

Aus dem Zentrum der Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Dötsch

Die funktionelle Rolle von Interleukin-6 in der akuten renalen Schädigung der neugeborenen Maus nach mechanischer Beatmung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Maria Isabella Rechmeier
aus Wuppertal

promoviert am 19.09.2024

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Druckjahr 2024

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Alcázar
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. S. P. Brähler

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Alejandro Alcázar

Dr. med. Celien Kuiper-Makris

Dr. nat. med. Jasmine Mohr

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin / eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die meinem Projekt zugrundeliegenden Tierversuche inklusive Tötung der Versuchstiere und nachfolgender Organentnahme wurden von Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. Alejandro Alcázar^a und Mitarbeitern seines Teams ausgeführt.

Die Anfertigung der Gewebeschnitte aus den in Paraffin eingebetteten Nieren erfolgte nach entsprechender Einweisung durch die biologisch technische Assistentin Frau Rebecca Wilke^a durch mich. Unter Anleitung von Dr. nat. med. Jasmine Mohr^a habe ich die Schnitte anschließend ebenfalls selbstständig einer PAS-Gewebefärbung zugeführt und unter entsprechend vorgegebenen histopathologischen Gesichtspunkten (Flächen- und Durchmesserbestimmungen, sowie statistische Auswertung der Messwerte) ausgewertet.

Die im Rahmen dieses Projekts vorgenommenen molekularbiologischen Untersuchungen (qRT-PCR und Western-Blot) wurden nach Einweisung durch die Biologielaborantin Frau Christina Vohlen^a selbstständig von mir ausgeführt und ausgewertet. Auch die notwendigen Vorbereitungsschritte (RNA- und Proteinisolation, cDNA-Synthese, Pufferherstellung) habe ich unter anfänglicher Unterstützung durch Frau Vohlen und Frau Wilke selbst vorgenommen.

Da sich im Rahmen meiner Labortätigkeit weiteres Forschungspotenzial ergab und arbeitsgruppenintern parallel entsprechende ergänzende Untersuchungen durchgeführt wurden, werden im Ergebnisteil dieser Arbeit einige wenige Daten präsentiert, die nicht von mir persönlich generiert wurden. Diese sind entsprechend gekennzeichnet (s. Abb. 12 und 14).

Für eine detaillierte Auflistung aller verwendeten Materialien und Methoden, sowie der genutzten Softwareprogramme und statistischen Tests sei auf den Material- und Methodenteil (s. Abschnitt 3) verwiesen.

^a Universität zu Köln und Uniklinik Köln, Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin,
Translationale Experimentelle Pädiatrie, Experimentelle Pneumologie

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 05. Mai 2024

Unterschrift: Maria Isabella Rechner

Danksagung

Bei der Fertigstellung meines Promotionsprojekts haben mich viele Menschen unterstützt, bei denen ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bedanken möchte.

Dies gilt für Professor Dr. med. J. Dötsch als Direktor der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, der die Durchführung meines Forschungsprojekts unter Bereitstellung aller dafür notwendigen Ressourcen überhaupt ermöglicht hat.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank meinem Promotionsbetreuer, Professor Dr. med. Dr. nat. med. M. A. A. Alcázar. Er hatte für alle meine Fragen und Anliegen stets ein offenes Ohr und hat mich durch seine Freundlichkeit, sein enormes Fachwissen und seine anhaltende Forschungsbegeisterung nachhaltig beeindruckt und zudem zur Entwicklung eigener Ideen und Vorschläge ermutigt.

Auch bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Alcázar möchte ich mich herzlich für die hervorragende fachliche und methodische Betreuung meiner Forschungstätigkeit bedanken. Explizit erwähnt seien hier Frau Rebecca Wilke und Dr. nat. med. J. Mohr, sowie besonders nachdrücklich Frau Christina Vohlen und Dr. med. Celien Kuiper-Makris, die beide auch über meine Labortätigkeit hinaus immer ansprechbar und dadurch eine riesige Hilfe waren. Die Zusammenarbeit hat mir vor allem auch menschlich viel Freude gemacht!

Außerdem kann ich meiner Familie und meinen Freunden fürs Motivieren, Korrekturlesen und Stolzsein gar nicht genug danken. Ihr seid die Besten.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
Zusammenfassung	12
1. Einleitung	13
1.1 Nierenentwicklung und -aufbau	14
1.1.1 Struktureller Aufbau der Niere	14
1.1.2 Pränatale Entwicklung der Niere	15
1.2 Frühgeburtlichkeit.....	17
1.2.1 Definition und Epidemiologie von Frühgeburtlichkeit.....	17
1.2.2 Renale Konsequenzen einer Frühgeburtlichkeit.....	18
1.2.2.1 Hyperfiltrationshypothese nach Barry Brenner.....	19
1.3 Mechanische Beatmung: Pulmorenaler <i>Crosstalk</i>	20
1.4 Interleukin-6 (IL-6).....	23
1.4.1 Interleukin-6: Funktionen und Signalvermittlung.....	23
1.4.2 Die Rolle von Interleukin-6 im Kontext renaler Erkrankungen	25
1.5 Fragestellungen und Arbeitshypothese	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Tierexperimentelles Design	27
2.2 Materialien	29
2.2.1 Chemikalien und Reagenzien	29
Chemikalie / Reagenz Artikelnummer Hersteller	29
2.2.2 Puffer und Lösungen.....	31
2.2.3 Kits	32
2.2.4 Gele für Western-Blot-Verfahren.....	32
2.2.5 Antikörper für Western-Blot-Verfahren.....	33
2.2.6 Primer für qRT-PCR.....	33
2.2.6.1 Primer für TaqMan-qRT-PCR	33
2.2.6.2 Primer für SYBR-Green-I-qRT-PCR	34
2.2.7 Verbrauchsmaterial	34

2.2.8 Geräte und Ausrüstung	37
Gerät Artikelname / -nummer Hersteller	37
2.2.9 Software	39
2.3 Methoden	40
2.3.1 Histologische Verfahren	40
2.3.1.1 Anfertigung von Paraffinschnitten	40
2.3.1.2 PAS-Färbung	40
2.3.1.2.1 Quantitative Histomorphometrie der Niere.....	41
2.3.2 Methoden zur Bestimmung von Expressionsmustern auf mRNA-Ebene	42
2.3.2.1 RNA-Isolation und -konzentrationsbestimmung.....	42
2.3.2.2 cDNA-Synthese.....	42
2.3.2.3 Quantitative <i>Real Time PCR</i>	43
2.3.3 Methoden zur Bestimmung von Expressionsmustern auf Proteinebene	45
2.3.3.1 Proteinisolation und –konzentrationsbestimmung	45
2.3.3.2 <i>SDS-Page</i> und <i>Western Blotting</i>	47
2.3.3.3 Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse	49
2.4 Statistische Auswertung	49
3. Ergebnisse	50
3.1 Postnatale MV verursacht Inflammation im neonatalen Nierengewebe	50
3.1.1 Untersuchung der renalen <i>Ii6</i> - und <i>Ii1b</i> -mRNA-Expression nach 4h MV.....	50
3.1.2 Untersuchung der renalen Expression inflammatorischer Mediatoren nach 8h MV	51
3.1.2.1 Untersuchung einer möglichen renalen NF- κ B-Aktivierung nach 8h MV	52
3.2 Postnatale MV stört die zelluläre Homöostase im neonatalen Nierengewebe	56
3.2.2 Untersuchung einer möglichen Störung der mitochondrialen Biogenese als Anzeichen für oxidativen Stress nach 8h MV	58
3.3 Postnatale MV reguliert die Genexpression von Podozytenmarkern im neonatalen Nierengewebe	59
3.4 Möglicher Pathomechanismus der podozytären Schädigung unter postnataler MV: Hinweise auf eine ROS-vermittelte β -Catenin-Aktivierung im neonatalen Nierengewebe	60

3.5 Postnatale MV reguliert die Genexpression von Fibrosemarkern im neonatalen Nierengewebe	61
3.6 Strukturelle Effekte von postnataler MV auf das neonatale Nierengewebe	63
3.6.1 Untersuchung von Anzahl und Durchmesser der Glomeruli nach 8h MV.....	63
3.6.2 Untersuchung des strukturellen Aufbaus der Nierenkortexregion nach 8h MV ...	64
4. Diskussion	65
4.1 Klinische Relevanz: Warum ist die Erforschung beatmungsbedingter (neonataler) Nierenschädigungen bedeutsam für die klinische Praxis?	67
4.2 Untersuchung des renalen Effekts einer postnatalen MV an der neugeborenen Maus: Welche translationalen Chancen und Hindernisse sind zu berücksichtigen?	68
4.3 Welcher Erkenntnisgewinn ergibt sich durch unsere Forschung bezüglich der Pathophysiologie der postnatalen beatmungsbedingten Nierenschädigung?.....	69
4.3.1 Postnatale MV initiiert eine akute, IL-6-vermittelte Inflammation im neonatalen Nierengewebe.....	69
4.3.2 Postnatale MV hat einen potenziell programmierenden Effekt auf das neonatale Nierengewebe.....	71
4.3.2.1 Postnatale MV stört den des Zellzyklus und initiiert möglicherweise frühzeitige Alterungsprozesse im neonatalen Nierengewebe	71
4.3.2.2 Postnatale MV beeinflusst die Genexpression und Signalwege in den Podozyten des neonatalen Nierengewebes	72
4.3.2.3 Postnatale MV verzögert die strukturelle Ausreifung und initiiert ein profibrotisches Expressionsmuster im neonatalen Nierengewebe	74
4.4 Ist IL-6 ein geeigneter Angriffspunkt für die zielgerichtete Prävention postnataler <i>Ventilation-Induced Kidney Injuries</i> ?	75
4.5 Limitationen dieser Arbeit	77
4.6 Ausblick	79
5. Fazit	81
Literaturverzeichnis	82
Anhang	103
Abbildungsverzeichnis	103
Tabellenverzeichnis	105

Abkürzungsverzeichnis

<i>Actb</i>	β-Actin
A. d.	Aqua destillata
AKI	<i>Acute Kidney Injury</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BCA	Bicinchoninsäure
BPD	Bronchopulmonale Dysplasie
BSA	Albumin Fraktion V
BSF-2	B-Zell stimulierender Faktor 2
cDNA	komplementäre DNS (engl. <i>complementary DNA</i>)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i>
Co	Kontrolle (engl. <i>control</i>)
C _t	<i>Threshold Cycle</i>
CTGF / <i>Ctgf</i>	<i>Connective tissue growth factor</i>
Cu ²⁺	Kupfer
DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DEPC	Diethylidicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
E	E
E2F1 / <i>E2f1</i>	E2F Transkriptionsfaktor 1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
EZV	Extrazelluläres Volumen
GA	Gestationsalter
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
gp130	Glykoprotein 130
HPR	Meerrettichperoxidase
HZV	Herzzeitvolumen
IL	Interleukin
IL-1β / <i>Il1b</i>	Interleukin-1β
IL-6 / <i>Il6</i>	Interleukin-6
<i>Il6-KO</i> / <i>IL6^{-/-}</i>	Interleukin-6-Knockout
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor

<i>Irak1</i>	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>
<i>Irak4</i>	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i>
JAK-1	Januskinase 1
KO	Knockout
LANUV	Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
MCP-1 / <i>Mcp1</i>	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MV	Mechanische Beatmung (engl. <i>Mechanical Ventilation</i>)
<i>Myd88</i>	<i>MYD88 innate immune signal transduction adaptor</i>
nAKI	neonatale AKI
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nRDS	<i>Neonatal Respiratory Distress Syndrome</i>
NTC	<i>No Template Control</i>
OD	Optische Dichte
O ₂	Sauerstoff (engl. <i>oxygen</i>)
p	p-Wert (Überschreitungswahrscheinlichkeit)
P	Postnataler Tag
p21 / <i>Cdkn1a</i>	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
p65	Transkriptionsfaktor p65
PAI-1 / <i>Serpine1</i>	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PAS	Perjodsäure-Schiff (engl. <i>Periodic acid-Schiff</i>)
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
<i>Pdcn</i>	Podocin
<i>Pdpm</i>	Podoplanin
PFA	Paraformaldehyd
PGC-1 α / <i>Ppargc1a</i>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α</i>
pSTAT3	phosphorylierter Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3
qRT-PCR	<i>Real-time quantitative PCR</i>
RDS	Atemnotsyndrom (engl. <i>respiratory distress syndrome</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
SASP	<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)

SEM Standardfehler des Mittelwerts (engl. <i>standard error of the mean</i>)
sIL-6-R löslicher IL-6-Rezeptor (engl. <i>soluble</i>)
<i>Sirt1</i> Sirtuin-1
SOCS3 / <i>Socs3</i> <i>Suppressor of Cytokine Signalling 3</i>
SSW Schwangerschaftswoche
STAT3 Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3
<i>Synpo</i> Synaptopodin
TBST <i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TGF- β <i>Transforming growth factor β</i>
TNF- α / <i>Tnfa</i> Tumornekrosefaktor- α
tPA <i>Tissue Plasminogen Activator</i>
<i>Traf6</i> <i>TNF receptor associated factor 6</i>
uPA <i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
VIKI <i>Ventilation-Induced Kidney Injury</i>
WHO Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i>)
WT Wildtyp

Zusammenfassung

Frühgeborene sind aufgrund ihrer Lungenunreife häufig auf mechanische Beatmung angewiesen¹⁻⁴. Während diese Intervention lebensrettend sein kann, verursacht sie gleichzeitig jedoch nicht nur pulmonale Schäden^{2,3}, sondern geht u. a. auch mit einem erhöhten Risiko für eine akute Nierenschädigung einher⁵⁻⁹. Die zugrundeliegenden Mechanismen einer beatmungsbedingten Nierenschädigung sind bisher allerdings weitgehend ungeklärt. Daher wurde in diesem Projekt der akute strukturelle und molekulare Effekt von postnataler mechanischer Beatmung am Mausmodell untersucht. Da unsere Arbeitsgruppe zuvor bereits zeigen konnte, dass die Aktivierung des Interleukin (IL)-6/STAT3-Signalwegs maßgeblich an der Entstehung einer postnatalen Hyperoxie-induzierten Nierenschädigung beteiligt ist¹⁰, lag unser Untersuchungsfokus auf der Klärung der Rolle von IL-6 als möglichem Schlüsselregulator für ein akutes renales Schädigungsgeschehen.

Dazu wurden Wildtyp-Mäuse (Typ C57BL6N¹⁰⁻¹²) und homozygote *Il6*-Knockout-Mäuse (Typ B6.129S2IL-6^{tm1Kopf/J}^{10,13}) am fünften Lebenstag vier bzw. acht Stunden lang mechanisch beatmet (unbeatmete Tiere aus beiden Gruppen dienten als Kontrollen). Anschließend wurden die Tiere zwecks Organentnahme euthanasiert und die Nieren für molekularbiologische Untersuchungen schock gefroren oder für histomorphometrische Analysen in Paraffin eingebettet.

Die Ergebnisse der Gen- und Proteinexpressionsmessungen zeigten *post ventilationem* eine signifikante renale Aktivierung der IL-6/STAT3-Signalkaskade, sowie eine deutliche Expressionssteigerung der ebenfalls proinflammatorischen Mediatoren *Il1b* (inklusive seiner *downstream* Effektoren) und *Mcp1*. Dieser ausgeprägte Entzündungsprozess war mit einem Expressionsanstieg von *Ppargc1a* und *Sirt1* (mitochondriale Marker), *Cdkn1a* (Seneszenzmarker), sowie *Serpine1* und *Ctgf* (Fibrosemarker) assoziiert. Zudem konnte eine auffällige Veränderung der mRNA-Expression podozytärer Marker festgestellt werden. Histomorphologisch zeigte sich in den beatmeten Tieren außerdem eine Vergrößerung der nephrogenen Zone im Verhältnis zur Kortexgesamtfläche. Der *Il6*-Knockout konnte die beschriebenen Beatmungseffekte zum Teil verhindern oder zumindest attenuieren.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine postnatale mechanische Beatmung im neonatalen Nierengewebe eine IL-6-vermittelte Entzündungsreaktion anstößt und damit störend in die zelluläre und mitochondriale Homöostase eingreift. Die frühe Hochregulation profibrotischer Mediatoren deutet dabei auf eine über die Akutphase hinausgehende, langfristige Schadensinduktion hin. Entsprechend ergibt sich das Potenzial für die Entwicklung präventivtherapeutischer Interventionen, wobei die weiterführende Erforschung eines anti-IL-6-basierten Ansatzes vielversprechend erscheint.

1. Einleitung

Lange Zeit wurden akute Nierenschäden nach klinischer Erholung der Nierenfunktion als vollständig reversibel angesehen. Dieses Dogma gilt inzwischen jedoch als überholt, da gezeigt werden konnte, dass Akutschäden das Risiko für die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung erhöhen^{14–16}. Ein Patientenkollektiv, das nachweislich ein erhöhtes Risiko für sowohl *Acute Kidney Injuries* (AKI)^{1 5,7} als auch die Entwicklung einer *Chronic Kidney Disease* (CKD)² aufweist, sind Frühgeborene^{21–23}.

Der kausale Zusammenhang zwischen Geburtsunreife und assoziierten (frühen) AKIs auf der einen, sowie der langfristigen Entstehung einer CKD auf der anderen Seite, kann unter dem Begriff *Developmental Origins of Health and Disease* (DOHaD) zusammengefasst werden^{24–27}. Dieser beschreibt die Annahme, dass adverse Umweltbedingungen während einer kritischen (frühen) Entwicklungsperiode einen andauernden, gewissermaßen „programmierenden“ Effekt auf den unreifen Organismus haben und langfristig für die Entwicklung chronischer Erkrankungen prädisponieren können^{25,28–30}. Wegen dieses Chronifizierungspotenzials sind die Identifikation nierenschädigender Stressoren und zugrundeliegender Schädigungsmechanismen während der Neonatalperiode entscheidend, damit mögliche Strategien zur Prävention und / oder zielgerichteten Therapie entwickelt werden können.

In diesem Sinne liegt der Fokus der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der lokalen renalen Schädigungsmechanismen unter postnataler mechanischer Beatmung, da diese als unabhängiger Risikofaktor für das Auftreten einer neonatalen AKI gilt⁵. Basierend auf den Erkenntnissen aus unserem Hyperoxie-basierten Vorgängerprojekt zur Entstehung neonataler Nierenschäden¹⁰ (s. Abschnitt 1.4.2) soll dabei ein besonderes Augenmerk auf der Rolle von Interleukin-6 (IL-6) liegen, um im Umkehrschluss den potenziellen Benefit einer antikörperbasierten Anti-IL-6-Therapie im vorliegenden Setting beurteilen zu können.

¹ Bei Erwachsenen kann bei Auftreten eines der folgenden Kriterien von einer *Acute Kidney Injury* (AKI) gesprochen werden: Anstieg des Serumkreatininwerts um mindestens 0,3 mg/dl innerhalb von 48 h bzw. auf mindestens das 1,5-fache des Ausgangswerts innerhalb von sieben Tagen, und / oder neu auftretende Oligurie (< 0,5 ml/kg Körpergewicht pro Stunde über mind. 6 Stunden)¹⁷. Bei Neugeborenen hingegen wird bereits ab einer Urinproduktion von < 1 ml/kg Körpergewicht pro Stunde (auch ohne messbaren Anstieg des Serumkreatinins) von einer neonatalen AKI ausgegangen¹⁸.

² Unter dem Oberbegriff *Chronic Kidney Disease* (CKD) werden abnormale strukturelle oder funktionelle Nierenbefunde zusammengefasst, die mehr als drei Monate bestehen und sich negativ auf die Gesundheit eines Patienten auswirken¹⁹. Es wird eine Prävalenz von *circa* 9 % der globalen Gesamtbevölkerung angenommen, 2017 stand die CKD weltweit an zwölfter Stelle der Todesursachen²⁰.

1.1 Nierenentwicklung und -aufbau

Bevor im Folgenden ein Überblick über die bisher bekannten renalen Konsequenzen von Frühgeburtlichkeit und mechanischer Beatmung gegeben wird, soll zwecks besseren Verständnisses zunächst eine kurze Rekapitulation der Entwicklung und des strukturellen Aufbaus der Niere erfolgen.

1.1.1 Struktureller Aufbau der Niere

Die Niere ist ein paarig angelegtes Organ, dessen komplexer struktureller Aufbau in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Das Nierenparenchym wird in Rinden- (Kortex renalis) und Markregion (Medulla renalis) eingeteilt. Der Kortex verläuft subkapsulär und zieht säulenförmig in das Organinnere, dazwischen liegen pyramidenförmige Markabschnitte.

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, welches jeweils ein Nierenkörperchen aus Glomerulus und umgebender Bowman-Kapsel (im Kortex) und die sich daran anschließenden Tubulusabschnitte bis hin zum Sammelrohr (im Mark) umfasst³¹. Als Glomerulus wird ein arterielles Kapillarknäuel bezeichnet, dessen fenestriertes Endothel einen Flüssigkeitsaustritt in den Raum zwischen Gefäßwand und der umgebenden Bowman-Membran ermöglicht, welche aus einem inneren und einem äußeren Blatt besteht. Das innere Blatt wird aus den sogenannten Podozyten gebildet, deren Fußfortsätze über *tight junctions* eng miteinander verschränkt sind. Zwischen den Podozyten befindet sich außerdem ein Schlitzdiaphragma. Es bildet gemeinsam mit dem Kapillarendothel, der glomerulären Basalmembran und den Podozyten die Blut-Harn-Schranke, also den glomerulären Filterapparat. Das gebildete Filtrat (der sogenannte Primärharn) tritt anschließend in das Tubulussystem über³¹.

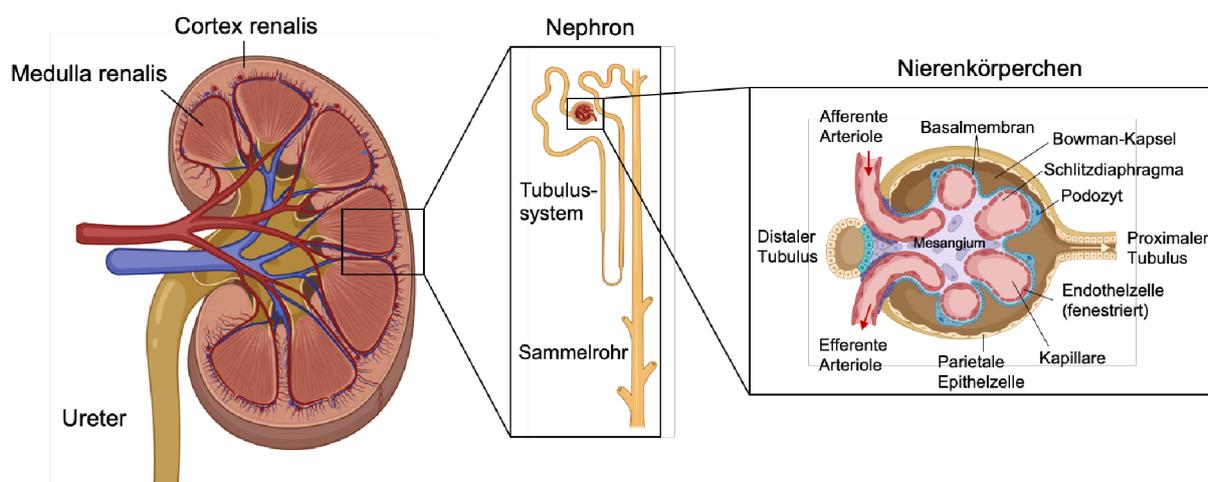


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Nierenaufbaus. Dargestellt sind ein makroskopischer Nierenlängsschnitt mit Kortex- und Markabschnitten (links), sowie der schematische Aufbau eines Nephrons, d. h. je ein Nierenkörperchen und anschließendes Tubulussystem bis hin zum Sammelrohr (mittig). Der letzte Abbildungsabschnitt zeigt den mikroskopischen Aufbau des Nierenkörperchens mit glomerulärer Kapillare und umgebender Bowman-Kapsel (rechts).

Eine Schädigung des glomerulären Filtrationsapparates und insbesondere der Podozyten kann mit der Entwicklung von Proteinurie, glomerulosklerotischen Veränderungen und progredientem Nierenfunktionsverlust einhergehen^{32,33}. In diesem Zusammenhang sei jedoch auch auf die erhebliche interindividuelle Varianz der zahlenmäßigen Nephronausstattung hingewiesen³⁴⁻³⁶. In einer Publikation von Nyengaard und Bendtsen et al. wird beispielsweise von minimal 331.000 und maximal 1.420.000 Nephronen pro Niere berichtet³⁴. Dies ist insofern klinisch relevant, als davon ausgegangen wird, dass Menschen mit einer geringen Ausstattung an (funktionstüchtigen) Nephronen eine geringere renale „Reservekapazität“ aufweisen. Dadurch sollen im Laufe des Lebens erworbene Nierenschädigungen schneller einen messbaren Nierenfunktionsverlust bedingen als bei Menschen mit einer höheren Nephrongrundausrüstung^{37,38} (s. Abschnitt 1.2.2.1).

1.1.2 Pränatale Entwicklung der Niere

Bevor die Niere jedoch überhaupt zum funktionsfähigen Ausscheidungsorgan heranreifen kann, werden während der pränatalen Entwicklung zunächst zwei transiente Organvorstufen (Pro- und Mesonephros) gebildet, um anschließend wieder abgebaut und durch die sogenannte Nachniere (Metanephros) ersetzt zu werden³⁹⁻⁴² (s. Abb. 2).

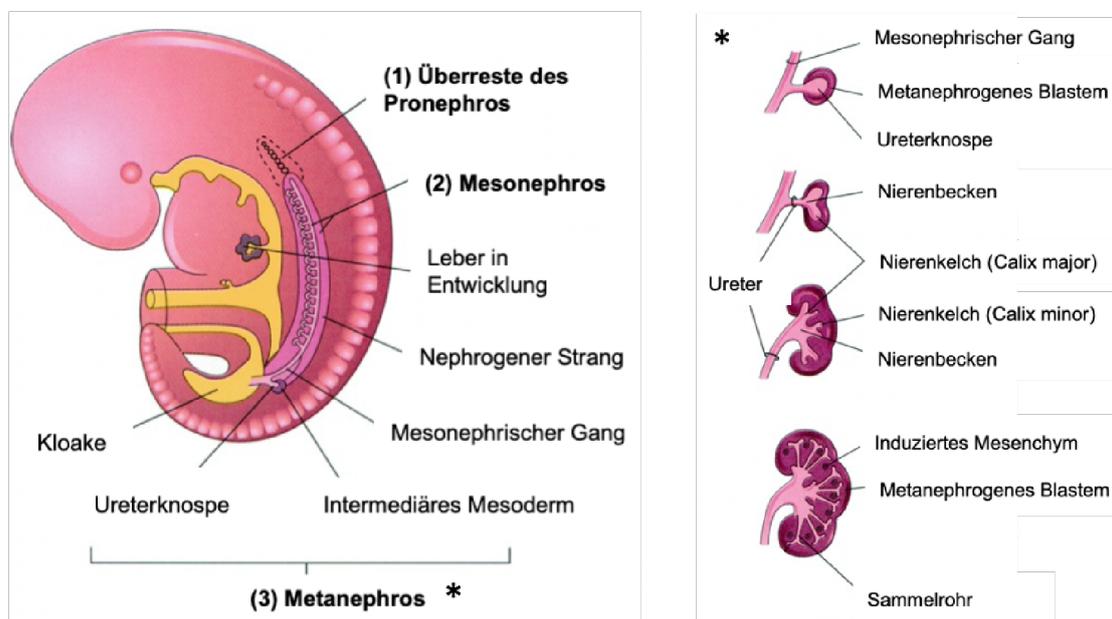


Abbildung 2: Schematische Darstellung der stadienhaften pränatalen Nierenentwicklung. [Modifiziert nach Moore et al. (2016)⁴³, Abbildungsgenehmigung erteilt durch Elsevier].

Grob zusammengefasst werden folgende Entwicklungsschritte vollzogen:

- (i) Im frühen Fetalstadium entspringt die sogenannte Vorniere (Pronephros) dem intermediären Mesoderm. Mesenchymale Zellen durchlaufen eine epitheliale Transformation und formieren sich zu dem sogenannten pronephrischen Gang,

dessen distaler Anteil als einzige der genannten Strukturen bestehen bleibt und fortan als mesonephrischer Gang bezeichnet wird. Dieser wächst nach kaudal, um später mit dem Sinus urogenitalis zu fusionieren⁴⁰⁻⁴².

- (ii) Während seines Wachstums induziert der mesonephrische Gang zunächst die Formation der Urniere (Mesonephros). Die entstandenen Tubuli und Nephronvorläufer degenerieren im Folgenden von kaudal nach kranial^{41,42}.
- (iii) Anschließend differenziert der kaudale Abschnitt des intermediären Mesenchyms zum metanephrogenen Blastem. Aus dem mesonephrischen Gang entsteht die Ureterknospe, die in das metanephrogene Blastem einwächst⁴⁰⁻⁴². Es folgen mehrere Zyklen dichotomer Verzweigungen der Ureterknospe, wodurch das zukünftige Sammelrohrsystem der Niere, auch als Nachniere oder Metanephros bezeichnet, entsteht^{41,42}.
- (iv) Gleichzeitig bilden sich um die Knospenspitzen kappenartige Kondensate aus induziertem Mesenchym, aus denen sich ihrerseits die Nephrone mit glomerulären und tubulären Anteilen entwickeln^{41,42}. Durch ihre Fusion mit dem angrenzenden Abschnitt der Ureterknospe entsteht ein kontinuierliches Lumen zwischen Nephronen und Sammelrohrsystem⁴⁴.

