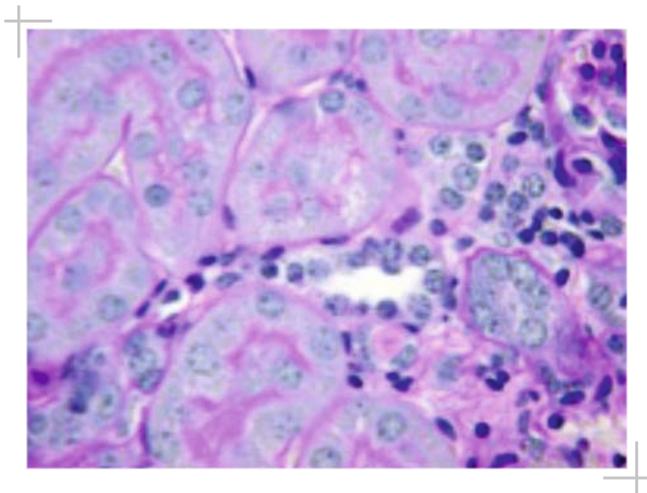


Bedeutung von Seneszenzmechanismen
für das chronische Transplantatversagen
am Beispiel einer temporär ischämischen
Niere der p16^{INK4a} transgenen Maus

Mirja Raib



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFBENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

und

der Klinik für Pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen
der Medizinischen Hochschule Hannover
Betreuerin: Prof. Dr. Dr. Anette Melk

Bedeutung von Seneszenzmechanismen für das chronische
Transplantatversagen am Beispiel einer temporär ischämischen
Niere der p16^{INK4a} transgenen Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Mirja Raiß

Tierärztin aus Zweibrücken

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Reinacher
Prof. Dr. Dr. Anette Melk

Tag der Disputation: 03.04.2014

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Mirja Raiß

Im Text verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ARF	Acute Renal Failure
ATN	Akute Tubuläre Nekrose
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAN	Chronische Allograft Nephropathie
CDK	Cyclinabhängige Kinasen
CDKI	Cyclinabhängige Kinase Inhibitoren
cDNA	Complementary DNA
chron.	chronisch
CIS	Corticale Interstitielle Zellen
CT	Threshold Cycle
CTS	Corticale Tubuläre Zellen
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleic Acid
FIT	Fibrous Intimal Thickening
g	Gramm
GD	Glomerula Disease
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT	Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
IF	Interstitielle Fibrose
I/R	Ischämie/Reperfusion
M1	Mortality Checkpoint 1
M2	Mortality Checkpoint 2
MAPK	Mitogen-Activated-Protein-Kinase
MDM2	Murine Double Minute
mg	Milligramm
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
min	Minuten
ml	Milliliter

MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT	Masson-Trichrom
ns	nicht signifikant
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Färbung
PCR	Polymerase Chain Reaction
pRb	Retinoblastom-Protein
qRT-PCR	Quantitative-Real-Time-Polymerase Chain Reaction
Ras	Rat Sarcoma
RNA	Ribonucleic Acid
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
STASIS	Stress Or Aberrant Signaling Induced Senescence
TA	Tubuläre Atrophie
TIN	Tubulointerstitielle Nephritis
TN	Transplantatnephropathie
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNF- β	Tumornekrosefaktor-beta
vs	versus
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZMF	Zentrum für medizinische Forschung
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Bedeutung der Nierenalterung und ihr Einfluss auf die Nierenfunktion	7
1.2 Nierentransplantation	10
1.3 Seneszenz	12
1.4 Der Zellzyklusregulator p16 ^{INK4a}	14
1.5 Der Proliferationsmarker Ki-67	19
1.6 Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase	19
1.7 Fragestellung	20
2. Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Geräte	22
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	25
2.1.3 Pufferlösungen und Reagenzien aus eigener Herstellung	28
2.1.4 Oligonukleotide	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Tiere	30
2.2.2 Ischämie/Reperfusions-Modell (I/R-Modell)	31
2.2.3 Organentnahme	33
2.2.3.1 Vorbereitungen	33
2.2.3.2 Operatives Prozedere bei der Organentnahme	33
2.2.4 Organaufarbeitung	34
2.2.4.1 Fixierung	34
2.2.4.2 Einbettung	34
2.2.4.3 Schneiden der Gewebeblöcke	35
2.2.5 Histologische Färbungen	35
2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	35
2.2.5.2 Periodic-acid-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)	36
2.2.6 Immunhistochemische Untersuchungen	36
2.2.6.1 Ki-67 Immunhistochemie	37
2.2.6.2 Phospho-p38 Immunhistochemie	38
2.2.7 Molekularbiologische Methoden	39
2.2.7.1 RNA-Isolation	39

2.2.7.2 UV-Spektroskopie	40
2.2.7.3 Agarosegelelektrophorese	41
2.2.7.4 Complementary DNA (cDNA)- Synthese	43
2.2.7.5 Quantitative Real-time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	44
2.2.8 Statistik	47
3. Ergebnisse	48
3.1 Gesamt- und Nierengewicht der Mäuse, Nierenfunktionsdaten	48
3.2 Histologie	53
3.2.1 Chronischer Schaden	53
3.3 Immunhistochemische Untersuchungen	56
3.3.1 Ki-67 Immunhistochemie	56
3.3.2 Phospho-p38 Immunhistochemie	60
3.4. Quantitative Real-time PCR	65
3.4.1 p16 ^{INK4a} quantitative Real-time PCR	65
3.4.2 Telomerase quantitative Real-time PCR	66
4. Diskussion	67
4.1 Gewichte der Tiere	68
4.2 Ischämie/Reperfusion	69
4.3 Histologische Ergebnisse und funktionelle Daten	70
4.4 Quantitative Real-time PCR	74
4.4.1 p16 ^{INK4a} quantitative Real-time PCR	74
4.4.2 Telomerase quantitative Real-time PCR	75
4.5. Immunhistochemische Untersuchungen	76
4.5.1 Der Proliferationsmarker Ki-67	76
4.5.2 Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase	77
4.6 Ist p16 ^{INK4a} gewebeprotectiv?	77
5. Zusammenfassung	80
6. Summary	82
7. Literaturverzeichnis	83
8. Danksagung	93

1. Einleitung

1.1 Bedeutung der Nierenalterung und ihr Einfluss auf die Nierenfunktion

Die Funktion und die Morphologie der Niere ändern sich merklich im Alter¹⁻³. Da der Alterungsprozess der Niere mit einer Abnahme der Nierenfunktion und einer erhöhten Anfälligkeit für Nierenerkrankungen einhergeht^{1, 4}, stellt die Nierenalterung ein wichtiges klinisches Problem dar^{5, 6}.

Ein altersbedingter Funktionsverlust der Niere ist einfach zu messen, weshalb die Niere als generelles Modell für Organalterung exzellent geeignet ist⁷.

Im Zuge der Nierenalterung kommt es zu einer Reduktion des renalen Blutflusses und der GFR^{8, 9}. Damit einher geht eine hauptsächlich die Nierenrinde betreffende Abnahme der Nierenmasse¹⁰. Zudem reduziert sich im Alter die Anzahl der Glomerula, was mit einer Glomerulosklerose assoziiert ist. Weiterhin kommt es zu einer Intimafibrosierung von vornehmlich größeren Nierenarterien^{5, 11-13}. Auch die Nierentubuli sind altersbedingten Veränderungen unterworfen. Als solche treten unter anderem Volumenverminderung der proximalen und Divertikelbildung der distalen Tubuli, sowie Aufsplitterungen der Basalmembran auf. Ebenso kommt es zu einer interstitiellen Fibrosierung¹¹⁻¹³.

Die grundlegenden histologischen Zeichen der Nierenalterung sind also Glomerulosklerose, tubuläre Atrophie, interstitielle Fibrose und fibröse Intimaverdickung der Arterien^{8, 7}. Diese strukturellen Veränderungen bedingen auch die Veränderungen der Nierenfunktion, gemessen an der Zunahme des renalen Gefäßwiderstandes, der Reduktion des renalen Plasmaflusses und der Zunahme der Filtrationsfraktion^{14, 15}. So nimmt die glomeruläre Filtrationsrate im Alter ebenso ab wie der renale Blutfluss. Das Gleiche gilt für die Konzentrierungs- und Verdünnungskapazität mit entsprechender Beeinträchtigung des Volumen-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes^{11-13, 16}.

Chronische Nierenerkrankungen entstehen vor allem durch das Zusammenspiel einer altersbedingten Abnahme der Nierenfunktion und verschiedenen Erkrankungen.

Hierbei sind insbesondere Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertension, Arteriosklerose und Herzerkrankungen zu nennen, welche zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion beitragen^{6, 8, 17}.

Aufgrund ihrer besonderen wechselseitigen Beziehung zur Niere soll in der vorliegenden Arbeit vor allem auf die Hypertension und kardiovaskuläre Erkrankungen eingegangen werden.

Eine Hypertension kann sowohl Ursache als auch Folge einer Nierenerkrankung sein und muss daher bei allen Patienten kontrolliert werden⁶. Im Rahmen dieser wechselseitigen Beziehung bewirkt einerseits eine renale Erkrankung eine Erhöhung des Blutdrucks und andererseits führt eine Hypertonie zu einem Fortschreiten des Funktionsverlustes erkrankter Nieren^{18, 19}.

Die Hypertonie ist in vielen Fällen das Leitsymptom einer akuten oder chronischen Nierenerkrankung. Daneben sind renoparenchymatöse oder renovaskuläre Erkrankungen für circa 90% der sekundären Hypertonieformen verantwortlich und damit nach der primären Hypertonie die Hauptursache für Bluthochdruck¹⁸.

Einer der wichtigsten Gründe hierfür ist die Kombination aus einer reduzierten Nierenfunktion und dem Unvermögen, Natrium auszuscheiden²⁰.

Generell wird vermutet, dass eine niedrige Anzahl an Nephronen sowohl das Risiko einer Hypertension, als auch das Risiko der Progression renaler Erkrankungen erhöht²¹.

Eine Abnahme der Nierenfunktion gilt auch im Rahmen von kardiovaskulären Erkrankungen als Risikofaktor^{22, 23}.

Es wurde bereits in einigen Studien untersucht, ob eine eingeschränkte Herzleistung zu einer verminderten Nierenleistung, oder ob eine Einschränkung der Nierenleistung, als pathogenetischer Faktor, zu einer kardialen Verschlechterung führt^{24, 22, 25-27}. Aktuell herrscht der Konsens, dass beide Organe in einer wechselseitigen Beziehung zueinander stehen²⁸.

Bei vielen Patienten mit einer Herzinsuffizienz kommt es zumindest zu einer geringfügigen Einschränkung der Nierenfunktion²⁹. Gleichzeitig steigt mit der Progression der Niereninsuffizienz auch die Prävalenz der Herzinsuffizienz^{27, 30, 31}.

Damit geht einher, dass eine eingeschränkte Nierenfunktion einen bedeutenden prognostischen Faktor für die Mortalität der Herzinsuffizienz darstellt³². Unter dem Begriff des kardioresenalen Syndroms unterscheidet Ronco fünf Typen³³.

Bei akuten bzw. chronischen kardioresenalen Syndromen (Typ 1 bzw. Typ 2) werden Veränderungen der Nierenfunktion durch akute oder chronische Herzerkrankungen verursacht. Bei akuten bzw. chronischen renokardialen Syndromen (Typ 3 bzw. Typ 4) sind renale Pathologien die Auslöser für Herzerkrankungen. Der Typ 5 beschreibt sekundäre Syndrome, wie sie bei Systemerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus) auftreten und sowohl kardiale als auch renale Dysfunktionen bedingen³³.

Durch diese Komorbidität zwischen altersbedingten degenerativen Prozessen der Niere und Erkrankungen wie arterieller Hypertonie und Herzinsuffizienz kann der Verlust funktionierender Zellen oder Nephron-Einheiten beschleunigt werden¹.

Resultierend daraus ist die Niere nicht mehr in der Lage, auf externe Stressfaktoren (zum Beispiel im Rahmen der Transplantation) im Sinne einer Restitutio ad integrum adäquat zu reagieren³⁴⁻³⁶.

Folglich sind insbesondere ältere Menschen für die Entwicklung renaler Dysfunktionen anfällig und damit der Gefahr einer akuten Niereninsuffizienz (= acute renal failure = ARF) ausgesetzt^{37, 38}. Über 60% der ARF-Fälle resultieren aus einer Hypoperfusion, bedingt durch Dehydratation und Hypotension, sowie aus einer Ischämie, welche zum Beispiel durch Herzstörungen oder durch Medikamente (z.B. NSAID, und ACE-Hemmer) ausgelöst werden können. In vielen Fällen spielen allerdings auch multifaktorielle Ursachen eine Rolle^{5, 39}.

Die akute tubuläre Nekrose (ATN) ist einer der wichtigsten Gründe für das Entstehen einer ARF, bei welcher akute ischämische oder toxische Ereignisse die Hauptursachen sind³⁷. Über 60% der ARF Fälle sind das Resultat einer renalen Hypoperfusion und intra-renalem ischämischem Schaden und führen letztlich zu einer ATN³⁹. Die Pathogenese der ATN beinhaltet ein Zusammenspiel verschiedener Prozesse. Zu diesen gehören eine endotheliale Schädigung, Störungen des mikrovaskulären Flusses, tubuläre Hypoxien, Dysfunktionen und Apoptosen, sowie tubuläre Obstruktionen³⁷.

Im Rahmen der histologischen Veränderungen sind sowohl die proximalen als auch die distalen Tubuli betroffen. Die proximalen und distalen Tubuli sind dilatiert und umgeben von abgeflachten Zellen⁴⁰. In den Lumina sind häufig desquamierte Zellen oder Zelldebris zu detektieren⁴⁰. Im Rahmen der ischämischen tubulären Nekrose kommt es regelmäßig zu einer Zerstörung der tubulären Wand (einhergehend mit einem Zellverlust und einer Zerstörung der Basalmembran). Das Interstitium ist diffus ödematös und infiltriert mit einer geringen Menge an Lymphozyten und Monozyten⁴⁰. Die Glomerula sind seltener betroffen.

1.2 Nierentransplantation

Die Nierentransplantation wird prinzipiell bei dialysepflichtigen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz oder bei Patienten, die binnen weniger Monate dialysepflichtig werden (präterminale Niereninsuffizienz), durchgeführt.

Die häufigsten Ursachen einer terminalen Niereninsuffizienz sind Diabetes mellitus (34%), arterielle Hypertonie (27%), chronische Glomerulonephritis (10%), obstruktive Uropathie/chronische Pyelonephritis/Refluxnephropathie (6%), polyzystische Nierendegeneration (3%) und andere Ursachen (20%) (z.B. tubulo-interstitielle Nephritis, Lupus erythematodes, multiples Myelom)⁴¹.

In Deutschland warten circa 9.000 Patienten auf ein Nieren-Transplantat, von denen jährlich nur etwa 2.700 transplantiert werden können⁴². Die Wartezeit auf ein allogenes Transplantat (Allotransplantation = Transplantation zwischen genetisch nicht identischen Individuen der gleichen Spezies, z.B. Mensch zu Mensch) betrug im Jahr 2007 im Mittel vier Jahre⁴².

Die Indikation einer Nierentransplantation oder einer Dialysebehandlung ist selten absolut und wird vielmehr durch das Abwägen von Nutzen und Risiko bestimmt.

In Anbetracht der steigenden Erfolgsrate im Bereich der Transplantationsmedizin wird die Indikation zur Transplantation selbst bei Risikopatienten immer weiter gestellt werden können⁴². Schätzungen besagen, dass bei optimaler Vorbereitung circa die Hälfte aller Dialysepatienten von einer Transplantation bezüglich Lebensqualität und Lebenserwartung profitieren könnte⁴³.

Der Vergleich von für eine Nierentransplantation gelisteten Dialyse-Patienten mit bereits transplantierten Patienten zeigt eine Verlängerung der Lebenserwartung von im Mittel 6 auf 17 Jahre^{42, 43}.

Da jedoch eine zunehmende Organknappheit besteht und die Wartezeiten stetig steigen, werden vermehrt Spender mit erweiterten Spenderkriterien akzeptiert^{1, 11}. Hierzu zählt unter anderem ein erhöhtes Lebensalter^{1, 11}. In Deutschland hat der Anteil an älteren verstorbenen Spendern (>65 Jahren) in den letzten Jahren kontinuierlich zugenommen^{11, 16}.

Bedeutung der Nierenalterung im Rahmen der Transplantationsmedizin

Die Nierenalterung stellt insbesondere im Rahmen der Transplantationsmedizin ein wichtiges klinisches Problem dar⁴⁴, da alte Nieren eine erhöhte Empfindlichkeit für die Entwicklung eines akuten Nierenversagens und eine schlechtere Erholung der Funktion nach einem solchen Ereignis zeigen⁵. Resultierend daraus zeigt die Transplantation von Organen alter Spender ein schlechteres Transplantatüberleben^{16, 45, 46 44}.

Neben präexistierenden Spenderfaktoren wie dem Alter und einer arteriellen Hypertonie werden auch Empfängerfaktoren wie zum Beispiel eine Größenungleichheit zwischen Spender und Empfänger als Risikofaktoren für ein Transplantatversagen genannt³⁶. Ein erhöhtes Spenderalter wird jedoch als der stärkste Prädiktor für ein schlechtes Langzeittransplantatüberleben beschrieben³⁶.

Diese Beobachtungen haben zu der Hypothese geführt, dass in alten Nieren nicht nur die Nierenfunktion an sich vermindert ist, sondern auch die Fähigkeit auf Stressfaktoren von außen im Sinne einer Restitutio ad integrum adäquat zu reagieren³⁴⁻³⁶. Daraus geht hervor, dass nicht nur direkt schädigende Einflüsse auf das Transplantat (zum Beispiel verlängerte Ischämiezeiten im Rahmen der Transplantation oder Abstoßungsreaktionen), sondern auch generelle Alterungsprozesse der Nierenzellen für ein chronisches Transplantatversagen bei höherem Spenderalter verantwortlich gemacht werden^{11, 36}.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich das Langzeittransplantatüberleben von 14 auf 6 bzw. 8 Jahre halbiert, wenn man auf Nieren älterer Spender zurückgreift⁴⁷. Ursache hierfür ist die vermehrte Anzahl bereits gealterter, sogenannter seneszenten Zellen (zur Begrifflichkeit „Seneszenz siehe auch 1.3)⁴⁴.

Die Anzahl seneszenter Zellen wird folglich einerseits durch Alterungsprozesse und andererseits durch das Einwirken unterschiedlichster Stressoren (z.B. Nephropathien, operativer Stress oder Allograft-Abstoßungsreaktionen) bestimmt⁴⁴. Seneszente Zellen wiederum bedingen eine schlechtere Regenerationsfähigkeit des Gewebes⁴⁸.

1.3 Seneszenz

Unter dem Begriff „zelluläre Seneszenz“ (=“replikative Seneszenz“) versteht man einen permanenten und irreversiblen Zellzyklusarrest, wie ihn Zellen von Säugetieren nach einer definierten Anzahl von Teilungen in Kultur zeigen^{34, 49 50, 51}. In diesem Zustand ist die Zelle zwar noch im Hinblick auf ihre metabolische Aktivität funktionsfähig, es besteht aber keine Möglichkeit zur weiteren Replikation⁵². Der Nachweis solcher Zellen in vivo, die nicht mehr replikationsfähig und damit auch nicht mehr regenerationsfähig sind, könnte Aspekte der eingeschränkten Regenerationsfähigkeit alter Nieren erklären^{44, 53}.

Ursprünglich wurde der Begriff zelluläre Seneszenz synonym mit dem Begriff der replikativen Seneszenz verwendet und von Hayflick und Moorhead in humanen Fibroblasten beschrieben⁵⁴. Die replikative Seneszenz wurde ausführlich in Kulturen humaner Fibroblasten untersucht⁵⁵. Diese Fibroblasten replizieren sich für 50-70 Generationen, um dann in eine Phase überzugehen, in der keine Zellteilung mehr möglich ist, aber die Zelle lebensfähig bleibt. Mit jeder Replikation kommt es zur Telomerverkürzung; die Zellteilung wird unterbunden, wenn die Telomere eine kritische Länge erreicht haben und eine weitere Verkürzung zur genomischen Instabilität führen würde^{55, 56}.

Das Enzym Telomerase ist in der Lage, den Telomerverlust zu kompensieren und damit die vollständige Replikation eines linearen Chromosoms zu ermöglichen. Transfektion von Telomerase in primäre humane Zellen hebt die replikative Seneszenz auf und führt zur Immortalisation⁵⁷.

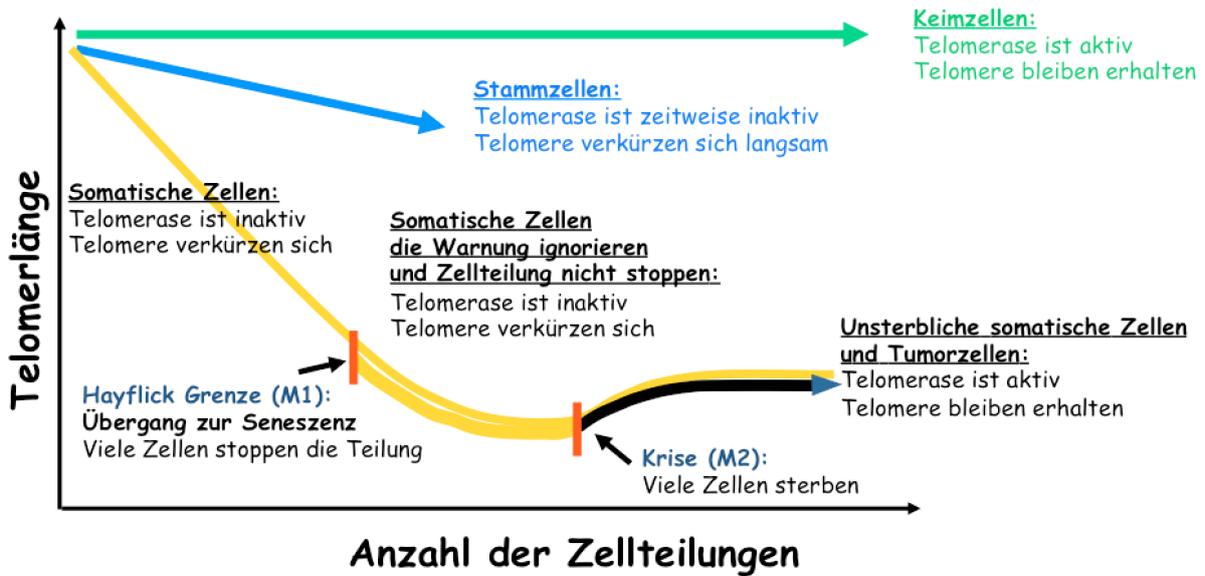


Abb. 1 Telomer Hypothese: Die Telomerase ist in embryonalen Zellen aktiv, um lange stabile Telomere aufrecht zu erhalten. In den meisten normalen somatischen Zellen wird die Telomerase jedoch unterdrückt. Daraus resultierend kommt es zu einem Telomerverlust in sich teilenden Zellen. Bei M1 (M1, mortality checkpoint 1), dem Hayflick Limit, findet ein irreversibler Zellzyklusarrest statt, wenn ein kritischer Telomerverlust erreicht wurde. Die Zellen sind jedoch weiterhin lebensfähig. Haben die Zellen jedoch eine genomische Instabilität erreicht, gehen sie in das Krisenstadium (M2, mortality checkpoint 2) über; in diesem Stadium sterben die meisten Zellen. Einige Klone können durch Aktivierung der Telomerase das Stadium M2 umgehen, dadurch ihr Genom stabilisieren und unsterblich werden³⁵.

Das Konzept der replikativen Seneszenz wurde ausgeweitet und umfasst mittlerweile auch andere Formen des permanenten irreversiblen Zellzyklusarrestes. Grund ist die Beobachtung, dass Fibroblasten aus Mausembryonen in Kultur nicht den Telomermechanismus benutzen, um eine weitere Proliferation zu inhibieren^{58, 59}. Maus-Telomere sind zwar länger als humane Telomere (40-150 vs. 5-20 kb), stoppen jedoch ihre Abnahme nach der 15.-30. Generation³⁴. Daraus folgt, dass sie andere Merkmale der Seneszenz mit humanen Fibroblasten gemein haben.

Dieser Phänotyp wird als „stress or aberrant signaling induced senescence“ (STASIS) bezeichnet, weil er ebenso durch DNA-Schädigung, oxidativen Stress, Aktivierung von Ras und epigenetische Alterationen hervorgerufen werden kann⁶⁰.

Die Zellzyklusregulatoren $p16^{INK4a}$ und $p19^{ARF}$ sind mit diesem nicht-replikationsabhängigen Wachstumsstop assoziiert worden⁶¹⁻⁶³.

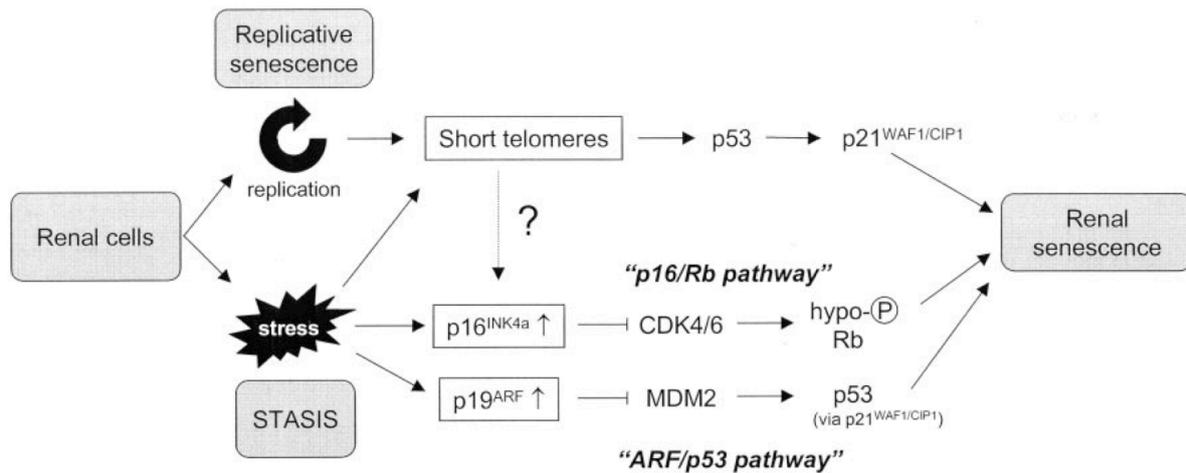


Abb. 2 Zelluläre Seneszenz in renalen Zellen in vivo. Das Diagramm stellt die Unterschiede zwischen den beiden Formen zellulärer Seneszenz dar: „Replikative Seneszenz“ und „STASIS“. In humanen renalen Zellen führen kurze dysfunktionale Telomere zu einer Aktivierung von p53. p53 führt daraufhin über p21^{WAF1/CIP1} zu einem Zellzyklusarrest.

Ein Anstieg der p16^{INK4a}-Expression wird durch unterschiedliche Stressoren hervorgerufen und führt in Folge zu einer Aktivierung des P16/Rb-Weges. p16^{INK4a} inhibiert die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) 4 und 6. Dadurch unterbleibt eine Hyperphosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb) und es kommt zu einem irreversiblen Zellzyklusarrest (STASIS). Mäuse benutzen keinen Telomermechanismus, um eine weitere Proliferation renaler Zellen zu inhibieren. Ein Anstieg von p16^{INK4a} oder p19^{ARF} resultiert in einer Aktivierung des p16^{INK4a}/Rb-Signalweges, beziehungsweise des p53/ARF-Signalweges. p19^{ARF} verhindert durch eine Bindung von MDM2 eine Ubiquitinierung und einen Abbau von p53. Dadurch kommt es zu einem Zellzyklusarrest (STASIS), vermittelt durch p53 (oder p21^{WAF1/CIP1}). In Maus-Fibroblasten scheint außerdem p16^{INK4a} stärker an der Regulation des Zellzyklus-Arrest beteiligt zu sein als p19^{ARF} ³⁴.

