliche Aussage über die Prognose als auch über das regenerative Potenzial nach akuter Nierenschädigung verspricht.

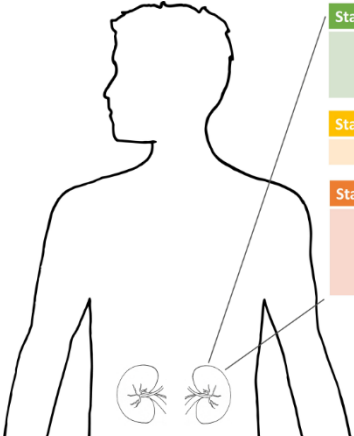
1.1 Akute Nierenschädigung

1.1.1 Definition und Klassifikation

Eine akute Nierenschädigung ist definiert als akuter Beginn einer abnehmenden bis hin zum vollständigen Verlust der Nierenfunktion, der über Tage anhält, aber grundsätzlich reversibel ist.²² Als Folge kommt es zur Retention harnpflichtiger Substanzen sowie zu Störungen im Flüssigkeit-, Elektrolyt- und Säure-Base-Haushalt. Klinisch stellt sich der Verlust der Urinausscheidung in Form einer Oligo- (Urinproduktion < 500 ml/d) bis hin zur Anurie (Urinproduktion < 100 ml/d) dar. Diagnostisch nachweisbar ist ein Anstieg der Kreatinin-Konzentration im Blutserum. Nach Definition der KDIGO muss eines der folgenden Kriterien erfüllt sein¹²:

- a) Anstieg des Serum-Kreatinins um $\geq 0,3$ mg/dl ($\geq 26,5$ μ mol/l) innerhalb von 48 Stunden
- b) Anstieg des Serum-Kreatinins auf das $\geq 1,5$ fache des Ausgangswertes innerhalb der letzten 7 Tage
- c) Urinvolumen < 0,5 ml/kg/h über 6 Stunden

Weiterhin unterscheidet die KDIGO anhand des Kreatininanstiegs, der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Urinmenge drei Stadien. Summiert ermöglichen diese Kriterien die Einschätzung des Schweregrades der akuten Nierenschädigung. Mit zunehmendem Schweregrad steigt die Sterblichkeit, sowie das Risiko einer langfristigen Nierenschädigung. Um Folgen frühzeitig zu erkennen und behandeln zu können, sind die Ursachen der Schädigung sowie individuelle Risikofaktoren zu identifizieren.²³



Stadium	Serumkreatinin	Urinausscheidung
1	Anstieg um 0,3 mg/dl (26,5 µmol/l) (innerhalb von 48 Stunden) oder 1,5- bis 1,9-facher Anstieg (innerhalb von 7 Tagen)	<0,5 ml/kgKG/h für 6-12 h
2	2- bis 2,9-facher Anstieg (innerhalb von 7 Tagen)	<0,5 ml/kgKG/h für ≥12 h
3	<ul style="list-style-type: none"> • ≥3-facher Anstieg (innerhalb von 7 Tagen) oder • Anstieg auf ≥4 mg/dl (353,6 µmol/l) oder • Beginn einer Nierenersatztherapie oder • Patienten <18 Jahre: Abfall der eGFR auf <35ml/min/1,73 m² 	<0,3 ml/kgKG/h für ≥24 h oder Anurie für ≥12 h

Abbildung 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung. Einteilung gemäß dem Anstieg der Serumkreatinin-Konzentration (mg/dl oder µmol/l) und anhand der Urinausscheidung (ml/kgKG/h) in drei Stadien; mit zunehmenden Kreatinin-Anstieg und Abnahme der Urinmenge steigt der Schweregrad der akuten Nierenschädigung.

1.1.2 Ätiologie und Pathomechanismus

Die Entstehung der akuten Nierenschädigung lässt sich grundsätzlich anhand ihrer Ätiologie und nach drei Pathomechanismen in prä-, intra- und postrenale Nierenschädigung unterscheiden.

Die prärenale Nierenschädigung ist mit 60 % die häufigste Ursache und entsteht durch eine renale Minderperfusion.²² Eine verminderte Perfusion der Niere tritt im Rahmen eines Volumenmangels auf, der durch Hypovolämie bei Blutung, Erbrechen, Durchfall oder durch eine Diuretikaehinnahme bedingt sein kann. Weitere Ursache ist ein vermindert zirkulierendes Blutvolumen bei Herzinsuffizienz, Schock oder Sepsis. Kausal führt das Perfusionsdefizit zunächst nicht zu einer direkten renal tubulären oder glomerulären Schädigung, jedoch kommt es aufgrund einer hormonellen Gegenreaktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems mit Zunahme der Natrium-regulierten Wasserrückresorption zu einer verminderten Urinausscheidung und einem Blutdruckanstieg. Dieser limitiert die Nierendurchblutung weiter und fördert sekundär eine intrarenale Nierenschädigung.

Ursächlich für eine postrenale Nierenschädigung ist eine Harnabflussstörung, welche durch Fehlbildungen oder erworbene Abflussbehinderungen im Bereich des Nierenbeckens, der Harnleiter oder der Blase verursacht werden kann. Folglich kommt es aufgrund von Harnsteinen oder Tumoren zum Harnverhalt mit Rückstauung in die Niere.

Zweithäufigste Ursache ist die intrarenale Nierenschädigung (35 % Häufigkeit), bei der es zu einer direkten Schädigung des Nierengewebes kommt.²² Ihr liegt hauptsächlich eine Tubulusnekrose zugrunde. Zusätzlich erfolgt die Abnahme der glomerulären Filtrationsrate durch einen gestörten tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus mit Vasokonstriktion des zuführenden Gefäßes, der den Pathomechanismus weiterführend unterstützt. Die Schädigung der Tubuluszellen erfolgt meist ischämisch oder medikamentös-toxisch bedingt, wodurch ein Sauerstoffmangel im Gewebe entsteht. Als medikamentös-toxische Einflüsse sind die Einnahme von Nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), die Verwendung von Kontrastmittel und die Anwendung von Chemotherapeutika zu benennen.^{22,24} Platin-haltige Chemotherapeutika gelten als Standardtherapie bei der Behandlung von soliden Tumorerkrankungen wie Ovarial-, Zervix-, Bronchial-, Hoden- und Blasen Tumoren als auch von Kopf-Hals-Tumoren.^{25,26} Cisplatin ist eines der potentesten, aber auch nebenwirkungsreichsten Derivate.²⁷ Beobachtungen zeigen, dass mit Applikation von Cisplatin eine akute Nierenschädigung in 20 % der Fälle assoziiert, sowie ein anhaltender Nierenfunktionsverlust wahrscheinlich ist.²⁸ Ferner kommt es bei wiederholter Applikation von Cisplatin zu einer Kumulation und steigender Nephrotoxizität.²⁹

1.1.3 Cisplatin-Nephrotoxizität

1.1.3.1 Allgemeine Eigenschaften von Cisplatin

Cisplatin ist eine platinhaltige, anorganische Substanz, die sich aus einem zentralen Platinatom mit jeweils zwei gebundenen Chlorid- und Ammoniakmolekülen in Cis-Konfiguration zusammensetzt.²⁶ Die Aufnahme von Cisplatin in die Zelle erfolgt nach heutigem Wissensstand sowohl über passive als auch aktive Transportmechanismen. Aufgrund eines geringen Molekulargewichts von 300.01 g/mol erfolgt sie einerseits passiv per Diffusion über die Zellmembran. Andererseits werden verschiedene Transportproteine wie der Kupfer-Transporter CTR1/2 (*engl.* cooper transporter) sowie der Kationentransporter OCT2 (*engl.* organic cation transporter) als aktiver Mechanismus zur Aufnahme in die Zelle erforscht.^{30,31} Die Expression von OCT2 an der basolateralen Membran des proximalen Tubulus erklärt die mit Cisplatin-assoziierte Nierenschädigung.³⁰

Nach Passieren der Zellmembran zeigt sich die hydrolysierte Form von Cisplatin als aktive und reaktive Substanz, die mit intrazellulären Bestandteilen interagiert.³² Durch die Hydrolyse entsteht eine positiv geladene Form des Platinkomplex, die mit der negativ geladenen DNA im Zellkern interagiert.^{31,33} Als primäre Zielstruktur von Cisplatin wurde jahrzehntelang die DNA angesehen. Dabei erklärte man die zytotoxische und antineoplastische Wirkung von Cisplatin überwiegend aufgrund dessen Eigenschaft, die DNA bei deren Zellteilung zu inhibieren.^{34,35} Das Platinatom von Cisplatin bindet an die Purinbasen der Doppelhelix und bildet als Alkylans Vernetzungen innerhalb und zwischen den DNA-Doppelsträngen. Hierbei kommt es als Folge zu DNA-Doppelstrangbrüchen, die unter anderem eine Störung der Replikation und Translation hervorrufen und somit die Zellfunktion beeinträchtigen. Die Proteinsynthese stoppt und die Zelle ist funktionsunfähig.^{34,36} Wissenschaftliche Arbeiten gaben den wegweisenden Hinweis, dass die Zytotoxizität nicht allein durch Inhibierung der DNA besteht,^{37,38} sondern zusätzlich auf Beeinflussung der Synthesewege von Proteinen und Enzymen beruht. Aktuell wird die Interaktion von Cisplatin mit Glutathion (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin, GSH), Metallothionein, mit mitochondrialen Proteinen und der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (*engl.* reaktive oxygen species, ROS) diskutiert.³⁹ Außerdem zeigte sich eine Interaktion von Cisplatin mit Bestandteilen der Zellmembran wie Phospholipiden und Phosphatidylserinen sowie des Zytoskeletts.^{40,41} In Anbetracht der Tatsache, dass Cisplatin das Tumorwachstum und die Migration hemmt, kann davon ausgegangen werden, dass die physiologische Funktion des Zytoskeletts und die damit einhergehenden Zellprozesse durch Cisplatin beeinträchtigt werden.⁴²

Verfolgt man den Metabolismus von Cisplatin, fällt nach Applikation die Plasmakonzentration und Cisplatin ist in multiplen Organen nachweisbar. Die stärkste Anreicherung ist initial in exkretorischen Organen zu beobachten. In der Niere ist die Cisplatin Konzentration anhaltend erhöht.⁴³ Somit ist die Niere von einer Cisplatin-Schädigung betroffen, da sie hohe Konzentrationen von Cisplatin in ihre Zellen aufnimmt und Ausscheidungsorgan ist. Die zelluläre Aufnahme von Cisplatin erfolgt primär von proximalen Tubuluszellen, was eine überwiegende zelluläre Schädigung im proximalen Tubulusepithel erklärt.²⁵ Bei der Elimination

von Cisplatin akkumuliert es vorrangig im Nierenkortex. Dies resultiert im Auftreten dosisabhängiger Nebenwirkungen, die bis hin zum Funktionsverlust der Niere führen können.

1.1.3.2 Pathomechanismus der Cisplatin-Nephrotoxizität

Betrachtet man die Cisplatin-Nephrotoxizität, führen unterschiedliche Pathomechanismen zum Zelluntergang tubulärer Zellen.⁴⁴ Dies beinhaltet die durch Cisplatin-induzierte Zellnekrose und Aktivierung der extrinsischen und intrinsischen Apoptose.^{25,45} Letzteres tritt ein, wenn der induzierte Zellschaden an der DNA die erforderlichen Reparaturmechanismen der Zelle übersteigt.³⁹ Zusätzlich führt die Applikation von Cisplatin zu einer Zytokin-vermittelten Immunreaktion.⁴⁵ Ihr liegt hauptsächlich eine Hochregulation des Tumornekrosefaktors- α (*engl.* tumor necrosis factor α , TNF- α) zugrunde.²⁵ Begleitend konnte die vermehrte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TGF- β (*engl.* transformin growth factor- β), MCP-1 (*engl.* monocyte chemoattractant protein-1) sowie Interleukin- (IL) 1 β und IL-6 im Nierenepithel von Cisplatin-stimulierten Tieren nachgewiesen werden.^{46,47} In der Mikroumgebung einer akuten Nierenschädigung kommt es infolge der Zytokin-Ausschüttung geschädigter epithelialer Zellen zur Einleitung einer Immunantwort.^{48,49} Durch die Schädigung des Gewebes werden Zellen der Immunabwehr, vor allem neutrophile Granulozyten, Monozyten und natürliche Killer- (NK) Zellen rekrutiert.⁵⁰ Es folgt die Aktivierung ortsansässiger mononuklearer Phagozyten sowie die Differenzierung von aus dem Blut eingewanderten Monozyten zu Makrophagen. Lokal kommt es parallel zur Einschränkung der Mikrozirkulation und zur Sauerstoffminderversorgung der Zellen. Dies bedeutet oxidativer Stress für die Zelle. Zudem führt eine Hypoxie des Gewebes zur Endothelaktivierung und zum Verlust der Gefäßpermeabilität, wodurch eine Infiltration von Immunabwehrzellen aus dem Gefäßsystem in das umliegende Gewebe ermöglicht wird.⁴⁹ Neben Zytokinen beeinflussen freiliegende Zellbestandteile (*engl.* damage-associated molecular patterns, DAMPS) sowie während der Schädigung freigesetzte ROS aus den geschädigten Nierenzellen die Mikroumgebung und mobilisieren Makrophagen.⁵¹ Hierbei erfüllen Makrophagen neben der Abwehr pathogener Erreger die Phagozytose zellulärer Bestandteile und eliminieren so apoptotische Zellen.⁵²

Dies dient zum einen dazu, Zellreste zu beseitigen und zum anderen, durch Präsentation von Zellbestandteilen als auch Fremdmaterial an Zellen der erworbenen Immunabwehr, eine Abwehrreaktion zu erzielen.⁵³ Die initiale Phase der Schädigung umfasst die ersten 24 Stunden, in denen Makrophagen das Gewebe infiltrieren und aktiviert werden.^{49,54} Auf das proinflammatorische Signal der Mikroumgebung, reagieren sie mit der Ausschüttung von Stickstoffmonoxid (NO) und proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-12.⁵¹ Dieses proinflammatorische Signal der Makrophagen fördert zunächst die bereits existierende Inflammationsreaktion und verschlechtert durch zusätzliche Schädigung des Nierengewebes die Nierenfunktion.⁵⁵

Aufgrund der dosisabhängigen Nephrotoxizität sollte der Einsatz von Cisplatin als auch anderer nephrotoxischer Substanzen streng überwacht und bei Auftreten von starken Nebenwirkungen restriktiver angewendet werden. Ein frühzeitiges Erkennen einer Niereninsuffizienz ist somit zur Überwachung von Therapieregimen unverzichtbar. Anzeigende Kriterien der einsetzenden akuten Nierenschädigung ist eine Reduktion der GFR sowie ein Anstieg der Nierenretentionsparameter. Da die GFR sowie der Kreatininwert aktuell als Richtgrößen der Diagnosesicherung dienen, ist eine genaue Betrachtung notwendig.

1.1.4 Biomarker im Rahmen der akuten Nierenschädigung

1.1.4.1 Klassische Biomarker

Die im klinischen Kontext angewendeten klassischen Marker, welche der Erfassung und Kontrolle einer Nierenschädigung dienen, sind der primär glomerulär filtrierte Metabolit Kreatinin sowie die glomeruläre Filtrationsrate. Kreatinin zählt als Basiskriterium medizinischer Klassifikationen der akuten Nierenschädigung, aktuell gemäß den Leitlinien nach KDIGO. Das Serum-Kreatinin steigt bei akuter Nierenschädigung nach ca. 48 - 72 Stunden an.¹⁰ Zu berücksichtigen gilt, dass ein Anstieg erst mit einem Funktionsverlust der Niere ab 50 % zu erwarten ist. Der Kreatininwert ist abhängig von der Muskelmasse, dem Alter sowie dem aktuellen Metabolismus, der sich nach körperlicher Arbeit oder in schwerer Krankheitssituation verändert¹ und wird somit von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Im Vergleich zu Vorwerten kann das

Serum-Kreatinin vor allem als Verlaufskontrolle nützlich sein.¹⁶ Als weiteres Kriterium zur Überprüfung der Nierenfunktion wird die geschätzte GFR verwendet, die anhand der Cockcroft-Gault- oder der MDRD-Formel (*engl.* Modification of Diet in Renal Disease) errechnet wird. Die GFR wird jeweils durch eine Gleichung, die sich auf den Serum-Kreatinin-Wert bezieht, bestimmt und beinhaltet empirische, patientenbezogene Parameter, die anhand von Querschnittsdaten aus Patientenkollektiven ermittelt wurden.⁵⁶ Kreatinin wird als Abbauprodukt des Körpers physiologisch konstant renal ausgeschieden und sein Metabolismus unterliegt nur geringfügig aktiven Prozessen, sodass die Eliminationsrate von Kreatinin annähernd der Filtrationsrate des Glomerulus entspricht.²² Die Abschätzung der GFR kann präzise mit der Kreatinin-Clearance im 24-Stunden-Urin errechnet werden,⁵⁷ wird jedoch im klinischen Alltag aufgrund von Zeitaufwand und Anfälligkeit für Fehler selten angewendet und daher mit Hilfe der beiden Formeln abgeschätzt.¹ Der Kreatinin-Wert als auch die GFR beurteilen die Funktionalität der Filtrationsfunktion der Niere, aber stellen nur indirekt einen akuten Schädigungsmarker dar. Zum einen weil der Kreatininwert erst bei einem fortgeschrittenen Zeitpunkt ansteigt und zum anderen da die Bestimmung der GFR anhand der Kreatinin-Clearance unter pathophysiologischen Bedingungen verfälscht sein kann und damit eine tatsächliche Veränderung nur unzureichend valide abbildet.^{14,56,58} Insgesamt betrachtet sind die Nachteile einer Kreatinin-orientierten Definition aufgrund dessen Limitationen vielfach diskutiert und die Suche nach anderweitigen Kriterien notwendig.

1.1.4.2 Neue Biomarker

Im klinischen Alltag stellt sich die Frage nach Biomarkern, die alternativ zu den klassischen Biomarkern frühzeitig und spezifisch eine akute Nierenschädigung aufzeigen. Um dieses Prinzip zu verfolgen, fokussierte sich die Forschung zum Beispiel auf die Quantifizierung von tubulären Proteinen, die im Rahmen der Nierenschädigung vermehrt exprimiert und mit der Urinausscheidung nachgewiesen werden können.¹⁴ Zu den in den Fokus getretenen neuen Biomarkern zählen u.a. Lcn-2, Kidney Injury molecule-1 (KIM-1) und IL-18,⁴⁹ die mit Hilfe einer Literaturrecherche zusammengestellt und das aktuelle Wissen aus Studien und Review-Artikeln als Überblick zusammengefasst wurde.^{13,14,59-61}

IL-18 ist ein Zytokin und Bestandteil der IL-1 Zytokin-Familie. Die IL-1 Zytokin-Familie steht in Zusammenhang mit der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort.⁶⁰ Demnach erfolgt die Synthese von IL-18 in unterschiedlichen Geweben einschließlich Zellen des Immunsystems wie Monozyten und Makrophagen. In der Niere ist IL-18 konstitutionell in Zellen des distalen Tubulus und im Sammelrohr exprimiert.⁶² Im Rahmen der akuten Nierenschädigung konnte eine Induktion der IL-18 Synthese in geschädigten Epithelzellen des Tubulussystem nachgewiesen werden.⁵⁹ Ferner zeigte sich ein erhöhter IL-18 Nachweis im Urin von Patienten mit manifester akuter Nierenschädigung, ausgenommen hiervon waren ursächliche Harnwegsinfekte, chronische Nierenerkrankungen und Patienten mit nephrotischem Syndrom.⁶³ Hierbei korrelierte der frühe IL-18 Nachweis im Urin mit dem Schweregrad und der Mortalität der akuten Nierenschädigung. In einer Studie an IL-18-defizienten Mäusen im Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) von Wu et al. konnte einerseits eine IL-18 assoziierte Nierenschädigung gezeigt werden, jedoch entstammte die schädigende Wirkung hauptsächlich von Zellen des Knochenmarks.⁶⁴ Somit hat IL-18 die Eigenschaft als Biomarker aber auch als Mediator des Immunsystems wirksam zu sein.⁶¹ Als Folge dessen können IL-18 Messwerte durch allgemeine Entzündungsprozesse oder Autoimmunerkrankungen beeinflusst werden, was in der Folge die Sensitivität und Spezifität von IL-18 im Rahmen der akuten Nierenschädigung in Frage stellt.^{13,60,63}

KIM-1 ist ein Membranprotein, das auf Nierenepithelgewebe nachweisbar ist und bei Schädigung vermehrt in Zellen des proximalen Tubulus exprimiert wird.⁵⁹ Es zeichnet sich durch einen schnellen Anstieg im Urin aus, der annähernd gleich zur Konzentration im Gewebe ist und sich proportional zur Nierenschädigung verhält.⁶⁵ Demzufolge ist ein erhöhter Nachweis von KIM-1 im Urin mit einem ungünstigen Langzeitergebnis im Sinne einer Dialysepflicht und Mortalität bei Behandlung von Patienten mit einer akuten Nierenschädigung assoziiert.^{13,63} Das Bemerkenswerte am KIM-1 Protein ist seine extrazelluläre Domäne, die eine Immunglobulin-ähnliche Struktur enthält und mit der Vermittlung von Phagozytose in Verbindung gebracht wird.⁶⁰ In der Funktion als Scavenger-Rezeptor auf Nieren-Epithelzellen ermöglicht KIM-1 das Erkennen und die Phagozytose von apoptotischen Zellen und verhindert einerseits die

Obstruktion des tubulären Lumens.⁶⁶ Andererseits kann sich die apikale KIM-1 Domäne abspalten, mit dem Urin ausgeschieden und nachgewiesen werden. Bei genauer Betrachtung sprechen Untersuchungen von Ichimura et al. für eine zusätzliche Wirkung von KIM-1 im Rahmen von reparativen Prozessen in tubulären Epithelien.⁶⁷ Sie konnten durch In-situ Hybridisation und immunhistochemische Untersuchungen darstellen, dass KIM-1 in proliferierendem Epithel im proximalen Tubulus nachweisbar ist und Potenzial für eine positive Beeinflussung von Zellintegrität und Regeneration aufweist. Insgesamt betrachtet zeichnet sich KIM-1 im Rahmen der Nierenschädigung als Biomarker durch seine hohe Aussagekraft aufgrund der Sensitivität und Spezifität aus.^{61,66}

Im Rahmen der aktuellen experimentellen Arbeit wurden die Eigenschaften und Funktionen von Lcn-2 aufgrund dessen vielversprechendem Potenzial in der Diagnostik und insbesondere in der Therapie der akuten Nierenschädigung im Folgenden genauer betrachtet.

1.2 Lipocalin-2 (Lcn-2)

1.2.1 Allgemeine Eigenschaften

Im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen ist Lcn-2 in Epithelzellen vermehrt exprimiert.⁶⁸ Erstmals wurde Lcn-2 von Kjeldsen et al. in spezifischen Granula aktivierter menschlicher neutrophiler Granulozyten im Jahr 1993 identifiziert.⁶⁹ Als neutrophil gelatinase assoziiertes Lipocalin (NGAL) wurde es mit der Gelatinase Matrix-Metalloproteinase (MMP)-9 verknüpft, woher ferner der Name entstammt.⁷⁰ Das aus der Maus isolierte Gen 24p3 ist homolog zu dem im menschlichen Genom exprimierten NGAL, das heute als Mitglied der Lipocalin-Familie die Bezeichnung Lipocalin-2 erhalten hat. Die Lipocalin-Superfamilie besteht aus mehr als 30 Proteinen, die sich durch ihre Vielzahl an Bindungsspezifitäten auszeichnen. Sie erfüllen die Speicherung sowie den Transport von wasserunlöslichen Stoffen wie Vitamin A oder Steroidhormonen,^{20,71} dienen als Bindungspartner im Retinol- und Pheromontransport und sind an physiologischen Abläufen wie Zellwachstum und -entwicklung beteiligt.^{72,73} Lcn-2 ist ein 25 Kilodalton (kDa) großes Protein, das sich dem Gen mit der Lokalisation 9q34.11 im menschlichen Genom

zuweisen lässt.⁷⁴ Lcn-2 zeichnet sich durch seine gewundene Tertiärstruktur mit einer röhrenförmigen Anordnung der beta-Faltblätter aus. Durch kelchförmige Aussparungen entsteht dadurch eine spezifische Bindestelle für Liganden. Die Calyx des Proteins ist hydrophob und bindet wie alle Lipocaline bevorzugt lipophile Moleküle.⁷²

Spezifische Liganden in der Lcn-2 Bindestelle sind Eisen-beladene Siderophore. Durch ihre Bindung hemmt Lcn-2 das bakterielle Wachstum.⁷⁵ Siderophore sind kleine Moleküle, die Eisen mit hoher Affinität binden.¹⁵ Ursprünglich wurden Siderophore in Bakterien identifiziert. Besonders im Rahmen von Inflammationsgeschehen und infiltrierenden Erregern ist die Verfügbarkeit von Eisen entscheidend, da die meisten Erreger wie Bakterien oder Parasiten für ihre DNA-Synthese und Zellwachstum auf Eisen angewiesen sind. Ergänzend benötigen sie Eisen zur Abwehr von ROS. Als Folge haben Bakterien und andere Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, mit denen sie Eisen mit hoher Affinität binden und aus der Umgebung aufnehmen können.⁷⁶ Die hohe Affinität des Siderophor-Eisenkomplexes ermöglicht es ihnen im Vergleich zu anderen Chelatoren, das gebundene Eisen dem Wirt zu entziehen. Lcn-2 aus Eukaryonten bildet durch seinen Siderophore-Liganden die Fähigkeit Eisen zu binden und die Menge an verfügbarem Eisen zu minimieren, sodass dem bakteriellen Wachstum kein Eisen mehr zur Verfügung steht.^{69,74} Versuche mit Lcn-2-defizienten Mäusen haben verdeutlicht, dass es durch eine verminderte Aktivität neutrophiler Granulozyten zu einer erhöhten Anfälligkeit für bakterielle Infekte kommt.⁷⁷ Als Abwehrstrategie der Niere bei Harnwegsinfekten konnte gezeigt werden, dass Zellen des Sammelrohres mit einer erhöhten Sekretion von Lcn-2 reagieren, um damit die Erregerbekämpfung zu verstärken.⁷⁸ Demzufolge stellt Lcn-2 einen Abwehrmechanismus des Körpers gegen eindringende Erreger dar und ist somit Teil der angeborenen Immunität.

1.2.2 Lcn-2 und Eisen im Rahmen einer akuten Nierenschädigung

In einer Analyse von rund 2000 Patienten aus zehn prospektiven Studien zeigten Haase et al., dass es in Fällen einer subklinischen Nierenschädigung zu einer Lcn-2 Erhöhung im Serum und im Urin, bei fehlendem Serum-Kreatinin Anstieg, kommt.⁷⁹ Bei der Schädigung von Nierentubuluszellen ist Lcn-2 im Blutserum als

auch im Urin innerhalb weniger Stunden nachweisbar.⁹ Somit erweist sich Lcn-2 als sensitiver Indikator. Betrachtet man plasmatisches Lcn-2 wird es im Glomerulus des Nierengewebes filtriert und anschließend maßgeblich im proximalen Tubulus reabsorbiert.⁹ Im Rahmen einer akuten und chronischen Niereninsuffizienz kommt es zur Hochregulation von Lcn-2 im geschädigten Nierengewebe.⁸⁰ Bei Schädigung von renalen Nierenzellen wird Lcn-2 vor allem von Tubuluszellen des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife als auch des Sammelrohres vermehrt synthetisiert und sekretiert.⁷² Ergänzend kommt es zur verminderten Absorption im proximalen Tubulus, sodass Lcn-2 über den Urin ausgeschieden wird. Lcn-2 zeichnet sich als Biomarker aus, weil es als einer der schnellsten induzierten Gene bei Auftreten einer akuten Nierenschädigung identifiziert wurde.^{14,79} Ein erhöhter Lcn-2 Nachweis im Serum sowie im Urin geht mit einem schlechten klinischen Verlauf bei hospitalisierten Patienten einher.⁸⁰ In den hierzu durchgeführten Metanalysen konnte gezeigt werden, dass ein positiver Lcn-2 Befund mit einer schwergradigen Verlaufsform der akuten Nierenschädigung assoziiert ist. Die Lcn-2 Erhöhung korrelierte dabei mit einem ungünstigen Langzeitüberleben.

Bei akuter Nierenschädigung ist neben Lcn-2 auch die Eisenkonzentration in der Niere und im Urin erhöht.¹⁷ Zusätzlich zeigen experimentelle Studien *in vitro* als auch *in vivo*, dass Eisen eine Nierenschädigung verursacht. Während eines IRI erwirkt u.a. ein fallender pH-Wert die Reduktion von Fe³⁺ und es bildet sich eine redox-aktive Form des Eisens.^{81,82} Damit einhergehend entsteht oxidativer Stress, der zu einer Zellschädigung bis hin zur Tubulusnekrose führt. Physiologisch gelangt Eisen gebunden an Transferrin oder über andere Eisen-bindende Proteine wie Albumin oder Lcn-2 über die Zirkulation zur Filtration in den Glomerulus der Niere.¹⁷ Dort filtrierte Eisen anschließend über verschiedene Mechanismen reabsorbiert.⁸³ Lcn-2-gebundenes Eisen gelangt über den Lipocalin-(24p3R) oder den Megalin Rezeptor in die Tubuluszellen und wird anschließend in den Körperkreislauf zurückgeführt.⁸⁴ Im Rahmen von Nierenerkrankungen steigt die Eisenkonzentration in der Niere durch die erhöhte Filtration von Eisen und Eisen-haltiger Proteine.¹⁷ Zudem fällt vermehrt Eisen durch geschädigte glomeruläre und tubuläre Nierenzellen an. Durch den Einsatz von Eisenchelatoren bei ischämischer Schädigung der Niere

limitierte sich die Schwere der akuten Nierenschädigung. Bei Anwendung des Eisenchelators Deferoxamin (DFO) in der postischämischen Phase der akuten Nierenschädigung zeigte sich eine Stabilisierung der Nierenretentionsparameter und ein verbessertes histologisches Erscheinungsbild der renalen Tubuluszellen.¹⁸ Untersuchungen zeigen, dass Lcn-2 seinen Siderophor-Liganden über ein weites Spektrum von pH-Werten fest bindet⁸⁰ und somit seine Eisen-bindende Funktion auch im ischämischen Milieu fortsetzen kann. Lcn-2 bietet demnach die Möglichkeit durch seine Eisenbindung als Chelator zu wirken, toxisches Eisen zu binden und somit zu reduzieren.

1.2.3 Eisenbeladung von Lcn-2 als regenerative Funktion

Lcn-2 zeigt neben der Eisenbindungskapazität als Immunabwehrmechanismus die Fähigkeit, in der körpereigenen Eisenhämostase Eisen zu transportieren und Eisen intrazellulär abzugeben.^{72,73} Interessanterweise scheint sich der daraus resultierende Effekt von Lcn-2 in Abhängigkeit seiner Eisenbeladung zu unterscheiden. Zur Differenzierung der Eisenbeladung von Lcn-2 beschreibt apo-Lcn-2 die Eisen-unbeladene Form von Lcn-2, wohingegen Eisen-gebundenes Lcn-2 als holo-Lcn-2 bezeichnet wird. Um die Wirkung von Lcn-2 an den Zielzellen zu bestimmen, untersuchte man Rezeptoren, die dessen Funktionen vermitteln. Die Funktionen von Lcn-2 werden nach heutigem Wissensstand maßgeblich über zwei Transportwege vermittelt. Einerseits über den löslichen Transportrezeptor SCL22A17, auch Lipocalin-Rezeptor genannt (24p3R, Lcn-2R).^{15,72,85} Andererseits über den low-density Lipoproteinrezeptor LRP2, der als Megalin-Rezeptor bezeichnet wird.⁸⁶ Bei der Bindung von Lcn-2 an den membranständigen Lipocalin-Rezeptor von Zielzellen konnte von Devireddy et al. eine aktivierende Kaskade der Apoptose regulierenden Proteine Bcl-2 (*engl.* B-cell lymphoma 2) und BIM (*engl.* bcl-2-interacting mediator of cell death) in Mauszellen nachgewiesen werden.⁸⁷ Die beiden Proteine der Bcl-Familie sind Regulatorproteine der Apoptose und können in apoptose-hemmende und apoptose-fördernde Proteine unterteilt werden.⁸⁸ Als Eisen-unbeladene Form von Lcn-2 kann apo-Lcn-2 nach Transfer über die Zellemembran intrazelluläres Eisen binden und dadurch das verfügbare Eisen reduzieren. Dies induziert die Expression des Proteins Bim (Abb. 2).⁸⁷ Bim wirkt als pro-apoptotischer Faktor (*Apoptose-förderndes Protein*) und leitet die

Apoptose ein. Die intrazelluläre Aufnahme von holo-Lcn-2 führte hingegen nicht zu Apoptose. Holo-Lcn-2 förderte die Speicherung des Eisens im intrazellulären Eisenspeicher und bewirkte über den anti-apoptotischen Faktor Bcl-2 ein vermehrtes Zellüberleben.⁸⁹ Somit deutet sich an, dass die Eisenbeladung von Lcn-2 ein Wegweiser für die Zellen zwischen Überleben und Zelltod ist.