Die Nephronneubildung findet dabei jeweils in der äußersten Kortexschicht statt, die während dieser Periode als nephrogene Zone bezeichnet wird. Diese Zone wird im Entwicklungsverlauf immer schmaler bis sie schließlich mit Ende der renalen Ausreifung gänzlich verschwindet⁴⁵.

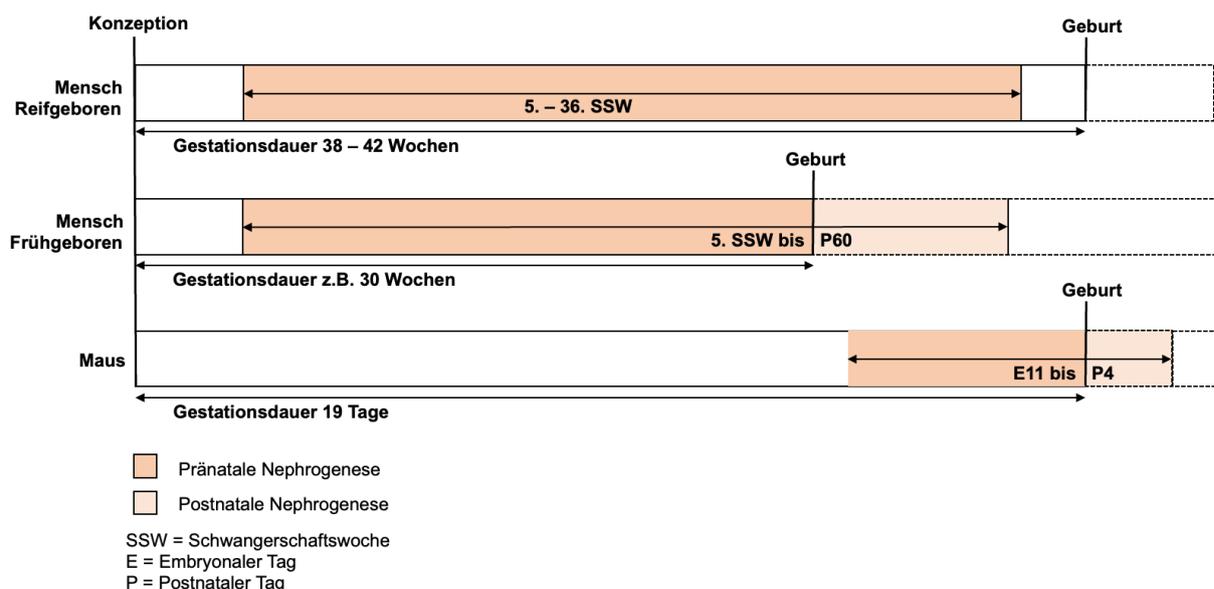


Abbildung 3: Gegenüberstellung des zeitlichen Ablaufs der Nierenentwicklung bei Mensch (reif- versus frühgeboren) und Maus. [Modifiziert nach Cullen-McEwen et al. (2016)⁴⁶, Abbildungsgenehmigung erteilt durch Elsevier].

Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, vollzieht sich der Hauptanteil der Nephrogenese beim Menschen im letzten Schwangerschaftsdrittel und endet physiologischerweise um die 36. Schwangerschaftswoche (also pränatal)⁴⁷. Bei Mäusen wiederum dauert die Nephronneubildung über die ersten zwei bis vier postnatalen Lebenstage hinweg an^{41,48}. In dieser Hinsicht bietet sich das Mausmodell zur Erforschung renaler Effekte von Frühgeburtlichkeit an (s. translationale Chancen und Hindernisse, Abschnitt 4.4), da auch bei Frühgeborenen eine über einen gewissen Zeitraum hinweg postnatal andauernde Nephrogenese festgestellt werden konnte⁴⁹⁻⁵¹.

1.2 Frühgeburtlichkeit

Dass eine vorzeitige Geburt trotz dieser extrauterinen Fortführung der Nephrogenese negative strukturelle und funktionelle Auswirkungen auf die Niere hat (s. Abschnitt 1.2.2), liegt zum einen an dem intrinsischen Stress durch die plötzliche Transition von intra- nach extrauterin und den einhergehenden funktionellen Anforderungen an das noch unreife Organ^{52,53}. Zum anderen sind Frühgeborene im Rahmen der neonatalmedizinischen Versorgung häufig auch externen (u. a. iatrogenen) Stressoren ausgesetzt, die die Nieren zusätzlich belasten können⁵⁴⁻⁵⁶. Da das individuelle Ausmaß der Organunreife zudem mit der renalen Suszeptibilität gegenüber iatrogenen Schäden korreliert, steigt mit abnehmendem Gestationsalter entsprechend die Wahrscheinlichkeit einer postnatalen Nierenschädigung inklusive kurz- und langfristiger gesundheitlicher Folgen⁵⁶.

1.2.1 Definition und Epidemiologie von Frühgeburtlichkeit

Als Frühgeborene gelten laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) solche Kinder, die vor Vollendung der 37. Schwangerschaftswoche (SSW) geboren werden. Nach Gestationsalter werden diese weiterhin in die Kategorien extrem (< 28 SSW), sehr (< 32 SSW) und moderat frühgeboren (ab 32 SSW) eingeteilt⁵⁷. Den aktuellen Zahlen zufolge werden jährlich bis zu 15 Millionen Kinder frühzeitig geboren, die Tendenz ist weiter steigend^{58,59}. Während das Überleben – auch extrem Frühgeborener – dank Verbesserung der neonatalmedizinischen Versorgungsmöglichkeiten kontinuierlich ansteigt⁶⁰⁻⁶², bleibt die assoziierte Kurz- und Langzeitmorbidity allerdings hoch und stellt sowohl sozioökonomisch als auch privat eine große Herausforderung dar⁶³. In Abbildung 4 werden einige häufige Akut- und Spätfolgen einer Frühgeburtlichkeit tabellarisch aufgezeigt. Da eine ausführliche Erläuterung des aktuellen Wissensstands bezüglich möglicher gesundheitlicher Komplikationen jedoch jenseits des Rahmens dieser Arbeit liegt, sei dazu auf entsprechende Übersichtsarbeiten verwiesen⁶⁴⁻⁶⁶. Im Folgenden wird ausschließlich auf pulmonale und renale Konsequenzen einer Geburtsunreife eingegangen werden.

	Akut	Chronisch
Zentrales Nervensystem	<ul style="list-style-type: none"> • Krampfanfälle, Koma • Kernikterus • Zerebrale Einblutungen • Periventriculäre Leukomalazie • Retinopathia prematurorum • ... 	<ul style="list-style-type: none"> • Hör- und Sprachstörungen • Sehstörungen • Infantile Zerebralparese • Entwicklungsverzögerung • ...
Vaskuläres System	<ul style="list-style-type: none"> • Persistierender Ductus arteriosus • Hypotonie • Herzrhythmusstörung, Asystolie • ... 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypertonus, Koronare Herzkrankheit • Herzinsuffizienz • ...
Respirationstrakt	<ul style="list-style-type: none"> • Apnoe • Atemnotsyndrom • Bronchopulmonale Dysplasie • ... 	<ul style="list-style-type: none"> • Infektanfälligkeit • Obstruktive Atemwegserkrankung • ...
Renales System	<ul style="list-style-type: none"> • Angeborenes Nephrondefizit • <i>Actue Kidney Injuries</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteinurie • <i>Chronic Kidney Disease</i>
Gastrointestinaltrakt	<ul style="list-style-type: none"> • Nekrotisierende Enterokolitis • ... 	<ul style="list-style-type: none"> • GI-Motilitätsstörungen • Malabsorptionssyndrome • Kurzdarmsyndrom • ...
Metabolismus	<ul style="list-style-type: none"> • Hypoglykämie • Hyperbilirubinämie • ... 	<ul style="list-style-type: none"> • Knochenstoffwechselstörung • Metabolisches Syndrom (Adipositas, Fettstoffwechselstörung, DM Typ II) • ...
Wachstum / Entwicklung	<ul style="list-style-type: none"> • Wachstumsverzögerung • Verzögerung der motorischen Entwicklung • ... 	
Psyche	<ul style="list-style-type: none"> • Depression, Angststörung • Aufmerksamkeitsdefizitsyndrom • Autismusspektrumstörungen • Soziale Anpassungsstörungen • ... 	

Abbildung 4: Exemplarische Auflistung von gesundheitlichen Akut- und Spät komplikationen nach Frühgeburtlichkeit. [Modifiziert nach Morniroli et al. (2023)⁶⁴, Abbildungsgenehmigung per CCLizenz: CC BY 4.0].

1.2.2 Renale Konsequenzen einer Frühgeburtlichkeit

Da die Nephrogenese zum größten Teil während des letzten Schwangerschaftstrimenons stattfindet⁴⁷, kann es im Rahmen einer Frühgeburt zu einer Verlagerung der strukturellen Nierenentwicklung von intra- nach extrauterin kommen.

Eine tubuläre Unreife geht postnatal mit funktionellen Einschränkungen wie einer verminderten Fähigkeit zur Urinkonzentration (Asthenurie) oder einer gestörten Sekretions- und Resorptionssteuerung einher. Letzteres kann das vermehrte Auftreten extrazellulärer Flüssigkeitsansammlungen (pulmonal bis hin zum Beatmungsbedarf), sowie metabolischer Entgleisungen bedingen⁶⁷. Zudem wurde bei Frühgeborenen trotz des nachweislichen postnatalen Fortlaufens der Glomerulusneubildung^{49,68} ein bleibendes numerisches Nephrondefizit festgestellt⁴⁹⁻⁵¹. Für die vorhandenen Filtrationseinheiten wurden zudem eine verminderte Podozytenzahl pro Glomerulus⁶⁹, eine kompensatorisch akzelerierte Reifungstendenz und das vermehrte Auftreten morphologisch auffälliger und vergrößerter Glomeruli beschrieben^{50,68,70-73}. Letzteres wird nach Barry Brenner als Ausdruck einer kompensatorischen Hyperfiltration gewertet^{37,38} (s. u.). Die beschriebenen strukturellen

Auffälligkeiten gehen schon früh mit einer verringerten Filtrationsleistung der Niere einher^{67,74,75}, sodass es vermehrt zu (Mikro-)Albuminurie und Proteinurie kommen kann^{75,76}. Langfristig weisen Frühgeborene somit ein relevant erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer CKD und kardiovaskulärer Begleiterkrankungen auf^{21–23,75,76}.

1.2.2.1 Hyperfiltrationshypothese nach Barry Brenner

Unter Zuhilfenahme der sogenannten Brenner- oder Hyperfiltrations-Hypothese lässt sich die pathophysiologische Entwicklung einer CKD nach Frühgeburtlichkeit nachvollziehen (s. Abb. 5): Barry Brenner postulierte als Erster, dass eine geringe renale Filtrationsoberfläche

(z.B. bei angeborenem Nephrondefizit nach Frühgeburtlichkeit) mit einer erhöhten Natriumretention einhergehe, wodurch das extrazelluläre Volumen (EZV) zunehme. Das infolgedessen steigende Herzzeitvolumen (HZV) resultiere dann in einem Blutdruckanstieg, woraufhin die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) steige. Dies wiederum führe zu einer Mehrbelastung der renalen Filtrationseinheiten und einer reaktiven

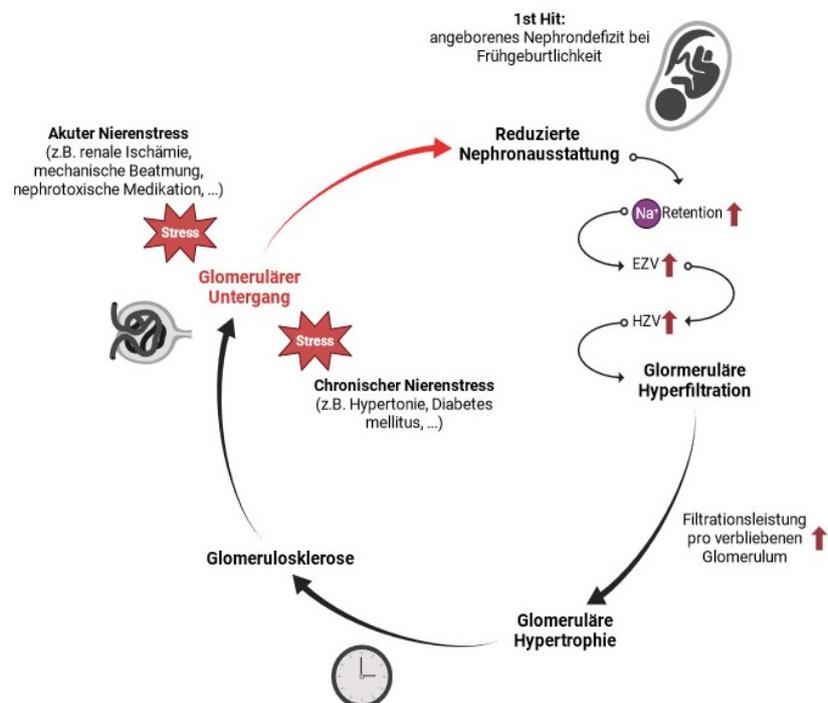


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Hyperfiltrations-Hypothese nach Brenner.

Hypertrophie der glomerulären Strukturen. Langfristig sei dieser Vorgang insofern als maladaptiv einzustufen, als die konstante glomeruläre Hyperfiltration letztlich zu strukturellen Schäden und Glomerulosklerose führe. Durch weiteren Nephronuntergang werde somit ein Teufelskreis begründet^{37,38}. Da verschiedene histomorphometrische Autopsiestudien eine entsprechende inverse Korrelation zwischen Glomerulusanzahl und -volumen bestätigen konnten, ist die Brenner-Hypothese inzwischen weithin anerkannt^{71,73}.

Für die Pathogenese einer chronischen Nierenerkrankung nach Frühgeburtlichkeit kann also von einem *Multiple-Hit-Modell* ausgegangen werden: Die Störung der regelrechten Nephrogenese begünstigt ein angeborenes Nephrondefizit (*First Hit*)^{49,68}. Daraus resultiert eine Hyperfiltration der vorhandenen Filtrationseinheiten. Diese entwickeln bei Frühgeborenen

unter der Mehrbelastung aufgrund ihrer Unreife schneller strukturelle Schäden als bereits ausgereifte Filtrationseinheiten im adulten Gewebe, was wiederum mit frühen funktionellen Einbußen assoziiert sein kann⁷⁷. Darüber hinaus auftretende akute Nierenschädigungen (z. B. beatmungsbedingt, s. u.) können als *Follow Hits* einen weiteren Nephronuntergang provozieren und somit die Auftretenswahrscheinlichkeit eines relevanten Nierenfunktionsverlusts steigern bzw. dessen Progress beschleunigen^{14–16,77–79}.

1.3 Mechanische Beatmung: Pulmorenaler Crosstalk

Für akute Nierenschädigungen gibt es eine Vielzahl an Ursachen, etwa eine renale Ischämie^{80,81}, ein septisches Geschehen^{82,83} oder die Verabreichung nephrotoxischer Medikamente^{84,85}. Auch eine invasive mechanische Beatmung geht nachweislich mit einem erhöhten AKI-Risiko einher^{5–9}. Für die Neonatalperiode geht dieser Zusammenhang besonders eindrücklich aus einer rezenten Publikation von Burgmaier et al. hervor, in der eine fünfmal höhere AKI-Inzidenz unter beatmeten Frühgeborenen im Vergleich zu nicht beatmeten Kontrollen berichtet werden konnte⁵.

Die Notwendigkeit einer mechanischen Beatmung im neonatalen Setting ist häufig auf eine Lungenunreife bei Frühgeburtlichkeit zurückzuführen^{1–4}. Beim sogenannten Atemnotsyndrom des Neugeborenen (engl. *Neonatal Respiratory Distress Syndrome* (nRDS)) liegt pathophysiologisch ein Mangel an Surfactant vor^{61,86,87}. Dieses in den alveolären Typ-II-Epithelzellen gebildete Lipoprotein ist wesentlich für das Herabsetzen der Oberflächenspannung in den Alveolen verantwortlich⁸⁸. Bei einem unzureichenden Vorhandensein von Surfactant kommt es zu alveolärem Kollaps und Atelektasebildung, woraus eine verminderte Gasaustauschfläche und mechanische Schädigung des respiratorischen Epithels resultieren⁸⁹. Die begleitende Entzündungsreaktion führt im Verlauf zu erhöhter alveolärer Gefäßpermeabilität und resultierender Flüssigkeitsansammlung intraalveolär, woraus ein Teufelskreis entstehen kann⁹⁰. Da die Surfactantproduktion (die ab der 22. bis 24. Entwicklungswoche langsam beginnt^{91,92}) erst im späteren Schwangerschaftsverlauf deutlich ansteigt⁹³, korrelieren die Inzidenz des Atemnotsyndroms und das Gestationsalter invers⁹⁴.

Therapeutisch gesehen kommen eine Reihe von Interventionen in Frage, um der resultierenden Hypoxie zu begegnen bzw. vorzubeugen, z. B. eine antenatale mütterliche Kortikosteroidgabe zur Lungenreifeinduktion⁹⁵, oder eine postnatale intratracheale Surfactantadministration⁹⁶. Aus der dennoch häufig bestehenden Indikation für eine invasive mechanische Beatmung ergibt sich ein Dilemma, denn diese lebensrettende Maßnahme kann ihrerseits schwere und langanhaltende Lungenschäden hervorrufen^{2,3}. Unter anderem begünstigt eine mechanische Beatmung die Entwicklung eines chronischen Krankheitsgeschehens, welches schon seit über 50 Jahren als Bronchopulmonale Dysplasie

(BPD) bekannt ist⁹⁷ und mit einem relevanten Risiko für eine chronische Atemwegsobstruktion einhergeht⁸⁹. Die Definition und Pathogenese der BPD haben sich allerdings über die letzten Jahrzehnte deutlich gewandelt (s. Abb. 6): Ursprünglich galten (bei moderat Frühgeborenen) hohe Beatmungsdrücke (Baro-, Volutrauma und Atelektotrauma) und toxische Sauerstoffkonzentrationen als Hauptentstehungsfaktoren der BPD^{97,98}. Die schwere Schädigung des respiratorischen Epithels ging mit bindegewebigen Umbauprozessen einher und resultierte in einem typischen Nebeneinander von überblähten und atelektatischen Lungenabschnitten⁹⁹. Inzwischen werden basierend auf diesen Erkenntnissen zwar bevorzugt lungenschonendere Beatmungsmodi gewählt¹⁰⁰. Dafür ist jedoch das Gestationsalter der betroffenen Neugeborenen im Schnitt deutlich zurückgegangen¹⁰¹, da aufgrund geburtshilflicher und neonatalmedizinischer Fortschritte zunehmend auch extrem Frühgeborene überleben⁶⁰⁻⁶². Die Lungen dieser Kinder befinden sich bei Geburt in einem entsprechend unreifen Entwicklungsstadium¹⁰² – die frühzeitige Transition von intra- nach extrauterin resultiert in einem Arrest der physiologischen Organentwicklung mit Unterbrechung der regelrechten Alveolarisierung^{103,104}. Für diese „neue BPD“ ist eine mechanische Beatmung also nicht länger Hauptentstehungsfaktor¹⁰⁴. Da sie jedoch maladaptive Entzündungsprozesse im Lungengewebe befeuert, die die Alveolarisierung zusätzlich stören, spielt die invasive Beatmung auch weiterhin eine pathogenetische Rolle¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

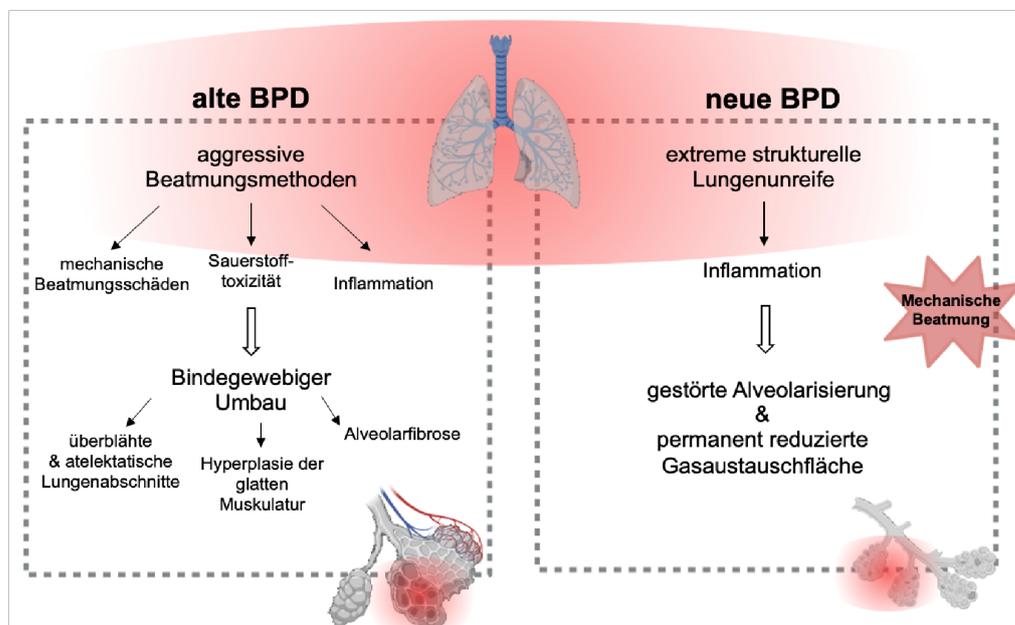


Abbildung 6: Schematische Gegenüberstellung der ursprünglichen und aktuellen Pathogenese der Bronchopulmonalen Dysplasie. Dargestellt sind die Hauptentstehungsfaktoren der „alten“ (links) und „neuen“ BPD (rechts). Erstere umfassen hohe Beatmungs- und Sauerstoffpartialdrücke, wie sie früher bei moderat Frühgeborenen angewendet wurden^{97,98}. Daraus resultierte ein typischer bindegewebiger Umbau des Lungengewebes⁹⁹. Die „neue BPD“ betrifft im Gegensatz dazu vor allem extrem Frühgeborene, deren strukturelle Lungenunreife postnatal zu einer gestörten Alveolarisierung mit daraufhin permanent reduzierter Gasaustauschfläche führt^{103,104}. Eine mechanische Beatmung spielt insofern weiterhin eine pathogenetische Rolle, als die einhergehende pulmonale Entzündungsreaktion die strukturellen Ausreifungsprozesse zusätzlich stört¹⁰⁵⁻¹⁰⁸.

Darauf, dass eine mechanische Beatmung nicht nur pulmonale Schäden verursacht, sondern u. a. auch mit einem erhöhten Risiko für eine akute Nierenschädigung einhergeht, ist bereits hingewiesen worden⁵⁻⁹. Dabei ist ein Wechselspiel von Lunge und Niere bedeutsam, welches auch als pulmorenaler *Crosstalk* bezeichnet werden kann. Diese Organinteraktion äußert sich beispielsweise darin, dass ein *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) mit der Entstehung einer *Acute Kidney Injury* assoziiert ist und umgekehrt^{109,110}. In der Entstehung eines ARDS-induzierten Nierenschadens spielen verschiedene Faktoren eine Rolle: Sowohl eine respiratorische Azidose^{111,112}, als auch Blutgasstörungen (Hypoxie und Hyperkapnie wirken dabei synergistisch) können etwa über verschiedene Mechanismen eine verminderte Nierendurchblutung mit GFR-Abnahme bedingen^{113,114}.

Eine invasive Beatmung trägt ihrerseits durch die veränderten intrathorakalen Druckverhältnisse zur Entstehung einer renalen Minderperfusion bei, denn die Kompression der Lungengefäße kann den Blutstrom zum rechten Herzen einschränken und eine systemische Hypotonie zur Folge haben^{115,116}. Verschärft wird dieser Effekt noch durch die resultierende Steigerung des Sympathikotonus mit konsequenter Abnahme der GFR¹¹⁷⁻¹¹⁹. Darüber hinaus wird eine

von der beatmeten Lunge ausgehende systemische Entzündungsreaktion angenommen, die auf das Nierengewebe übergreifen und lokale Schäden verursachen kann. Diese Überlegung kam erstmals Ende der 1990er Jahre auf und wird unter dem Begriff der Biotrauma-Hypothese zusammengefasst¹²⁰⁻¹²². Da ein ventilationsgetriggelter Anstieg proinflammatorischer Signalstoffe inner- und außerhalb der Lunge seither vielfach bestätigt werden konnte, hat sich diese Annahme in Forschung und Klinik inzwischen etabliert¹²³⁻¹²⁸. Zu den Mediatoren, deren vermehrte systemische Zirkulation unter Beatmung für die Entstehung eines akuten

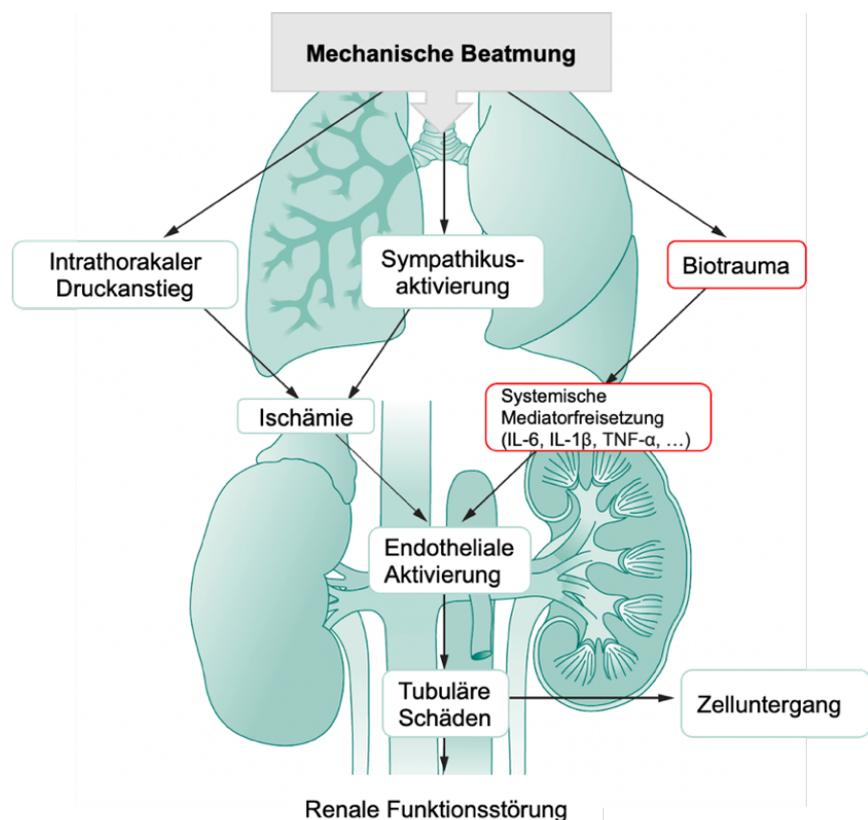


Abbildung 7: Bekannte Pathomechanismen der beatmungsbedingten Nierenschädigung. [Modifiziert nach Kuiper et al. (2019)¹¹⁰, Ab bildungsgenehmigung erteilt durch Elsevier].

Nierenschadens verantwortlich gemacht werden, zählen demnach u. a. IL-1 β , TNF- α und IL-6¹²⁹. Abbildung 7 zeigt die aktuell diskutierten Pathomechanismen der sogenannten *Ventilation-Induced Kidney Injury* (VIKI) unter Berücksichtigung des pulmorenalen *Crosstalks*.

1.4 Interleukin-6 (IL-6)

Während die Rolle des Zytokins IL-6 in der Vermittlung pulmonaler Beatmungsschäden bereits intensiv beforscht wurde^{126,130–132}, gibt es bezüglich seiner ventilationsbedingten Expression im Nierengewebe selbst kaum Daten¹³³. Vor allem gibt es unserem Kenntnisstand nach noch keine Publikation, anhand derer eine explizite Aussage bezüglich der kurz- oder langfristigen renalen Folgen einer früh postnatal beatmungstriggerten lokalen Aktivierung des IL-6-Signalwegs möglich wäre. Da im Rahmen des vorliegenden Projekts unter anderem der renale Effekt eines IL-6-Knockouts unter mechanischer Beatmung erforscht wurde, soll nun noch kurz auf die allgemeinen Wirkmechanismen von IL-6, seinen Signalweg und seine Rolle im Kontext verschiedener nephrologischer Erkrankungen eingegangen werden.