1.4 Der Zellzyklusregulator p16^{INK4a}

In Vorarbeiten konnte nachgewiesen, dass Telomere in menschlichen Nierenzellen mit dem Alter kürzer werden⁶⁴. Im Gegensatz dazu wurden lange Telomere, eine im Alter anhaltende Expression von Telomerase und das Fehlen einer kritischen Telomerverkürzung in alten Nieren von Mäusen und Ratten gefunden⁶⁵.

Diese Speziesunterschiede im Alter unterstützen die Auffassung, dass Mäuse- und Rattenzellen, die aus Labortieren mit vorhandener Telomerase-Aktivität isoliert wurden, wie auch Fibroblasten aus Mausembryonen im Gegensatz zu menschlichen Zellen die Telomerverkürzung nicht als Replikationszähler benutzen.

Melk et al.⁶⁶ untersuchten daraufhin verschiedene Kandidatengene (z.B. p16^{INK4a}, p14/p19^{ARF}, p21^{WAF1/CIP1}, heat-shock Proteine, TGF-beta, PAI-1, Metallothionine, GADD45), von denen berichtet wurde, dass sie von nicht mehr teilungsfähigen, seneszenten Zellen *in vitro* differenziell exprimiert werden können.

Bei Mensch, Maus und Ratte war die deutlichste Korrelation mit der Alterung der Niere für den Zellzyklusregulator p16^{INK4a} nachweisbar^{65, 66}. P16^{INK4a} wurde hauptsächlich in Tubuluszellen gefunden (distaler Tubulus und Sammelrohr) und war ebenfalls in atrophischen Tubuli nachweisbar. Eine für das Alter korrigierte Analyse zeigte eine hoch signifikante Korrelation zwischen p16^{INK4a}-Expression und tubulärer Atrophie⁶⁶.

In einem vaskularisierten, MHC-inkompatiblen Transplantationsmodell der Maus⁴⁴ konnte gezeigt werden, dass in Nieren von 18 Monate alten Spendern die akute Abstoßung nicht nur p16^{INK4a} induzierte, sondern dass sie in der alten Niere auch zur schnellen Entwicklung einer tubulären Atrophie und dem Verlust tubulärer Zellen führte. Dies trat trotz im Vergleich zu 3 Monate alten Spendern vergleichbarer Intensität der Immunantwort und der Immunogenität auf. Der Anstieg der p16^{INK4a}-Expression nach Transplantation war additiv zu der bereits vor der Transplantation erhöhten p16^{INK4a}-Expression in alten Nieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein höheres Spenderalter zu einer schnelleren Atrophie und einem schnelleren Zugrundegehen des alten Gewebes führt. Die Beobachtungen legen die Schlussfolgerung nahe, dass die p16^{INK4a}-Expression einen irreversiblen Zellzyklus-Arrest in Nierenzellen induziert und dadurch zu einer verminderten Regenerationsfähigkeit des alten Gewebes führt. Das hat zur Folge dass während der Transplantation auftretende Schäden nicht repariert werden können. Organmasse und -funktion können somit nicht aufrechterhalten werden⁴⁴.

In einer weiteren Studie⁶⁷ konnte der Zellzyklusinhibitor p16^{INK4a} in Biopsien von Patienten mit chronischer Transplantatnephropathie (TN) nachgewiesen werden. Hierbei wurde die p16^{INK4a}-Expression in 14 Biopsien mit der Diagnose TN mit der p16^{INK4a}-Expression in Biopsien zum Zeitpunkt der Implantation verglichen und zeigte einen steilen Anstieg von p16^{INK4a}.

Für jeden dieser longitudinalen Vergleiche übertraf der Anstieg der p16^{INK4a}-Expression in der TN-Biopsie bei weitem den, der durch Alterung allein zu erwarten gewesen wäre. Die Expression von p16^{INK4a} war ähnlich oder größer als die p16^{INK4a}-Expression in Biopsien physiologisch gealterter Nieren⁶⁷.

Diese Studien^{44, 67} bestätigen, dass Stressfaktoren im Rahmen der Transplantation ein beschleunigtes Auftreten von zellulärer Seneszenz und damit eine akzelerierte Alterung der Transplantatniere hervorrufen.

Eine weitere Studie⁶⁸ konnte belegen, dass p16^{INK4a} nicht nur im Alter eine Rolle spielt, sondern auch durch verschiedene Stressoren getriggert werden kann und zu einem Seneszenz-ähnlichen Phänotyp führt. Die Studie basierte auf der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen p16^{INK4a}-Expression und glomerulären Erkrankungen (GD)⁶⁸.

In dieser Studie wurde eine p16^{INK4a} Immunfärbung an 35 Biopsien mit GD, 12 mit tubulointerstitieller Nephritis (TIN), und 19 normalen, transplantierten Lebendspender-Nieren durchgeführt. Als Basiswerte dienten die Werte von 42 normalen Nieren. Die für das jeweilige Alter erwarteten Werte wurden mit den erhobenen Werten verglichen. Dabei zeigte sich, dass die p16^{INK4a}-Expression bei den GD-Biopsien in den Zellkernen der Glomerula und des Interstitiums deutlich über die erwarteten Werte hinausging. Diese Werte lassen sich also nicht allein auf das Alter zurückführen⁶⁸.

In multivariaten Analysen zeigte sich, dass GD unabhängig mit einer wachsenden nukleären p16^{INK4a}-Expression in den Glomeruli und im Interstitium assoziiert war. Die p16^{INK4a}-Expression in den glomerulären und interstitiellen Zellkernen und dem tubulären Zytoplasma war in Nieren mit Proteinurie und mit Atrophie/Fibrose höher. Ein zunehmendes Alter war mit einer wachsenden nukleären p16^{INK4a}-Expression in den Tubuli assoziiert. Weiterhin waren Entzündungen im Interstitium mit einer wachsenden nukleären p16^{INK4a}-Expression in interstitiellen Zellen assoziiert⁶⁸.

Die p16^{INK4a}-Färbung des tubulären Zytoplasmas war sowohl bei GD, als auch bei TIN im Vergleich mit der Kontrollgruppe erhöht und nicht altersbezogen.

Demzufolge zeigten Nieren mit GD eine steigende Expression des Seneszenzmarkers p16^{INK4a} in glomerulären und interstitiellen Zellkernen, verglichen mit normal alternden Nieren oder TIN. Diese Ergebnisse lassen eine Beteiligung von somatischen Zellseneszenzmechanismen bei der Entwicklung einer GD vermuten⁶⁸. Die genannten Vorarbeiten unterstützen die Auffassung dass p16^{INK4a} einer der wichtigsten Marker für Alterungsprozesse in der Niere ist^{48, 68}. Daraus folgt, wenn es in Zellen von Menschen oder Mäusen zu Seneszenz kommt, ist dies mit einem p16^{INK4a}-Anstieg assoziiert⁴⁴. Ein Seneszenz-assoziiertes Wachstumsstop wird hierbei über Zellzyklusinhibitor-Proteine und durch Downregulation von positiv agierenden Zellzyklusregulatoren vermittelt³⁵.

Im Zentrum der Zellzyklusmaschinerie stehen die Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) welche regulatorische Signale annehmen und integrieren. Die CDKs werden wiederum von CDK-Inhibitoren (CKI) beeinflusst. Die CKI unterbinden eine Aktivierung der CDK oder machen sie rückgängig³⁵. Es existieren zwei Hauptfamilien bei den CKIs: 1) INK4A (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c}, p19^{INK4d}) und 2) CIP/KIP (p21^{CIP1}, p27^{KIP1}, p57^{KIP2})³⁵. p16^{INK4a} agiert hierbei als Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor im p16/pRb-Signalweg (pRb = Retinoblastom-Protein)³⁴. Im pRb-Signalweg wird der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase kontrolliert⁶¹.

p16^{INK4a} (= INK 4A für Inhibitor von CDK 4) verursacht beim gemeinsamen Signalweg also einen G1 Arrest mit Hilfe einer spezifischen Inhibition von CDK4 und CDK6⁶¹. Dadurch wird eine Hyperphosphorylierung von pRb und damit der Eintritt in die S-Phase verhindert^{35, 69}. Das heißt, die Zelle kann nicht weiter proliferieren.

Genauer gesagt wird durch Cyclin D/CDK4/6-Komplexe der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase initiiert. Diese Komplexe führen zur Phosphorylierung von pRb, wodurch es zur funktionellen Deaktivierung von pRb kommt und die Passage durch den G1-Kontrollpunkt möglich wird. Durch die Bindung von p16^{INK4a} an den Cyclin D/CDK4/6-Komplex wird dessen Aktivität wiederum inhibiert.^{61, 70} Es wird die Phosphorylierung des pRb und damit auch die Freisetzung des an pRb gebundenen Transkriptionsfaktors E2F verhindert⁷¹. Die Freisetzung und damit Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F ist für die Fortsetzung des Zellzyklus jedoch erforderlich.

Das heisst, die Zelle verharrt im G1-Arrest^{71, 72}. $p16^{INK4a}$ hat somit eine wichtige Kontrollfunktion vor dem Eintritt in die DNA-Synthesephase, indem es seneszente Zellen aus dem Proliferationszyklus entfernt⁷³.

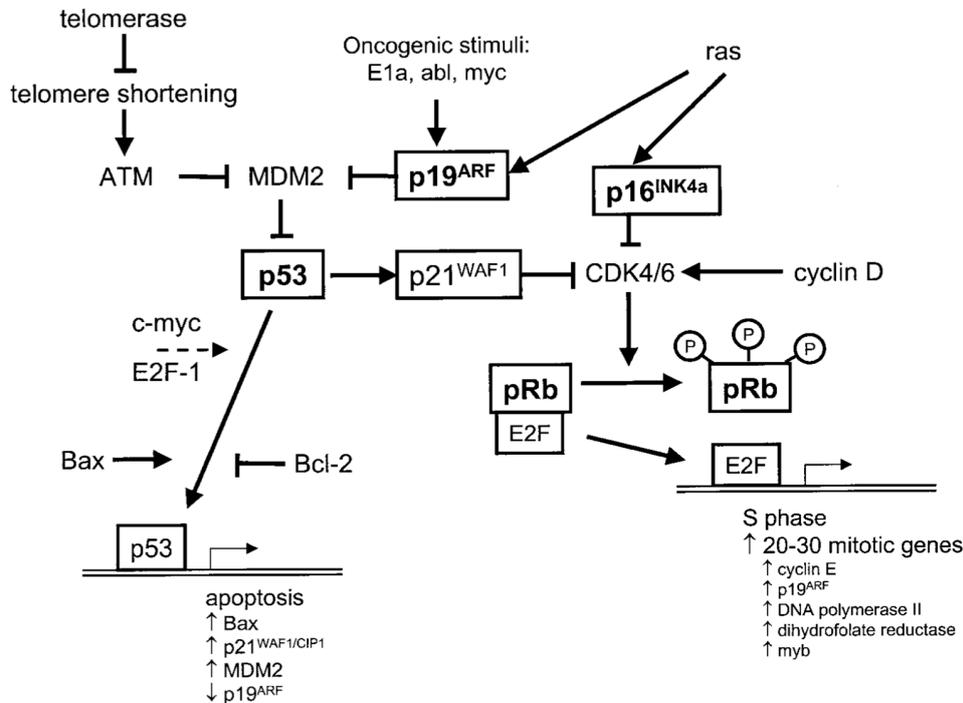


Abb. 3 Der p53-Retinoblastoma(Rb)-Signalweg: p53 wird durch DNA-Schaden und/oder Telomerverkürzung hochreguliert. Dabei steht es unter der Kontrolle von MDM2, welches p53 inhibiert. Dies kann jedoch durch die Aktivierung von $p19^{ARF}$ verhindert werden und dadurch zu einer Stabilisierung von p53 führen. Durch diese Stabilisierung von p53 wiederum wird die Induktion einiger für die Apoptose (u.a. Bax) und für den Wachstumsstopp ($p21^{CIP1}$) wichtiger Gene möglich. $p16^{INK4a}$ interferiert mit D-Typ-Zyklinen und inhibiert so CDK4/6. Dadurch kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Hypophosphoryliertes pRb hemmt E2F-abhängige Gene und blockiert einen Übergang von der G1- in die S-Phase. E2F alleine hingegen transaktiviert viele Gene, welche für die Mitose wichtig sind.

$p16^{INK4a}$ hat nicht nur eine entscheidende Rolle als CKI im Rahmen des Zellzyklus und als Biomarker für das Alter, sondern spielt auch eine wichtige Rolle als Tumorsuppressor^{74, 75}.

Der Genlocus CDKN2A (INK4a/ARF) kodiert für zwei unterschiedliche Proteine $p16^{INK4a}$ und $p14^{ARF}$ (oder $p19^{ARF}$ in Mäusen),⁷⁶ die wiederum von zwei unterschiedlichen Leserastern transkribiert werden⁷⁷.

Wird $p16^{INK4a}$ in Zellen durch Mutation oder Deletion inaktiviert, so kann es zu einer Proliferation veränderter Zellen kommen. Dies ist in vielen Tumorzellen der Fall^{70, 78,}

79

Bei einer Untersuchung von Chromosomen-Aberrationen konnte p16^{INK4a} erstmals als Tumorsuppressor in Melanomen identifiziert werden⁸⁰.

Neben diversen Studien^{81, 82}, welche in Tumoren und Zelllinien eine Inaktivierung von p16^{INK4a} beschreiben, konnten auch homozygote Deletionen und Mutationen in den Zelllinien unterschiedlichster Tumore identifiziert werden⁸³.

Anhand von „Knockout“-Mäusen mit funktionsfähigem ARF und inaktivem p16^{INK4a} konnten diese Daten bestätigt werden. Im Gegensatz zu Mäusen mit intaktem p16^{INK4a} entwickeln p16^{-/-}-Mäuse innerhalb eines Jahres spontan mehr B-Zelllymphome und Melanome. Zu einem noch breiteren Spektrum an Tumoren kommt es, wenn man die p16^{INK4a} negativen Mäuse mit Karzinogenen behandelt^{71, 76, 84}.

1.5 Der Proliferationsmarker Ki-67

Das Antigen Ki-67 ist ein Protein, welches zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen geeignet ist (ein sogenannter Proliferationsmarker)⁸⁵. Es ist während der gesamten aktiven Phase des Zellzyklus präsent (G1, S, G2, Mitose)⁸⁶. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G0-Phase befinden, exprimieren Ki-67 nicht. Aufgrund dieser Tatsache wird Ki-67 auch gern als Proliferationsmarker im Rahmen der Tumorforschung eingesetzt⁸⁶. Im Rahmen dieses Projektes bietet sich Ki-67 folglich an, da es ein zuverlässiger Proliferationsmarker ist und sich mittels Immunhistochemie gut darstellen lässt. Mit Hilfe von Ki-67 sollte das Ausmaß an proliferierenden Zellen in verschiedenen Nierenkompartimenten beurteilt werden.

1.6 Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

Die MAP-Kinasen (mitogen-activated protein Kinasen = MAPK) selbst sind kleine Proteinkinasen, welche andere Proteine phosphorylieren. Die MAP-Kinasen werden normalerweise direkt durch Phosphorylierung an zwei Stellen aktiviert. Damit die Kinasen aktiv sind, müssen beide Reste phosphoryliert sein⁸⁷. Der MAP-Kinase Weg bezeichnet eine Reihe mehrstufiger Signaltransduktionswege, die an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, des Zellwachstums und des programmierten Zelltodes beteiligt sind⁸⁷.

Die Signalwege umfassen mindestens drei in Reihe geschaltete Kinasen (Mitose->MAP-KKK->MAP-KK->MAP-K->weitere Signaltransduktionswege), welche in dieser Reihenfolge aktiviert werden.

Wenn die MAP-Kinasen aktiviert sind, akkumulieren sie im Zellkern wo sie nun kerneigene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und dadurch die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen regulieren.

Sobald die MAP-Kinasen dephosphoryliert und damit inaktiviert werden, verteilen sie sich wieder im Zytosol und stehen für weitere Aktivierungszyklen zur Verfügung⁸⁷.

Man unterteilt die MAPK in drei Gruppen:

- 1) die „extracellular signal-related Kinasen“ mit den Isoformen ERK-1 und ERK-2
- 2) die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38MAPK)
- 3) die c-LUN-N-terminalen Kinasen (JNK)^{87, 88}.

Die Aktivierung von p38MAPK erfolgt unter anderem durch unterschiedliche Stressoren (wie z.B. Ischämie, Entzündungen, Zytokine und UV-Licht)⁸⁸. Im Rahmen einer Ischämie regt p38MAPK in renalen tubulären Zellen eine Produktion des Tumornekrose Faktor- α (TNF α) an und dadurch eine TNF α -abhängige Apoptose⁸⁹. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass die p38MAPK eine p16^{INK4a}-Expression und Seneszenz induzieren kann^{90, 91}. Dadurch ist es von Interesse, in dem vorliegenden Projekt auch die p38MAPK im Rahmen einer Immunhistochemie zu untersuchen.

1.7 Fragestellung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression des Zellzyklusinhibitors p16^{INK4a} in der alten, menschlichen Niere *in vivo* nachweisbar ist^{44, 66}. Zudem war es möglich, p16^{INK4a} durch Stressfaktoren im Rahmen einer Transplantation zu induzieren^{92 44}. Dieses galt für Nieren von Menschen und Mäusen⁴⁴. Im vorliegenden Projekt sollten diese Beobachtungen in Form einer Pilotstudie erweitert und spezifiziert werden. Dabei sollte die Bedeutung der p16^{INK4a}-Expression für das Auftreten von akzelerierter, zellulärer Seneszenz untersucht werden. Im Besonderen sollte hierbei die Bedeutung der Transplantatischämie als Teilaspekt der im Rahmen des Transplantationsprozesses auftretenden Stressfaktoren charakterisiert werden. Dazu wurde ein Ischämie/Reperfusion-Modell genutzt. Zur experimentellen Darstellung wurde ein geeignetes Tiermodell in Form einer transgenen p16^{INK4a}-Maus eingesetzt.

Im Rahmen dieser Pilotstudie wurden sowohl Wildtyptiere als auch p16^{INK4a} transgene Mäuse an verschiedenen Tagen (3-30 Tage) nach Ischämie/Reperfusion (I/R) untersucht, um so das Ausmaß des Schadens und die Induktion von Seneszenzsignalwegen aufzeigen zu können. Anhand von fehlender p16^{INK4a}-Expression sollte gezeigt werden, ob ein Wegfall dieses Signalwegs zu einer verbesserten Regenerationsfähigkeit der Nieren führen kann.

Ziele des hier vorgestellten Projektes waren:

1. Der Nachweis, dass I/R zur p16^{INK4a}-Expression führt.
2. Der Nachweis, dass bei fehlender p16^{INK4a}-Expression eine bessere Regeneration nach I/R eintritt.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Arterienklemme, BH 120	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen
Ausgießstation EG 1150 H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Biopsie-Kassetten, LAB 120.004	LaborService Albert Benzinger, Walldorf
Brutschrank	Memmert GmbH & Co.KG Schwabach
Clip-Mini	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen
Dampfdrucktopf "Pascal"	Dako Cytomation GmbH, Hamburg
Deckgläser; 0101232	LaborService Albert Benzinger, Walldorf
Dumont forceps	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Elektrophoresekammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Erlenmeierkolben	DURAN Group GmbH, Wertheim
Extra fine "Bonn"	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Eye dressing forceps	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
FACS- Röhrchen; 352058	BD Biosciences, Heidelberg
Filterspitzen	Eppendorf Vertrieb GmbH Wesseling-Berzdorf

Gefrierschrank, -80°C V.I.P. Sanyo	M&S Laborgeräte GmbH Wiesloch
Gefrierschrank, -22°C	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Homogenisator	IKA®-Werke GmbH & Co.KG, Staufen
Isofluran, 3 %	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Kamera DFC 320	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Knüpfpinzette	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen
Kühlplatte EG 1150 C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Ochsenhausen
Kühlzentrifuge	M&S Laborgeräte GmbH Wiesloch
Küvetten	Eppendorf Vertrieb GmbH Wesseling-Berzdorf
Lidsperre	Geuder AG, Heidelberg
Magnetrührgerät Polymax MR 3002	Heidolph Instruments, Schwabach
Membranspatel	Geuder AG, Heidelberg
Mikroskop DM LB2	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotom, RM 2125	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikrotomklingen	pfm medical AG, Köln
Mikrowelle	Sharp Electronics GmbH Hamburg
Mini Vannas	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Mini Trans-Blot Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Nadelhalter	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen
Nahmaterial (Ethicon) Vicryl 6-0, V991- H Nahtgut USP 8-0, 2808G Nahtgut schwarz 10-0, EH 7436	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Narkosegerät Isofluran Table System Objektträger Superfrost Plus	Stoelting Co., Illinois, USA Laborservice Albert Benzinger, Walldorf
Parafilm PM-996	BRAND GmbH & Co.KG, Wertheim
PCR- Cyclor	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PH-Meter, pH M62 Standard Photometer	Firma Kurt Hillerkus, Krefeld Eppendorf-Vertrieb, Wesseling-Berzdorf
Pipetten (2 – 1000 µl)	Eppendorf-Vertrieb, Wesseling-Berzdorf
Pipetten (5 und 25 ml)	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
Pipetten (10 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
RTD- PCR	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Sigma 1K15 Kühlzentrifuge	SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz
Silicon mat	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Skalpell	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen
Stainless steel container	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Stereomikroskop (M3)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Sterilizing container	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Surgical sissors	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Taumler Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermomixer	Eppendorf-Vertrieb, Wesseling-Berzdorf
TouhgCut	Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen
Tubes	Eppendorf-Vertrieb, Wesseling-Berzdorf
UV- Kamera	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Vannas Tübingen	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Vortexgerät, Heidolph Reax top	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage	Kern & Sohn GmbH, Bahlingen
Wärmebad, HI 1210	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Wärmeplatte, HI 1220	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Agarose, Pulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Antibody Diluent Background Reducing	Dako Cytomation GmbH, Hamburg
Aqua injectabile	B.Braun AG, Melsungen
BSA, 1 %	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Chloral hydrate	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronsäure Monohydrat	Merck, Darmstadt
DAB, Liquid	Dako Cytomation GmbH, Hamburg
DAKO Cytomation pen	Dako Cytomation GmbH, Hamburg
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	Life Technologies GmbH, Darmstadt
EnVision + Single Reagents HRP, mouse	Dako Cytomation GmbH, Hamburg
Eosin Y (C.I. 45380)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Avantor Performance Materials, Griesheim
Ethanol (70%,96%,99%)	Zentralbereich Neuenheimer Feld, Heidelberg
Ethidiumbromid (1%)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,0	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Eukitt	O. Kindler GmbH & Co, Freiburg
First Strand Puffer	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Formaldehyd, 37 %	Merck, Darmstadt
Formalin, 4 %	Merck, Darmstadt
Gill's Hämatoxylin No.3	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Hämatoxylin	Selbsterstellung
Hämatoxylinindikator	Honeywell Riedel de Haen, Seelze
Isopropanol	Merck, Darmstadt,
Kaliumaluminiumsulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Methanol	Avantor Performance Materials, Griesheim

Moloney Murine Leukemia Virus	
Reverse Transkriptase (MMLV- RT)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mouse anti Rat Ki-67 (M7248016)	Dako Cytomation GmbH, Hamburg
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumiodat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Normal Goat Serum	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach
p16 (F-12) Antikörper	Santa Cruz Biotechnologie Inc., Heidelberg
Paraffin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Paraplast	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Periodsäure (Periodic acid 100g)	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Phospho-p38 MAPK (T180/Y182)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Primer	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Purified mouse IgG2a, Isotyp control	BD Biosciences, Heidelberg
Random hexame primer	Life Technologies GmbH, Darmstadt
RNA loading dye Puffer	Thermo scientific, Darmstadt
RNAsin plus RNase- Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim
Schiff's Reagenz	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
TaqMan Universal PCR Mastermix	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trizol	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tween 20	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Universal Blocking Reagenz 10x	Dako Cytomation GmbH, Hamburg

Ultra pure DNase/ RNAse- freies Wasser	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Avantor Performance Materials, Griesheim
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden im Zentralbereich Neuenheimer Feld, Abteilung 3.3 Zentrallager, Heidelberg erworben.

2.1.3 Pufferlösungen und Reagenzien aus eigener Herstellung

Hämalaun nach P. Mayer (Hämatoxylin)

1 g Hämatoxylin in 1000 ml destilliertem Wasser lösen

0,2 g Natriumjodat hinzufügen

50 g chemisch reines Kalialaun (Kaliumaluminiumsulfat-12-hydrat) dazugeben und auf 50-60 °C erwärmen

Nach dem Erkalten 50 g Chloralhydrat und 1 g kristallines Citronensäuremonohydrat dazugeben und lösen, danach filtrieren.

RNA 10 x Buffer:

0,2 M (83,72 g) Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) (pH 7,0)

50 mM (8,2 g) Natriumacetat (anhydrous/wasserfrei)

10 mM (7,44 g) EDTA (pH 8,0)

pH auf 7 einstellen, auf 2 l mit RNAse-freiem Wasser auffüllen

Agarosegel

1,19 g Agarosepulver

7,5 ml RNA 10 x Buffer

13,5 ml Formalin

4 µg Ethidiumbromidlösung (1%) auf 75 ml RNAse freies Wasser auffüllen.

0,01 M Citratpuffer pH 6,0

2,1 g Citronensäuremonohydrat

900 ml destilliertes Wasser

ca. 13 ml von 2 M NaOH, bis pH = 6,0

mit destilliertem Wasser bis auf 1000 ml auffüllen

2.1.4 Oligonukleotide

HPRT:

forward primer 5'TGACACTGGTAAAACAATGCAAAC 3'

reverse primer 5'AACAAAGTCTGGCCTGTATCCAA 3'

Sonde 5'TTCACCAGCAAGCTTGCAACCTTAACC 3'

Telomerase:

forward primer 5'GACATGGAGAACAAGCTGTTTGC 3'

reverse primer 5'CGTCACCAACAGAAAGTCATCAAC 3'

Sonde 5'ACGTAAAAGCAACCCATCCCGCTGC 3'

P16^{INK4a} :

forward primer 5'GGGCACTGCTGGAAGCC 3'

reverse primer 5'AACGTTGCCCATCATCATC 3'

Sonde 5'CCGAACCTTTTCGGTCGTA 3'

Alle Sequenzen sind in der Richtung 5' - 3' angegeben und wurden bei MWG Biotech (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) erworben.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden p16^{INK4a}-transgene Mäuse (129/Ola*C57BL/6, Punktmutation Genlocus Cdkn2a, zur Verfügung gestellt von Dr. Anton Berns, Netherlands Cancer Institute, Amsterdam), im weiteren Text als INK4a^{-/-}-Mäuse bezeichnet und Wildtyp-Kontrollmäuse (129/Ola*C57BL/6) mit gleichem genetischem Hintergrund verwendet. Die Tiere wurden in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) gehalten und versorgt. Es wurde eine Gruppe von 33 Tieren im Alter von 3 Monaten untersucht. Die INK4a^{-/-}-Mäuse hatten im Mittel ein Gewicht von 31,25 g. Das mittlere Gewicht der Wildtyp-Mäuse (WT-Maus) lag bei 31,87 g. Die Tiere wurden in Gruppen von 3 bis zu 5 Tieren untersucht.

Wildtyp (WT)
129/Ola * C57BL/6



Abb. 4

Tag 3 → N = 3
Tag 7 → N = 5
Tag 14 → N = 5
Tag 30 → N = 3

INK4a^{-/-}

129/Ola * C57BL/6
Punktmutation Genlocus Cdkn2a



Abb. 5

Tag 3 → N = 6
Tag 7 → N = 5
Tag 14 → N = 3
Tag 30 → N = 3

Da es sich um eine Pilotstudie handelt, haben wir nicht von allen Tieren alle Parameter untersuchen können.