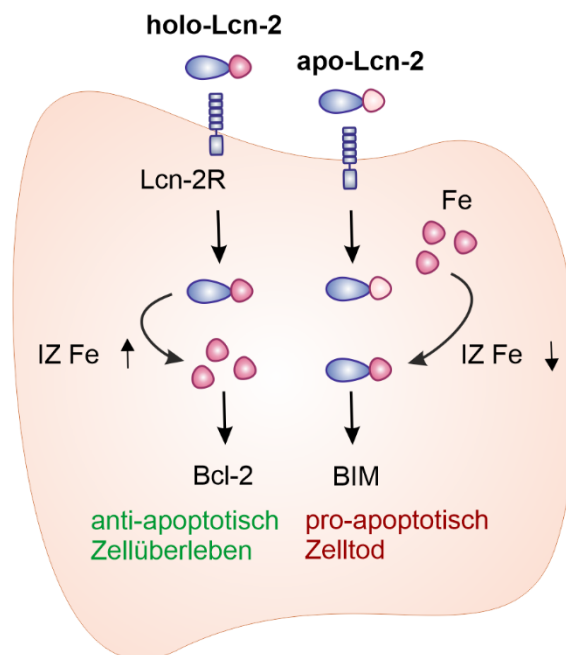


Abbildung 2: Eisenbeladung von Lcn-2 bestimmt die regenerative Funktion. Zelluläre Aufnahme von Lcn-2 über den Lipocalin-2 Rezeptor (Lcn-2R). Die Endozytose von Eisen-gebundenen Lcn-2 (holo-Lcn-2) erhöht den intrazellulären Eisengehalt (IZ Fe) und wirkt über die Induktion von Bcl-2 anti-apoptotisch. Aufnahme von Eisen-unbeladenen Lcn-2 (apo-Lcn-2) fördert über die Bindung und Reduktion von IZ Fe die Apoptose über die erhöhte Expression des Proteins BIM. Schematische Darstellung gemäß Erkenntnissen von Devireddy et al.⁸⁷ und adaptiert von Richardson et al.⁸⁹

Im Kontext einer akuten Nierenschädigung konnten, unabhängig von dessen Ätiologie, pathophysiologische Veränderungen in den proximalen Tubulusepithelzellen beobachtet werden, welche das Zytoskelett der Zellen und deren Zellpolarität verändern.⁹⁰ Der proximale Tubulus ist somit der Ort, an dem einerseits der Schaden entsteht und zudem die Ausschüttung von Biomarkern erfolgt.¹⁴ Andererseits scheint dort die Regeneration durch Reorganisation der Epithelien ihren Anfang zu finden. Diese Regenerationsprozesse finden vermutlich ihren Ursprung in einer Art „Stammzell-Nische“ der proximalen Tubulusepithelzellen.^{19,91} Hierbei ist naheliegend, dass es im Kontext von Regenerationsprozessen in der Niere zur vermehrten Expression von Proteinen kommt, die auch bei der embryonalen Entwicklung nachweisbar sind.

Am Beispiel der embryonalen Entwicklung des harnableitenden Systems konnte bewiesen werden, dass durch die Zugabe von Lcn-2 die Proliferation mesenchymaler Stammzellen zur Bildung und Ausreifung von epitheliale Gewebe führt.^{73,92,93} Ergänzend konnte gezeigt werden, dass die Epithelisierung aus dem Mesenchym deutlich durch holo-Lcn-2 im Vergleich zu apo-Lcn-2 gefördert wurde.²⁰ Diese proliferative Wirkung von Lcn-2 konnte nicht nur während der Embryonalentwicklung beobachtet werden, sondern zeigte sich auch im Kontext von Regenerationsprozessen bei Nierenschädigung. Nach induzierter Schädigung von Nierenepithelgewebe konnte in der Phase der Regeneration eine vermehrte Lcn-2 Expression sowie eine co-lokalisierte Erhöhung von Proliferationsmarkern nachgewiesen werden.⁹⁴ In Zusammenhang mit einer ischämischen Schädigung von Nieren bei Mäusen konnte Lcn-2 als anti-apoptotischer Faktor durch Reduktion apoptotischer Zellen nachgewiesen werden.⁹³ Hierfür wurde rekombinant hergestelltes Lcn-2 in einem *in vivo* IRI-Versuchsaufbau an Mäusen vor, während und nach der Ischämie-Schädigung intravenös injiziert. Im Vergleich zu Tieren, die eine Injektion mit Kochsalz-Lösung erhielten, minimierte sich das Ausmaß der tubulären Schädigung und der Anstieg des Serumkreatinins mit der Lcn-2 Applikation. Zusätzlich zeigte sich durch die exogene Lcn-2 Zufuhr eine Proliferation des Nierentubulusepithels. Auch im Kontext der Nierenschädigung zeigte sich der protektive Effekt von Lcn-2 auf die Tubuluszellen in Abhängigkeit von der Eisenbeladung.⁹⁵ Mori et al. untersuchten in einem *in vivo* IRI Versuchsaufbau an Mäusen die Eisen-abhängige Wirkung von Lcn-2, indem sie rekombinantes holo- oder apo-Lcn-2 intraperitoneal oder s.c., 15 Minuten vor Ischämie oder 1-2 Stunden nach Reperfusion injizierten und das Serumkreatinin maßen. Holo-Lcn-2 verringerte den Anstieg des Kreatinins im Vergleich zu apo-Lcn-2. Bei Erweiterung der Versuchsdurchführung fügten sie dem rekombinanten Lcn-2 Gallium hinzu, das die Eisenbindestellen blockiert und somit als Eisen-Antagonist agiert. Bei dessen Applikation war keine schützende Wirkung von Lcn-2 im IRI-Versuch zu verzeichnen, sodass der regenerative Effekt von Lcn-2 durch dessen Fähigkeit Eisen zu transportieren und abzugeben definiert ist.

1.2.4 Ursprung von Lcn-2 als Wegweiser der dualen Funktion

Aktuelle Forschungsergebnisse formen ein funktionales Repertoire von Lcn-2, das einerseits in Inflammationsgeschehen bei der Erregerabwehr aktiv ist. Andererseits präsentiert sich Lcn-2 als Treiber von Zelldifferenzierung und Regeneration in Abhängigkeit von seiner Eisenbeladung. In Zusammenhang mit vielseitigen experimentellen Arbeiten erscheint die Lcn-2 Sekretion aus der Niere nicht die hauptsächliche Lcn-2 Quelle zu sein. Ein anderer Ursprung der Lcn-2 Produktion könnte zusätzlich zur Eisenbeladung die unterschiedlichen Funktionen von Lcn-2 erklären. In Anbetracht der Erkenntnis, dass eine akute Nierenschädigung eine Systemreaktion initiiert, erklärt dies die Hochregulation der Lcn-2 Synthese auch in anderen Organen.⁹⁶ Im Rahmen einer Sepsis-induzierten Nierenschädigung konnte in einem *in vivo* CLP (*engl.*: cecal ligation and puncture) - Mausmodell ein Zusammenhang zwischen der Lcn-2 Quelle und der unterschiedlichen Funktion von Lcn-2 dargestellt werden.⁹⁷ Während die Lcn-2 Konzentration in der Akutphase der Nierenschädigung (nach 24 Stunden) in Überständen von Nierentubulusepithelzellen erhöht war und sich assoziiert mit einem Anstieg von Kreatinin zeigte, konnte das Lcn-2 Protein in Überständen Gewebe-residenter Makrophagen der Niere nach 48 Stunden erhöht nachgewiesen werden und korrelierte mit der Nierenregeneration. Lcn-2 aus diesen Gewebe-residenten Makrophagen der Niere unterschied sich zudem in seiner Eisenbeladung, indem es in der regenerativen Phase als holo-Lcn-2 vorlag und somit die Bedeutung von Makrophagen und vor allem von Eisen-beladenem Lcn-2 aus Makrophagen in der akuten Nierenschädigung hervorhebt. Unter Berücksichtigung der zentralen Rolle von Makrophagen im Eisenmetabolismus wirft das bisherige Wissen nicht nur die Frage nach dem Zusammenspiel zwischen Makrophagen, Lcn-2 und Eisen auf, sondern vor allem auch die Zusammenhänge dieser Akteure im Rahmen von Regenerationsprozessen bei der akuten Nierenschädigung.

1.3 Makrophagen

1.3.1 Makrophagen in der Niere

Makrophagen als Immunzellen des Retikulozytären Systems (RHS) differenzieren sich aus der hämatopoetischen Stammzelle aus dem Knochenmark über Monozyten zu ausgereiften Makrophagen.⁹⁸ Als Teil des RHS agieren residente Makrophagen in Form von Kupffer-Stern Zellen in der Leber, Alveolarmakrophagen in der Lunge oder Langerhans Zellen in der Haut als Immunantwort auf pathogene Erreger. Neben ihrer Funktion als Teil der Immunabwehr übernehmen Makrophagen wichtige Aufgaben wie die Limitation von Inflammationsreaktionen, sie leiten Regenerationsprozesse ein und beeinflussen die Wundheilung. Makrophagen sind somit involviert im Rahmen von Erkrankung aber auch der Instandhaltung der körpereigenen Homöostase.^{99,100}

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf einer akuten Nierenschädigung, bilden Makrophagen als Teil des angeborenen Immunsystems einen initialen Akteur und Mediator.^{48,101} Die Mikroumgebung eines geschädigten Nierengewebes zeichnet sich durch ein inflammatorisches Milieu aus, woraufhin es zur Zytokinvermittelten Einwanderung von Immunzellen kommt und infiltrierende Monozyten sich zu Makrophagen differenzieren.^{48,49} Zirkulierende, aus dem Knochenmark stammende Monozyten zeichnen sich durch ihre hohe zelluläre Plastizität aus.¹⁰² Aufgrund der Entzündungsreaktion im Rahmen der akuten Nierenschädigung, verlassen Monozyten die Blutbahn, wandern über Chemokinrezeptoren in das Gewebe ein und differenzieren sich dort zu Makrophagen.^{49,103,104} Entsprechend der inflammatorischen Mikroumgebung erfolgt die Polarisierung zu klassisch aktivierten, pro-inflammatorischen Makrophagen. Dies konnte einerseits durch nicht-aktivierte Zellen im pro-inflammatorischen Milieu¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ als auch durch den adaptiven Transfer von Interferon-gamma (IFN- γ)- aktivierten Makrophagen bestätigt werden.⁵⁵ Neben der Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen entstehen ROS und es kommt zur Freisetzung von DAMPs aus geschädigten Tubuluszellen in das Schädigungsgebiet, die eine Aktivierung und Polarisierung von pro-inflammatorischen Makrophagen unterstützen.^{51,104} In diesem Zusammenhang konnte in einer *in vitro* Untersuchung an Mäusen eine

Hochregulation von IL-1 β in Makrophagen nach Kontakt mit DAMPs aus der geschädigten Niere nach IRI induziert werden, die über Toll-like-Rezeptoren (TLR) vermittelt wurde¹⁰⁸ und Kennzeichen eines pro-inflammatorischen Makrophagen Phänotyps darstellt.^{50,109,110} Dass die Makrophagen-Infiltration den Verlauf der akuten Nierenschädigung von Beginn an bestimmt, konnte in Versuchen verdeutlicht werden, in denen das Fehlen von Makrophagen zu Beginn der akuten Nierenschädigung die Nierenfunktion schützte. Durch die Zugabe von pro-inflammatorisch geprägten Makrophagen konnte anschließend das zu erwartende Bild der akuten Nierenschädigung wiederhergestellt werden.¹⁰⁴ Diese pro-inflammatorischen Makrophagen unterstützen zunächst die Entzündungsreaktion des Gewebes durch die eigene Produktion von Zytokinen, ROS und NO und es resultiert eine zunehmende Nierenschädigung, die mit Anzahl der Makrophagen steigt.^{55,106} Dies spiegelt sich in einem zunehmenden Anstieg des Serumkreatinins und dem Verlust der glomerulären Filtrationsrate wider.¹¹¹ Zudem interagieren Zellen des Nierengewebes mit den eingewanderten Makrophagen, wodurch der Aktivierungsstatus und die Polarisierung der Makrophagen aufrechterhalten und das Ausmaß der Entzündungsreaktion durch Signale von Gewebe und Makrophagen verstärkt und sich auf das Fortschreiten der Schädigung auswirkt.¹⁰⁴ Durch eine verstärkte Aktivität der Immunzellen, die durch Freisetzung destruktiver Stoffe wie ROS, MMP oder pro-apoptischer Zytokine mitbestimmt ist, wird die Mikroumgebung als Folge mitgeschädigt.¹¹² In diesem Zusammenhang bedarf es somit einerseits einer notwendigen Aktivität der Makrophagen zur Immunabwehr und Entfernung von apoptotischen Zellen.¹⁰⁴ Andererseits ist eine Umkehr in ein anti-inflammatorisches Milieu zwingend notwendig, um die Regeneration einzuleiten und eine anhaltende und überschießende Aktivität pro-inflammatorischer Makrophagen zu verhindern.

Ebenso wie die Abwesenheit von Makrophagen in der Akutphase der Nierenschädigung deren Bedeutung unterstreichen konnte, zeigte das Fehlen von Makrophagen in der Reparaturphase eine verminderte Regenerationsfähigkeit des Gewebes und verdeutlicht somit den Stellenwert von Makrophagen bei der Nierenregeneration.⁵¹ Lee et al. konnten in einer *in vitro* Untersuchung an Mäusen zeigen, dass es im späteren Verlauf der

Nierenschädigung nach IRI zu einer Anpassung des Makrophagen-Phänotyps kommt, der durch seine pro-regenerative Aktivität eine tubuläre Zellproliferation förderte.¹¹¹ Ergänzende Untersuchungen konnten eine durch Makrophagen-vermittelte Regeneration geschädigter Nierenzellen und die positive Beeinflussung eines IRI in Mausnieren bestätigen.^{21,107,113-115} Eine Interaktion zwischen Nierengewebe und Makrophagen scheint bestimmend für den Übergang von Inflammation zu Regeneration in der akuten Nierenschädigung zu sein. Hierbei werden als beeinflussende Faktoren das Zytokin-Profil der Mikroumgebung, die Produktion von Makrophagen-spezifischen Wachstumsfaktoren (M-CSF und GM-CSF) durch das Tubulusepithel oder das Makrophagen spezifische Apoptose-Inhibitor-Protein (*engl.* apoptosis-inhibitor of macrophage Protein, AIM) diskutiert.^{51,107,116} AIM ist ein von Makrophagen sekretiertes Protein, das mit der Regeneration des tubulären Nierengewebes in Verbindung gebracht wurde. In einer *in vitro* Untersuchung des IRI an Mäusen konnte gezeigt werden, dass AIM sich an apoptotischen Zellen und Zelltrümmern im Lumen des proximalen Tubulussystems anreichert und mit KIM-1 interagiert.¹¹⁷ Diese Bindung verstärkte die Phagozyten-Funktion von KIM-1, wodurch Zelltrümmer effektiver beseitigt und eine verstärkte Regeneration beobachtet werden konnte. Pro-regenerative Makrophagen wirken im Rahmen der akuten Nierenschädigung über ihre Fähigkeit der Phagozytose, durch die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen sowie von Wachstumsfaktoren, die eine Proliferation der umliegenden Zellen induziert.^{48,110} Hierbei erwirken pro-regenerative Makrophagen selbst durch die Phagozytose von apoptotischen und beschädigten Zellbestandteilen die Einleitung ihrer regenerativen Wirkung.^{112,118}

Im zeitlichen Verlauf der akuten Nierenschädigung spiegelt sich somit ein funktionales Spektrum der Makrophagen-Aktivität und demzufolge ihrer Wirksamkeit wider. In Form ihrer Gestalt, der als Phänotyp bezeichnet wird, vermitteln Makrophagen ihre Wirkungen und Aufgaben, die es im Folgenden genauer zu betrachten gilt.

1.3.2 Makrophagen-Phänotypen

Makrophagen zeichnen sich durch ihre funktionale Vielfalt aus. Mithilfe ihrer Heterogenität können sie ihren Phänotyp verändern und auf Signale und Einflüsse der Umgebung reagieren. Stark vereinfacht werden Makrophagen in zwei Gruppen eingeteilt, den klassisch und den alternativ aktivierten Makrophagen-Phänotyp.⁹⁹ Mit Hilfe von Mosser et al. konnte ein Model der Makrophagen Klassifikation etabliert werden, indem deren Funktionalität als Kriterium integriert wurde.⁵⁰ Man unterscheidet primär zwischen drei funktionalen Gruppen, in denen Makrophagen im Sinne der (a) Immunabwehr, (b) Wundheilung und (c) Immunregulation agieren. Überschneidende und geteilte Charakterausprägungen zwischen den Gruppen sind dabei integriert. Dies erlaubt eine Vielzahl an unterschiedlichen Phänotypen und ermöglicht ein funktionales Makrophagen-Spektrum. Weiterführend erfolgt die vereinfachte Zuteilung und Erläuterung der Unterscheidungsmerkmale in klassische und alternative Makrophagen.

Die Aktivierung von klassischen Makrophagen erfolgt durch Freisetzung von IFN- γ aus NK- oder T-Helferzellen, dem Kontakt mit Lipopolysacchariden (LPS) oder durch die Aktivierung von TLR.^{50,52,119} Funktionell ordnet man sie der Immunabwehr zu, in dessen Funktion ihre Aktivierung zu einer verstärkten antimikrobiellen Wirksamkeit durch die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, NO, ROS sowie der Induktion der adaptiven Immunabwehr führt.¹²⁰ Klassische Makrophagen werden demnach im Infektionsgeschehen oder bei einer akuten Zellschädigung aktiviert und beseitigen durch eine initiale und schnelle Immunantwort Pathogene. Durch pro-inflammatorische Zytokine kommt es zu einer intensivierten Immunreaktion sowie zur Aktivierung der adaptiven Immunabwehr durch die Induktion von Haupthistokompatibilitätskomplex II (*engl.* major histocompatibility complex, MHC II).¹²¹

Alternativ aktivierte Makrophagen zählen zu Makrophagen der Wundheilung, die u.a. durch IL-4, IL-10 und IL-13 aktiviert werden und sich in ihrer Funktion durch Limitation von Inflammationsgeschehen und Einleitung von Zellerneuerung auszeichnen.^{50,109,122} Ihr Zytokinprofil umfasst TGF- β und IL-10 sowie Chemokine, die eine Immunregulation als auch Regenerationsprozesse einleiten.¹²⁰ Um die Regeneration einzuleiten, bedarf es zunächst der Resolution

der Inflammation, die durch verminderte Produktion proinflammatorischer und vermehrter Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 erfolgt. Zur Beseitigung von apoptotischem Zell- oder Fremdmaterial kommt es zur vermehrten Expression phagozytärer Rezeptoren wie Scavenger-Rezeptoren¹²³ und der Steigerung ihres endozytotischen Leistungsvermögens.¹¹⁸ Im Rahmen der Zellregeneration fördern alternative Makrophagen die Bildung der extrazellulären Matrix und Wachstumsfaktoren, die beispielsweise die Angiogenese durch Bildung von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) unterstützen.^{120,124} Diese Funktion wurde im Rahmen der Wundheilung vielfach beschrieben.¹²⁵

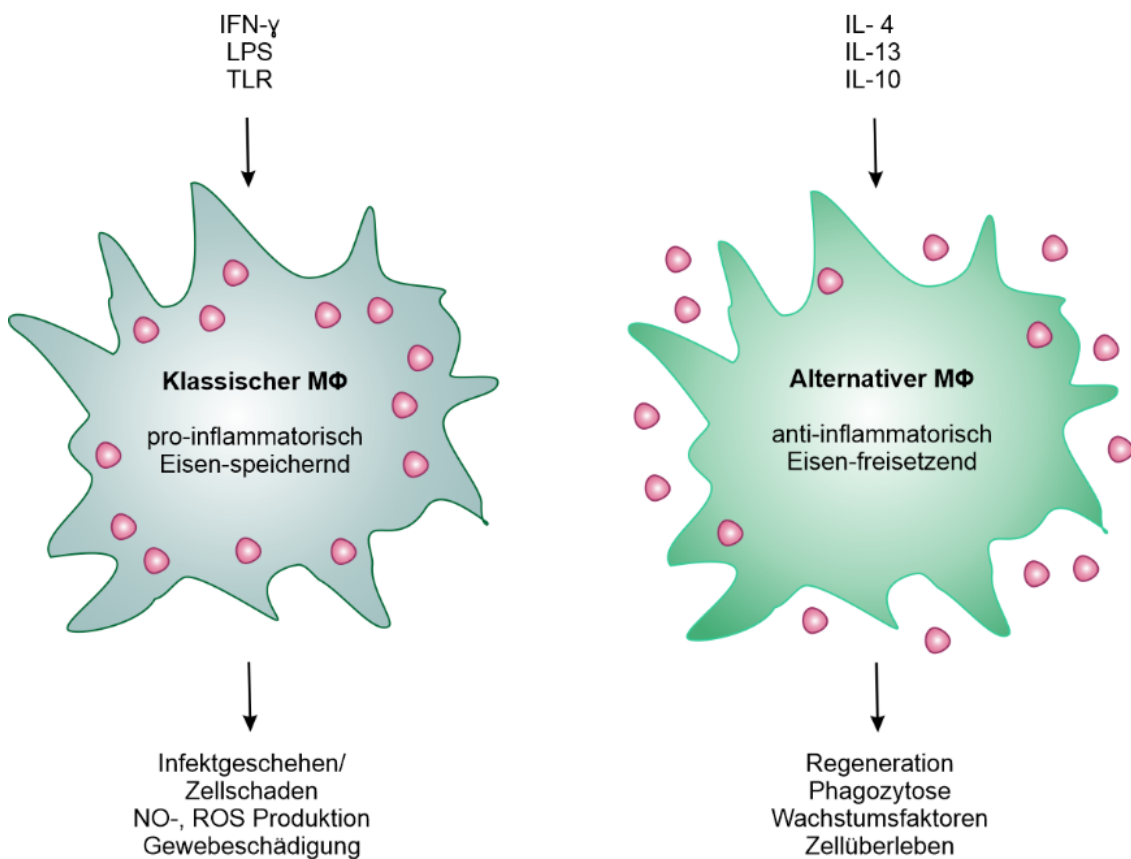


Abbildung 3: Einteilung des Makrophagen Phänotyps gemäß klassischer oder alternativer Aktivierung. Aktivierung von klassischen Makrophagen durch IFN, LPS oder via TLR im Infektgeschehen oder bei Zellschädigung. Über die schnelle Reaktion im Rahmen der Immunabwehr (NO-/ ROS Produktion) eliminieren sie Pathogene aber schädigen gleichzeitig durch die pro-inflammatorische Reaktion das umliegende Gewebe. Alternativ aktivierte Makrophagen zeichnen sich im Rahmen der Regeneration durch Limitation der Inflammation und Einleitung der Zellerneuerung aus. Nach der Aktivierung durch u.a. Botenstoffe wie IL-4, IL-13 und IL-10 induzieren sie das Zellüberleben durch proliferative Prozesse. Hierbei ist der jeweilige Makrophagen Phänotyp mit der Funktion von Makrophagen in der Eisen-Homöostase verknüpft. Übernommen und modifiziert aus Jung et al.¹²¹

1.3.3 Makrophagen und Eisen

Ein Merkmal von Makrophagen ist ihre zentrale Rolle als Regulator der Eisenhämostase. Das Gleichgewicht im Eisenhaushalt obliegt einer strengen Kontrolle, da Eisen für eine Vielzahl an Funktionen essenziell ist, jedoch ein Überschuss die Entstehung von ROS und Zellschädigung begünstigt.⁷⁶ Neben der DNA-Synthese und den Stoffwechselprozessen ist Eisen für die Hämatopoese und den Sauerstofftransport wichtig.¹²⁶ Als essenzielles Spurenelement erfolgt die Eisenaufnahme über den Dünndarm mit ca. 1 - 2 mg pro Tag.¹²⁷ Im Verhältnis zum Gesamteisen von 20 - 25 mg, das im Körper pro Tag zirkuliert, erfüllt das absorbierte Eisen der Enterozyten nur einen geringen Anteil des notwendigen Eisenbedarfs.¹²⁸ Der überwiegende Anteil des Gesamtkörpereisens (70 Prozent) befindet sich in gebundener Form im Hämoglobin zirkulierender Erythrozyten.^{128,129} In Erythrozyten dient der Hämoglobin-Eisen-Komplex zum Transport von Sauerstoff und der Weitergabe an Zielzellen, die es für ihren Energiestoffwechsel benötigen.¹³⁰ Betrachtet man den Eisenstoffwechsel als einen Kreislauf, wird der Eisenbedarf aus bereits vorhandenen und umverteilten Eisen gedeckt, das hauptsächlich aus dem Abbau alter oder geschädigter Erythrozyten durch Makrophagen in der Milz entsteht.¹³¹ Mit der Fähigkeit zur Phagozytose können Makrophagen Erreger, apoptotische Zellen und Zelltrümmer beseitigen. Die Besonderheit gilt der Phagozytose von Erythrozyten, die als Erythrophagozytose bezeichnet wird. Über die Aufnahme und den Abbau untauglicher Erythrozyten gewähren Makrophagen die Homoöostase im Erythrozytenhaushalt, aber vor allem stellen sie Eisen durch das Recyclen aus Hämoglobin dem Blutkreislauf wieder zur Verfügung.¹³² Dadurch übernehmen Makrophagen bei der Umverteilung und Bereitstellung von Eisen eine zentrale und wichtige Aufgabe. Um diese Funktion zu erfüllen, besitzen Makrophagen eine Vielzahl an regulierenden Genen und Proteinen, durch die sie zum einen Eisen aufnehmen und speichern und zum anderen bei Bedarf mobilisieren und exportieren können.

Bei der Phagozytose von Erythrozyten in der Milz, nehmen Makrophagen das Häm-gebundene Eisen auf. Anschließend können sie es intrazellulär in einem labilen Eisenpool (*engl.* labil intracellular iron pool, LIP) oder gebunden an Ferritin speichern.^{121,133} Die Speicherung von Ferritin-gebundenem Eisen erfolgt, wenn

die Eisenkonzentration hoch ist und somit die Verfügbarkeit den Eisenbedarf übersteigt.^{132,134} Durch die Ferritin-gekoppelte Eisenspeicherung wird ein Überschuss an Eisen reduziert, um die Zelle vor dessen Toxizität zu schützen und ermöglicht zudem die Eisenfreisetzung unter Eisenmangel.^{127,135} Der LIP ist ein Speicher an kurzfristig verfügbaren Eisenvorkommen.¹²¹ Die Eisenkonzentration im LIP entspricht dem aktuellen freien Eisenbedarf und ist abhängig von der Eisenaufnahme, der Ferritin-gebundenen Eisenmenge sowie vom Eisenexport.^{104,127} Die Speicherung von Eisen in Makrophagen dient vor allem der Bindung von Eisen bei hoher Eisenverfügbarkeit und zur Reduktion von freiem Eisen. Dem Gegenüber ist die Eisenfreisetzung über den Ferroportin-vermittelten Export eine wichtige Voraussetzung in Makrophagen, um Eisen für den Organismus bereitzustellen. Ferroportin ist das einzige Protein, das für den Eisenexport bekannt ist. Die Ferroportin-Expression ist in Makrophagen stark hoch reguliert, da unter physiologischen Bedingungen Eisen in Makrophagen nur kurzzeitig verweilt und vornehmlich exportiert wird.¹³² Seine Regulation ist demzufolge bedeutend für die Eisenfreisetzung aus Makrophagen.¹³¹ Ein wichtiger Regulator von Ferroportin ist das von der Leber gebildete Protein Heparin.¹³⁶ Mit Blick auf den systemischen Eisenhaushalt wird die Heparin-Expression durch die Plasmakonzentration von Eisen als auch durch das Gesamteisen reguliert.¹⁰⁴ Infolge hohen Eisenvorkommens wird Heparin induziert, bindet an Ferroportin und führt über dessen Internalisation und Abbau zur verringerten Eisenabgabe in den Blutkreislauf.¹³² Folglich kann Heparin und seine Wirkweise als Feedback-Mechanismus in Rahmen des Eisen-Recyclings von Makrophagen und der enteralen Absorption im Dünndarm gewertet werden.¹³² Nach dem Eisenefflux aus Makrophagen über Ferroportin, wird Eisen an das im Blutkreislauf frei zirkulierende Protein Transferrin gebunden.¹³⁵ Über Transferrin gelangt Eisen zu den Zielzellen, wo es für die DNA-Synthese, die Zellfunktion und den Zellstoffwechsel aber vor allem für die Hämatopoese im Knochenmark wiederverwendet wird.^{131,132,134,136,137} Alternativ zur Erythrophagozytose besitzen Makrophagen verschiedene Wege, über die sie Eisen aufnehmen können.¹³⁷ Aus dem zirkulierenden Blut nehmen Makrophagen maßgeblich Transferrin-gebundenes Eisen über den Transferrin-Rezeptor (TfR) auf.^{121,136} Ergänzend können sie freies Eisen in Form von Nicht-Transferrin-gebundenem Eisen (NTBI) über den divalenten Metallionentransporter (DMT-1)

aufnehmen.¹²¹ Makrophagen verfügen ebenso über den Lcn-2-Rezeptor (24p3R), über den sie alternativ zu Transferrin Lcn-2-gebundenes Eisen aufnehmen können.¹³⁷ Betrachtet man das Eisengleichgewicht auf zellulärer Ebene, unterliegt die Kontrolle über die Aufrechterhaltung des zytosolischen Eisenspiegels den Eisen-regulierenden Proteinen (*engl.* iron regulatory proteins, IRPs).^{131,138} Auf mRNA Ebene binden IRPs an spezifische Abschnitte, den Eisen-reagierenden Elementen (*engl.* iron response Elements, IREs). Hierdurch wird abhängig von einem Eisenmangel oder -überschuss u.a. die Synthese von Ferritin, Ferroportin und dem Transferrin-Rezeptor reguliert.^{17,132,138} Folglich kann entsprechend der Eisenkonzentration und des Eisenbedarfs mittels Speicherung oder Bereitstellung reagiert werden.

Als Bestandteil ihrer funktionellen Vielfalt haben Makrophagen Phänotypen ausgebildet, die sich je nach Gestalt der Umgebung anpassen und reagieren. Wenn man berücksichtigt, dass Makrophagen einen Schlüsselpunkt in der Verwertung und Bereitstellung von Eisen darstellen, ist es naheliegend, dass sich ihre Aufgaben und Eigenschaften in der Eisen-Homöostase mit Eisen-Phänotypen verknüpfen lassen.¹⁰⁴ Dies spiegelt sich einerseits in der intra- als auch extrazellulären Verfügbarkeit von Eisen in der Mikroumgebung und andererseits im Eisengenprofil und somit der Eisen-Disponibilität der Makrophagen wider. Demzufolge unterscheiden sich pro-inflammatorische und anti-inflammatorische Makrophagen in ihrem Verhalten Eisen aufzunehmen, zu speichern und freizusetzen. Klassisch aktivierte, pro-inflammatorische Makrophagen zeichnen sich durch ihre Eisen-bindende und -speichernde Funktion aus. Durch die Speicherung von Eisen im retikulozytären System steht eindringenden Erregern weniger freies Eisen zur Verfügung und der Körper verhindert somit indirekt deren Wachstum.¹³⁹ Alternativ aktivierte, anti-inflammatorische Makrophagen bilden einen Eisen-freisetzenden Phänotyp aus, der sich durch das Recyclen und den Export von Eisen an die Mikroumgebung auszeichnet.^{132,140} Das freigesetzte Eisen unterstützt die DNA-Synthese in den Zielzellen und wirkt proliferativ nicht nur auf Epithelzellen, sondern auch auf Fibroblasten und andere Zellen in der Mikroumgebung.^{120,121,141}

Spannenderweise zeigen Studien, dass Eisen die Lcn-2 Regulation beeinflussen kann¹⁴² und der Eisengehalt Auswirkungen auf die Lcn-2 Synthese in Makrophagen hat.²¹ In der experimentellen Arbeit unserer Forschungsgruppe wurden Makrophagen über entnommene Stammzellen aus dem Knochenmark von Mäusen und Ratten (*engl.* bone marrow derived macrophages, BMDM) generiert. Die Transduktion von IL-10 in Makrophagen aus Ratten führte zu einem Anstieg ihres intrazellulären Eisengehaltes. Unter Induktion eines Sauerstoffmangels in Nierenepithelzellen und Behandlung mit dem Überstand stimulierter Makrophagen, zeigte sich das Vorhandensein von Eisen als protektiv. Dies trat nach Behandlung der Makrophagen mit IL-10 als auch mit Eisen ein. Entfernte man den Eisengehalt durch einen Eisenchelator reduzierte sich dieser Effekt. Bemerkenswert ist, dass ebenfalls eine Induktion der Lcn-2-Expression in Makrophagen beobachtet werden konnte. Wie wir bereits wissen, ist die Funktion von Lcn-2 abhängig von seiner Eisenbeladung, sodass der Zusammenhang von intrazellulärem Eisengehalt und Lcn-2 Expression schlüssig erscheint. Die Verfügbarkeit von Eisen wirkt verstärkend auf die Zytokin-Zusammensetzung und die Funktion der Makrophagen in Form des Makrophagen Phänotyps.^{120,139} Demzufolge ist die Polarisierung von Makrophagen hinsichtlich ihres Umgangs mit Eisen mit ihrem Phänotyp eng gekoppelt.¹²¹ Makrophagen bilden als Teil des Immunsystems sowie als zentraler Koordinator der Eisenhomöostase einen wichtigen Knotenpunkt zwischen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen.¹³² In Erinnerung an den protektiven Einfluss und proliferative Wirkung von holo-Lcn-2, richtet sich der Fokus des gesammelten Wissens auf die Wirkweise pro-regenerativer, Eisen-freisetzender Makrophagen und inwieweit Lcn-2 aus Makrophagen diese Funktion vermittelt.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Die akute Nierenschädigung stellt sich klinisch der Herausforderung, durch unzureichend sensitive und spezifische Biomarker nicht frühzeitig erkannt zu werden. Die Möglichkeit, eine Reversibilität und Protektion der akuten Nierenschädigung zu ermöglichen, lässt das Augenmerk der experimentellen Forschung auf mögliche regenerative Einflussfaktoren richten. Makrophagen präsentieren sich in einer funktionalen Vielfalt und agieren als aktivierte Makrophagen-Phänotypen im Akutgeschehen. Angesichts der wichtigen Aufgaben von Makrophagen in der Eisenhomöostase und des erhöhten Eisenbedarfs proliferierender Zellen ist die wechselseitige Beziehung zwischen Makrophagen und Eisen ebenso wie der Zusammenhang beider für die Regenerationsfähigkeit der Niere unzureichend verstanden. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Rolle von Makrophagen als Eisenquelle sowie Lcn-2 als wesentliches Eisentransportprotein zu verknüpfen und zu untersuchen. Dabei galt es zu verstehen, wie Makrophagen durch die Eisen-sequestrierende Funktion von Lcn-2 die Regeneration geschädigter Nierentubulusepithelzellen fördern. Aus dem bisherigen Wissen kann vermutet werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der protektiven Wirkung von Lcn-2 und pro-regenerativen Makrophagen bei akuter Nierenschädigung gibt. Vor allem unter der Beobachtung, dass beide Akteure Einfluss auf das verfügbare Eisen in der Mikroumgebung nehmen. Um diesen Zusammenhang im Rahmen einer Nierenschädigung mit Cisplatin zu untersuchen, wurde zunächst ein Cisplatin-induziertes Schädigungsmodell mit primären murinen Tubulusepithelzellen *in vitro* etabliert. Durch die Zugabe von konditioniertem Medium von primären Wildtyp- und Lcn-2^{-/-} Makrophagen, sowie der Stimulation mit rekombinanten, Eisen-beladenen Lcn-2 wurde die Rolle von Eisen und Lcn-2 als Eisen-transportierendes Protein bezüglich der Induktion der Regeneration geschädigter Tubulusepithelzellen untersucht. Ergänzende Untersuchungen sowohl des Makrophagen-Eisen-Phänotyps als auch von Lcn-2 als alternativer Eisentransporter unter pathophysiologischen Bedingungen, könnte zu einem tieferen Verständnis von Eisen-beladenem Lcn-2 und seiner pro-regenerativen Funktion im Verlauf der akuten Nierenschädigung beitragen, um hierdurch den Weg für innovative Therapieansätze zu ebneten.