1.4.1 Interleukin-6: Funktionen und Signalvermittlung

Interleukin-6 erhielt nach seiner Entdeckung zunächst die Bezeichnung „B-Zell stimulierender Faktor 2“ (BSF-2)^{134,135}. Rasch wurde jedoch erkannt, dass sein Wirkspektrum deutlich über eine reine B-Zell-Stimulation hinausgeht, was zu der Namensänderung führte¹³⁶. Zu den immunologischen Funktionen des Zytokins werden inzwischen die Rekrutierung verschiedener Klassen von Immunzellen in entzündete Gewebeanteile^{137,138} sowie die Förderung der Differenzierung von Monozyten hin zu Makrophagen gezählt¹³⁹. Zudem hat es eine wichtige Rolle bezüglich der B-^{134,140}, aber auch T-Zell-Differenzierung inne^{141,142} und initiiert die hepatische Bildung von Akute-Phase-Proteinen^{143,144}. Damit gilt IL-6 grundsätzlich als proinflammatorisches Signalmolekül, dessen gezielte Inhibition bereits seit Jahren therapeutische Anwendung in der Behandlung verschiedener chronisch-entzündlicher (Autoimmun-)Erkrankungen findet¹⁴⁵. Gleichzeitig sind inzwischen allerdings auch entzündungshemmende und regenerative Eigenschaften des Zytokins bekannt^{146–148}.

Eine zelluläre Stimulation durch IL-6 kann grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen (s. Abbildung 8). Ein Teil der Körperzellen besitzt einen membranständigen IL-6-Rezeptor, an den das Zytokin direkt binden kann, was als klassischer IL-6-Signalweg bezeichnet wird¹⁴⁹. Darüber hinaus kann das Zytokin auch an einen im Plasma vorliegenden IL-6-Rezeptor ohne Transmembrandomäne (dieser wird als *soluble* IL-6-Rezeptor (sIL-6-R) bezeichnet^{134,150}) binden und so auch in Zellen ohne primären IL-6-Rezeptor eine Signalkaskade initiieren. In diesem Fall spricht man vom Trans-Signalweg¹⁵¹. In der Niere weisen zum Beispiel nur die Podozyten einen membranständigen IL-6-Rezeptor auf¹⁵², in allen

anderen renalen Zelltypen kann ein IL-6-Effekt entsprechend nur über den Trans-Signalweg erzielt werden^{146,153}. Abbildung 8 fasst den geschilderten Ablauf des IL-6/JAK/STAT-Signalwegs schematisch zusammen:

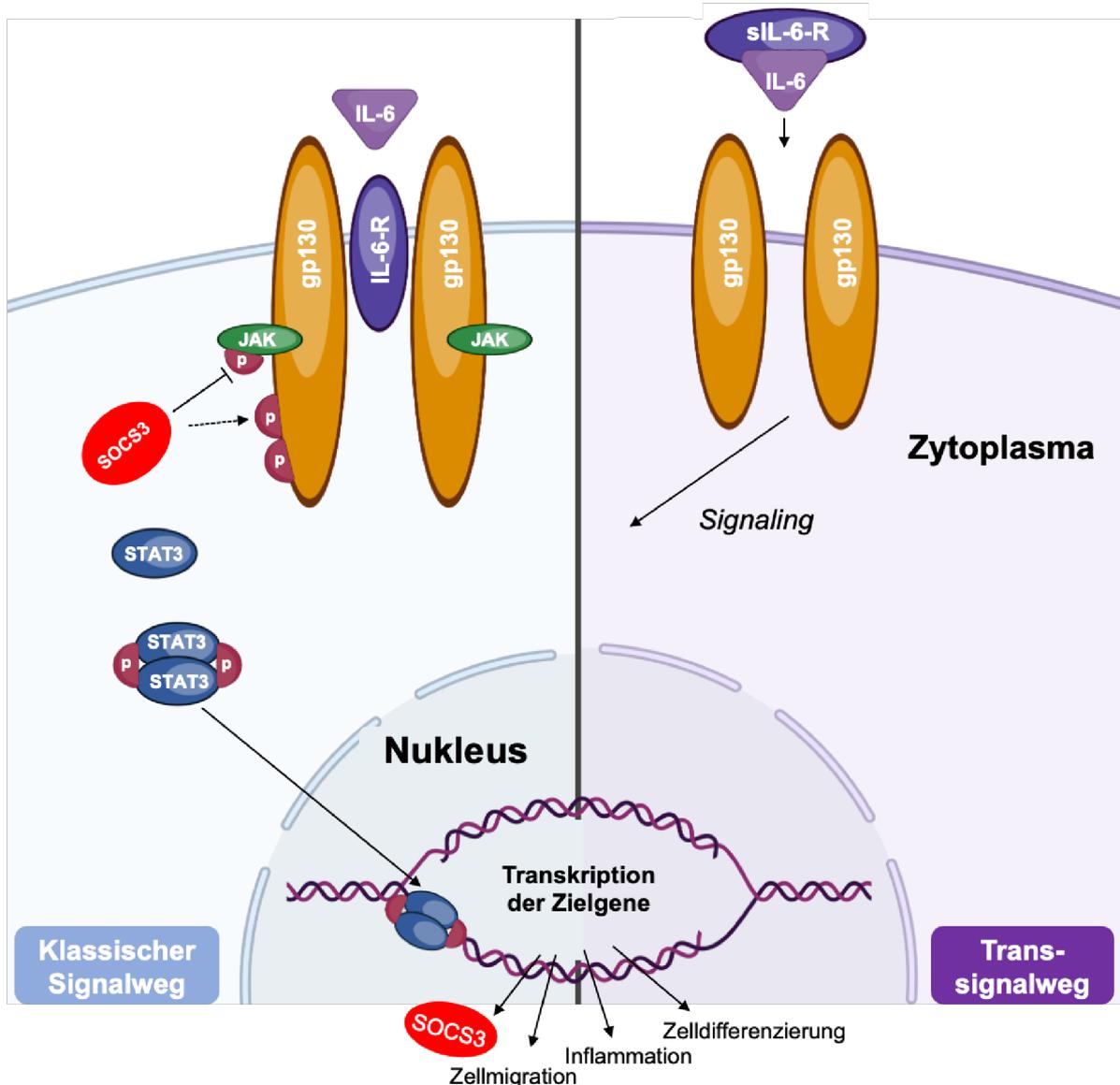


Abbildung 8: Schematische Darstellung des IL-6/JAK/STAT Signalwegs. Zunächst bindet IL-6 an einen spezifischen IL-6-Rezeptor (IL-6-R)¹⁵⁴. Der entstandene Komplex bindet dann an das ubiquitär exprimierte Glykoprotein 130 (gp130)^{155,156}. Dieses dimerisiert und leitet das Signal nach intrazellulär weiter¹⁵⁷. Die luminal angelagerte Janus-Kinase 1 (JAK1) phosphoryliert daraufhin intrazelluläre Tyrosinreste des gp130 und rekrutiert damit den Signaltransduktor und Aktivator der Transkription 3 (STAT3), um auch diesen zu phosphorylieren^{158–161}. Phosphoryliertes (aktiviertes) STAT3 durchläuft dann ebenfalls eine Dimerisierung und kann anschließend in den Zellkern translozieren, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Zielgene veranlasst^{162,163}. Eines dieser Zielgene ist das *Suppressor of Cytokine Signalling 3* (*Socs3*)-Gen. SOCS3 fördert den Abbau der Janus-Kinase, wodurch ein negativer Feedbackmechanismus gewährleistet ist¹⁶⁴. Über die Bindung an einen IL-6-Rezeptor ohne Transmembrandomäne (*soluble* IL-6-Rezeptor (sIL-6-R))^{134,150}, kann IL-6 auch Zellen ohne membranständigen IL-6-Rezeptor stimulieren, was als Trans-Signalgebung bezeichnet wird¹⁵¹. [Modifiziert nach Camporeale und Poli (2012)¹⁴⁹, Abbildungsgenehmigung durch Urheberin erteilt].

1.4.2 Die Rolle von Interleukin-6 im Kontext renaler Erkrankungen

Als primär proinflammatorisches Signalmolekül spielt IL-6 im Rahmen verschiedener entzündlicher Nierenerkrankungen eine vorantreibende Rolle (z. B. bei renaler Beteiligung eines systemischen Lupus erythematodes¹⁶⁵ oder diabetischer Nephropathie¹⁶⁶). Im Kontext akut nierenschädigender Ereignisse kann die IL-6-Plasmakonzentration zudem als frühzeitiger Prädiktor für die primäre Entstehungswahrscheinlichkeit und den voraussichtlichen Schweregrad einer AKI herangezogen werden¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Dies gilt auch für Patienten mit akutem Atemnotsyndrom¹⁷⁰, was auf eine Rolle von IL-6 im pulmorenalen *Crosstalk* hinweist. Deutlich wird dies auch durch die bisherigen Forschungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt werden konnte, dass IL-6 nach Exposition gegenüber erhöhten Sauerstoffkonzentrationen nicht nur als ein Schlüsselmediator für eine pulmonale, sondern auch für die konsekutive renale Schadensinduktion fungiert^{10,171}. Neben der Vermittlung akuter Schädigungsmechanismen wird dem Zytokin zudem eine Rolle im Chronifizierungsprozess renaler Erkrankungen zugeschrieben, da es u. a. bindegewebige Umbauprozesse im Nierengewebe anstößt^{10,172-174}.

Letzteres bestätigte sich auch in dem bereits erwähnten Vorgängerprojekt der Arbeitsgruppe Alcázar¹⁰, in dem der renale Effekt einer postnatalen Sauerstoffexposition (ohne invasive Beatmung) untersucht wurde: Dazu wurden neugeborene Wildtyp-Mäuse postnatal in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Interventionsgruppe exponierte man anschließend über einen Zeitraum von vier Wochen gegenüber einer Inspirationsluft mit 85 % Sauerstoffanteil, während die Kontrollgruppe normaler Raumluft (21 % O₂) ausgesetzt war. Anschließend wurden die Gruppen erneut geteilt: Die erste Hälfte der Versuchstiere wurde unmittelbar nach Beendigung der Sauerstoff- bzw. Raumluftexposition am postnatalen Tag 28 (P28) zur Entnahme der Nieren geopfert; die zweite Hälfte wurde erst nach einer Erholungsphase in Raumluft an P70 untersucht. So konnten eine akute und eine chronische renale Schädigungsphase identifiziert werden. Erstere zeichnete sich durch eine IL-6-vermittelte lokale Inflammation mit Aktivierung profibrotischer Signalwege aus. Dies resultierte trotz Beendigung der Exposition zum späteren Untersuchungszeitpunkt in einer irreversiblen glomerulären Schädigung mit einhergehender hyperfiltrationsbedingter Hypertrophie und insgesamt verminderter Filtrationsleistung. Durch die parallele Untersuchung genetisch modifizierter *Il6*-Knockout-Mäuse konnte zu beiden Untersuchungszeitpunkten ein (sowohl strukturell als auch funktionell) protektiver Effekt einer *Il6*-Defizienz festgestellt werden¹⁰.

Da die klinische Versorgung Frühgeborener häufig nicht nur eine isolierte Sauerstoffzufuhr, sondern auch eine (zusätzliche) Unterstützung der Atemmechanik durch invasive Beatmaßmaßnahmen beinhaltet¹⁻⁴, schließt meine Forschungsarbeit an das besagte Projekt an, um das renale Schädigungsmuster unter mechanischer Raumluftbeatmung mit dem unter

Hyperoxie vergleichen und Rückschlüsse über mögliche pathomechanische Parallelen und potenzielle gemeinsame therapeutische Angriffspunkte ziehen zu können.

1.5 Fragestellungen und Arbeitshypothese

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass beatmete Frühgeborene ein hohes AKI-Risiko aufweisen^{5,7}, was unter anderem auf eine von der Lunge auf die Niere übergreifende Entzündungsreaktion zurückgeführt werden kann¹⁷⁵. Das Zytokin IL-6 spielt nachweislich eine entscheidende Rolle in der Entstehung der pulmonalen Inflammation nach mechanischer Beatmung und / oder toxischer Sauerstoffexposition^{126,171}, und wurde auch im Kontext akuter und chronischer Nierenpathologien als treibender Faktor identifiziert^{10,167–170,172–174}.

Auf dieser Grundlage ergab sich die Frage, ob IL-6 eine zentrale Rolle in der Vermittlung eines akuten Nierenschadens unter postnataler normoxischer Beatmung einnimmt, und inwiefern sich ein *Il6*-Knockout diesbezüglich als protektiv erweisen würde. Die dem hier erörterten Forschungsprojekt zugrundeliegende Arbeitshypothese lautete daher:

„Eine postnatale normoxische Beatmung initiiert eine IL-6-vermittelte renale Entzündungsreaktion und wirkt sich somit potenziell schädlich auf die langfristige strukturelle und funktionelle Nierenentwicklung aus. Ein *Il6*-Knockout ist in diesem Kontext folglich renoprotektiv.“

Entsprechend wurden konkret folgende Fragestellungen definiert:

- I. Verursacht eine frühe postnatale Raumlufbeatmung eine Entzündungsreaktion im neonatalen Nierengewebe und kann diesbezüglich ein (protektiver) Effekt des *Il6*-Knockouts festgestellt werden?
- II. Führt eine frühe postnatale Raumlufbeatmung zu einer Störung der zellulären Homöostase im neonatalen Nierengewebe und kann diesbezüglich ein (protektiver) Effekt des *Il6*-Knockouts festgestellt werden?
- III. Können nach früher postnataler Raumlufbeatmung akute strukturelle Auffälligkeiten im neonatalen Nierengewebe bzw. ein diesbezüglich (protektiver) Effekt des *Il6*-Knockouts festgestellt werden?
- IV. Zeigen sich bereits unmittelbar nach Beendigung der postnatalen Raumlufbeatmung Anzeichen für einen programmierenden Effekt auf die langfristige Nierengesundheit und kann diesbezüglich ein (protektiver) Effekt des *Il6*-Knockouts festgestellt werden?

Bevor die von uns erzielten Forschungsergebnisse dargelegt und im Kontext der aktuellen Datenlage bewertet werden, folgt zunächst die Beschreibung der angewandten Untersuchungsmethoden und aller dazu genutzten Materialien.

2. Material und Methoden

Alle hier aufgelisteten Materialien und beschriebenen Methoden sind in vorausgegangenen Projekten durch Mitglieder der Arbeitsgruppe Alcázar erprobt und etabliert. Ebenso die zugrundeliegenden, standardisierten Vorgehensprotokolle.

2.1 Tierexperimentelles Design

Mein Projekt basiert auf einem tierexperimentellen Design. Alle Tierversuche wurden gemäß den Vorlagen des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) vorgenommen, eine entsprechende Genehmigung lag vor (Aktenzeichen 2015.A122 und 81-02.04.2020.A239). Das im Folgenden beschriebene Prozedere ist nicht von mir selbst, sondern von Universitätsprofessor Dr. med. Dr. nat. med. Miguel A. Alejandre Alcázar und Mitarbeitern seines Teams ausgeführt worden und an anderer Stelle bereits vorbeschrieben¹⁷⁶. Hier soll es für ein besseres Gesamtverständnis kurz umrissen werden (s. Abb. 9).

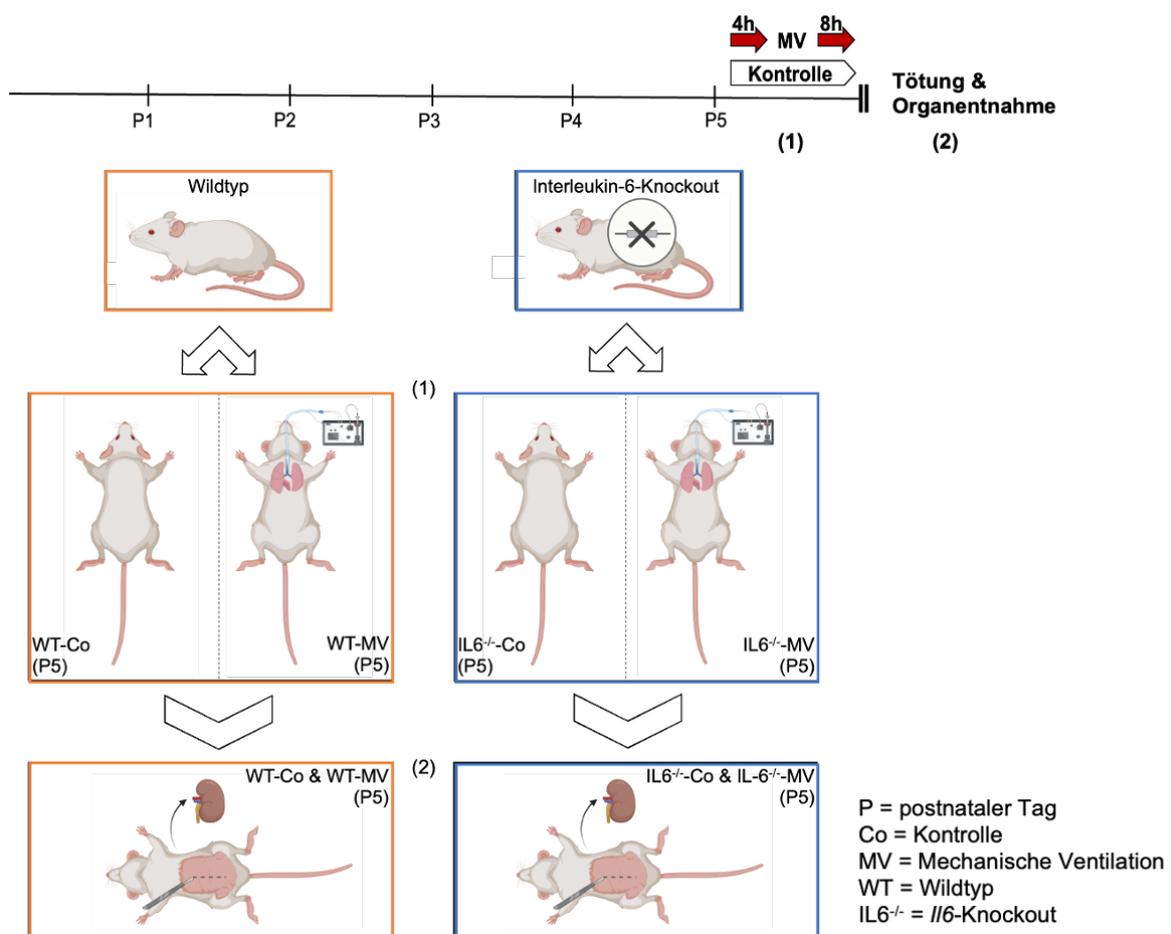


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Tierversuchsaufbaus. Für das vorliegende Projekt wurden Wildtyp-Mäuse und //6-Knockout-Mäuse jeweils in eine Kontroll- und eine Beatmungsgruppe eingeteilt, sodass letztlich vier Subgruppen untersucht wurden: WT-Co, WT-MV, IL6^{-/-}-Co und IL6^{-/-}-MV. Die mechanische Beatmung (MV) erfolgte am fünften postnatalen Tag (P5) über vier bzw. acht Stunden mit Raumluft, die Kontrolltiere atmeten während dieser Zeit weiter spontan. Anschließend wurden die Tiere euthanasiert und ihre Nieren entnommen.

Wildtyp- (Typ C57BL/6N, Charles River Laboratories International¹⁰⁻¹², n = 28) und genetisch modifizierte //6-Knockout-Mäuse (Typ B6.129S2IL-6^{tm1Kopf}/J, The Jackson Laboratory^{10,13}, n = 30) aus drei bis sechs Würfen wurden postnatal nach dem Zufallsprinzip jeweils in Kontroll- und Interventionsgruppe eingeteilt. Die Gegenüberstellung von genetisch unmodifizierten und //6-Knockout-Gruppen diente dabei der Klärung des mechanistischen Stellenwerts des Zytokins in diesem Kontext, bzw. der Beurteilung eines potenziellen therapeutischen Benefits einer IL-6-Blockade.

Die Tiere wurden in feuchtigkeits- und temperaturkontrollierten (22 ± 2 °C) Käfigen mit zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Am fünften postnatalen Tag (P5) wurden die Mäuse aus den Interventionsgruppen unter Narkose (per gewichtsadaptierter subkutaner Injektion von Ketamin (~60 µg/g) und Xylazin (~12 µg/g)) tracheotomiert, intubiert und an einen Mikroventilator (MicroVent 848, Harvard Apparatus, Holliston, MA) angeschlossen. Darüber erfolgte eine kontinuierliche Beatmung (mit initialen Tidalvolumina von 9 – 10 µl/g KG und sukzessiver Anpassung auf durchschnittlich 7 – 8 µl/g KG) mit erwärmter und angefeuchteter Raumluft (21 % Sauerstoff). Die Beatmungsdauer betrug vier bzw. acht Stunden. Dabei lag der Fokus meiner Untersuchungen auf dem renalen Einfluss der achtstündigen Beatmung. Es wird im Folgenden jedoch auch auf arbeitsgruppeninterne Untersuchungsdaten verwiesen werden, die nach nur vierstündiger Intervention erhoben wurden. Die Kontrolltiere erhielten derweil unter Narkose eine oberflächliche Sham-Inzision in der Nackenregion und atmeten während der Versuchszeit spontan.

Abschließend wurden alle Tiere in tiefer Narkose durch Eröffnung der Aorta abdominalis und konsekutives Ausbluten getötet, woraufhin die Nieren *en bloc* entnommen werden konnten. Die jeweils linke Niere wurde längs halbiert und für spätere histologische Untersuchungen einer vierprozentigen Paraformaldehyd (PFA)-Fixierung zugeführt. Daraufhin konnten die Organhälften nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe in Paraffin eingebettet werden (s. Abschnitt 2.3.1). Die rechten Nieren wurden indes für weitere Verfahren (RNA- und Proteinisolation) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C gelagert (s. Abschnitte 2.3.2 und 2.3.3).

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Artikelnummer	Hersteller
2-Mercaptoethanol	#4227.3	Roth
2-Propanol (>99,8 %)	#6752.4	Roth
3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	#220201	Calbiochem
Acrylamide Mix Gel 30 (Rotiphorese)	#3029.1	Roth
Albumin Fraktion V (BSA)	#8076.3	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	#A1142	AppliChem
Bromphenolblau Natrium-Salz	#A512.1	Roth
Chloroform (>99 %)	#3313.2	Roth
Destilliertes Wasser (Aqua destillata (A. d.))		Merck (Elix® Essential Wasseraufbereitungssystem)
Diethyldicarbonat (DEPC)	#1609-47-8	Roth
DNase I	#DN-25	Sigma-Aldrich
dNTP Mix (10 mM each)	#R0193	Thermo Fisher Scientific
EDTA stop solution	#A263A	Promega
Ethanol (EtOH) (≥ 99,8 %)	#9065.2	Roth
Ethanol (EtOH) (70 %)	#2202.5000	Chemsolute
Glycerol	#G5516	Sigma-Aldrich
Glycin, Elphograde	#3908.3	Roth
Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Lösung „TriReagent“	#T9424	Sigma-Aldrich
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100X)	#78430	Thermo Fisher Scientific
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	#T865.2	Roth
Methanol	#CP43.3	Roth
Milchpulver, blocking grade	#T145.3	Roth
MMLV reverse transcriptase	#M170A	Promega

MMLV-buffer 5x	#M531A	Promega
Natriumchlorid	#9265.2	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	#0183.3	Roth
Neo-Clear	#CAS 64741-65-7	Merck
Neo-Mount	#1.09016.0100	Merck
Oligo-desoxythymidin-Primer (Oligo-dT-Primer) (5' TTTTTTTTTTTTTTTT3')	#16T	Eurofins/MWG
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 - 180 kDa	#26616	Thermo Fisher Scientific
Perjodsäure	#3257.1	Roth
Platinum qPCR Supermix –UDG with Rox	#11743500	Invitrogen
Platinum qPCR Supermix–UDG w/Rox	#11743500	Invitrogen
Ponceau S (C.I. 27195)	#5938.2	Roth
Random-Primer	#11034731001	Roche
Recombinant RnasinI RNase Inhibitor	#N2511	Promega
RQ1 DNase 10X Reaction Buffer	#M198A	Promega
RQ1 RNase-Free DNase	#M610A	Promega
Schiffsreagenz	#X900.1	Roth
SYBR Supermix	#A6002	Promega
TEMED	#2367.3	Roth
TRI Reagent	#T9424	Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure	#8789.1	Roth
Tris PUFFERAN > 99,9 %	#4855.3	Roth
Tween 20 / Polyethylensorbitmonolaurate	#P1379	Sigma-Aldrich

2.2.2 Puffer und Lösungen

Standardmedium: Destilliertes Wasser

Puffer / Lösung	Komponenten	Konzentration
APS	Ammoniumpersulfat	10 % (m/v)
Blocking-Solution (Medium: TBST)	Milchpulver	5 % (m/v)
	Bovines Serumalbumin	2 % (m/v)
BSA (Medium: TBST)	Bovines Serumalbumin	5 % (m/v)
DEPC-behandeltes Wasser	DEPC	1 % (v/v)
HALT-Puffer	1M TRIS (pH 7,5)	5 % (v/v)
	CHAPS	20 mM
	Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch)	1 % (v/v)
Lämmli-Puffer 10x	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	250 mM
	Glycin	1920 mM
	10 % SDS	5 % (m/v)
Milch (Medium: TBST)	Milchpulver	5 % (m/v)
Ponceau Färbelösung	Ponceau S	0,2 % (w/v)
	Trichloressigsäure	3 % (v/v)
Probenpuffer 5x		0,5 M
	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	20,6 % (v/v)
	10 % SDS	0,0026 % (v/v)
	Bromphenolblau Glycerin β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
		25 % (v/v)
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	0,5 M
SDS	Natriumdodecylsulfat	10 % (m/v)
Stripping-Puffer (pH 6,7)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	50 mM
	Natriumdodecylsulfat	2 % (m/v)
	2-Mercaptoethanol (Zugabe unmittelbar vor Gebrauch)	0,7 %
Towbin-Puffer 10x	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	250 mM
	Glycin	1920 mM

Transferpuffer für Semi-DryBlotting	Towbin-Puffer 10 %	10 % (m/v)
	Methanol	10 % (m/v)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	1,5M
Tris-buffered saline with Tween20 (TBST) (pH 7,5)	Natriumchlorid	100 mM
	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	10 mM
	Tween20 Polyethylensorbitmonolaurate	0,1 % (v/v)

2.2.3 Kits

Kit	Hersteller	Artikelnummer
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare	#RPN2232
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.	#23225

2.2.4 Gele für Western-Blot-Verfahren

Gel	Reagenz	Konzentration	Volumen [ml] für ein großes Gel
Sammelgel 4 %	A. dest.	68 % (v/v)	5,44
	30 % Acrylamidmix	17 % (v/v)	1,36
	Sammelgelpuffer	13 % (v/v)	1,04
	10 % APS	1 % (v/v)	0,08
	10 % APS	1 % (v/v)	0,08
	TEMED	0,1 % (v/v)	0,008

Gel	Reagenz	Konzentration	Volumen [ml] für ein großes Gel
Trenngel 10 %	A. dest.	40 % (v/v)	10
	30 % Acrylamidmix	33 % (v/v)	8,25
	Trenngelpuffer	25 % (v/v)	6,25
	10 % SDS	1 % (v/v)	0,25
	10 % APS	1 % (v/v)	0,25
	TEMED	0,04 % (v/v)	0,01

2.2.5 Antikörper für Western-Blot-Verfahren

	Antikörper	Masse	Hersteller		Verdünnung	Medium
I.	β -ACTIN	45 kDa	Cell Signaling Inc.	#3700	1 : 5000	5 % Milch / TBST
II.	Anti-Mouse		Cell Signaling Inc.	#7076	1 : 10.000	5 % Milch / TBST
I.	NF- κ B p65	65 kDa	Cell Signaling Inc.	#8242	1 : 1000	5 % Milch / TBST
II.	Anti-Rabbit		Cell Signaling Inc.	#7074	1 : 1000	5 % Milch / TBST
I.	PCNA	36 kDa	Dako Denmark A/S	#M0879	1 : 10.000	5 % Milch / TBST
II.	Anti-Mouse		Cell Signaling Inc.	#7076	1 : 10.000	5 % Milch / TBST
I.	pSTAT3	79,86 kDa	Cell Signaling Inc.	#9145	1 : 1000	5 % BSA / TBST
II.	Anti-Rabbit		Cell Signaling Inc.	#7074	1 : 1000	5 % Milch / TBST
I.	STAT3	79,86 kDa	Cell Signaling Inc.	#9139	1 : 3000	5 % Milch / TBST
II.	Anti-Mouse		Cell Signaling Inc.	#7076	1 : 3000	5 % Milch / TBST