Für die Gruppe der Wildtyptiere wurde an Tag 3 keine glomeruläre Filtrationsrate untersucht, auch wurden keine immunhistologischen Untersuchungen dieser Gruppe durchgeführt. Deshalb fehlt bei der Auswertung der Ergebnisse demzufolge bei GFR, Ki-67- und phospho-p38-Immunhistochemie der Tag 3.

2.2.2 Ischämie/Reperfusions-Modell (I/R-Modell)

Für die Untersuchungen wurde ein bereits etabliertes Ischämie/Reperfusions-Modell der Maus verwendet (Aktenzeichen des Tierversuchs 35-9185.81/G-38/05, genehmigt durch das Regierungspräsidium Karlsruhe). Dieses Modell simuliert den Stressfaktor der I/R, wie er nach der Organentnahme im Rahmen der Transplantation entsteht. Durch die realitätsnahen Bedingungen wird ein Rückschluss vom Tiermodell auf den Menschen ermöglicht. Bei dieser Arbeit wurde bei allen Tieren künstlich eine Ischämie induziert. Die finale Tötung und Organentnahme der Tiere erfolgte 3, 7, 14 und 30 Tage nach dieser Operation.

Operationsablauf

Es wurde eine Isofluran/Sauerstoff-Narkose durchgeführt (3% Isofluran). Dabei wurde den Tieren Isofluran und Sauerstoff über einen Narkoseschlauch zugeführt, der direkt über der Schnauze platziert wurde. Zunächst wurden die Tiere in einen luftdicht abgeschlossenen Käfig gesetzt, in welchen das Inhalationsnarkotikum über einen Schlauch eingeleitet wurde. Hierdurch wurden die Tiere stressfrei sediert. Nachdem ein Stadium der Reflexlosigkeit erreicht war, wurden die Tiere auf eine 38°C warme Platte gelegt. In Rückenlage wurden alle Gliedmaßen fixiert. Um die Narkose zu erhalten, wurde den Tieren, wie zuvor beschrieben, das Narkotikum über einen Schlauch zugeführt.

Anschließend wurde unter dem Stereomikroskop, per medianer Laparatomie, das Abdomen eröffnet. Die linke Niere wurde exploriert und inklusive ihrer Gefäße freigelegt. Die Arteria und Vena renalis der linken Niere wurden nachfolgend mittels einer Gefäßklemme für einen Zeitraum von 30 Minuten nicht traumatisch verschlossen und anschließend wieder eröffnet. Ein Auskühlen der Tiere wurde mittels der beheizten Platte und der Benutzung von angewärmter Infusionslösung, welche intraperitoneal verabreicht wurde, verhindert. Die Körpertemperatur wurde zu diesem Zweck während des gesamten Operationsverlaufes rektal erfasst.

Nachfolgend wurde die Inzision mit schichtweisem Wundverschluss versorgt.

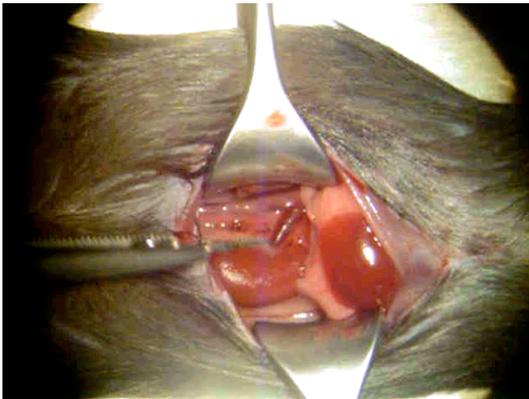


Abb. 6

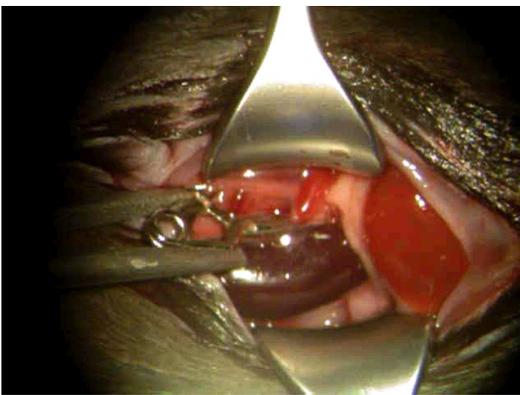


Abb. 7

Abb. 6 und 7: Ischämie/Reperfusion-Modell: das eröffnete Abdomen erlaubt den Blick auf die linke Niere einer Versuchsmaus **a)** vor der Ischämie und **b)** kurz vor der Wiedereröffnung der Nierengefäße. Deutlich zu sehen sind die Zyanose und Schwellung der Niere. (Bildmaterial von Dr. Heidi Braun (Otto-Meyerhofzentrum, Heidelberg) zur Verfügung gestellt)

Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere in eine kleine Intensiveinheit unter Bereitstellung von Sauerstoff auf eine Wärmeplatte gelegt. Da nach der Operation die Möglichkeit einer Niereninsuffizienz bestand, wurden die Mäuse innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Operation zweistündlich und danach täglich auf ihren Gesundheitszustand hin beurteilt. Hierbei wurde vor allem auf das Vorliegen einer Dehydratation (verminderter Hautturgor, Gewichtsverlust), sowie Anzeichen für Schmerzen (lethargisches Verhalten mit eingeschränkter Bewegung) geachtet.

Die Tiere wurden aus diesem Grund am ersten postoperativen Tag in Einzelkäfigen gehalten und danach in einen Käfig mit einem oder zwei weiteren Tieren gehalten, um eine soziale Deprivation zu vermeiden.

Im Falle von offensichtlichen Schmerzzuständen wurde ein Analgetikum (Tramadol) über das Trinkwasser verabreicht. Lethargie, Dehydratation und Gewichtsverlust von mehr als 15 % galten als Kriterien für eine Euthanasie.

2.2.3 Organentnahme

2.2.3.1 Vorbereitungen

Vierundzwanzig Stunden vor Beginn der Operation wurden die Tiere in einen metabolischen Käfig verbracht. In diesem Zeitraum wurde die Ausscheidung des Urins der Tiere erfasst. Die Tiere wurden vor Verbringen in den Käfig und nach Herausholen (nach 24 Stunden) gewogen.

2.2.3.2 Operatives Prozedere bei der Organentnahme

An Tag 3, 7, 14 und 30 nach I/R erfolgte die Organentnahme. Hierzu wurden die Tiere durch Verabreichung des Inhalationsnarkotikums (s.2.2.2.1) tief sediert. Nach Erreichen des Narkosestadiums wurde ihnen Blut mittels kardialer Punktion entnommen. Im Anschluß wurden die Tiere durch Cervikaldislokation getötet und die Organe entnommen. Hierzu wurden nach Eröffnung der Bauchhöhle zunächst beide Nieren aus ihrer Fettkapsel gelöst und entfernt. Die Nieren wurden dreigeteilt, wobei das mittlere Stück den histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen diente. Die beiden Pole dienten jeweils der DNA- und RNA-Isolation. Die Nieren wurden zu diesem Zweck in beschriftete Aluminiumtüten verpackt und zum Transport in flüssigem Stickstoff gelagert.

Des Weiteren wurden auch das Herz, die Milz, die Leber und ein Stück Muskel entnommen. Auch diese Organe wurden zunächst in beschrifteten Aluminiumtüten in flüssigen Stickstoff gelegt und dann bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingelagert.

2.2.4 Organaufarbeitung

Alle für die Histologie und Immunhistochemie vorgesehenen Gewebe wurden zunächst fixiert. Anschließend wurden die Organe eingebettet, bevor sie geschnitten und gefärbt werden konnten.

Der gewonnene Urin und das mittels kardialer Punktion gewonnene Blut wurden im Zentrum für medizinische Forschung (ZMF) analysiert. Sie dienten der Ermittlung des Kreatiningehaltes in Plasma und Serum, sowie der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Die GFR ist das Flüssigkeitsvolumen, das von allen Glomeruli pro Zeiteinheit filtriert wird.

Berechnung der GFR:
$$\frac{\text{Kreatinin Wert Urin} \times \text{Urin Volumen (ml)}}{\text{Kreatinin Wert Plasma} \times 1440 (=24\text{h in min.)}}$$

2.2.4.1 Fixierung

Die Organe wurden für maximal 24 Stunden in 4% Formaldehyd Lösung (=10% Formalin) eingelegt. Danach wurden die Organe in 70% Ethanol überführt und darin für 24 Stunden inkubiert. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe. Dabei wurden die Organe für 2 mal 30 Minuten in 96% Ethanol, anschließend für 2 mal 45 Minuten in 99% Ethanol und letztlich für 45 Minuten in Xylol überführt. Im Anschluss erfolgte das Einbetten der Organe.

2.2.4.2 Einbettung

Zunächst wurden die Organe in beschrifteten Gefäßen (Einbettungskassetten) für 45 Minuten in Paraplast (Schmelztemperatur bei 55 °C) gelegt. Anschließend wurde für 45 Minuten ein Vakuum erzeugt, welches für die folgenden 45 Minuten wieder aufgehoben wurde. Nun wurden die auf 55 °C vorgewärmten Metallschälchen auf eine 60 °C warme Arbeitsplatte gelegt und anschließend mit flüssigem Paraffin befüllt. In Folge wurden die Organstücke aus ihren Einbettungskassetten entnommen und in den Metallschalen mit dem flüssigen Paraffin positioniert. Anschließend wurde das Ganze auf einer Eisplatte abgekühlt, um eine feste Konsistenz zu erreichen.

Nun war es möglich die Gewebeblöcke aus den Metallschalen herauszulösen, woraufhin sie bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert wurden.

2.2.4.3 Schneiden der Gewebeblöcke

Es wurden 10 serielle Schnitte mit einer Dicke von je 3 µm, angefertigt. Die Objektträger wurden in Küvetten sortiert und für mindestens 24 Stunden bei 38°C inkubiert.

2.2.5 Histologische Färbungen

Vor jeder Färbung wurden die Schnitte zunächst deparaffiniert. Im Zuge der Deparaffinierung wurden die Objektträger für 3 mal 5 Minuten in Xylol gebadet. Danach folgte eine absteigende Alkoholreihe aus 100% Ethanol, 96% Ethanol und 70% Ethanol. Diese diente der Rehydratation. Nach jeder Färbung folgte zur Konservierung eine aufsteigende Alkoholreihe aus 70% Ethanol, 96% Ethanol und 100% Ethanol mit anschließendem Xylolbad (3 mal 5 Minuten) zur Entwässerung. Im Anschluss wurde auf die Objektträger ein Eindeckmedium (Eukit) aufgebracht, um ein Deckglas befestigen zu können.

2.2.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Nach Deparaffinierung der Schnitte wurden die Präparate für 2 Minuten in Hämalaulösung (Hämatoxillin Gill No. 3) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in bidestilliertem Wasser kamen die Objektträger für 30 Sekunden in Eosin (Eosin Y 1%ig).

Auswertung:

Die Schnitte wurden auf das Vorhandensein von zellulärer Infiltration beurteilt, welche über das normale Ausmaß nach I/R hinausging. Der Schnitt wurde hierzu mit dem 10er Objektiv unter dem Mikroskop betrachtet. Präparate, welche ein abnormes Maß an Infiltrat aufwiesen, wurden aus den Untersuchungen herausgenommen. Dies war zum Beispiel bei einem Harnwegsinfekt der Fall.

2.2.5.2 Periodic-acid-Schiff-Färbung (PAS-Färbung)

Nach Deparaffinierung wurden die Objektträger für 5 Minuten in Periodsäure (1% Lösung: 2 g auf 200 ml destilliertes Wasser) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten in bidestilliertem Wasser erfolgte eine 25-minütige Inkubation in Schiff's Reagenz.

Im Anschluss erfolgte wieder ein Waschschriff, bevor die Objektträger für 40 Minuten in Hämatoxylin inkubiert wurden.

Auswertung:

Die Schnitte wurden mit einem dem Banff-Score⁹³ angelehnten Score zur Evaluierung akuter und chronischer Läsionen nach Nierentransplantation semiquantitativ ausgewertet. Der Banff-Score wurde entwickelt, um Nierenbiopsien standardisiert zu beurteilen und beinhaltet neben tubulärer Atrophie und Fibrose noch weitere Kriterien. Diese zusätzlichen Kriterien spielen allerdings bei diesem I/R-Modell der Maus keine Rolle, so dass nur ein Teilaspekt des Banff-Scores für die Auswertung der Präparate verwendet wurde. Die Nierenquerschnitte wurden hierzu mit dem 20er Objektiv unter dem Mikroskop betrachtet. Das Präparat wurde in Kortex, kortikomedullären Übergangsbereich und Medulla unterteilt. In die Untersuchungen flossen der Kortex und der kortikomedulläre Übergangsbereich ein. Zu diesem Zweck wurde das Präparat mit dem 20er Objektiv komplett durchgemustert und auf einen chronischen Schaden (atrophische Tubuli) hin beurteilt. Der Schaden pro Bildausschnitt wurde hierbei semiquantitativ in Form eines prozentualen Wertes geschätzt. Aus den einzelnen ausgewerteten Bildausschnitten pro Präparat wurde letztlich ein Mittelwert gebildet. Als chronischer tubulärer Schaden (Atrophie) galten verminderte Diameter der Tubuli, eine abnehmende Zellzahl und eine gewellte und verdickte Basalmembran⁹⁴.

2.2.6 Immunhistochemische Untersuchungen

Bei den Immunhistochemischen Untersuchungen, wurde mit der indirekten Peroxidase-Methode gearbeitet. Diese diente der Markierung der gesuchten Proteine.

Hierbei wurde zunächst ein Primärantikörper gegen das gesuchte Protein und danach ein Peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper aufgetragen. Dieser sekundäre Antikörper bindet an den Erstantikörper.

In einem dritten Schritt wurden DAB und H₂O₂ (das Substrat der Peroxidase) zugefügt, wodurch in der Peroxidase-Reaktion DAB in eine braune, unlösliche Substanz umgewandelt wurde, die auf dem Schnitt sichtbar war.

2.2.6.1 Ki-67 Immunhistochemie

Nach Deparaffinierung folgte eine Erhitzung der Präparate im Dampfkochtopf für 30 Minuten bei 125 °C. Dieser Schritt diente dazu, die nach der Gewebefixation zuvor maskierten antigenen Strukturen zu demaskieren und zu reaktivieren. Nach einer Abkühlphase von einer Stunde im Wasserbad bei 60 °C und weiteren 20 Minuten außerhalb des Wasserbades bei Raumtemperatur wurden die Schnitte in ein Gemisch aus 3% Wasserstoffperoxid und Methanol zur Inaktivierung endogener Peroxidase verbracht. Alle weiteren Schritte erfolgten nun in einer feuchten Kammer, um eine Austrocknung der Präparate zu vermeiden. Die Objektträger wurden soweit getrocknet, dass mit einem Fettstift (Dako Cytomation pen S2002 von Dako, Hamburg) Trennungslinien zwischen dem spezifischen Antikörper-Reaktionsfeld und dem Kontrollfeld (Isotypkontrolle) gezogen werden konnten.

Nach einer kurzen Rehydratationsphase in PBS wurden alle Schnitte für 20 Minuten mit Universal Blocking Reagenz 10x (200 µl Universal Blocking Reagenz 10x (HK085-5KE) in 1800 µl Antibody diluting Buffer with Background reducing components (S3022 von Dako, Hamburg)) beschichtet, um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden.

Nach Absaugen der Lösung wurde der primäre Mausantikörper (Ki-67 monoclonal Mouse anti-Rat IgG2a: 190 mg/l (Clone: MIB-5) (M7248 von Dako, Hamburg)) in einer Verdünnung von 1:25 (24 µl in 576 µl Blocking Reagent), beziehungsweise die Isotypkontrolllösung (Isotype control: mouse IgG2a: 250 µg/ml: 1,6 in 800 µl Antibody diluting buffer) auf die dafür vorgesehenen Felder aufgebracht und für 60 Minuten belassen. Nach einem Waschschrift in PBS wurden alle Reaktionsfelder (das heißt, die beiden Reaktionsfelder mit dem spezifischen Antikörper und das Reaktionsfeld mit der Isotypkontrolle) für 30 Minuten mit Envision-Lösung (Envision+(K4001 from Dako mouse)) linked with peroxidase (K4001 von Dako, Hamburg)) dem Sekundärantikörper, beschichtet. In Folge eines weiteren Waschschriftes wurden alle Reaktionsfelder für 5 Minuten mit DAB (DAB liquid (K3466 von Dako, Hamburg)) i.e.chromogen) inkubiert.

Durch diesen Schritt erfolgte die Sichtbarmachung des spezifisch gebundenen Sekundärantikörpers. Die Schnitte wurden gewaschen und für 5 Minuten mit Hämatoxylin gegen gefärbt.

Auswertung:

Die beiden zuvor gefärbten Schnitte wurden hierbei mit dem 20er Objektiv unter dem Mikroskop durchgemustert. Danach wurde ein Schnitt ausgewählt. Bei diesem wurde in Folge der Kortex komplett durchgemustert und zehn randomisierte Bildausschnitte dieses Schnittes abfotografiert. In diesen Bildausschnitten wurden nun die positiven (braun markiert) und negativen Zellen in den Tubuli, den Glomerula und dem Interstitium als absolute Zahlen und der prozentuale Anteil positiver Zellen an der Gesamtzahl ermittelt. Auch der prozentuale Anteil positiver Tubuli wurde ermittelt.

2.2.6.2 Phospho-p38 Immunhistochemie

Prinzipiell unterscheidet sich die phospho-p38 Immunhistochemie nur in wenigen Punkten von der Ki-67 Immunhistochemie (siehe 2.2.6.1) und wird daher hier vor allem unter Berücksichtigung der Unterschiede dargestellt.

Nach der Antigendemaskierung und der Inaktivierung endogener Peroxidasen wurden die einzelnen Reaktionsfelder mit Hilfe eines Fettstiftes begrenzt, so dass sie im Anschluss für 10 Minuten mit 20% Normal Goat Serum (0,8ml NGS + 3,2 ml Antibody diluting buffer (S26 von Chemicon, Hampshire, England)) inkubiert werden konnten.

Danach erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem primären *phospho-p38 Antikörper* (Phospho-p38 monoclonal rabbit anti-human IgG (1:100=10 µl in 990 µl antibody diluting buffer)(New England Biolabs GmbH, Frankfurt)) sowie der *Isotypkontrolllösung* (Rabbit (DA1E) mAb IgG XP Isotype Control(PE Conjugate)). Die Schnitte wurden in PBS gewaschen und anschließend für dreißig Minuten mit *Envision-Lösung* (EnVision+(K4003 from Dako (rabbit9) linked with peroxidase (K4003 von Dako, Hamburg)) inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift in PBS und die Inkubation mit *DAB*. Die Schnitte wurden gewaschen und abschließend für 5 Minuten mit Hämatoxylin gegen gefärbt.

Auswertung:

Die Auswertung der phospho-p38 Immunhistochemie erfolgte wie die Auswertung der Ki-76 Immunhistochemie, beschrieben unter 2.2.6.1.

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

2.2.7.1 RNA-Isolation

Prinzip:

Um RNA untersuchen zu können, muss man diese zunächst aus Geweben extrahieren, bzw. isolieren. Da RNA höchst instabil ist, ist es wichtig, auf Eis und dabei sauber und zügig zu arbeiten. Alle Methoden zur Isolierung von RNA beruhen darauf, die Zellen in einer chemischen Umgebung zu lysieren, in der RNasen schnell denaturiert werden. Anschließend wird die RNA von den übrigen zellulären Bestandteilen getrennt. Auch hierfür sollten Bedingungen herrschen, welche die noch verbleibende RNase-Aktivität limitieren oder ganz eliminieren. Anschließend können RNA, DNA und Proteine durch eine Phasentrennung separiert werden, so dass die RNA isoliert werden kann. Die RNA wird gewaschen und für eine weitere Verwendung in RNase-freiem Wasser gelöst.

Ablauf:

Zur RNA-Isolierung wurde das eingefrorene Nierengewebe verwendet. Zu Beginn musste das Gewebe homogenisiert werden. Dieser Schritt erfolgte mit Hilfe eines Homogenisators (ULTRA-TURRAX, IKA-Werke GmbH und Co. KG, Staufen) bei den Geweben der Tage 3, 7, und 14. Alle Schritte im Rahmen der Homogenisierung erfolgten auf Eis.

Die bei -80 °C konservierten Gewebe wurden zunächst gewogen, bevor sie in ein mit 1 ml Trizol befülltes Reagenzglas überführt und mit Hilfe des Homogenisators zerkleinert wurden. Anschließend wurde das Homogenisat in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 12000 x g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert.

Das Zerkleinern und Homogenisieren der Tag-30 Gewebe erfolgte aufgrund der niedrigen Organmenge mit einem TissueLyser (TissueLyser, Quiagen GmbH, Hilden). Der TissueLyser zerreisst und homogenisiert mit Hilfe von Metallkugeln gleichzeitig mehrere biologische Proben durch hochfrequentes Schütteln. So konnte ein Gewebeverlust relativ niedrig gehalten werden. Anschließend wurde auch dieses Homogenisat wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Im Zuge der Phasenseparierung wurde nachfolgend der klare Überstand abpipetiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wodurch sich die Nucleoproteine absetzen konnten.

Nach der Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurden die Reaktionsgefäße für 15 Sekunden kräftig geschüttelt und anschließend nochmals für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie für 15 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert wurden.

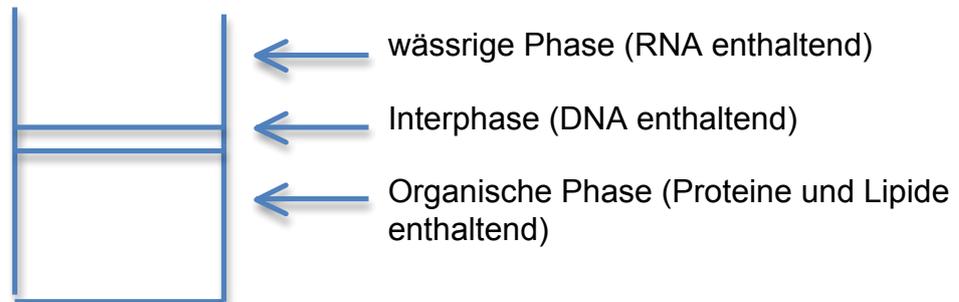


Abb. 8: Phasenseparierung

Im Anschluß erfolgte die RNA-Präzipitation. Dabei wurde die wässrige Phase aus der Phasenseparierung zuvor in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 0,5 ml Isopropyl Alkohol für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 12000 x g. Im folgenden Schritt wurde die RNA gewaschen, um überschüssige Reagenzien zu entfernen. Dazu wurde der Überstand aus der Zentrifugation zuvor abpipetiert und verworfen, so dass nur noch ein kleines RNA-Pellet übrig blieb. Zu diesem wurde 1 ml 75% Ethanol zugegeben und gut durchmischt. Anschließend wurde die Probe für 5 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Probe erneut für 5 Minuten bei 7500 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte das Lösen der RNA. Hierbei wurde das RNA-Pellet für 5-10 Minuten bei Raumluft getrocknet und anschließend in 20-80 µl RNase-freiem Wasser gelöst (je nach Größe des Pellets), bevor die Probe bei -80 °C eingelagert wurde.

2.2.7.2 UV-Spektroskopie

Prinzip:

Bei der UV-Spektroskopie arbeitet man mit einem Photometer, um die Konzentration und die Reinheit der RNA zu überprüfen.

Hierbei wird die Extinktion monochromatischen Lichtes, mit der Wellenlänge, bei der die zu untersuchende Substanz ihr Absorptionsmaximum hat, beim Durchgang durch eine probenhaltige Küvette gemessen. Daraus kann nun mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes die Konzentration berechnet werden.

$$E_{\lambda} = -\lg(I_1/I_0) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d$$

E_{λ} =Extinktion
 I_1 =Intensität des transmittierenden Lichts
 I_0 =Intensität des eingestrahlten Lichts
 ε_{λ} =Extinktionskoeffizient
 c =Konzentration der absorbierenden Substanz
 d =Dicke des durchstrahlten Körpers

Ablauf:

Nach dem Auftauen der Proben auf Eis wurden 2 µl der RNA-Probe mit 98 µl RNase-freiem Wasser in einem Reaktionsgefäß durchmischt. Mit dem Photometer wurde anschließend die Extinktion bei 260 und 280 nm gegen Wasser als Leerwert gemessen, bevor die einzelnen Proben in Quarzküvetten durchgemessen werden konnten. Durch das angegebene Verhältnis der Extinktion von 260 zu 280 nm konnte zudem Aufschluss über die Reinheit der Probe erlangt werden. Das Verhältnis sollte hierbei mindestens 1,8 betragen.

2.2.7.3 Agarosegelelektrophorese

Prinzip:

Da die RNA gegenüber Verunreinigungen mit Ribonukleasen sehr anfällig ist, muss nach der Isolation überprüft werden, ob die RNA intakt ist. Zu diesem Zweck verwendet man die Gelelektrophorese. Die RNA wandert hierbei aufgrund ihrer negativen Ladung in einem denaturierten Agarosegel zur Anode. Das eingesetzte Formaldehyd verhindert dabei die Sekundärstrukturbildung, so dass sich die RNA anhand der Molekülgröße in Fraktionen (28S, 18S) auftrennen kann. Durch Einfärben der RNA mit Ethidiumbromid können die Fraktionen unter UV-Licht schließlich sichtbar gemacht und so die Isolation beurteilt werden.

Ablauf:

Zunächst wurden die Elektrophoresekammer, die Gelkammer und der Taschenkamm gründlich mit H_2O_2 gereinigt und anschließend mit Laufpuffer (RNA-Puffer in einfacher Konzentration) befüllt. Zur Gelherstellung wurden 1,19 g Agarosepulver in 75 ml Aqua injectabile gelöst, anschließend in der Mikrowelle für 2 Minuten bei 400 Watt erhitzt und unter dem Abzug mit 4 μl Ethidiumbromid (1%) versetzt. Unter schwenkender Bewegung wurde alles durchmischt, bis ein Abkühlen auf ca. 60 °C erfolgte. Nun wurden 13,5 ml Formaldehyd (37%) und 7,5 ml zehnfach konzentrierter RNA-Puffer zugegeben. Das Ganze wurde nochmals gut durchmischt und schließlich in die Gelkammer gegossen. Wichtig war hierbei, ein gerader Untergrund und das Vermeiden von Luftblasenbildung, um optimale Bedingungen zu schaffen. Nach der Aushärtung des Gels wurde der Taschenkamm entfernt und die Gelkammer konnte in die mit Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt werden. Anschließend wurden die RNA-Proben aufgetaut. Nach dem Auftauprozess wurde 1 μg der RNA mit 2 μl RNase-freiem Wasser und 2 μl Probenpuffer vermischt. Zur Denaturierung der RNA erfolgte ein Erhitzen des Gemisches für 15 Minuten bei 60 °C im Thermomixer. Danach konnten die Taschen der Gelkammer mit den Proben nacheinander befüllt werden. Die Elektrophoresekammer wurde nun über etwa 12 Stunden bei 12 Volt an ein Netzteil angeschlossen. Danach wurde das Gel herausgenommen und unter UV-Licht beurteilt sowie zur Dokumentation abfotografiert. Bei Intaktheit der RNA konnten die 28S und 18S rRNA-Banden als eindeutige, distinkte Banden in einem Verhältnis von 2:1 nachgewiesen werden.