2 Material

2.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Hersteller
Absorptionsplatten-Lesegerät ELx808	Bio-TEC Instr. Inc. (Bad Friedrichshall)
Apollo-1 LB 911 Photometer	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Analysewaage	Mettler (Gießen)
Autoklav HV 85	bPW (Süßen)
B 250 Sonifier Ultraschall-Zelldisruptor/ -Homogenisator	Branson Ultrasonics (Danbury, USA)
BioSpectrometer kinetic	Eppendorf AG (Hamburg)
Brutschrank (BB 6060)	Heraeus (Hanau)
CASY Zellzählung	Schärfe System (Reutlingen)
CFXConnect TM Real-Time PCR	Bio-Rad Laboratories (München)
CombiMag RCH Magnetrührer	IKA Labortechnik (Staufen)
Combitips	Eppendorf (Hamburg)
Feinwaage	Sartorius (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop BZ9000	Keyence (Neu-Isenburg)
Hera Cell 240 (Inkubator)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
IKA T25 digital ULTRA TURRAX	IKA-Werke (Staufen)
LabLine Schüttelmaschine	Uniequib (Martinsried)
LSRII/Fortessa	BD Biosciences (Heidelberg)
Mastercycler pro S	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop Axioskop 40	Zeiss (Göttingen)

Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss (Göttingen)
Mikroskop LSM 800	Zeiss (Wetzlar)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories (München)
NanoDrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
Neubauer Zählkammer	Labor Optik (Friedrichsdorf)
Odyssey Infrarot Imaging-System	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
PinAAcleTM 900 T Atomabsorptionsspektrometer	PerkinElmer (Waltham, USA)
pH Meter	Schott AG (Mainz)
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
PowerPac Netzanschlussgerät	Bio-Rad Laboratories (München)
Purelab Plus Wassersystem	ELGA Labwater (Celle)
Pyrocatechol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Roller Mixer SRT1	Bibby Scientific (Staffordshire, UK)
Sterilbank (Lamin Air HB 2448)	Haraeus (Hanau)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermocycler AB7300	ABI (Darmstadt)
Thermocycler Primus	MWG-Biotech (Ebersberg)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories (München)
UV-1800 Spektrophotometer	Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan)
UV High Precision Zellküvette	Hellma (Müllheim)
Vortex (V-530)	JASCO Labortechnik (Groß-Umstadt)
Wasserbad SW-20C	JULABO (Seelbach)

xCELLigence RTCA DP Analyzer	Roche (Mannheim)
Zentrifuge 5415 R und 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge Mikro22R	Hettich (Tuttlingen)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten	Millipore (Schwalbach)
Zellkulturschalen	Sarstedt (Nümbrecht)
Kammerobjektträger	Nunc (Langenselbold)
Deckgläschen	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Filter (70 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
Filter (40, 70, 100 µm)	Millipore (Schwalbach)
ELISA 96 Lochplatte	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Eppendorf Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
FACS Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Falcons (15, 50 ml) Zentrifugenröhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Filcons-Filter (70 µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
Filterspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Immobilon-FL PVDF Membran	Millipore (Schwalbach)
Latexhandschuhe	B. Braun (Melsungen)

Nadeln (21, 26 gauge)	Dispomed (Gelnhausen)
PCR 96 Lochplatte	Bio-Rad Laboratories (München)
PCR Röhrchen	Starlab (Hamburg)
Petrischalen	Greiner (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg) und Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (Combitips)	WS Laborservice (Langenorla)
Skalpell	Feather (Osaka, Japan)
Spritzen (2, 5, 10, 20 ml)	Braun (Melsungen)
TALON 2-ml Schwerkraftsäulen	Clontech (Mountain View, USA)
Whatman Filter	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
xCELLigence E-Platten	Roche (Mannheim)
xCELLigence CIM-Platten	Roche (Mannheim)
Zellkulturflaschen	Greiner (Frickenhausen)
Zellscharber	Greiner (Frickenhausen)

2.3 Chemikalien und Kits

Tabelle 3: Chemikalien und Kits

Chemikalien und Kits	Hersteller
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma (Hamburg)
α -Globulin	Grifols (Langen)
Aceton	Fischer (Saarbrücken)
40 % Acrylamid/ Bis-acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)

Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau-Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth (Karlsruhe)
Cisplatin Teva	TEVA Generics GmbH (Ulm)
Collagenase Typ1	Worthington (Lakewood, USA)
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH (Basel, Schweiz)
Detoxi-Gel Endotoxin Säule	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	AppliChem (Darmstadt)
Dynabeads Protein G	Life Technologies (Darmstadt)
Eisen(III)-chloride Hexahydrat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Essigsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol	Applichem (Darmstadt)
HEPES	Sigma-Aldrich (Steinheim)
H2SO4	Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Interleukin-10	Pepto-Tech (Rocky Hill, USA)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Merck (Darmstadt)
Eisen-Standard für AAS Eisen 1000 mg/L Eisen in 2% HNO3	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)

Lysozyme	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Maxima First Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol	J.T. Baker (Griesheim)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Natriumdeoxycholat	AppliChem (Darmstadt)
Mowiol	Sigma (Hamburg)
PeqGold RNA Pure	PeqLab Biotechnologie (Erlangen)
Paraformaldehyde (PFA)	Merck (Darmstadt)
Phalloidin	Biotrend (Köln)
ProCatch Glutathione Resin	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
ProLong® Gold Reagent mit DAPI	Life Technologies (Darmstadt)
Protease Inhibitor Cocktail Mix (PIM)	Roche (Basel, Schweiz)
Protein Assay Dye Reagent Konzentrat	Bio-Rad Laboratories (München)
Pyrokatechol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Reagenz A, B, S	BioRad (München)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Streptavidin-HRP	R&D Systems (Wiesbaden)
SYBR GREEN Supermix	Bio-Rad Laboratories (München)
Tetraethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Tris	AppliChem (Darmstadt)

TritonX-100	AppliChem (Darmstadt)
Trypanblau	Sigma (Hamburg)
Trypsin/EDTA	Sigma (Hamburg)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
XTT Cell Proliferation Kit (Activation und XTT Reagent)	Appllichem (Darmstadt)
Ziegenserum	Kraeber & Co. GmbH (Ellerbek)

2.3.1 Medien und Mediensupplemente

Tabelle 4: Medien und Mediensupplemente

Material	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies (Darmstadt)
Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12)	Life Technologies (Darmstadt)
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA (Cölbe)
Murines GM-CSF	Pepto-Tech (Rocky Hill, USA)
Dulbecco's phosphate-buffer saline (PBS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco (Karlsruhe)

Tabelle 5: Verwendete Standardmedien mit Abkürzung und Zusammensetzung

Name	Zusammensetzung
mTEZ Standardmedium	DMEM/ HAM's F12 (1:1) <ul style="list-style-type: none"> ○ 10 % fetalen Kälberserum (FCS) ○ 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (1 % PenStrep)
BMDM Standardmedium	DMEM <ul style="list-style-type: none"> ○ 10 % fetalen Kälberserum (FCS) ○ 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1 % PenStrep)
BMDM Diff-Medium	DMEM <ul style="list-style-type: none"> ○ 10 % fetalen Kälberserum (FCS) ○ 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1 % PenStrep) ○ 20 ng/ml Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF)
Starv-Medium	DMEM <ul style="list-style-type: none"> ○ 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (1 % PenStrep)

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 Puffer/Lösungen für die Herstellung von rekombinanten Lcn-2

Elutionspuffer (pH 8)	
Glutathion (reduziert)	30,7 mg
Tris-HCl (50 mM)	ad 10 ml

IPTG (100 mM)	
IPTG	120 mg
Aqua bidest.	5 ml
gekühlt bei -20 °C und lichtgeschützt zu lagern	

LB Medium	
NaCl	10 g
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Aqua bidest.	1000 ml

Natriumdesoxycholsäure (1 %)	
Natriumdesoxycholsäure	0,5 g
Aqua bidest.	50 ml

Resin regeneration Puffer I (pH 8,5)	
NaCl	2,922 g
Tris-HCl	1,21 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Resin regeneration Puffer II (pH 4,5)

NaCl	2,922 g
Natriumacetat	0,8203 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

SOC Medium

Glucose	0,36 g
MgCl ₂	0,95 g
MgSO ₄	1,20 g
NaCl	0,5 g
Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
Aqua bidest.	1000 ml

Tris-HCl (50 mM)

Tris-HCl	60,57 mg
Aqua bidest.	10 ml

2.4.2 Puffer für die Immunpräzipitation (IP)

IP-Puffer	
Tris/HCl 50 mM	0,6 g
NaCl 300 mM	0,876 g
EDTA 5 mM	0,186 g
NP-40 1 %	500 µl
Glycerin 10 %	10 ml
Natriumfluorid 1 mM	1 ml des 100 mM Stock
Natriumorthovanadate 1 mM	1 ml des 100 mM Stock
PMSF 1 mM	10 µl
Protease Inhibitor Mix	1x frisch dazugeben

2.4.3 Puffer für den Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Coating buffer (pH 9,6)	
Na ₂ CO ₃	3,03 g
NaHCO ₃	6 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

2.4.4 Lösung für die RNA Isolation

DEPC Wasser	
DEPC	1 ml
Aqua bidest.	1000 ml
Über Nacht durchmischen und autoklavieren	

2.4.5 Puffer/Lösung für die Western Blot Analyse

APS (10 %)	
APS	5 g
Aqua bidest.	50 ml

Blotting Puffer (10 x)	
Glycerin	144 g
Tris	30,3 g
Aqua bidest	1000 ml

Blotting Puffer (1 x)	
Blotting Puffer 10x	100 ml
Methanol	200 ml
Aqua bidest	700 ml

Elektrophoreselaufpuffer (10 x/ pH 8.3)	
Glycerin	144 g
SDS	10 g
Tris	30 g
Aqua bidest.	Ad 1000 ml

Probenpuffer (4 x) „Laemmli-Puffer“ (pH 6,8)	
Bromphenolblau-Natriumsalz	10 mg
Glycerin	5 ml
SDS (10%)	2 ml
Puffer Sammelgel	1.25 ml
Aqua bidest.	1.75 ml
Vor Verwendung 10% β -Mercaptoethanol hinzufügen	

Puffer Trenngel (pH 8,8)	
Tris-HCl	36,34 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

Puffer Sammelgel (pH 6,8)	
Tris-HCl	12,11 g
Aqua bidest.	ad 100 ml

SDS Puffer (10 %)	
SDS	5 g
Aqua bidest.	50 ml

TBS (10 x / pH 7,4)	
NaCl	90 g
Tris	12,11 g
Aqua bidest	ad 1000 ml

TTBS	
TBS (10x)	100 ml
Tween 20	600 μ l
Aqua bidest.	900 ml

2.5 Antikörper

2.5.1 Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 6: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Hersteller	Lösung
Primärantikörper		
Anti-Pan-Cytokeratin	Sigma-Aldrich (Steinheim)	1:100
Sekundärantikörper		
Anti-Mouse IgG-Cy3	Jackson Immuno Research (Ely, UK)	1:300

2.5.2 Antikörper für Protein- und Western Blot Analyse

Tabelle 7: Antikörper für Protein- und Western Blot Analyse

Antikörper	Hersteller	Lösung
Anti-KIM-1	ProSci (Poway, USA)	1:1000
Anti-Klotho	R&D (Wiesbaden)	1:500
Anti-Pan-Actin	Cell Signaling (Frankfurt)	1:3000
Anti-Nucleolin	Santa Cruz (Heidelberg)	1:3000
Anti-Lipocalin-2	R&D Systems (Wiesbaden)	1:500
Anti-Ratten-IgG	R&D Systems (Wiesbaden)	1:2000
Anti-Ratten HRP	Amersham (Freiburg)	1:2000

2.6 Quantitative PCR Primer

Die verwendeten Primersequenzen für die quantitative PCR wurden zunächst mit der NTI software (Life Technologies, Darmstadt) designed und von der Firma Bio-Rad, Biomers (Ulm) bezogen. Ausschließlich β -Aktin, CK18, E-Cadherin und ZO-1 wurden von Invitrogen, Thermo Fisher (Karlsruhe) erworben.

Tabelle 8: Primer Sequenzen für Real-Time Quantitative PCR

Primer	Sequenz
β -Actin	Forward: 5-CCACCATGTACCCAGGCATT-3 Reverse: 5-AGGGTGTAACGCAGCTCA-3
β -Catenin	Forward: 5-TCTGAGGACAAGCCACAGGATTACA-3 Reverse: 5-GGGCACCAATGTCCAGTCCAA-3
CD136	Forward: 5-TTCACTGCACTGGGACTGAG-3 Reverse: 5-AGGACAGTGTTTGGGACTG-3
CK18	Forward: 5-TTGTACCACCAAGTCTGCC-3 Reverse: 5-TTGTATCGGGCCTCCACATC-3
E-Cadherin	Forward: 5-TGAAGAAGGAAGAAGA-3 Reverse: 5-TGGGAGCCACTTTCGA-3
IL-1 β	Forward: 5-AGGCCACAGGTATTTTGTCTG-3 Reverse: 5-GACCTTCCAGGATGAGGACA-3
iNOS	Forward: 5-ACCCTAAGAGTCACAAAATGGC-3 Reverse: 5-TTGATCCTCACATACTGTGGACG-3
MRC	Forward: 5-GGAGTGATGGAACCCAGTG-3 Reverse: 5-CTGTCCGCCAGTATCCATC-3
PCNA	Forward: 5-AATGGGGTGAAGTTTTCTGC-3 Reverse: 5-CAGTGGAGTGGCTTTTGTGA-3
RPS27a	Forward: 5-GACCCTTACGGGGAAAACCAT-3 Reverse: 5-AGACAAAGTCCGGCCATCTTC-3
Stathmin	Forward: 5-CTTGCGAGAGAAGGACAAGC-3 Reverse: 5-CGGTCCTACATCGGCTTCTA-3
TBP	Forward: 5-GGGCCGCCGGTAACT-3 Reverse: 5-AGCCCTGAGCGTGGCA-3

TNF α	Forward: 5-CCATTCCTGAGTTCTGCAAAGG-3 Reverse: 5-AGGTAGGAAGGCCTGAGATCTTATC-3
YM-1	Forward: 5-GGGCATACCTTTATCCTGAG-3 Reverse: 5-CCACTGAAGTCATCCATGTC-3
ZO-1	Forward: 5-GCCATTACACGGTCCTCTGA-3 Reverse: 5-GCGAAAGGTAAGGGACTGG-3

2.7 Software

Tabelle 9: Software

Software	Hersteller
AxioVision Release 4.7	Zeiss (Göttingen)
CFX Manager 1.6.X	Bio-Rad Laboratories (München)
Citavi 6	Citavi (Wädenswil, Schweiz)
CorelDRAW Home&Student 2019	Corel Corp. (Ottawa, USA)
GraphPad Prism 5.02	GraphPad Software (La Jolla, USA)
Microsoft 365	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Nano Drop 1000 3.8.1	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
RTCA Software 1.2.1	Roche (Mannheim)
Vector NTI software	Life Technologies (Darmstadt)

3 Methoden

3.1 Tiere

C57BL/6 Wildtyp sowie Lcn-2^{-/-} Mäuse, die aus der Linie von C57BL/6 Mäusen stammen, wurden von mfd Diagnostics (Wendelsheim, Deutschland) gezüchtet und zur Verfügung gestellt. Die Tierhaltung erfolgte in der zentralen Forschungseinrichtung am Universitätsklinikum Frankfurt am Main und entsprach standardisierten Bedingungen (durchschnittliche Temperatur 25 °C, Helligkeitszyklus von 12 Stunden, Futter und Wasser ad libitum). Die Auswahl der Mäuse erfolgte geschlechtsunabhängig, das Alter der Tiere war durchschnittlich 6 Monate. Alle Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit ethischen Grundsätzen, nach Vorschriften der Deklaration von Helsinki als auch nach nationalen und internationalen Richtlinien durchgeführt. Für die Organentnahme und zur anschließenden Isolation primärer Mauszellen war keine zusätzliche tierethische Genehmigung erforderlich. Alle Durchführungen, die die Verwendung von Mäusen beinhalteten, entsprachen den Richtlinien des Hessischen Tierschutzgesetzes.

3.2 Zellkultur

Für Zellkulturarbeiten wurden ausschließlich sterile Materialien verwendet. Die Sterilisation erfolgte durch Autoklavieren oder durch die Reinigung mit 70 % Ethanol. Die Tätigkeiten in der Zellkultur wurden unter der sterilen Arbeitsbank durchgeführt, zuvor erfolgte die Desinfektion der Werksfläche und der Handschuhe mit 70 % Ethanol.

3.2.1 Murine renale Tubuluspithelzellen (mTEZ)

3.2.1.1 Isolation mTEZ

Die Gewinnung von mTEZ erfolgte aus Nieren von C56BL/6 WT Mäusen. Die Nieren wurden in einem 50 ml-Röhrchen mit PBS gesammelt und auf Eis zur weiteren Verarbeitung am selben Tag überführt. Die Isolation der mTEZ erfolgte unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur. Über mechanische und enzymatische Aufbereitungsschritte mit anschließender Dissoziation wurde das Nierengewebe in Einzelzellen aufgeschlossen. Hierfür wurde das Gewebe mit

PBS gespült und die noch bestehenden Nierenkapsel- sowie Hilumanteile entfernt. Mittels „crossed blades“ (*engl.* crossed – gekreuzt; blades – Schwerte) Verfahren, unter Verwendung zweier Skalpelle, die im 90 ° Winkel zueinanderstehen, wurden das Nierengewebe zerkleinert. Zur Herstellung einer 0,5 % Enzymlösung wurde 10 mg Kollagenase Typ 1 mit 20 ml reinem Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) gelöst und anschließend mit einem 45 µM Filter steril filtriert. Die Berechnung der benötigten Enzymlösung orientierte sich an der Anzahl der Nierenpaare: pro Nierenpaar wurden ca. 2 ml Enzymlösung benötigt. Das zerkleinerte Nierengewebe inkubierte mit der Enzymlösung für 30 Minuten bei 37 °C unter Schütteln im Wasserbad. Durch das Lösen der Zell-Zell Kontakte mittels der proteolytischen Funktion des Enzyms Kollagenase entstand eine Einzelzellsuspension. Durch Zentrifugation bei 300 g für 10 Minuten wurde die Kollagenase inaktiviert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend in erwärmtes mTEZ Standardmedium aufgenommen. Das mTEZ Standardmedium wurde für die weiteren Isolationsschritte und anschließende Kultivierung verwendet. Um ausschließlich renale Tubulusepithelzellen von Gewebe und Zellen anderen Ursprungs zu differenzieren, wurde die Zellsuspension durch Nylonnetze mit folgender Größe filtriert: 100, 70, 40 µm. Zunächst wurde das gelöste Zellpellet durch ein 100 µm Nylonnetz gefiltert und hierbei die Zell-/Gewebesuspension mit Hilfe des Stempels einer 2 ml Spritze über das Nylonnetz passagiert. Das Filtrat wurde in einem Volumenverhältnis von Filtrat zu Medium von 1:1 aufgenommen, erneut bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet in 3 - 5ml Medium aufgenommen. Es folgte die Filtration durch das 70 µm sowie 40 µm Nylonnetz. Zellen größer als 70 µm, sowie das Filtrat aus dem 40 µm Nylonnetz wurden verworfen. Der Zellrückstand im 40 µm Nylonnetz wurde durch Invertieren und Spülen des Siebes mit Medium in einer Petrischale aufgefangen und entsprach einer Größe von 40 – 70 µm. Die Zellsuspension wurde anschließend in einem zweiten Inkubationsschritt mit der Enzymlösung für 30 Minuten inkubiert und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde im mTEZ Standardmedium aufgenommen und in einer mittleren Flasche (75 cm²) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nicht-adhärenente Zellen wurden 24 Stunden nach Isolation durch Waschen mit PBS entfernt. Die verbleibenden adhärenente Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.1.2 Kultivierung und Passage von mTEZ

Primär isolierte murine Tubulusepithelzellen wurden nach erfolgter Isolation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und unter Wasserdampfsättigung inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde alle drei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt. Bevor kultivierte mTEZ in die Versuchsdurchführung eingebracht werden konnten, erfolgte die Umsetzung der Zellen bis zu einer Passage 2 oder 3. Für das Passagieren der Zellen wurde eine Trypsin/EDTA-Lösung verwendet, durch die Zugabe von mTEZ Standardmedium wurden die gelösten Zellen aufgenommen und mittels Zentrifugation die Trypsin/EDTA-Lösung entfernt. Die Aufnahme des Zellpellets erfolgte in frischem Nährmedium und die Zellen konnten in eine neue Kulturflasche überführt und kultiviert werden.

3.2.1.3 Zellzahlbestimmung mit Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer unter Zuhilfenahme von Trypanblau angewendet. Nach Lösung der Zellen von der Zellkulturfläche mit Trypsin und Aufnahme der Zellen in Nährmedium, wurden 20 µl des Zellgemisches mit 20 µl Trypanblau in einem Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) vermischt. Mit Hilfe der Trypanblaufärbung konnten nicht mehr lebende Zellen von lebensfähigen Zellen unterschieden und somit tote Zellen von der Zellzahlbestimmung ausgeschlossen werden. Für die Neubauer Zählkammer wurden 20 µl Zellgemisch pro Zählkammer pipettiert und für die Zählung zwei Quadrate (entspricht 16 Feldern) ausgewertet. Aus der wiederholten Zellzählung wurde der Mittelwert errechnet. Der Mittelwert entsprach der Zellzahl $\times 10^4$ pro ml Zelllösung. Für die Aussaat in die gewünschten Kulturgefäße wurde eine entsprechende Zellzahl bestimmt. Diese sind in der Tabelle 10 zur Übersicht zusammengefasst.

Tabelle 10: Zellzahlbestimmung und Aussaat von mTEZ

Fläche pro Well	Anwendung	Zellzahl pro Volumeneinheit
6-Loch Platte (9,6 cm ²)	RNA Isolation, Western Blot Proteinbestimmung	9 x 10 ⁴ Zellen
12-Loch Platte (3,9 cm ²)	Phalloidin Färbung, Atomabsorptionsspektrometrie	3,6 x 10 ⁴ Zellen
96-Loch Platte (0,32 cm ²)	XTT-Überlebensnachweis	2 x 10 ⁴ Zellen
Chamberslide: 8-Loch Platte (0,8 cm ²)	Immunfluoreszenz Färbung	5 x 10 ³ Zellen

3.2.2 Makrophagen aus dem Knochenmark (BMDM)

3.2.2.1 Isolation und Kultivierung von BMDM

Tibia- und Femur Knochen von C56BL/6 WT und Lcn-2^{-/-} Mäusen wurden entnommen. Vor Beginn der Isolation erfolgte unter sterilen Bedingungen der Zellkultur ein Waschschrift mit 70 % Ethanol. Anschließend wurde das Knochenmark mit PBS unter Verwendung einer Spritze mit aufgesetzter Nadel (26 G) durchspült. Die gewonnene Zelllösung wurde durch 70 µm Filcons-Filter gefiltert, um feste Bestandteile zu trennen. Im nächsten Schritt wurde das Filtrat bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in BMDM Standardmedium gelöst. Um die gewonnenen Stammzellen des Knochenmarks zu Makrophagen zu differenzieren, erfolgte die Aussaat in 6-Well Platten (6×10⁶ Zellen/Well) über 7 Tage im Brutschrank mit BMDM Diff-Medium. Nicht-adhärenente Zellen wurden durch einen Mediumwechsel alle 3 Tage entfernt. Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen für 24 Stunden in serumfreiem Medium kultiviert.

3.2.2.2 Herstellung von Makrophagen konditioniertem Medium

Es ist gut etabliert^{141,143}, dass die Stimulation mit IL-10 eine Polarisierung von Makrophagen in anti-inflammatorisch, pro-regenerativ geprägte Makrophagen

bewirkt. In der vorliegenden Arbeit wurden Makrophagen für 24 Stunden in Starv-Medium mit 20 ng/ml IL-10 inkubiert. Um konditioniertes Medium zu erhalten, wurde der Zellkulturüberstand in ein Röhrchen überführt und bei 200 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der erhaltene Überstand mit einem 0,2 µm -Filter filtriert und das Filtrat aliquotiert. Das filtrierte konditionierte Medium wurde entweder direkt für Untersuchungen verwendet oder bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Bei Verwendung der konditionierten Medien wurden diese auf Eis aufgetaut, nochmalig durch Pipettieren durchmischt und pro Well pipettiert.

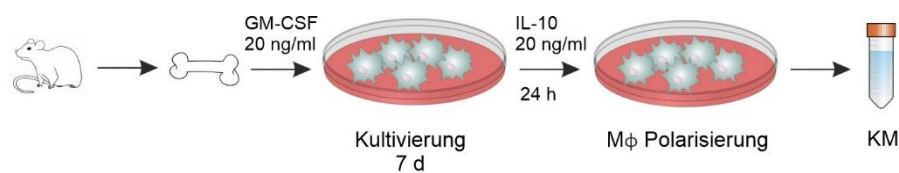


Abbildung 4: Experimenteller Aufbau zur Gewinnung eines konditionierten Mediums IL-10-stimulierter Mφ. Entnahme von Tibia- und Femur Knochen von C56BL/6 WT und Lcn-2^{-/-} Mäusen und Isolierung von Stammzellen aus dem Knochenmark. Differenzierung mittels GM-CSF (20 ng/ml) mit Kultivierung der Mφ über 7 Tage (d). Stimulation mit IL-10 (20 ng/ml) über 24 Stunden (h) zur Makrophagen Polarisierung und anschließende Gewinnung eines konditionierten Mediums (KM).

3.3 *In vitro* Untersuchungen

3.3.1 Cisplatin-induzierte Schädigung der mTEZ

Bei der Induktion einer Zytotoxizität an mTEZ wurde ein Cisplatin-Schädigungsmodell etabliert. Zur Herstellung einer Cisplatin Stammlösung wurde reines Cisplatin mit serumfreiem mTEZ Standardmedium vermischt. Unter der Berücksichtigung der molaren Masse (300 g/mol) wurde die Stoffmengenkonzentration [M] der käuflichen Cisplatin-Stammlösung mit 3300 µM errechnet. Anschließend konnte aus dieser Stammlösung eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 50; 20; 10; 5; 2; 1 µM hergestellt und in serumfreiem mTEZ Medium gelöst werden. Durch das Pipettieren der entsprechenden Cisplatin-Konzentration auf die kultivierten mTEZ und Inkubation über 24 Stunden wurde eine Schädigung der Zellen induziert. Als Kontrolle für die erfolgreiche Zellschädigung wurden unbehandelte sowie geschädigte Zellen im Vergleich ausgewertet und mit Hilfe eines XTT-Überlebensnachweises quantifiziert.

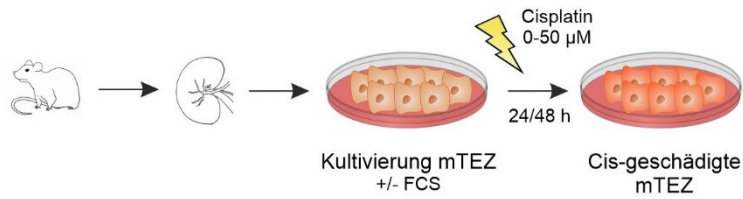


Abbildung 5: Experimenteller Aufbau zur Cisplatin (Cis)-induzierten Schädigung der mTEZ. Isolation mTEZ aus Nieren von C56BL/6 WT Mäusen. Anschließende Kultivierung mTEZ mit oder ohne FCS. Schädigung der mTEZ mit einer Cisplatin-Verdünnungsreihe (0-50 µM Cisplatin) über 24 oder 48 Stunden (h).

Für die Inkubation geschädigter mTEZ mit Makrophagen-konditioniertem Medium wurde zunächst eine 5 µM Cisplatin-Lösung erstellt und zur Schädigung auf kultivierte mTEZ pipettiert. Also Kontrolle dienten mTEZ, welche mit serumfreien mTEZ Standardmedium ohne Cisplatin inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator über 24 Stunden. Nach 24 Stunden folgte zunächst das Waschen der Zellen mit PBS und anschließend das Hinzufügen der konditionierten Medien.

3.3.2 Etablierung eines Rescue Modells an Cisplatin-geschädigten mTEZ

Nach Schädigung mit Cisplatin wurden mTEZ aus WT Mäusen durch die Zugabe von KM aus IL-10-behandelten Makrophagen von WT und Lcn-2^{-/-} Mäusen stimuliert. Zusätzlich wurde in einer weiteren Versuchsgruppe das KM von Lcn-2^{-/-} Mäusen mit rekombinant-hergestellten holo-Lcn-2 in der Konzentration 1 µg/ml versehen. Die unstimulierte Kontrolle erhielt das Starv-Medium. Die Dauer der Stimulation wurde auf 48 Stunden festgelegt, wobei nach 24 Stunden eine erneute Zugabe der jeweiligen konditionierten Medien stattfand.

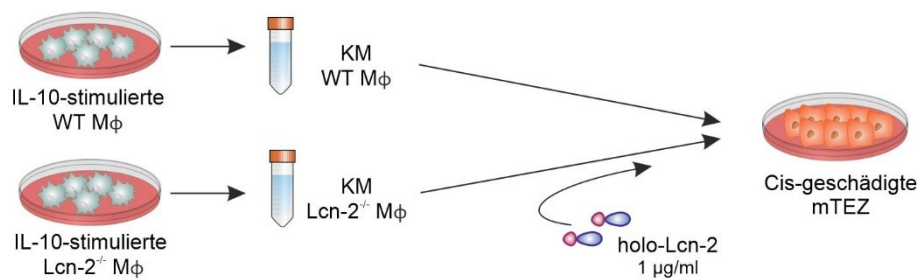


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Rescue Modells an Cisplatin (Cis)- geschädigten mTEZ. Herstellung KM von IL-10-stimulierten WT Mφ und Lcn-2^{-/-} Mφ, zunächst Schädigung primärer mTEZ mit 5 µm Cisplatin über 24 Stunden mit anschließender Zugabe der KM über 48 Stunden. Rescue-Versuch durch das Zufügen von rekombinanten, holo-Lcn-2 zu KM von Lcn-2^{-/-} Mφ.

3.3.3 xCELLigence Proliferationsnachweis

Die Proliferation von mTEZ wurde unter Verwendung des RTCA DP xCELLigence Instrumentes gemessen. Anfänglich wurde eine Hintergrundmessung des Detektors, der einen E-Platteneinsatz enthielt, unter Verwendung von 50 µl serumfreiem Medium durchgeführt, das 30 Minuten im Inkubator inkubiert worden war (37 °C, 5 % CO₂). Das Gerät ermittelt über Sensoren Veränderungen im elektrischen Feld und kann somit dynamisch und in Echtzeit die Zellwachstumsrate messen. Dazu wurden kultivierte mTEZ zunächst durch Zugabe einer 5 µM Cisplatin Lösung über 24 Stunden vorgeschädigt, die Kontrolle erhielt serumfreies mTEZ Standardmedium. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, gezählt und dem Insert in 100 µl serumfreiem Medium (10.000 Zellen pro Well) zugesetzt. Im E-Platteneinsatz erfolgte das Hinzufügen des Makrophagen-konditioniertem Mediums. Jede Bedingung wurde in mindestens drei unabhängigen Experimenten dreifach durchgeführt. Die Proliferation nach Zugabe von konditioniertem Medium wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden kontinuierlich als Impedanzanstieg gemessen. Die Auswertung erfolgte von der 2. – 60. Stunde des Versuchsdurchlaufes. Die Daten werden als Steigung pro Stunde des normalisierten Zellindexes als Maß für die zeitabhängigen Änderungen der Impedanz dargestellt. Die RTCA-Software 1.2 wurde zur Datenerfassung und -analyse verwendet.

3.4 Nachweismethoden

3.4.1 XTT-Zellvitalitätsassay

Zur Darstellung einer Schädigung mTEZ durch Cisplatin und Quantifizierung der Überlebensfähigkeit der mTEZ wurde ein käufliches Zellvitalitäts-Kit angewendet. In der Anwendung kommt es zur Umsetzung von 2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl) tetrazolium-5-carboxanilid (XTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan-Farbstoff. Der entstandene Formazan-Farbstoff, kann mittels Photometrie detektiert werden. Gemäß der Anleitung wurden kultivierte mTEZ dafür in 96-Loch Platten ausgesät und nach drei Tagen Inkubation in den Versuch eingeschlossen. Nach erfolgter Versuchsdurchführung schloss sich der XTT-Zellvitalitätsassay an. Zur Vorbereitung wurde das alte Medium der Zellen entfernt, die Zellen mit PBS

gewaschen und 100 µl neues Standardmedium pro Well pipettiert. Für den XTT-Assay wurde das aktivierende Reagenz (XTT activation solution) und das XTT Reagenz gemischt und auf die Zellen pipettiert. Die Verteilung des hinzugefügten Volumens wurde mit Hilfe einer Schüttelplatte erzeugt und die Zellplatte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 2 Stunden erfolgte die photometrische Messung bei 490 nm mit der Referenzwellenlänge 620 nm. Pro Konzentration erfolgte die Testung in 6 Kontrollproben zur Errechnung des Mittelwertes.

3.4.2 Phalloidin Färbung

Phalloidin ist ein Farbstoff, der sich durch Bindung an das F-Aktin des Zytoskeletts der Zelle auszeichnet. Durch Immunfluoreszenz-markiertes Phalloidin ist die Anfärbung der Aktinfilamente möglich und das Zytoskelett wird mikroskopisch sichtbar.