2.2.6 Primer für qRT-PCR

2.2.6.1 Primer für TaqMan-qRT-PCR

Primer	Forward (5')	Reverse (3')	Probe (5'-FAM-Sequenz-TAMR-3')
<i>Actb</i>	TGACAGGATGCAGAAG GAGATTACT	GCCACCGATCCACACA GAGT	ATCAAGATCATTGCTCCTCC TGAGCGC
<i>Ctgf</i>	CATTAAGAAGGGCAAAA AGTGCAAT	TGCAGCCAGAAAGCTCA AACT	CGGACACCTAAAATCGCCAA GCCTG
<i>Il1b</i>	TGACAGTGATGAGAATG ACCTGTTC	GGACAGCCCAGGTCAA AGG	ACCCCAAAAGATGAAGGGC TGCTTCC
<i>Il6</i>	ACAAGTCGGAGGCTTA ATTACACAT	AATCAGAATTGCCATTG CACAA	TCTTTTCTCATTTCACGATT TCCCAGAGAA
<i>Irak1</i>	TAGCTTGCTGCTGCATG CA	CCTGCCTGAAGCCCTTC TAGT	AGAGGCCCCCATGACCCA GGTATAC
<i>Irak4</i>	CAGCGACAACCTGTGC TTAGTG	CATCCAGGCAGGACAG TCTGT	ACATGCCCAACGGGTCTT GCTG
<i>Mcp1</i>	GGCTCAGCCAGATGCA GTTAAC	CTTGGTGACAAAATA CAGCTTCTT	CCCCACTCACCTGCTGCTAC TCATTCA
<i>Myd88</i>	TGGCCATCTGCCTAGTA AAGCT	CAGTAGCAGATAAAGGC ATCGAAAA	TTGATGACCCCTAGGACAA ACGCC

<i>Pdcd</i>	TCCGACTGGGACATCT GCTT	CGGAGATCAACCTTGTG ATAGGT	AGGTCCTGGCCTGTTCTTTT TTTTACCCTG
<i>Pdpm</i>	GTGCTACTGGAGGGCT TAATGAA	TTCCTCTAAGGGAGGCT TCGT	CTACTGGCAAGGCACCTCT GGTACCAAC
<i>Ppargc1a</i>	TCGAAAAAGAAGTCCCA TACACAA	TTCCACACTTAAGGTTC GCTCAATA	CACCAAATGACCCCAAGGG TTCCC
<i>18S</i>	AGATCCCAGACTGGTTC CTG	TTGTTGTCTAGACCGTT GGC	CAGAACCTGGCTGTACTTCC CATCC
<i>Serpine1</i>	GCTGGCTATGCTGCAG ATGAC	TGCCCTTCTCATTGACT TTGAA	AAAACCCGGCGGCAGATCC A
<i>Sirt1</i>	GGCTTGAGGGTAATCA ATACCTGTT	GCATGTGCCACTGTCAC TGTT	ATGACGTCTTGTCTCTAGT TCCTGTGGCA
<i>Sypno</i>	GCTGTACCAGTCTGCTT GCAAT	CCCAAGGTGTCGGTCT CTTG	ACTCCAGCAAACCAACCTTC GAGCTG
<i>Sod1</i>	GTACCAGTGCAGGACC TCATTTTA	GTCTCCAACATGCCTCT CTTCAT	CTCACTCTAAGAAACATGGT GGCCCGG
<i>Socs3</i>	CCACCCTCCAGCATCTT TGT	TCCAGGAACTCCCGAAT GG	ACTGTCAACGGCCACCTGG ACTCCT
<i>Tnfa</i>	GGCTGCCCCGACTACG T	GACTTTCTCCTGGTATG AGATAGCAA	CCTCACCCACACCGTCAGC CG
<i>Traf6</i>	ATCTCGAGGATCATCAA GTACATTGT	TGTGTGTATTAACCTGG CACTTCTG	TTGTCCCCAGTGCCAACGTC CTTT

2.2.6.2 Primer für SYBR-Green-I-qRT-PCR

Primer	Forward (5')	Reverse (3')
<i>E2f1</i>	CATCAGTACCTCGCTGGTAGCA	TGAGGTTTCATAGCGTGACTIONCTC
<i>Cdkn1a</i>	GAACATCTCAGGGCCGAAAA	CGTGGGCACTTCAGGGTTT
<i>Tnfa</i>	AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG	GCTTGCTCACTCGAATTTTGAGAAG

2.2.7 Verbrauchsmaterial

Material	Artikelname & -nummer	Hersteller
96-Mikrotiterplatte	96 MicroWell™ Plates Non-treated - Pinchbar Design (#269620)	Thermo Scientific
Deckgläser	20x20 mm Thickness No. 1 (#631-0122)	VWR International

Deckgläser	#631-1573	VWR International
Einschweißfolie Clear Seal	#4ti-0541	4titude
Einweg-Pistill	Pestles for Round-Bottom micro tube (#173-02Y)	WATSON Bio Lab
Filterpapier	Rotilabo Faltenfilter Typ 113b (#CA 13.1)	Roth
Frischhaltefolie	CLING-FLIM (#1255.1)	Roth
Glasbehältnis	Borosilicate 3.3. 500ml (#215-1594)	VWR International
Glasbehältnis	Borosilicate 3.3. 1000ml (#215-1595)	VWR International
Kapillarspitzen	Kapillarspitzen 200 µl (#729011)	Biozym Scientific
Kosmetiktuch	Dissolve Tech	Papernet, Sofidel S.p.A.
Kühlbox		Schaumaplast GmbH & Co. KG
Mehrkanalpipette	Reasearch plus 30-300 µl 8-Kanal (#237380Z)	Eppendorf
Mikrotomklingen	Microtome Blades R35 Stainless Steel (#02.075.00.005)	FEATHER Safety Razor Co.
Nitrozellulose-Membran	Nitrocellulose Blotting Mambrane Protran 0,45 µm NC (#10600002)	GE Healthcare UK
Objektträger	Superfrost Plus Menzel-Gläser Thermo scientific 25x75x1mm (#J1800AMNZ)	Menzel Gläser
Pasteurpipette	Transferpipette 3,5 ml (#86.1171)	Sarstedt
Pinsel	Nova Synthetics	da Vinci Künstlerpinselfabrik DETEF GmbH
Pinsel	Fino 2/0, Fino 0 (#01910 000 200, 0190 00 000)	Marabu GmbH & Co. KG
Pinzette	Deckglaspinzette, gebogen (#232-0111)	Sigma-Aldrich
Pipette	Reference 0,1-2,5 µl (#142946Z)	Eppendorf
Pipette	Research 100-1000 µl (#264172)	Eppendorf
Pipette	Reference 2-20 µl (#264812)	Eppendorf
Pipette	Research plus 10-100 µl (#278075A)	Eppendorf

Pipette (Serologisch, 10 ml)	#86.1254.001	Sarstedt
Pipette (Serologisch, 25 ml)	#86.1685.001	Sarstedt
Pipette (Serologisch, 5 ml)	#86.1253.001	Sarstedt
Pipettenspitze	300 µl (#0030 000.897)	Eppendorf
Pipettenspitze	20 µl (#70.1114)	Sarstedt
Pipettenspitze	200 µl (#70.760.012)	Sarstedt
Pipettenspitze	1000 µl (#70.762.010)	Sarstedt
Plastikküvette	Standküvette (#H550.1)	Roth
Präparatebox	Slidebox 100 Place Cork Red Ea (#HS15994C)	Heathrow Scientific
Reagenzreservoir	Reagenzreservoir steril klar 60 ml (#618487)	VWR International
Reagenzgefäß	SafeSeal Reagiergefäß 2 ml (#72.695.500)	Sarstedt
Reagenzgefäß	Reagiergefäß 0,5 ml (#72.699)	Sarstedt
Reagenzgefäß	SafeSeal Reagiergefäß 1,5 ml (#72.706)	Sarstedt
Roller	Soft Rubber	Speedball Art Products
Röhrchen 0,5 ml	#72.699	Saarstedt
SafeSeal Micro tube 2 ml	#72.695.500	Sarstedt
SafeSeal tube 1,5 ml	#72.706	Sarstedt
Schraubröhre	Röhre 50 ml 114x28mm (#62.547.254)	Sarstedt
Schraubröhre	Röhre 15ml 120x17mm Sarstedt (#62.554.502)	
Stabpipette	Serologische Pipette 5ml (#86.1253.011)	Sarstedt
Stabpipette	Serologische Pipette 10ml (#86.1254.011)	Sarstedt
Stabpipette	Serologische Pipette 25ml (#86.1254.011)	Sarstedt
Trockeneis	ICEBITZZZ® Nuggets klein 6,5kg (#633846)	Linde

tube 15 ml, 120 x 17 mm ²	#62.554.502	Sarstedt
tube 50 ml, 114 x 28 mm ²	#62.547.254	Sarstedt
Tupperdose	Toppits Dose	Melitta
Verschlussfolie	Parafilm "M" laboratory film (#H666.1)	Roth
Wägeschale	Wägeschälchen 8,5 x 8,5cm (#1884.1)	Roth
Whatman Gel-Blotting-Papier GB 005 (1,5mm)	#10426994	GE Healthcare
Whatman-Papier	Gel Blotting Paper GB 005	GE Healthcare (#10426994)

2.2.8 Geräte und Ausrüstung

Gerät	Artikelname / -nummer	Hersteller
Abzug	AIRFLOW-CONTROL (#EN 14175)	Caspar & Co Labora
Folienschweißgerät	Folio (#FS 3604)	Severin
Folienschweißgerät	HTA Folieneinschweißgerät (Modell HT121TS)	4titude
Gewebehomogenisator	Sonoplus HD 2070 Ultraschall-Homogenisator	Bandelin
Heizblock	Thermomixer comfort (#5355ZL047891)	Eppendorf
Heizblock	TK23	Hettich
Imager	Molecular Imager ChemiDoc XRS+ Imaging System (#721BR02933)	Bio-Rad Laboratories
Kammer (Blotting)	PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter Sedec M (#700-1220DE)	PEQLAB Biotechnologie
Kammer (Blotting): Gläser (groß)	PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin L	VWR International
Kammer (Blotting): Gläser (klein)	PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin S	VWR International
Kreisschüttler	IKA Vortex 1 V1 S000 (#6156302)	IKA-Werke

Kühlplatte	Leica EG1150 C Kühlplatte	Leica Biosystems
Magnetrührer	Leica Biosystems	Ika
Mikroskop	DIALUX 20 EB (#950 021)	Leica Instruments
Mikroskop	Slidescanner Leica SCN400 (#11045032, 321416)	Leica Microsystems
Mikroskop	Mikroskop BX43	Olympus
Mikrotom	2035 Biocut (#11760239)	Leica Instruments
Netzgerät	Netzgerät EV231	VWR International
PCR-System	7500 Real time PCR System	Applied Biosystems
Pipette (Pasteur)	#LW4694	Alphalaboratories
Pipetten	Eppendorf Research® plus Pipetten (2,5, 10, 20, 100 und 1000 µl)	Eppendorf
Pipettierhilfe	ROTA-Filler 300	Heathrow Scientific
Pipettierhilfe	Pipetus (#9907200)	Hirschmann Laborgeräte
Plattenleser	Infinite M200 Pro Nano (#1010003100)	Tecan
Schüttelplatte	TYP 3005 (#10509211 E)	Gesellschaft für Labortechnik
Schwingmühle	MM400	Retsch
Slide Scanner	Leica SCN400 Slide Scanner	Leica Biosystems
Spectrofotometer	Typ Infinite M200	NanoQuant
Thermocycler	Typ 7500	Applied Biosystem
Transformator (Stromquelle Gelelektrophorese)	Electrophoresis Power Supply EV202 (#106075)	PEQLAB Biotechnologie
Trockenschrank	UM 100 (#901136)	Memmert
Ultraschall-Homogenisator	Sonoplus HD 2070 (#517.00001672.012)	Bandelin Electronic
Vortexer	VTX-3000 L	LMS Laboratory and Medical supplies
Vortexer	MINI-Vortex	Kisker-Biotech

Waage	321 LS Typ 220A	Precisa Gravimetrics
Wärmeschrank	Universalschrank UN30	Memmert
Wasserbad	Tissue Flotation Bath TFB 55 (#901 211 0811)	Medite
Wasserbad	WNB 14	Memmert
Wippe-Schüttler	MR-12	Biosan
Zentrifuge	Micro Centrifuge Model SD (#058367)	Roth
Zentrifuge	5424R	Eppendorf
Zentrifuge	5804R	Eppendorf
Zentrifuge	420R	Hettich
Zentrifuge	Z216 MK	Hermle

2.2.9 Software

Software	Hersteller
Aperio Image Scope (Version: 12.0.1.5030)	Aperio Technologies
Applied Biosystems 7500 Real time PCR Software (Version 2.0.6)	Thermo Fisher Scientific
GraphPad Prism 7 (Version: 7.04)	GraphPad Software
iControl 2.0 (Version: 3.9.1.0)	Tecan Austria GmbH
Image J2	Image J
Image Lab (Version: 5.2.1 build 11)	Bio-Rad Laboratories Inc.
Microsoft Excel 2016 (Version: 16.0.5026.1000)	Microsoft Corporation
Primer Express Software (Version: 3.0.1)	Thermo Fisher Scientific
SCN400 Client (Version: 2.2.0.3789)	Leica Microsystems

2.3 Methoden

2.3.1 Histologische Verfahren

2.3.1.1 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für eine histologische Untersuchung der Mäusenieren wurden mithilfe eines Mikrotoms (Leica RM 2035 BioCut; Leica Biosystems) 3 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese wurden vor Aufziehen auf Adhäsionsobjektträger (25 x 75 x 1 mm) für einige Minuten in ein 40 °C warmes Wasserbad überführt, um eine Ausdehnung der Schnitte zu ermöglichen und somit Stauchungsartefakten vorzubeugen. Die beladenen Objektträger wurden entsprechend beschriftet und für mindestens 12 Stunden bei 36 °C trocknen gelassen.

2.3.1.2 PAS-Färbung

Die Untersuchung struktureller Effekte der Beatmung (und des *Il6*-Knockouts) wurde an PAS-gefärbten Organschnitten vorgenommen. Durch die Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS) werden vor allem kohlenhydrathaltige Gewebestrukturen (z. B. Glykogene oder Basalmembranen) angefärbt. Dabei oxidiert die Perjodsäure freie Hydroxylgruppen zu Aldehydgruppen, an welche dann die schwefelhaltige Fuchsin säure aus dem Schiffs Reagenz binden kann. Dadurch imponiert das Zytoplasma magenta- bis rosafarben. Zur Kontrastierung der Zellkerne erfolgt im Anschluss eine Gegenfärbung mit Hämalaun, wodurch nukleäre Strukturen sich blau, und besonders teilungsaktiven Zellen mit höheren RNA-Konzentrationen sich bläulich darstellen³¹.

Mein Vorgehen orientierte sich an dem aus dem bereits zitierten Vorgängerprojekt von Jasmine Mohr et al.¹⁰. Es wurden von jeweils fünf bis sechs Tieren aus allen vier Gruppen (WT-Co, WT-MV, *IL6*^{-/-}-Co, *IL6*^{-/-}-MV) Paraffinschnitte angefertigt, und für jedes Tier ein repräsentativer Nierenlängsschnitt (also solche, auf denen alle Organregionen erfasst und keine relevanten Schnittartefakte erkennbar waren) für die PAS-Färbung ausgewählt. Diese Schnitte wurden dann im ersten Schritt entparaffiniert, indem sie je drei Mal für fünf Minuten im Lösungsmittel Neo-Clear inkubiert wurden. Danach wurden sie durch das Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 80 %, 70 % Ethanol für je eine Minute) in wässrige Lösung gebracht und anschließend eine Minute lang in destilliertem Wasser (A. d.) gewaschen. Daraufhin erfolgte eine zehnmünütige Inkubation mit frisch angesetzter Perjodsäure (1 %). Dem schlossen sich mehrere Waschgänge an (zwei Mal fünf Minuten in Leitungswasser, danach zwei Mal zwei Minuten in A. d.), woraufhin die Schnitte wiederum 15 Minuten in Schiffs Reagenz eingebracht wurden. Dem wurden eine Inkubation in warmem Leitungswasser (35 – 42 °C für 5 min), ein Waschschrift mit A. d. (1 min), und schließlich die Gegenfärbung mit einer sauren Hämalaunlösung (nach Mayer) angeschlossen. Danach wurden die Schnitte für sechs Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach nochmaligem Waschen mit

destilliertem Wasser (1 min), erfolgte eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol für je 1 min). Es folgte eine abschließende Klärung in Neo-Clear (zwei Mal fünf Minuten), woraufhin die gefärbten Schnitte mit Neo-Mount eingedeckelt werden konnten.

2.3.1.2.1 Quantitative Histomorphometrie der Niere

Evaluiert wurden an den PAS-Schnitten zum einen die Nierenkortexfläche (in Relation zur gesamten Schnittfläche)¹⁰, sowie der relative Anteil der nephrogenen Zone am Nierenkortex (s. Abb. 10). Die gefärbten Schnitte wurden dazu zunächst bei 20-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung abfotografiert. Anschließend konnten mit der Software „Aperio Image Scope“ die Flächen der nephrogenen Zone und des Gesamtkortex für jeden Schnitt markiert werden (Funktion: *Pen Tool*). Im zweiten Schritt wurden die so bearbeiteten Längsschnitte in das Softwareprogramm „ImageJ“ überführt (Funktion: *Snapshot*). Darin wurde nach Festlegen der Skalierung anhand eines Größenmaßstabs (Funktion: *Analyze: Set Scale*) die zu bestimmende Fläche entsprechend der zuvor angefertigten Markierungen umrandet (Funktion: *Polygon Selections*) und vermessen (Funktion: *Analyze: Measure*).

Zum anderen wurden der durchschnittliche glomeruläre Durchmesser und die Gesamtzahl der Nierenkörperchen pro Schnitt bestimmt¹⁰. Dazu wurde ausschließlich das Programm „Aperio Image Scope“ genutzt. Aufgrund der geringen Organgröße wurden alle Glomeruli auf jedem der Schnitte markiert (und somit gezählt). Anschließend wurde der jeweils größtmögliche Durchmesser der einzelnen Glomeruli mit der Softwarefunktion *Ruler Tool* vermessen.

Alle Ergebnisse der oben beschriebenen histomorphometrischen Untersuchungen wurden in das Softwareprogramm „Excel“ überführt und dort tabellarisch zusammengefasst. Zudem wurde hier für jedes Tier ein individueller Mittelwert für den glomerulären Durchmesser berechnet. Abschließend erfolgten unter Verwendung des Programms „GraphPad Prism“ (Version 7.04, GraphPad Software) die Ermittlung statistisch relevanter Gruppenunterschiede, sowie die Erstellung einer graphischen Darstellung der gewonnenen Daten (s. Abb. 22, 23).

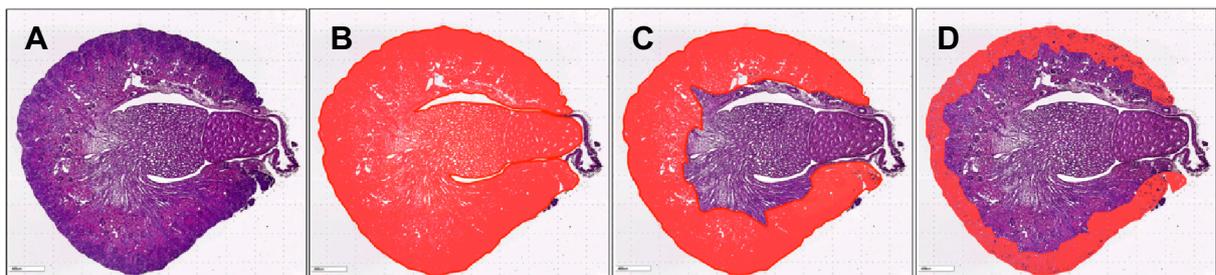


Abbildung 10: Repräsentativer Nierenlängsschnitt (A) mit exemplarischer Kennzeichnung von B) Renaler Gesamtfläche; C) Kortexareal; D) Nephrogener Zone.

2.3.2 Methoden zur Bestimmung von Expressionsmustern auf mRNA-Ebene

2.3.2.1 RNA-Isolation und -konzentrationsbestimmung

Die im Rahmen dieses Projekts durchgeführte Isolation der Ribonucleinsäuren (RNA) aus dem Nierengewebe basierte auf der sogenannten *Single-Step* Methode nach Chomczynski und Sacchi¹⁷⁷. Zuerst wurden dafür jeweils 500 µl der Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Lösung „TriReagent“ (Sigma-Aldrich) zu den Gewebeproben pipettiert, anschließend wurden die Proben in einer Gewebsmühle zusätzlich für 20 bis 30 Sekunden bei 30 Hz mechanisch unter Verwendung einer Metallkugel homogenisiert. Nach kurzem Vortexen erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Daraufhin wurden je 100 µl Chloroform hinzugegeben und die Proben erneut 15 Sekunden lang durchmischt. Nach weiteren drei Minuten Inkubation bei RT erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 12000 U/min und 4 °C, wodurch sich eine 3-Phasen-Bildung einstellte. Die oberste, RNA-haltige Phase konnte dann jeweils in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt werden. Dazu wurden je 250 µl Isopropanol zugegeben, wodurch ein Ausfallen der RNA erzielt wurde. Auf eine 20-minütige Inkubation der Proben bei 4 °C erfolgte eine weitere Zentrifugation. Danach konnte der flüssige Überstand abgegossen werden. Das übriggebliebene RNA-Pellet wurde anschließend zwei Mal mit je 500 µl 75 % Ethanol gewaschen (5-minütige Zentrifugation bei 15.000 U/min und 4 °C, anschließendes Abgießen des Ethanols). Danach wurden die Pellets für 30 min luftgetrocknet. Abschließend konnten die RNA-Pellets in RNase-freiem destilliertem Wasser gelöst werden.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels spektrophotometrischer Messung (Gerät: *Spectrofotometer Typ Infinite M200Pro*, NanoQuant). Dieser Schritt ist für die spätere Vergleichbarkeit der einzelnen Proben entscheidend. Das Messprinzip basiert auf der Bestimmung der optischen Dichte (OD): Das Absorptionsmaximum von Ribonucleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm (maximale Konzentration 1 µg/µl). Proteine hingegen weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf. Für eine Reinheitsbestimmung der Proben bzw. die Feststellung einer etwaigen Proteinkontamination wurde zusätzlich der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} bestimmt (akzeptierter Ratio-Wert 1,8 – 2,0). Bis zum weiteren Gebrauch wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

2.3.2.2 cDNA-Synthese

Um aus der gewonnenen Gesamt-RNA komplementäre Desoxyribonucleinsäure (cDNA) zu generieren, wurde mithilfe einer DNA-Polymerase eine sogenannte reverse Transkription¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ durchgeführt. Für jedes Versuchstier wurde ein einem Mikrogramm RNA-Gehalt entsprechendes Probenvolumen verwendet. Dieses wurde dann mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem destilliertem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Um möglichen DNA-Verunreinigungen der Proben zu begegnen, wurden diese mit DNase (je 3 µl 10x DNase I-

Puffer und 3 µl RNase-freeDNase I) inkubiert (15min bei RT). Durch Zugabe von 1 µl *Stop-Solution* (25mM EDTA) und anschließender Inkubation der Proben bei 65 °C wurde der DNA-Verdau durch Inaktivierung der zugegebenen Enzyme gestoppt.

Dann wurden je 4 µl DEPC-behandeltes Wasser, 1,2 µl Oligo-dT-Primer (0,5µg/µl) und 1,8 µl Randomprimer (0,5 µg/µl) hinzugegeben. Als Primer werden kurze DNA-Oligonukleotide bezeichnet, die an spezifische Regionen der Ziel-RNA binden und somit einen geeigneten Startpunkt für die Transkription eines zur RNA-Matrize komplementären DNA-Strangs bilden. Oligo-dT-Primer binden spezifisch am Poly-A-Schwanz der eukaryotischen *messenger RNA* (mRNA). Um eine Primer-Anlagerung zu ermöglichen, wurden die Proben für 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und danach für eine Minute auf Eis kaltgestellt.

Daraufhin wurden im nächsten Schritt jeder Probe 15 µl MMLV-Puffer 5x, 3,75 µl dNTP-Mix (je 10 mM), 1,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl), 3µl MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl), sowie 6,75 µl DEPC-behandeltes Wasser hinzugefügt, was in der Synthese einer doppelsträngigen cDNA resultierte. Diese Reaktion erfolgte bei 37 °C und wurde nach einer Stunde durch Überführen der Proben auf Eis unterbrochen. Anschließend wurden alle Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.3.2.3 Quantitative Real Time PCR

Für die Erfassung von Veränderungen auf Ebene der Genexpression wurde die Methode der quantitativen *Real-Time-PCR* (qRT-PCR) eingesetzt. Dabei erfolgt eine Vervielfältigung der gewonnenen cDNA in einem sich wiederholenden, dreischrittigen Prozess, der als Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bekannt ist¹⁸¹: Zunächst werden die DNA-Doppelstränge durch Hitzeeinwirkung in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Dies ermöglicht die Anlagerung von synthetischen Oligonukleotiden (sogenannte Primer) an die Einzelstränge (*Annealing*). Ausgehend von diesen Primern können im letzten Schritt, der Elongation, die DNA-Zielsequenzen durch eine hitzestabile DNA-Polymerase generiert werden. Das Enzym beginnt dazu am 5'-Ende des Primers die passenden Nukleinbasen komplementär zum Matrizenstrang zu verknüpfen. Um eine erfolgreiche Synthese zu gewährleisten, werden zusätzlich eine Pufferlösung, Magnesium-Ionen (als Cofaktor für die Erkennung der Nukleotide durch die Polymerase), und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) hinzugegeben. So entstehen erneut DNA-Doppelstränge; den nächsten Amplifikationsschritten (30 – 40 Zyklen) müssen jeweils also wiederum Denaturierung und Primeranlagerung vorangehen.

Dabei kann in kurzer Zeit durch exponentielle Vervielfältigung eine große Menge der DNA-Zielsequenz generiert werden. Das Besondere an der qRT-PCR ist, dass sie zusätzlich zur DNA-Amplifikation durch die Messung von Fluoreszenzfarbstoffemissionen eine

Quantifizierung des Reaktionsfortschritts in Echtzeit ermöglicht¹⁸². Dazu wurden für das vorliegende Projekt sowohl die TaqMan-, als auch die SYBR-Green-I-Methode verwendet (s. Abb. 11).

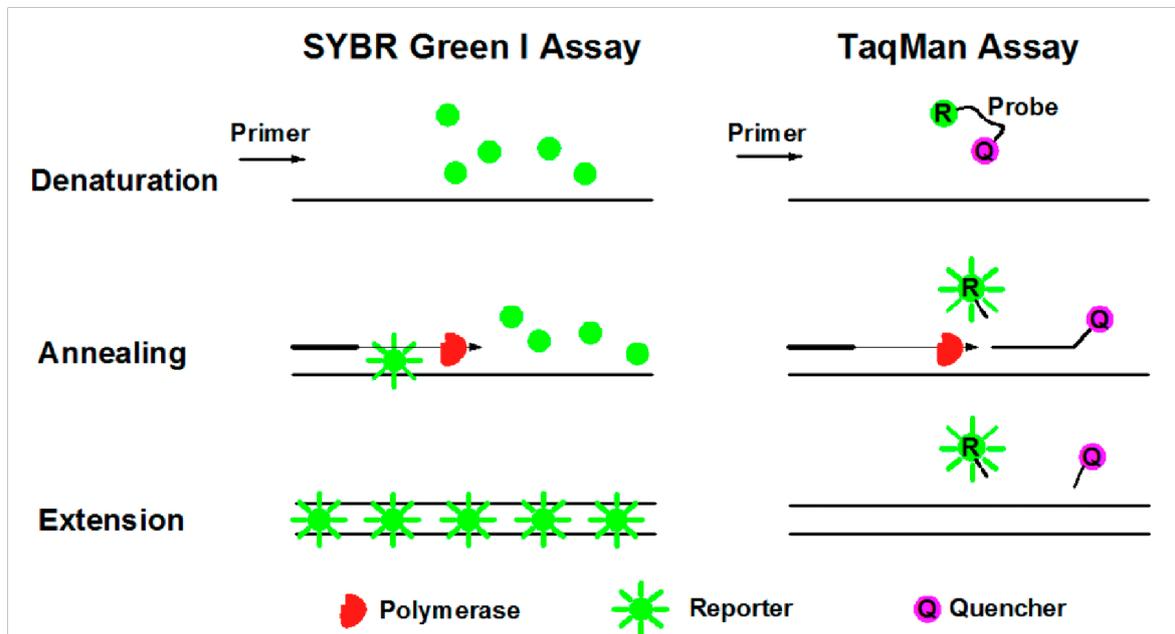


Abbildung 11: Prinzip der quantitativen Real-Time PCR nach dem SYBR-GREEN-I- und TaqMan-Verfahren. Das TaqMan-Verfahren basiert auf der Zugabe sequenzspezifischer Oligonukleotidsonden, welche am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (R), und am 3'-Ende einen Quencher (Q) tragen. Dieser unterdrückt bei intakter Sonde die Fluoreszenzabgabe des Reporterfarbstoffs. Nach Erkennen der Zielsequenz innerhalb des zu replizierenden DNA-Abschnitts, lagert sich die Sonde unterhalb der Primerstelle an und wird im Zuge des Transkriptionsfortschritts durch die DNA-Polymerase gespalten. Dadurch werden 5'- und 3'-Ende voneinander getrennt, sodass das Fluoreszenzsignal des Reporterfarbstoffs entsprechend steigt. Mit jedem Amplifikationszyklus werden weitere Sonden abgespalten, und die Signalintensität wird entsprechend proportional zum Replikationsprodukt (messbar) gesteigert¹⁸³. Im Vergleich dazu basiert die SYBR-Green-I-Methode zwar auch auf einem Fluoreszenzfarbstoff, dieser erkennt jedoch jede doppelsträngige DNA und wird also unspezifisch in jeden neu entstehenden Doppelstrang eingelagert. Bei Denaturierung dieser Doppelstränge in Folge einer Temperaturerhöhung wird der SYBR-Green-I-Farbstoff entsprechend wieder freigesetzt. Die dadurch bedingte Änderung des Fluoreszenzsignals kann photometrisch gemessen werden, wobei die Höhe des erfassten Signals ebenfalls proportional zur Menge der entstandenen Amplikone ist¹⁸⁴. [Entnommen aus: Cao Y et al. (2020)¹⁸⁵. Abbildungsgenehmigung per CC-Lizenz: CC BY 4.0].