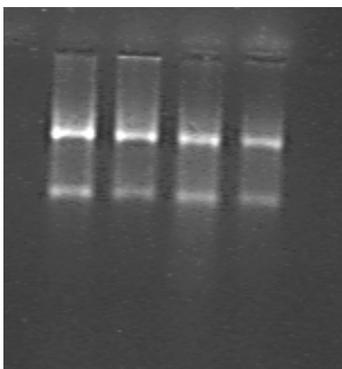


Abb. 9: Agarosegelelektrophorese: zu sehen ist das 2:1 Verhältnis der 28S-rRNA- (oben) und 18S-rRNA- (unten) Bande der aufgetragenen RNA

2.2.7.4 Complementary DNA (cDNA)- Synthese

Prinzip:

Soll DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden, so benötigt man dazu spezifische DNA-Polymerasen. Diese sind DNA-abhängig und dadurch nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Um die Transkription eines Genes nachzuweisen, muss man jedoch die abgelesene RNA untersuchen. Aus diesem Grund setzt man zunächst eine RT-RNA-abhängige DNA-Polymerase ein, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Diese cDNA kann nun als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen daraus zu amplifizieren. Mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase kann also aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden.

Im einzelnen benötigt die RNA-abhängige DNA-Polymerase zunächst einen Primer (kurzer, komplementärer DNA-Abschnitt), welcher an die RNA binden kann und so die DNA-Synthese initiiert. Als Primer fungieren hierbei Random-Primer (Oligonukleotide). Durch die Zugabe einzelner freier Nucleotide können diese mit Hilfe der reversen Transkriptase nun komplementär an die RNA angefügt werden. Für die cDNA-Synthese ist hierbei ein bestimmter pH-Wert und eine bestimmte Salzkonzentration nötig, weshalb ein Puffer hinzugegeben werden muss. Als Kofaktor der reversen Transkriptase wird zudem Magnesium eingesetzt. Um einen Verdau der RNA zu verhindern, wird außerdem ein RNase-Inhibitor (RNasin) eingesetzt. Damit RNasin aktiv werden kann, muss mit Hilfe von DTT eine reduzierende Pufferbedingung erzeugt werden. DTT spaltet Disulfidbrücken von Nucleotiden und bewirkt so die Entfaltung der RNA. Die Zugabe von BSA sorgt dafür, dass die cDNA-Synthese stabiler und sauberer abläuft.

Ablauf:

Zunächst wurde ein Mastermix erstellt. Dieser setzte sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

7.4 µl	DEPC H ₂ O	7.4 µl
8.0 µl	First Strand Buffer (5x)	8.0 µl
1.0 µl	d NTP (10x)	1.0 µl
0.4 µl	1% BSA	0.4 µl
0.4 µl	0.1M DTT	0.4 µl
0.8 µl	RNasin	0.8 µl
	Random	
0.6 µl	hexamer (1µg)	0.6 µl
	MMLV (Reverse	
1.4 µl	Transcriptase)	1.4 µl
20.0 µl	Aliquot	20 µl

Diese 20 µl Mastermix je Probe wurden zunächst in PCR-Tubes vorgelegt, bevor 1 µg der RNA hinzugefügt wurde. Das Ganze wurde mit einer Pipette durchmischt und anschließend in die PCR-Maschine gebracht.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe eines PCR-Programms, welches sich aus folgenden drei Schritten zusammensetzte:

1. 5 Minuten bei Raumtemperatur
2. 60 Minuten bei 37 °C
3. 5 Minuten bei 97 °C

Abschließend wurden die Proben bei –20 °C gelagert.

2.2.7.5 Quantitative Real-time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Prinzip:

Mit Hilfe der qRT-PCR lässt sich die Expressionsrate der jeweils zugrundeliegenden mRNA darstellen, so dass sich Unterschiede in der Expression verschiedener Gene in Geweben nachweisen lassen. Für die vorliegende Arbeit wurde die Quantifizierung mittels Fluoreszenzdetektion und der Hilfe einer TaqMan-Sonde (Hydrolyse-Sonde) verwendet.

Zwei Primer flankieren den gesuchten Genabschnitt auf der cDNA. Zusätzlich hybridisiert ein komplementäres Oligonukleotid (TaqMan-Sonde), welches an einem Ende mit dem Quencher- und an dem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) markiert ist, in diesem Abschnitt. Die Fluoreszenz des Reporters wird bei einer intakten Sonde durch den Quencher unterdrückt. Wenn die Taq-Polymerase, welche zusätzlich eine Exonuklease-Aktivität besitzt, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaut, kommt es zu einer Entfernung von Quencher und Fluorophor voneinander. Dadurch kann eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional zur cDNA Menge beziehungsweise mRNA Menge an und kann mit Hilfe eines Detektiergerätes gemessen werden. Es ist wichtig, zur Kontrolle zusätzlich ein externes Referenzgen zu messen. Das Referenzgen sollte leicht zu detektieren, aber schwierig durch externe und interne Faktoren zu beeinflussen sein. Ein Beispiel hierfür ist das Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-Gen (HPRT), welches im Rahmen dieser Untersuchungen eingesetzt wurde.

Der Versuchsablauf für den Expressionsnachweis von p16^{INK4a} und Telomerase war identisch. Der Unterschied bestand lediglich in den eingesetzten Primern beziehungsweise der Probe und der Zusammensetzung der Referenz (Pool). Der Pool diente als Referenzwert, auf den die Werte aller anderen Proben bezogen wurden, um damit verschiedene Versuchsansätze vergleichbar zu machen. Die Auswahl der für den Pool verwendeten Proben hängt von dem zu untersuchenden Gen ab. Der Pool sollte aus Proben mit hoher Expression bestehen. Für den p16^{INK4a}-Pool wurden cDNA-Proben alter Tiere verwendet, während für den Telomerasepool cDNA-Proben jüngerer Tiere eingesetzt wurden. Entscheidend hierbei ist die Altersabhängigkeit der exprimierten Menge dieser Gene.

Auf jeder Platte befanden sich zwei Felder für die no template control (NTC). NTC ist die Wasserkontrolle, in der keine DNA eingesetzt wurde.

Durchführung:

Zunächst wurden zwei Mastermix-Lösung für das zu untersuchende Gen und das Referenzgen (HPRT) hergestellt. Die Mastermix-Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

0,375 µl FW Primer (20 µM)
 0,375 µl RV Primer (20 µM)
 0,5 µl Probe (10 µM)
 2 µl Magnesiumchlorid (25 mM)
 4,25 µl Wasser
 12,5 µl Universal Mastermix

Die Mastermix-Lösung wurde durchmischt und anschließend auf eine 96 Loch (Well) PCR-Platte pipettiert. Dabei wurde eine Hälfte der Platte für das zu untersuchende Gen und die andere Hälfte für das Kontrollgen verwendet. Es wurden jeweils 20 Proben (Doppelbestimmung) sowie der Pool (Sechsfachbestimmung) und eine no template control (NTC) pipettiert.

In jedes einzelne Well wurden dabei zunächst 20 µl Mastermix vorgelegt, bevor 5 µl der cDNA zugegeben wurden, inklusive der Pool- und Wasserfelder.

Die Platten wurden durch leichtes Schütteln durchmischt, anschließend mit einer entsprechenden Folie verschlossen und für zwei Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die belegten Platten in das PCR-Gerät gestellt.

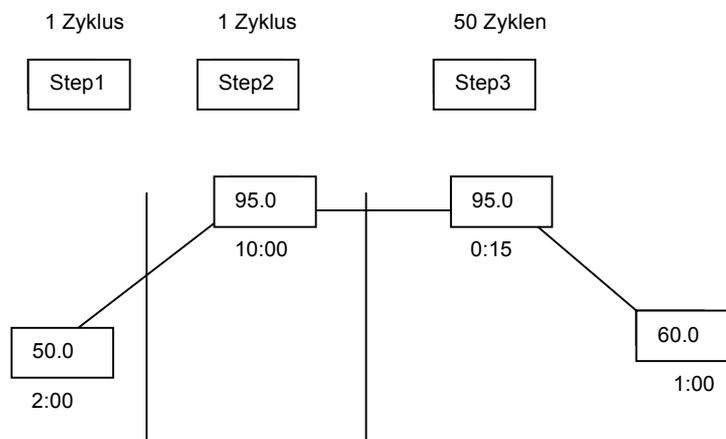


Abb. 10: Protokoll der PCR-Amplifikation. Step 1 : Verdau zurückgebliebener Enzyme bei 50 °C für 2 Minuten, Step 2 : dient der Aktivierung der Transkriptase bei 95 °C für 10 Minuten, Step 3 : in einem ersten Schritt erfolgt die Auftrennung der cDNA bei 95 °C für 15 Sekunden, in einem zweiten Schritt erfolgt das Ablesen der DNA-Stränge und das Ablösen der Sonde bei 60 °C für 1 Minute.

Auswertung:

In der Startphase der PCR ist die DNA-Menge begrenzt. Zum Ende hin ist die DNA-Menge der Zielsequenz so stark angestiegen, dass immer häufiger Produktfragmente miteinander hybridisieren. Dadurch wird die PCR gehemmt (Plateauphase). Zwischen der Startphase und der Plateauphase liegt die exponentielle Phase. In dieser Phase verdoppelt sich die Zielsequenz unter optimalen Bedingungen. Der Anfang dieser exponentiellen Phase, wenn die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, wird zur Quantifizierung genutzt und als CT-Wert (Threshold Cycle) bezeichnet. Mit Hilfe des Referenzgens kann die Expression des Zielgens rechnerisch normalisiert werden. Dabei werden die Signale des Referenzgens verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA- oder DNA-Proben auszugleichen. Die Berechnung setzt eine optimale PCR-Effizienz voraus (Effizienz = 2). Die relative Genexpression wird nun mit Hilfe der Delta-Delta-CT-Methode berechnet. Bei dieser Berechnung ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen wichtig. Die CT-Werte werden hierbei einfach voneinander abgezogen (delta-CT). Nachfolgend werden die dCT-Werte vom Mittelwert der Pool-dCT-Werte abgezogen. Aus den Ergebnissen wird der Logarithmus gebildet, woraufhin im Anschluß die Doppelbestimmungen nach Pfaffl gemittelt werden können:

$$\text{dCT} = \text{CT Zielgen (p16 bzw. Telomerase)} - \text{CT Referenzgen (HPRT)}$$

$$\text{ddCT} = \text{dCT Proben} - \text{dCT Kontrolle (Pool)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\text{ddCT}}$$

2.2.8 Statistik

Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS (Version 20.0). Die Werte wurden mittels nicht parametrischer Tests bei unabhängigen Stichproben verglichen. Für die zeitlichen Verläufe innerhalb der Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet, ein Vergleich zwischen zwei Gruppen (KO versus Wildtyp) erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Ein p-Wert <0,05 galt als statistisch signifikant. Alle Werte wurden als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Gesamt- und Nierengewicht der Mäuse, Nierenfunktionsdaten

Die Tiere wurden sowohl vor der Operation als auch vor der Organentnahme gewogen. Vor der Operation wurde versucht, die Mäuse der Vergleichsgruppen zu den Entnahmetagen so zu wählen, dass sie sich in Bezug auf das Gewicht nicht signifikant voneinander unterschieden, um einen Einfluss des unterschiedlichen Gewichts auf die Ergebnisse auszuschließen („matchen“). Tabelle 1 zeigt, dass die Gewichte der transgenen Tiere sich vor der Operation nicht signifikant von den Gewichten der Wildtypiere unterschieden haben.

Gewicht vor OP		
Tag 3	INK4a ^{-/-}	31,25 (± 2,27)
	WT	34,77 (± 1,79)
Tag 7	INK4a ^{-/-}	30,01 (± 1,66)
	WT	31,79 (± 0,19)
Tag 14	INK4a ^{-/-}	27,22 (± 1,60)
	WT	28,04 (± 2,49)
Tag 30	INK4a ^{-/-}	34,29 (± 2,64)
	WT	32,13 (± 1,19)

Tabelle 1: Körpergewicht (g) der untersuchten Tiere vor der Operation
Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der untersuchten Tiergruppen

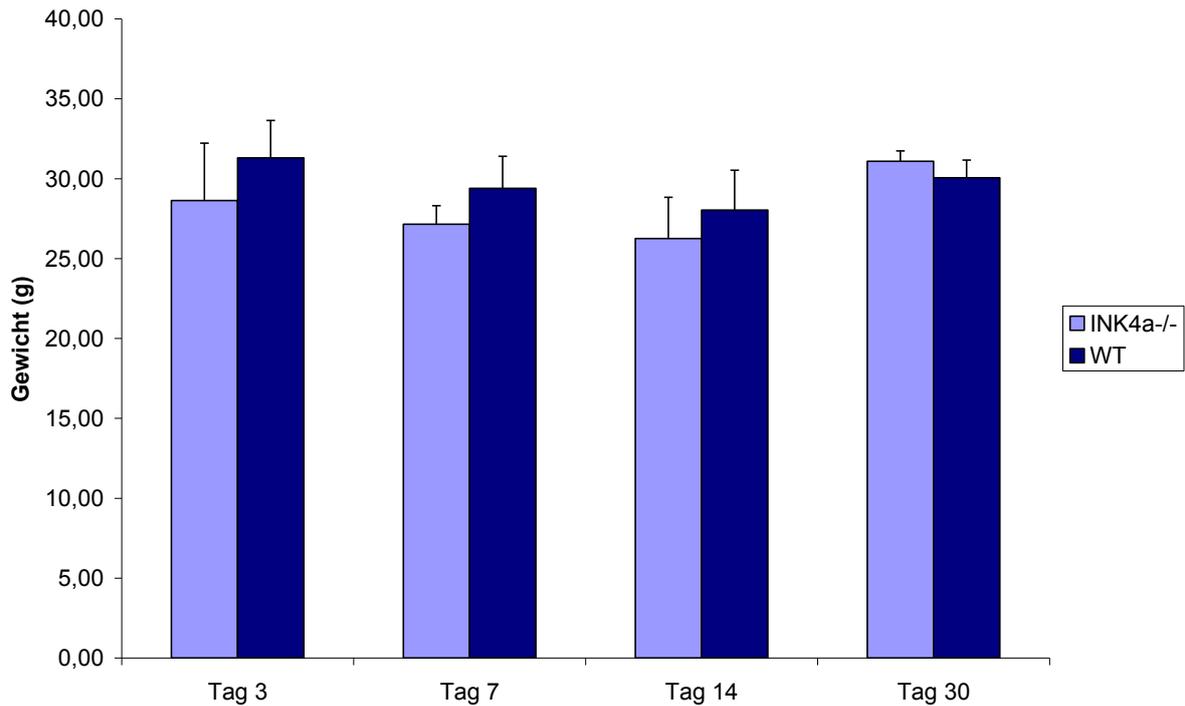


Abb. 11: Körpergewicht (g) der untersuchten Tiere vor der Organentnahme

Dargestellt werden Gewichtsmittelwerte und Standardabweichungen der untersuchten Tiergruppen, die 3, 7 14 bzw. 30 Tage nach der Ischämie, direkt vor der finalen Organentnahme ermittelt wurden

Auch vor den Organentnahmen waren die Mäuse an allen Tagen vergleichbar schwer, d.h. es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und INK4a^{-/-}-Mäusen und auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Entnahmetagen (siehe Abbildung 11).

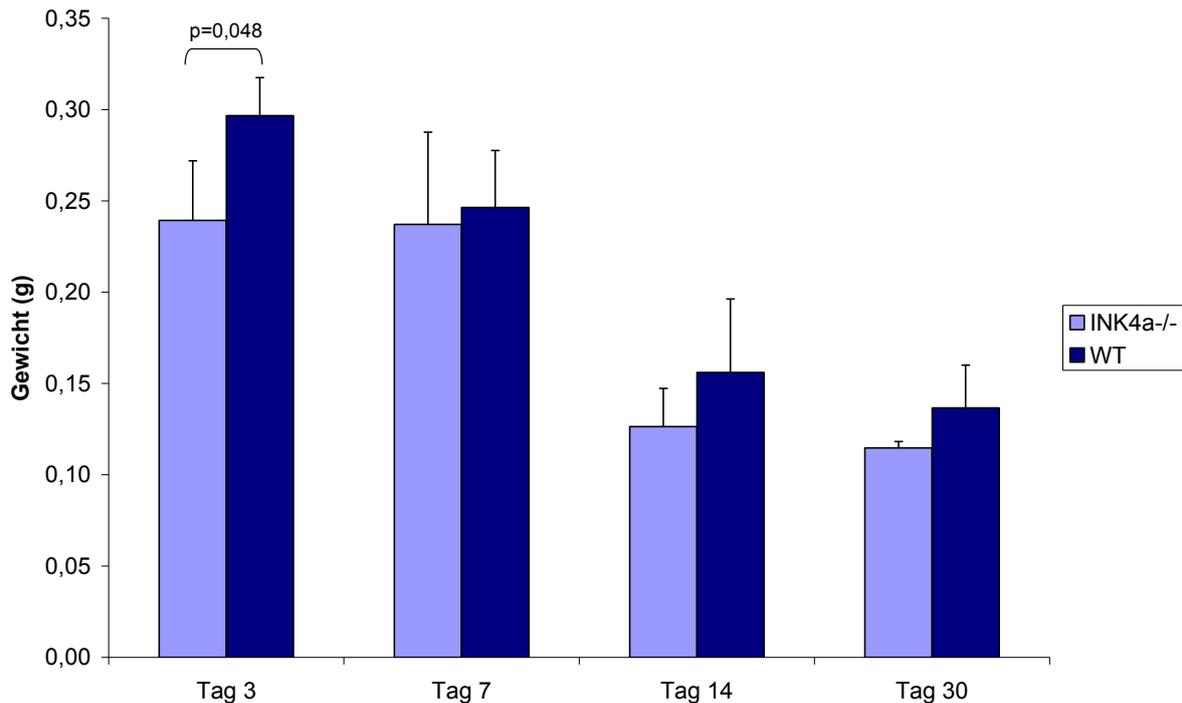


Abb. 12: Gewicht der linken Niere (geklemmt) im Rahmen der Organentnahme

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen und signifikanten Unterschiede bezogen auf das Gewicht der linken Niere bei den untersuchten Tieren.

Signifikanz im Vergleich beider Gruppen: Tag 3 ($p = 0,048$)

Signifikanz im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p = 0,07$

Signifikanz im Verlauf der WT-Mäuse: $p = 0,001$

Bei den Organentnahmen wurden sowohl die linke, geklemmte, als auch die rechte, unbehandelte Niere aller Tiere gewogen. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der geklemmten Nieren. Das Gewicht der linken Niere nahm im Verlauf ab. Tendenziell waren die geklemmten Nieren der transgenen Mäuse zu allen Zeitpunkten leichter als die Nieren der Wildtypmäuse. An Tag 3 war dieser Unterschied auch knapp signifikant. In beiden Gruppen nahmen die Nierengewichte im Laufe des Versuchs signifikant ab. Die Nierengewichte waren demnach an Tag 30 bei beiden Gruppen am geringsten.

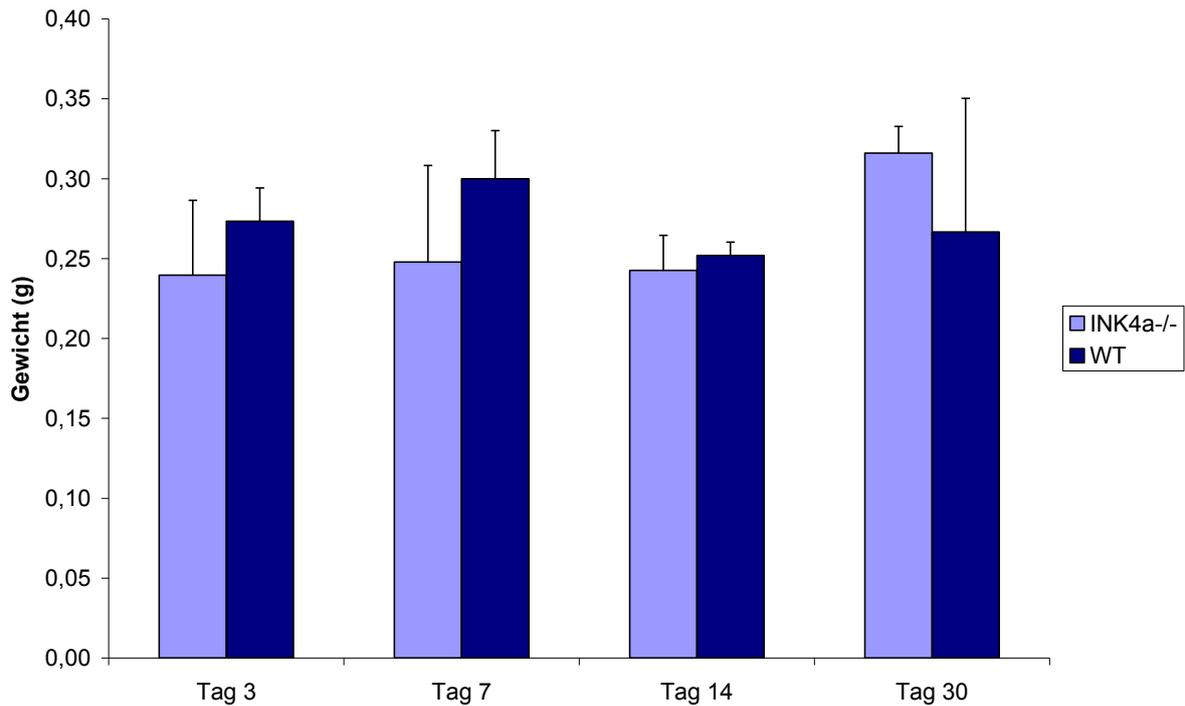


Abb. 13: Gewicht der rechten Niere im Rahmen der Organentnahme

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen bezogen auf das Gewicht der rechten Niere bei den untersuchten Tieren.

In Abbildung 13 wird das Gewicht der rechten Niere im Rahmen der Organentnahme graphisch dargestellt. Im Gegensatz zur linken Niere war das Gewicht der rechten Niere relativ gleich bleibend.

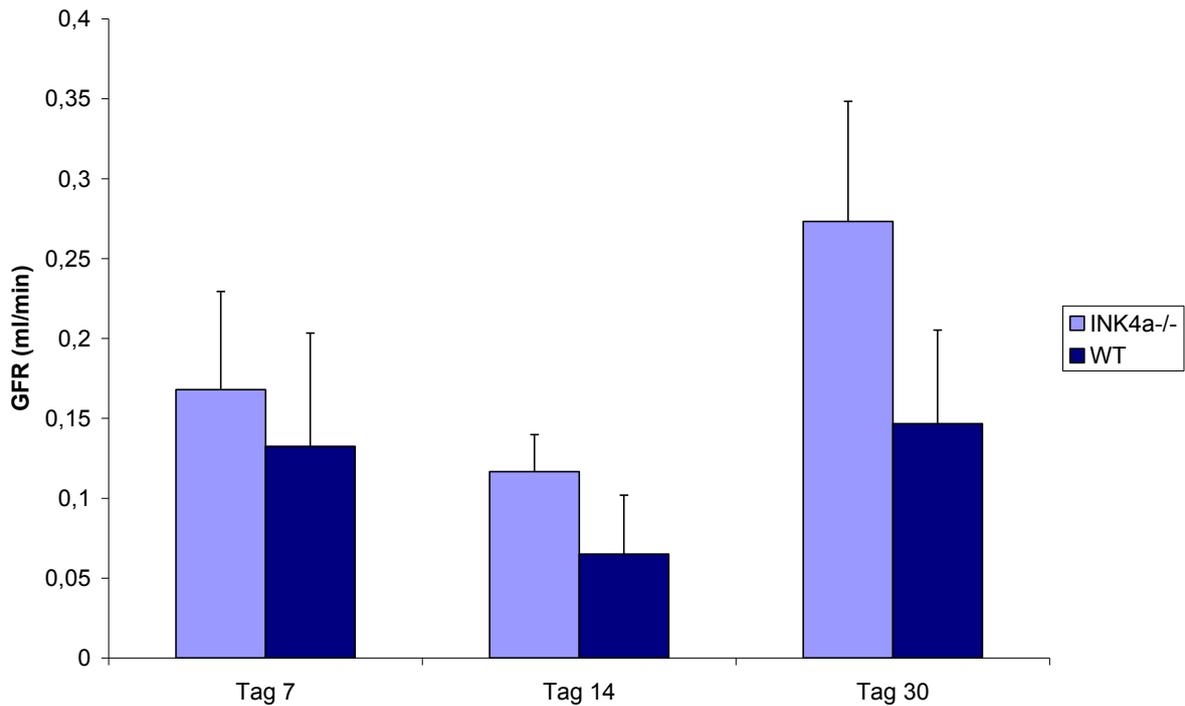


Abb. 14: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen bezogen auf die glomeruläre Filtrationsrate der untersuchten Tiere.

In Abbildung 14 wird die ermittelte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei den untersuchten Tieren graphisch dargestellt. Die GFR war an allen Tagen nach I/R bei den transgenen Tieren höher als bei den WT-Tieren. Diese Unterschiede waren allerdings zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Die GFR sank zum Tag 14 hin ab und stieg an Tag 30 wieder an. Allerdings auch im Verlauf ohne statistisch signifikante Unterschiede.