Die Aussaat der mTEZ und die anschließende Durchführung des Versuches erfolgte in 12-Loch Platten, in denen Deckgläschen eingelegt wurden. Hierdurch wurde eine Fläche erzielt, die einerseits eine gute Adhäsion der Zellen und zusätzlich die Ausführung der Färbung und anschließende Mikroskopie ermöglichte. Nach der erfolgreichen Versuchsdurchführung wurden die Zellen unter der Werkbank mit PBS gewaschen und mit 1 ml 4 % PFA für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Durch Inkubation mit 500 µl Triton X-100/PBS für 4 Minuten wurde die Permeabilität der Zellen erhöht und anschließend mit 250 µl 1 % Bovines Serumalbumin (BSA)/PBS für 25 Minuten inkubiert. Das Phalloidin wurde mit PBS gemischt und je 150 µl pro Well für 20 Minuten bei Raumtemperatur bei Dunkelheit auf den Zellen belassen. Die Deckgläschen wurden vorsichtig entfernt und zum Trocknen gelagert. Währenddessen konnte die Fixierung der Zellen mit ProLong® Gold inklusive Fluoreszenzfarbstoff DAPI auf die Objektträger aufgetragen und die Deckgläschen anschließend aufgebracht werden. Die Objektträger kühlten über Nacht im Kühlschrank, die anschließende Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit Hilfe eines LSM 800 Konfokalmikroskops.

3.4.3 Immunfluoreszenz Färbung

Isolierte mTEZ wurden hierzu in einer 8-Loch Chamberslide Platte kultiviert und zu Beginn der Färbung mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte unter Zugabe von 100 µl eiskaltem Aceton- Methanol Gemisch pro Well, welches für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubierte. Nach Waschen der Zellen mit PBS folgte die Blockierung mit 100 µl Blocklösung je Zellkammer für 20 Minuten. Zur Herstellung der Blocklösung wurde Ziegenserum mit PBS 1:20 verdünnt sowie mit 5 % α -Globulin vermischt. Der Primärantikörper wurde in verdünnter Blocklösung (Blocklösung in PBS im Verhältnis 1:10) gelöst, je 100 µl pro Well pipettiert und zur Inkubation für 45 Minuten bei 37 °C und unter Schütteln im Brutschrank verwahrt. Nach einem Waschschritt wurde der Sekundärantikörper in verdünnter Blocklösung angesetzt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 45 Minuten. Anschließend wurde der Sekundärantikörper durch Waschen entfernt, die Chamberslide-Kammern gelöst und der Objektträger mit Mowiol eingedeckelt. Zur Mikroskopie und Dokumentation wurde ein Keyence BZ9000 Fluoreszenzmikroskop verwendet. Die Pan-Cytokeratin Färbung erfolgte zur Zellcharakterisierung primär isolierter mTEZ. Ein positiver farblicher Nachweis bildet vorliegende Cytokeratin Filamente im Zellplasma ab und zeigt so eindeutig den epithelialen Ursprung und die Reinheit der isolierten Zellen.

3.4.4 Proteinanalysen

3.4.4.1 Herstellung von rekombinanten Lcn-2

Die Proteinherstellung von Lcn-2 wurde durch Transfektion eines pGEX-4T-3-NGAL Plasmids in einer Escherichia coli (E. coli) BL21 Zellkultur induziert. Der Glutathion-S-Transferase (GST) Tag an Lcn-2 ermöglichte eine anschließende Aufreinigung.

Transformation

10 µl des Plasmids wurde mit 40 µl des E. coli Stammes vermischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42 °C über zwei Minuten folgte die Induktion eines Kälteschocks für zwei Minuten auf Eis. Für die Kultivierung der Bakterien wurde ein SOC Nährmedium

(*engl.* Super Optimal broth with Catabolite Repression) verwendet, welches Hefeextrakt, Trypton, Natrium-, Kalium und Magnesiumchlorid sowie Magnesiumsulfat und Glucose beinhaltet. Mit 450 µl SOC Medium wurden die Bakterienstämme für 45 Minuten bei 37 °C unter Schütteln erhitzt. Je 50 µl der Bakterienkultur inkubierte auf einem LB- (lysogeny broth, Nährmedium) Agar mit Ampicillin bei 37 °C über Nacht. Am Folgetag konnten drei der gewachsenen Kolonien gepickt und in ein Falcon mit 25 ml LB und 25 µl Ampicillin überführt werden. Darauffolgend inkubierte die Lösung erneut unter Schütteln über Nacht bei 37 °C. Die Bakterienkultur wurde anschließend auf ein finales Volumen von 200 ml LB erweitert und schließlich die Lcn-2 Expression durch Beigabe von 0,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Aktivierung des Lac-Operons induziert IPTG Transkriptions- und Translationsprozesse. Die hergestellten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 4 °C bei 3000 x g über 15 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen.

Aufreinigung von rekombinantem Lcn-2

Zur Freisetzung und Reinigung des GST-gebundenen Lcn-2 Proteins wurde ein ProCatch Glutathion Resin verwendet und nach Anweisung des Herstellers vorbereitet. Die folgenden Durchführungen ermöglichen, dass das GST-gebundene Lcn-2 sich an das reduzierte Glutathion Resin bindet und anschließend unter Anwendung eines Elutionspuffers extrahiert werden kann. Die Arbeiten wurden steril auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde die Zellyse durch Zugabe von Lysis-Puffer, Protease Inhibitor Mix und Lysozym eingeleitet. Zusätzlich wurde durch Sonifizieren mit Ultraschall ein Aufschluss der Zellmembran erzeugt. Nach Zentrifugation wurde der Proteinüberstand mit Resin vermischt und inkubierte unter Rollen für 20 Minuten bei 4 °C. Ungebundenes Protein wurde durch Zentrifugation (5 Minuten/ 700 x g/ 4 °C) und Waschen mit PBS entfernt. Das Resin-Pellet wurde mit Lysis Puffer resuspendiert und in eine TALON 2-ml Schwerkraftsäule überführt. Durch die Zugabe von Imidazol kam es zur Lösung des Lcn-2 Proteins vom Resin, die durch schrittweise Erhöhung der Konzentration von zunächst 10 mM auf 100 mM herbeigeführt wurde. Die Regeneration des ProCatch Glutathioin Resins erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Endotoxin Entfernung

Das in der Lösung befindliche und an GST-gebundene Lcn-2 wurde auf Gel-Säulen zur Entfernung von Endotoxinen wie LPS und Reduktion dieser möglichen Giftstoffe für Zellen aufgetragen. Hierzu wurden ein Detoxi-Gel Endotoxin-Abbaugel verwendet, das zunächst unter Verwendung von 5 ml 1 % Natriumdesoxycholsäure regeneriert und anschließend mit pyrogenfreiem Wasser gewaschen wurde. Es erfolgte das Übertragen der Lösung auf die Gel-Säulen und die Inkubation für eine Stunde. Pyrogenfreies Wasser wurde verwendet, um einen Durchfluss durch die Säulen zu gewährleisten und das GST-gebundene und aufgereinigte Lcn-2 aufzufangen. Zur Wiederherstellung der Gel-Säulen wurde diese erneut mit 1 % Natriumdesoxycholsäure gespült und in 25 % Ethanol aufbewahrt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurde die Methode nach Bradford durchgeführt. Das zum Protein Assay verwendete Reagenzkonzentrat wurde in einem Verhältnis von 1:4 mit destilliertem Wasser gemischt und anschließend gefiltert. Für jede Standardkonzentration (2,5; 1,5; 0,75; 0,38; 0,19; 0,09; 0,05; 0,02 mg/ml) wurde je 10 µl des Standards, sowie Duplikate der Proben auf eine 96-Loch Platte aufgetragen und 200 µl des Reagenzes pro Well hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über 5 Minuten unter leichtem Schütteln, anschließend wurde die Proteinmenge anhand eines Apollo-1 LB 911 Photometers bei 595 nm gemessen.

3.4.4.2 Herstellung von rekombinanten Eisen-beladenen Lcn-2

Für die Beladung von rekombinant-hergestellten Lcn-2 mit Eisen (holo-Lcn-2) wurde zusätzlich Pyrokatechol verwendet. Um die Konzentration von Lcn-2:Katechol:Eisen im Verhältnis 1:1:1 zu erreichen, wurde zunächst die Stoffmenge des Lcn-2 Stock [1 µg/µl] anhand des benötigten Volumens mit $n = c \times V$ berechnet. Für die spätere Versuchsdurchführung wurden 5 ml KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen mit beladenem Protein veranschlagt. Holo-Lcn-2 sollte sich im Verhältnis von 1:1000, also mit einer Konzentration von 1 µg/ml darstellen, was bei 5 ml KM ein Volumen von 5 µl holo-Lcn-2 ergab. Bei Annahme des 25 kDa schweren Eisen-unbeladenen Lcn-2 (apo-Lcn-2) mit einer Konzentration

von 40 μM und einem Volumen von 5 μl ergab sich eine Stoffmenge [n] gleich 2×10^{-10} mol. Daraus errechnete sich für Eisen und Katechol, bei einer Konzentration von jeweils 25 μM , mit der Formel $V = n / c$ je ein Volumen von 8 μl , das zu 5 μl Lcn-2 hinzugefügt wurde. Anschließend konnte das Eisen-beladene holo-Lcn-2 mit dem KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen gemischt werden.

3.4.4.3 UV-vis Spektroskopie

Für die Überprüfung der Bindungsfähigkeit des rekombinanten Lcn-2 Eisen-Katechol-Komplexes wurde die UV-vis Spektroskopie (*engl.* ultraviolet and visible spectroscopy) angewendet. Diese beruht auf dem Prinzip der Lichtabsorption aus dem Bereich von ultraviolettem und sichtbarem Licht bei elektromagnetischer Bestrahlung. Die Veränderung der Absorption ermöglicht eine Aussage darüber, ob die Bindung zwischen Liganden und Metall, in diesem Fall zwischen Pyrokatechol und Eisen, stattfindet und gibt Auskunft inwieweit Lcn-2 den Eisen-Katechol-Komplex bindet. Für die Messung wurde zunächst eine Hintergrundmessung mit Tris-Puffer (100 mM, pH 7,5) durchgeführt. Für die Komplexbildung wurde Pyrokatechol (10 μM) mit Eisen(III)-chlorid (FeCl_3) (10 μM) vermischt, sodass der Eisen-Katechol-Komplex in einem Verhältnis von 1:1 vorlag. Rekombinant hergestelltes Lcn-2 wurde in Elutionspuffer gelöst und der Eisen-Katechol-Komplex unter Titrieren hinzugefügt, bis eine Äquivalenzdosis entstand. In spezielle, dafür vorgesehene UV-Zellküvetten wurde die Lösung pipettiert und mit einem UV 1800 UV-vis Spektrometer bei einer Wellenlänge von 300 - 800 nm gemessen.

3.4.4.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis der Lcn-2 Freisetzung aus Makrophagen wurde durch einen antikörperbasierten Assay (ELISA) durchgeführt, dessen Anwendung bereits zuvor etabliert wurde.^{144,145} Zu Beginn wurde eine ELISA 96-Loch Platte mit 200 μl KM und Standardlösung beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Platte fünfmal mit PBS/0,01 % Tween gewaschen. Die Blockierung erfolgte mit einer Lösung von 1 % BSA, 0,01 % Tween und PBS über eine Stunde, gefolgt von einem erneuten

Waschschritt. Die Inkubation mit dem Lcn-2 Antikörper (Anti-Lipocalin-2; 1:500) erstreckte sich über zwei Stunden. Um restliche ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde ein weiterer Waschschritt angeschlossen und anschließend der biotinylierte Sekundärantikörper Anti-Ratten-IgG (1:2000) für eine Stunde zugefügt. Danach erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-HRP (1:200) über 45 Minuten. Zur Farbentwicklung wurde ein Farbreagenz (Substrat-Reagenzienpaket von R&D) verwendet und die Anwendung durch Zugabe von H₂SO₄ gestoppt. Unter Verwendung eines Apollo-1 LB 911 Photometers wurde die Absorption bei 450 nm gegen 620 nm gemessen. Der Lcn-2 Gehalt berechnete sich anhand der Menge pro mg Gesamtproteinmenge.

3.4.4.5 Immunpräzipitation von Lcn-2 aus Makrophagen

Die Immunpräzipitation (IP) ermöglicht das Ausfällen und Quantifizieren von Proteinen durch Antigen-Antikörper spezifische Bindung. Hierzu wurde das KM der Makrophagen mit 100 µl ProteinA Dynabeads pro Probe gemischt. Vorher wurden die Beads durch Inkubation über Nacht bei 4 °C an einen spezifischen Antikörper gegen Lcn-2 gekoppelt. Unter Verwendung des DynaMag-2 Magnets wurden am darauffolgenden Tag die Beads mit dem gebundenen Lcn-2 aufgereinigt. Durch 3 Waschschritte mit IP-Puffer wurden ungebundene Substanzen entfernt. Anschließend wurde das Protein von den Beads mittels einer Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten gelöst. Durch anschließende Inkubation auf dem DynaMag-2 Magnet wurden die aufgereinigten Beads vom Überstand getrennt. Im Überstand ist das immunpräzipitierte Lcn-2 enthalten, welches bei -80 °C bis zur Proteinbestimmung und weiteren Messungen gelagert wurde. Das mittels Immunpräzipitation herausgelöste Lcn-2 Protein aus den Überständen IL-10 stimulierter Makrophagen wurde anschließend im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle mittels Atomabsorptionsspektrometrie weiterführend untersucht.

3.4.4.6 Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Um eine quantitative Elementbestimmung von Eisen zu gewährleisten, wurde die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) durchgeführt. Durch eine Flamme verdampft die Lösung der Probe und die Moleküle dissoziieren zu Atomen und werden ionisiert. Durch die unterschiedliche Atomstruktur der Moleküle entsteht eine charakteristische Wellenlänge. Je nach Absorption und Linienspektrum des Elements kann die Konzentration bestimmt werden. Die Menge an Protein-gebundenem Eisen im KM von Makrophagen sowie im Zelllysat der unterschiedlichen Rescue-Gruppen Cisplatin-geschädigter mTEZ wurde durch die AAS ermittelt. Durch Verdampfen der Probe in einem mit Graphit-beschichteten Ofen entsteht ein Lichtstrahl mit einer für Eisen spezifischen Wellenlänge. Die dabei absorbierte Lichtmenge freier Atome verhält sich annähernd linear zur Konzentration des Eisens, wodurch die Eisenmenge quantifiziert werden kann. Für die Durchführung der AAS wurden mTEZ in 12-Loch Platten kultiviert. Die Überstände pro Well wurden entnommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe eines Lyse Puffers (7,5 ml 50 mM Tris HCl pH 8, 10 ml 10 % SDS, 5 ml Glycerol ad 50 ml Wasser) gelöst. Anschließend wurde das Zelllysat bei -20 °C eingefroren. Das konditionierte Medium konnte direkt verwendet werden. Mit Hilfe von Amicon® Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten wurden die Proben aufkonzentriert. Je Versuchsgruppe erfolgte die Messung von Triplikaten mit einem PinAAcle™ 900 Spektrometer bei einer Wellenlänge von 248,33 nm und mit einer Spaltbreite von 0,2 mm. Zur Kalibrierung wurde ein Eisen Standard AAS „Stock solution“ in Wasser gelöst und als Lösung mit einer Konzentrationsspanne von 10 µg/l bis 90 µg/l verwendet. Für die thermo-chemische Spaltung der organischen Verbindungen (Pyrolyse) wurde eine Temperatur von 1400 °C, für die Zerstäubung (Atomisierung) eine Erhitzung auf 2100 °C gewählt. Der Eisengehalt berechnete sich als Eisenmenge in µg/l.

3.4.4.7 Western Blot Analyse

Der Western Blot bezeichnet eine Methode zum Nachweis spezifischer Proteine, die zunächst mittels Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran übertragen („Blotting“) werden.

Dann erfolgt die Bindung des ausgewählten Proteins an einen Primärantikörper durch Antigen-Antikörper Interaktion, welches darauffolgend durch Koppelung mit einem sekundären Antikörper visualisiert wird. Die Quantifizierung des untersuchten Proteins erfolgt in Korrelation zur Expression eines Strukturproteins. Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde zunächst das Natriumdodecylsulfat (SDS)- Gel mit den in der Tabelle 11 aufgeführten Chemikalien vorbereitet. Die Herstellung des Polyacrylamid-Gels beinhaltete das Anfertigen zweier Gelphasen, bestehend aus dem oberen Sammel- und unteren Trenngel, sodass zunächst die Konzentration der aufgetragenen Proteine und anschließend die Auftrennung erfolgen konnte. Zur Vorbereitung der Proben wurde 12,5 µl Probenpuffer („Laemmli-Puffer“) mit 12,5 µl Aqua bidest sowie 25 µl GST-tagged Lcn-2 oder 5 µg Proteinprobe vermischt und anschließend unter Schütteln für 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 Volt für eine Stunde. Anschließend wurde das SDS-Gel entfernt. Zeitgleich erfolgte die Aktivierung der Immobiln-FL Polyvinylidenfluorid (PVDF) Fluorkunststoffmembran in Methanol. Das SDS-Gel konnte nun auf die Membran übertragen und bei 0,07 Ampere, 300 Watt und 25 Volt über eine Stunde „geblottet“ werden. Durch Inkubation der Membran mit 5 % fettfreier Milch in TTBS bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden erfolgte die Blockierung der Membran. Der primäre Antikörper wurde hinzugefügt und inkubierte über Nacht bei 4 °C. Am Folgetag wurde die Membran mit TTBS gewaschen und folgend inkubierte der sekundäre Antikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Membran mit TTBS, erfolgte die Analyse mit einem Odyssey Infrarot Imaging-System. Eine Übersicht der angewendeten Antikörper ist in Tabelle 7 aufgelistet. Als Kontrolle wurde Nucleolin oder Pan-Aktin verwendet.

Tabelle 11: Zusammensetzung und Herstellung des SDS-Gels

Chemikalien	Trenngel (10 %)	Sammelgel (4 %)
Acrylamid/ Bis-acrylamid (40 %)	5 ml	1 ml
Puffer (Trenngel)	5 ml	
Puffer (Sammelgel)		2,5 ml
Aqua bidest	9,8 ml	6,4 ml
SDS (10 %)	200 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl
APS (10 %)	200 µl	50 µl

3.4.5 RNA Analysen

3.4.5.1 RNA Isolation

Für die Gewinnung und Untersuchung von RNA wurden kultivierte mTEZ oder BMDM verwendet. Zur Isolation wurde der Überstand zunächst entfernt und die Platten bei -80 °C für 4 – 5 Stunden eingefroren. Durch Applikation von 1 ml PeqGold RNA Pure konnten die Zellen gelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt werden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Durch Vortexen wurde die Lösung durchmischt und die Proben bei 4 °C und 12.000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Hierdurch entstand eine Separation der Proben in drei Phasen; die Phenol-Chloroform Phase, der Protein beinhaltenden Interphase und der oberen wässrigen Schicht, welche RNA enthält. Nachdem die obere Phase in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt wurde, wurden 500 µl Isopropanol hinzugefügt und die Proben zur Ausfällung über Nacht bei -20 °C eingefroren. Am Folgetag wurden die Proben durch Vortexen erneut gemischt und die RNA durch Zentrifugation pelletiert und in Waschsritten mit Ethanol aufgereinigt. Es schloss sich das zweimalige Waschen mit 75 % Ethanol an. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Proben durch Abtropfen an der Luft und anschließend bei 60 °C für 10 Minuten

getrocknet. Mit Hilfe von DEPC-Wasser wurde das Pellet gelöst und die Probe für weitere 10 Minuten bei 60 °C und unter Schütteln suspendiert.

3.4.5.2 cDNA Herstellung

Mit Hilfe eines NanoDrop ND-1000 konnte die RNA-Menge und -Qualität bestimmt und anschließend durch die Verwendung eines cDNA Synthese Kits die RNA in cDNA umgewandelt werden. Für die Transkription wurde pro 1 µg RNA, 1 µl Enzym-Mix, 4 µl Reaction-Mix und DEPC-Wasser verwendet und zu einem finalen Volumen von 20 µl zusammengefügt. Die Einstellungen des Mastercyclers pro S sind in Tabelle 12 zur Übersicht aufgelistet. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

Tabelle 12: Ablauf der cDNA-Synthese

Phase	Zyklen	Temperatur
1.	10 Minuten	25 °C
2.	15 Minuten	50 °C
3.	5 Minuten	85 °C
4.		Abkühlen auf 4 °C

3.4.5.3 Quantitative Polymerasekettenreaktion (real-time PCR)

Für die Durchführung einer quantitativen Echtzeit Polymerasekettenreaktion (real-time qPCR) musste zunächst ein Mastermix bestehend aus 0,5 µl cDNA (25 ng), 3,5 µl DEPC-Wasser, 5 µl SYBR GREEN Super mix, sowie je 0,5 µl (5 pmol) Sense-Strang Primer und Antisense-Strang Primer vorbereitet werden. Es wurde eine 96-Loch Platte verwendet, hierbei erfolgte die Messung der Proben als Triplikate. Nach Pipettieren jeder Probe in die entsprechenden Wells wurde die Platte mit einem Schutzfilm zugeklebt und kurz zentrifugiert. Für die Durchführung der real-time PCR Messung wurde das CFXConnect TM Real-Time PCR-Gerät unter der Zuhilfenahme der CFX Manager 1.6.X Software verwendet. Die einzelnen Phasen und Voreinstellungen der real-time PCR sind

in der Tabelle 13 zusammengestellt. Zur Standardisierung wurden RPS27a und TBP als Housekeeping-Gene verwendet.

Die Analyse der qPCR erfolgte mit der Delta-Delta-CT Methode ($\Delta\Delta CT$).¹⁴⁶ Zur Ermittlung der relativen Expressionsunterschiede wurden die gemessenen CT-Werte verwendet und zum Housekeeping-Gen normalisiert. Zunächst wurde der Mittelwert der gemessenen CT-Werte ermittelt und die Differenz zum Housekeeping-Gen berechnet (ΔCT). Anschließend wurden mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode die relativen Veränderungen der Genexpression mit der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnet. Die graphische Darstellung der Expressionsunterschiede erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism. Eine Übersicht der angewendeten Primer ist in Tabelle 8 aufgelistet. Zur Bestimmung der epithelialen Marker der primär isolierten mTEZ auf Genebene wurden die PCR-Produkte von CK 18, E-Cadherin und ZO-1 im Zusammenhang mit dem Housekeeping Gen β -Aktin zusätzlich durch eine Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt und durch UV-Licht visualisiert.

Tabelle 13: Ablauf der real-time PCR

Phase	Zyklen	Temperatur
Initiation	1 x 3 Minuten	95 °C
Denaturierung	15 Sekunden	95 °C 60 °C 72 °C
Primerhybridisierung (Annealing)	30 Sekunden	
Elongation/ Amplifikation	30 Sekunden	
Denaturierung	1 x 30 Sekunden	95 °C
Renaturierung	1 x 30 Sekunden	72 °C
Schmelzpunkt Bestimmung/ - Analyse	115 x 5 Sekunden	72 - 95 °C (0.5 °C pro Zyklus)

3.5 Statistische Analysen

Zur Auswertung der erhobenen Daten wurde die Software GraphPad Prism 5.02 verwendet. Die Normalverteilung der Variablen wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft. Bei Normalverteilung der Daten wurde eine statistische Signifikanz mittels one-way ANOVA und anschließendem Tukey's Multiple comparison Test überprüft. Konnte nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden, wurde der Kruskal-Wallis Test und folgendem Dunn-Posthoc Test angewendet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler des Mittelwerts (Standard error of the mean; SEM) angegeben. Zur Ermittlung einer Signifikanz der Korrelationen wurde mit dem Spearman-Test unter Einbeziehung aller untersuchten Gruppen ermittelt. Als statistisch signifikant wurden $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Primäre mTEZ sind *in vitro* durch einen epithelialen Phänotyp gekennzeichnet

Zur Erforschung der regenerativen Fähigkeit von Cisplatin-geschädigtem Nierenepithelgewebe erfolgte zu Beginn die Etablierung einer primären Zellkultur aus murinem Nierengewebe. In Abbildung 7 sind die Isolationsschritte zur Gewinnung primärer mTEZ dargestellt.

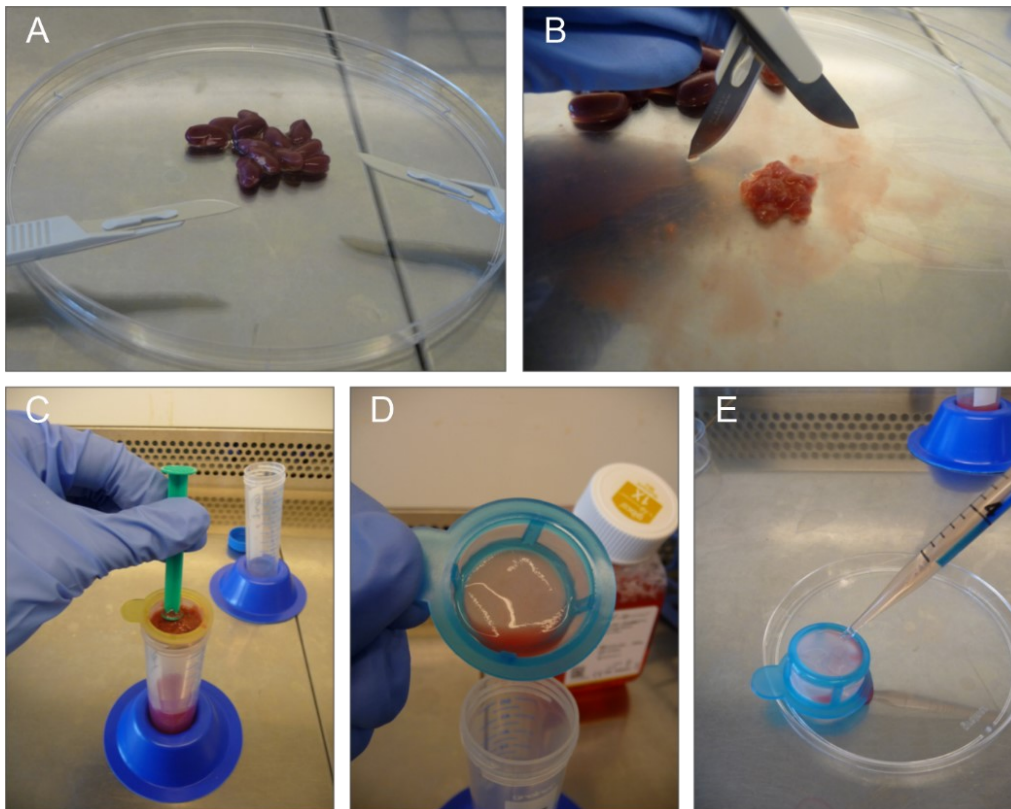


Abbildung 7: Isolationsschritte zur Gewinnung primärer mTEZ. A) Isolierte Nieren aus C56BL/6 WT Mäusen. B) Entfernung der Nierenkapsel- und Hilumanteile, anschließend Zerkleinerung des Gewebes mittels „crossed blades“. C) Inkubation des zerkleinerten Nierengewebes mit einer Kollagenase Enzymlösung zur Herstellung einer Einzelzellsuspension, Filtration und Passage durch Nylonnetz der Größe 100 µm mit Hilfe eines Spritzenstempels. D) Filtration durch ein 70 und 40 µm Nylonnetz. E) Invertieren und Spülen des Zellrückstands aus dem 40 µm Nylonnetz, Aufnahme der Zellen mit mTEZ Standardmedium zur Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂.

In der *in vitro* Kultivierung kam es durch Proliferation zur Vermehrung der Zellen bis zur Konfluenz. Morphologisch zeigte sich in den frühen Passagen (Abb. 8A) ein homogenes Erscheinungsbild der Primärzellen. Die Zellen stellten sich rundlich mit zentriertem Zellkern dar. Mit zunehmender Passage beobachtete man teils spindelförmige Zellen, deren Ausläufer sich netzwerkartig miteinander

verbunden und ein pleomorphes Muster zeigten. Trotz dieser Vielgestaltigkeit kam ein grundsätzlich regelmäßiger Zellrasen zur Darstellung. Zur Charakterisierung der isolierten und kultivierten Primärzellen als Zellen epithelialen Ursprungs wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit Pan-Cytokeratin durchgeführt. Mit Hilfe fluoreszierender Antikörper wurde das gezielte Antigen markiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Es zeigte sich eine homogene Färbung des Zytoskeletts im Zytoplasma der isolierten Zellen (Abb. 8B). Um den epithelialen Ursprung der isolierten Zellen zusätzlich zu bestätigen, wurde das mRNA-Expressionsprofil epithelialer Marker mit Hilfe einer PCR und anschließendem Nachweis der Produkte durch eine Agarose-Gel-Elektrophorese gezeigt (Abb. 8C). Die sich darstellenden Größen der PCR-Produkte entsprachen den jeweiligen zu erwartenden Produkten der verwendeten Primer von CK18, E-Cadherin und ZO-1, sodass das Gen-Expressionsmuster der isolierten Zellen als epithelial bestätigt wurde.

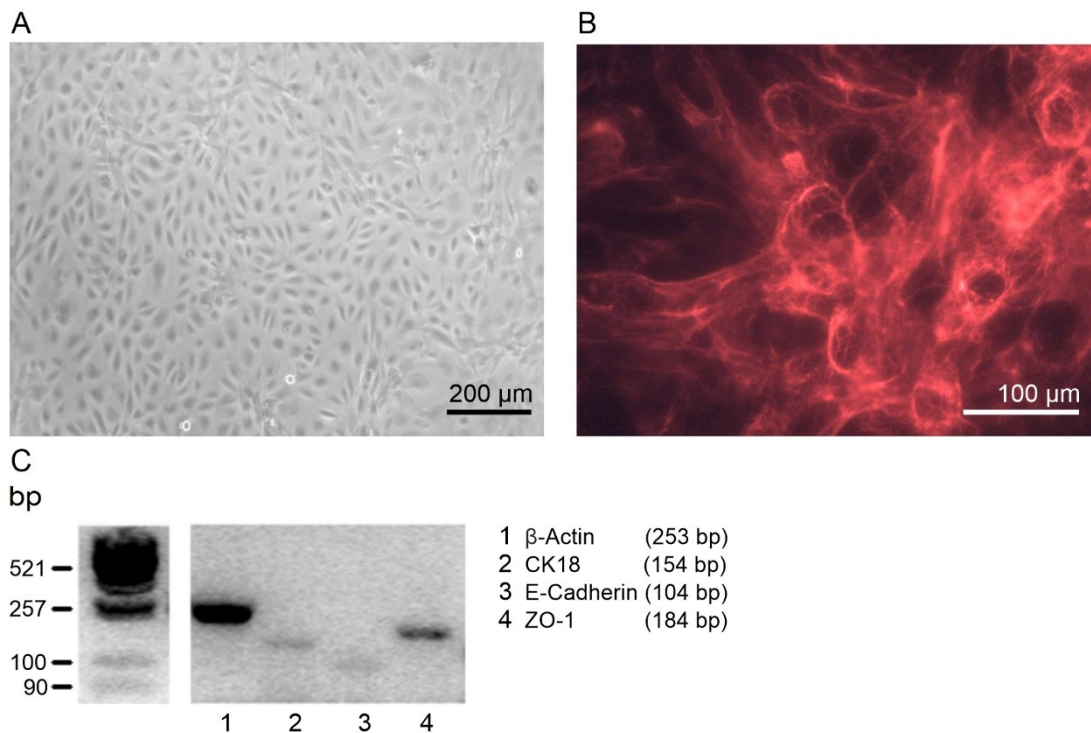


Abbildung 8: Kultivierung primärer mTEZ mit Darstellung eines epithelialen Phänotyps. A) *In vitro* Kultivierung von mTEZ, Darstellung einer frühen Passage mit homogener, epithelialer Morphologie, Maßstab 200 µm. B) Immunfluoreszenzfärbung nach Pan-Zytokeratin, Maßstab 100 µm. C) mRNA Expression von CK-18, E-Cadherin und ZO-1 der isolierten primären Zellen analysiert mittels PCR und Agarose-Gel-Elektrophorese.

4.1.1 Die Schädigung von mTEZ durch Inkubation mit Cisplatin ist dosisabhängig

Zur Darstellung einer Cisplatin-induzierten Schädigung von Nierengewebe, die zu einer akuten Niereninsuffizienz führen kann, erzielten wir dies *in vitro* durch Inkubation muriner Tubulusepithelzellen mit Cisplatin. Um das Ausmaß der Zytotoxizität durch Cisplatin an mTEZ beurteilen zu können, wurde eine Cisplatin-Verdünnungsreihe erstellt und die Inkubation mit kultivierten Zellen über 24 und 48 Stunden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte im Vergleich zur ungeschädigten Kontrolle mit einer XTT-Viabilitätsmessung. Überlebende Zellen nehmen das XTT-Reagenz auf und wandeln es in einen Formazan-Farbstoff um. Die gemessene optische Dichte, die photometrisch detektiert werden kann, verhält sich annähernd proportional zur Zellaktivität und somit zum Zellüberleben. Die prozentuale optische Dichte (OD) errechnete sich in Relation zur ungeschädigten Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Analyse zeigte, dass mit steigender Cisplatin-Konzentration die optische Dichte der Zellen und somit die Anzahl lebensfähiger Zellen vermindert war (Abb. 9). Somit schädigte Cisplatin die mTEZ und reduzierte deren Überlebensfähigkeit. Mit steigender Cisplatin-Konzentration sank die Überlebensfähigkeit. Zwischen der Kultivierung der Cisplatin-Verdünnungsreihe über 24 oder 48 Stunden zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Um den Versuchsaufbau hinsichtlich einer adäquaten Dosis-abhängigen Schädigung, die eine Regeneration und weiterführende Untersuchungen zulässt, zu evaluieren, wurde der Versuchsaufbau durch Kultivierung der mTEZ mit 5 % oder ohne FCS variiert. Bei Zugabe von 5 % FCS zeigte sich in allen Gruppen ein erhöhter Überlebensanteil der mTEZ verglichen mit mTEZ, die ohne FCS kultiviert waren. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für den folgenden Versuchsaufbau eine Cisplatin-Konzentration von 5 μ M ohne Zugabe von FCS festgelegt. Dies repräsentierte eine ausreichende Schädigung der Zellen, die jedoch zusätzlich einen Anteil überlebender mTEZ mit Regenerationspotenzial abbildete.