Für die Versuchsdurchführung nach dem TaqMan-Prinzip wurden für jede Probe 12,5 µl Platinum-Supremix, 8,5 µl destilliertes Wasser, 0,5 µl Taqman-Sonde (2 µmol/l) und jeweils 0,5 µl *forward* und *reverse* Primer (6 µmol/l) (s. Abschnitt 2.2.6.1) angesetzt und anschließend auf die entsprechenden Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Danach wurden jeweils 2,5 µl cDNA hinzugegeben. Die Platte wurde mit einer Plastikfolie luftdicht versiegelt und für drei Minuten bei 20 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte die Reaktionsaufzeichnung im Thermocycler.

Für die Versuchsdurchführung nach dem SYBR-GREEN-I-Prinzip wurden je 12,5 µl IQ SYBR

Supermix, 5,5 µl destilliertes Wasser, sowie jeweils 0,5 µl *forward* und *reverse* Primer (10 µmol/l) (s. Abschnitt 2.2.6.2) angesetzt. Nach Auftragung auf die Mikrotiterplatte wurde anschließend je 1 µl cDNA hinzu pipettiert. Im Anschluss wurde verfahren, wie oben für die TaqMan-Sonden beschrieben.

2.3.2.4 Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse

Es erfolgte eine relative Quantifizierung der PCR-Ergebnisse. Dazu wurden die Expressionslevel der Zielgene und sogenannter endogener Kontrollgene verglichen. Letztere werden auch als *Housekeeping*-Gene bezeichnet, da sie unabhängig vom Interventionsstatus in allen Tieren gleichermaßen exprimiert werden. Als *Housekeeping* dienten in meinen Versuchen die Gene *Actb* und *18s*. Im Sinne der vergleichenden C_t -Methode ($\Delta\Delta C_t$ -Methode) wurde das Verhältnis von der Expression des jeweiligen Zielgens zu der des *Housekeeping*-Gens ermittelt. Der C_t -Wert (*Threshold Cycle*) gibt die minimale Anzahl an Replikationszyklen an, die zur Überschreitung des Fluoreszenzsignals über einen zuvor festgelegten Schwellenwert NTC (*No Template Control*) nötig ist. Je mehr Ziel-DNA in einer Probe, desto schneller kann ein signifikantes Signal erfasst werden, und desto niedriger fällt dementsprechend der C_t -Wert aus. Für die Auswertung wurden folgende arithmetische Formeln angewandt¹⁸⁶:

$$\text{Relative Veränderung in der Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ Kontrollgruppe} - \Delta C_t \text{ Untersuchte Gruppe}$$

$$\Delta C_t = C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Housekeeping}$$

2.3.3 Methoden zur Bestimmung von Expressionsmustern auf Proteinebene

2.3.3.1 Proteinisolation und –konzentrationsbestimmung

Für die Proteinisolation aus den Mäusenieren wurde ein HALT-Puffer im Verhältnis 1 : 100 mit CHAPS-Puffer (3-Cholamidopropyldimethylammonio-1-Propansulfonat) versetzt und direkt im Anschluss auf das gefrorene Gewebe (-80 °C) gegeben. CHAPS ist ein nicht-denaturierendes Detergens, welches Proteine aus ihrer Membranverankerung lösen und Protein-Protein-Bindungen auflösen kann¹⁸⁷. Die Menge der zugegebenen Lösung richtete sich nach der jeweiligen Gewebemenge und betrug zwischen 80 und 130 µl. Zusätzlich erfolgte zuerst eine mechanische Homogenisierung mittels eines Pistills und anschließender Sonifikation (20 Sekunden, drei Zyklen bei mittlerer Stärke). Die so lysierten Proben wurden daraufhin für eine Stunde auf Eis inkubiert, wobei alle 10 Minuten eine Durchmischung erfolgte. Nach dieser Inkubationszeit wurde eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 rpm angeschlossen. Dadurch ergab sich eine Phasenbildung. Die oberste, proteinhaltige Phase wurde jeweils abgenommen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt.

Die hier beschriebene Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration ist als BCA-Assay bekannt und verläuft zweischrittig¹⁸⁸. Zuerst erfolgt dabei die sogenannte Biuret-Reaktion, während welcher Peptide mit drei oder mehr Aminosäureresten in einer alkalisch-wässrigen Umgebung Chelatkomplexe mit zweiwertigen Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) bilden. Diese werden dabei zu einwertigen Ionen reduziert (Cu^{1+}), woraus ein Farbumschlag nach hellblau resultiert. Die Intensität der Farbauscheidung ist proportional zu der Anzahl an beteiligten Peptidbindungen. Im Folgeschritt bilden dann wiederum die entstandenen Cu^{1+} -Ionen mit der zugegebenen Bicinchoninsäure (BCA) Komplexe aus, was zu einer Violettfärbung der Probenlösungen führt. Die Farbreaktion wird also intensiviert und eine kolorimetrische Erfassung der Reaktionsintensität und Proteinkonzentration somit erleichtert¹⁸⁸.

Zunächst wurde eine Rinderserumalbumin-Standardreihe mit bekannter Proteinmenge vorbereitet. Dafür wurden in fünf Mikroreaktionsgefäße je 30 μl CHAPS vorgelegt. In das erste davon wurden zusätzlich 30 μl Rinderserumalbumin (BSA) zugegeben. Daraus wurden wiederum 30 μl in das nächste Gefäß überführt, woraus anschließend wiederum 30 μl entnommen und in das dritte Mikroreaktionsgefäß pipettiert wurden. So wurde verfahren, bis letztlich fünf Verdünnungsgrade von 1 : 2 bis 1 : 32 vorlagen. In je ein weiteres Gefäß wurden jeweils nur 30 μl CHAPS beziehungsweise 30 μl BSA pur pipettiert. Anschließend wurden die Proteinproben mit CHAPS-Puffer verdünnt (1 : 10) und davon je 3 μl zu 27 μl CHAPS-Mix gegeben. Im letzten Vorbereitungsschritt wurden die im „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific) enthaltenen Reagenzien (A und B) nach Angaben des Herstellers in einem Verhältnis von 50 : 1 zu einem *Working Reagenz* vermischt (für ein Gesamtvolumen von 200 μl pro Probe inklusive Standardreihe). Danach wurde eine Mikrotiterplatte (insges. 96 Wells, s. Tab. 11) mit der Standardreihe, sowie den CHAPS-versetzten Nierenproteinen beladen, wobei alle Proben zwecks Doppelbestimmung insgesamt zwei Mal aufgetragen wurden (10 μl pro Well). In die beladenen Wells wurde dann je 200 μl *Working Reagenz* hinzu pipettiert.

Well	1 SR	2 SR ₂	3 P	4 P ₂	5 P	6 P ₂
A	1 : 32	1 : 32	P1	P1	P6	P6
B	1 : 16	1 : 16	P2	P2	P7	P7
C	1 : 8	1 : 8	P3	P3	P8	P8
D	1 : 4	1 : 4	P4	P4	P9	P9
E	1 : 2	1 : 2	P5	P5	P10	P10
F	Puffer pur	Puffer pur				
G	BSA pur	BSA pur				

Tabelle 11: Auftragungsschema für die Mikrotiterplatte im Rahmen der kolorimetrischen Proteinkonzentrationsbestimmung. SR = Standardreihe; P = Probe.

Nach einer halbstündigen Inkubation bei 37 °C, erfolgte die entsprechende kolorimetrische Messung bei einer Wellenlänge von 562 nm (Tecan Infinite M200 PRO NanoQuant). Aus den Mittelwerten der jeweils zwei Messwerte für die einzelnen Proben (Doppelbestimmung) wurde dann in Relation zu den Messwerten für die BSA-Standardreihe der Proteingehalt der Proben ermittelt. Bis zum weiteren Gebrauch wurden alle Proteinproben bei -80 °C eingefroren.

2.3.3.2 SDS-Page und Western Blotting

Für die Untersuchung der Expressionsmuster auf Proteinebene wurde die Western-Blot-Methode ausgewählt¹⁸⁹. Im ersten Schritt musste dazu eine SDS-Page (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) erfolgen, also eine Auftrennung der Proteingemische nach Molekularmasse¹⁹⁰. Das SDS-Page-Verfahren umfasst mehrere Teilschritte: Zunächst wurden die Gele hergestellt, wobei hier ein Lämmli-System zum Einsatz kam (Sammelgel mit Tris-Glycin-Puffer pH 6,8); Trenngel mit Tris-Glycin-Puffer pH 8,8 (s. Abschnitt 2.2.2). Anschließend wurden die Proben vorbereitet. Dazu wurde zu jeweils 20 µg aufbereitetem Protein (s. 2.3.3.1) 5 x SDS-Probenpuffer (s. Abschnitt 2.2.2) hinzugegeben und das Gemisch anschließend für 10 Minuten bei 70 °C erhitzt. Daraufhin wurde die Gelkammer mit 1 x Lämmli-Puffer gefüllt und das Gel wurde mit den Proben beladen. Dies, sowie die vorherige Probenvorbereitung, dienen der Denaturierung der Proteine auf ihre Primärstruktur. Denn das SDS ist ein anionisches Tensid, welches zur Auflösung der hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb der Proteine führt, sodass diese in ihre Primärstrukturen übergehen, also als linearisierte Aminosäuresequenzen vorliegen und somit allesamt eine negative Ladung aufweisen. Diese Denaturierung wird durch das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol durch Reduktion enthaltener Disulfidbrücken vervollständigt¹⁹⁰.

Für die eigentliche Elektrophorese wurde eine elektrische Spannung an das Gel angelegt, um eine Wanderung der Proteine Richtung Anode zu bewirken (45 min bei 80 V, gefolgt von 180 min bei 120 V). Kleinere Proteine konnten durch die Poren des Gels in der gleichen Zeit entsprechend weiter wandern als größere. Da die negative Ladung des zugesetzten SDS außerdem zu einer Überdeckung der Proteineigenladung und deren Negativierung im Verhältnis zu der jeweiligen Proteinmasse führt, erfolgte die Trennung der Proben einzig auf Grund der unterschiedlichen Molekularmasse der enthaltenen Proteine und war nicht durch etwaige Ladungsunterschiede beeinträchtigt.

Nach Abschluss der SDS-Page erfolgte ein Western-Blot-Verfahren (*Semi-Dry-Blot*). Beim *Western Blotting* werden die im Gel befindlichen Proteine wiederum elektrophoretisch auf eine negativ geladene Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) übertragen, welche sie durch hydrophobe Wechselwirkungen binden kann¹⁹¹. Zuvor wurde die Membran dazu mit kaltem

destilliertem Wasser (4 °C) aktiviert, und dann in einen methanolhaltigen Transferpuffer (4 °C) überführt (s. Abschnitt 2.2.2). Die so präparierte Membran wurde anschließend auf zwei Lagen ebenfalls mit Puffer getränktem Filterpapier (Whatman) in eine Blotkammer überführt. Auf die Membran wurde das mit den Proteinproben beladene Gel platziert, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Luftblasen zwischen Membran und Gel verblieben. Auf das Gel wurden zwei weitere Lagen Filterpapier geschichtet. Der verbliebene Transferpuffer wurde hinzugegeben, und die Gelkammer 120 min lang bei 1,3 mA / cm² unter Strom gesetzt. Nach erfolgreichem Proteintransfer auf die Membran erfolgte eine Ponceau-S-Färbung zur Kenntlichmachung der Proteinbanden¹⁹². Der Blot wurde dazu für zwei Minuten in besagtem Puffer inkubiert und die überschießende Farbe anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen. Danach wurde die Membran mit einer *Blocking Solution* (5 % Milch + 2 % BSA in TBST) geblockt. Dies diente der Absättigung überschüssiger Proteinbindungsstellen der Blotmembran, um anschließend eine möglichst spezifische Antikörperbindung zu ermöglichen.

Für die eigentliche Proteindarstellung wurde eine Immunfärbung angeschlossen. Dazu wurden die jeweiligen Blots zuerst mit einem für das zu bestimmende Protein spezifischen, primären Antikörper (s. Abschnitt 2.2.5) für 30 min bei RT und im Anschluss über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Je nach Herstellerangabe wurden besagte Antikörper entweder in 5 % Milch in TBST oder 5 % BSA in TBST verdünnt. Am Folgetag wurden die Blots gewaschen (3 x 10 min in TBST), um unspezifisch gebundene Antikörper zu beseitigen. Daraufhin konnten die Blots mit einem sekundären Antikörper, welcher mit 5 % Milch in TBST verdünnt wurde, inkubiert werden. Dieser bindet speziesspezifisch den primären Antikörper und ist mit einer Meerrettichperoxidase (HPR) konjugiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit (eine Stunde bei RT) folgten weitere drei Waschvorgänge in TBST.

Um mehr als ein Protein auf demselben Membranabschnitt detektieren zu können, konnten die Blots nach Auswertung *gestripped* werden, das heißt, die gebundenen Antikörperkomplexe konnten von der Membran entfernt und diese im Anschluss zum Nachweis weiterer Proteine wiederverwendet werden¹⁹³. Dazu wurde die Membran in einem β -mercaptoethanolhaltigem Puffer für 15 Minuten bei 56 °C in einem Wasserbad inkubiert, wodurch die Disulfidbrücken der zuvor gebundenen Antikörper aufgebrochen wurden. Nach weiteren drei Waschvorgängen in TBST konnte anschließend wieder ein Blockiervorgang (90 Minuten bei RT in 5 % in Milch TBST + 2 % BSA) erfolgen. Danach konnte die Membran wie oben beschrieben erneut mit einem primären Antikörper inkubiert werden.

2.3.3.3 Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse

Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgte durch eine oxidative Reaktion des Luminols in der zugegebenen *Chemiluminescence Solution (Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kit)*, welche durch die peroxidase markierten sekundären Antikörper katalysiert wird. Bei dieser Reaktion entsteht Licht, welches unter Zuhilfenahme eines „*ChemIDoc XRS+ Systems*“ (Bio-Rad Laboratories GmbH) quantifiziert werden konnte.

Die Auswertung der Western-Blot-Ergebnisse erfolgte quantitativ unter Verwendung der Software „*Image Lab*“ (Bio-Rad Laboratories GmbH), die für die Erstellung eines Negativbilds der Proteinbanden genutzt wurde. Dies ermöglichte eine Messung der einzelnen Bandendichten (semiquantitativ densitometrische Analyse). Anschließend wurden die Messergebnisse in Relation zu der gemessenen Bandendichte des mitbestimmten Housekeeping-Proteins β -ACTIN gesetzt ($\text{Bandendichte}_{\text{Protein}} / \text{Bandendichte}_{\beta\text{-Actin}}$).

2.4 Statistische Auswertung

Um die im Folgenden dargelegten Ergebnisse meiner Arbeit auf ihre Signifikanz hin zu überprüfen, kamen verschiedene statistische Tests zur Anwendung. Als Hilfsmittel hierfür diente die Software „*GraphPad Prism*“ (Version 7.04, GraphPad Software).

Für die Beurteilung der qRT-PCR Ergebnisse wurde ein parametrischer Test in Form eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests (*Student's t-Test*) herangezogen. Dieser ermittelt (unter Annahme einer Normalverteilung der Daten innerhalb der Vergleichsgruppen) die Differenz zwischen den Mittelwerten der zu vergleichenden Gruppen. Die Nullhypothese lautet hierbei also, dass kein Unterschied zwischen den Gruppenmittelwerten vorliegt, während die Alternativhypothese von einem Unterschied ausgeht (ohne Vermutung bezüglich der Richtung des Unterschieds in den Gruppen)¹⁹⁴.

Alle anderen Ergebnisse wurden aufgrund der kleineren Gruppengrößen mit dem nichtparametrischen *Mann-Whitney-U-Test* auf statistisch signifikante Unterschiede hin untersucht (dieser Test erfordert keine Normalverteilung der Daten). Dabei werden die Versuchsgruppen nicht anhand ihres Mittelwerts, sondern über die Verteilung der mittleren Ränge verglichen¹⁹⁴.

Das Signifikanzniveau wurde auf fünf Prozent festgelegt ($p < 0,05$), und ist in den folgenden Grafiken (Darstellung \pm *Standard Error of the Mean*), welche ebenfalls mit „*GraphPad Prism*“ (Version 7.04, GraphPad Software) erstellt wurden, entsprechend gekennzeichnet ($= p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$).

3. Ergebnisse

Um unsere Arbeitshypothese zu adressieren, wurden die Nieren der Versuchstiere auf ein lokales Inflammationsgeschehen, sowie mögliche zellmetabolische und strukturelle Beatmungsfolgen hin untersucht. Dazu wurden Wildtyp- und *Il6*-defiziente Mäuse jeweils in eine Kontroll- und eine Beatmungsgruppe eingeteilt (s. tierexperimentelles Design, Abschnitt 2.1). Der Übersicht halber werden im Kommenden folgende Abkürzungen zur Beschreibung der Versuchstiere genutzt:

Wildtyp(en)	WT
<i>Il6</i> -Knockout(s)	<i>Il6</i> ^{-/-}
<i>Mechanical Ventilation</i> (beatmete Tiere)	MV
<i>Control</i> (nicht beatmete Tiere)	Co

3.1 Postnatale MV verursacht Inflammation im neonatalen Nierengewebe

Um die Mechanismen und das Ausmaß einer entzündlichen Antwort der Niere auf die vorgenommene postnatale Beatmung zu untersuchen, wurde *post interventionem* zunächst die renale Expression verschiedener aus dem Kontext des Biotraumas (s. Abschnitt 1.3) bekannter Entzündungsmediatoren untersucht.

3.1.1 Untersuchung der renalen *Il6*- und *Il1b*-mRNA-Expression nach 4h MV

Vorab werden hier arbeitsgruppeninterne Ergebnisse präsentiert, die von Dr. med. Kuiper-Makris (AG Alcázar) erzielt wurden und die renale mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-1 β nach nur vierstündiger Beatmung zeigen (s. Abb. 12).

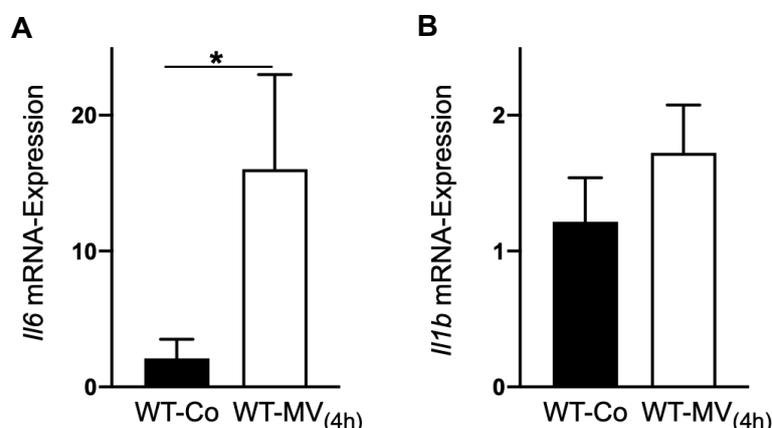


Abbildung 12: Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) *Il6* und B) *Il1b* nach 4h mechanischer Beatmung (MV). Housekeeping-Gen: *Actb*. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 5); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{4h}; n = 10). Mann-Whitney-U-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Datenerhebung durch Dr. med. C. Kuiper-Makris.

Dabei fiel auf, dass die renale Expression von *Il6* nach vierstündiger MV bereits einen signifikanten Anstieg zeigte (s. Abb. 12 (A)), wohingegen die *Il1b*-Expression in den Nieren der beatmeten Wildtyp-Mäuse zu diesem frühen Untersuchungszeitpunkt noch nicht relevant gesteigert war (s. Abb. 12 (B)). Diese Erkenntnis ergänzt die von mir vorgenommenen Untersuchungen nach acht Stunden Beatmung entscheidend, da sie Rückschlüsse auf die zeitliche Expressionsdynamik der Mediatoren und deren gegenseitige Regulation im vorliegenden Kontext zulässt.

3.1.2 Untersuchung der renalen Expression inflammatorischer Mediatoren nach 8h MV

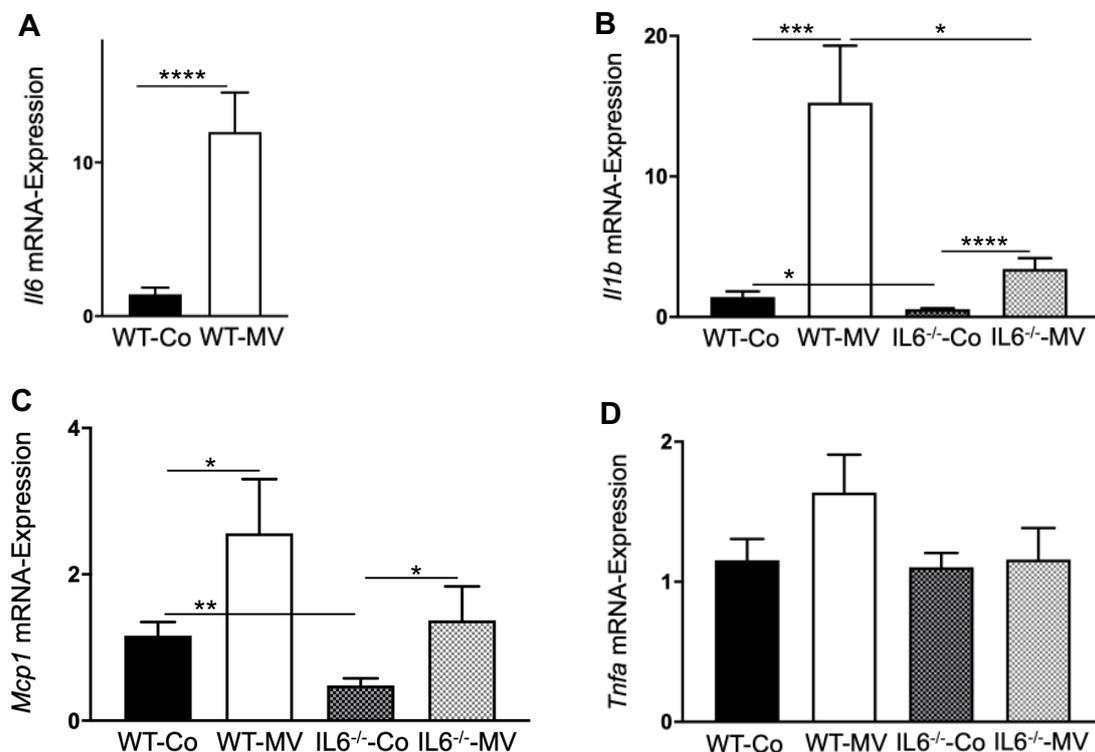


Abbildung 13: Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) *Il6*; B) *Il1b*; C) *Mcp1* und D) *Tnfa* nach 8h mechanischer Beatmung (MV). Housekeeping-Gen: *Actb*. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 14 - 15); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 11); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 15); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 7 - 8). Student's t-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert ± SEM.

Nach achtstündiger Beatmung zeigte sich schließlich neben dem *Il6*- auch das *Il1b*-Level in den Wildtyp-Nieren signifikant erhöht (s. Abb. 13 (A + B)). Der *Il6*-Knockout konnte besagte *Il1b*-Transkriptionssteigerung jedoch deutlich attenuieren (s. Abb. 13 (B)). Ähnliches gilt für die Transkriptionsrate des Chemokins *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (Genname *Mcp1*), welche unter Beatmung ebenfalls signifikant zunahm, in den *Il6*-defizienten Nieren allerdings als insgesamt vermindert auffiel (s. Abb. 13 (C)).

Einzig die mRNA-Expression des Tumornekrosefaktor- α (Genname *Tnfa*) zeigte sich weder durch die achtstündige Beatmung noch den *Il6*-Knockout relevant beeinflusst (s. Abb. 13 (D)).

Dies überraschte uns zuerst, da TNF- α ebenso wie IL-6 als systemischer Marker für ein beatmungsinduziertes Biotrauma gilt^{195,196}. Andererseits konnten auch andere Autoren keine relevante renale *Tnfa*-Expressionssteigerung nach mechanischer Beatmung berichten¹⁹⁷, sodass der lokale Effekt des Zytokins im Zuge einer beatmungsbedingten Nierenschädigung vernachlässigbar scheint.

Die Zusammenschau aus der zeitlichen Verzögerung zwischen frühem *Il6*- (s. Abb. 12 (A)) und nachfolgendem *Il1b*-Expressionsanstieg (s. Abb. 13 (B)), sowie der effektiven Abmilderung einer beatmungsbedingten *Il1b*- und *Mcp1*-Mehrexpression durch den *Il6*-Knockout (s. Abb. 13 (B + C)) indiziert eine zentrale Rolle von Interleukin-6 für die Entstehung und Aufrechterhaltung der renalen Entzündungsreaktion unter mechanischer Beatmung.

3.1.2.1 Untersuchung einer möglichen renalen NF- κ B-Aktivierung nach 8h MV

Da in der Literatur eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor kappa-light-chainenhancer of activated B-cells* (NF- κ B) als wichtiger Pathomechanismus für die Entstehung des beatmungsbedingten Biotraumas diskutiert wird¹⁹⁸, erfolgte im Anschluss an meine Untersuchungen durch Christina Vohlen (AG Alcázar) zusätzlich eine Western-Blot-Analyse der renalen p65-Expression (s. Abb. 14):

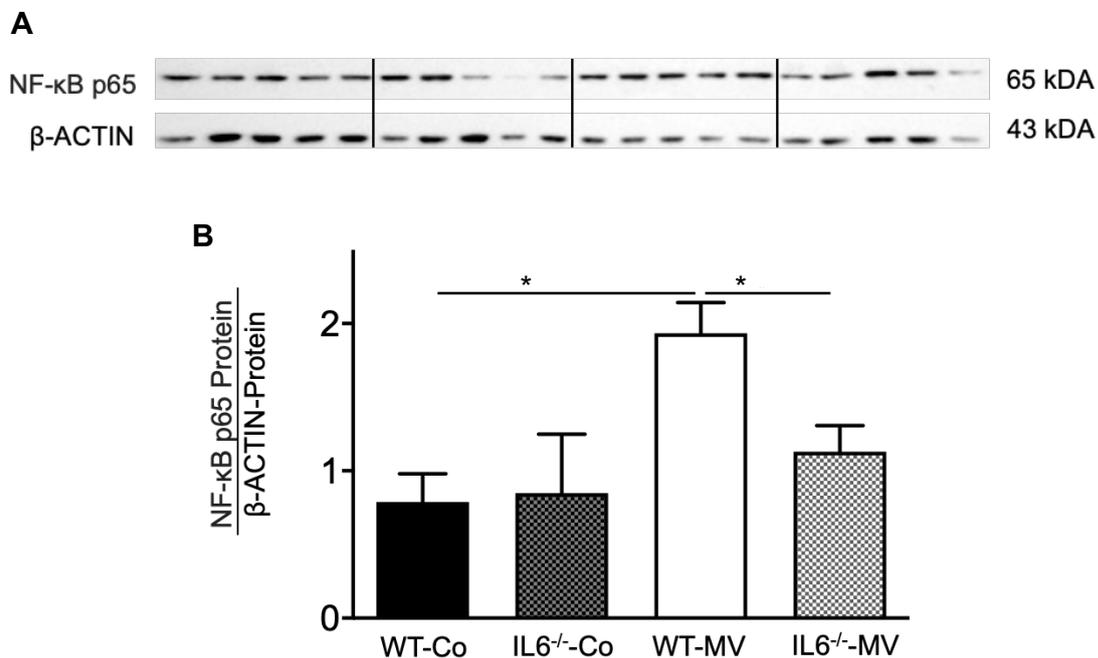


Abbildung 14: Messung der p65 Proteinmenge nach 8h mechanischer Beatmung (MV) (A) mit grafischer Darstellung der densitometrischen Western-Blot-Analysen (B). Ladungskontrolle: β -ACTIN. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 5); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 5); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 5); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 5). Mann-Whitney-U-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert \pm SEM. Datenerhebung durch C. Vohlen.