3.2 Histologie

3.2.1 Chronischer Schaden

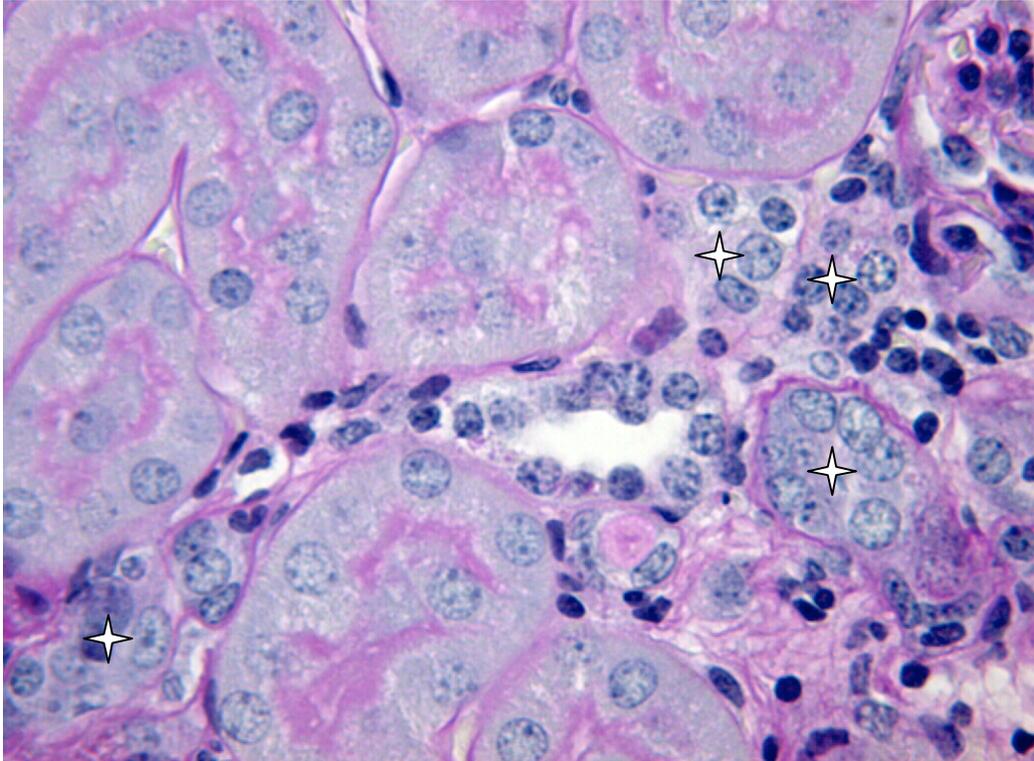


Abb. 15: Histologischer Schnitt der Niere einer INK4a^{-/-}-Maus (Tier-Nr.353) an Tag 30
Die durch Sterne gekennzeichneten Bereiche stehen für chronischen (atrophischen) Schaden. (PAS-Färbung; 40x Objektiv)

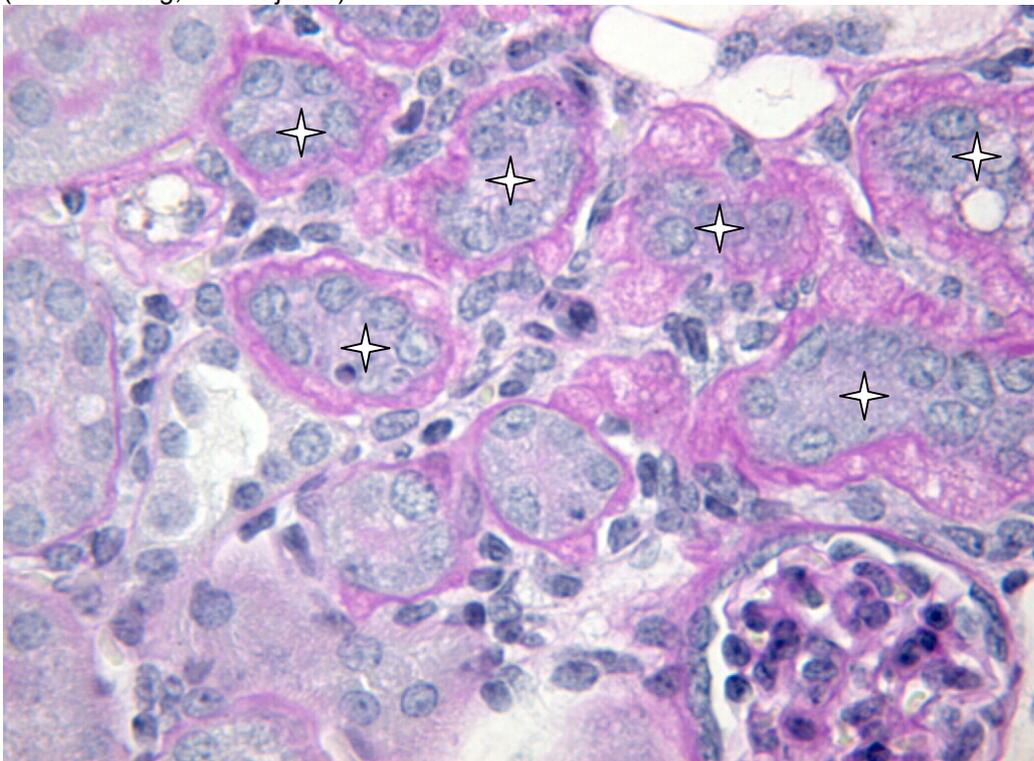


Abb. 16: Histologischer Schnitt der Niere einer WT-Maus (Tier-Nr.459) an Tag 30
Die durch Sterne gekennzeichneten Bereiche stehen für chronischen (atrophischen) Schaden. (PAS-Färbung; 40x Objektiv)

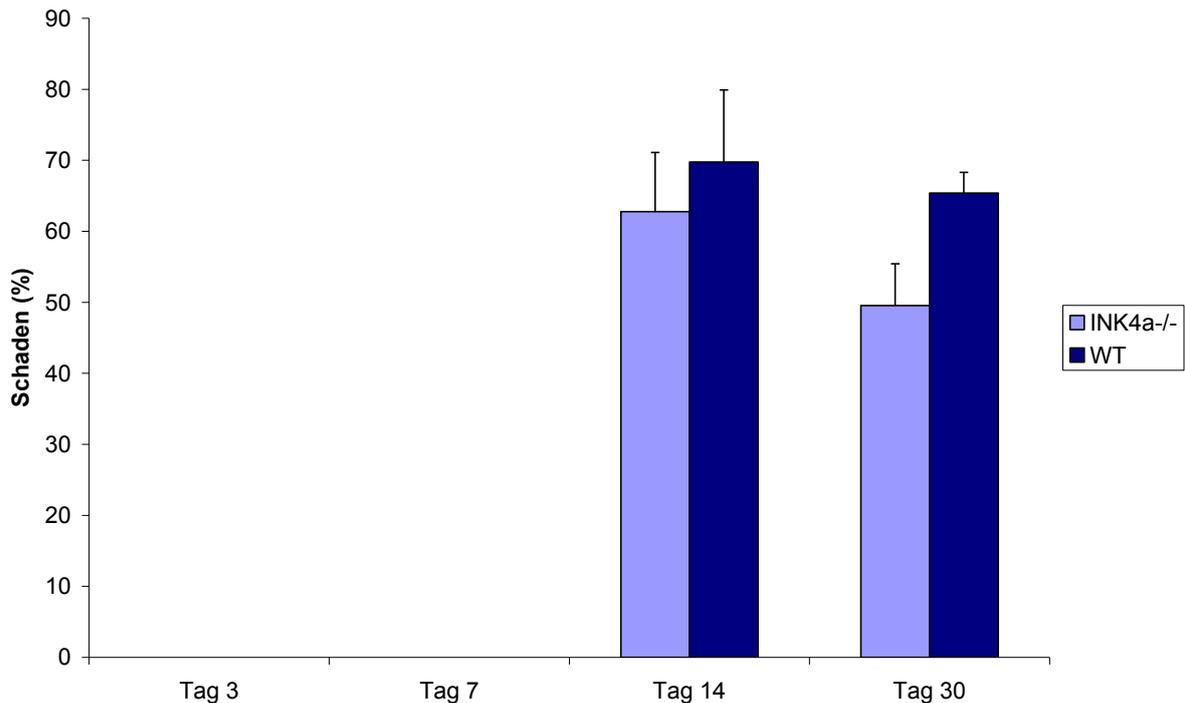


Abb. 17: Chronischer Schaden im Bereich des Nierenkortex

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen bezogen auf den chronischen Schaden im Bereich des Nierenkortex bei den untersuchten Tieren.

Signifikanz im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p = 0,001$

Signifikanz im Verlauf der WT-Mäuse: $p = 0,004$

In Abbildung 17 wird der chronische Schaden im Bereich des Nierenkortex dargestellt. Ein chronischer Schaden (s.2.2.5.2) trat ab Tag 14 auf. An Tag 30 zeigte sich etwas weniger chronischer Schaden. Diese Veränderung im zeitlichen Verlauf war in beiden Gruppen signifikant. Der chronische Schaden bei den Wildtyptieren war tendenziell höher als bei den transgenen Mäusen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

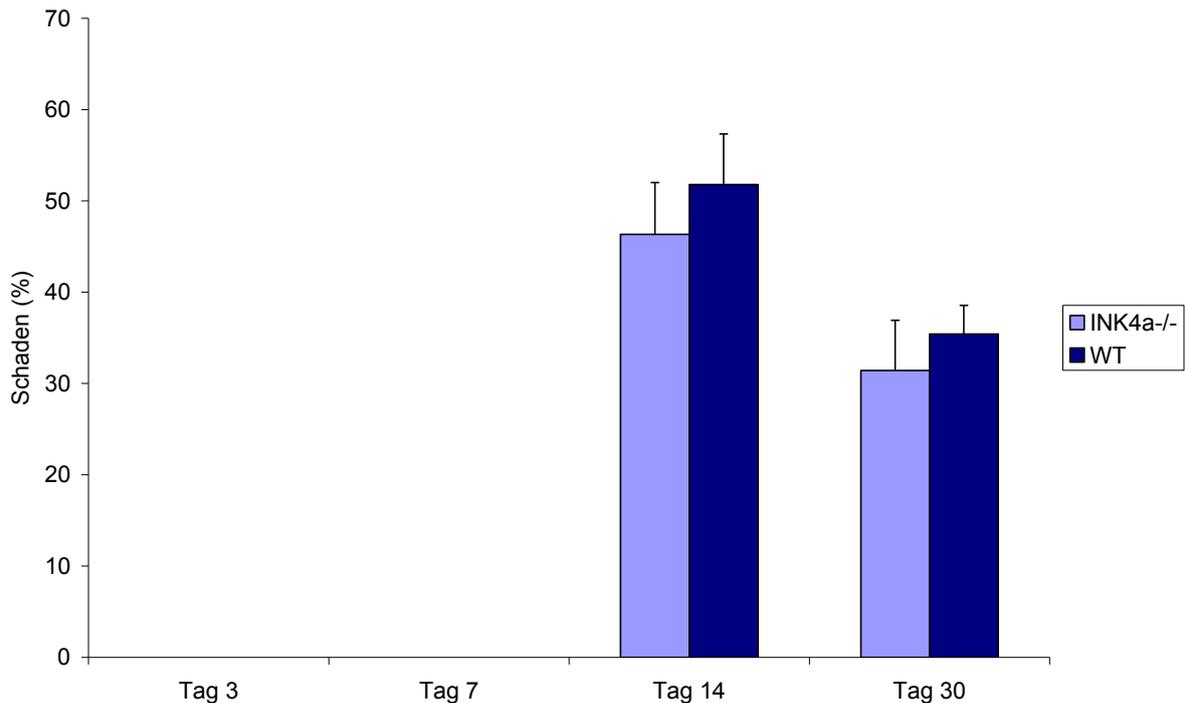


Abb. 18: Chronischer Schaden im Bereich des Übergangs zwischen Kortex und Medulla

Dargestellt werden die Mittelwerte, Standardabweichungen und signifikanten Unterschiede bezogen auf den chronischen Schaden im Bereich des Überganges zwischen Nierenkortex und Nierenmark bei den untersuchten Tieren.

Signifikanz im Verlauf der *INK4a^{-/-}*-Mäuse: $p = 0,001$

Signifikanz im Verlauf der *WT*-Mäuse: $p = 0,002$

In Abbildung 18 wird der ermittelte chronische Schaden im Bereich des Überganges, also dem Bereich zwischen Nierenkortex und Medulla, dargestellt. Ein chronischer Schaden trat ab Tag 14 auf, dieser war an Tag 30 bereits in beiden Gruppen deutlich geringer ausgeprägt ist. Bei den Wildtyptieren war der chronische Schaden sowohl an Tag 14 als auch an Tag 30 tendenziell höher. Der Unterschied zu den transgenen Mäusen war jedoch nicht signifikant.

3.3 Immunhistochemische Untersuchungen

3.3.1 Ki-67 Immunhistochemie

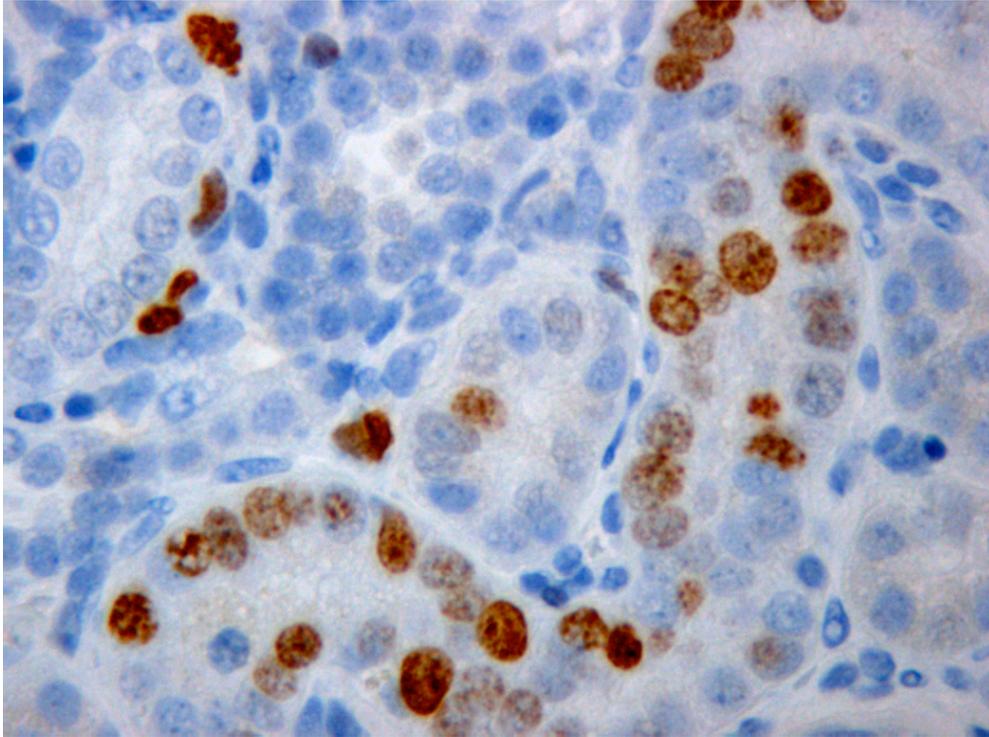


Abb. 19 Ki-67 Immunhistochemie bei einer INK4a^{-/-}-Maus (Tier-Nr. 486) an Tag 14.
Die braun gefärbten Zellen stellen die positiven Zellen (also Ki-67-Antigen enthaltende Zellen) dar.
(40x Objektiv)

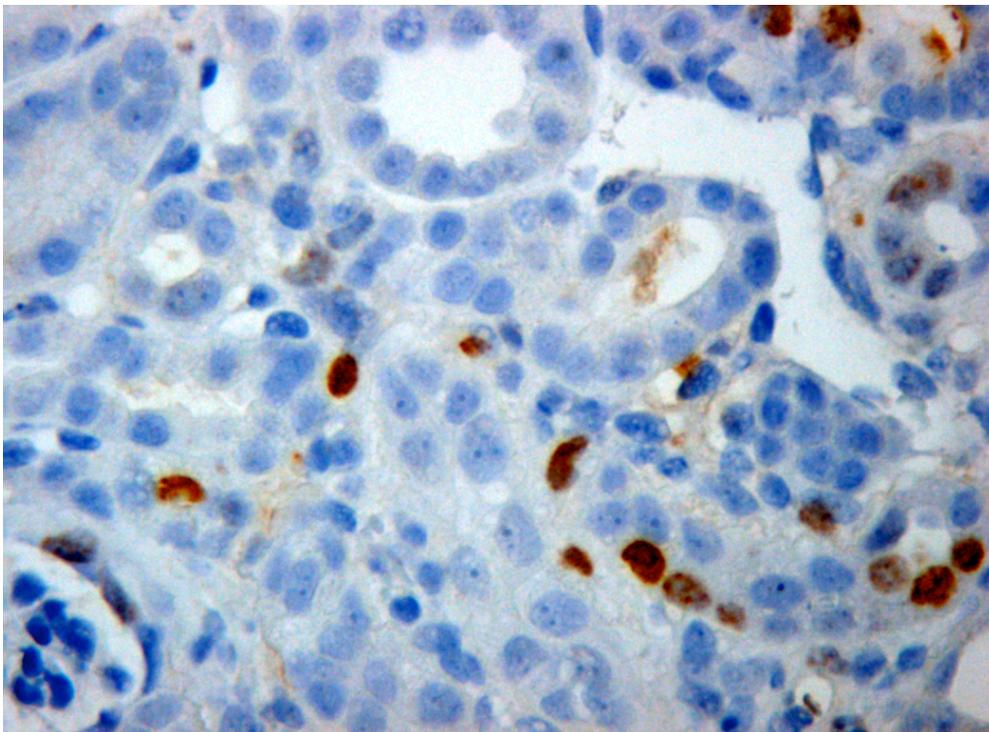


Abb. 20 Ki-67 Immunhistochemie bei einer WT-Maus (Tier-Nr.491) an Tag 14.
Die braun gefärbten Zellen, stellen die positiven Zellen (also Ki-67-Antigen enthaltende Zellen) dar.
(40x Objektiv)

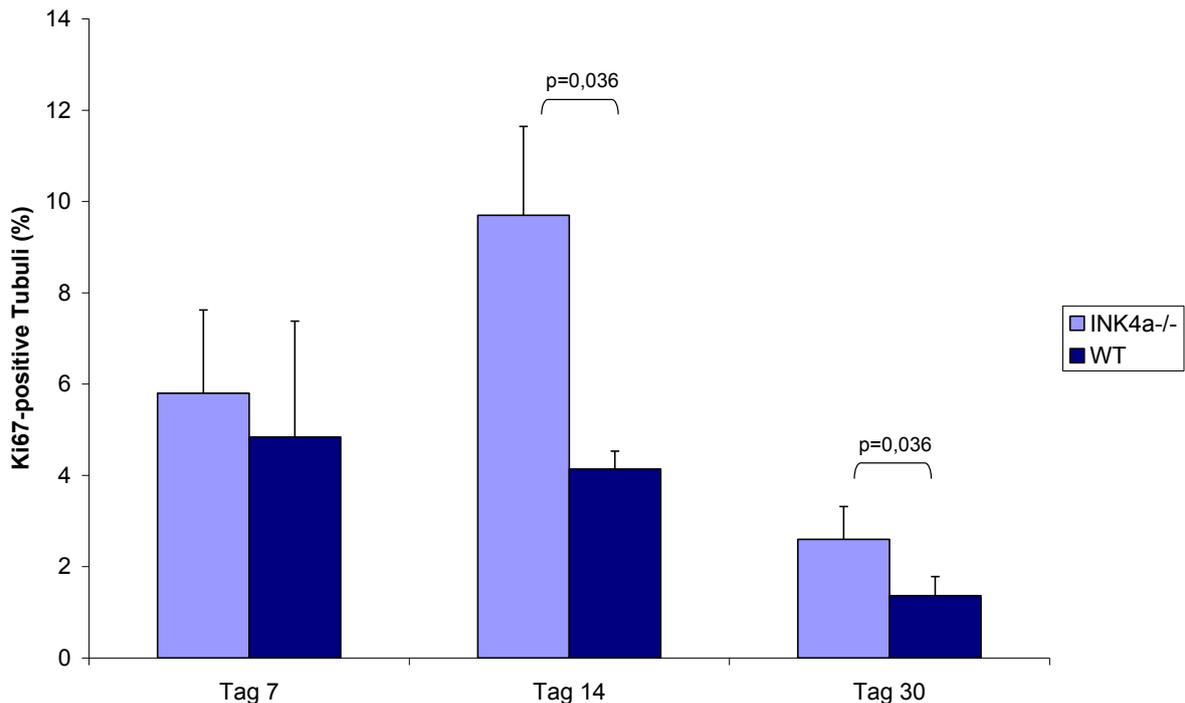


Abb. 21: Ki-67, Anteil positiver Tubuli

Dargestellt werden die Mittelwerte, Standardabweichungen und signifikanten Unterschiede bezogen auf die Anzahl Ki-67-positiver Tubuli.

Signifikanzen im Vergleich beider Gruppen: Tag 14 ($p = 0,036$); Tag 30 ($p = 0,036$)

Signifikanz im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p=0,006$

Die Ki-67 Immunhistochemie gilt als Maß für die Proliferationsrate. Es wurde der Anteil Ki-67 positiver Tubuli (als grobes Maß für die Proliferation innerhalb der Tubuli), positiver Tubuluszellen (als exaktes Maß für die Proliferation in diesem Segment) und positiver Glomerulumzellen ermittelt. Als positiv galten Zellen, welche braun markiert (gefärbt) waren.

In Abbildung 21 wird die Anzahl der Ki-67 positiven Tubuli graphisch dargestellt. INK4a^{-/-}-Tiere wiesen zu jedem Untersuchungszeitpunkt mehr Ki-67 positive Tubuli auf als WT-Tiere. Dieser Unterschied war an den Tagen 14 und 30 auch signifikant (siehe Abb. 21). Bei den INK4a^{-/-}-Tieren war die Anzahl der Ki-67 positiven Tubuli, an Tag 14 maximal. Die Zeitpunkte waren in dieser Gruppe signifikant unterschiedlich. Die Wildtypiere zeigten tendenziell weniger Ki-67 positive Tubuli im Verlauf von Tag 7 bis Tag 30. Die Unterschiede zwischen den Zeitpunkten waren jedoch bei diesen Tieren laut Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant unterschiedlich.

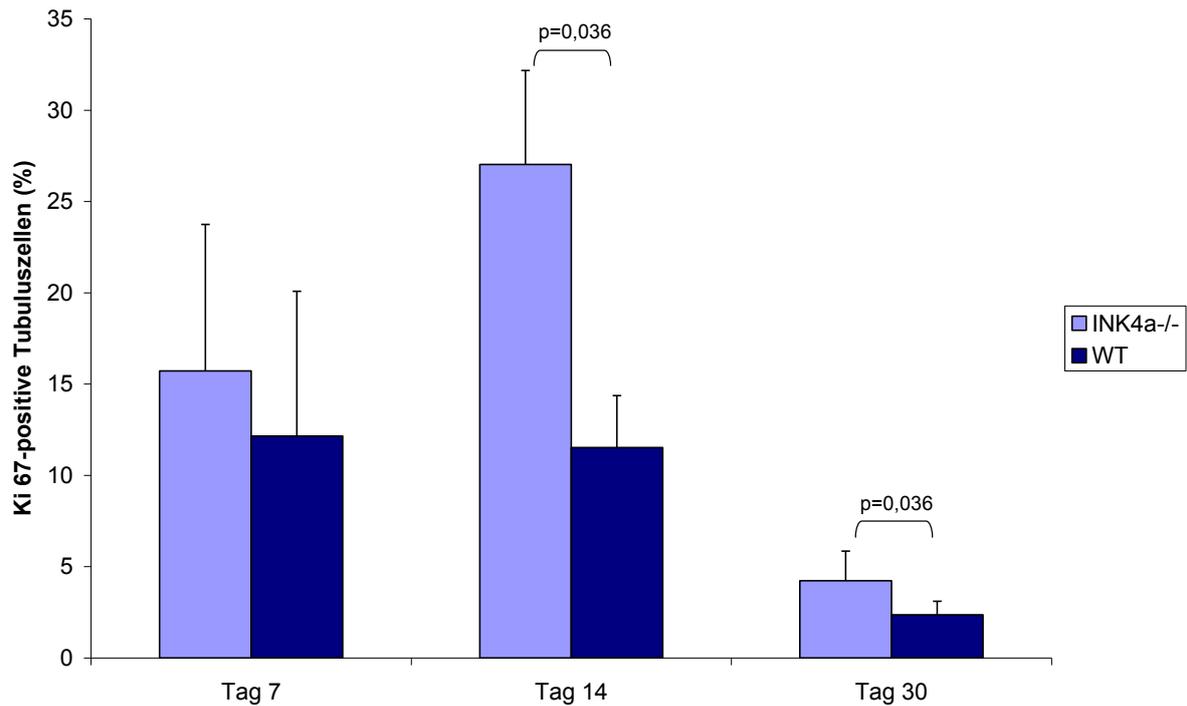


Abb. 22: Ki-67, Anteil positiver Tubuluszellen

Dargestellt werden die Mittelwerte, Standardabweichungen und signifikanten Unterschiede bezogen auf die Anzahl Ki-67-positiver Tubuluszellen

Signifikanzen im Vergleich beider Gruppen: Tag 14 ($p = 0,036$); Tag 30 ($p = 0,036$)

Signifikanz im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p = 0,02$

Signifikanz im Verlauf der WT-Mäuse: $p = 0,039$

In Abbildung 22 wird der Verlauf der Anzahl positiver Tubuluszellen dargestellt. Der Verlauf der positiven Tubuluszellen war vergleichbar mit dem der positiven Tubuli. Transgene Mäuse zeigten mehr proliferierende Zellen in den Tubuli als Wildtypmäuse. Dieser Unterschied war an Tag 14 und an Tag 30 signifikant. Der Anteil Ki-67 positiver Tubuluszellen war bei den INK4a^{-/-}-Mäusen an Tag 14 maximal. In der Wildtypgruppe war die Menge an Ki-67 positiven Tubuluszellen an Tag 7 und 14 vergleichbar, an Tag 30 zeigten sich weniger Ki-67 positive Tubuluszellen. Die Unterschiede im zeitlichen Verlauf waren in beiden Gruppen signifikant.

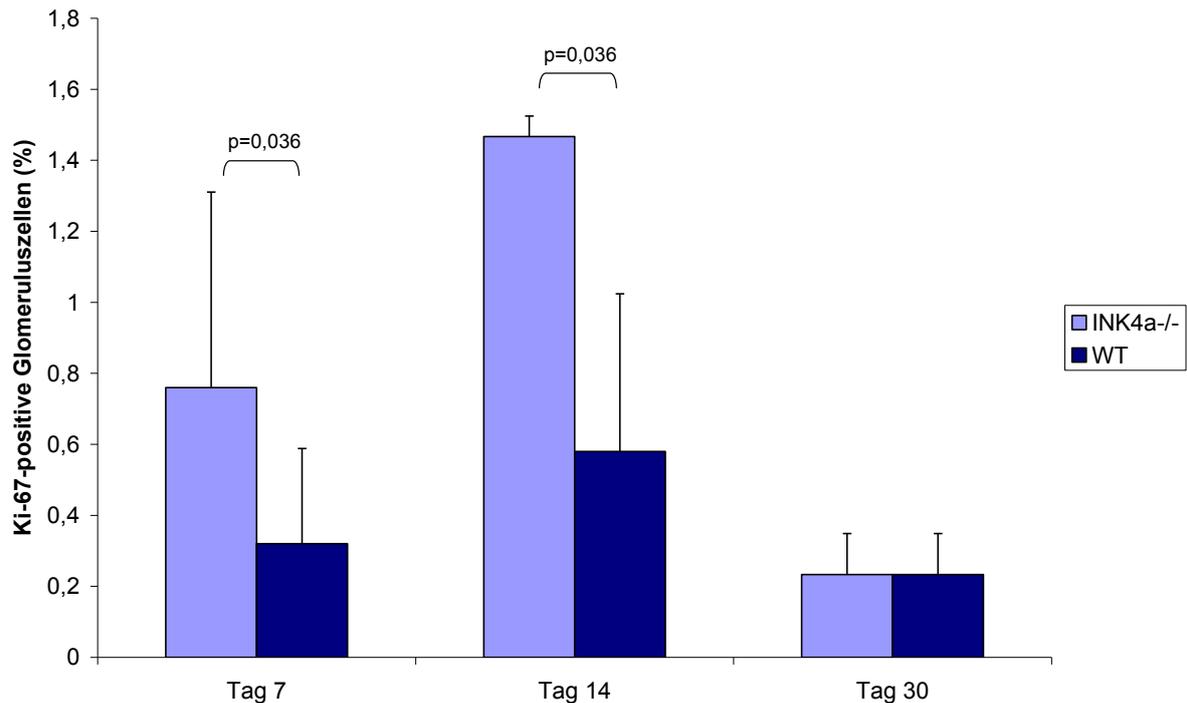


Abb. 23: Ki-67, Anteil positiver Glomeruluszellen

Dargestellt werden die Mittelwerte, Standardabweichungen und signifikanten Unterschiede bezogen auf den Anteil Ki-67-positiver Glomeruluszellen

Signifikanzen im Vergleich beider Gruppen: Tag 7 ($p = 0,036$); Tag 14 ($p = 0,036$)

Signifikanzen im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p = 0,011$

In Abbildung 23 wird der Verlauf der positiv gefärbten Glomerulumzellen im Rahmen der Ki-67 Auswertungen graphisch dargestellt.

Auch bei den Glomerulumzellen konnte mit Hilfe der Ki-67 Immunhistochemie eine höhere Proliferation bei den transgenen Tieren gegenüber den Wildtyptieren nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war an den Tagen 7 und 14 auch signifikant. Insgesamt war die Proliferation in den Glomerulumzellen an Tag 14 maximal und war an Tag 30 bereits deutlich geringer. Diese zeitlichen Unterschiede waren in der INK4a^{-/-}-Gruppe auch signifikant.