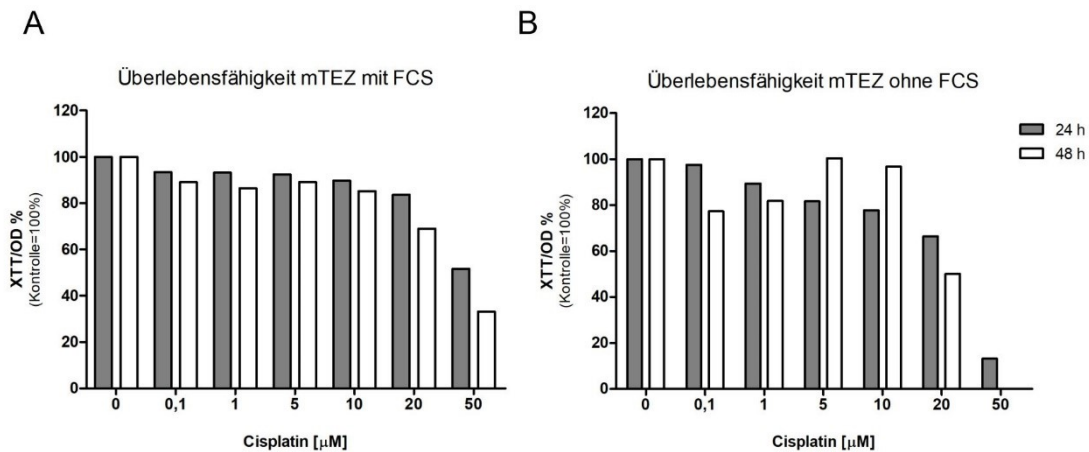


Abbildung 9: Nachweis der dosis-abhängigen Zytotoxizität von Cisplatin. A) Inkubation von mTEZ mit steigender Cisplatin-Konzentration 0,1; 1; 5; 10; 20; 50 μM . XTT-Viabilitätsmessung der prozentualen optischen Dichte (OD %) des umgesetzt Farbumschlags lebensfähiger Zellen in Relation zur unstimulierten Kontrolle (100 %) über 24 und 48 Stunden (h). B) Reduzierte Überlebensfähigkeit mTEZ bei Kultivierung ohne FCS, n = 3.

4.2 IL-10-stimulierte Makrophagen bilden einen pro-regenerativen, Eisen-freisetzenden Phänotyp aus

4.2.1 Polarisierung von Makrophagen erzeugt einen pro-regenerativen Phänotyp

Um eine mögliche regenerative Wirkung von Makrophagen auf geschädigte mTEZ in Abhängigkeit von Lcn-2 zu untersuchen, wurden Zellen aus dem Knochenmark von WT als auch Lcn-2^{-/-} Mäusen isoliert und kultiviert (Abb. 10A). Anschließend erfolgte die Untersuchung der IL-10-stimulierten Makrophagen auf ihre phänotypischen Eigenschaften.

Zur Analyse der IL-10-stimulierten WT Makrophagen wurde zunächst das Zytokinprofil auf Genebene untersucht. Mit der Durchführung einer quantitativen Echtzeit-PCR (real-time qPCR) konnte die inflammatorische als auch pro-regenerative Regulation auf mRNA Ebene untersucht werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10B dargestellt. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ergab die Analyse der IL-10-stimulierten Makrophagen eine Hochregulation der pro-regenerativen Marker Makrophagen Mannose Rezeptor (MRC), Chitinase 3-like 3 (YM-1) und CD163. Im Gegensatz dazu erfolgte die Reduktion der inflammatorischen Mediatoren IL-1 β , TNF- α und NOS in der Isoform iNOS.

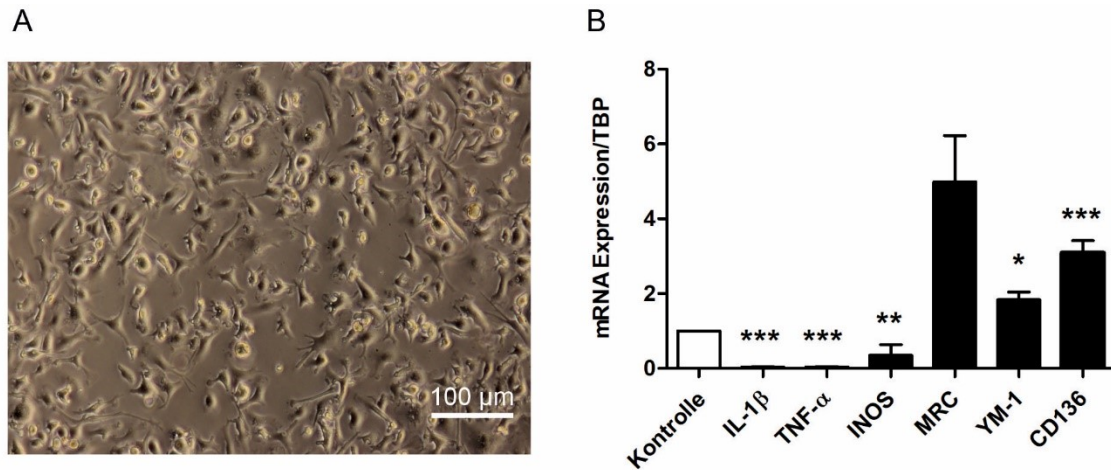


Abbildung 10: IL-10-stimulierte primäre Mφ bilden einen anti-inflammatorischen Phänotyp aus. A) *In vitro* Abbildung isolierter und kultivierter primärer Wildtyp Mφ, Maßstab 100 μm B) mRNA Expression pro-inflammatorischer (IL-1β, TNF-α, INOS) und anti-inflammatorischer Marker (MRC, YM-1, CD136) von IL-10-stimulierten Mφ als quantitative Messung mittels qPCR, normalisiert zu TBP, Auswertungen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; Ergebnisse als Mittelwert ± SEM, n=5; t-Test, *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001.

4.2.2 Pro-regenerative Makrophagen bilden einen Eisen-freisetzenden Phänotyp aus

Im Hinblick auf den Einfluss von Makrophagen im Eisenmetabolismus wurde die Eisen-speichernde oder Eisen-freisetzende Aktivität der kultivierten Makrophagen untersucht. Zur Quantifizierung des Eisengehaltes von IL-10-stimulierten WT Makrophagen erfolgte die Analyse des Zellüberstandes mittels AAS. Hierbei kam es nach Stimulation mit IL-10 zum signifikanten Anstieg des Eisengehaltes im KM der Makrophagen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, das für eine mit IL-10-assoziierte Eisenfreisetzung von Makrophagen spricht (Abb. 11A). Um die Freisetzung von Lcn-2 in Abhängigkeit von der Makrophagen Polarisierung abzubilden, wurde das antikörperbasierte Messverfahren ELISA angewendet. Die Auswertung (Abb. 11B) ergab die Lcn-2 Menge im konditionierten Medium in Abhängigkeit von der Stimulation der Makrophagen mit IL-10. Im KM von IL-10-stimulierten Makrophagen kam es zu einem vermehrten Nachweis von Lcn-2. Um zusätzlich die Eisenbeladung von Lcn-2 der IL-10-polarisierten Makrophagen zu bestimmen, wurde zunächst aus dem KM der Makrophagen mittels Immunpräzipitation das Lcn-2 Protein isoliert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Lcn-2-gebundenen Eisenmenge

mittels AAS. Lcn-2-gebundenes Eisen konnte im KM von IL-10-stimulierten Makrophagen erhöht nachgewiesen werden (Abb. 11C).

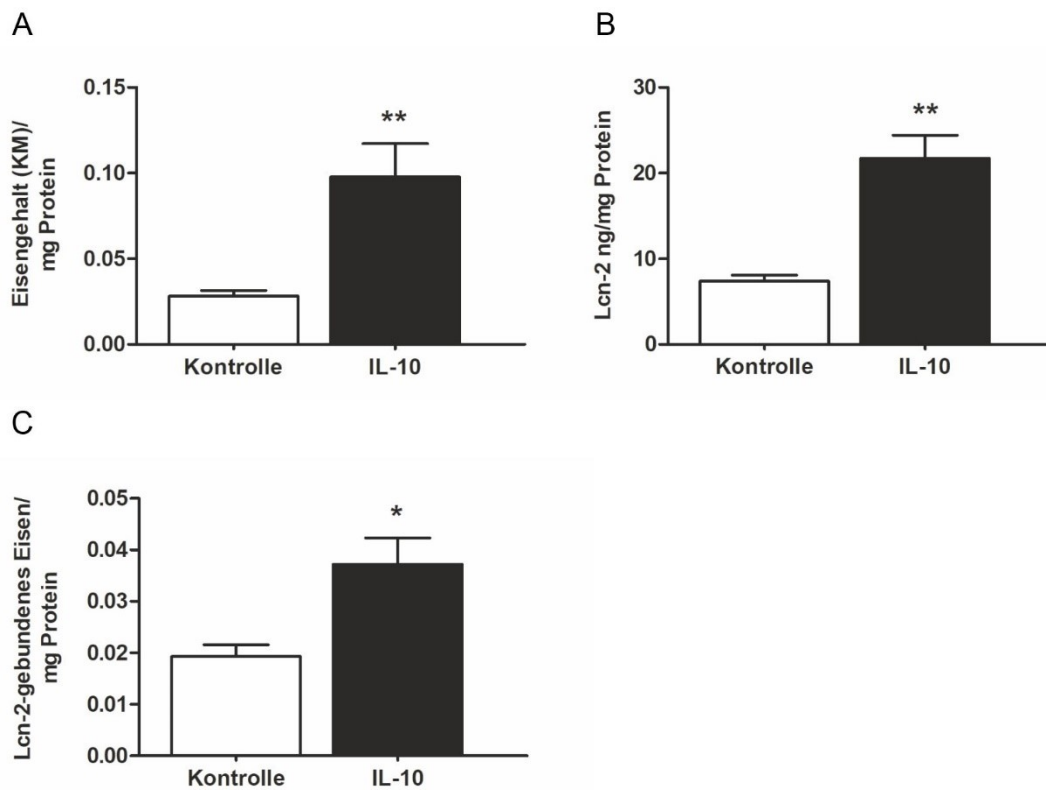


Abbildung 11: IL-10-stimulierte primäre M ϕ bilden einen Eisen-freisetzenden Phänotyp aus, der sich durch eine vermehrte Freisetzung von Lcn-2-gebundenen Eisen auszeichnet. A) Quantifizierung des Eisengehaltes im KM IL-10 stimulierter M ϕ mittels AAS. B) Antikörperbasiertes Messverfahren ELISA zur Proteinbestimmung von Lcn-2 in KM von M ϕ in Abhängigkeit von der IL-10 Stimulation. C) Messung des Lcn-2-gebundenen Eisengehaltes nach IP von Lcn-2 und anschließender AAS-Messung des Eisengehaltes relativ zum Proteingehalt im KM von M ϕ , Auswertungen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM, n=5; t-Test, *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass IL-10-stimulierte WT Makrophagen einen anti-inflammatorischen, pro-regenerativen Phänotyp ausbilden, der sich durch die Freisetzung von Eisen auszeichnet. Zusätzlich kommt es zur vermehrten Freisetzung von Lcn-2 aus den Makrophagen. Dieses konnte als Eisen-beladenes Lcn-2 nachgewiesen werden.

4.3 Die Regeneration von mTEZ nach Cisplatin Schädigung durch KM aus Makrophagen ist abhängig von Lcn-2 und Eisen

4.3.1 Rekombinant-hergestelltes Lcn-2 bindet Eisen über eine Eisen-Katecholbindung

Im Rahmen der Versuchsdurchführung erfolgte zunächst die Herstellung von rekombinanten Lcn-2. Zur Überprüfung des isolierten rekombinanten Lcn-2 Proteins wurde eine Western Blot Analyse mit einem spezifischen Lcn-2 Antikörper durchgeführt (Abb. 12A). Es stellte sich eine charakteristische Bande für Lcn-2 bei 48 kDa dar. Zur Untersuchung der Eisenbindungsfähigkeit des rekombinanten Lcn-2 wurde eine UV-vis Spektroskopie unter Verwendung eines Eisen-Katechol-Komplexes (FeCat) angewendet. Zur Bestimmung der Eisenbindung von Lcn-2 wurde das rekombinante Protein mit dem Eisen-Katechol-Komplex inkubiert. In der Aufzeichnung der UV-vis Spektroskopie (Abb. 12B) wurden zunächst die separaten Kurven des rekombinant-hergestellten Lcn-2 und des Eisen-Katechol-Komplexes beobachtet. Unter Titrieren des Eisen-Katechol-Komplexes zum rekombinanten Lcn-2 kam es ab einer Konzentration von 14,5 μM zur Absorptionsvariation und Veränderung des Kurvenverlaufes und der Kurvenspitze ähnlich zum UV-vis Spektrum des Eisen-Katechol-Komplexes ohne Lcn-2, das als Positivkontrolle diente.

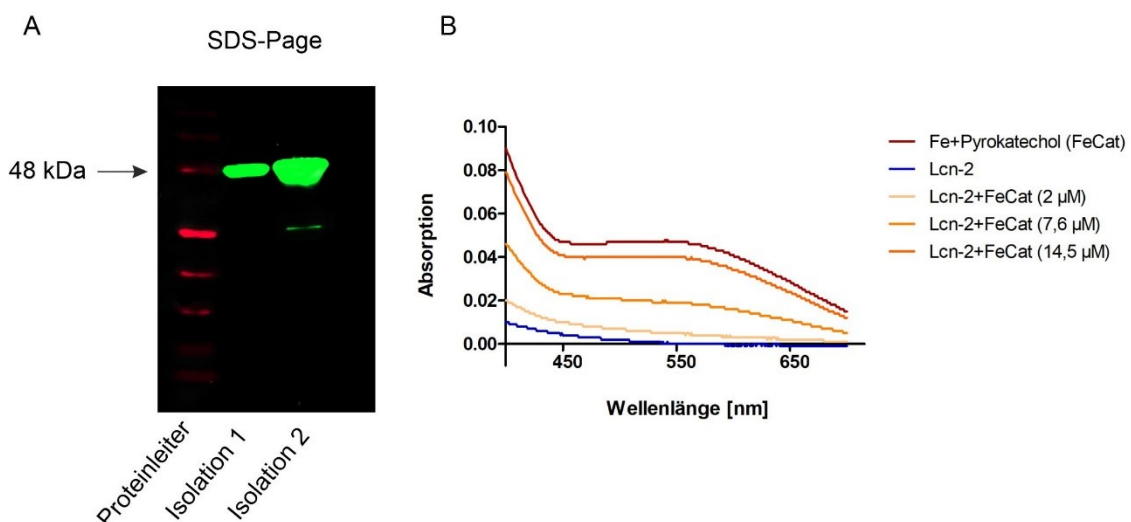


Abbildung 12: Eisenbindung des rekombinant-hergestellten Lcn-2. A) Validierung des rekombinant-hergestellten Proteins Lcn-2 (48 kDa) mittels Western Blot Verfahren, Darstellung im Vergleich zur standardisierten Proteinleiter. B) Komplexbildung des Eisen-Katechol-Komplexes (FeCat) mit Lcn-2 führt zur Verschiebung der Absorption und Veränderung des Kurvenverlaufes visualisiert durch UV-Spektrografie.

4.3.2 Lcn-2 aus Makrophagen fördert die epitheliale Integrität von mTEZ

Um einen regenerativen Effekt von KM von IL-10-stimulierten Makrophagen in Abhängigkeit von Lcn-2 zu untersuchen und an Cisplatin-geschädigten, primären mTEZ darzustellen, wurde das etablierte Cisplatin-induzierte Schädigungsmodell um die anschließende Zugabe von KM von primären WT und Lcn-2^{-/-} Makrophagen, sowie um die Ergänzung von rekombinanten holo-Lcn-2 erweitert.

Zunächst wurde die epitheliale Integrität der Zellen durch Betrachtung von Struktur-bildenden Proteinen des Zytoskeletts untersucht, die als Netzwerk eine Stabilisierung der Zelle und der Zellintegrität bilden. ZO-1, E-Cadherin und β -Catenin sind Stabilisatoren von Zell-Zell Kontakten. Bei der Untersuchung dieser Proteine auf mRNA-Ebene gelten sie als richtungsweisende epitheliale Marker und bestimmen ein funktionsfähiges Zytoskelett. Im Anschluss an eine Cisplatin-induzierte Schädigung der mTEZ wurde nach Zugabe von KM aus WT Makrophagen eine signifikante Hochregulation von ZO-1, E-Cadherin und β -Catenin beobachtet, die auf die Induktion von Regenerationsmechanismen der geschädigten Zellen hinweisen (Abb. 13). Bei Verwendung von KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen bleibt die Wirkung aus. Dagegen konnte dieser Effekt durch die Zugabe von rekombinanten holo-Lcn-2 aufgehoben werden und verdeutlicht, dass die regenerative Wirkung auf das Zytoskelett und der zellulären Integrität von mTEZ durch Lcn-2 aus Makrophagen vermittelt wurde.

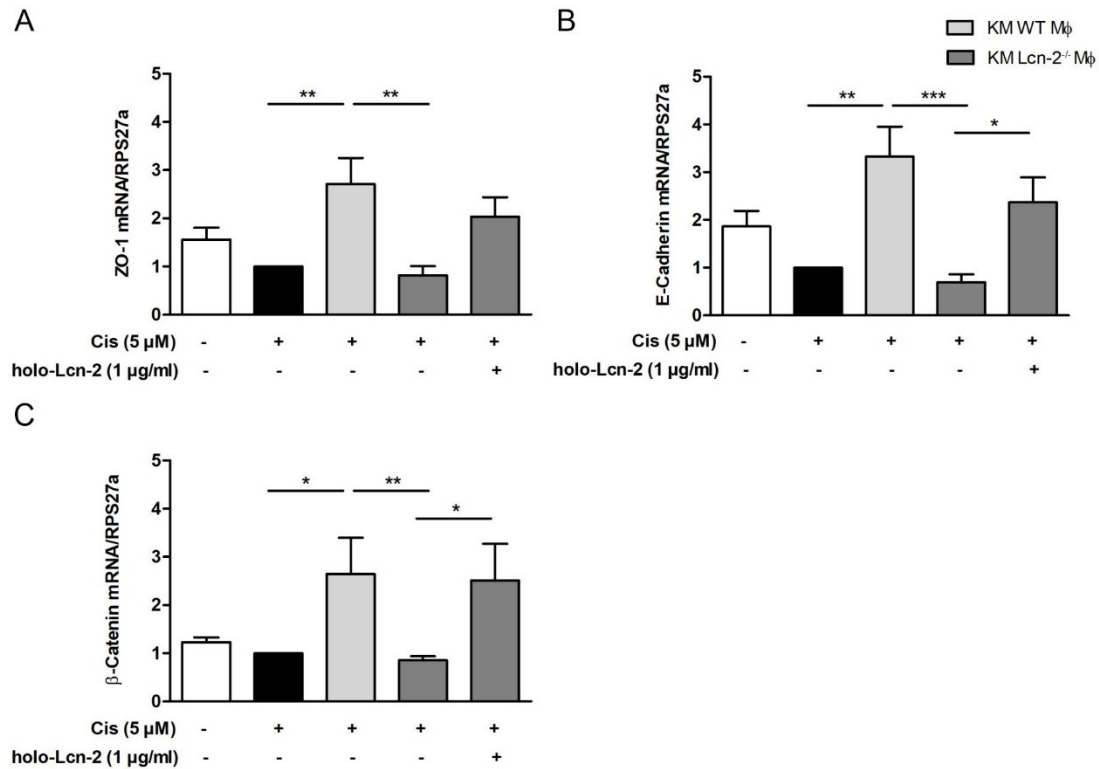


Abbildung 13: Lcn-2-vermittelte Regeneration der zellulären Integrität und des epithelialen Phänotyps. A) mRNA Expression von ZO-1 B) E-Cadherin und C) β -Catenin in mTEZ quantifiziert durch qPCR-Analyse; normalisiert zum Housekeeping Gen RPS27a; Auswertungen im Vergleich zur Schädigung mit 5 μ M Cisplatin, Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM, n=6; One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, bei nicht normalverteilten Daten Kruskal-Wallis Test und Dunn-Posthoc Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

Ergänzend wurde das Aktin-Zytoskelett der mTEZ durch eine Phalloidin-Färbung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie visualisiert, um eine Veränderung der zellulären Struktur einerseits durch die Cisplatin-Schädigung und andererseits bei Regeneration zu beurteilen (Abb. 14). Bei Inkubation mit Cisplatin kondensierte das durch Phalloidin markierte Aktin-Zytoskelett, lagerte sich an die Zellwand an und verdeutlichte die Schädigung der mTEZ. Die Applikation von KM aus WT Makrophagen induzierte die Reorganisation der inneren Zell-Architektur und ein homogenes Verteilungsmuster des Aktin-Zytoskeletts. Diese Auswirkungen konnten unter Verwendung von Lcn-2^{-/-} Makrophagen nicht beobachtet werden. Auch hier bestätigte sich unter Zuführen von rekombinanten, Eisen-beladenen Lcn-2 eine visualisierte Regeneration der Zellstrukturen durch ein gleichmäßig verteiltes Muster des Aktin-Zytoskeletts und indiziert eine Wiederherstellung der Zellintegrität und des zellulären Erscheinungsbildes.

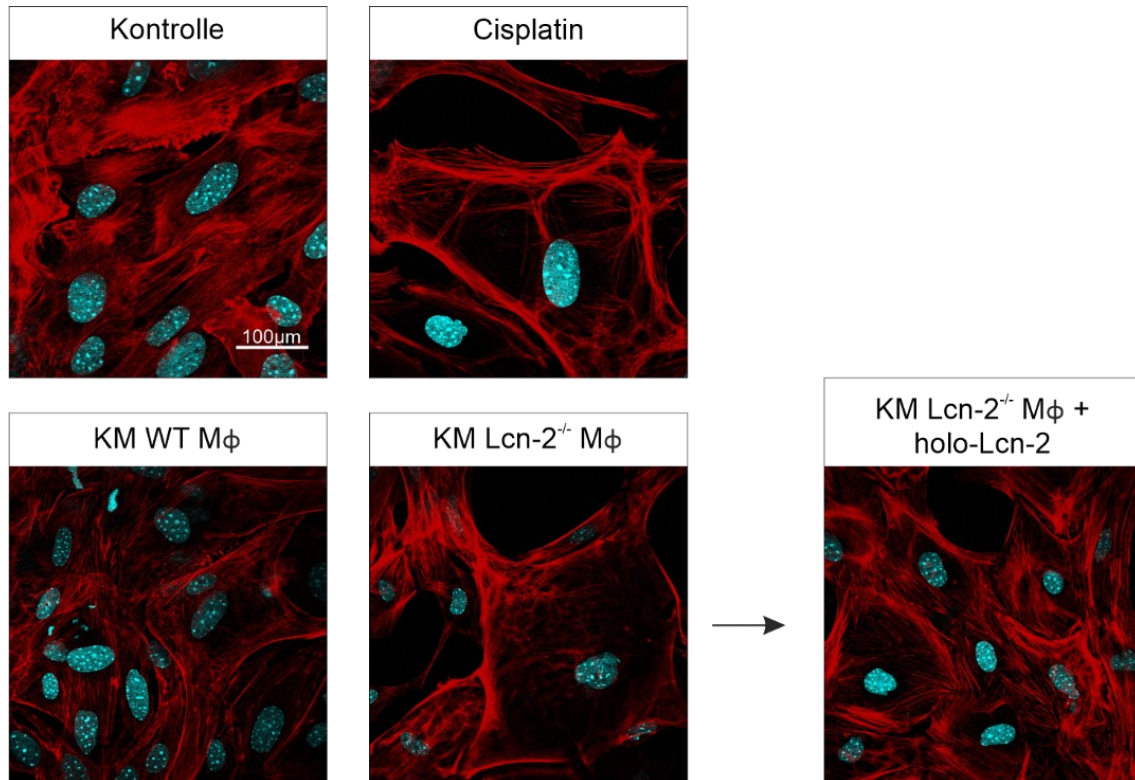


Abbildung 14: Die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts wird durch Lcn-2 induziert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Phalloidin-Färbung mit Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts (rot) sowie des Zellkerns mit DAPI-Färbung (blau) mTEZ. Kondensation der Aktinfilamente nach Cisplatin-Schädigung, Regeneration nach Zugabe von KM aus WT Mφ, Rescue bei Zugabe von holo-Lcn-2 zu KM Lcn-2^{-/-} Mφ; Maßstab 100 µm.

Auf Proteinebene wurde die epitheliale Regeneration von mTEZ mit Hilfe des Schädigungsmarkers KIM-1 und des Nieren-spezifischen Protektivfaktors Klotho untersucht. Während eines akuten Nierenschadens herrscht ein Mangel an Klotho, wohingegen es in Phasen der Regeneration zu einem Anstieg kommt. Bei der Proteinanalyse mittels Western-Blot Verfahren zeigte sich bei Cisplatin Schädigung muriner Tubulusepithelzellen ein Anstieg von KIM-1 und die Minderung von Klotho (Abb. 15). Eine Reduktion der Schädigung und somit Trend zur Regeneration konnte bei der Inkubation von mTEZ mit KM aus WT Makrophagen durch den Abfall der KIM-1 Konzentration beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kam es bei KM von Lcn-2^{-/-} Makrophagen zu keinem signifikanten Abfall des KIM-1 Proteins. Außerdem wurde nur eine leichte, jedoch nicht signifikante Reduktion von KIM-1 unter Ergänzung von rekombinanten holo-Lcn-2 beobachtet.

Entsprechend ergab die Analyse des Proteins Klotho keine relevante Erhöhung von Klotho weder nach Zugabe von KM von WT noch von Lcn-2^{-/-} Makrophagen.

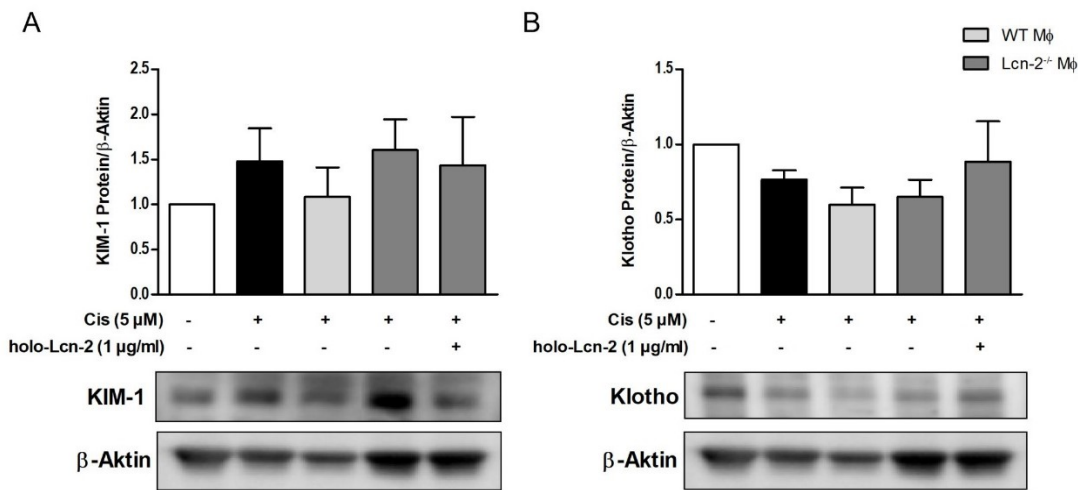


Abbildung 15: Zellschädigung und -regeneration auf Proteinebene mittels Analyse des Schädigungsmarkers KIM-1 und Protektivfaktors Klotho. A) Proteinexpression von KIM-1 (44 kDa) und B) Klotho (130 kDa) im Vergleich zu β-Aktin ermittelt durch Western Blot Analyse; densitometrische Auswertung, Ergebnisse als Mittelwert ± SEM, n=3.

4.3.3 Die Induktion der Proliferation geschädigter mTEZ ist Lcn-2 vermittelt

Die Regeneration geschädigter Zellen ist neben einer Stabilisierung der epithelialen Integrität zudem durch die Zunahme proliferativer Prozesse gekennzeichnet. Hierzu wurde die Expression von Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) und Stathmin auf mRNA Ebene untersucht. Die Verwendung von KM aus WT Makrophagen induzierte die Expression von PCNA und Stathmin in Cisplatin-geschädigten mTEZ signifikant (Abb. 16A). Im Unterschied dazu konnte bei KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen keine erhöhte Stathmin und PCNA Expression beobachtet werden. Die Zugabe von rekombinanten holo-Lcn-2 zu KM von Lcn-2^{-/-} Makrophagen steigerte die Expression von PCNA signifikant. Ergänzend wurde eine Hochregulation von Stathmin beobachtet.

Die Proliferation wurde zudem in einer Echtzeitmessung mit der xCELLigence Methode quantifiziert (Abb. 16B). Die Messungen bestätigten eine Abnahme der Proliferation der mTEZ in Folge der Cisplatin-Schädigung. Mit dem anschließenden Zufügen von KM aus WT Makrophagen wurde ein signifikanter Anstieg der Wachstumsrate nachgewiesen, wohingegen das KM aus

Lcn-2^{-/-} Makrophagen zu keinem Proliferationsanreiz in der xCELLigence Messung führte. Der pro-proliferative Effekt ließ sich aber durch die zusätzliche Administration von rekombinanten, Eisen-beladenen Lcn-2 signifikant steigern, sodass es zu einer deutlichen Proliferation der mTEZ bei Verwendung von KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen unter Ergänzung von holo-Lcn-2 kam. Zusammenfassend bewirkte KM von IL-10-stimulierten Makrophagen eine verbesserte epitheliale Integrität und gesteigerte Proliferation Cisplatin-geschädigter muriner Tubulusepithelzellen. Dabei zeigte sich, dass es bei der Verwendung von KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen zu keiner Regeneration der murinen Tubulusepithelzellen kam und die Regeneration nur durch die Zugabe von rekombinanten, holo-Lcn-2 induziert und verstärkt werden konnte.

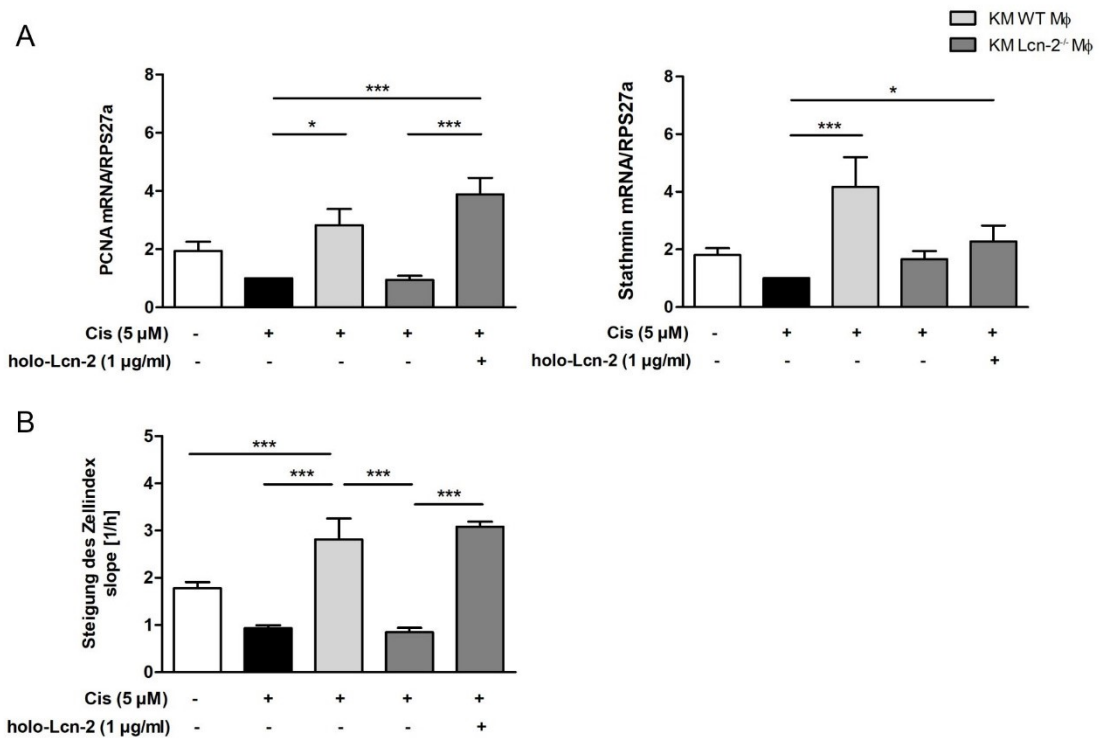


Abbildung 16: Proliferation Cisplatin-geschädigter mTEZ durch Eisen-beladenes Lcn-2. A) mRNA-Expression von PCNA und Stathmin in mTEZ analysiert durch qPCR relativ zum Housekeeping Gen RPS27a, Auswertungen im Vergleich zur Schädigung mit 5 μ M Cisplatin B) Proliferation von mTEZ nach Cisplatin Schädigung durch Stimulation mit KM aus WT M ϕ sowie nach Zugabe von holo-Lcn-2 zu Lcn-2^{-/-} M ϕ gemessen als Wachstumsrate in xCELLigence im Vergleich zu Cisplatin-geschädigten mTEZ; Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM, n \geq 5; One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, bei nicht normalverteilten Daten Kruskal-Wallis Test und Dunn-Posthoc Test, *p \leq 0,05, **p \leq 0,01, ***p \leq 0,001.

4.3.4 Eisen-abhängiges Recovery durch Makrophagen-sezerniertes Lcn-2

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit die Bereitstellung von Eisen an sich regenerierende Zellen durch Makrophagen-sezerniertes Lcn-2 bestimmt wird und Einfluss auf die Proliferation geschädigten Zellen nimmt. Hierfür wurde zunächst der Eisengehalt im Zelllysate der mTEZ nach Cisplatin-Schädigung und im Anschluss nach Stimulation mit den konditionierten Medien durch Anwendung der AAS gemessen (Abb. 17A). Infolge der Inkubation mit Cisplatin reduzierte sich der intrazelluläre Eisengehalt. Nach Stimulation der geschädigten mTEZ mit dem KM von WT Makrophagen erhöhte sich der Eisengehalt im Zelllysate signifikant. Diese Erhöhung der intrazellulären Eisenmenge indiziert eine durch das konditionierte Medium von Makrophagen vermittelte Aufnahme von Eisen in die Zellen. Im Gegensatz dazu kam es zu keinem Anstieg des Eisengehaltes bei Zugabe von KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen. Als Hinweis darauf, dass KM aus Makrophagen die Eisenaufnahme in mTEZ Lcn-2 abhängig fördert, wurde ein Rescue-Versuch durch die Zugabe von Eisen-beladenen Lcn-2 zu Lcn-2^{-/-} Makrophagen untersucht. Durch das Hinzufügen von holo-Lcn-2 wurde ein signifikanter Anstieg des intrazellulären Eisengehaltes in mTEZ gemessen und bestätigte die Lcn-2-vermittelte Eisenaufnahme der Zellen.