Das Protein p65 ist Bestandteil des intrazellulären (homo- oder heterodimeren) NF-κB-Komplexes¹⁹⁹, dem in Abwesenheit aktivierender Stimuli zytosolisch inhibierend wirkende Proteine angelagert sind^{200,201}. Die Initiierung einer NF-κB-Signalkaskade erfolgt u. a. durch das proinflammatorische Zytokin IL-1β^{202,203} und führt über mehrere Schritte zur Translokation des NF-κB-Komplexes nach intranukleär^{204,205}. Dort kann der Transkriptionsfaktor durch Bindung an spezifische Promotorregionen seinerseits die Expression proinflammatorischer Signalmoleküle wie IL-6 induzieren^{206,207}.

Erwartungsgemäß konnten wir eine signifikante p65-Expressionssteigerung in den Nieren der beatmeten Wildtypen feststellen, was auf eine lokale NF-κB-Aktivierung schließen lässt. Diese scheint, wie auch die oben präsentierte *I1b*-Expression (s. Abb. 13 (B)), durch die Blockade des IL-6-Signalwegs effektiv verhindert worden zu sein (s. Abb. 14 (B)). Letzteres unterstreicht erneut die Wahrscheinlichkeit eines zentralen Stellenwerts von IL-6 innerhalb des beobachteten Entzündungsgeschehens.

3.1.3 Untersuchung der inflammatorischen Signaltransduktion nach intrazellulär

Nachdem ein beatmungsbedingter Anstieg der mRNA-Expression von *I6* und *I1b* im neonatalen Nierengewebe gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob unter Beatmung tatsächlich eine Signaltransduktion besagter Zytokine auf zellulärer Ebene stattfindet.

Die in Abbildung 15 zusammengefassten Untersuchungsergebnisse bestätigten die Aktivierung des IL-6/STAT3-Signalwegs (s. Abschnitt 1.4.1) unter Beatmung: In Einklang mit der signifikanten *I6*-Expressionssteigerung ist nach acht Stunden MV ebenfalls eine signifikante Mehrexpression des IL-6-Zielgens *Socs3* zu berichten. Dieser Beatmungseffekt zeigte sich in den *I6*-defizienten Nieren entsprechend deutlich abgemindert (s. Abb. 15 (A)). Auch die Expressionsanalyse des intrazellulären IL-6-Effektors STAT3 und seiner phosphorylierten Form pSTAT3 spiegelte einen signifikant hochregulierenden Beatmungseffekt in den Wildtyp-Nieren wider. In den Nieren der *I6*-Knockout-Tiere zeigte sich nach Beatmung im Gegensatz dazu keine signifikante Expressionssteigerung von STAT3 oder pSTAT3. Zudem fiel der relative Anteil des biologisch aktiven pSTAT3 am Gesamtprotein (pSTAT3/STAT3) nur in den Nieren der beatmeten Wildtyp-Tiere als signifikant erhöht auf (s. Abb. 15 (B - E)).

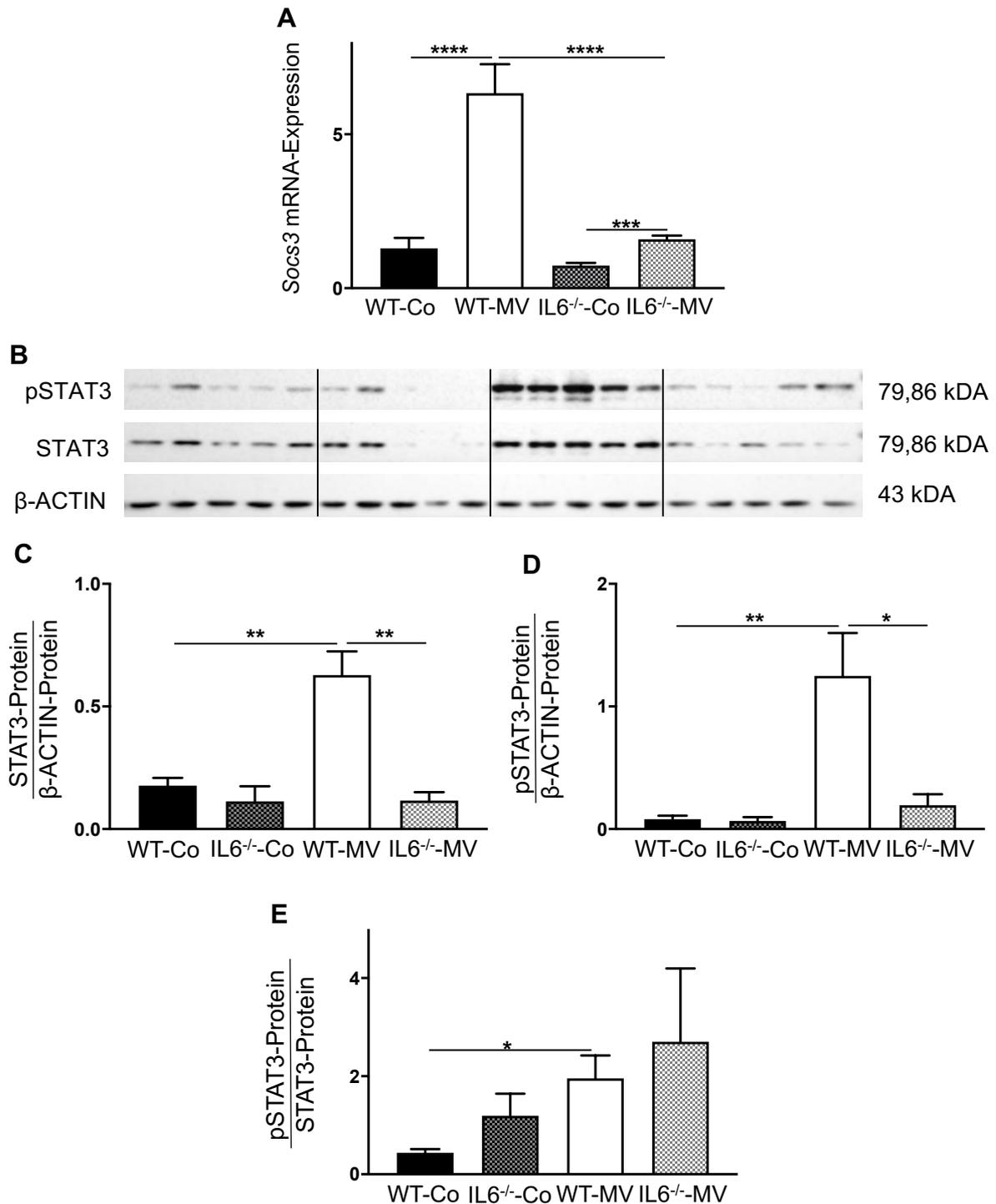


Abbildung 15: Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) *Socs3* und der (p)STAT3-Proteinmenge (B) nach 8h mechanischer Beatmung (MV) mit grafischer Darstellung der densitometrischen Western-Blot-Analysen (C - E). A: Housekeeping-Gen: *Actb*. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 14 - 15); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 11); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 15); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 7 - 8). Student's t-Test. **B - E:** Ladungskontrolle: β-ACTIN. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 5); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 5); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 5); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 5). Mann-Whitney-U-Test. **A - E:** p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert ± SEM.

Zur Überprüfung einer aktiven IL-1 β -Signaltransduktion erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expressionslevel einiger intrazellulär nachgeschalteter Moleküle (s. Abb. 16). Denn zur Signalübermittlung bindet IL-1 β an den ubiquitär exprimierten Typ-1 IL-1-Rezeptor^{208,209} und induziert dessen Konformationsänderung, woraufhin sich ein Korezeptor (*IL-1 Receptor Accessory Protein*) anlagern kann^{210,211}. Intrazellulär können daraufhin zunächst die Signalproteine *Myeloid Differentiation Factor 88* (Genname *Myd88*) und *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 4* (Genname *Irak4*)²¹² und anschließend *Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1* (Genname *Irak1*) und -2 (Genname *Irak2*)²¹³ an den IL-1-Rezeptorkomplex binden. Auf die Phosphorylierung der IRAKs hin wird zuletzt der *Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6* (Genname *Traf6*) rekrutiert²⁰², welcher über eine Polyubiquitinierung verschiedener Folgesignalmoleküle die Expression der IL-1 β -Zielgene veranlasst²¹⁴.

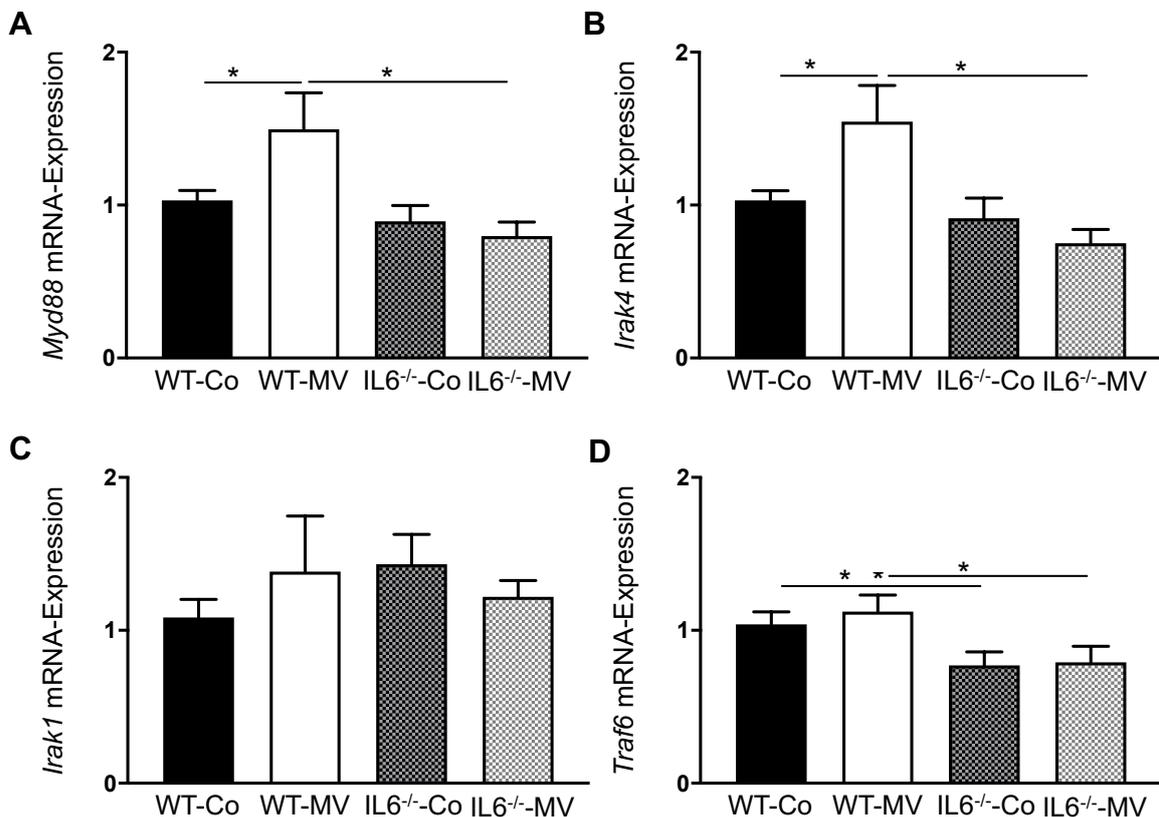


Abbildung 16: Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) *Myd88*; B) *Irak4*; C) *Irak1*; und E) *Traf6* nach 8h mechanischer Beatmung (MV). Housekeeping-Gen: *Actb*. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 14 - 15); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 11); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 15); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 7 - 8). Student's t-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert \pm SEM.

Da sich in den Nieren der von uns untersuchten Wildtyp-Mäuse nach achtstündiger MV eine signifikante Expressionssteigerung von *Myd88* und *Irak4* (s. Abb. 16 (A + B)) zeigte, kann also tatsächlich auf eine beginnende IL-1 β -Aktivierung geschlossen werden. Dass sich für die noch

weiter *downstream* befindlichen Mediatoren *Irak1* und *Traf6* zum vorliegenden Untersuchungszeitpunkt keine relevante Transkriptionsanpassung feststellen ließ (s. Abb. 16 (C + D)), ist am ehesten auf die begrenzte Beobachtungszeit zurückzuführen.

Der *Il6*-Knockout zeigte wiederum einen deutlichen Effekt: Wie das *Il1b*-Expressionslevel (s. Abb. 16 (B)) war auch die *Traf6*-Transkription sowohl in den Knockout-Kontrollen als auch in der Knockout-Beatmungsgruppe im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp-Pendant signifikant herunterreguliert (s. Abb. 16 (D)). Dasselbe gilt für den Vergleich zwischen den Wildtyp- und Knockout-Beatmungsgruppen (WT-MV vs. *IL6*^{-/-}-MV) bezüglich des *Myd88*- und *Irak4*-Levels (s. Abb. 16 (A + B)). Nur die *Irak1*-mRNA-Expression in Wildtyp- und Knockout-Nieren unterschied sich zum vorliegenden Untersuchungszeitpunkt nicht signifikant (s. Abb. 16 (C)).

3.2 Postnatale MV stört die zelluläre Homöostase im neonatalen Nierengewebe

Um einen Einblick in potenziell langfristig programmierende Effekte der beobachteten Entzündungsreaktion zu gewinnen, wurden anschließend mögliche Auswirkungen auf den Zellzyklus und -metabolismus untersucht.

3.2.1 Untersuchung einer potenziellen renalen Proliferationsstörung nach 8h MV

Für das Nierengewebe sind auf akute Schädigungsreize hin zwei verschiedene, gegensätzliche Zellreaktionen beschrieben: Kompensatorisch gesteigerte Proliferation^{215,216} auf der einen, und Zellzyklusarrest auf der anderen Seite^{217,218}. Um den Effekt der postnatalen Beatmung auf die zelluläre Homöostase zu untersuchen, wurden entsprechend die Genexpressionslevel der Zellzyklusregulatoren *Cdkn1a* und *E2f1*, sowie die exprimierte Proteinmenge des Proliferationsmarkers *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) im Gruppenvergleich untersucht (s. Abb. 17).

Das Gen *Cdkn1a* codiert für den *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1* (CDK-Inhibitor 1), der auch als p21 bezeichnet wird. P21 blockiert den Fortschritt des Zellzyklus am sogenannten G1-S-Checkpoint^{3 221–223}. Diese Blockade kann vorübergehend oder permanent sein, der CDK-Inhibitor kann also u. a. als Marker für Zellalterungsprozesse (Seneszenz) herangezogen werden^{224,225}. Der Transkriptionsfaktor E2F1 fördert im Gegensatz zu p21 den Progress von der G1- zur S-Phase²²⁶ und begünstigt unter anderem eine PCNA-Expressions-

³ Der Zellzyklus verläuft phasenhaft: Während der sogenannten G₁-Phase wächst die Zelle und bereitet sich auf die in der folgenden Synthese (S)-Phase stattfindende Verdopplung der Erbinformation vor. An die S-Phase schließt sich die G₂-Phase an, bis die Zelle zur Teilung in der Mitose (M)-Phase bereit ist²¹⁹. Zwischen diesen Phasen liegen sogenannte *Checkpoints*, an denen überprüft wird, ob der bisherige Zyklus regelrecht verlaufen ist und der Übertritt in die nächste Phase stattfinden kann²²⁰.

steigerung²²⁷⁻²²⁹. PCNA ist ein wesentlicher Cofaktor der kontinuierlichen DNA-Synthese^{230,231} und übernimmt regulatorische Funktionen im Bereich der DNA-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle^{232,233}.

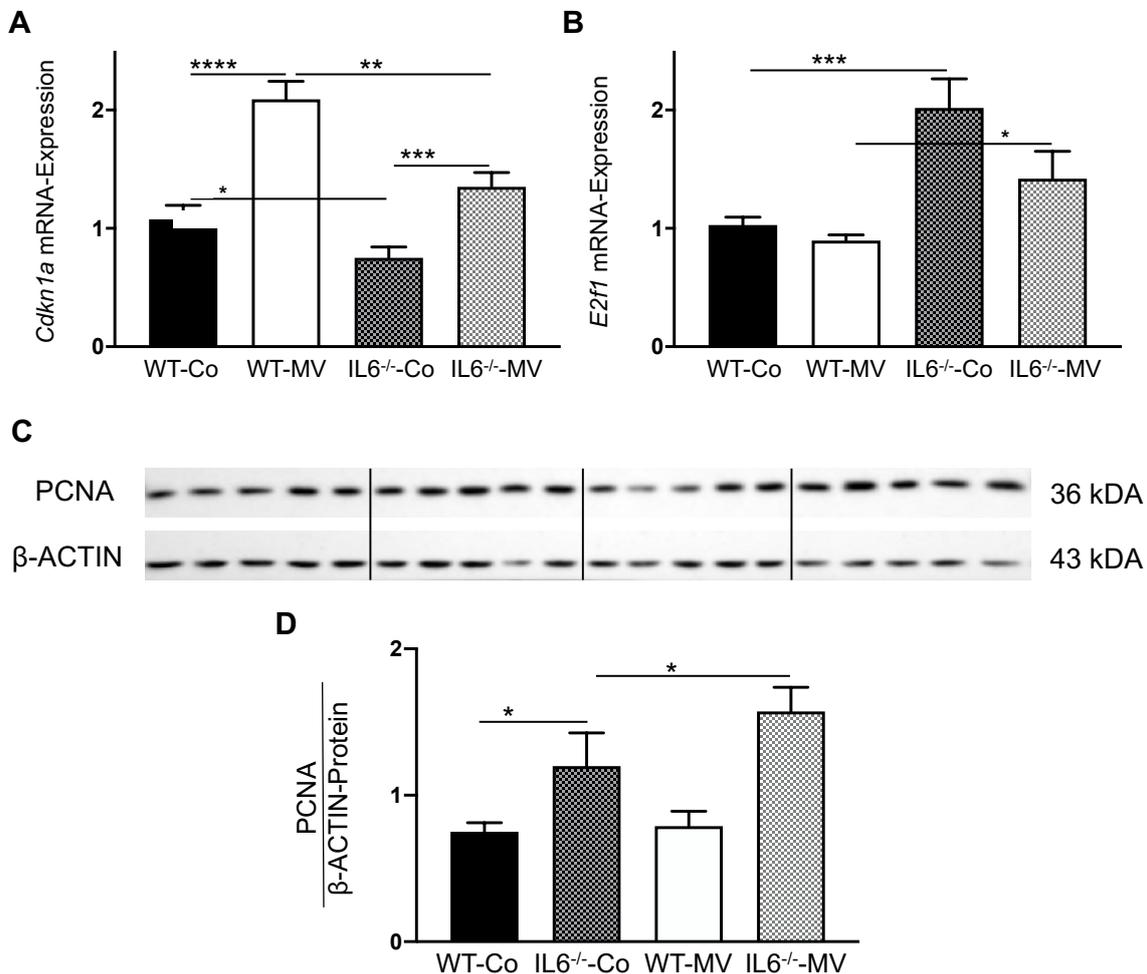


Abbildung 17: Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) *Cdkn1a* und B) *E2f1* und der PCNA-Proteinmenge (C) nach 8h mechanischer Beatmung (MV) mit grafischer Darstellung der densitometrischen Western-Blot-Analyse (D). A + B: Housekeeping-Gen: *Actb*. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 14 – 15); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 11); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 15); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 7 – 8). Student's t-Test. **C + D:** Ladungskontrolle: β-ACTIN. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 5); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 5); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 5); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 5). Mann-Whitney-U-Test. **A – D:** p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert ± SEM.

Unsere Untersuchungsdaten konnten eine für die Interventionsgruppen (WT-MV und IL-6^{-/-}-MV) im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe relevant erhöhte *Cdkn1a*-Expression belegen. Dies indiziert für das vorliegende Schädigungsmodell einen stressbedingten Zellzyklusarrest^{217,218} und kann als frühes Anzeichen einer beatmungsbedingten vorzeitigen Seneszenzinduktion im Nierengewebe in Betracht kommen^{224,225}. Der *Il6*-Knockout attenuierte diesen Beatmungseffekt und führte *per se* (WT-Co vs. IL6^{-/-}-Co) zu einer reduzierten renalen

Cdkn1a-Expression (s. Abb. 17 (A)). Inwiefern dies als renoprotektiv gewertet werden kann, wird im Diskussionsteil erörtert werden (s. Abschnitt 4.3.2.1).

Erwartungsgemäß verhielt sich das beobachtete *E2f1*-Expressionslevel gegenläufig zu der gemessenen *Cdkn1a*-Expression: Es zeigte sich kein relevanter Beatmungseffekt in Wildtyp- und Knockout-Nieren (bei Tendenz in Richtung niedrigerer Expression in den beatmeten Tieren), die *Il6*-defizienten Gruppen zeigten jedoch eine insgesamt signifikant höhere *E2f1*-Transkriptionsrate als die Wildtypen (s. Abb. 17 (B)).

Ähnlich verhielten sich die gemessenen PCNA-Proteinexpressionslevel im Gruppenvergleich: Es ließ sich ebenfalls kein Beatmungseffekt im Sinne einer renalen Über- oder Unterexpression nach MV feststellen, der *Il6*-Knockout resultierte zudem unabhängig von der Beatmungsintervention in einem insgesamt höheren PCNA-Level (s. Abb. 17 (C – D)). Somit lässt sich auf einen proliferationsfördernden Effekt des Knockouts auf das neonatale Nierengewebe schließen.

3.2.2 Untersuchung einer möglichen Störung der mitochondrialen Biogenese als Anzeichen für oxidativen Stress nach 8h MV

Da im Rahmen eines Entzündungsgeschehens zudem vermehrt oxidativer Stress entsteht^{234,235} – also ein metabolisches Ungleichgewicht zwischen anfallenden reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) und neutralisierenden, antioxidativen Kompensationsmechanismen der Zellen^{236,237} – wurde zudem eine potenzielle mitochondriale Dysregulation in den Nierenzellen unter mechanischer Beatmung untersucht.

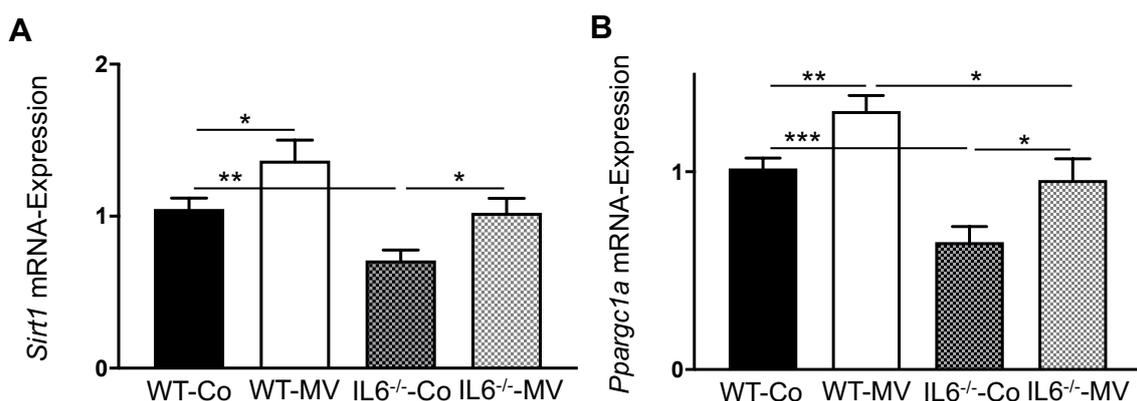


Abbildung 18: Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) *Sirt1* und B) *Ppargc1a* nach 8h mechanischer Beatmung (MV). Housekeeping-Gen: *Actb*. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 14 – 15); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 11); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 15); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 7 – 8). Student's t-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert ± SEM.

Dazu bestimmten wir die Transkriptionsrate der mitochondrialen Marker *Sirt1* und *Ppargc1a* (s. Abb. 18), denn die Mitochondrien gelten als eine Hauptentstehungsquelle für die aggressiven ROS^{238,239} und sind ihrerseits auch besonders anfällig für oxidativen Stress^{240,241}.

Das Gen *Sirt1* codiert für die Histon-Deacetylase Sirtuin-1, der eine wichtige Rolle in der Regulation verschiedener antioxidativer Faktoren und der Aufrechterhaltung einer normalen mitochondrialen Funktion zugeschrieben wird^{242–244}. Sie steigert bei Energiebedarf oder oxidativem Ungleichgewicht unter anderem die Expression und Aktivität des sogenannten *Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma Coactivator 1-α* (PGC-1α, Gencode *Ppargc1a*)²⁴⁵, der als „Masterregulator“ der mitochondrialen Biogenese gilt^{243,246}. Aktives PGC-1α kann daraufhin in den Zellkern translokieren und dort die Transkription verschiedener, auch antioxidativer Zielgene veranlassen²⁴⁷.

Die von uns gemessenen Expressionslevel von *Sirt1* und *Ppargc1a* verhielten sich im Gruppenvergleich gleichsinnig: Die mechanische Beatmung führte sowohl in den Wildtyp-, als auch in den Knockout-Mäusen zu einer statistisch relevanten Expressionssteigerung. Insgesamt fiel die Genexpression beider Marker (wie bereits für die *Cdkn1a*-mRNA-Expression geschildert) in den Knockout-Nieren zudem signifikant geringer aus als im Wildtypgewebe (s. Abb. 18). Es lässt sich also eine oxidative Belastung des neonatalen Nierengewebes unter postnataler MV vermuten, die durch die Blockade des IL-6-Signalwegs geringer auszufallen scheint (s. Diskussion, Abschnitt 4.3.2.1)

3.3 Postnatale MV reguliert die Genexpression von Podozytenmarkern im neonatalen Nierengewebe

Weil außerdem ein adverser Effekt von IL-6 auf die Struktur und Funktion der Podozyten (s. Abb. 1) vorbeschrieben ist, schien eine beatmungsbedingte Schädigung dieser denkbar. Deswegen bestimmten wir im nächsten Schritt die mRNA-Expression der Podozytenmarker Synaptopodin (Gencode *Synpo*), Podoplanin (Gencode *Pdprn*) und Podocin (Gencode *Pdcdn*) (s. Abb. 19).

Synaptopodin ist ein Aktin-assoziiertes Protein, welches in den Fußfortsätzen der Podozyten vorkommt²⁴⁸. Es spielt eine wichtige Rolle für die Funktionsfähigkeit und Integrität des podozytären Zytoskeletts, sowie bei der Abwehr oxidativer Schädigungsmechanismen innerhalb der Podozyten^{249–251}. Podoplanin wird seinerseits in der podozytären Zellmembran exprimiert²⁵² und ist für die regelrechte Interaktion der Fußfortsätze und damit die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere von Bedeutung²⁵³. Die Expression des Proteins Podocin kann wiederum als podozytäres Reifezeichen herangezogen werden, da es in den Podozyten erst zu einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium gebildet wird²⁵⁴.

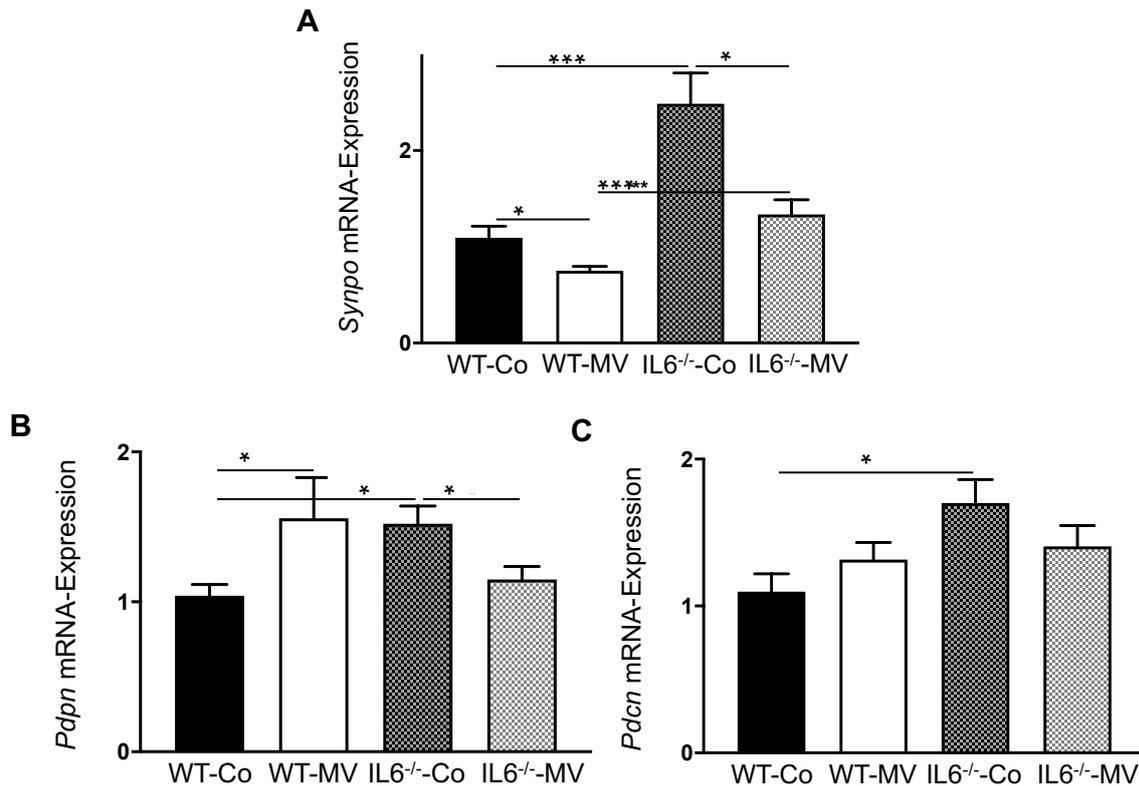


Abbildung 19: Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) *Synpo*; B) *Pdpn* und C) *Pdcn* nach 8h mechanischer Beatmung (MV). Housekeeping-Gen: *Actb*. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 14 – 15); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 11); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 15); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 7 – 8). Student's t-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert ± SEM.