3.3.2 Phospho-p38 Immunhistochemie

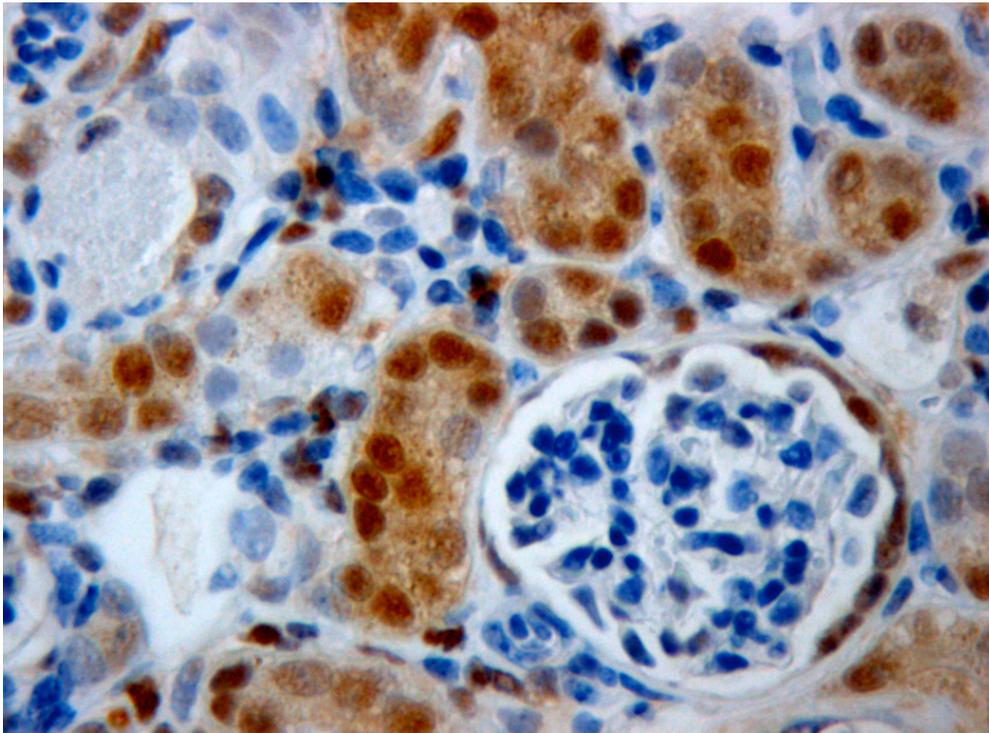


Abb. 24 phospho-p38 Immunhistochemie bei einer INK4a^{-/-}-Maus (Tier-Nr.338) an Tag 30.
Die braun gefärbten Zellen stellen die positiven Zellen (also Zellen, welche die phosphorylierte Form von p38 enthalten) dar.
(40x Objektiv)

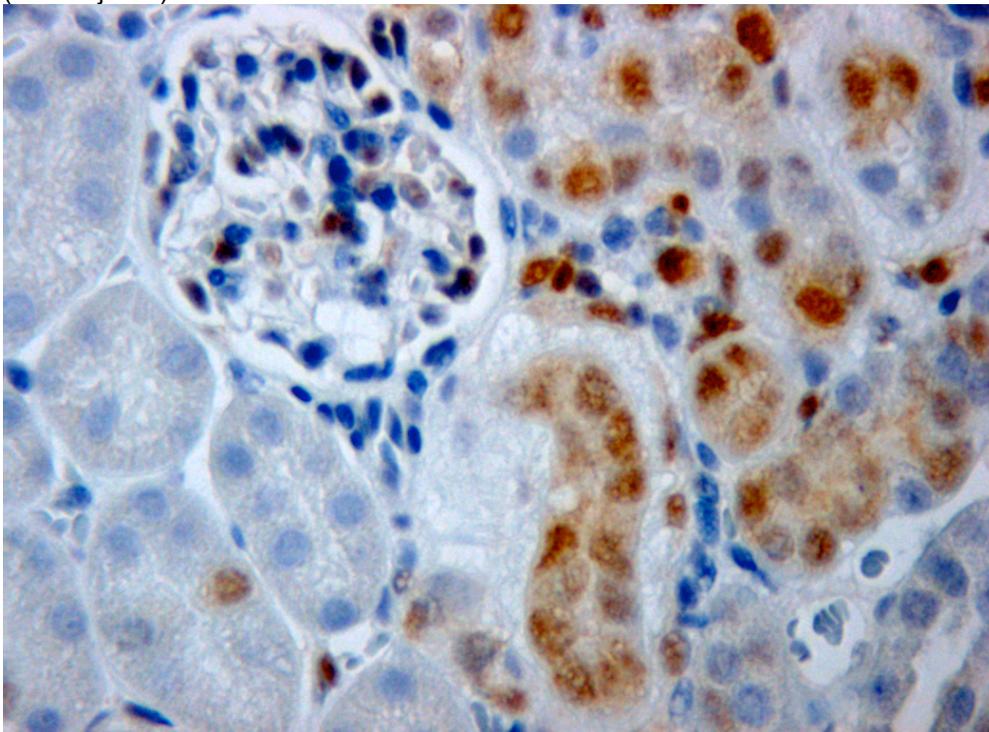


Abb. 25 phospho-p38 Immunhistochemie bei einer WT-Maus (Tier-Nr.425) an Tag 30.
Die braun gefärbten Zellen stellen die positiven Zellen (also Zellen, welche die phosphorylierte Form von p38 enthalten) dar.
(40x Objektiv)

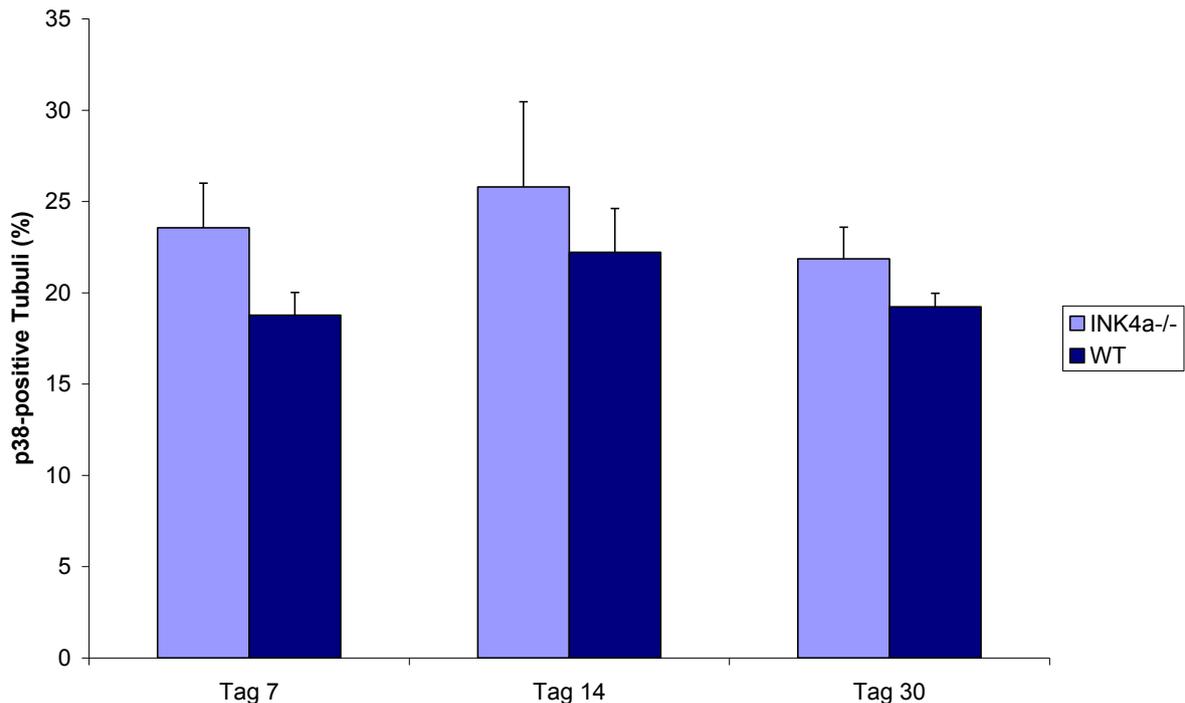


Abb. 26: phospho-p38 positive Tubuli

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen bezogen auf den Anteil phospho-p38-positiver Tubuli

Signifikanzen im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p = 0,012$

Als Maß für die Aktivierung des stress-induzierten MAPK-Signalwegs wurde die aktivierte, phosphorylierte Form des p38-Proteins immunhistochemisch in den Schnitten der linken, geklemmten Niere nachgewiesen. Es wurden der Anteil phospho-p38 positiver Tubuli (als grobes Maß für die Aktivierung innerhalb der Tubuli), positiver Tubuluszellen (als exaktes Maß für die Aktivierung dieses Signalwegs in diesem Segment), positiver Fibroblasten und positiver Glomeruluszellen ermittelt. Als positiv galten Zellen, welche braun markiert (gefärbt) waren.

In Abbildung 26 wird der Anteil phospho-p38 positiver Tubuli graphisch dargestellt. Die Nieren der transgenen Mäuse zeigten an allen Tagen tendenziell mehr phospho-p38 als die der Wildtypmäuse, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Der Anteil positiver Tubuli war bei beiden Gruppen an Tag 14 am höchsten. Im Verlauf waren bei den INK4a^{-/-}-Mäusen die Unterschiede signifikant.

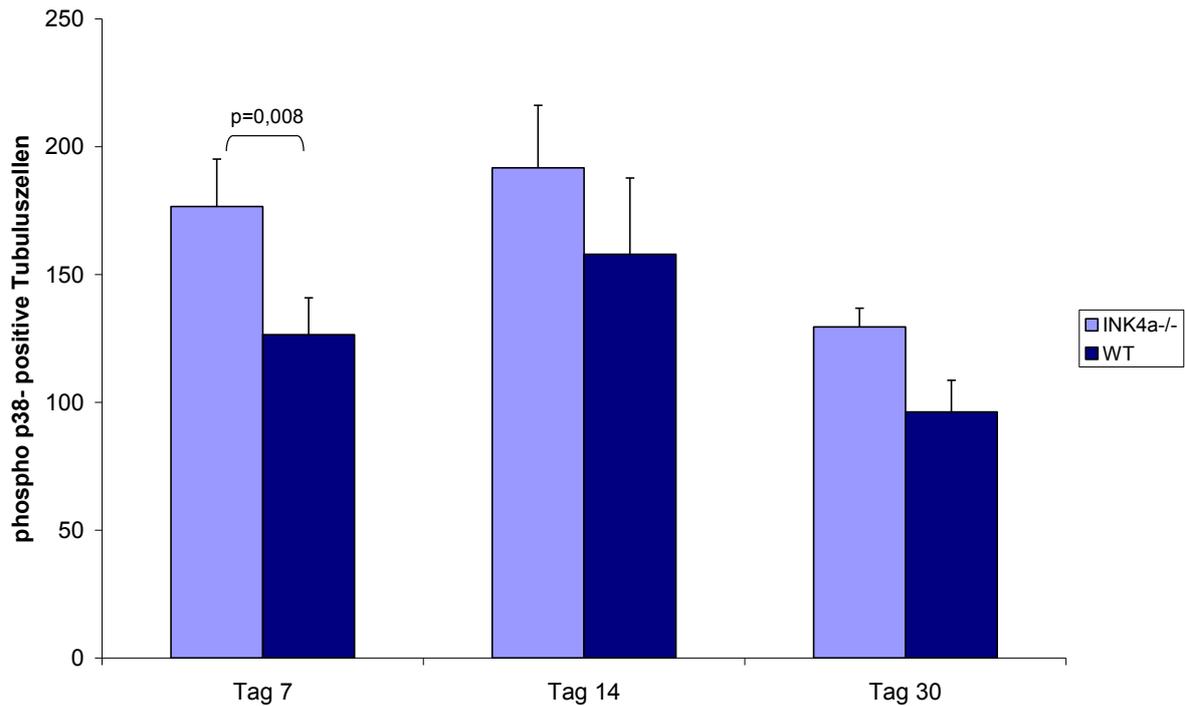


Abb. 27: Anteil der positiven Tubuluszellen

Dargestellt werden die Mittelwerte, Standardabweichungen und signifikanten Unterschiede bezogen auf die Anzahl phospho-p38-positiver Tubuluszellen

Signifikanz im Vergleich beider Gruppen: Tag 3 ($p = 0,008$)

Signifikanz im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p = 0,05$

Signifikanz im Verlauf der WT-Mäuse: $p = 0,015$

In Abbildung 27 wird der Anteil phospho-p38 positiver Tubuluszellen dargestellt. Die Auswertung der positiv gefärbten Tubuluszellen verhielt sich äquivalent zu den positiv gefärbten Tubuli (vgl. Abbildung 26). Das bedeutet, dass die INK4a^{-/-}-Tiere zu allen Entnahmezeitpunkten mehr positive Zellen, als die Wildtypiere aufwiesen und dieser Unterschied auch an Tag 7 signifikant war. Der Anteil phospho-p38 positiver Tubuluszellen war, wie bei der Auszählung der Gesamttubuli, bei beiden Gruppen an Tag 14 maximal.

Die Änderungen im Verlauf waren bei beiden Gruppen signifikant.

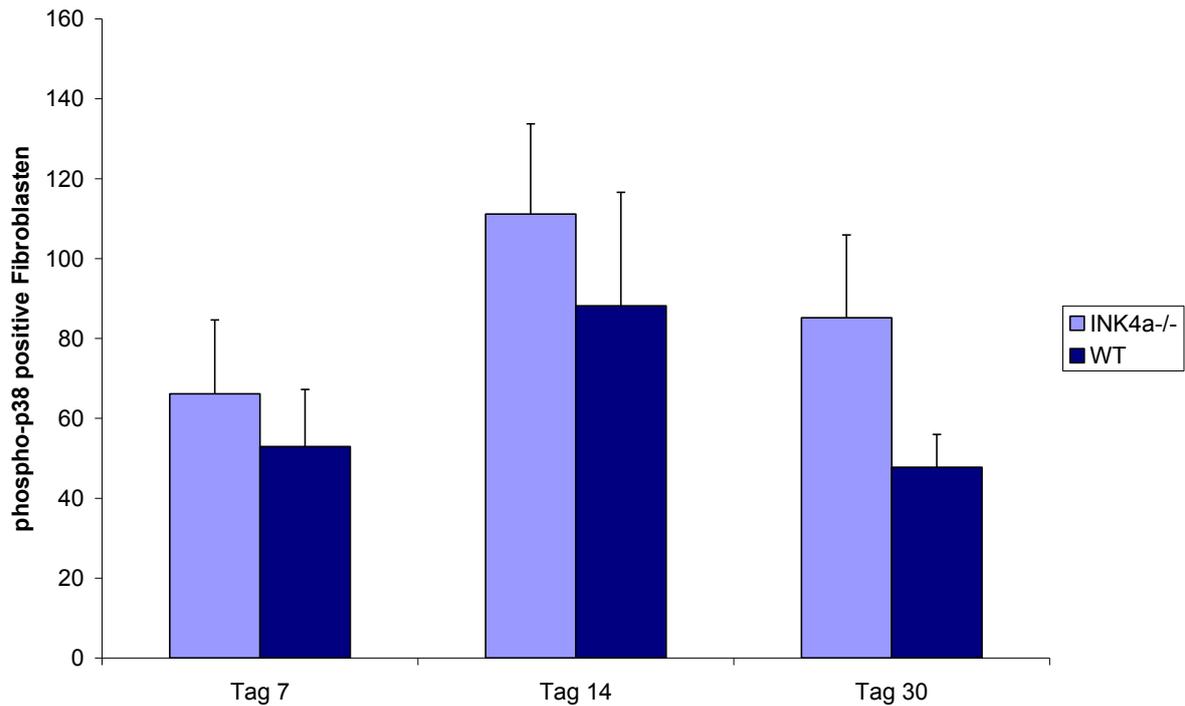


Abb. 28: Anteil der phospho-p38 positiven Fibroblasten

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen bezogen auf den Anteil phospho-p38-positiven Fibroblasten

Signifikanzen im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p = 0,007$

In der Abbildung 28 wird der Anteil phospho-p38 positiver Fibroblasten graphisch dargestellt. Auch bei den Fibroblasten war die phospho-p38 Färbung in transgenen Tieren zu jedem Zeitpunkt höher, und an Tag 14 bei beiden Gruppen maximal. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war jedoch nicht signifikant. Außerdem zeigte die statistische Auswertung des Verlaufs einen signifikanten Anstieg in der transgenen Mausgruppe.

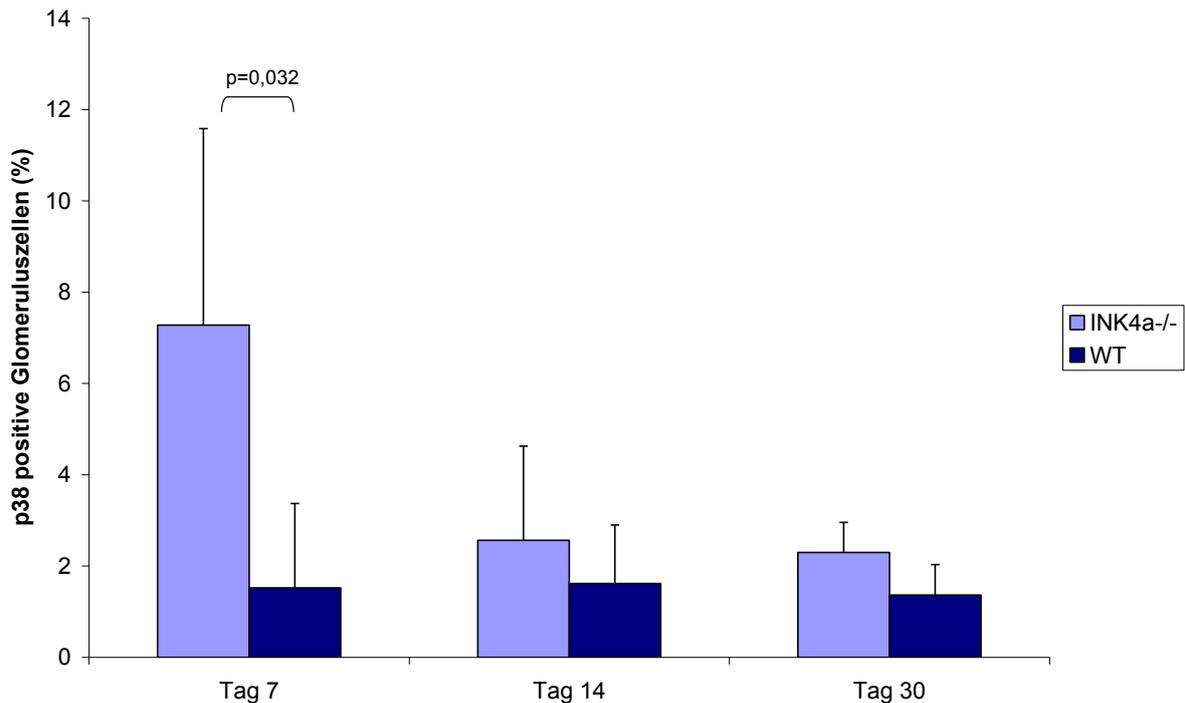


Abb. 29: Anteil der phospho-p38 positiven Glomeruluszellen

Dargestellt werden die Mittelwerte, Standardabweichungen und signifikanten Unterschiede bezogen auf den Anteil phospho-p38-positiver Glomeruluszellen

Signifikanz im Vergleich beider Gruppen: Tag 7 ($p = 0,032$)

Signifikanz im Verlauf der INK4a^{-/-}-Mäuse: $p = 0,009$

In der Abbildung 29 wird der Anteil phospho-p38 positiver Glomeruluszellen graphisch dargestellt. Auch dieser Zelltyp zeigte eine erhöhte Aktivierung von p38 bei den transgenen Tieren. An Tag 7 war dieser Unterschied signifikant. An Tag 7 wurden auch die meisten phospho-p38 positiven Glomeruluszellen bei den INK4a^{-/-}-Tieren ausgezählt. Der Unterschied im zeitlichen Verlauf war bei diesen Tieren auch signifikant. Die Zahl positiver Zellen bei den Wildtyptieren war zu allen ausgezählten Zeitpunkten relativ gleichbleibend.

3.4. Quantitative Real-time PCR

3.4.1 p16^{INK4a} quantitative Real-time PCR

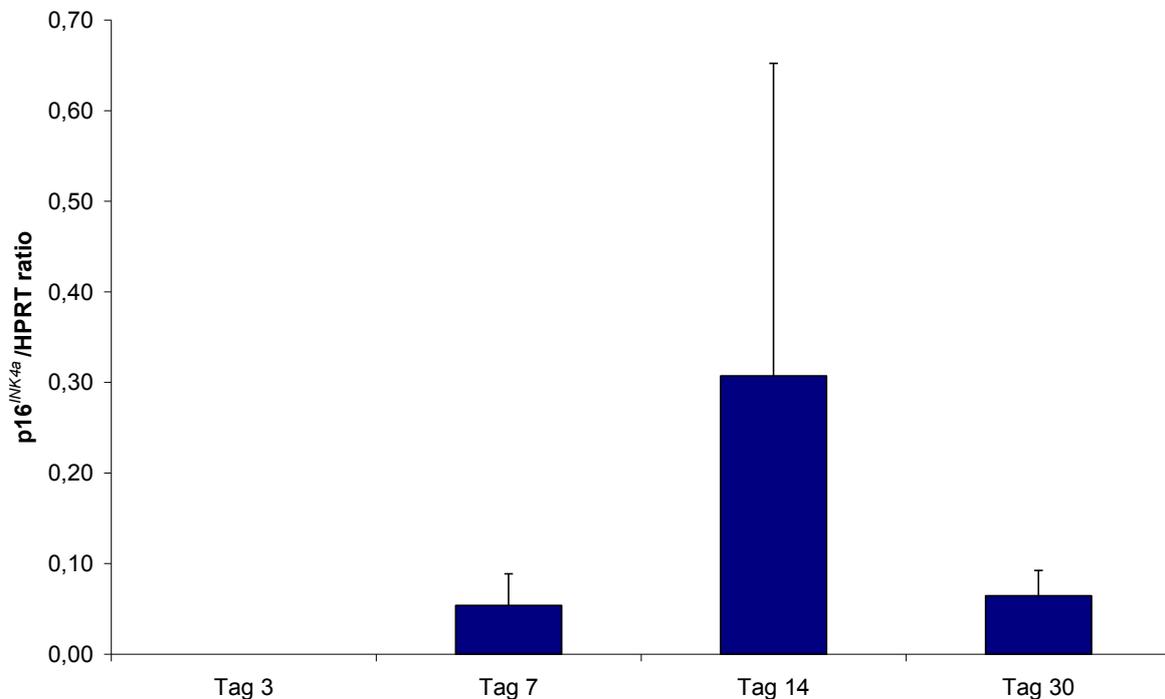


Abb. 30 p 16^{INK4a} mRNA-Expression

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen, ermittelt mittels Real-time PCR, im Verhältnis zur Expression von HPRT.

Signifikanz im Verlauf: $p = 0,007$

Die p16^{INK4a}-mRNA-Expression, ermittelt mit Hilfe der Real-time PCR bei Wildtypmäusen, war ab Tag 7 detektierbar, erreichte ein Maximum an Tag 14 und sank an Tag 30 wieder ab. Die Expressionsunterschiede zu den verschiedenen Zeitpunkten waren signifikant (siehe Abbildung 30).

3.4.2 Telomerase quantitative Real-time PCR

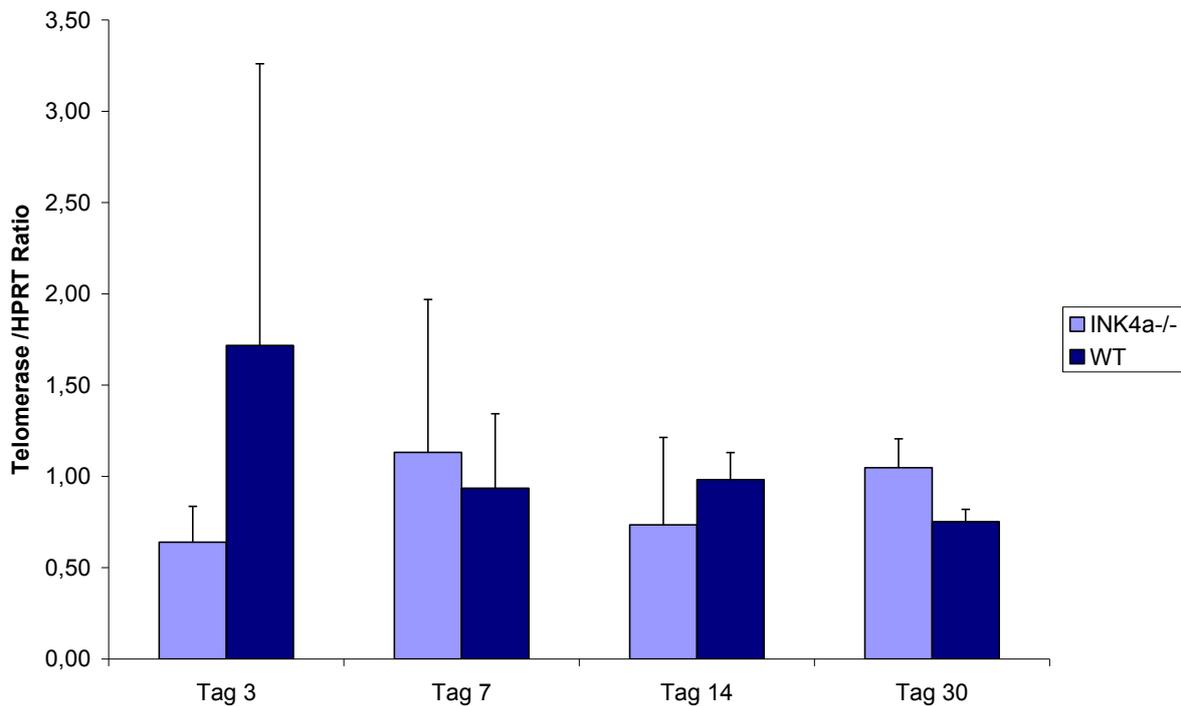


Abb. 31: Telomerase mRNA-Expression

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt mittels Real-Time-PCR, im Verhältnis zur Expression von HPRT.

In Abbildung 31 wird die Auswertung der Telomerase Real-time PCR dargestellt.

Die Expression der Telomerase mRNA folgte bei beiden Gruppen keinem eindeutigen Zeitverlauf, und schwankte stark, sowohl im Hinblick auf teils hohe Standardabweichungen innerhalb einer Gruppe als auch im Hinblick auf die Expression an den verschiedenen Tagen. An den Tagen 3 und 14 exprimierten die Wildtypmäuse tendenziell mehr Telomerase als die INK4a^{-/-}-Mäuse, während an den Tagen 7 und 30 die Expression bei den transgenen Mäusen höher war.

4. Diskussion

Im Alter kommt es immer häufiger zu schweren renalen Erkrankungen^{1, 34}. Dabei ist das Problem renaler Dysfunktionen und Nierenerkrankungen im Endstadium eine große Last für das Gesundheitssystem, denn die Therapietendenz geht zunehmend in Richtung Organ-Transplantation⁴⁸. Dies beruht darauf, dass die Nierentransplantation sowohl eine längere Lebenserwartung als auch eine bessere Lebensqualität im Vergleich zu allen anderen Nierenersatzverfahren bietet⁴².

Die zwei größten Probleme im Rahmen renaler Transplantationen sind die Organverfügbarkeit und das Langzeittransplantatüberleben^{45, 66}.

Um der ständig zunehmenden Organknappheit entgegenzuwirken, wurden verschiedene Spenderkriterien modifiziert. Ein wichtiges Spenderkriterium, welches verändert wurde, ist die Akzeptanz eines höheren Lebensalters der Donoren^{1, 95}. Durch diese Erweiterung und die dadurch bedingte Steigerung der Organverfügbarkeit versucht man den ständig wachsenden Wartelisten und den immer längeren Wartezeiten entgegenzuwirken. Als ideale Altersgruppe für Spendernieren wurden in mehreren Studien 15-40-jährige Spender benannt^{16, 96}. Der Anteil der Spender mit einem Lebensalter >65 Jahre liegt jedoch aktuell bei 20%¹¹. Die Entscheidung, ein höheres Spenderalter zu akzeptieren, birgt jedoch einige Risiken. Ein Hauptaspekt hierbei ist die Beeinträchtigung des Langzeittransplantatüberlebens, welche ab einem Spenderalter von mehr als 60 Jahren zum Tragen kommt⁴⁶. Ein höheres Spenderalter führt zu einer schnelleren Organatrophie und einem schnelleren Zugrundegehen des alten Gewebes³⁷. Dieser Effekt ist aggraviert, wenn z.B. akute Abstoßungsreaktionen auftreten oder bei verlängerter Ischämie^{34, 46, 48}, da während der Transplantation auftretende Schäden nicht repariert und damit Organmasse und -funktion nicht aufrecht erhalten werden können^{66, 67}.