In einer Korrelation zwischen der Eisenmenge im Zelllysate der mTEZ aller Versuchsgruppen in der AAS und der Proliferationsrate in der xCELLigence Messung (Abb. 17B) ergab sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Eisengehalt und der Proliferation der Zellen. Dabei zeigte sich, dass mit steigendem Eisengehalt der Zellen eine stärkere Proliferation assoziiert war. In Zusammenhang mit der erhöhten zellulären Eisenaufnahme kam es zum gesteigerten Wachstum und somit zur Förderung von regenerativen Prozessen in den geschädigten mTEZ.

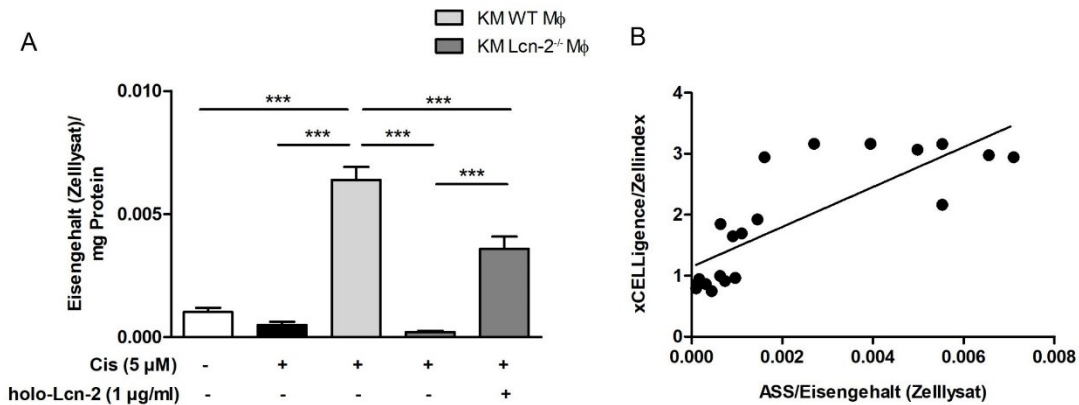


Abbildung 17: Die Regeneration mTEZ ist abhängig von der Bereitstellung von Lcn-2-gebundenem Eisen aus M ϕ . A) Bestimmung des Eisengehaltes im Lysat unterschiedlich stimulierter mTEZ mittels AAS; Mittelwert \pm SEM, n=6, One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, ***p \leq 0,001. B) Korrelation des Eisengehaltes gemessen aus dem Lysat von mTEZ unter Einbezug aller Versuchsgruppen mittels AAS und der Wachstumsrate durch xCELLigence; Spearman r=0.862; p < 0.001.

Ergänzend wurden diese Erkenntnisse durch die Überprüfung der Überlebensfähigkeit geschädigter mTEZ unter Stimulation mit den konditionierten Makrophagen-Medien mit Hilfe des XTT-Viabilitätsassays untersucht (Abb. 18). Dabei wurde kein signifikantes Ergebnis beobachtet, aber es zeigte sich ein prozentualer Anstieg lebensfähiger Zellen bei Zugabe von KM aus WT Makrophagen als auch beim Hinzufügen von rekombinanten holo-Lcn-2.

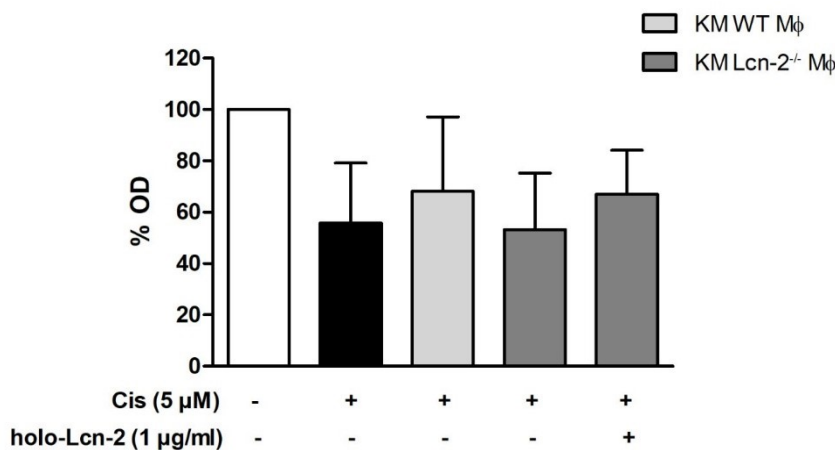


Abbildung 18: M ϕ -sezerniertes Lcn-2 fördert die Überlebensfähigkeit mTEZ. Überlebensfähigkeit Cisplatin-geschädigter mTEZ nach Inkubation mit KM aus M ϕ in Abhängigkeit von Lcn-2 quantifiziert durch XTT-Viabilitätsmessung. Prozentualen optischen Dichte (OD %) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100 %); Ergebnisse als Mittelwert \pm SEM, n=3.

Zusammenfassend wurde die Vitalität von mTEZ nach Cisplatin-induzierter Schädigung durch die Inkubation mit konditioniertem Medium von IL-10-stimulierten Makrophagen gesteigert. Hierdurch konnte einerseits eine Regeneration der Zellintegrität und des epithelialen Phänotyps der mTEZ wiederhergestellt werden, andererseits konnte eine durch Eisen-beladenes Lcn-2 induzierte Proliferation der geschädigten Zellen nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung von IL-10-polarisierten Makrophagen auf Cisplatin-geschädigte primäre renale Tubulusepithelzellen zu untersuchen. Hierbei sollte ein tieferes Verständnis von Schädigungsmustern und Reparaturprozessen erreicht werden, um mögliche zukünftige therapeutische Optionen zu evaluieren. In Hinblick darauf, dass Eisen essenziell für die Zellproliferation ist und die pro-regenerative Funktion von Lcn-2 einen etablierten Faktor während der akuten Nierenschädigung darstellt, bildet ihre Verknüpfung einen relevanten Forschungsinhalt. Aufgrund der regulatorischen Funktion von Makrophagen in der Eisenhomöostase gewährleisten sie, durch das Recyceln von Eisen, dessen Bereitstellung bei der zellulären Regeneration und steuern über die Freisetzung von Lcn-2 den Eisentransport in der Mikroumgebung. Im Zentrum der Forschungsfrage stand, inwieweit eine pro-regenerative Wirkung IL-10-stimulierter Makrophagen auf die Tubulusepithelzellen von der Verfügbarkeit von eisenbeladenem Lcn-2 abhängig ist.

5.1 Verlauf einer akuten Nierenschädigung

Unzureichend frühzeitige Erkennungsmarker und spezifische Therapiemöglichkeiten erschweren die Behandlung einer akuten Nierenschädigung, sodass die Wahrscheinlichkeit von Langzeitfolgen mit der Schwere der Erkrankung ansteigt.¹⁴⁷ Die an den aktuellen Kriterien einer akuten Nierenschädigung orientierte Einleitung einer Behandlung ermöglicht es nicht, frühzeitig und spezifisch zu therapieren. Der Kreatininwert ist seit Jahren grundlegendes Element von Bewertungsmethoden sowie essentieller Bestandteil von Assessmentinstrumenten und Diagnosekriterien, obgleich er als Biomarker nur eine geringe Sensitivität und Spezifität aufweist.¹⁴ Neben der begrenzten Sensitivität und Spezifität schneller Veränderungen gibt der Kreatininwert zudem keine Hinweise auf die Ätiologie, Lokalisation oder das Ausmaß der Schädigung.^{10,148} Dem entsprechend beurteilt die GFR nur die Filtrationsaufgabe des Glomerulus als einen Teilbereich der Nierenfunktion,²⁴ sodass auf der Suche nach alternativen Kriterien zur Diagnostik, Überwachung und Prognostik einer akuten Nierenschädigung andere körpereigene Biomarker

in den Fokus treten. Lcn-2 überzeugt als Biomarker in der akuten Nierenschädigung, da es frühzeitig und prädiktiv eine Nierenschädigung aufzeigt. Einerseits dient der Nachweis von Lcn-2 im Serum und Urin dadurch als sensitive, nicht-invasive Nachweismethode einer akuten Nierenschädigung, die mit dem Grad der Schädigung von Tubulusepithelzellen einhergeht.^{21,80} Andererseits zeigen die wissenschaftlichen Erkenntnisse von Lcn-2, dass sich Lcn-2 als protektiver Faktor bei Nierenschädigung erwiesen hat.^{21,93,95} Mit dem Wissen um die Reparaturfähigkeit der Niere liegt der Fokus der aktuellen Forschung neben dem frühzeitigen Erkennen einer Nierenschädigung auf zusätzlichen regenerativen Faktoren. Denn das Erholungsmuster der Niere spiegelt die Möglichkeit zwischen Regeneration und Langzeitschaden wider.¹⁴⁹ Hierbei entdeckten Kellum et al. anhand elektronischer Daten von 16.000 erkrankten Patienten, dass eine frühzeitige, schnelle Erholung mit kurzer intensivmedizinischer Betreuung und kürzerem Krankenhausaufenthalt sowie mit einem guten Langzeitüberleben (1-Jahr-Langzeitüberleben, 90,2 % Häufigkeit) einherging.¹⁴⁹ Klinische Interventionen, welche die Regenerationsmechanismen der Niere unterstützen, könnten demnach zukünftig das Potenzial haben das Patientenüberleben zu verbessern.⁷

Um eine akute Nierenschädigung auf den Pathomechanismen zu untersuchen, etablierte sich in experimentellen Arbeiten anderer Forschungsgruppen ein IRI, das durch Induktion einer renalen Ischämie typische strukturelle und funktionale Veränderung hervorruft und mit einem Anstieg der Nierenretentionsparameter einhergeht.^{21,93,114} Hierbei konnte ein Abfall der glomerulären Filtrationsrate durch verminderte Perfusion sowohl bei Menschen als auch bei Versuchstieren beobachtet werden.¹⁹ Der hauptsächliche Schaden einer akuten Nierenschädigung entsteht in renalen Epithelzellen des proximalen Tubulus, da die dort befindlichen Zellen besonders anfällig für eine Minderperfusion als auch für toxische Einflüsse sind.^{6,14} Aufgrund der primär nephrotoxischen Wirkung am proximalen Tubulus²⁵ bildet Cisplatin ein ähnliches Schädigungsmuster wie das Modell einer induzierten Ischämie ab.^{150,151} Durch die Reduktion der Nierendurchblutung in Folge eines erhöhten Gefäßwiderstandes in der Niere führt Cisplatin zur Abnahme der glomerulären Filtrationsrate sowie zum Anstieg der Retentionsparameter.²⁵ Das Cisplatin-Schädigungsmodell ist

gekennzeichnet durch das frühe Auftreten pathophysiologischer Veränderungen, die der akuten Nierenschädigung jeglicher Ätiologie entsprechen.¹⁵² Dadurch ist die Cisplatin-induzierte Nierenschädigung auch in experimentellen *in vitro* Untersuchungen ein häufig verwendetes und etabliertes Modell. In der aktuellen experimentellen Arbeit wurde eine Zellkultur aus primär isolierten Nierentubulusepithelzellen etabliert, da sich Zellen der Primärkultur durch ihre physiologischen Eigenschaften auszeichnen und zur Untersuchung biochemischer Prozesse als relevant präsentieren.¹⁵³ Primär isolierte und kultivierte Zellen zeichnen sich *in vitro* durch ihre erhaltene Zellpolarität und intakte Zell-Zell Verbindungen aus, sodass charakteristische Eigenschaften der ursprünglichen Zellen erhalten bleiben und die isolierten Zellen als repräsentative Zellkultur einzuschätzen gilt.¹⁵⁴ Die Etablierung der vorliegenden *in vitro* Untersuchung an primären mTEZ nach Cisplatin-induzierter Schädigung ermöglichte somit die kultivierten Zellen in Bezug auf deren regeneratives Potenzial zu untersuchen.

Es wurde für die Isolation primärer renaler Tubulusepithelzellen eine Vorlage gemäß Dekel et al. verwendet,¹⁵⁵ die in ähnlicher Weise in bereits etablierten experimentellen Versuchsreihen angewendet wurde.^{156,157} Unter Verwendung einer Pan-Zytokeratin Immunfluoreszenzfärbung sowie über eine quantitative PCR-Untersuchung wurden die isolierten Zellen epithelialen Ursprungs bestätigt. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen, erfolgte keine weiterführende Differenzierung der isolierten Zellen als proximale Tubulusepithelzellen z.B. über Immunfluoreszenzfärbung des spezifischen Markers Megalin oder immunmagnetische Trenntechnik.^{156,158} Mit dem Wissen, dass primär isolierte und *in vitro* kultivierte Zellen der Niere unterschiedlichen Ursprüngen entstammen und eine unterschiedliche Stabilität ihrer charakteristischen Marker aufweisen können, erhöht die Wahrscheinlichkeit einer Dedifferenzierung der Zellen in der Zellkultur.¹⁵³ Hierbei zeigte sich, dass kultivierte proximale Tubuluszellen im Vergleich zu Zellen vom distalen Nierentubulussystem stabilere charakteristische Kennzeichen aufweisen und distale Tubuluszellen sich tendenziell schneller dedifferenzieren. Die primär isolierten Zellen der aktuellen Untersuchung wurden in der Kultivierung als epithelial bestätigt. Jedoch wäre eine Analyse der isolierten Primärkultur und Zuordnung als Epithelzellen des

proximalen Tubulus für zukünftige Versuchsreihen zu ergänzen. Im Gegensatz dazu, ist es im aktuellen Versuchsaufbau gelungen durch optimale Kulturbedingungen eine hohe Konfluenz der Primärkultur zu erreichen und dadurch wichtige Voraussetzungen zur optimalen Polarisierung, Organisierung des Zytoskeletts und die Zelldifferenzierung zur gewährleisten.¹⁵³

Cisplatin induziert eine zelluläre Schädigung über verschiedene Pathomechanismen. Diese Schädigung bildet sich primär in Form einer tubulären Nekrose und Apoptose^{25,45} vor allem am proximalen Tubulussystems¹⁵² ab. Diesbezüglich konnte eine Cisplatin-abhängige Schädigung der primär isolierten Tubulusepithelzellen spezifisch dargestellt werden. Die aktuellen Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen anderer Forschungsgruppen, dass mit steigender Dosierung eine zunehmende Schädigung von Nierengewebe erfolgt.^{31,45,150,159,160} Die Schwere der Cisplatin-vermittelten Schädigung ist zudem von dem Behandlungszeitraum oder der Dauer der Applikation abhängig.²⁹ Eine ergänzende histologische Betrachtung der geschädigten Zellen unter Verwendung von Zell-Färbetechniken (z.B. konventionelle histologische Beurteilung mit HE-Färbung oder immunhistochemische Färbung mit Annexin V oder TUNEL-Methode) könnte zur Beurteilung des Schädigungsmusters hilfreich sein. Beide immunhistochemische Methoden dienen der Markierung von apoptotischen Zellen,^{161,162} die anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie visualisiert oder durchflusszytometrisch bestimmt werden können.¹⁶³ Zudem wäre eine basale Bestimmung von Lcn-2 in mTEZ auf mRNA- und Proteinebene sowie in Abhängigkeit von der Cisplatin-Dosis eine gute Ergänzung zur Beurteilung der geschädigten mTEZ. Demgegenüber ermöglichte die Vitalitätsmessung mit dem XTT-Überlebensnachweis eine Spanne der Cisplatin Schädigung zu beurteilen und dadurch eine Dosierung zu wählen, die einerseits eine Schädigung abbildet, jedoch durch eine verbleibende Überlebensfähigkeit der Zellen Regeneration zulässt. Darüber hinaus wäre eine Abbildung der Zellviabilität durch ein LDH-Assay oder ein Nachweis proliferativer Marker über eine immunhistochemische Färbung mit Ki-67 oder PCNA denkbar,¹⁶⁴ um eine erhaltene Fähigkeit der mTEZ zur Regeneration in Abhängigkeit von Cisplatin zu bestimmen.

5.2 Regeneration in der Niere

Es ist allgemein anerkannt, dass es zu Beginn einer akuten Nierenschädigung zu einer Entzündungsreaktion kommt und in der Folge Zellen des Immunsystems aktiviert werden, in das Nierengewebe übertreten und als Immunabwehr aktiv unterstützen.^{6,165} Hierbei senden beschädigte proximale Tubulusepithelzellen eine Vielzahl an Signalen wie Biomarker und Zytokine in ihre Mikroumgebung. Einerseits als Kennzeichen ihrer Schädigung, als Abwehrstrategie und zur Aktivierung von Immunzellen. Andererseits, um in der sich anschließenden Regeneration mit Hilfe der infiltrierenden Zellen durch Proliferationsanreize unterstützt zu werden.^{19,90,91} Folglich kommt es zu einer wechselseitigen Aktivierung von geschädigtem Gewebe und Zellen des Immunsystems, die in miteinander vernetzen pathophysiologischen Abläufen interagieren.^{14,49}

Bei Betrachtung des zeitlichen Verlaufs einer akuten Nierenschädigung sind diese pathophysiologischen Abläufe entscheidend darüber, ob es entweder zur Regeneration des Gewebes^{19,91} oder zu einem fibrotischen Umbau mit Ausbildung einer chronischen Nierenerkrankung kommt.⁹⁰ Es gibt zwei wesentliche Hypothesen, die versuchen das regenerative Potenzial der Niere zu erklären. Eine Vermutung besagt, dass Vorläuferzellen in der Niere einen Pool an proliferierenden Zellen bilden, durch den das regenerative Potenzial gewährleistet wird.¹⁶⁴ Andererseits könnte es in den verbleibenden, überlebenden Nierenepithelzellen nach Schädigung zur Dedifferenzierung und anschließender Proliferation kommen. Bonventre et al. konnten diese Abfolge von Veränderungen vermehrt in den Epithelzellen des proximalen Tubulus beobachten und somit die Kapazität des Nierengewebes sich zu regenerieren erklären.^{19,91} Durch die Proliferation der überlebenden Epithelzellen wurde die Lücke im kontinuierlichen Zellrasen geschlossen und durch anschließende Differenzierung die tubuläre Integrität gewährleistet. Entscheidend scheint hierbei, dass Zellen durch lokale Mediatoren und Zell-Zell-Interaktion zur Regeneration angeregt werden. Duffield et al. konnten an geschädigten Nierenepithelzellen von Mäusen in der regenerativen Phase aufzeigen, dass die epitheliale Integrität nicht durch Stammzellen, die aus dem Knochenmark stammen, wiederhergestellt wurde.¹⁶⁶ Es konnte vielmehr nachgewiesen werden, dass durch die Proliferation verbliebener Nierenzellen die Zellintegrität gewahrt

wurde.¹⁶⁶ Somit wurde bestätigt, dass die intrinsische Kapazität der Nierenzellen die Regeneration und Kontinuität der Zellstruktur ermöglicht.¹⁶⁷ Die zellulären Grundlagen der Nierenregeneration sind bisher nicht vollständig geklärt,¹⁶⁴ jedoch ist es eindeutig, dass andere Faktoren Impulse zur Proliferation induzieren und entscheidend zur Regeneration beitragen.⁹⁰

5.2.1 Makrophagen-induzierte Nierenregeneration

Neben einer relevanten Rolle von Makrophagen bei der beginnenden Inflammation der akuten Nierenschädigung, stellen Makrophagen zusätzlich einen entscheidenden Akteur im Rahmen von regenerativen Prozessen dar.¹⁶⁸ Da eine Entzündungsreaktion mit vielseitigen Veränderungen der Gewebeumgebung verbunden ist, kommt es zu einer Polarisierung des Makrophagen Phänotyps. Hierbei zeigen Betrachtungen der epithelialen Wundheilung, dass zu Beginn Immunzellen primär der Abwehr von Erregern dienen und anschließend die Auflösung der Entzündungsreaktion initiieren und das Epithel bei dessen Proliferation und Heilung stützen.¹⁶⁹ Demzufolge erscheinen Makrophagen bei Schädigung der epithelialen Barrierefunktion und der damit initiierten Einwanderung von Immunzellen in verschiedenen Phasen der Wundheilung aktiv und beeinflussen den Verlauf.⁵¹ Durch das inflammatorische Mikromilieu kommt es zu Beginn zur Polarisierung von eingewanderten Monozyten zu klassisch aktivierten Makrophagen, die zunächst eine zunehmende Schädigung der Niere hervorrufen.^{44,152} Jo et al. konnten zeigen, dass eine Depletion von Makrophagen in der akuten Phase der Nierenschädigung mit einer verringerten Tubulusnekrose mit Reduktion der Inflammationsreaktion und Apoptose in Nierenepithelzellen einhergeht.¹⁰¹ Eine Makrophagen Depletion in der akuten, pro-inflammatorischen Phase der Nierenschädigung kann die Entzündungsreaktion und die Nierenschädigung zwar limitieren,⁵⁵ jedoch reicht sie nicht aus, um anschließend eine Regeneration zu induzieren. In diesem Zusammenhang konnten Vinuesa et al. zeigen, dass die Depletion von Makrophagen im IRI bei Mäusen zu einer deutlichen Abnahme auch der regenerativen Prozesse führte und somit der Zeitpunkt des Makrophagen Transfers entscheidend war.¹⁰⁷ Während der Reperfusion, als Zeitpunkt nach Ischämieschaden an dem Regeneration stattfindet, wirkte der Transfer von Makrophagen pro-regenerativ. Entscheidend war hierbei die

Zytokin-Zusammensetzung des Nierengewebes, die sich zu Beginn pro-inflammatorisch und im Verlauf anti-inflammatorisch präsentierte. Für eine Heilung benötigt es demnach eine Interaktion zwischen den Epithelzellen und den Zellen des Immunsystems, um ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren zu ermöglichen.¹⁶⁹

Makrophagen zeichnen sich durch ihre Funktion aus, eindringende Erreger, aber auch körpereigene Zellen wie alte oder funktionsuntüchtige Erythrozyten in der Milz oder apoptotische Zellen zu phagozytieren und gewährleisten hierdurch eine wichtige Aufgabe in der Gewebemöostase.^{133,170,171} Sie führen insbesondere durch ihre Phagozytose-Aktivität zur Elimination von Zelltrümmern.¹¹⁸ Hierfür exprimieren Makrophagen verschiedene Rezeptoren, beispielsweise Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR). Diese sind spezifische Rezeptoren bei der Phagozytose, durch die Makrophagen Erreger, aber auch geschädigte oder apoptotische Zellen erkennen können. Im speziellen können aktivierte PRR's (wie Toll-like-Rezeptoren) intrazelluläre transkriptionelle Mechanismen induzieren, die die zelluläre Aktivität beeinflussen sowie die Produktion von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren in Makrophagen veranlassen.¹⁷² Die Phagozytose von apoptotischen Zellen und das Beseitigen von geschädigtem Gewebe schützt zudem vor einer autoimmunen oder chronischen Entzündungsreaktion,¹⁷³ denn ohne Elimination von geschädigten und apoptotischen Zellen könnten diese eine ständige Aktivierung von lebensfähigen Zellen und von Immunzellen bewirken.¹²¹ Die gezielte Phagozytose von apoptotischen Zellen ist unter dem Begriff Efferozytose bekannt,¹⁷⁴ die den Aktivitätsstatus von Makrophagen direkt beeinflusst und somit auch Auswirkungen auf deren Immunantwort hat.¹⁷⁵ Als Folge der Aufnahme von apoptotischen Zellen in das Phagolysosom verstärken Makrophagen vor allem ihre anti-inflammatorische Immunantwort und unterdrücken die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.^{104,112} Hiermit übereinstimmend ist die Beobachtung, dass Makrophagen bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen mit einer vermehrten Synthese und Ausschüttung von IL-10 reagieren.¹⁷⁶ IL-10 wirkt immunsuppressiv und unterdrückt die pro-inflammatorische Immunantwort.¹⁷² IL-10 gehört zum Zytokin-Repertoire eines alternativ aktivierten Makrophagen.¹²⁰ Zusätzlich ist es eines der bekannten Zytokine, die Makrophagen zu einem pro-regenerativen Phänotyp polarisiert.^{50,109,122} Es wird

deutlich, dass die Signale der Mikroumgebung in der Nierenschädigung einen dynamischen Prozess durchlaufen und hierbei der Kontakt mit apoptotischen Zellen sowie die Zytokin-Signale für eine Änderung des Makrophagen-Phänotyps bestimmend sind.⁵¹ Zusätzlich erscheint die Zytokin-Zusammensetzung entscheidend für die Regeneration der Niere zu sein. Hierbei scheinen regenerative Zytokine wie IL-10 einen positiven und protektiven Einfluss auf das Nierenepithel zu haben.¹⁷⁷

In Einklang mit den experimentellen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde in dieser Untersuchung eine etablierte Methode zur Isolation und Kultivierung von primären BMDM aus Mäusen angewendet,¹¹⁴ bei der differenzierte Makrophagen mit IL-10 stimuliert und anschließend entweder weiterführend untersucht oder ein konditioniertes Medium generiert wurde.^{21,143} Gemäß bisheriger Untersuchungen von uns als auch anderer Forschungsgruppen zeichneten sich Makrophagen, die mit anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder IL-4 stimuliert wurden, durch ihren pro-regenerativen Phänotyp aus,¹⁴¹ der sich auch in der vorliegenden Arbeit durch das Expressionsmuster pro- und anti-inflammatorischer Marker auf mRNA Ebene bestätigen ließ. Zudem konnte nachweisen werden, dass das konditionierte Medium von IL-10-stimulierten Wildtyp Makrophagen auf Cisplatin-geschädigte mTEZ pro-regenerativ wirkte, indem die Proliferation der mTEZ gemessen an den proliferativen Markern PCNA und Stathmin auf Gen-Ebene sowie der Wachstumsrate durch die xCELLigence Methode gefördert wurde. Zudem wurde die epitheliale Regeneration durch eine verbesserte Integrität der zellulären Struktur wiederhergestellt. In diesem Zusammenhang konnten vorherige Forschungsarbeiten zeigen, dass Makrophagen abhängig von ihrem Phänotyp die Mikroumgebung aktiv beeinflussen und die Regeneration in der Niere fördern.^{21,116,166,169,178} Aufgrund ihrer Plastizität können sich Makrophagen den vielseitigen Veränderungen der Gewebeumgebung im Rahmen einer Entzündungsreaktion anpassen, die von pro-inflammatorischen und destruktiven bis hin zu entzündungshemmenden und reparativen Phasen reichen. Viele Forschungsarbeiten postulieren daher einen Wechsel des Makrophagen Phänotyps im Schädigungsgebiet, in Abhängigkeit von der Mikroumgebung und der Dominanz der vorherrschenden Zytokine.^{111,179,180} Es scheint, als seien die zunächst infiltrierenden Makrophagen im Verlauf

unempfindlich für die pro-inflammatorischen Signale, um eine zunehmende anti-inflammatorische Antwort zu induzieren.¹⁷¹ Mit Hilfe der adaptierten Makrophagen-Aktivität liefern pro-regenerative Makrophagen einen entscheidenden Beitrag in der Regeneration von Gewebestrukturen im Nierengewebe,^{111,113,181} nicht nur durch ihre Zytokin-Zusammensetzung, ihre Phagozytose-Aktivität oder durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren,^{112,115} sondern auch, wie bereits initial in dieser Arbeit beschrieben, speziell in Abhängigkeit von Lcn-2 und Eisen.^{21,97,114,178}

5.2.2 Makrophagen und Eisen in der Nierenregeneration

Für die Wiederherstellung der Gewebemöostase gewährleisten Makrophagen zusätzlich zu ihrer Funktion als Teil des Immunsystems, die Regulation der Eisenverfügbarkeit und bilden somit einen wichtigen Koordinator von zellulären Prozessen.¹³² Im geschädigten Nierengewebe ist die Bindung von freigesetztem toxischen Eisen vorrangig wichtig, um oxidativen Stress und den damit assoziierten Zelltod (Ferroptosis) zu verhindern.¹⁸ Makrophagen übernehmen eine zentrale Rolle in der Steuerung der gesamten Eisenhomöostase des Körpers, über die sie Eisen aufnehmen, recyceln und für den Eisenbedarf von Zellen freisetzen können. Da Eisen einerseits eine schädigende Wirkung besitzt und andererseits essenziell für zellulärer Prozesse ist,¹³¹ haben sich regulatorische Mechanismen entwickelt, um ein Gleichgewicht von Eisen auf systemischer und zellulärer Ebene zu gewährleisten. Infolgedessen ist es schlüssig, dass auch in Makrophagen eine Anpassung von Eisen-regulierten Genen und Proteinen entsprechend ihrer Polarisierung erfolgt,¹²¹ sodass einerseits klassisch aktivierte Makrophagen die Verfügbarkeit von Eisen zur Erregerabwehr verhindern und alternativ aktivierte Makrophagen vermehrt Eisen freisetzen, um Zellen bei deren Proliferation und Regeneration zu unterstützen.^{139,140} Insgesamt präsentiert sich die einflussreiche Rolle von Makrophagen in der allgemeinen Gewebe- und Eisenhomöostase sowie deren Präsenz und Funktion in den unterschiedlichen Phasen der akuten Nierenschädigung miteinander verknüpft, sodass die Vermutung naheliegt, dass Makrophagen Eisen im Akutgeschehen aufnehmen und es anschließend in der regenerativen Phase zur Zellproliferation bereitstellen. Vorangegangene Untersuchungen, die den Zusammenhang zwischen pro-regenerativen

Makrophagen und einem Eisen-freisetzenen Phänotyp nachweisen konnten, validierten dies basierend auf einem spezifischen Eisengenprofil.^{140,182} Im Zusammenhang mit der Polarisierung eines pro-regenerativen Makrophagen durch die IL-10 Stimulation, konnte in der aktuellen Untersuchung damit einhergehend eine vermehrte Eisenseisetzung nachwiesen werden. Mit Hilfe des quantitativen Messverfahrens AAS wurde eine erhöhte Eisenkonzentration im Überstand der IL-10-stimulierten Makrophagen sowie von Lcn-2-gebundenem Eisen gemessen. Demzufolge wäre eine ergänzende Untersuchung des Eisengenprofils sinnvoll, um den Eisen-freisetzenen Phänotyp des IL-10-stimulierten Makrophagen auf zellulärer Ebene zu bestätigen und differenziert zu betrachten. Als wichtigstes Protein der Eisenseisetzung wird Ferroportin in Makrophagen in Zusammenhang mit vielfältigen pathophysiologische Ursachen wie Hypoxie oder durch pro-inflammatorische Mediatoren auf Gen-Ebene reguliert.¹⁸³ In alternativ aktivierten Makrophagen konnte eine erhöhte Ferroportin-Konzentration belegt werden,¹²¹ die mit der Eisen-freisetzenen Funktion von Makrophagen einhergeht und die pro-regenerative Wirkung durch den Ferroportin-vermittelten Eisenexport bestätigt.^{132,183} Demzufolge beeinflusst die Verfügbarkeit von Eisen den Makrophagen-Aktivitätsstatus und trägt zum phänotypischen Erscheinungsbild maßgeblich bei.¹⁰⁴ In einer zuvor durchgeführten experimentellen Arbeit unserer Forschungsgruppe konnte bereits eine Assoziation zwischen der IL-10-Polarisierung eines alternativ aktivierten, pro-regenerativen Makrophagen Phänotyps und des erhöhten Eisen-regulierten Genprofils und Proteinlevels von Ferroportin nachwiesen werden.¹⁴¹ Die Veränderung des Eisen-Gen-Profils in Abhängigkeit von der Polarisierung konnte zusätzlich durch die Analyse des IRP-2, Transferrin-Rezeptors und Ferritinen nachgewiesen werden. Des Weiteren bestimmt vermutlich die Eisenseverfügbarkeit der Mikroumgebung den Makrophagen Phänotyp.^{120,139} Hierbei konnten Pereira et al. zeigen, dass ein Eisenmangel den Energiestoffwechsel von humanen Makrophagen und deren immunologische Funktion *in vitro* hinsichtlich eines anti-inflammatorischen Phänotyps beeinflusste.¹⁸⁴ Zusätzlich konnten sie nachweisen, dass ein Eisenmangel in Ratten *in vivo* die Schwere einer Makrophagen-assoziierten Nierenschädigung reduzieren, sodass dies den Zusammenhang zwischen Eisenseverfügbarkeit und dem Makrophagen Phänotyp verstärkte.

Untersuchungen mit IL-10-transduzierten Makrophagen unserer Forschungsgruppe konnten bestätigen, dass es Eisen-abhängig zur Induktion anti-inflammatorischer Marker sowie von Lcn-2 in Makrophagen kam und sich ihr Zusammenhang als regenerativ auf das Zellüberleben auswirkte.²¹ Makrophagen unterliegen demzufolge einer Eisen-abhängigen Polarisierung, die darüber entscheidet, ob Makrophagen Eisen speichern oder freisetzen und folglich eine Proliferation fördern oder nicht. Mit der aktuellen Arbeit konnte übereinstimmend mit anderen Untersuchungen bestätigt werden, dass es in Folge der alternativen Polarisierung von Makrophagen zu einer deutlichen Erhöhung der Lcn-2 Expression kommt.^{21,143} Es konnte nachweisen werden, dass es durch IL-10 Stimulation von Makrophagen zur vermehrten Konzentration von Eisen-beladenen Lcn-2 im konditionierten Medium kommt und wir stellten dies als metabolische Reaktion von Makrophagen zur Hypothese, um dadurch eine Proliferation und Regeneration in geschädigten Nierenepithelzellen zu vermitteln.