In den Nieren der von uns beatmeten Wildtyp-Mäuse zeigte sich im Vergleich zu den unbeatmeten Kontrollen eine signifikante Transkriptionsabnahme von *Synpo* (s. Abb. 19 (A)), sowie eine signifikante Transkriptionssteigerung von *Pdpn* (s. Abb. 19 (B)). Die mechanische Beatmung (MV) hatte jedoch keine statistisch relevante Auswirkung auf die *Pdcn*-Genexpression (s. Abb. 19 (C)).

Auffällig waren zudem die in den *Il6*-Knockout-Nieren insgesamt signifikant höheren mRNA-Level aller drei Marker (s. Abb. 19 (A – C: WT-Co vs. IL6^{-/-}-Co)). Ansonsten konnte festgestellt werden, dass die Transkriptionslevel von *Pdpn* und *Pdcn* in den Nieren der beatmeten Knockout-Tiere im Gegensatz zum Wildtyp-Pendant postinterventionell abfielen (s. Abb. 19 (B + C: WT-MV vs. IL6^{-/-}-MV)).

3.4 Möglicher Pathomechanismus der podozytären Schädigung unter postnataler MV: Hinweise auf eine ROS-vermittelte β -Catenin-Aktivierung im neonatalen Nierengewebe

In verschiedenen Publikationen konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Podozyten besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress sind^{255,256}, sondern auch, dass dieser Zusammenhang pathomechanisch u. a. auf eine renale β -Catenin-Aktivierung zurückgeführt

werden kann^{255,257}. Entsprechend untersuchten wir nach Feststellung des oben beschriebenen Beatmungseffekts auf die podozytäre Genexpression im nächsten Schritt die renale β -CATENIN-Expression unserer Versuchstiere (s. Abb. 20).

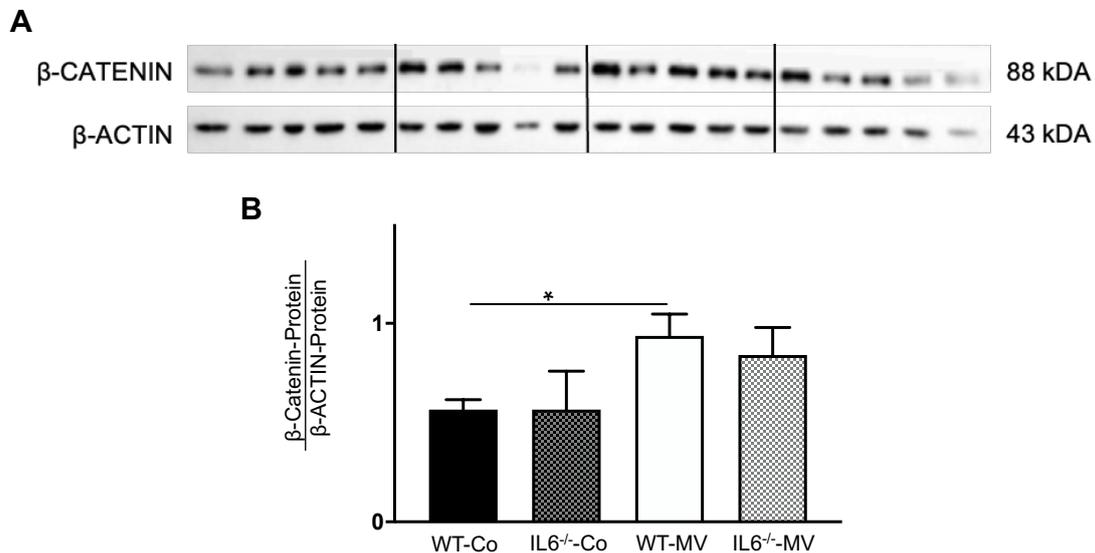


Abbildung 20: Messung der β -CATENIN-Proteinmenge nach 8h mechanischer Beatmung (MV) (A) mit grafischer Darstellung der densitometrischen Western-Blot-Analysen (B). Ladungskontrolle: β -ACTIN. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 5); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 5); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 5); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 5). Mann-Whitney-U-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert \pm SEM.

Die festgestellte signifikante Steigerung des β -CATENIN-Expressionsniveaus in den Nieren der beatmeten Wildtyp-Mäuse (s. Abb. 20 (B)) stützte unsere Annahme einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und konsekutiven Podozytenschädigung unter postnataler MV (s. o.). Zudem zeigte sich auch hier ein tendenziell attenuierender Effekt des *Il6*-Knockouts auf die vermutete renale β -Catenin-Aktivierung.

3.5 Postnatale MV reguliert die Genexpression von Fibrosemarkern im neonatalen Nierengewebe

Da die bisher präsentierten Untersuchungsergebnisse eine beatmungsbedingte Entzündungsreaktion im neonatalen Nierengewebe belegen und Hinweise auf daraus resultierenden oxidativen Stress liefern konnten, bestimmten wir im nächsten Schritt mittels qRT-PCR die renale mRNA-Expression der profibrotischen Mediatoren *Plasminogen Activator Inhibitor Type 1* (PAI-1, Genname *Serpine1*) und *Connective Tissue Growth Factor* (Genname *Ctgf*) (s. Abb. 21). Denn sowohl Inflammation als auch oxidativer Stress sind in der Literatur hinreichend als Anstoß für bindegewebige Umbauprozesse in der Niere beschrieben worden²⁵⁸⁻²⁶⁰, welche wiederum als gemeinsame Endstrecke chronischer Nierenerkrankungen gelten^{261,262}. Uns interessierte entsprechend, ob wir Hinweise auf einen potenziell langfristig

programmierenden Effekt der postnatalen Beatmungsintervention im Sinne einer frühzeitigen renalen Fibroseinduktion würden finden können.

PAI-1 ist im klinischen Kontext vornehmlich für seine hämostatische Funktion als wichtigster Inhibitor der fibrinolytisch wirksamen Enzyme *Tissue Plasminogen Activator* (tPA) und *Urokinase Plasminogen Activator* (uPA) bekannt^{263,264}. Als Gegenspieler der Plasminogenaktivatoren inhibiert PAI-1 jedoch auch verschiedene Matrixmetalloproteinasen, wodurch es bei vermehrter Expression eine Akkumulation der Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) begünstigt^{265,266}. Neben proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und IL-1 β ²⁶⁷, induziert auch der *Transforming Growth Factor* (TGF)- β eine renale PAI-Induktion. TGF- β gilt in der Niere als zentraler Entstehungsfaktor für tubulointerstitielle Fibrose und Glomerulosklerose^{268,269} und ist dabei auf CTGF als wichtigen *downstream* Effektor angewiesen²⁷⁰.

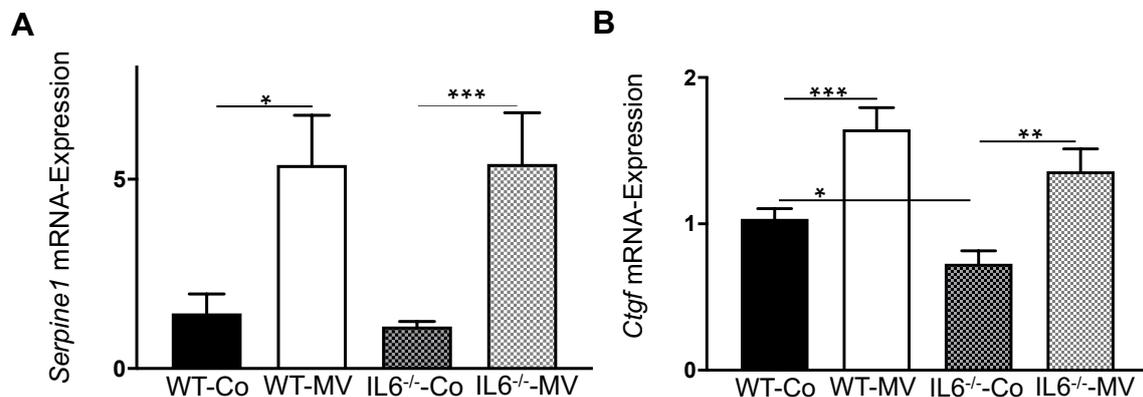


Abbildung 21: Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) *Serpine1* und B) *Ctgf* nach 8h mechanischer Beatmung (MV). Housekeeping-Gen: *Actb*. Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 14 – 15); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 11); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 15); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 7 – 8). Student's t-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert \pm SEM.

Trotz der relativ kurzen Interventions- und Beobachtungsdauer von acht Stunden konnte bereits zum vorliegenden Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Anstieg der Transkriptionsrate beider Fibrosemarker festgestellt werden (s. Abb. 21 (A + B)). Die *Il6*-Defizienz verhinderte eine beatmungsinduzierte Mehrexpression der Fibrosemarker nicht, resultierte aber unabhängig von der Beatmungsintervention (WT-Co vs. IL6^{-/-}-Co) in einer insgesamt signifikant reduzierten renalen *Ctgf*-Expression (s. Abb. 21 (B)).

3.6 Strukturelle Effekte von postnataler MV auf das neonatale Nierengewebe

Abschließend untersuchten wir die akuten histopathologischen Beatmungseffekte, da wir neben einer möglichen Bindegewebsvermehrung eine beatmungsbedingte Ausreifungsstörung des neonatalen Nierengewebes sowie eine Schädigung der unreifen glomerulären Strukturen vermuteten.

3.6.1 Untersuchung von Anzahl und Durchmesser der Glomeruli nach 8h MV

Dazu wurden an PAS-gefärbten Nierenlängsschnitten zunächst die Glomeruli innerhalb der untersuchten Nierenkortextfläche ausgezählt und vermessen (s. Abb. 22), um zu überprüfen, ob bereits unmittelbar nach Beendigung der achtstündigen Beatmung ein Effekt auf die zahlenmäßige Nephrone Ausstattung und / oder eine hyperfiltrationsbedingte glomeruläre Hypertrophie auffallen würden (s. Abschnitt 1.2.2.1).

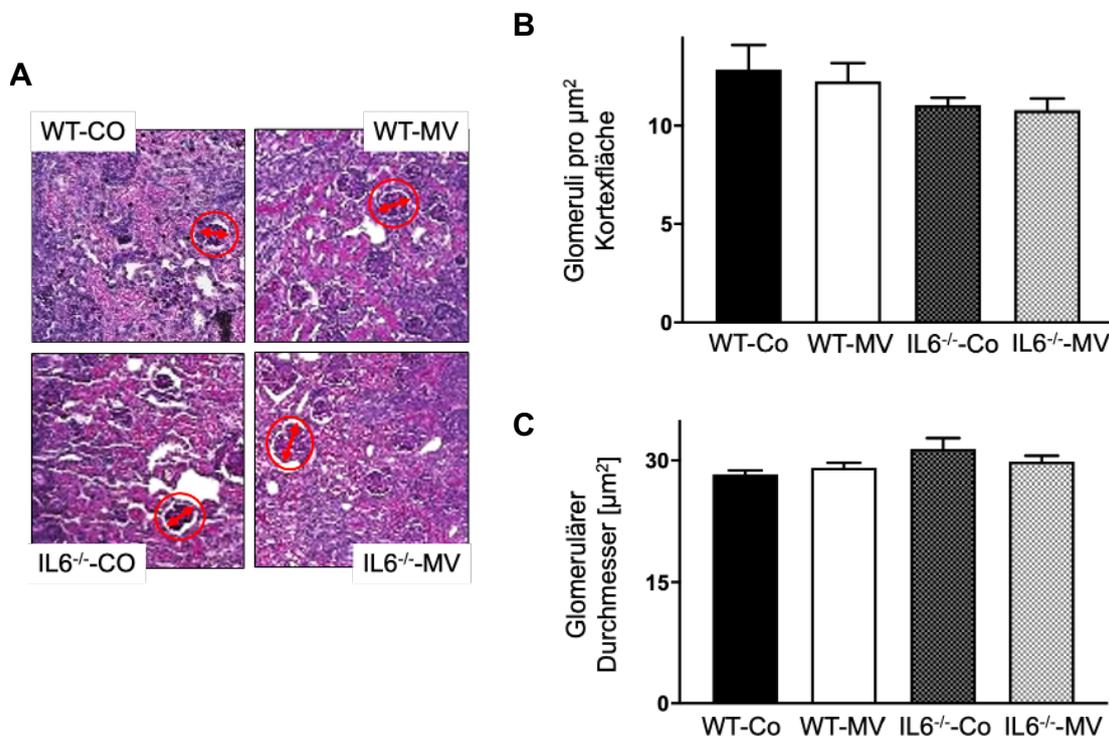


Abbildung 22: Repräsentative Bildausschnitte aus den untersuchten Nierenlängsschnitten mit exemplarischer Kennzeichnung der ausgewerteten glomerulären Strukturen (A). Gruppenvergleichende Gegenüberstellung des Durchschnittswerts der Anzahl erfasster Glomeruli innerhalb der untersuchten Nierenkortextfläche (B) und des glomerulären Durchmessers (µm) (C). Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 5); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 5); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 5); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 5). Mann-Whitney-U-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert ± SEM.

Wie aus Abbildung 22 hervorgeht, konnten jedoch diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Versuchsgruppen festgestellt werden, d. h. weder die Beatmung noch der *Il6*-Knockout hatten zum vorliegenden Untersuchungszeitpunkt einen entsprechenden strukturellen Effekt auf das untersuchte Nierengewebe.

3.6.2 Untersuchung des strukturellen Aufbaus der Nierenkortexregion nach 8h MV

Um zuletzt noch eine mögliche Ausreifungsstörung der nephrogenen Zone nach Beatmung oder eine stressbedingte kompensatorische Hypertrophie kortikaler Strukturen¹⁰ zu erfassen, wurde abschließend das Flächenverhältnis zwischen nephrogener Zone (also unreifem Kortexanteil), Nierenkortex und Gesamtnierenfläche bestimmt (s. Abb. 23).

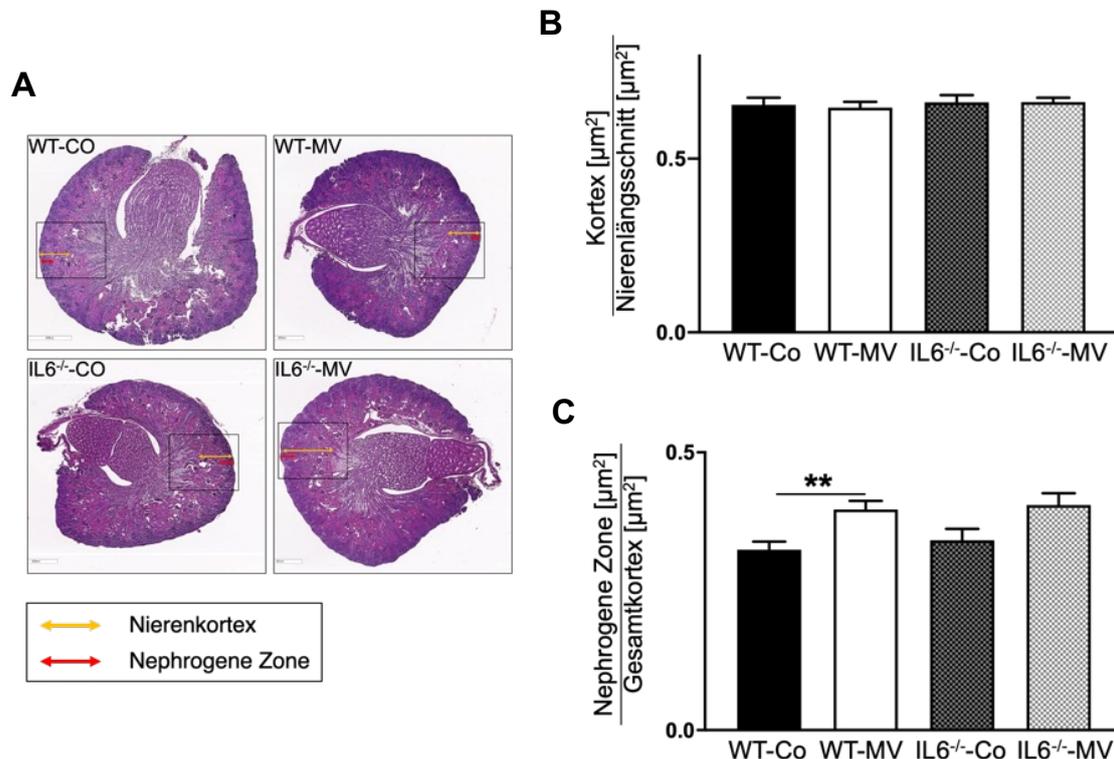


Abbildung 23: Repräsentative Nierenlängsschnitte mit exemplarischer Kennzeichnung der nephrogenen Zone bzw. des Nierenkortex (A). Gruppenvergleichende Gegenüberstellung des durchschnittlichen Flächenverhältnisses von kortikaler zu Gesamtfläche (B) und nephrogener Zone zu Gesamtkortex (C). Versuchstiere (postnataler Tag 5, P5): unbeatmete Wildtyp-Kontrollmaus (WT-Co; n = 5); Wildtyp-Maus nach MV-Exposition (WT-MV^{8h}; n = 5); unbeatmete *Il6*-Knockout-Kontrollmaus (IL6^{-/-}-Co; n = 5); *Il6*-Knockout-Maus nach MV-Exposition (IL6^{-/-}-MV^{8h}; n = 5). Mann-Whitney-U-Test: p = 0,05 (*), p < 0,01 (**), p < 0,001 (***), p < 0,0001 (****). Grafische Darstellung als Mittelwert ± SEM.

Während kein relevanter Akuteffekt von Beatmung und *l* oder *Il6*-Defizienz auf das Rinden-Mark-Verhältnis innerhalb der vier Vergleichsgruppen festgestellt werden konnte (s. Abb. 23 (B)), zeigte sich in den Nieren der beatmeten Wildtypen eine breitere nephrogene Zone als in denen der unbeatmeten Kontrollen. Dieser Beatmungseffekt war in den Knockout-Nieren tendenziell zwar ebenfalls feststellbar, hier jedoch als statistisch nicht signifikant zu werten (s. Abb. 23 (C)).

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des akuten renalen Effekts von postnataler mechanischer Beatmung. Basierend auf den Vorarbeiten der AG Alcázar¹⁰ lag die Hypothese zugrunde, dass der hohen Inzidenz von neonatalen *Acute Kidney Injuries* unter Beatmung⁵ eine IL-6-vermittelte Entzündungsreaktion zugrunde liegen könnte. Eine Blockade des IL-6-Signalwegs wurde entsprechend als protektive Intervention angenommen.

Folgende Kernaussagen lassen sich aus den oben präsentierten Untersuchungsergebnissen am experimentellen neonatalen Mausmodell der mechanischen Beatmung ableiten:

- (1) Postnatale mechanische Beatmung induziert über IL-6 eine Aktivierung inflammatorischer Signalwege im neonatalen Nierengewebe (s. Abb. 12 bis 16).
- (2) Daraus resultieren, vermutlich als Ausdruck oxidativen Stresses, eine veränderte Genexpression zentraler Modulatoren der mitochondrialen Biogenese, sowie eine verminderte Expression zellzyklusregulierender Moleküle (s. Abb. 17 und 18).
- (3) Strukturell gesehen äußert sich Letzteres in einer Ausreifungsstörung der nephrogenen Zone (s. Abb. 23). Zudem deutet die veränderte Genexpression verschiedener Podozytenmarker auf eine beatmungsbedingte (möglicherweise oxidative) Schädigung der Podozyten hin (s. Abb. 19 und 20).
- (4) Angesichts der zusätzlich festgestellten frühzeitigen (wahrscheinlich in der Akutphase IL-6-unabhängigen) Mehrexpression profibrotischer Mediatoren *post interventionem* lässt sich ein langfristig adverser Effekt der postnatalen MV auf die Nierenstruktur und -funktion vermuten (s. Abb. 21).
- (5) Die Blockade des IL-6-Signalwegs konnte einige der o. g. Schädigungsmechanismen verhindern oder attenuieren und sollte daher als renoprotektive Interventionsmöglichkeit zur Prävention beatmungsbedingter Nierenschädigungen erwogen werden.

Abbildung 24 zeigt eine schematische Darstellung unseres auf diesen Erkenntnissen aufbauenden Arbeitsmodells:

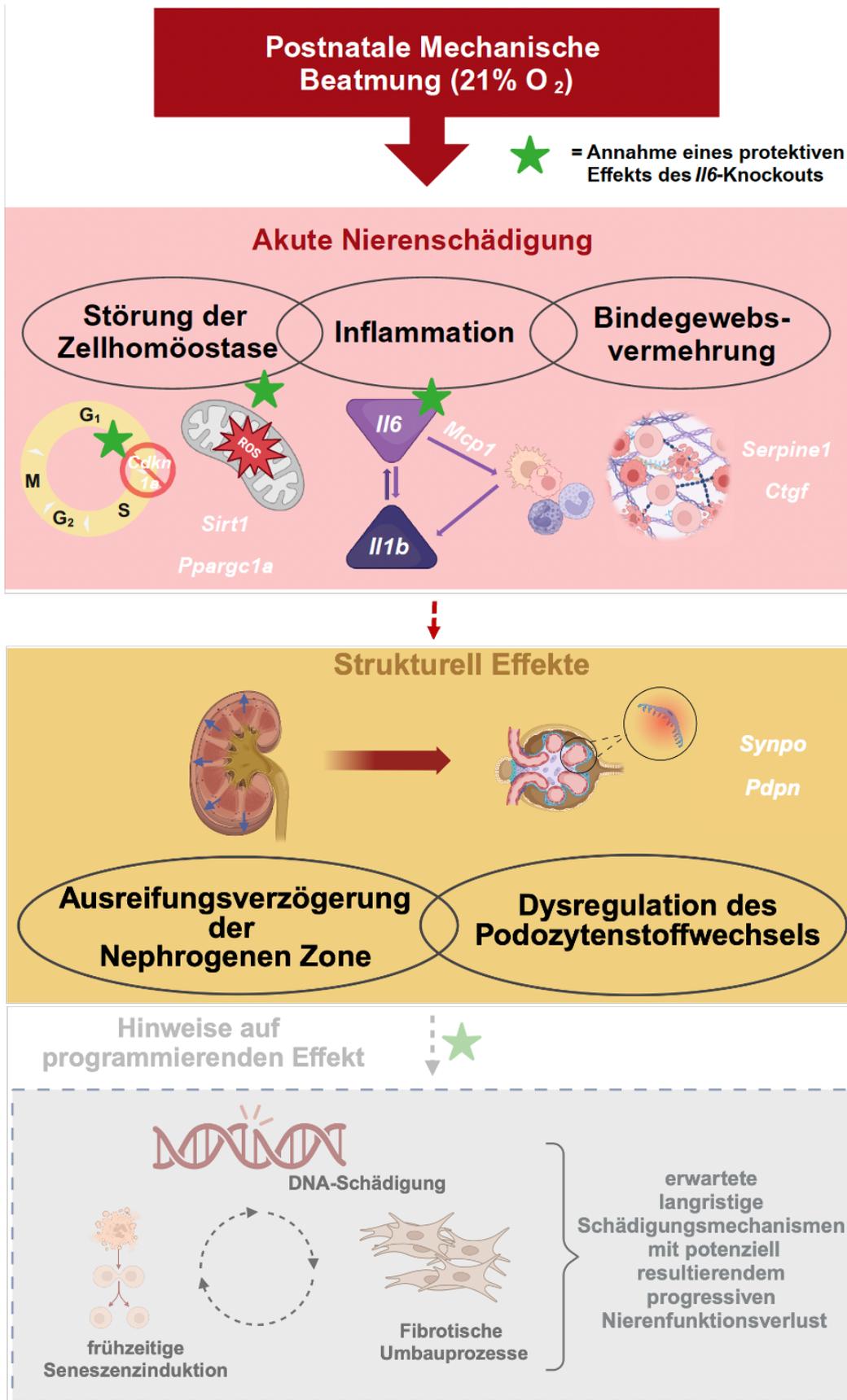


Abbildung 24. Schematische Ergebniszusammenfassung und schlussfolgerndes Arbeitsmodell. IL-6 initiiert unter postnataler mechanischer Beatmung ein lokales Inflammationsgeschehen im neonatalen Nierengewebe, welches mit einer Dysregulation der Zellhomöostase und Anstoßung profibrotischer Signalwege einhergeht. Eine Blockade des IL-6-Signalwegs attenuiert diese Entzündungsreaktion und könnte somit langfristige renale Folgeschäden reduzieren.

4.1 Klinische Relevanz: Warum ist die Erforschung beatmungsbedingter (neonataler) Nierenschädigungen bedeutsam für die klinische Praxis?

Bevor die diesem Arbeitsmodell zugrundeliegenden Untersuchungsergebnisse und Überlegungen vor dem Hintergrund des aktuellen Forschungsstands erörtert werden, soll zunächst kurz die klinische Ausgangslage, die uns zu unserem Projekt bewogen hat, rekapituliert werden. Denn die praktische Relevanz des Forschungsinhalts ist für eine sinnvolle und gerechte Ressourcenverteilung innerhalb der medizinischen Grundlagenforschung entscheidend, und sollte daher stets kritisch hinterfragt werden^{271,272}.

Erstens ist inzwischen hinreichend belegt, dass eine mechanische Beatmung nicht nur pulmonale Schäden verursacht, sondern u. a. auch *Acute Kidney Injuries* provozieren kann⁵⁻⁹. Obwohl diesbezüglich verschiedene Pathomechanismen diskutiert werden¹¹⁵ (s. Abschnitt 1.3), gibt es in der klinischen Versorgung bisher noch keine etablierten Maßnahmen zur Prävention oder Abmilderung dieses Beatmungseffekts²⁷³.

Dies mutet umso prekärer an, als akute Nierenschädigungen zweitens nachweislich mit einem erhöhten Risiko für die langfristige Entstehung bzw. den Progress einer CKD einhergehen^{14-16,274}. Frühgeborene stellen dabei eine besondere Risikogruppe dar (s. Abschnitt 1.2.2), denn ihre Nierenunreife geht mit einer hohen Vulnerabilität gegenüber reoadversen Umweltfaktoren einher und prädisponiert für langanhaltende strukturelle und funktionelle Folgen einer frühen Stressexposition (*Developmental Origins of Health and Disease*)⁷⁸. In der neonatologischen Patientenversorgung tut sich insofern ein Dilemma auf: Während eine mechanische Beatmung zur Sicherstellung eines suffizienten Gasaustausches bei Lungenunreife weiterhin eine lebensrettende Intervention darstellen kann¹⁻⁴ (s. Abschnitt 1.3), muss zugleich ihr gesamtes iatrogenes Schädigungspotenzial bedacht und adressiert werden. Der Aspekt des Risikos für eine beatmungsbedingte akute Nierenschädigung und die daraus resultierende langfristige Entstehung eines chronischen Nierenfunktionsverlusts ist dabei zu lange vernachlässigt worden^{115,275,276}.

Hier besteht also dringender Handlungsbedarf, da die klinische Relevanz von *Ventilation-Induced Kidney Injuries* mit der steigenden Frühgeborenenrate eher zu- als abnehmen wird^{58,59}. Insbesondere, wenn man sich neben der resultierenden Akutmorbidität und -mortalität^{56,277} die potenziell vermeidbaren langfristigen Folgen und einhergehenden enormen gesundheitsökonomischen Kosten vor Augen führt^{278,279}, liegt die Notwendigkeit für die Entwicklung zielgerichteter präventiver Maßnahmen auf der Hand. Dazu hoffen wir mit unserem Forschungsprojekt beitragen zu können.

4.2 Untersuchung des renalen Effekts einer postnatalen MV an der neugeborenen Maus: Welche translationalen Chancen und Hindernisse sind zu berücksichtigen?

Bevor unsere Untersuchungsergebnisse im Einzelnen diskutiert werden, soll kurz das zugrundeliegende tierexperimentelle Studiendesign (s. Abschnitt 2.1) hinsichtlich seiner translationalen Aussagekraft geprüft werden. Denn pathophysiologische Erkenntnisse, die am Tiermodell generiert wurden, sind in der Regel nur bedingt auf den menschlichen Organismus übertragbar²⁸⁰. Im Vergleich zu *In-vitro*-Modellen weisen Tierversuche (trotz strenger personeller und ethischer Auflagen) gleichwohl einige translationale Vorteile auf, welche sie für die humanmedizinische Grundlagenforschung weiterhin unabdingbar machen. Allem voran steht dabei die Beurteilbarkeit komplexer Wechselwirkungen verschiedener Systeme und Einflussfaktoren innerhalb eines Gesamtorganismus (wie der pulmorenalen Interaktion unter mechanischer Beatmung im vorliegenden Fall)^{281,282}.