Als Ursache hierfür wird vermutet, dass zelluläre Seneszenz mit zunehmendem Alter den Anteil an teilungs- und damit regenerationsfähigen Zellen im Gewebe vermindert. Diese Fähigkeit ist jedoch unverzichtbar für die Organreparatur und –integrität³⁴.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Tierversuchen anhand eines Transplantationsmodells der Maus zeigen, dass Nieren alter Spender mehr tubuläre Atrophie aufwiesen, die mit einer erhöhten Expression des Seneszenzmarkers p16^{INK4a} einherging⁴⁴.

Ausgehend von den Beobachtungen eines eingeschränkten Transplantatüberlebens von seneszenten Nieren und einem nachgewiesenen Zusammenhang mit p16^{INK4a} sollte bei dieser Pilotstudie überprüft werden, ob bei fehlender p16^{INK4a}-Expression die Regenerationsfähigkeit der Nieren nach I/R erhöht ist, und ob es daraufhin zu einer Verbesserung der Nierenfunktion kommt.

Dazu wurden Nieren von WT- und INK4a^{-/-}-Mäusen an Tag 3, 7, 14 und 30 nach I/R untersucht.

4.1 Gewichte der Tiere

Bei diesem Projekt wurde darauf geachtet, dass die Tiere in den direkt zu vergleichenden Gruppen vor der Operation nicht signifikant unterschiedlich schwer waren. Diesen wichtigen Aspekt gilt es zu berücksichtigen, da verschiedene Studien einen Zusammenhang zwischen dem Gewicht der Maus beziehungsweise der Ernährung und p16^{INK4a} belegen⁹⁷⁻⁹⁹. Luyckx et al.⁹⁸ zeigten in ihrer Arbeit, dass Tiere mit einem niedrigen Geburtsgewicht eine Korrelation zwischen Aufholwachstum und einem p16^{INK4a}-Anstieg in der nativen Niere aufwiesen.

Bei dieser Studie wurden schwangere Ratten einer proteinarmen Diät unterzogen. Die männlichen Nachkommen mit einem normalem oder niedrigem Geburtsgewicht wurden mit einer regulären oder hochkalorischen Diät ernährt, um ein Aufholwachstum zu unterstützen. Die Nieren dieser Tiere wurden unter anderem auf Seneszenzmarker (p16^{INK4a}, p21^{CIP}, p53, pRB) untersucht. Im Vergleich von Nieren normalgewichtiger Tiere und Tieren mit niedrigem Geburtsgewicht zum Zeitpunkt der Geburt zeigten sich keine Veränderungen bezüglich der Seneszenzmarker. Die Nieren der Tiere mit einem niedrigem Geburtsgewicht und einem folgendem rapidem Aufholwachstum zeigten jedoch einen signifikanten Anstieg von p16^{INK4a} (p<0,01).

Die renale p16^{INK4a}-Expression stieg progressiv an und zeigte in den Nieren von Tieren mit niedrigem Geburtsgewicht eine Signifikanz gegenüber den Nieren von normalgewichtigen Tieren im 3. und 6. Monat (p<0.02)⁹⁸.

Die Gruppe um Krishnamurthy et al.⁹⁹ zeigte, dass eine altersassoziierte p16^{INK4a}-Expression mit einer kalorischen Restriktion bei Tieren in Zusammenhang steht. Um den Zusammenhang zwischen Seneszenz und dem Alter *in vivo* zu analysieren, untersuchte diese Arbeitsgruppe die p16^{INK4a}/p19^{ARF}-Expression an einem Altersmodell in Ratten. Die Arbeitsgruppe zeigte in Übereinstimmung mit unseren Voruntersuchungen und Ergebnissen, dass es in fast allen Geweben der Tiere zu einem deutlichen Anstieg von p16^{INK4a} und p19^{ARF} kam, während sich die Expression der anderen verwandten Zellzyklusinhibitoren kaum oder gar nicht veränderten. Bei dieser Studie stellte sich außerdem heraus, dass der altersassoziierte Anstieg der p16^{INK4a}- und p19^{ARF}-Expression in der Niere durch kalorische Restriktion vermindert wurde⁹⁹.

Da die Tiergruppen in der vorliegenden Arbeit sowohl vor als auch nach der Operation unmittelbar vor Ende des Versuchs nicht unterschiedlich schwer waren, können Gewichtsunterschiede nicht die Ursache für die Unterschiede in den untersuchten Parametern sein. Die Ermittlung der Nierengewichte nach I/R zeigte, dass die geklemmte Niere in beiden Gruppen im Laufe der Zeit nach I/R an Gewicht verlor, was ein in der Literatur beschriebenes Phänomen darstellt¹⁰⁰.

4.2 Ischämie/Reperfusion

Ein durch Ischämie verursachter Schaden in der Niere ist einer der Hauptgründe für das Entstehen einer akuten Niereninsuffizienz. Folglich tragen verlängerte Ischämiezeiten im Rahmen von Nierentransplantationen zu einer schlechteren Transplantatfunktion bei¹⁰¹.

Im Zuge einer Ischämie kommt es zunächst zu einem tubulären Zellschaden und einer Reduktion der GFR, woraufhin in Folge eine Reparatur und Regeneration des Gewebes einsetzt¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

In unterschiedlichsten Studien wurde nachgewiesen, dass Ischämie/Reperfusion-Modelle gut etabliert und hervorragend geeignet sind, um die Charakteristika einer akuten Niereninsuffizienz und einer verminderten Transplantatfunktion zu studieren^{101, 103-106}.

Ein Beispiel hierfür ist die Studie von Shoskes et al.¹⁰⁷, in welcher ein Zusammenhang zwischen akuter Tubulusnekrose und einer höheren Inzidenz für Transplantatverluste untersucht wurde. Die Arbeitsgruppe vermutete einen Anstieg der Immunogenität des Transplantates und untersuchte daraufhin die Expression von MHC-Antigenen in der Niere nach einer künstlich induzierten Ischämie. Die Gruppe etablierte für diese Untersuchungen ein Maus-Modell und induzierte dabei bei den männlichen Tieren eine Ischämie. Dazu klemmten sie die versorgenden Gefäße der linken Niere für bis zu 60 Minuten ab. Es konnte in der geschädigten Niere ein MHC-Anstieg in den tubulären Zellen und eine Akkumulation von entzündlichen Infiltraten nachgewiesen werden. Beides könnte daher zu einer Transplantatabstoßung und dadurch auch zu einem Transplantatverlust beitragen¹⁰⁷.

Entscheidend für den Einsatz dieses Ischämie/Reperfusion-Modells in dieser Pilotstudie war, dass in mehreren Studien ein Zusammenhang zwischen I/R und der Induktion einer p16^{INK4a}-Expression bereits nachgewiesen wurde¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Hohegger et al.¹¹⁰ und die Arbeitsgruppe von Chokhotua et al.¹⁰⁸ zeigten, dass es nicht nur eine Verbindung zwischen I/R und einer p16^{INK4a}-Expression gibt, sondern dass eine p16^{INK4a}-Expression weniger von den Ischämieintervallen als vielmehr von den Reperusionszeiträumen abhängt.

In dem bei dieser Arbeit verwendeten Ischämie/Reperfusion-Modell wurden Arteria und Vena renalis der linken Niere mittels einer Gefäßklemme für einen Zeitraum von 30 Minuten atraumatisch verschlossen und anschließend wieder eröffnet. Durch ein einheitliches Studienprotokoll im Rahmen der Ischämie- und Reperusionszeiträume konnten dadurch bedingte Unterschiede in den Ergebnissen ausgeschlossen werden.

4.3 Histologische Ergebnisse und funktionelle Daten

In dieser Pilotstudie fanden sich chronische Veränderungen im Sinne einer tubulären Atrophie ab Tag 14. Dieser chronische Schaden war sowohl an Tag 14 als auch an Tag 30 in den INK4a^{-/-}-Nieren geringer ausgeprägt als in den WT-Nieren.

Die GFR war an Tag 7, 14 und 30 bei den transgenen Tieren höher als bei den WT-Tieren, mit einem Peak an Tag 30.

Wie bereits oben erwähnt, stellt das Langzeittransplantatversagen ein wichtiges und zunehmendes klinisches Problem dar^{6, 111}. IF/TA sind hierbei die Hauptkomponenten, welche zu einem späteren Transplantatverlust beitragen³⁶. IF/TA treten im Rahmen der Transplantation und der Ischämie auf^{100, 112, 113}.

Im Jahre 2009 konnte gezeigt werden, dass neben einem Stressor wie der I/R auch ein höheres Spenderalter zu einem Anstieg der p16^{INK4a}-Expression führt⁴⁴.

Für diese Studie wurde ein Nierentransplantationsmodell gewählt. Dabei wurden Nieren jüngerer Mäuse (3 Monate) und älterer Mäuse (18 Monate) transplantiert. Im Rahmen einer histologischen Untersuchung und einer RT-PCR wurden die Nieren junger und alter Spender 7 und 21 Tage nach Transplantation untersucht und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich in den Nieren älterer Spender ein signifikanter Anstieg der p16^{INK4a}-Expression. Des Weiteren zeigten sich deutliche histologische Veränderungen in Form von TA (Tag 7) und hinzu kommend IF (Tag 21). Diese traten insbesondere bei den Nieren alter Spender an Tag 7 nach Transplantation auf, im Vergleich mit den Nieren junger Spender. An Tag 21 nach Transplantation waren die Unterschiede zwischen alten und jungen Spendernieren noch vorhanden, aber nicht mehr signifikant. Die p16^{INK4a}-Expression stieg bei den jüngeren Vergleichsmäusen (3 Monate) nach der Transplantation nur langsam an und war nicht so deutlich ausgeprägt⁴⁴.

In weiteren Studien konnte diese Korrelation zwischen Seneszenzmarkern, vor allem eine hohe p16^{INK4a}-Expression und/oder kurze Telomere, mit dem Auftreten von IF/TA auch im Rahmen humaner Nierentransplantationen nachgewiesen werden^{67, 68, 114, 115}.

Melk et al.⁶⁷ konnten in einer Studie neben dem Zusammenhang zwischen IF/TA und einer gesteigerten p16^{INK4a}-Expression weiterhin eine Assoziation zu einer abnehmenden Transplantatfunktion zeigen.

Während sich die p16^{INK4a}-Expression in den Transplantaten mit stabiler Funktion in einem Bereich bewegte, der für das Alter erwartet wurde, überstieg die p16^{INK4a}-Expression in den Nieren mit verschlechterter Funktion und IF sowie TA das erwartete Ausmaß⁶⁷.

Bei dieser Studie⁶⁷ wurde eine p16^{INK4a}-Immunfärbung an transplantierten und nativen Nieren mit chronischen Nierenerkrankungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Implantation zeigten die Transplantate eine geringe IF/TA Ausprägung und die nukleäre p16^{INK4a}-Immunfärbung stimmte mit dem für das Alter erwarteten Ausmaß überein. Biopsien von Transplantaten mit abnormaler Funktion und IF/TA zeigten jedoch eine nukleäre und zytoplasmatische p16^{INK4a}-Färbung, welche das erwartete altersentsprechende Ausmaß deutlich überstieg.

In der Studie von Chkhotua et al.¹¹⁵ sollte die Beteiligung von p16^{INK4a} und p27^{KIP1} an der Entwicklung einer CAN (chronische Allograft Nephropathie) in der menschlichen Niere in vivo untersucht werden.

Die Hauptcharakteristika einer CAN sind die tubuläre Atrophie, interstitielle Fibrose und eine fibröse Verdickung der Intima (engl. = Fibrous intimal thickening, FIT). CAN ist einer der Hauptgründe für ein chronisches Transplantatversagen³⁶. Bei dieser Studie wurden eine p16^{INK4a}- und eine p27^{KIP1}-Expression in 20 normalen Nierengeweben verschiedener Altersstufen (21-80 Jahre) und in 9 chronisch abgestoßenen Nierengeweben evaluiert und verglichen. Die p16^{INK4a}-Expression zeigte eine Alterabhängigkeit in den kortikalen Tubuluszellen (CTS) und den interstitiellen Zellen (CIS) der normalen Nieren. Das chronologische und vorausberechnete Transplantatalter (53 +/- 21 und 76 +/- 8.9 Jahren) war signifikant unterschiedlich (p = 0,0126). Die Glomeruli, Tubuli und Interstitiellen Zellen von abgestoßenen Nierengeweben exprimierten signifikant höhere p16^{INK4a}-Level im Vergleich zu normalen Nierengeweben. Die Expression von p16^{INK4a} bei einer CAN Grad 3 war signifikant höher im Vergleich zur CAN Grad 2 (p = 0,013 und 0,004)¹¹⁵.

Die genannten Studien belegen, dass es einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten p16^{INK4a}-Expression und IF/TA sowie CAN gibt^{44, 92, 114, 115}. Dieser Effekt wird verstärkt durch ein höheres Spenderalter und Stressoren, wie sie zum Beispiel im Zuge einer Transplantation (I/R) auftreten^{44, 97}.

Dieses Phänomen ist nicht nur in Nieren von Nagetieren sondern auch in menschlichen Nieren zu beobachten^{44, 67, 92, 115}.

Auch bei dieser Pilotstudie zeigte sich, dass es in Folge des gesetzten I/R-Schadens zur Entwicklung von TA kam. Dabei zeigte sich sowohl in der Histologie als auch in der Funktionalität (GFR), dass die transgenen Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren weniger Schaden und eine bessere GFR aufwiesen, auch wenn die TA und die GFR in der von uns untersuchten kleinen Kohorte bei den INK4a^{-/-}-Mäusen nicht signifikant höher war. Eine Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass der Einfluss der I/R auf die GFR relativ gering war, weil die kontralaterale Niere nicht geklemmt oder entnommen wurde.

In einer auf dieser Pilotstudie aufbauenden Folgestudie⁹² wurden größere Kohorten und längere Untersuchungszeiträume nach I/R gewählt. Die Nieren der transgenen Tiere wiesen bei dieser Folgestudie signifikant weniger chronischen Schaden im Vergleich mit den WT-Nieren auf. Als weiterer Parameter chronischer Veränderungen wurde in der benannten Folgestudie⁹² auch die interstitielle Fibrose untersucht. Interstitielle Fibrose war ab Tag 14 messbar und bei den INK4a^{-/-}-Nieren im Vergleich mit den WT-Nieren signifikant geringer ausgeprägt. Auch im Rahmen der Nierenfunktion wiesen die transgenen Tiere signifikant bessere Ergebnisse im Vergleich mit den WT-Tieren auf⁹².

Um ausschließen zu können, dass eine reduzierte immunologische Antwort nach I/R für die besseren Ergebnisse der transgenen Tiere verantwortlich ist, wurden im Rahmen dieser weiterführenden Studie⁹² außerdem Transplantationsexperimente mit Nieren von transgenen Tieren und WT-Tieren durchgeführt. In einem Transplantationsmodell, bei dem beide Eigennieren entfernt wurden und die transplantierte Niere somit lebenserhaltend war, wiesen Mäuse mit Transplantaten von INK4a^{-/-}-Mäusen eine bessere Überlebensrate auf als Mäuse, denen Nieren von WT-Mäusen transplantiert wurden. Im histologischen Vergleich fanden sich bei den Mäusen mit Nierentransplantaten von transgenen Tieren signifikant weniger IF/TA, vergleichbar mit den Ergebnissen nach I/R⁹².

Es konnte nachgewiesen werden, dass die bessere Funktion von INK4a^{-/-}-Transplantaten nicht auf Differenzen im Rahmen einer immunologischen Antwort basierte. Die Menge an infiltrierenden Zellen, gemessen an der Anzahl von infiltrierenden CD3-positiven Lymphozyten und den typischen Läsionen einer Tubulitis, war in beiden Gruppen gleich⁹².

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass ein Verlust der Funktion des INK4a-Locus in Mäusen und damit das Entgehen einer p16^{INK4a}-abhängigen Seneszenz die Entwicklung von IF/TA signifikant reduziert und mit einer verbesserten Nierenfunktion, Erhaltung der Nephronzahl und einem besseren Transplantatüberleben assoziiert ist⁹².

Die Ergebnisse dieser Pilotstudie und der darauf aufbauenden Folgestudie⁹² zeigen, dass eine fehlende p16^{INK4a}-Expression die Entstehung von IF/TA zumindest teilweise verhindert und dadurch die Nierenfunktion verbessern kann. Dies ist mit der besseren replikativen und regenerativen Kapazität der Nieren von INK4a^{-/-}-Mäusen zu erklären. Diese Daten weisen damit auf eine pathogenetische Rolle von Seneszenz-Mechanismen bei der Entstehung von IF/TA hin. Die beschriebenen Ergebnisse liefern demnach einen wichtigen Hinweis darauf, dass Interferenzen mit p16^{INK4a} zu einem Anstieg der regenerativen Kapazität führen können. Durch eine Inhibierung der prematuren Seneszenz (=STASIS) könnte demzufolge ein wesentlicher therapeutischer Gewinn im Sektor der Nierentransplantation entstehen.

4.4 Quantitative Real-time PCR

Zelluläre Seneszenz im Allgemeinen und ein I/R-Schaden im Speziellen stehen mit einer Verkürzung von Telomeren und einer gesteigerten Expression von CDKIs wie p16^{INK4a} in Verbindung^{44, 64, 91}. Aus diesem Grund wurden im Rahmen einer quantitativen Real-time PCR einerseits die p16^{INK4a}-Expression bei WT-Mäusen und die Telomerase- Expression in transgenen und WT-Mäusen nach I/R untersucht.

4.4.1 p16^{INK4a} quantitative Real-time PCR

Bei dieser Untersuchung zeigte sich ein Anstieg der p16^{INK4a}-Expression von Tag 7 zu Tag 14. An Tag 30 kam es zu einem Abfall der p16^{INK4a}-Expression. Der ermittelte Expressionsanstieg nach I/R war bei dieser Pilotstudie, auch aufgrund von hohen Standardabweichungen innerhalb der Gruppen, nicht signifikant. Allerdings konnte bei der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Folgestudie eine signifikante Induktion der p16^{INK4a}-Expression an Tag 14 nach I/R nachgewiesen werden⁹².

In den Studien von Hochegger et al.¹¹⁰ und Chokhotua et al.¹⁰⁸ wurde ein Zusammenhang zwischen dem Ischämie/Reperfusionsschaden und einer p16^{INK4a}-Expression bestätigt. Dabei zeigte sich, dass die p16^{INK4a}-Gen- und Proteinexpression stark von der Reperfusionszeit abhängig ist und man nicht zwischen langen und kurzen Ischämieperioden unterscheiden konnte.

Lee et al.¹¹⁶ untersuchten in einer aktuellen Studie die p16^{INK4a}-Expression an der INK4a^{-/-}-Maus versus der WT-Maus.

In der Studie von Lee et al. wurden die histologischen Daten dieser Pilotstudie bestätigt. Außerdem führte die Arbeitsgruppe um Lee et al. ebenfalls eine quantitative Real-time PCR an WT-Mäusen durch, dabei kam es zu einem deutlichen Anstieg der p16^{INK4a}-Expression von Tag 1 zu Tag 28¹¹⁶. Dies entspricht dem p16^{INK4a}-Anstieg von Tag 7 zu 14 in dieser Pilotstudie. Im Gegensatz zu dieser Pilotstudie wurde jedoch ein weiterer Anstieg von Tag 14 zu Tag 28 nachgewiesen.

4.4.2 Telomerase quantitative Real-time PCR

In der menschlichen Niere werden Telomere im Alter kürzer^{92, 117}. Im Gegensatz dazu findet man in alten Nieren von Mäusen und Ratten lange Telomere, eine im Alter anhaltende Expression von Telomerase und das Fehlen einer kritischen Telomerverkürzung⁶⁵.

Die Telomerverkürzung ist eine Konsequenz von zellulärer Seneszenz und damit einhergehend von Alterungsprozessen^{97, 118}. Die Telomerlänge wird allerdings auch durch Umweltfaktoren und genetische Alterationen wie einer Telomerase-Mutation beeinflusst¹¹⁸.

Aus diesem Grunde wurde im Rahmen einer quantitativen Real-time PCR auch die Telomerase-Expression (als erweitertem Seneszenzparameter) bei transgenen und WT-Mäusen untersucht. Dabei schwankte die Expression der Telomerase-mRNA stark, sowohl im Hinblick auf teils hohe Standardabweichungen innerhalb einer Gruppe als auch im Hinblick auf die Expression an den verschiedenen Tagen. An den Tagen 3 und 14 exprimierten die Wildtypmäuse tendenziell mehr Telomerase als die INK4a^{-/-}-Mäuse, während an den Tagen 7 und 30 die Expression bei den transgenen Mäusen höher war. Die beobachteten Unterschiede hinsichtlich der chronischen Schäden sind somit nicht auf eine unterschiedliche Expression der Telomerase zurückzuführen.

In einer Studie von Melk et al.⁶⁴ konnte eine Assoziation zwischen einer Telomerverkürzung und dem Alter nachgewiesen werden. Es konnten allerdings keine signifikanten Assoziationen zwischen der Telomerlänge und der Nierenfunktion festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu konnte Westhoff et al.¹¹⁷ in einer Tierstudie einen Anstieg der Anfälligkeit für Zelltod und eine reduzierte Langzeitregeneration in Nieren mit kritisch verkürzten Telomeren nachweisen.

4.5. Immunhistochemische Untersuchungen

4.5.1 Der Proliferationsmarker Ki-67

Das Ausmaß an proliferierenden Zellen in verschiedenen Nierenkompartimenten wird mittels Immunhistochemie unter Benutzung des Ki-67-Antigens beurteilt. Ki-67 ist ein Marker, welcher streng mit der Zellproliferation assoziiert ist⁹². Durch diese Untersuchung sollte festgestellt werden, ob die höhere proliferative Kapazität renaler Tubuluszellen für die geringer ausgeprägten chronischen Schäden bei *INK4a*^{-/-}-Nieren verantwortlich ist. Die Daten der Arbeitsgruppe von Melk et al.^{44, 66} und weiterer Studienzentren^{48, 117, 119} bestätigen die gute Korrelation dieses Antigens mit der Proliferation. Basierend auf Vorarbeiten in humanen Nieren wurde eine inverse Korrelation zwischen p16^{*INK4a*} und Ki-67 erwartet^{64, 66}.

In einem ersten Schritt wurde die Anzahl positiver Tubuli ausgezählt. Dabei zeigte sich eine gute Korrelation mit der Anzahl positiver Tubuluszellen. Aus diesem Grund ist das Auszählen positiver Tubuli durchaus sinnvoll, um einen ersten Anhaltspunkt zu erhalten.

INK4a^{-/-}-Tiere wiesen zu jedem Untersuchungszeitpunkt mehr Ki-67 positive Tubuli, Tubuluszellen und Glomerulumzellen auf als WT-Tiere.

An Tag 14 wiesen die transgenen Tiere signifikant mehr positive Tubuli, Tubuluszellen und Glomerulumzellen ($p = 0,036$) auf, verglichen mit den WT-Tieren.

Durch Wegfall des $p16^{INK4a}$ -Signalwegs kommt es also zu einer erhöhten Proliferation in Tubulus- und Glomerulumzellen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Hypothese überein, dass eine erhöhte $p16^{INK4a}$ -Expression die proliferative Reserve tubulärer und glomerulärer Zellen reduziert und damit zu einer verminderten Regenerationsfähigkeit des Nierengewebes beiträgt.

In der auf dieser Pilotstudie aufbauenden Folgestudie ließen sich diese signifikant besseren Proliferationsraten in den transgenen Tieren nach Transplantation bestätigen⁹².

4.5.2 Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die phosphorylierte Form der MAP-Kinase p38 untersucht, die in der Signalkaskade oberhalb von $p16^{INK4a}$ ansetzt und möglicherweise eine Induktion von $p16^{INK4a}$ bewirkt.

Wang et al.¹²⁰ und Deng et al.⁹⁰ konnten zeigen, dass eine Aktivierung von p38 MAPK eine Induktion von $p16^{INK4a}$ und Seneszenz herbei führt.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten phospho-p38 Immunhistochemischen Untersuchung wiesen die $INK4a^{-/-}$ -Tiere mehr positiv gefärbte Zellen auf. Ein signifikanter Unterschied bei einem Vergleich der $INK4a^{-/-}$ -Tiere mit den WT-Tieren zeigte sich an Tag 7. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine kompensatorisch verstärkte Aktivierung von p38 bei $INK4a^{-/-}$ -Tieren sein. Da neben $p16^{INK4a}$ über p38MAPK auch eine Vielzahl anderer Transkriptionsfaktoren aktiviert und Gene induziert werden können, kann eine Aktivierung dieses Signalwegs eine weitere Induktion dieser Gene zur Folge haben¹²¹.

4.6 Ist $p16^{INK4a}$ gewebeprotectiv?

$p16^{INK4a}$ spielt nicht nur als Tumorsuppressor eine wichtige Rolle^{122, 123}, sondern ist wie zuvor beschrieben und durch unsere eigenen Ergebnisse untermauert auch mit somatischen Zellseneszenzmechanismen assoziiert^{44, 91, 92, 99}. Neben diesen beiden Funktionen zeigen neuere Studien jedoch, dass zelluläre Seneszenz unter gewissen Umständen auch gewebeprotectiv und mit einer Gewebereparatur verbunden sein kann¹²⁴⁻¹²⁶.

Die Arbeitsgruppe um Wolstein et al.¹²⁶ hat beispielsweise durch eine INK4a-Deletion in einem Modell über obstruktive Uropathie einen widersprüchlichen Effekt zu unserer Studie beobachtet.

Bei diesem Projekt wurde bei Wildtyp- und INK4a-KO-Mäusen eine unilaterale Urethraobstruktion (UUO) durchgeführt, um eine Fibrose zu induzieren.

Dabei zeigten die KO-Mäuse nach UUO einen deutlichen Anstieg der tubulären und interstitiellen Zellproliferation, eine Abnahme der Sammelrohr-Apoptose sowie eine größere Ablagerung von Kollagen und Fibronectin. Die Arbeitsgruppe schloss aus ihren Ergebnissen, dass p16^{INK4a} Entzündungen entgegenwirkt und eine Fibrose verhindert, während eine Deletion des Genes zu einer Erhöhung des Gewebes Schadens führt¹²⁶.

Auch wenn nicht ausgeschlossen werden kann, dass die aufgetretene Diskrepanz zu unserer Studie auf einer Differenz im Stamm der Knockout-Mäuse beruht, scheint es doch wahrscheinlich, dass die heterogene Auswirkung der p16^{INK4a}-Expression von dem biologischen Kontext und dem betroffenen Zelltyp abhängt. In zukünftigen Studien sollten diese Fragen durch komplementäre Stress-Modelle und durch den Gebrauch von zelltypischen spezifischen Gen-Deletions-Strategien untersucht werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Pilotstudie, dass die Entwicklung einer frühzeitigen Seneszenz durch p16^{INK4a}-Expression ein kritischer Regulationsmechanismus im Rahmen der Zell-Reparationsprozesse ist der zu einer post-ischämischen Entwicklung von IF/TA beitragen kann. Der Wegfall von p16^{INK4a} geht mit einer verbesserten Regenerations-Kapazität einher und könnte somit eine neue Strategie darstellen, um die Erfolgsrate im Rahmen der Nierentransplantation zu verbessern. Dies ist von besonderem Interesse für Patienten, die Nieren älterer Spender empfangen, da diese vermehrt eingesetzt werden, um den bestehenden Engpass bei Transplantaten zu bewältigen.