5.3 Eisen-gebundenes Lcn-2 wirkt pro-regenerativ

Trotz der Kenntnis, dass Lcn-2 als sensitiver Biomarker der akuten Nierenschädigung gilt und vom Nierenepithel bei Schädigung vermehrt exprimiert wird, konnte Lcn-2 zudem aber auch in proximalen Tubulusepithelzellen während der regenerativen Phase assoziiert werden.⁹⁴ In experimentellen Untersuchungen an Mäusen konnte die intravenöse Gabe von rekombinanten Lcn-2 eine Cisplatin-induzierte Nierenschädigung sowie einen IRI reduzieren,^{93,185} was sich durch eine Abnahme der Apoptoserate als auch durch einen Anstieg der Proliferation in proximalen Tubulusepithelzellen präsentierte. Hierbei konnten Mishra et al. aufzeigen, dass Lcn-2 bei histologischer Betrachtung repräsentativer Nierenabschnitte zu einer geringeren tubulären Schädigung führte.⁹³ Zusätzlich zeigte sich im TUNEL-Assay eine reduzierte Apoptoserate und ein Anstieg PCNA-positiver, proliferierender Tubulusepithelzellen in Assoziation mit der Lcn-2 Administration. Im Gegensatz dazu führte die Injektion eines Lcn-2 Antikörpers im Rahmen eines IRI an Mäusen *in vivo* zur Reduktion der proliferativen Marker Stathmin, PCNA und Ki-67 in der regenerativen Phase des Nierenepithels.¹⁸¹ Vinuesa et al. konnten außerdem aufzeigen, dass die Applikation des Lcn-2 Antikörpers in der frühen Entzündungsphase des IRI die Regeneration nicht limitierte.¹⁸¹ Hierbei war der

proliferierende Effekt von Lcn-2 in der regenerativen Phase abhängig von der Zytokin-Zusammensetzung der Mikroumgebung und assoziiert mit dem Anstieg von IL-10. Darüber hinaus belegte die experimentelle Arbeit von Mori et al., dass eine systemische Gabe von rekombinanten, holo-Lcn-2 in Mäusen in einem *in vivo* IRI einen protektiven Effekt erzielte.⁹⁵ Im Vergleich zu apo-Lcn-2, reduzierte holo-Lcn-2 den Anstieg von Kreatinin, die Schädigung der tubulären Zellstrukturen in der histologischen Betrachtung sowie die Anzahl an TUNEL-positiven, apoptotischen Zellen, sodass Lcn-2 sehr wahrscheinlich durch die Vermittlung von Eisen an Tubulusepithelzellen seine regenerative Wirkung erzielt. In derselben Versuchsreihe wurde der Metabolismus von sowohl systemisch-injizierten Eisen als auch holo- und apo-Lcn-2 über Fluoreszenzmarkierung nachverfolgt. Hierbei konnte zum einen dargestellt werden, dass sich Lcn-2-gebundenes, fluoreszierendes Eisen hauptsächlich in proximalen Tubulusepithelzellen anreichert. Zum anderen konnte durch die Verfolgung des fluoreszierenden Eisens eine Verlagerung beobachtet werden, die vermuten lässt, dass apo-Lcn-2 im Verlauf Eisen aufnehmen und zur Niere transportieren kann.

Holo-Lcn2 vermittelt über Rezeptor-vermittelte Endozytose die Aufnahme von Eisen in die Zelle,^{92,186} für die Eisen als essentielles Spurenelement für grundlegende Stoffwechselprozesse unerlässlich¹³¹ und besonders für das Wachstum von grundlegender Bedeutung ist.^{182,183} Nach einer Zellschädigung benötigt die Zelle Eisen, um über DNA-Replikation proliferative Prozesse zu ermöglichen.¹²⁶ Die anschließende Differenzierung der proliferierenden Zellen gewährleistet die Re-Integrität der Epithelzellen in einen kontinuierlichen Zellrasen.^{91,166} Bei der Zelldifferenzierung konnte nachgewiesen werden, dass Lcn-2 Wachstums- und Proliferationsprozesse in der Niere in Abhängigkeit von seiner Eisenbeladung fördert.^{20,73,92} Im embryonalen Gewebe ist Lcn-2 im fetalen Nierenepithel-, Thymus-, Nebennieren- und Gastrointestinalgewebe nachweisbar.¹⁸⁷ Am Beispiel der embryonalen Entwicklung des harnableitenden Systems förderte Lcn-2 die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Epithelgewebe und vermittelte die Aufnahme von Eisen in diese Zellen.⁹² Im Zuge dessen scheint Lcn-2 die epitheliale Zellstruktur in mesenchymalen Nierengewebe durch holo-Lcn-2 im Vergleich zu apo-Lcn-2 zu fördern.²⁰ Daher

wird vermutet, dass Lcn-2 während der Entwicklung der fetalen Niere Eisen bindet und es den Zellen zur Differenzierung von Epithelien und zur Organogenese bereitstellt.⁸⁶ Die Induktion einer Differenzierung durch Lcn-2 wurde jedoch nicht nur im embryonalen Gewebe beobachtet. Gwira et al. konnten zeigen, dass es *in vitro* zu einer vermehrten Expression von Lcn-2 in Tubulusepithelzellen durch die Stimulation mit dem Hepatozyten-Wachstumsfaktor kommt und Lcn-2 die Integrität des Zellepithels positiv beeinflusst.¹⁸⁸ Hierbei scheint Lcn-2 morphologische Zellstrukturen in Epithelzellen zu fördern und die Organisation von Epithelzellen in das tubuläre System zu stimulieren. Im Sinne der beschriebenen einflussreichen Rolle von Lcn-2 bei Wachstums- und Differenzierungsprozessen, konnten mit der aktuellen Untersuchung vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Es konnte bewiesen werden, dass Lcn-2 die Integrität und Polarität Cisplatin-geschädigter Epithelzellen verbesserte, indem eine signifikant erhöhte Expression der epithelialen Marker E-Cadherin, ZO-1 und β -Catenin in den mTEZ nachweisbar war. Berücksichtigt man zurückliegende Untersuchungen zur Cisplatin-induzierten Schädigung von Nierenepithelgewebe, kennzeichnete sich das geschädigte Gewebe bei histologischer Analyse durch das Auftreten von Schwellung des Zytoplasmas, Zellkernveränderungen, Ablösung der Zellen und Zellverlust als Anzeichen für Zelltod und Zerstörung der Zellintegrität.^{47,159,189,190} Cisplatin induziert demnach den Verlust der Zellpolarität und der Integrität des Zytoskeletts, dass in einer *in vitro* Untersuchung an primären proximalen Nierentubulusepithelzellen von Schweinen durch den Verlust der F-Aktinfasern des Zytoskeletts gekennzeichnet war.¹⁹¹ Außerdem zeigte sich eine Assoziation zwischen der Desorganisation des F-Aktins und apoptotischen proximalen Tubuluszellen.¹⁹² Die Zelladhäsion von proximalen Tubuluszellen im Nierengewebe wird über Integrine gewährleistet, die ein Bindeglied zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix darstellen,¹⁹³ sodass eine Schädigung des F-Aktins zur Zerstörung der Zellintegrität führt. Demzufolge wurde zur Beurteilung der Regeneration zusätzlich zum epithelialen Erscheinungsbild die Integrität der mTEZ untersucht. Mit den zuvor beschriebenen Forschungsarbeiten übereinstimmend, konnte eine Kondensation der F-Aktin Filamente in den Cisplatin-geschädigten und mit Phalloidin-gefärbten mTEZ dokumentiert werden. In Zusammenhang mit Lcn-2 zeigte sich eine deutlich sichtbare Wiederherstellung der Zytoskelett Struktur. Die

Wiederherstellung der Gewebeintegrität in Abhängigkeit von Lcn-2 konnte unsere Arbeitsgruppe bereits in einem *in vitro* Modell an Nierenepithelzellen von Ratten darstellen, in dem diese mit Colchicin geschädigt und mit Lcn-2-defizienten Makrophagen ko-kultiviert oder mit rekombinanten Lcn-2 supplementiert wurden.¹⁹⁴ Auch hier konnte bestätigt werden, dass Lcn-2 zum einen die mRNA Expression des epithelialen Markers E-Cadherin hochregulierte und zum anderen zu einer homogenen und normalisierten Verteilung der Aktinfasern führte. Somit konnte Lcn-2 die Integrität des Zytoskeletts und damit einhergehend einen epithelialen Zellphänotyp wiederherstellen. Insbesondere scheint die Freisetzung von Lcn-2 aus Makrophagen das pro-regenerative Potenzial der geschädigten Tubulusepithelzellen zu beeinflussen.

In Anbetracht der bisherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe lässt sich vermuten, dass die Lcn-2 Freisetzung aus Makrophagen wahrscheinlich der Eisenbindung in einem Milieu dient, in dem Eisen speziell durch die Freisetzung aus geschädigten Zellen verfügbar ist. Kommt es im Rahmen der Wundheilung zur unzureichenden lokalen Bereitstellung von Eisen, führt dies zur verminderten Proliferation von Epithelzellen und verzögerter Regeneration.¹⁹⁵ Demzufolge ist Lcn-2 als wichtiger Lieferant von Eisen in der Wundheilung aktiv und die Bereitstellung von Eisen durch Makrophagen für die Regeneration von Nierenepithelgewebe bei einer akuten Schädigung essentiell wichtig. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie Beobachtungen aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe legen nahe, dass Lcn-2 als alternatives Eisentransportprotein in Makrophagen exprimiert wird und Makrophagen hierdurch Einfluss auf metabolische Abläufe nehmen. Es kann vermutet werden, dass Lcn-2 aus pro-regenerativen Makrophagen durch die Bereitstellung von Eisen-gebundenen Lcn-2 an Zielzellen dort Regeneration, Proliferation und ein vermehrtes Zellüberleben bewirkt.¹⁷ Unsere Arbeitsgruppe konnte mit der Untersuchung an Nierenepithelzellen einer *in vitro* kultivierten Zelllinien unter Sauerstoffmangel verdeutlichen, dass das Vorhandensein von Eisen im Überstand von IL-10 stimulierten, anti-inflammatorischen Makrophagen zur Stimulation der geschädigten Zellen pro-proliferativ und pro-regenerativ wirkte.²¹ Ergänzend konnten wir auch *in vivo* an einem IRI an Ratten unter Infusion von IL-10-voraktivierten, Lcn-2-freisetzenden Makrophagen und Administration eines

Lcn-2 neutralisierenden Antikörpers sowie eines Eisenchelators bestätigt werden, dass das Zellüberleben und der protektive Effekt auf die Nierenepithelzellen von Lcn-2 sowie der Verfügbarkeit von Eisen maßgeblich beeinflusst wurde.

5.4 Makrophagen-sezerniertes Lcn-2 bei der Nierenregeneration

Es wird zunehmend deutlich, dass der Umgang mit Eisen für Makrophagen als auch für das Nierenepithel einen wichtigen Faktor für den Gewebeschutz bildet und eine Koordination zwischen beiden Akteuren, das sich in ihren Gemeinsamkeiten der Stoffwechselprozesse von Eisenverwertung und Eisenhomöostase widerspiegelt, sehr wahrscheinlich macht.⁵¹ Es ist bereits in anderen Pathologien vorbeschrieben, dass die Induktion von Lcn-2 eine Wechselwirkung zwischen Epithelzellen und Zellen des Immunsystems vermittelt.^{196,197} Unter Berücksichtigung unserer Ergebnisse, dass primär isolierte Makrophagen einen Eisen-freisetzenden Phänotyp ausbildeten und verstärkt holo-Lcn-2 im konditioniertem Medium nachweisbar war, sahen wir dies als biologische Reaktion von Makrophagen auf die Stimulation mit IL-10. In Verbindung mit den Ergebnissen erscheint es plausibel, dass Makrophagen im Akutgeschehen mit einer Lcn-2 Sekretion reagieren, Eisen binden und über die Eisen-Freisetzung die folgende Regeneration verbleibender Zellen vermitteln. Es konnte beobachtet werden, dass eine Aktivierung von Makrophagen nach Kontakt mit apoptotischen Zellen erfolgt und dies in Zusammenhang mit Lcn-2 und der Einleitung einer Regeneration gestellt werden.¹⁹⁸ Sola et al. konnten zudem zeigen, dass bei Kontakt von Makrophagen mit apoptotischen Zellen über Shingosine-1-phosphat die Lcn-2 Expression erhöht wurde.¹⁷⁸ Eine ergänzende Arbeit zeigte, dass es zu einer Shingosine-1-phosphat-vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktor STAT3 kommt, wodurch Lcn-2 in Makrophagen induziert wird¹⁹⁹ und über die Lcn-2 Sekretion aus Makrophagen eine Zellregeneration von Nierenepithelzellen nach IRI vermittelt wird.¹⁷⁸ Dabei zeigte Lcn-2 selbst sowie auch der Kontakt mit apoptotischen Zellen einen Einfluss auf die Polarisierung der Makrophagen zu einem pro-regenerativen Makrophagen-Phänotyp.

Um die Wirkung von pro-regenerativen Makrophagen auf mTEZ in Abhängigkeit von Lcn-2 und Eisen zu quantifizieren, wurde in der aktuellen Untersuchung zunächst bestätigt, dass es nach Cisplatin-Stimulation zu einer Abnahme der etablierten proliferativen Marker PCNA und Stathmin in mTEZ kommt.^{178,181,200} Hingegen förderte holo-Lcn-2 aus KM von Makrophagen die Proliferation in Form eines signifikanten Anstiegs der PCNA und Stathmin Expression. Das sahen wir im direkten Vergleich des KM von WT zu Lcn-2^{-/-} Makrophagen und bestätigten dies durch die Zugabe von rekombinanten, holo-Lcn-2 zum KM von Lcn-2^{-/-} Makrophagen. Das ist in Übereinstimmung mit der experimentellen Untersuchung von Kashiwagi et al. an *in vivo* Cisplatin-geschädigten Nieren von Ratten, in der die Anzahl proliferierender, PCNA-positiver Epithelzellen in der immunhistochemischen Untersuchung signifikant mit der Lcn-2 Expression in regenerierenden Tubuluszellen im kortiko-medullären Übergangsbereich korrelierte.¹⁸⁹ Die *in vivo* Untersuchung eines IRI an Ratten unserer eigenen Forschungsgruppe bestätigte bereits eine deutliche Hochregulation von Ki-67 und PCNA im Nierengewebe nach Applikation von Makrophagen, die Lcn-2 überexprimierten.¹¹⁴ Im Gegensatz dazu zeigte sich eine zunehmende Schädigung und Inflammation im Nierengewebe, wenn Lcn-2^{-/-} Makrophagen verwendet wurden und verdeutlichte die anti-inflammatorische und pro-proliferative Wirkung von Lcn-2 aus Makrophagen. Unsere kürzlich veröffentlichte experimentelle Arbeit zur Sepsis-induzierten Nierenschädigung in einem *in vivo* CLP-Mausmodell konnte nachweisen, dass Eisen-beladenes Lcn-2 in Überständen residenter Makrophagen in der regenerativen Phase vermehrt nachweisbar und mit der Regeneration in Form einer erhöhten PCNA und Stathmin Expression assoziiert war.⁹⁷ Hingegen war die Lcn-2 Konzentration in der Akutphase in Überständen von Nierentubulusepithelzellen erhöht, in der Lcn-2 als Eisen-unbeladenes Protein vorlag und mit der Nierenschädigung korrelierte. Zusätzlich konnte in der aktuellen Untersuchung die proliferative Wirkung von Eisen-beladenen Lcn-2 aus KM von Makrophagen durch den signifikanten Anstieg der Wachstumsrate von behandelten mTEZ im xCELLigence bestätigt werden, das als deutliches Ergebnis einer Lcn-2 vermittelten Regeneration zu werten ist und in Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungsergebnissen ist.¹⁹⁴

Mit Blick auf die physiologische Funktion von alternativ aktivierten Makrophagen im Rahmen der Regeneration und Wundheilung, kann die Makrophagen-Aktivität als ein funktionales Programm verstanden werden, in dem Makrophagen die umgebende Matrix durch Proliferationsanreize oder durch Förderung der Vaskularisation gestalten. Hierbei scheint die Eisen-freisetzende Aktivität von pro-regenerativen Makrophagen als trophischer Faktor wesentlich für die Einhaltung der Gewebemöostase und -regeneration zu sein.¹⁹⁵ Dieses funktionale Programm von Makrophagen konnte auch in der Tumorumgebung beobachtet werden. In Folge des Zellzerfalls von Tumorgewebe erkennen Tumor-spezifische Makrophagen (*engl.* tumor-associated macrophages, TAM) apoptotischen Zellen und phagozytieren diese.²⁰¹ Unsere als auch andere Arbeitsgruppen untersuchten den Tumor-spezifischen Makrophagen Phänotyp, der allgemein dafür bekannt ist, dass er das Tumorstadium fördert und Ähnlichkeit zum Eisen-freisetzenden, alternativ aktivierten Makrophagen Phänotyp aufweist.^{141,182} Der Kontakt zwischen Makrophagen und apoptotischen Zellen in der Tumorumgebung beeinflusst jedoch nicht nur den Makrophagen Phänotyp, sondern bedeutet eine hohe Anforderung an den metabolischen Stoffwechsel von Makrophagen, indem sie zum einen Zellbestandteile aber auch anfallende Substrate wie Eisen aufnehmen, recyceln und wiederbereitstellen.²⁰¹ Vorangegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zum Einfluss von TAM auf die Tumorentwicklung konnten aufzeigen, dass TAM auf den Kontakt mit apoptotischen Tumorzellen mit einer Lcn-2 Expression reagieren.¹⁹⁹ Ergänzend konnten wir nachweisen, dass TAM Lcn-2-gebundenes Eisen in die Mikroumgebung des Tumors freisetzen und in Abhängigkeit von Lcn-2 die Proliferation von Tumorzellen beeinflussen.¹⁴⁴ Bei der Ko-Kultivierung der Brustkrebs-Zelllinie MCF-7 mit KM von Lcn-2^{-/-} Makrophagen konnten wir die Steigerung der Wachstumsrate in Abhängigkeit von Lcn-2 und Eisen bestätigen. Ebenso zeigte sich in unserer Untersuchung des Nierenzellkarzinoms, dass die pro-proliferierende, tumor-förderliche Funktion von Lcn-2 durch dessen Eisenbeladung bestimmt war.²⁰² In diesem Zusammenhang förderte Eisen-beladenes Lcn-2 die Migration und Adhäsion von Tumorzellen in der Mikroumgebung, wohingegen Eisen-unbeladenes Lcn-2 gegenteilig wirkte und wahrscheinlich durch die intrazelluläre Eisenbindung einen Eisenmangel in der Umgebung erwirkte, wodurch Eisen zum Zellwachstum nicht mehr zur Verfügung

stand. In Verknüpfung der Ergebnisse aus eigenen Beobachtungen sowie Devireddy et al. zeigt sich, dass bei zellulärer Aufnahme von Lcn-2 dessen Eisenbeladung ein kritischer Wendepunkt für die Zelle zu sein scheint.^{87,202} Die Eisenbeladung von Lcn-2 scheint somit die zelluläre Antwort auf eine Schädigung entscheidend zu beeinflussen und die Perspektive der Zelle zwischen Zelltod, Differenzierung und Zellüberleben zu bestimmen. Eine Schlussfolgerung daraus könnte sein, dass sowohl TAM als auch alternativ aktivierte Makrophagen im Rahmen von Zellschädigung und Anfall von apoptotischen Zellen durch ihre Eisen-regulierende Rolle ihren metabolischen Stoffwechsel anpassen und als Reaktion auf frei-gewordenes, toxisches Eisen mit der Produktion von Lcn-2 reagieren, das anschließend Eisen bindet und an proliferierende Zellen vermittelt. Mit der aktuellen Untersuchung konnte durch die Zugabe von KM aus sowohl WT und Lcn-2^{-/-} Makrophagen als auch unter Zugabe von rekombinanten holo-Lcn-2 zu geschädigten mTEZ hervorgehoben werden, dass die Eisenbeladung von Lcn-2 ein wichtiges Kriterium für die Regeneration ist. Hierbei wurde beobachtet, dass es in geschädigten mTEZ zu einer erhöhten Aufnahme von Eisen bei Behandlung mit KM von WT Makrophagen und Lcn-2^{-/-} Makrophagen in Kombination mit rekombinanten holo-Lcn-2 kam. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem intrazellulären Eisengehalt der mTEZ und ihrer Proliferation, sodass hierdurch der Zusammenhang zwischen der regenerativen Wirkung von Eisen-gebundenen Lcn-2 und dessen Freisetzung aus pro-regenerativen Makrophagen gestützt werden konnte. Diese Ergebnisse geben Hinweis darauf, dass Makrophagen-sekretiertes Lcn-2 als protektiver Mechanismus in der Cisplatin-induzierten Nierenschädigung wirksam ist.

Das Ziel dieser Arbeit war es, Makrophagen mit deren Eisen-freisetzender Funktion als auch Lcn-2 als Eisentransportprotein im Rahmen von Regenerationsprozessen im Cisplatin-induzierten Nierenschaden zu untersuchen. Mit den aktuellen Ergebnissen konnte aufgezeigt werden, dass aus IL-10-stimulierten Makrophagen-sezerniertes Lcn-2 einen pro-regenerativen Effekt auf die epitheliale Integrität, Proliferation und die Überlebensfähigkeit von Cisplatin-geschädigten murinen Tubulusepithelzellen hatte. Dabei verdeutlichte das Zuführen von rekombinanten, Eisen-beladenen Lcn-2 zu Lcn-2^{-/-} Makrophagen, dass die regenerative Wirkung der stimulierten

Makrophagen maßgeblich durch Lcn-2 vermittelt wurde und es in Abhängigkeit von der Eisenaufnahme der mTEZ die Proliferation stimulierte. In der hier vorgelegten experimentellen Arbeit wurden die Mechanismen der zellulären Aufnahme von Eisen und des zellulären Effekts der Eisenaufnahme nicht vollständig aufgeklärt, sodass es für zukünftige Untersuchungen weiterführend zu untersuchen gilt, inwieweit die Eisen-abhängige und Lcn-2-vermittelte Regeneration Cisplatin-geschädigter mTEZ verläuft. Wir vermuten, dass Lcn-2 aus pro-regenerativen Makrophagen toxisches Eisen, das bei einer Zellschädigung entsteht, bindet und anschließend vermittelt. Hierzu untersuchten wir den Eisengehalt der mTEZ nach Stimulation mit unterschiedlichen konditionierten Medien als repräsentative Technik, denn eine ergänzende Untersuchung der konditionierten Medien vor allem hinsichtlich des rekombinant-hergestellten und Eisen-zugefügten Mediums schloss sich aus. Jedoch wäre für zukünftige Untersuchungen eine weiterführende Analyse der intra- als auch extrazellulären Eisenverfügbarkeit und der molekularen und genetischen Regulationen in mTEZ als auch der IL-10-stimulierten Makrophagen sinnvoll und eine hilfreiche Ergänzung für das Verständnis der Zell-Zell Interaktion und dem Eisenmetabolismus.

Ein anderer hierbei diskutierter Forschungsansatz ist, dass Lcn-2 seine protektive Wirkung an Nierenepithelzellen durch seine Funktion als körpereigener Eisen-Chelator erzielt. In Zusammenhang mit der akuten Nierenschädigung wurde Eisen in seiner katalytischen Form mit verschiedenen Ätiologien und Pathomechanismen assoziiert.^{81,203} Bei der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität wurde bei *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen durch geschädigte und apoptotische Zellen vermehrt freies, ungebundenes Eisen in der Mikroumgebung nachgewiesen, welches bei unzureichender Komplexierung toxisch reagiert und eine zusätzliche Zellschädigung begünstigt.²⁰⁴ Durch diese reaktive Form des Eisens entsteht oxidativer Stress, der von einer Tubulusnekrose bis hin zur Organdysfunktion führen kann.^{17,127} In der Konsequenz bedeutet das zum einen, dass der Körper bereits eigene Mechanismen bei der Instanhaltung der körpereigenen Gewebemöostase besitzt, um dieses überschüssige Eisen zu binden. Zum anderen, dass die Forschung sich diese Mechanismen zu nutzen machen kann, um reaktives Eisen

zu binden und dadurch die Regeneration zu fördern. Um einen Eisenüberschuss in proximalen Tubuluszellen und die damit assoziierte Schädigung im Rahmen einer Nierenschädigung zu reduzieren, wurde die Anwendung von Eisen-Chelatoren überprüft,¹⁷ die bereits aus der Behandlung von Hämochromatose bekannt sind.²⁰⁵ Dabei konnte der Einsatz des Eisen-Chelators DFO als therapeutische Strategie einer akuten Nierenschädigung von Paller et al. sowohl in einer *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchung an primären proximalen Tubulusepithelzellen von Ratten erste Ergebnisse erzielen,^{18,82} in dem die vorherige Applikation von DFO im IRI eine Schwere der Erkrankung senken konnten. Jedoch ist die Anwendung von Chelatoren mit schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Elektrolytentgleisung, neurotoxischer Störung, allergische Reaktion sowie direkten Schäden am Nierentubulussystem assoziiert und muss daher streng überwacht werden.^{22,206,207} Dadurch liegt ein Fokus der Forschung auf der Anwendung von endogenen Eisen-bindenden Proteinen bei der Nierenschädigung, die durch ihre Bindung von Eisen die Bildung von ROS verhindern, sodass die Anwendung von endogenen Eisen-bindenden Proteinen mit der Therapie mit Eisenchelatoren vergleichbar ist und sich womöglich durch weniger unerwünschte Nebeneffekte auszeichnet.²⁰³ Im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens an Myozyten ermöglichte die Verwendung eines bakteriellen Siderophore aus dem *Mycobacterium tuberculosis* eine Reduktion der Schädigung.²⁰⁸ Siderophore sind kleine Moleküle, die ursprünglich in Bakterien entdeckt wurden und über die Lcn-2 eine Eisenbindung mit hoher Affinität erreicht.^{15,74} Bao et al. konnten mit ihrer Analyse an kultivierten Ziellinien der Niere zeigen, dass das konstitutiv produzierte Siderophor Katechol an Lcn-2 bindet und dadurch Eisen komplexiert und recycelt.²⁰⁹ Außerdem konnte *in vivo* durch die Applikation der Eisen-Katecholverbindung und von Lcn-2 in Mäusen dargestellt werden, dass Lcn-2 mit der Eisen-Katecholverbindung einen Komplex bildete und reaktives Eisen vermindert werden konnte. Einerseits wurde der Komplex in verschiedenen Organen wie der Niere in proximalen Tubuluszellen aufgenommen, andererseits wurde ein großer Anteil des Lcn-2-Katechol-Komplexes über den Urin ausgeschieden. In der aktuellen Untersuchung konnte mit der UV-vis-Spektrografie eine feste Eisenbindung zwischen dem rekombinanten Lcn-2 Protein und dem Eisen-Katechol-Komplex vergleichbar mit ähnlichen

Untersuchungen festgestellt werden.^{144,202,209} In Anwesenheit von Lcn-2 kommt es zur Änderung der Bindungsformation, wodurch ein stabilerer Eisen-Katechol-Komplex entsteht.²⁰⁹ Dies führt zu einer Verschiebung der Spektrallinien auf ein höheres Energieniveau, das durch eine geringere messbare Wellenlänge gekennzeichnet ist. Demzufolge kommt es bei Bindung von Lcn-2 mit dem Eisen-Katechol-Komplex zur Verschiebung der Wellenlänge mit einem erniedrigten Absorptionsmaximum im Vergleich zum Eisen-Katechol-Komplex ohne Lcn-2.

In Zusammenhang mit dem Zuführen des rekombinanten, holo-Lcn-2 zu KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen im Vergleich zur alleinigen Zugabe von KM aus Lcn-2^{-/-} Makrophagen in geschädigten mTEZ, konnte die Eisenaufnahme in die Zellen deren Proliferation und Regeneration induzieren. Da Lcn-2 seinen Siderophor-Liganden auch im niedrigen Bereich des pH-Wertes gebunden halten kann, ermöglicht es Lcn-2, seine Eisen-bindende Funktion auch unter pathophysiologischen Bedingungen fortzusetzen.⁸⁰ Daher scheint sich Lcn-2 auch in einer geschädigten Mikroumgebung der Niere, die durch Hypoxie, Entzündung und oxidativem Stress gekennzeichnet ist, durch seine stabile Bindungsfunktion auszuzeichnen und die Eisen-komplexierende Funktion zu bewahren. Barasch et al. generierten eine mutierte Variante des rekombinanten Lcn-2 Proteins, die bei Eisenüberschuss in Mäusen Transferrin- und Citrat-gebundenes Eisen herauslösen, aufnehmen und transportieren konnte. Anschließend vermittelte die Lcn-2 Variante die Ausscheidung von Eisen über den Urin und könnte zukünftig eine Strategie sein, um überschüssiges Eisen über Lcn-2 als Chelator zu binden, auszuschleiden und dadurch toxisches Eisen zu reduzieren.¹⁶ Mit der experimentellen Arbeit konnte zwar gezeigt werden, dass die Lcn-2-Variante Eisen von Transferrin und Citrat herauslösen konnte, jedoch blieb ungewiss inwieweit anderweitig gebundenes Eisen oder der intrazelluläre Eisenspeicher davon beeinflusst wurde, vor allem wenn berücksichtigt wird, dass ein deutlich reduzierter intrazellulärer Eisengehalt ein pro-apoptisches Signal für die Zelle ist. Mori et al. diskutierten mit den eigenen Beobachtungen im IRI an Mäusen, in dem rekombinantes, Eisen-beladenes Lcn-2 appliziert wurde und die regenerative Wirkung der Eisenbindung von Lcn-2 nicht mit einer Chelatorfunktion gleichzusetzen war.⁹⁵ Denn in Kombination des rekombinanten

Lcn-2 Proteins mit dem Chelator Gallium konnte keine vergleichbare Wirkung erzielt werden, sodass die regenerative Wirkung von Lcn-2 auf die Übermittlung von Eisen in die Zelle zurückzuführen war.

Aufgrund der Akkumulation von Eisen bei der akuten Nierenschädigung¹⁷ und weil der menschliche Körper keinen Mechanismus für die Ausscheidung von Eisen besitzt,¹³¹ besteht eine weitere Möglichkeit einen Eisenüberschuss zu verhindern darin, die Eisenresorption bei der Filtration des Blutes in der Niere zu blockieren. Megalin ist ein Rezeptor auf Epithelzellen, der in der Niere von Zellen des proximalen Tubulus exprimiert wird und die Lcn-2-vermittelte Eisenaufnahme in Nierenepithelzellen koordiniert.^{84,86} Physiologisch ist Megalin für die Reabsorption von Lcn-2 und anderer Moleküle während der Filtration des Urins verantwortlich und verhindert dadurch deren Ausscheidung über den Urin.^{210,211} Daher besteht über die Regulation von Megalin die Möglichkeit einerseits die Aufnahme von Eisen-beladenen Lcn-2 zu fördern oder im Gegenteil dazu, über eine verminderte Reabsorption die Ausscheidung von Lcn-2 zu erhöhen und somit wahrscheinlich überschüssiges Eisen zu reduzieren. In einer experimentellen Studie des IRI an Mäusen *in vivo* wurde nachgewiesen, dass sich die Megalin-Expression in der frühen Schädigungsphase reduzierte.¹⁸¹ Da Megalin auch verantwortlich für die Aufnahme von nephrotoxischen Substanzen im proximalen Tubulus ist,²¹² könnte eine verminderte Megalin-Expression auf der Zelloberfläche ein Mechanismus sein, um eine Schädigung der Zellen zu reduzieren.²¹⁰ Im Gegensatz dazu kam es zu einer Hochregulation von Megalin in der späteren regenerativen Phase.¹⁸¹ Diese unterschiedliche zeitliche Expression von Megalin bei der akuten Nierenschädigung ermöglicht die Spekulation, dass Megalin eine unterschiedliche Funktion übernimmt.²¹² In Zusammenhang mit Lcn-2 könnte es bedeuten, dass das in der frühen Schädigungsphase von geschädigten Epithelzellen der Niere sekretierte Lcn-2^{72,80} aufgrund eines verminderten Megalin-Vorkommens nicht aufgenommen, sondern über den Urin ausgeschieden wird. Hinweisgebend hierfür ist, dass es in genetisch veränderten Megalin-knockout Mäusen zu einer erhöhten Ausscheidung von Lcn-2 in den Urin kommt.²⁰ In einem Patientenkollektiv in einer prospektiven Studie mit 14 Patienten konnte ergänzend beobachtet werden, dass es bei einer akuten Nierenschädigung infolge

einer Herzoperation zu einer signifikanten Erhöhung des katalytischen Eisens und von Lcn-2 im Urin kam und der Anstieg miteinander korrelierte.²¹³ Dabei könnte die Komplexierung von Eisen durch Lcn-2 und die anschließende Ausscheidung, das überschüssige und toxische Eisen über den Urin aus der Niere entfernen. Wie Barasch et al. bereits zeigten, konnte eine mutierte Variante des rekombinanten Lcn-2 Proteins Eisen binden und transportieren, aber zusätzlich wurde durch unzureichendes Erkennen durch Megalin die Reabsorption über Megalin umgangen.¹⁶ Als Folge war die vermehrte Ausscheidung der Lcn-2 Variante und des überschüssigen Eisens über den Urin nachweisbar. Demzufolge war das Umgehen der Lcn-2 Reabsorption durch Megalin hilfreich, um Lcn-2 abhängig Eisen über den Urin auszuscheiden. Zusätzlich verstärkte die Beobachtung aber auch die Bedeutung der Megalin-assoziierten Aufnahme von Lcn-2 in Nierenepithelzellen. Denn auf der anderen Seite ist die Hochregulation von Megalin in der regenerativen Phase einer Nierenschädigung mit einer protektiven Wirkung assoziiert,^{93,95} sodass möglicherweise eine Megalin-vermittelte Förderung der Regeneration von Nierentubulusepithelzellen auf die Aufnahme von Eisen-beladenen Lcn-2 zurückzuführen ist. Um diese divergente Regulation und Funktion von Megalin in der akuten Nierenschädigung zu verstehen, könnte es hilfreich sein dies in Kontext mit der dualen Rolle von Lcn-2 und dem Ursprung der Lcn-2 Sekretion zu setzen. Eine von unserer Forschungsgruppe durchgeführte Untersuchung zur Sepsis-induzierten Nierenschädigung verstärkt die Hypothese, dass die zelluläre Quelle und die Eisenbeladung von Lcn-2 entscheidend für dessen Funktion ist.⁹⁷ In dem CLP-induzierten Nierenschädigungsmodell stammte Eisen-beladenes Lcn-2 hauptsächlich von Makrophagen aus der Niere und korrelierte mit der Regeneration des Gewebes. Eisen-unbeladenes Lcn-2 wurde hingegen maßgeblich von Tubulusepithelzellen sezerniert und war in der frühen Schädigungsphase mit den anzeigenden Biomarkern assoziiert.