Es bleibt kritisch anzumerken, dass durch einen Wegfall von p16^{INK4a} eine frühzeitige Entstehung von Tumoren begünstigt werden kann.

Wird p16^{INK4a} in Zellen durch Mutation oder Deletion inaktiviert, kann es zu einer Proliferation veränderter Zellen kommen, wie es in vielen Tumorzellen der Fall ist^{70, 78, 79}.

Es ist daher erforderlich, mögliche Negativeffekte des Wegfalls von p16^{INK4a} in einem vergleichbaren Studienprotokoll wie in dieser Arbeit, zu untersuchen.

5. Zusammenfassung

Viele transplantierte Nieren zeigen im Verlauf der Zeit einen Verlust an Nephronen. Dieser Verlust entsteht durch die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose und tubulärer Atrophie nach der Transplantation und beeinträchtigt die Nierenfunktion. Allgemein stellen IF/TA eine gemeinsame Endstrecke vieler chronischer Nierenerkrankungen dar. Es ist wahrscheinlich, dass IF/TA eine Zunahme von Zellen widerspiegelt, welche die Fähigkeit zur Replikation und damit zur Regeneration verloren haben. Solche Zellen werden als seneszent bezeichnet. In Vorarbeiten wurde die besondere Bedeutung des Zellzyklus-Inhibitors und Seneszenzmediators $p16^{INK4a}$ für die Entstehung einer chronischen Transplantatnephropathie aufgezeigt. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass $p16^{INK4a}$ durch Stressfaktoren im Rahmen der Transplantation wie der I/R induziert wird.

Im Rahmen dieser Pilotstudie sollte der I/R-Schaden der Niere als ein Teilaspekt der transplantationsassoziierten Stressfaktoren untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine temporäre Ischämie induziert.

Die Arbeitshypothese war, dass I/R zu einer Induktion von $p16^{INK4a}$ in Wildtyp (WT)-Mäusen führt, und dass eine fehlende $p16^{INK4a}$ -Expression protektiv auf die ischämische Niere wirkt. Zu diesem Zweck wurden Nieren von WT-Mäusen und transgenen $INK4a^{-/-}$ -Mäusen an den Tagen 3, 7, 14 und 30 nach I/R untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass chronische tubuläre Veränderungen ab Tag 14 nach I/R detektierbar waren. Eine I/R induzierte einen Anstieg der $p16^{INK4a}$ -Expression in WT-Mäusen. Der Wegfall der $p16^{INK4a}$ -Proteinfunktion konnte in den transgenen Mäusen die Entstehung von TA und in erweiterten Experimenten auch IF zumindest teilweise verhindern. In $INK4a^{-/-}$ -Mäusen fand sich eine bessere Nierenfunktion, gemessen an einer höheren glomerulären Filtrationsrate. Eine erhöhte Proliferation nach I/R deutet darauf hin, dass die Nieren der $INK4a^{-/-}$ - Mäuse eine bessere replikative und regenerative Kapazität aufweisen.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen somit auf eine pathogenetische Rolle von p16^{INK4a} bei der Entstehung von IF/TA hin. Die in dieser Arbeit nachgewiesene verbesserte regenerative Kapazität der Niere durch Wegfall des Proteins p16^{INK4a} weist darauf hin, dass p16^{INK4a} ein Zielmolekül für neue Therapieansätze zur Verbesserung des Überlebens nach Nierentransplantationen darstellen kann. Dies ist von besonderem Interesse für Spendernieren von älteren Menschen, auf welche aufgrund der Organknappheit immer häufiger zurückgegriffen wird.

6. Summary

Many transplanted kidneys display a loss of nephron number after transplantation. This loss develops through IF/TA after transplantation and impairs renal function. Generally IF/TA are a common result of many chronic kidney diseases. It is likely that IF/TA represent an increase in the number of cells which have lost their ability to replicate and accordingly to regenerate. These cells are called „senescent cells“. It has been shown that the cell cycle inhibitor and senescence mediator p16^{INK4a} plays a special role for the development of chronic transplant nephropathy. In addition, it has been shown that certain stresses during transplantation, like ischemia-reperfusion (I/R) injury, is able to induce senescence.

In this pilot study an I/R injury in the kidney as part of transplantation associated stress was examined. The hypothesis was that I/R leads to an induction of p16^{INK4a} in wildtype (WT) mice and that the loss of p16^{INK4a} expression has a protective effect for the ischemic kidney. Therefore kidneys of WT mice and INK4a^{-/-} transgenic mice at the days 3, 7, 14 and 30 after I/R were examined.

I/R induced an increase of p16^{INK4a} expression in WT-mice. Chronic tubular changes were detected at day 14 after I/R. INK4a^{-/-} mice displayed less TA and in extended experiments the same was found for IF. Associated with the loss of p16^{INK4a} a higher GFR was detected, reflecting an improvement in renal function. A higher proliferation rate after I/R is an indicator that kidneys of INK4a^{-/-} mice have a better replicative and regenerative capacity.

Therefore, the results of this study highly suggests the pathogenetic role of p16^{INK4a} for the development of IF/TA.

The better regenerative capacity of INK4a^{-/-} kidneys shows that p16^{INK4a} may represent a new target for novel therapeutic development in order to improve the outcome after kidney transplantation. This is an important factor because the number of kidneys available for transplantation is rather low and therefore kidneys from older donors are routinely used nowadays.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Martin JE, Sheaff MT. Renal ageing. *J Pathol* 2007 Jan;211(2):198-205.
- (2) Thomas SE, Anderson S, Gordon KL, Oyama TT, Shankland SJ, Johnson RJ. Tubulointerstitial disease in aging: evidence for underlying peritubular capillary damage, a potential role for renal ischemia. *J Am Soc Nephrol* 1998 Feb;9(2):231-42.
- (3) Epstein M. Aging and the kidney. *J Am Soc Nephrol* 1996 Aug;7(8):1106-22.
- (4) Esposito C, Plati A, Mazzullo T, Fasoli G, De MA, Grosjean F, Mangione F, Castoldi F, Serpieri N, Cornacchia F, Dal Canton A. Renal function and functional reserve in healthy elderly individuals. *J Nephrol* 2007 Sep;20(5):617-25.
- (5) Baraldi A, Ballestri M, Rapana R, Lucchi L, Borella P, Leonelli M, Furci L, Lusvarghi E. Acute renal failure of medical type in an elderly population. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13 Suppl 7:25-9.
- (6) Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003 Jul 15;139(2):137-47.
- (7) Pannu N., Halloran PF. The kidney in aging, chap. 57, in *Primer on Kidney diseases*, 3rd., San Diego, CA, Academic Press; 2001, pp 377-381
- (8) Zhou XJ, Rakheja D, Yu X, Saxena R, Vaziri ND, Silva FG. The aging kidney. *Kidney Int* 2008 Sep;74(6):710-20.
- (9) Fuiano G, Sund S, Mazza G, Rosa M, Caglioti A, Gallo G, Natale G, Andreucci M, Memoli B, De Nicola L, Conte G. Renal hemodynamic response to maximal vasodilating stimulus in healthy older subjects. *Kidney Int* 2001 Mar;59(3):1052-8.
- (10) Gourtsoyiannis N, Prassopoulos P, Cavouras D, Pantelidis N. The thickness of the renal parenchyma decreases with age: a CT study of 360 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1990 Sep;155(3):541-4.
- (11) Giessing M, Conrad S, Schönberger B, Huland H, Budde K, Neumayer HH, Loening SA. [Kidney donors and kidney transplantation in the elderly]. *Urologe A* 2004 Aug;43(8):947-54.
- (12) Jehle A, Krapf R. [Kidney function and kidney diseases in the elderly]. *Schweiz Med Wochenschr* 2000 Mar 18;130(11):398-408.
- (13) Lamb EJ, O'Riordan SE, Delaney MP. Kidney function in older people: pathology, assessment and management. *Clin Chim Acta* 2003 Aug;334(1-2):25-40.

- (14) Lindeman RD, Goldman R. Anatomic and physiologic age changes in the kidney. *Exp Gerontol* 1986;21(4-5):379-406.
- (15) Fliser D, Zeier M, Nowack R, Ritz E. Renal functional reserve in healthy elderly subjects. *J Am Soc Nephrol* 1993 Jan;3(7):1371-7.
- (16) Alexander JW, Bennett LE, Breen TJ. Effect of donor age on outcome of kidney transplantation. A two-year analysis of transplants reported to the United Network for Organ Sharing Registry. *Transplantation* 1994 Mar 27;57(6):871-6.
- (17) Kielstein JT, Bode-Boger SM, Haller H, Fliser D. Functional changes in the ageing kidney: is there a role for asymmetric dimethylarginine? *Nephrol Dial Transplant* 2003 Jul;18(7):1245-8.
- (18) Watschinger B, Habicht A. [Renal sequelae of sympathetic hyperactivity]. *Wien Med Wochenschr* 2004;154 Spec No 1(1):7-9.
- (19) Adamczak M, Zeier M, Dikow R, Ritz E. Kidney and hypertension. *Kidney Int Suppl* 2002 May;(80):62-7.
- (20) Peixoto AJ, Orias M, Desir GV. Does kidney disease cause hypertension? *Curr Hypertens Rep* 2013 Jan 24.
- (21) Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. *N Engl J Med* 2003 Jan 9;348(2):101-8.
- (22) Hillege HL, Nitsch D, Pfeffer MA, Swedberg K, McMurray JJ, Yusuf S, Granger CB, Michelson EL, Ostergren J, Cornel JH, de Zeeuw D, Pocock S, van Veldhuisen DJ. Renal function as a predictor of outcome in a broad spectrum of patients with heart failure. *Circulation* 2006 Feb 7;113(5):671-8.
- (23) Hawkins R. New biomarkers of acute kidney injury and the cardio-renal syndrome. *Korean J Lab Med* 2011 Apr;31(2):72-80.
- (24) Schrier RW. Role of diminished renal function in cardiovascular mortality: marker or pathogenetic factor? *J Am Coll Cardiol* 2006 Jan 3;47(1):1-8.
- (25) Levin A. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis. *Semin Dial* 2003 Mar;16(2):101-5.
- (26) Dries DL, Exner DV, Domanski MJ, Greenberg B, Stevenson LW. The prognostic implications of renal insufficiency in asymptomatic and symptomatic patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2000 Mar 1;35(3):681-9.
- (27) Fried LF, Shlipak MG, Crump C, Bleyer AJ, Gottdiener JS, Kronmal RA, Kuller LH, Newman AB. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and mortality in elderly individuals. *J Am Coll Cardiol* 2003 Apr 16;41(8):1364-72.
- (28) Goh CY, Vizzi G, De CM, Ronco C. Cardiorenal syndrome: a complex series of combined heart/kidney disorders. *Contrib Nephrol* 2011;174:33-45.

- (29) Mann JF, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med* 2001 Apr 17;134(8):629-36.
- (30) Shlipak MG, Simon JA, Grady D, Lin F, Wenger NK, Furberg CD. Renal insufficiency and cardiovascular events in postmenopausal women with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2001 Sep;38(3):705-11.
- (31) Verma A, Anavekar NS, Meris A, Thune JJ, Arnold JM, Ghali JK, Velazquez EJ, McMurray JJ, Pfeffer MA, Solomon SD. The relationship between renal function and cardiac structure, function, and prognosis after myocardial infarction: the VALIANT Echo Study. *J Am Coll Cardiol* 2007 Sep 25;50(13):1238-45.
- (32) Bibbins-Domingo K, Lin F, Vittinghoff E, Barrett-Connor E, Grady D, Shlipak MG. Renal insufficiency as an independent predictor of mortality among women with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004 Oct 19;44(8):1593-600.
- (33) Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008 Nov 4;52(19):1527-39.
- (34) Melk A. Senescence of renal cells: molecular basis and clinical implications. *Nephrol Dial Transplant* 2003 Dec;18(12):2474-8.
- (35) Melk A, Halloran PF. Cell senescence and its implications for nephrology. *J Am Soc Nephrol* 2001 Feb;12(2):385-93.
- (36) Halloran PF, Melk A, Barth C. Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence. *J Am Soc Nephrol* 1999 Jan;10(1):167-81.
- (37) Cheung CM, Ponnusamy A, Anderton JG. Management of acute renal failure in the elderly patient: a clinician's guide. *Drugs Aging* 2008;25(6):455-76.
- (38) Schmitt R, Marlier A, Cantley LG. Zag expression during aging suppresses proliferation after kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2008 Dec;19(12):2375-83.
- (39) Kalra PA. Early management and prevention of acute renal failure. *EDTNA ERCA J* 2002;Suppl 2:34-8, 42.
- (40) Olsen S, Burdick JF, Keown PA, Wallace AC, Racusen LC, Solez K. Primary acute renal failure ("acute tubular necrosis") in the transplanted kidney: morphology and pathogenesis. *Medicine (Baltimore)* 1989 May;68(3):173-87.
- (41) US Renal Data System: *USRDS 1996 Annual Data Report*. National Institutes of Health; National Institute of Diabetes and Degenerative Kidney Diseases. Bethesda; 1996.
- (42) Kunzendorf U, Renders L, Ziegler E. [Chronic renal failure and transplantation]. *Internist (Berl)* 2007 Aug;48(8):804-12.

- (43) Oniscu GC, Brown H, Forsythe JL. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2005 Jun;16(6):1859-65.
- (44) Melk A, Schmidt BM, Braun H, Vongwiwatana A, Urmson J, Zhu LF, Rayner D, Halloran PF. Effects of donor age and cell senescence on kidney allograft survival. *Am J Transplant* 2009 Jan;9(1):114-23.
- (45) Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW. Impact analysis: a method for evaluating the impact of factors in clinical renal transplantation. *Clin Transplant* 1998;437-41.
- (46) Toma H, Tanabe K, Tokumoto T, Shimizu T, Shimmura H. Time-dependent risk factors influencing the long-term outcome in living renal allografts: donor age is a crucial risk factor for long-term graft survival more than 5 years after transplantation. *Transplantation* 2001 Sep 15;72(5):940-7.
- (47) Gjertson DW. Determinants of long-term survival of adult kidney transplants: a 1999 UNOS update. *Clin Transpl* 1999;341-52.
- (48) Famulski KS, Halloran PF. Molecular events in kidney ageing. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005 May;14(3):243-8.
- (49) Suzuki M, Boothman DA. Stress-induced premature senescence (SIPS)--influence of SIPS on radiotherapy. *J Radiat Res* 2008 Mar;49(2):105-12.
- (50) Sharpless NE, DePinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Sep;8(9):703-13.
- (51) Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Sep;8(9):729-40.
- (52) Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 2005 May;26(5):867-74.
- (53) Halloran PF, Melk A. Renal senescence, cellular senescence, and their relevance to nephrology and transplantation. *Adv Nephrol Necker Hosp* 2001;31:273-83.
- (54) Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1961 Dec;25:585-621.
- (55) Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990 May 31;345(6274):458-60.
- (56) Martens UM, Chavez EA, Poon SS, Schmoor C, Lansdorp PM. Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Exp Cell Res* 2000 Apr 10;256(1):291-9.
- (57) Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998 Jan 16;279(5349):349-52.

- (58) Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 2000 Aug 18;102(4):407-10.
- (59) Wright WE, Shay JW. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat Med* 2000 Aug;6(8):849-51.
- (60) Wright WE, Shay JW. Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nat Biotechnol* 2002 Jul;20(7):682-8.
- (61) Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995 May 5;81(3):323-30.
- (62) Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996 Apr 5;85(1):27-37.
- (63) Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* 2001 Feb 15;15(4):398-403.
- (64) Melk A, Ramassar V, Helms LM, Moore R, Rayner D, Solez K, Halloran PF. Telomere shortening in kidneys with age. *J Am Soc Nephrol* 2000 Mar;11(3):444-53.
- (65) Melk A, Kittikowit W, Sandhu I, Halloran KM, Grimm P, Schmidt BM, Halloran PF. Cell senescence in rat kidneys in vivo increases with growth and age despite lack of telomere shortening. *Kidney Int* 2003 Jun;63(6):2134-43.
- (66) Melk A, Schmidt BM, Takeuchi O, Sawitzki B, Rayner DC, Halloran PF. Expression of p16INK4a and other cell cycle regulator and senescence associated genes in aging human kidney. *Kidney Int* 2004 Feb;65(2):510-20.
- (67) Melk A, Schmidt BM, Vongwiwatana A, Rayner DC, Halloran PF. Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16INK4a in deteriorating renal transplants and diseased native kidney. *Am J Transplant* 2005 Jun;5(6):1375-82.
- (68) Sis B, Tasanarong A, Khoshjou F, Dadras F, Solez K, Halloran PF. Accelerated expression of senescence associated cell cycle inhibitor p16INK4A in kidneys with glomerular disease. *Kidney Int* 2007 Feb;71(3):218-26.
- (69) Palmero I, McConnell B, Parry D, Brookes S, Hara E, Bates S, Jat P, Peters G. Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status. *Oncogene* 1997 Jul 31;15(5):495-503.
- (70) Tam SW, Shay JW, Pagano M. Differential expression and cell cycle regulation of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p16Ink4. *Cancer Res* 1994 Nov 15;54(22):5816-20.

- (71) Sherr CJ. Parsing Ink4a/Arf: "pure" p16-null mice. *Cell* 2001 Sep 7;106(5):531-4.
- (72) Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996 Dec 6;274(5293):1672-7.
- (73) Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Oct;2(10):731-7.
- (74) Melzer D, Frayling TM, Murray A, Hurst AJ, Harries LW, Song H, Khaw K, Luben R, Surtees PG, Bandinelli SS, Corsi AM, Ferrucci L, Guralnik JM, Wallace RB, Hattersley AT, Pharoah PD. A common variant of the p16(INK4a) genetic region is associated with physical function in older people. *Mech Ageing Dev* 2007 May;128(5-6):370-7.
- (75) Krishnamurthy J, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 2006 Sep 28;443(7110):453-7.
- (76) Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, Loonstra A, Berns A. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 2001 Sep 6;413(6851):83-6.
- (77) Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001 Mar 10;264(1):42-55.
- (78) Ruas M, Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998 Oct 14;1378(2):F115-F177.
- (79) Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* 1998 Oct 1;12(19):2984-91.
- (80) Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y, Weaver-Feldhaus J, McClure M, Aitken JF, Anderson DE, Bergman W, Frants R, Goldgar DE, Green A, MacLennan R, Martin NG, Meyer LJ, Youl P, Zone JJ, Skolnick MH, Cannon-Albright LA. Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 1994 Sep;8(1):23-6.
- (81) Hatta Y, Hiramata T, Takeuchi S, Lee E, Pham E, Miller CW, Strohmeyer T, Wilczynski SP, Melmed S, Koeffler HP. Alterations of the p16 (MTS1) gene in testicular, ovarian, and endometrial malignancies. *J Urol* 1995 Nov;154(5):1954-7.
- (82) Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997 Nov 25;237(1):7-13.
- (83) Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994 Apr 21;368(6473):753-6.
- (84) Sharpless NE, Bardeesy N, Lee KH, Carrasco D, Castrillon DH, Aguirre AJ, Wu EA, Horner JW, DePinho RA. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 2001 Sep 6;413(6851):86-91.

- (85) Bullwinkel J, Baron-Luhr B, Ludemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol* 2006 Mar;206(3):624-35.
- (86) Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000 Mar;182(3):311-22.
- (87) Pearson G, Robinson F, Beers GT, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001 Apr;22(2):153-83.
- (88) Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai T, Whelan J. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem* 1997 Aug 8;272(32):19943-50.
- (89) Meldrum KK, Meldrum DR, Hile KL, Yerkes EB, Ayala A, Cain MP, Rink RC, Casale AJ, Kaefer MA. p38 MAPK mediates renal tubular cell TNF-alpha production and TNF-alpha-dependent apoptosis during simulated ischemia. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001 Aug;281(2):C563-C570.
- (90) Deng Q, Liao R, Wu BL, Sun P. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J Biol Chem* 2004 Jan 9;279(2):1050-9.
- (91) Westhoff JH, Hilgers KF, Steinbach MP, Hartner A, Klanke B, Amann K, Melk A. Hypertension induces somatic cellular senescence in rats and humans by induction of cell cycle inhibitor p16INK4a. *Hypertension* 2008 Jul;52(1):123-9.
- (92) Braun H, Schmidt BM, Raiss M, Baisantry A, Mircea-Constantin D, Wang S, Gross ML, Serrano M, Schmitt R, Melk A. Cellular senescence limits regenerative capacity and allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 2012 Sep;23(9):1467-73.
- (93) Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y, et.. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999 Feb;55(2):713-23.
- (94) Cohen A. Renal Anatomy and Basic Concepts and Methods in Renal Pathology. *Fundamentals of renal Pathology*. New York: Springer; 2006. p. 3-19.
- (95) Port FK, Bragg-Gresham JL, Metzger RA, Dykstra DM, Gillespie BW, Young EW, Delmonico FL, Wynn JJ, Merion RM, Wolfe RA, Held PJ. Donor characteristics associated with reduced graft survival: an approach to expanding the pool of kidney donors. *Transplantation* 2002 Nov 15;74(9):1281-6.

- (96) Cicciarelli J, Iwaki Y, Mendez R. The influence of donor age on kidney graft survival in the 1990s. *Clin Transpl* 1999;335-40.
- (97) Naesens M. Replicative senescence in kidney aging, renal disease, and renal transplantation. *Discov Med* 2011 Jan;11(56):65-75.
- (98) Luyckx VA, Compston CA, Simmen T, Mueller TF. Accelerated senescence in kidneys of low-birth-weight rats after catch-up growth. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009 Dec;297(6):F1697-F1705.
- (99) Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest* 2004 Nov;114(9):1299-307.
- (100) Feitoza CQ, Goncalves GM, Semedo P, Cenedeze MA, Pinheiro HS, Beraldo FC, dos Santos OF, Teixeira Vde P, dos Reis MA, Mazzali M, Pacheco-Silva A, Camara NO. Inhibition of COX 1 and 2 prior to renal ischemia/reperfusion injury decreases the development of fibrosis. *Mol Med* 2008 Nov;14(11-12):724-30.
- (101) Basile DP, Donohoe DL, Roethe K, Mattson DL. Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 Feb;284(2):F338-F348.
- (102) Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003 Apr;284(4):F608-F627.
- (103) Bonventre JV. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 1993 May;43(5):1160-78.
- (104) Humes HD, Lake EW, Liu S. Renal tubule cell repair following acute renal injury. *Miner Electrolyte Metab* 1995;21(4-5):353-65.
- (105) Williams P, Lopez H, Britt D, Chan C, Ezrin A, Hottendorf R. Characterization of renal ischemia-reperfusion injury in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997 Feb;37(1):1-7.
- (106) Azuma H, Nadeau K, Takada M, Mackenzie HS, Tilney NL. Cellular and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury of a single kidney. *Transplantation* 1997 Jul 27;64(2):190-7.
- (107) Shoskes DA, Parfrey NA, Halloran PF. Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse. *Transplantation* 1990 Jan;49(1):201-7.
- (108) Chkhotua AB, Abendroth D, Froeba G, Schelzig H. Up-regulation of cell cycle regulatory genes after renal ischemia/reperfusion: differential expression of p16(INK4a), p21(WAF1/CIP1) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes depending on reperfusion time. *Transplant Int* 2006 Jan;19(1):72-7.

- (109) Joosten SA, van H, V, Nolan CE, Borrias MC, Jardine AG, Shiels PG, van Kooten C, Paul LC. Telomere shortening and cellular senescence in a model of chronic renal allograft rejection. *Am J Pathol* 2003 Apr;162(4):1305-12.
- (110) Hochegger K, Koppelstaetter C, Tagwerker A, Huber JM, Heining D, Mayer G, Rosenkranz AR. p21 and mTERT are novel markers for determining different ischemic time periods in renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007 Feb;292(2):F762-F768.
- (111) Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant* 2011 Mar;11(3):450-62.
- (112) Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage. *Am J Kidney Dis* 1992 Jul;20(1):1-17.
- (113) Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003 Dec 11;349(24):2326-33.
- (114) Ferlicot S, Durrbach A, Ba N, Desvaux D, Bedossa P, Paradis V. The role of replicative senescence in chronic allograft nephropathy. *Hum Pathol* 2003 Sep;34(9):924-8.
- (115) Chkhotua AB, Gabusi E, Altimari A, D'Errico A, Yakubovich M, Vienken J, Stefani S, Chieco P, Yussim A, Grigioni WF. Increased expression of p16(INK4a) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes in aging human kidney and chronic allograft nephropathy. *Am J Kidney Dis* 2003 Jun;41(6):1303-13.
- (116) Lee DH, Wolstein JM, Pudasaini B, Plotkin M. INK4a deletion results in improved kidney regeneration and decreased capillary rarefaction after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012 Jan 1;302(1):F183-F191.
- (117) Westhoff JH, Schildhorn C, Jacobi C, Homme M, Hartner A, Braun H, Kryzer C, Wang C, von Zglinicki T, Kränzlin B, Gretz N, Melk A. Telomere shortening reduces regenerative capacity after acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2010 Feb;21(2):327-36.
- (118) Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med* 2009 Dec 10;361(24):2353-65.
- (119) Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson LD, Silva FG. Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. *J Am Soc Nephrol* 1994 Jun;4(12):2032-9.
- (120) Wang W, Chen JX, Liao R, Deng Q, Zhou JJ, Huang S, Sun P. Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* 2002 May;22(10):3389-403.

- (121) Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. Trends Mol Med 2009 Aug;15(8):369-79.
- (122) Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. Genes Dev 2010 Nov 15;24(22):2463-79.
- (123) Finkel T, Serrano M, Blasco MA. The common biology of cancer and ageing. Nature 2007 Aug 16;448(7155):767-74.
- (124) Jun JI, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. Nat Cell Biol 2010 Jul;12(7):676-85.
- (125) Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR, Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nat Cell Biol 2009 Aug;11(8):973-9.
- (126) Wolstein JM, Lee DH, Michaud J, Buot V, Stefanchik B, Plotkin MD. INK4a knockout mice exhibit increased fibrosis under normal conditions and in response to unilateral ureteral obstruction. Am J Physiol Renal Physiol 2010 Dec;299(6):F1486-F1495.

Eigene Veröffentlichung

Braun H, Schmidt BM, **Raiss M**, Baisantry A, Mircea-Constantin D, Wang S, et al.

Cellular senescence limits regenerative capacity and allograft survival.

J Am Soc Nephrol 2012 Sep;23(9):1467-73.

8. Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Manfred Reinacher, für seine Bereitschaft die Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten. Ich danke Ihm für seine stete Präsenz und den Rückhalt sowie die schnelle und gründliche Korrektur der Arbeit.

Ich danke Frau Prof. Dr. Dr. Anette Melk für die Überlassung dieses interessanten Themas und die stete Betreuung der Dissertationsarbeit. Danke für die Unterstützung und Geduld bei der Durchführung dieser Arbeit.

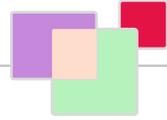
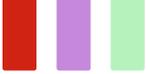
Ebenfalls danke ich Frau Dr. Heidi Braun für Ihre vielfältige Hilfe und Unterstützung im Rahmen dieser experimentellen Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Meike Hömme für Ihre Hilfestellung und Zusammenarbeit beim Erstellen dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meiner Schwester Britta und meinem Schwager Tilman für die Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Ich danke meinen Eltern von Herzen für die kontinuierliche Hilfe und Unterstützung in jeglicher Form über die letzten Jahre. Ihre Liebe und Ihr Rückhalt hat mir die Kraft gegeben, meine Ziele zu erreichen und meinen Weg zu finden.

Der größte Dank gilt meinem Mann Patric, der Liebe meines Lebens und meinen Söhnen Vincent und Oscar. Ohne Ihre Liebe und Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht fertig stellen können. Ihr seid mein größtes Glück!



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6159-3



9 783835 196159 3