5.5 Abschließendes Fazit

Die Tatsache, dass sich Makrophagen aufgrund ihrer Plastizität in ihrem Aktivitätsstatus und ihrer Funktion in der Gewebemöostase der Mikroumgebung anpassen können, zeichnet sie als essenzielle Koordinatoren aus. Dies ermöglicht Makrophagen ein großes funktionales Repertoire, durch das sie interaktiv mit dem Zytokin-Milieu des geschädigten Gewebes und dem Epithelgewebe interagieren. Zusätzlich ist ihre Plastizität die Voraussetzung dafür, dass Makrophagen durch Beenden der pro-inflammatorischen Reaktion, durch Elimination von geschädigten und apoptotischen Zellen und anschließender Einleitung einer Regeneration über die Vermittlung von Eisen, sowohl in Abhängigkeit von als auch unabhängig von Lcn-2, die epitheliale Reparatur begünstigen.^{124,169}

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Untersuchung erstmalig an einem *in vitro* Cisplatin-Schädigungsmodell an primären Tubulusepithelzellen gezeigt werden, dass das KM von IL-10-stimulierten, pro-regenerativen Makrophagen die Regeneration, epitheliale Integrität und Proliferation der geschädigten Zellen induziert. Dabei konnte durch den Vergleich zwischen WT und Lcn-2^{-/-} Makrophagen bewiesen werden, dass die regenerativen Prozesse über Lcn-2 vermittelt wurden. Ergänzend verdeutlichte der experimentelle Aufbau, dass die durch Lcn-2 induzierte regenerative Wirkung Eisen-abhängig ist. Die Produktion und Sekretion von Lcn-2 aus Makrophagen kann somit als Reaktion von Makrophagen auf die Signale der Mikroumgebung und als metabolische Signatur gedeutet werden, mit der pro-regenerative Makrophagen Lcn-2-gebundenes Eisen an proliferierende Zellen vermitteln.¹⁴⁴

Somit ergibt sich die finale Hypothese, dass Makrophagen im Rahmen einer Nierenschädigung vermutlich toxisches Eisen geschädigter Zellen über die Ausschüttung von Lcn-2 binden. Anschließend initiiert Lcn-2 in den Zielzellen Proliferation und Regeneration, indem es gebundenes Eisen zur Verfügung stellt (Abb.19).

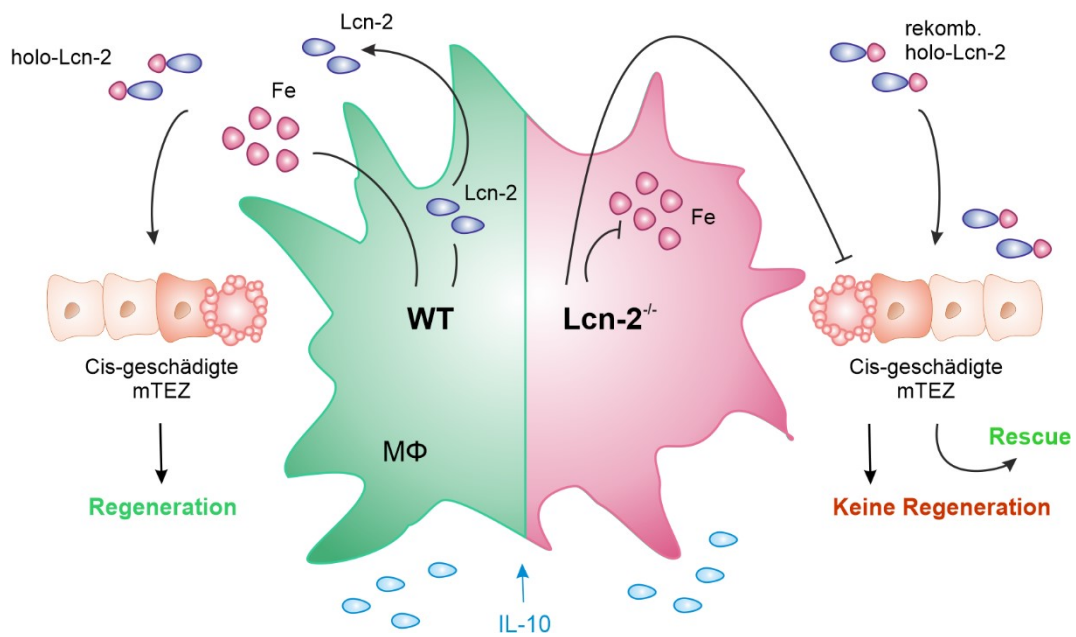


Abbildung 19: Zusammenfassung der Ergebnisse und schematische Darstellung der Hypothese. In Folge der Stimulation von WT M ϕ mit IL-10 bilden diese einen Eisen-freisetzenden Phänotyp aus. Hingegen kommt es in Lcn-2^{-/-} M ϕ zu keiner Eisenfreisetzung in die Mikroumgebung. Zusätzlich kommt es in WT M ϕ zu einer vermehrten Lcn-2 Produktion und Sekretion, das Eisen in der Umgebung bindet und als Eisen-beladenes Lcn-2 (holo-Lcn-2) an Cisplatin-geschädigte mTEZ überträgt und Proliferation und Regeneration vermittelt. Durch die Zugabe von rekombinanten holo-Lcn-2 konnte der negative Effekt von KM aus Lcn-2^{-/-} M ϕ aufgehoben werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Weiss R, Meersch M, Pavenstädt H-J, Zarbock A. Acute Kidney Injury: A Frequently Underestimated Problem in Perioperative Medicine. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(49):833-842.
2. Zeng X, McMahon GM, Brunelli SM, Bates DW, Waikar SS. Incidence, outcomes, and comparisons across definitions of AKI in hospitalized individuals. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(1):12-20.
3. Zarbock A, John S, Jörres A, Kindgen-Milles D. Neue KDIGO-Leitlinien zur akuten Nierenschädigung. Praktische Handlungsempfehlungen. *Anaesthesist.* 2014;63(7):578-588.
4. Khadzhyrov D, Schmidt D, Hardt J, et al. The Incidence of Acute Kidney Injury and Associated Hospital Mortality. *Dtsch Arztebl Int.* 2019;116(22):397-404.
5. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *The Lancet.* 2012;380(9843):756-766.
6. Akcay A, Nguyen Q, Edelstein CL. Mediators of inflammation in acute kidney injury. *Mediators Inflamm.* 2009;2009:137072.
7. Chawla LS, Bellomo R, Bihorac A, et al. Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(4):241-257.
8. Collister D, Pannu N, Ye F, et al. Health Care Costs Associated with AKI. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(11):1733-1743.
9. Devarajan P. Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology (Carlton).* 2010;15(4):419-428.
10. Albert C, Haase M, Albert A, Zapf A, Braun-Dullaeus RC, Haase-Fielitz A. Biomarker-Guided Risk Assessment for Acute Kidney Injury: Time for Clinical Implementation? *Ann Lab Med.* 2021;41(1):1-15.
11. Barasch J, Zager R, Bonventre JV. Acute kidney injury: A problem of definition. *The Lancet.* 2017;389(10071):779-781.
12. Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron. Clinical practice.* 2012;120(4):c179-84.
13. Obermüller N, Geiger H, Weipert C, Urbschat A. Current developments in early diagnosis of acute kidney injury. *Int Urol Nephrol.* 2014;46(1):1-7.

14. Urbschat A, Obermuller N, Haferkamp A. Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers*. 2011;16 Suppl 1:S22-30.
15. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1826(1):129-169.
16. Barasch J, Hollmen M, Deng R, et al. Disposal of iron by a mutant form of lipocalin 2. *Nat Commun*. 2016;7:12973.
17. Martines AMF, Masereeuw R, Tjalsma H, Hoenderop JG, Wetzels JFM, Swinkels DW. Iron metabolism in the pathogenesis of iron-induced kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(7):385-398.
18. Paller MS, Hedlund BE. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. *Kidney Int*. 1988;34(4):474-480.
19. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8):2199-2210.
20. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(2):407-413.
21. Jung M, Sola A, Hughes J, et al. Infusion of IL-10-expressing cells protects against renal ischemia through induction of lipocalin-2. *Kidney Int*. 2012;81(10):969-982.
22. Herold G. *Innere Medizin 2021*. Köln: Herold Gerd; 2020.
23. Kellum JA, Lameire N. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: A KDIGO summary (Part 1). *Crit Care*. 2013;17(1):204.
24. Moore PK, Hsu RK, Liu KD. Management of Acute Kidney Injury: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis*. 2018;72(1):136-148.
25. dos Santos NAG, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Archives of Toxicology*. 2012;86(8):1233-1250.
26. Rozenzweig M, von Hoff DD, Slavik M, Muggia FM. Cis-diamminedichloroplatinum (II). A new anticancer drug. *Ann Intern Med*. 1977;86(6):803-812.
27. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, et al. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: Spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol*. 1996;52(12):1855-1865.

28. Bhat ZY, Cadnapaphornchai P, Ginsburg K, et al. Understanding the Risk Factors and Long-Term Consequences of Cisplatin-Associated Acute Kidney Injury: An Observational Cohort Study. *PLoS ONE*. 2015;10(11):e0142225.
29. Hartmann JT, Kollmannsberger C, Kanz L, Bokemeyer C. Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer. *Int J Cancer*. 1999;83(6):866-869.
30. Ciarimboli G. Membrane transporters as mediators of cisplatin side-effects. *Anticancer Res*. 2014;34(1):547-550.
31. Johnstone TC, Suntharalingam K, Lippard SJ. The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs. *Chem Rev*. 2016;116(5):3436-3486.
32. Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(4):307-320.
33. Kelland LR. Preclinical perspectives on platinum resistance. *Drugs*. 2000;59 Suppl 4:1-38.
34. Jamieson ER, Lippard SJ. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin–DNA Adducts. *Chem Rev*. 1999;99(9):2467-2498.
35. Siddik ZH. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003;22(47):7265-7279.
36. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther*. 1987;34(2):155-166.
37. Yu F, Megyesi J, Price PM. Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;295(1):F44-52.
38. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9100-9106.
39. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012;31(15):1869-1883.
40. Köpf-Maier P, Mühlhausen SK. Changes in the cytoskeleton pattern of tumor cells by cisplatin in vitro. *Chem Biol Interact*. 1992;82(3):295-316.
41. Speelmans G, Sips WH, Grisel RJ, et al. The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1996;1283(1):60-66.

42. Speelmans G, Staffhorst RW, Versluis K, Reedijk J, Kruijff B de. Cisplatin complexes with phosphatidylserine in membranes. *Biochemistry*. 1997;36(34):10545-10550.
43. Litterst CL, Gram TE, Dedrick RL, Leroy AF, Guarino AM. Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum(II) (NSC 119875) to dogs. *Cancer Res*. 1976;36(7 PT 1):2340-2344.
44. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*. 2008;73(9):994-1007.
45. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*. 2010;2(11):2490-2518.
46. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2007;334(2):115-124.
47. Ramesh G, Reeves WB. TNF- α mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest*. 2002;110(6):835-842.
48. Meng X-M, Tang PM-K, Li J, Lan HY. Macrophage Phenotype in Kidney Injury and Repair. *Kidney diseases (Basel)*. 2015;1(2):138-146.
49. Zuk A, Bonventre JV. Acute Kidney Injury. *Annual review of medicine*. 2016;67:293-307.
50. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-969.
51. Huen SC CLG. Macrophages in Renal Injury and Repair. *Annu Rev Physiol*. 2017;79:449-469.
52. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
53. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*. 2000;164(12):6166-6173.
54. Ysebaert DK, Greef KE de, Vercauteren SR, et al. Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15(10):1562-1574.
55. Ikezumi Y, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ. Interferon-gamma augments acute macrophage-mediated renal injury via a glucocorticoid-sensitive mechanism. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(4):888-898.

56. Thomas C, Thomas L. Renal failure--measuring the glomerular filtration rate. *Dtsch Arztebl Int.* 2009;106(51-52):849-854.
57. Pschyrembel W. *Klinisches Wörterbuch: Mit klinischen Syndromen.* 252., durchges. und verb. Auflage Reprint 2020. Berlin/Boston: De Gruyter; 2021.
58. Endre ZH, Pickering JW, Walker RJ. Clearance and beyond: the complementary roles of GFR measurement and injury biomarkers in acute kidney injury (AKI). *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301(4):F697-707.
59. Schrezenmeier EV, Barasch J, Budde K, Westhoff T, Schmidt-Ott KM. Biomarkers in acute kidney injury - pathophysiological basis and clinical performance. *Acta Physiol (Oxf).* 2017;219(3):554-572.
60. Kashani K, Cheungpasitporn W, Ronco C. Biomarkers of acute kidney injury: the pathway from discovery to clinical adoption. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55(8):1074-1089.
61. Edelstein CL. Biomarkers of acute kidney injury. *Advances in chronic kidney disease.* 2008;15(3):222-234.
62. Gauer S, Sichler O, Obermüller N, et al. IL-18 is expressed in the intercalated cell of human kidney. *Kidney Int.* 2007;72(9):1081-1087.
63. Devarajan P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23(2):194-200.
64. Wu H, Craft ML, Wang P, et al. IL-18 contributes to renal damage after ischemia-reperfusion. *JASN.* 2008;19(12):2331-2341.
65. Yin C, Wang N. Kidney injury molecule-1 in kidney disease. *Ren Fail.* 2016;38(10):1567-1573.
66. Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(11):3265-3268.
67. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, et al. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(7):4135-4142.
68. Kjeldsen L, Cowland JB, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1482(1-2):272-283.

69. Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengeløv H, Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*. 1993;268(14):10425-10432.
70. Kjeldsen L, Bainton DF, Sengeløv H, Borregaard N. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel matrix protein of specific granules in human neutrophils. *Blood*. 1994;83(3):799-807.
71. Flower. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J*. 1996;34(6):84.
72. Abella V, Scotece M, Conde J, et al. The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers*. 2015;20(8):565-571.
73. Yang J, Mori K, Li JY, Barasch J. Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2003;285(1):F9-18.
74. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell*. 2002;10(5):1033-1043.
75. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004;432(7019):917-921.
76. Recalcati S, Locati M, Cairo G. Systemic and cellular consequences of macrophage control of iron metabolism. *Semin Immunol*. 2012;24(6):393-398.
77. Berger T, Togawa A, Duncan GS, et al. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to Escherichia coli infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(6):1834-1839.
78. Paragas N, Kulkarni R, Werth M, et al. α -Intercalated cells defend the urinary system from bacterial infection. *The Journal of clinical investigation*. 2014;124(7):2963-2976.
79. Haase M, Devarajan P, Haase-Fielitz A, et al. The outcome of neutrophil gelatinase-associated lipocalin-positive subclinical acute kidney injury: A multicenter pooled analysis of prospective studies. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(17):1752-1761.
80. Paragas N, Qiu A, Hollmen M, Nickolas TL, Devarajan P, Barasch J. NGAL-Siderocalin in kidney disease. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1823(9):1451-1458.

81. De Vries B, Walter SJ, Bonsdorff L von, et al. Reduction of circulating redox-active iron by apotransferrin protects against renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2004;77(5):669-675.
82. Paller MS, Hedlund BE. Extracellular iron chelators protect kidney cells from hypoxia/reoxygenation. *Free radical biology & medicine*. 1994;17(6):597-603.
83. Smith CP, Thévenod F. Iron transport and the kidney. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1790(7):724-730.
84. Langelueddecke C, Roussa E, Fenton RA, Wolff NA, Lee W-K, Thévenod F. Lipocalin-2 (24p3/neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)) receptor is expressed in distal nephron and mediates protein endocytosis. *J Biol Chem*. 2012;287(1):159-169.
85. Cabedo Martinez A-I, Weinhäupl K, Lee W-K, et al. Biochemical and Structural Characterization of the Interaction between the Siderocalin NGAL/LCN2 (Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin/Lipocalin 2) and the N-terminal Domain of Its Endocytic Receptor SLC22A17. *J Biol Chem*. 2016;291(6):2917-2930.
86. Hvidberg V, Jacobsen C, Strong RK, Cowland JB, Moestrup SK, Borregaard N. The endocytic receptor megalin binds the iron transporting neutrophil-gelatinase-associated lipocalin with high affinity and mediates its cellular uptake. *FEBS Lett*. 2005;579(3):773-777.
87. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell*. 2005;123(7):1293-1305.
88. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:395-419.
89. Des Richardson R. 24p3 and its receptor: dawn of a new iron age? *Cell*. 2005;123(7):1175-1177.
90. Bonventre JV. Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. *Contrib Nephrol*. 2010;165:9-17.
91. Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14 Suppl 1:S55-61.
92. Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin. *Mol Cell*. 2002;10(5):1045-1056.

93. Mishra J, Mori K, Ma Q, et al. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(12):3073-3082.
94. Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2534-2543.
95. Mori K, Lee HT, Rapoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(3):610-621.
96. Grigoryev DN, Liu M, Hassoun HT, Cheadle C, Barnes KC, Rabb H. The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(3):547-558.
97. Mertens C, Kuchler L, Sola A, et al. Macrophage-Derived Iron-Bound Lipocalin-2 Correlates with Renal Recovery Markers Following Sepsis-Induced Kidney Damage. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(20).
98. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(12):953-964.
99. Labonte AC, Tosello-Trampont A-C, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells*. 2014;37(4):275-285.
100. Hume DA. Differentiation and heterogeneity in the mononuclear phagocyte system. *Mucosal Immunol*. 2008;1(6):432-441.
101. Jo S-K, Sung S-A, Cho W-Y, Go K-J, Kim H-K. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(5):1231-1239.
102. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*. 2008;118(11):3522-3530.
103. Li L, Huang L, Sung S-SJ, et al. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2008;74(12):1526-1537.
104. Mertens C, Marques O, Horvat NK, Simonetti M, Muckenthaler MU, Jung M. The Macrophage Iron Signature in Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(16).
105. Erwig LP, Kluth DC, Walsh GM, Rees AJ. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J Immunol*. 1998;161(4):1983-1988.

106. Duffield JS. Macrophages and immunologic inflammation of the kidney. *Semin Nephrol.* 2010;30(3):234-254.
107. Vinuesa E, Hotter G, Jung M, Herrero-Fresneda I, Torras J, Sola A. Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury. *J Pathol.* 2008;214(1):104-113.
108. Campanholle G, Mittelsteadt K, Nakagawa S, et al. TLR-2/TLR-4 TREM-1 signaling pathway is dispensable in inflammatory myeloid cells during sterile kidney injury. *PLoS ONE.* 2013;8(7):e68640.
109. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-686.
110. Tammaro A, Kers J, Scantlebery AML, Florquin S. Metabolic Flexibility and Innate Immunity in Renal Ischemia Reperfusion Injury: The Fine Balance Between Adaptive Repair and Tissue Degeneration. *Frontiers in immunology.* 2020;11:1346.
111. Lee S, Huen S, Nishio H, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):317-326.
112. Anders H-J, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int.* 2011;80(9):915-925.
113. Huen SC, Huynh L, Marlier A, Lee Y, Moeckel GW, Cantley LG. GM-CSF Promotes Macrophage Alternative Activation after Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(6):1334-1345.
114. Jung M, Brüne B, Hotter G, Sola A. Macrophage-derived Lipocalin-2 contributes to ischemic resistance mechanisms by protecting from renal injury. *Sci Rep.* 2016;6:21950.
115. Lin S-L, Li B, Rao S, et al. Macrophage Wnt7b is critical for kidney repair and regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(9):4194-4199.
116. Duffield JS. Macrophages in kidney repair and regeneration. *JASN.* 2011;22(2):199-201.
117. Arai S, Kitada K, Yamazaki T, et al. Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice. *Nature medicine.* 2016;22(2):183-193.

118. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-461.
119. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: New molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006;177(10):7303-7311.
120. Brüne B, Dehne N, Grossmann N, et al. Redox control of inflammation in macrophages. *Antioxid Redox Signal.* 2013;19(6):595-637.
121. Jung M, Mertens C, Brune B. Macrophage iron homeostasis and polarization in the context of cancer. *Immunobiology.* 2015;220(2):295-304.
122. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: An immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451-483.
123. Zani IA, Stephen SL, Mughal NA, et al. Scavenger receptor structure and function in health and disease. *Cells.* 2015;4(2):178-201.
124. Pull SL, Doherty JM, Mills JC, Gordon JI, Stappenbeck TS. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(1):99-104.
125. Mirza R, DiPietro LA, Koh TJ. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. *Am J Pathol.* 2009;175(6):2454-2462.
126. Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute. Iron. <https://lpi.oregonstate.edu/mic/minerals/iron#reference3>. Updated January 4, 2022. Accessed February 15, 2022.
127. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International journal of hematology.* 2008;88(1):7-15.
128. Winter WE, Bazydlo LAL, Harris NS. The molecular biology of human iron metabolism. *Laboratory medicine.* 2014;45(2):92-102.
129. Korolnek T, Hamza I. Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells. *Blood.* 2015;125(19):2893-2897.
130. Rouault TA. How mammals acquire and distribute iron needed for oxygen-based metabolism. *PLOS Biology.* 2003;1(3):E79.
131. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell.* 2010;142(1):24-38.

132. Recalcati S, Cairo G. Macrophages and Iron: A Special Relationship. *Biomedicines*. 2021;9(11).
133. De Back DZ, Kostova EB, van Kraaij M, van den Berg TK, van Bruggen R. Of macrophages and red blood cells; a complex love story. *Frontiers in physiology*. 2014;5:9.
134. Jung M, Weigert A, Mertens C, Rehwald C, Brüne B. Iron Handling in TumorAssociated Macrophages-Is There a New Role for Lipocalin-2? *Frontiers in immunology*. 2017;8:1171.
135. Zhang D, Meyron-Holtz E, Rouault TA. Renal iron metabolism: Transferrin iron delivery and the role of iron regulatory proteins. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(2):401-406.
136. Nairz M, Theurl I, Swirski FK, Weiss G. "Pumping iron"-how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Arch*. 2017;469(3-4):397-418.
137. Gammella E, Buratti P, Cairo G, Recalcati S. Macrophages: Central regulators of iron balance. *Metallomics*. 2014;6(8):1336-1345. doi:10.1039/c4mt00104d.
138. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr*. 2008;28:197-213.
139. Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: Contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol*. 2011;32(6):241-247.
140. Corna G, Campana L, Pignatti E, et al. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica*. 2010;95(11):1814-1822.
141. Mertens C, Akam EA, Rehwald C, Brüne B, Tomat E, Jung M. Intracellular Iron Chelation Modulates the Macrophage Iron Phenotype with Consequences on Tumor Progression. *PLoS ONE*. 2016;11(11):e0166164.
142. Ziegler S, Röhrs S, Tickenbrock L, et al. Lipocalin 24p3 is regulated by the Wnt pathway independent of regulation by iron. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007;174(1):16-23.
143. Jung M, Weigert A, Tausendschön M, et al. Interleukin-10-induced neutrophil gelatinase-associated lipocalin production in macrophages with consequences for tumor growth. *Mol Cell Biol*. 2012;32(19):3938-3948.

144. Mertens C, Mora J, Ören B, et al. Macrophage-derived lipocalin-2 transports iron in the tumor microenvironment. *Oncoimmunology*. 2018;7(3):e1408751.
145. Ören B, Urosevic J, Mertens C, et al. Tumour stroma-derived lipocalin-2 promotes breast cancer metastasis. *J Pathol*. 2016;239(3):274-285.
146. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
147. Chertow GM, Burdick E, Honour M, Bonventre JV, Bates DW. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(11):3365-3370.
148. Huen SC, Parikh CR. Molecular phenotyping of clinical AKI with novel urinary biomarkers. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;309(5):F406-13.
149. Kellum JA, Sileanu FE, Bihorac A, Hoste EAJ, Chawla LS. Recovery after Acute Kidney Injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2017;195(6):784-791.
150. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer therapy*. 2003;1:47-61.
151. Dobyán DC, Levi J, Jacobs C, Kosek J, Weiner MW. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980;213(3):551-556.
152. Ozkok A, Edelstein CL. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury. *Biomed Res Int*. 2014;2014:967826.
153. Baer PC, Bereiter-Hahn J. Epithelial cells in culture: Injured or differentiated cells? *Cell Biol Int*. 2012;36(9):771-777.
154. Gstraunthaler G. *Zell- und Gewebekultur - Gstraunthaler, Lindl // Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Imprint: Springer Spektrum; 2013.
155. Dekel B, Zangi L, Shezen E, et al. Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(12):3300-3314.
156. Baer PC, Nockher WA, Haase W, Scherberich JE. Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation: Technical Note. *Kidney Int*. 1997;52(5):1321-1331.

157. Cilenti L, Kyriazis GA, Soundarapandian MM, et al. Omi/HtrA2 protease mediates cisplatin-induced cell death in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(2):F371-9.
158. Breggia AC, Himmelfarb J. Primary Mouse Renal Tubular Epithelial Cells Have Variable Injury Tolerance to Ischemic and Chemical Mediators of Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2008;1(1):33-38.
159. Rodríguez-García ME, Quiroga AG, Castro J, Ortiz A, Aller P, Mata F. Inhibition of p38-MAPK potentiates cisplatin-induced apoptosis via GSH depletion and increases intracellular drug accumulation in growth-arrested kidney tubular epithelial cells. *Toxicol Sci.* 2009;111(2):413-423.
160. Lieberthal W, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol.* 1998;274(2):F315-27.
161. Homburg CH, Haas M de, Borne AE von dem, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood.* 1995;85(2):532-540.
162. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, et al. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 1998;46(3):327-334.
163. Van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry.* 1996;24(2):131-139.
164. Andrianova NV, Buyan MI, Zorova LD, et al. Kidney Cells Regeneration: Dedifferentiation of Tubular Epithelium, Resident Stem Cells and Possible Niches for Renal Progenitors. *International journal of molecular sciences.* 2019;20(24).
165. Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol.* 2007;123(1):7-13.
166. Duffield JS, Park KM, Hsiao L-L, et al. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1743-1755.
167. Krause D, Cantley LG. Bone marrow plasticity revisited: protection or differentiation in the kidney tubule? *J Clin Invest.* 2005;115(7):1705-1708.

168. Kluth DC. Pro-resolution properties of macrophages in renal injury. *Kidney Int.* 2007;72(3):234-236.
169. Leoni G, Neumann P-A, Sumagin R, Denning TL, Nusrat A. Wound repair: role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunol.* 2015;8(5):959-968.
170. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549-555.
171. Duffield JS. The inflammatory macrophage: A story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci.* 2003;104(1):27-38.
172. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723-737.
173. Brazil JC, Quiros M, Nusrat A, Parkos CA. Innate immune cell-epithelial crosstalk during wound repair. *The Journal of clinical investigation.* 2019;129(8):2983-2993.
174. Gheibi Hayat SM, Bianconi V, Pirro M, Sahebkar A. Efferocytosis: molecular mechanisms and pathophysiological perspectives. *Immunology and cell biology.* 2019;97(2):124-133.
175. Elliott MR, Koster KM, Murphy PS. Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. *J Immunol.* 2017;198(4):1387-1394.
176. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalde J, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997;390(6658):350-351.
177. Deng J, Kohda Y, Chiao H, et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury. *Kidney Int.* 2001;60(6):2118-2128.
178. Sola A, Weigert A, Jung M, et al. Sphingosine-1-phosphate signalling induces the production of Lcn-2 by macrophages to promote kidney regeneration. *J Pathol.* 2011;225(4):597-608.
179. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol.* 2005;175(1):342-349.
180. Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2015;72(21):4111-4126.
181. Vinuesa E, Sola A, Jung M, Alfaro V, Hotter G. Lipocalin-2-induced renal regeneration depends on cytokines. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(5):F1554-62.

182. Recalcati S, Locati M, Marini A, et al. Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *Eur J Immunol.* 2010;40(3):824-835.
183. Gammella E, Correnti M, Cairo G, Recalcati S. Iron Availability in Tissue Microenvironment: The Key Role of Ferroportin. *International journal of molecular sciences.* 2021;22(6).
184. Pereira M, Chen T-D, Buang N, et al. Acute Iron Deprivation Reprograms Human Macrophage Metabolism and Reduces Inflammation In Vivo. *Cell reports.* 2019;28(2):498-511.e5.
185. Ma Q, Devarajan SR, Devarajan P. Amelioration of cisplatin-induced acute kidney injury by recombinant neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Ren Fail.* 2016;38(9):1476-1482.
186. Jaber SA, Cohen A, D'Souza C, et al. Lipocalin-2: Structure, function, distribution and role in metabolic disorders. *Biomed Pharmacother.* 2021;142:112002.
187. Zhang P-X, Zhang F-R, Xie J-J, et al. Expression of NGAL and NGALR in human embryonic, fetal and normal adult tissues. *Mol Med Rep.* 2012;6(4):716-722.
188. Gwira JA, Wei F, Ishibe S, Ueland JM, Barasch J, Cantley LG. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin regulates epithelial morphogenesis in vitro. *J Biol Chem.* 2005;280(9):7875-7882.
189. Kashiwagi E, Tonomura Y, Kondo C, et al. Involvement of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and osteopontin in renal tubular regeneration and interstitial fibrosis after cisplatin-induced renal failure. *Exp Toxicol Pathol.* 2014;66(7):301-311.
190. Lieberthal W, Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 2):F700-F708.
191. Kruidering M, van de Water B, Zhan Y, et al. Cisplatin effects on F-actin and matrix proteins precede renal tubular cell detachment and apoptosis in vitro. *Cell death and differentiation.* 1998;5(7):601-614.
192. Van de Water B, Kruidering M, Nagelkerke JF. F-actin disorganization in apoptotic cell death of cultured rat renal proximal tubular cells. *Am J Physiol.* 1996;270(4 Pt 2):F593-603.

193. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E. The alpha 5 beta 1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(13):6161-6165.
194. Jung M, Brüne B, Knethen A von, et al. Lipocalin-2 abrogates epithelial cell cycle arrest by PPAR γ inhibition. *Lab Invest*. 2018;98(11):1408-1422.
195. Recalcati S, Gammella E, Buratti P, et al. Macrophage ferroportin is essential for stromal cell proliferation in wound healing. *Haematologica*. 2019;104(1):47-58.
196. Carlson M, Raab Y, Sevéus L, Xu S, Hällgren R, Venge P. Human neutrophil lipocalin is a unique marker of neutrophil inflammation in ulcerative colitis and proctitis. *Gut*. 2002;50(4):501-506.
197. Nielsen BS, Borregaard N, Bundgaard JR, Timshel S, Sehested M, Kjeldsen L. Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. *Gut*. 1996;38(3):414-420.
198. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature immunology*. 2005;6(12):1191-1197.
199. Jung M, Ören B, Mora J, et al. Lipocalin 2 from macrophages stimulated by tumor cell-derived sphingosine 1-phosphate promotes lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Science signaling*. 2016;9(434):ra64.
200. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-378.
201. Mora J, Mertens C, Meier JK, Fuhrmann DC, Brüne B, Jung M. Strategies to Interfere with Tumor Metabolism through the Interplay of Innate and Adaptive Immunity. *Cells*. 2019;8(5).
202. Rehwald C, Schnetz M, Urbschat A, et al. The iron load of lipocalin-2 (LCN-2) defines its pro-tumour function in clear-cell renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2020;122(3):421-433.
203. Wang J, Liu Y, Wang Y, Sun L. The Cross-Link between Ferroptosis and Kidney Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:6654887.
204. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. *Drug metabolism reviews*. 1999;31(4):971-997.
205. Kontoghiorghes GJ, Spyrou A, Kolnagou A. Iron chelation therapy in hereditary hemochromatosis and thalassemia intermedia: regulatory and non regulatory mechanisms of increased iron absorption. *Hemoglobin*. 2010;34(3):251-264.

206. Porter JB. A risk-benefit assessment of iron-chelation therapy. *Drug safety*. 1997;17(6):407-421.
207. Cappellini MD, Musallam KM, Taher AT. Overview of iron chelation therapy with desferrioxamine and deferiprone. *Hemoglobin*. 2009;33 Suppl 1:S58-69.
208. Horwitz LD, Sherman NA, Kong Y, et al. Lipophilic siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* prevent cardiac reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):5263-5268.
209. Bao G, Clifton M, Hoette TM, et al. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nature chemical biology*. 2010;6(8):602-609.
210. Mahadevappa R, Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin in acute kidney injury: foe and friend. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(2):F147-54.
211. Marzolo M-P, Farfán P. New insights into the roles of megalin/LRP2 and the regulation of its functional expression. *Biological research*. 2011;44(1):89-105.
212. Nielsen R, Christensen EI, Birn H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int*. 2016;89(1):58-67.
213. Akrawinthawong K, Shaw MK, Kachner J, et al. Urine catalytic iron and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as companion early markers of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective pilot study. *Cardiorenal Medicine*. 2013;3(1):7-16.

7 Publikationen

Originalarbeit:

Urbschat A, Thiemens AK, Mertens C, Rehwald C, Meier JK, Baer PC, Jung M. Macrophage-secreted Lipocalin-2 Promotes Regeneration of Injured Primary Murine Renal Tubular Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 16;21(6):2038. doi: 10.3390/ijms21062038.

Vortragssitzungen:

Thiemens AK, Baer P, Jung M, Urbschat A. *In vitro* Untersuchungen zum Einfluss des Eisentransportproteins Lipocalin-2 auf die akute Schädigung muriner renaler Tubulusepithelzellen. 25. Jahrestagung Arbeitskreis Nierentransplantation der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., Dresden, 2017.

Thiemens AK, Baer P, Jung M, Mertens C, Urbschat A. Lipocalin-2 bei Cisplatin-induzierter Schädigung primärer muriner renaler Tubulusepithelzellen. 9. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Freiburg, 2017.

Thiemens AK, Baer P, Jung M, Mertens C, Urbschat A. Makrophagen induziertes Lipocalin-2 fördert die Regeneration geschädigter primärer muriner renaler Tubulusepithelzellen. 10. Symposium Urologische Forschung der Deutschen Gesellschaft für Urologie, Mainz, 2018.

8 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

***In vitro* Untersuchungen
zum Einfluss des Eisentransportproteins Lipocalin-2
auf die akute Schädigung muriner renaler Tubulusepithelzellen**

im Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik 4 in der Klinik für Nephrologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Patrick C. Baer mit Unterstützung durch PD Dr. Michaela Jung und PD Dr. Anja Urbschat ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Urbschat A, Thiemens AK, Mertens C, Rehwald C, Meier JK, Baer PC, Jung M. Macrophage-secreted Lipocalin-2 Promotes Regeneration of Injured Primary Murine Renal Tubular Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 16;21(6):2038. doi: 10.3390/ijms21062038.

Ort, Datum

Anne-Kathrin Thiemens



Publiziert unter der Creative Commons-Lizenz Namensnennung (CC BY) 4.0 International.
Published under a Creative Commons Attribution (CC BY) 4.0 International License.
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>