Die Maus als Modellorganismus bietet sich für die nephrologische Grundlagenforschung insofern an, als eine ausreichend große Verwandtschaft zur menschlichen Nierenentwicklung, -anatomie und -physiologie besteht^{42,283}. Hinzu kommt die Möglichkeit der gezielten genetischen Manipulation von Mäusen, was uns den Einschluss *Il6*-defizienter Versuchstiere¹⁰⁻¹² (s. Abschnitt 2.1) und damit die spezifische Untersuchung der Rolle von IL-6 für die Pathogenese der postnatalen beatmungsbedingten Nierenschädigung ermöglicht hat.

Durch die Untersuchung neonataler Mäuse, deren Nierenentwicklung noch nicht vollendet war, wurde zudem eine Übertragbarkeit auf menschliche Frühgeborene angestrebt⁴⁹⁻⁵¹ (s. Abschnitt 1.1.2). Diese ist allerdings dadurch begrenzt, dass eine echte Frühgeburtlichkeit mit komplexen Beeinträchtigungen fast aller Organsysteme einhergeht⁶⁴⁻⁶⁶, die bei den von uns untersuchten reifgeborenen Mäusen nicht vorlag. Zudem sei auch kritisch darauf hingewiesen, dass zum vorliegenden Interventionszeitpunkt (P5) bereits von einer weitestgehend abgeschlossenen Nephrogenese in den untersuchten Mäusenieren auszugehen ist^{41,48}. Zur Überprüfung eines möglicherweise adversen Effekts der postnatalen Beatmung auf die quantitative Glomerulusausstattung ist unser Modell entsprechend nicht geeignet^{284,285}. Da die neu entstandenen Filtrationseinheiten zum Untersuchungszeitpunkt allerdings noch in struktureller Ausreifung begriffen waren⁴⁸, ist aber zumindest von einer erhöhten Stresssuszeptibilität der glomerulären Strukturen auszugehen, wie sie auch für menschliche Frühgeborene angenommen wird⁷⁷ (s. Abschnitte 1.2.2 und 1.2.2.1).

Was den von uns gewählten Beatmungsmodus (einschließlich Interventionszeitpunkt und -dauer, s. Abschnitt 2.1) betrifft, so wurde dieser bereits in anderen arbeitsgruppeninternen

Projekten erprobt^{132,176} und induziert nachweislich eine *Ventilation-Induced Lung Injury* (VILI) mit lokaler Inflammation und verminderter Alveolen- sowie Gefäßbildung^{174,286}. Es wurde somit einerseits sichergestellt, dass unsere Intervention die nötige Effektstärke zur wahrscheinlichen Induktion einer beatmungsbedingten Nierenschädigung haben würde (s. Abschnitt 1.3). Andererseits tut sich dadurch jedoch eine Diskrepanz zwischen unserem Modell und der klinischen Praxis auf, da in den aktuellen Leitlinienempfehlungen zur invasiven mechanischen Beatmung Frühgeborener ein lungenprotektiveres Prozedere vorgesehen ist²⁸⁷. Einschränkend muss zudem bedacht werden, dass eine exakte Übertragung der gängigen Beatmungsmodi von Mensch auf Maus und umgekehrt aufgrund von Unterschieden in Lungenaufbau und -physiologie letztlich nicht möglich ist^{288,289}.

Zuletzt sei darauf hingewiesen, dass die standardisierten und sterilen Abläufe in Tierhaltung und interventionellem Vorgehen sowie die enge genetische Verwandtschaft der Versuchstiere untereinander zwar entscheidend für eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sind und zudem die isolierte Untersuchung eines Schädigungsmechanismus unter Ausschluss potenzieller Störfaktoren ermöglichen. Es darf indes nicht vergessen werden, dass dadurch eine Vereinfachung stattfindet, die die realistische Beurteilung von gemessenen Effektstärken erschweren. So ist davon auszugehen, dass das Ausmaß einer renalen Schädigung unter Beatmung multifaktoriell bedingt ist und u. a. durch genetische Faktoren, individuelle (z. B. infektiöse) Grunderkrankungen oder die zusätzliche Exposition gegenüber weiteren nierenschädlichen Stressoren (z. B. nephrotoxischer Medikamentenverabreichung) mitbeeinflusst wird^{5,54,275}.

4.3 Welcher Erkenntnisgewinn ergibt sich durch unsere Forschung bezüglich der Pathophysiologie der postnatalen beatmungsbedingten Nierenschädigung?

Da in der Literaturrecherche zum Thema beatmungsbedingte Nierenschädigung allerdings auffällt, dass die meisten Publikationen sich auf die Erfassung einer systemischen Entzündungsreaktion unter Beatmung und deren Korrelation mit der Auftretenswahrscheinlichkeit einer AKI beschränken¹²⁹, sind modellbasierte präklinische Forschungsprojekte wie dieses trotz translationaler Einschränkungen durchaus sinnvoll, um unser lückenhaftes Verständnis der sich innerhalb der Niere abspielenden Schädigungsmechanismen zu verbessern.

4.3.1 Postnatale MV initiiert eine akute, IL-6-vermittelte Inflammation im neonatalen Nierengewebe

So war zwar bereits bekannt, dass eine mechanische Beatmung eine Mehrexpression proinflammatorischer Mediatoren im Nierengewebe bewirken kann. In den entsprechenden

Arbeiten wurden jedoch unseres Wissens ausschließlich adulte Versuchstiere untersucht^{175,197}. Bei diesen zeigte sich nach vierstündiger Ventilation im Gegensatz zu den von uns ventilerten neugeborenen Mäusen (s. Abb. 12) noch keine Steigerung der renalen IL-6-Expression¹⁹⁷. Unsere Untersuchungen indizieren also eine größere renale Effektstärke der Beatmung im neonatalen Setting und stützen somit die Annahme einer höheren Vulnerabilität der unreifen Niere (s. o.).

Darüber hinaus sehen wir unsere Annahme einer zentralen Rolle von IL-6 für die Entstehung und Unterhaltung einer renalen Entzündungsreaktion unter postnataler Beatmung bestätigt. Denn zusätzlich zu der frühen Aktivierung des IL-6-Signalwegs (s. Abb. 12, 13, 15) stellten wir auch eine signifikante renale *Mcp1*- und *Il1b*-Transkriptionssteigerung fest, die durch den *Il6*-Knockout jeweils effektiv verhindert werden konnte (s. Abb. 13). Führt man sich die in der Literatur beschriebenen IL-6-Wirkmechanismen vor Augen, ist der Ablauf dieser Entzündungsreaktion etwa wie folgt denkbar (s. Abb. 24): Die Aktivierung des IL-6-Signalwegs resultiert wahrscheinlich (wie verschiedentlich vorbeschrieben) in einer MCP-1 Expressionssteigerung^{290,291}, woraufhin anzunehmen ist, dass das besagte Chemokin eine vermehrte Einwanderung von Monozyten in das Nierengewebe bewirkt²⁹¹⁻²⁹³. Daraufhin ist eine monozytäre Ausdifferenzierung zu Makrophagen anzunehmen, welche bekanntlich ebenfalls durch IL-6 gefördert wird und zudem eine zusätzliche IL-6-Expression bedingen könnte¹³⁹. Außerdem gelten Makrophagen als wichtige IL-1 β -Produzenten^{294,295}, es ergibt sich also ein möglicher Erklärungsansatz für den Zusammenhang der beobachteten *Il6*- und nachfolgenden *Il1b*-Transkriptionssteigerung (s. Abb. 12, 13). Da IL-1 β seinerseits als wichtiger IL-6-Stimulus dokumentiert ist^{202,203,207}, gehen wir im Verlauf von einer wechselseitigen Induktion der Entzündungsmediatoren aus. Unsere Untersuchungsergebnisse legen etwa eine NF- κ B-Aktivierung nahe (Abb. 14), die typischerweise im Zuge einer IL-1 β -Signalgebung erfolgt und in der Regel eine Steigerung der *Il6*-Transkription nach sich zieht^{202,203,207}.

Um unsere Vermutung eines mechanistischen Zusammenhangs zwischen der beobachteten IL-6- und IL-1 β -Induktion zu überprüfen, sind allerdings weiterführende Untersuchungen notwendig. Unter anderem wäre etwa ein Nachweis der angenommenen Immunzellinvasion und -differenzierung wünschenswert. Zusätzlich könnte etwa auch eine Inflammasombeteiligung am beobachteten Entzündungsgeschehen untersucht werden. Denn diese multimeren Proteinkomplexe²⁹⁶ sind nicht nur generell für die proteolytische IL-1 β -Aktivierung verantwortlich^{297,298}, sondern auch maßgeblich an der Entstehung pulmonaler

⁴ Der Oberbegriff *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs) bezeichnet nicht-mikrobielle, endogene Zellkomponenten (z. B. ROS), die nach Zellschaden oder -untergang vermehrt aus dem Zytosol freigesetzt werden und von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems als Antigene erkannt werden³⁰⁰⁻³⁰³.

Beatmungsschäden beteiligt²⁹⁹. Außerdem ist bekannt, dass eine stressbedingte vermehrte Freisetzung von sogenannten *Damage Associated Molecular Patterns* (DAMPs)⁴ im Nierengewebe – z. B. unter mechanischer Beatmung – ebenfalls zu einer Inflammation führen kann^{300–303}. Es ergibt sich also weiteres Forschungspotenzial (s. Ausblick).

4.3.2 Postnatale MV hat einen potenziell programmierenden Effekt auf das neonatale Nierengewebe

Zudem muss die Frage nach der (langfristigen) Konsequenz dieses Entzündungsgeschehen auf die Nierengesundheit gestellt werden. Denn Entzündung *per se* ist nicht zwangsläufig pathologisch, sondern kann der Elimination verschiedenster Noxen sowie der Reparatur geschädigten Gewebes dienen^{167,304}. Im Zuge anhaltender oder überschießender Immunreaktionen werden hingegen vorzeitige Zellalterungsprozesse und eine progressive Fibrosierung angestoßen, woraus ein dauerhafter Funktionsverlust des betroffenen Gewebes resultiert^{258,304,305}.

Solche adversen Entzündungsfolgen sind auch für *Ventilation-Induced Kidney Injuries* anzunehmen. Denn die mechanische Beatmung provoziert durch resultierenden Zellstress die Freisetzung endogener Antigene (DAMPs), wodurch es zu einer sterilen Inflammation (inklusive Inflammation, s. o.) kommen kann^{306,307}. Als sterile Inflammation wird eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems in Abwesenheit pathogener Mikroorganismen bezeichnet, die durch das vermehrte Auftreten von DAMPs initiiert und aufrechterhalten wird³⁰⁸. Da die provozierte Immunreaktion unter Fortlaufen der MV nicht resolviert werden kann, sondern durch anhaltende DAMP-Entstehung weiter befeuert wird, ist sie also am ehesten als maladaptiv einzustufen^{300,308}. Entsprechend haben wir uns entschieden, das Nierengewebe unserer Versuchstiere auf mögliche frühe Anzeichen für langfristig programmierende Effekte der beobachteten Entzündungsreaktion hin zu untersuchen.

4.3.2.1 Postnatale MV stört den Zellzyklus und initiiert möglicherweise frühzeitige Alterungsprozesse im neonatalen Nierengewebe

Tatsächlich zeigten sich bereits unmittelbar im Anschluss an die achtstündige Beatmung messbare Auswirkungen auf den Zellzyklus und -metabolismus in den Nieren der untersuchten Wildtyp-Mäuse. Die unter Beatmung festgestellte Mehrexpression der mitochondrialen Marker *Sirt1* und *Ppargc1a* (s. Abb. 18) indiziert eine Dysregulation des zellulären Stoffwechsels und kann mit einer vermehrten Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies assoziiert sein^{10,243,309–311}. Oxidativer Stress ist eine häufige Nebenerscheinung inflammatorischer Prozesse^{234,235} und kann (mitunter irreversible) DNA-Schäden verursachen^{312–314}. Ein direkter Nachweis solcher

Schäden erfolgte im Rahmen des aktuellen Projekts zwar nicht (s. Ausblick). Die ebenfalls gemessene Transkriptionssteigerung des p21-Gens *Cdkn1a* (s. Abb. 17) deutet jedoch bereits auf einen stressbedingten Zellzyklusarrest hin^{217,218} und ist gut mit der Annahme oxidativer Schäden vereinbar^{315,316}.

Allerdings werden für eine gesteigerte p21-Expression im Kontext akuter Organschäden aktuell sowohl positive als auch negative Konsequenzen diskutiert: Einerseits wird angenommen, dass durch die Hochregulation des antiproliferativen Signalmoleküls mehr Zeit für die Reparatur geschädigter DNA-Sequenzen bleibt, sodass ein apoptotischer Zelluntergang minimiert und maligne Entartungsprozesse verhindert werden können. Diese protektive, homöostatische Funktion von p21 konnte am Mausmodell sowohl für AKI^{218,317}, als auch für pulmonale Beatmungsschäden³¹⁸ gezeigt werden. Andererseits gilt p21 aber auch als Marker für zelluläre Seneszenz^{224,225}, also einem permanenten Zellzyklusarrest in Folge von über die Zeit akkumulierter DNA-Schäden^{319,320}. Sowohl Inflammation (und insbesondere IL-6)^{321–323}, als auch oxidativer Stress^{324,325} sind als Auslöser für frühzeitige Zellalterung bekannt. Betroffene Zellen weisen charakteristische Veränderungen in Stoffwechsel und Struktur auf und sekretieren bestimmte Faktoren (*Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP))³²⁶, zu denen auch die von uns untersuchten und in den Nieren der beatmeten Tiere vermehrt exprimierten Mediatoren IL-6, MCP-1, PAI-1 und CTGF zählen (s. Abb. 12, 13, 21)^{326–328}. Kurzfristig gesehen kann die dadurch angestoßene Entzündungsreaktion mit der einhergehenden Invasion von Immunzellen zur Beseitigung schwer geschädigter Zellen und Wiederherstellung der Gewebshomöostase beitragen^{329,330}. Allerdings können die rekrutierten Entzündungszellen oftmals nicht alle seneszenten Zellen abräumen³³¹. Eine andauernde Sekretion der SASP-Mediatoren kann dann wiederum Alterungsprozesse in benachbarten, ursprünglich gesunden Zellen initiieren^{328,332}. Da daraus letztlich eine Einschränkung der regenerativen Kapazität und die verstärkte Aktivierung bindegewebiger Umbauprozesse resultieren^{333–335}, gelten vorzeitige Alterungsprozesse als wichtiger pathogenetischer Faktor für chronische Nierenerkrankungen^{335–337}.

Zusammenfassend ergeben sich aus unseren bisher diskutierten Untersuchungen also einige Hinweise auf mögliche langfristige Folgen einer postnatalen Beatmung auf die Niere. Diesen sollte in künftigen Forschungsprojekten weiter nachgegangen werden (s. Ausblick).

4.3.2.2 Postnatale MV beeinflusst die Genexpression und Signalwege in den Podozyten des neonatalen Nierengewebes

Darüber hinaus sollte für Folgeprojekte auch eine immunhistochemische Untersuchung des strukturellen Beatmungseffekts auf die Podozyten in Betracht gezogen werden (s. Ausblick). Denn es ist ein adverser Effekt von IL-6 auf die Struktur und Funktion der Fußzellen

vorbeschrieben^{338,339}, und diese gelten zudem als besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress^{255,256}.

Aus diesem Grund erfolgte bereits im Rahmen des vorliegenden Projekts zunächst die Bestimmung der renalen β -CATENIN-Expression, da die Aktivierung des β -Catenin-Signalwegs aus einer vermehrten ROS-Produktion in der Niere resultieren und einen Podozytenumbau und -untergang nach sich ziehen kann^{255,257}. Die von uns festgestellte β -CATENIN-Mehrexpression (s. Abb. 20) spricht also ebenfalls für eine oxidative Belastung der Niere unter postnataler Beatmung und ging zudem, wie von Zhou et al.²⁵⁷ vorbeschrieben, mit einer signifikanten Abnahme der *Synpo*-Transkription einher (s. Abb. 19 (A)). Da ein Synaptopodinmangel mit einer vermehrten Produktion freier Sauerstoffradikale innerhalb der Podozyten assoziiert ist²⁴⁹ und für anhaltende strukturelle Podozytenschäden prädisponiert³⁴⁰, sehen wir unsere Vermutung einer inflammatorisch angestoßenen Fußzellbeeinträchtigung durch diese Ergebnisse gestützt.

Andererseits wird in der Literatur im Rahmen inflammatorischer Nierenschädigungen auch eine verminderte Podocin-Expression berichtet³⁴¹, die wir nach achtstündiger MV (auf mRNA-Ebene) nicht feststellen konnten (s. Abb. 19 (C)). Auffällig ist auch die von uns gemessene Hochregulation der *Pdpm*-Transkription nach Beatmung (s. Abb. 19 (B)), da in anderen AKI-Modellen im Gegensatz dazu eine Abnahme des podozytären Podoplanin-Levels festgestellt wurde^{252,342}.

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit denen der hier zitierten Publikationen ist jedoch durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden (im vorliegenden Projekt mittels qRT-PCR, in den zitierten Arbeiten mittels immun(histo)chemischer Nachweismethoden^{252,341,342}) nur eingeschränkt möglich, da sich die Genexpression nicht zwangsläufig in einer entsprechenden Proteinmenge widerspiegeln muss (dabei spielen Faktoren wie die individuelle Translationseffizienz oder die Proteinhaltzeit eine Rolle³⁴³, s. Abschnitt 4.5). Denkbar wäre jedoch etwa, dass die von uns festgestellte *Pdpm*-Expressionssteigerung Ausdruck einer transkriptionellen Kompensation eines ventilationsbedingten Proteinverlusts sein könnte. Da Podoplanin zudem kein podozytenspezifischer Marker ist, sondern z. B. auch in den Zellmembranen von lymphatischen Endothel³⁴⁴ und verschiedenen Immunzellen vorkommt^{345,346}, ist die beobachtete Mehrtranskription *post ventilationem* möglicherweise aber auch als weiteres Indiz für eine renale Entzündungsreaktion mit entsprechender Zellinvasion zu werten (s. Ausblick).

4.3.2.3 Postnatale MV verzögert die strukturelle Ausreifung und initiiert ein profibrotisches Expressionsmuster im neonatalen Nierengewebe

Bisher lässt sich festhalten, dass eine postnatale mechanische Beatmung im Nierengewebe ein IL-6-vermitteltes Entzündungsgeschehen verursacht, woraus oxidativer Stress und eine Interruption des renalen Zellzyklus zu resultieren scheinen.

Zusätzlich kann trotz des frühen Untersuchungszeitpunkts (unmittelbar im Anschluss an die achtstündige Intervention) eine signifikante Transkriptionssteigerung der profibrotisch wirkenden Mediatoren *Serpine1* und *Ctgf*^{268–270,347} berichtet werden (s. Abb. 21). Der Anstoß bindegewebiger Umbauprozesse ist, wie bereits erwähnt, eine wichtige maladaptive Entzündungsfolge^{258,348} und gilt zudem als gemeinsamer Pathomechanismus verschiedener Nierenpathologien, aus dem über die Zeit ein fortschreitender Nierenfunktionsverlust resultieren kann^{261,262}. Denn die kompensatorische Hyperfiltration der verbliebenen (nicht fibrotisch veränderten) Filtrationseinheiten führt ihrerseits zu glomerulärer Hypertrophie und strukturellen Kapillarschäden^{37,38} (s. Brenner-Hypothese, Abschnitt 1.2.2.1), wodurch eine voranschreitende Fibrosierung weiter angetrieben wird^{258–260}. Da unsere Untersuchungsergebnisse eine profibrotische Wirkung der postnatalen Beatmung auf das unreife Nierengewebe nahelegen, kann möglicherweise ein programmierender Effekt der Intervention auf die langfristige Nierengesundheit angenommen werden. Dabei spielt die strukturelle Nierenunreife unserer Versuchstiere eine besondere Rolle, weil eine postnatale Stressexposition die extrauterine Entstehung und Reifung neuer Glomeruli in Quantität und Qualität beeinträchtigen kann^{49–51,68–73} (s. Abschnitt 1.2.2). Entständen also unter postnataler Beatmung weniger und / oder strukturell auffällige Filtrationseinheiten, könnte dies gegebenenfalls einen frühzeitigen Anstoß des besagten *Circulus vitiosus* aus Hyperfiltration und glomerulärem Untergang bedeuten.

Allerdings konnten wir in der histopathologischen Untersuchungen unserer Nierenquerschnitte keinen signifikanten Effekt der postnatalen Beatmung auf die zahlenmäßige Nephronausstattung feststellen (s. Abb. 22). Bei der Bewertung dieser Beobachtung müssen jedoch zwei wichtige Einschränkungen unseres Modells (s. Abschnitte 4.2 und 4.5) bedacht werden: Erstens ist davon auszugehen, dass die Nephrogenese der untersuchten Tiere zum gewählten Interventionszeitpunkt (P5) bereits weitestgehend abgeschlossen war^{41,48}, sodass die Beatmung diesen Prozess primär gar nicht wesentlich beeinträchtigt haben kann. Und zweitens spiegeln unsere Daten aufgrund des kurzen Beobachtungszeitraums lediglich eine Momentaufnahme der akuten Schädigungsphase wider. Das heißt, dass ein potenzieller Nephronuntergang als längerfristige Folge der beatmungsbedingten Entzündungsreaktion nicht erfasst werden konnte.

Auch in den Publikationen von Staub et al.²⁸⁵ und Sutherland et al.³⁴⁹, in denen der renostrukturelle Effekt einer postnatalen MV jeweils am Lammmodell untersucht wurde, war die Nephronneubildung der untersuchten Tiere trotz Frühgeburtslichkeit bereits abgeschlossen, sodass eine ähnliche Limitation hinsichtlich der Einschätzung des quantitativen Beatmungseffekts auf die Glomerulusausstattung unter laufender Nephrogenese gegeben war. Jedoch berichten die Autoren eine beatmungsbedingte Beeinträchtigung des postnatalen kapillären Wachstums mit funktionell relevanter Reduktion der glomerulären Filtrationsoberfläche^{285,349}. Entsprechende Untersuchungen wurden für das vorliegende Projekt nicht vorgenommen. Stattdessen zielte unsere Bestimmung des durchschnittlichen glomerulären Durchmessers auf die Feststellung einer hyperfiltrationsbedingten Hypertrophie ab^{10,71,73}. Dass sich auch diesbezüglich kein signifikanter Beatmungseffekt zeigte (s. Abb. 22), ist wahrscheinlich wiederum auf den frühen Untersuchungszeitpunkt zurückzuführen. Denn auch die postnatale Sauerstoffexposition im Vorgängerprojekt unserer Arbeitsgruppe resultierte erst nach mehrwöchiger Latenz in einer Glomerulushypertrophie¹⁰ (s. Abschnitt 1.4.2).

Ein Vorteil des frühen Untersuchungszeitpunkts im vorliegenden Projekt liegt jedoch in der Möglichkeit der Beurteilung der nephrogenen Zone (also des noch in Reifung befindlichen Kortexabschnitts⁴⁵). Dass die Nieren der beatmeten Wildtyp-Mäuse im Vergleich zu den unbeatmeten Kontrollen einen größeren relativen Anteil unreifer Kortexabschnitte am Gesamtkortex aufwiesen (s. Abb. 23), lässt auf eine ventilationsbedingte Ausreifungsstörung innerhalb des neonatalen Nierengewebes schließen. In Zusammenschau mit der ebenfalls festgestellten Mehrexpression des p21-Gens *Cdkn1a* (s. Abb. 17) lässt sich diese strukturelle Auffälligkeit gut mit der oben erörterten Annahme eines stressbedingten (IL-6-vermittelten) Zellzyklusarrests in Einklang bringen (s. Abschnitt 4.3.2.1).

4.4 Ist IL-6 ein geeigneter Angriffspunkt für die zielgerichtete Prävention postnataler *Ventilation-Induced Kidney Injuries*?

Dieser reifungsverzögernde Beatmungseffekt zeigte sich zwar tendenziell auch in den Nieren unserer *Il6*-defizienten Versuchstiere (*IL6*^{-/-}-Co vs. *IL6*^{-/-}-MV), der Größenunterschied der nephrogenen Zone war hier jedoch als statistisch nicht signifikant zu bewerten (s. Abb. 23). Da der *Il6*-Knockout zudem mit einem signifikant geringeren *Cdkn1a*-Expressionsanstieg nach Beatmung und – unabhängig von der MV – einer höheren Expression von *E2f1* und PCNA einherging (s. Abb. 17), kann also ein proliferativer Effekt des Knockouts auf das unreife Nierengewebe vermutet werden. Auch die (unabhängig von der Beatmung) gesteigerte mRNA-Expression des Podozytenmarkers Podocin (s. Abb. 19) spricht für eine akzelerierte Reifungstendenz in den *Il6*-defizienten Nieren^{254,350}.

Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt unklar, ob dieser Knockouteffekt sich langfristig als renoprotektiv oder -advers erweisen würde. Denn wie oben beschrieben kann sich ein p21-vermittelter Zellzyklusarrest durchaus positiv auf das Outcome nach akuter Nierenschädigung auswirken^{218,317} (s. Abschnitt 4.3.2.1), während sein Ausbleiben in einer höheren Fehlerquote bei der zellulären Replikation und dadurch vermehrtem Zelluntergang resultieren kann³⁵¹. Um einen physiologisch-protectiven Effekt der p21-vermittelten Zellzyklusunterbrechung von einer beatmungsbedingten vorzeitigen Seneszenzinduktion, und damit den langfristigen Effekt des *Il6*-Knockouts (protectiv vs. advers) besser beurteilen zu können, sind folglich weitere Untersuchungen mit größerer Latenz zum akuten Schädigungsgeschehen indiziert (s. Ausblick).

Neben der Unklarheit bezüglich eines Vor- oder Nachteils des scheinbar reifungsakzelerierenden, proliferativen *Il6*-Knockout-Effekts, fiel in den entsprechenden Nieren auch die verminderte Transkriptionssteigerung von *Sirt1* und *Ppargc1a* nach Beatmung auf (s. Abb. 17). Dies könnte einerseits eine Reduktion des oxidativen Stresslevels durch Verhinderung des IL-6-vermittelten Entzündungsgeschehens anzeigen. Andererseits gilt eine Expressionssteigerung besagter Regulatoren im Kontext oxidativer und inflammatorischer Nierenschädigungen als protectiv^{243,309–311}, während ein PGC-1 α -Mangel in verschiedenen AKI-Modellen mit einem schlechten Outcome^{215,352,353} und bei CKD-Patienten mit einem höheren Fibrosierungsgrad der Niere assoziiert werden konnte³¹⁰. Interessanterweise zeigt sich zudem eine Diskrepanz zwischen der von uns in diesem Projekt festgestellten, herunterregulierenden Wirkung des Knockouts auf die renale mRNA-Expression von *Sirt1* und *Ppargc1a* und dem im Vorgängerprojekt von Jasmine Mohr et al.¹⁰ beschriebenen gegenteiligen Effekt nach postnataler Sauerstoffexposition. Die damaligen Untersuchungen resultierten in einer signifikant gesteigerten Transkription besagter Gene in den Nieren der *Il6*-Knockout-Mäuse im Vergleich zu den genetisch unmodifizierten Tieren. Außerdem zeigte sich eine effektive Unterdrückung der Hyperoxie-bedingten profibrotischen Prozesse in den *Il6*-Knockout-Nieren¹⁰, während unsere Expressionsbestimmung der Fibrosemarker *Serpine1* und *Ctgf* unmittelbar nach Beendigung der mechanischen Beatmung (noch) nicht auf einen antifibrotischen Effekt der *Il6*-Defizienz schließen ließ (s. Abb. 21). Eine solche Ergebnisdivergenz kann auf unterschiedliche Faktoren zurückzuführen sein, darunter das primäre Schädigungsausmaß und der Untersuchungszeitpunkt (so erfolgten die Untersuchungen im Vorgängerprojekt nach mehrwöchiger postnataler Sauerstoffexposition und wurden zudem zu einem späteren Zeitpunkt nach Beendigung der Stressexposition wiederholt¹⁰).

Zudem kann IL-6 je nach zeitlichem und situativem Kontext verschiedene, zum Teil gegenläufige Prozesse anstoßen³⁵⁴. Diese pleiotrope Wirkweise des Zytokins ist noch nicht abschließend erforscht, was in der therapeutischen Anwendung einer gezielten IL-6-Blockade zu Unsicherheiten bezüglich möglicher adverser Effekte auf den Gesamtorganismus führen kann - vor allem während vulnerabler Entwicklungsphasen³⁵⁵⁻³⁵⁷.

Andererseits umfasst das konventionelle Vorgehen bei (postnatalem) beatmungsbedingtem Biotrauma bzw. (neonatalen) AKIs insgesamt bisher keine spezifische Therapie^{56,358}. Stattdessen wird häufig auf eine kortikosteroidbasierte Immunsuppression zurückgegriffen, obwohl diese nachweislich mit verschiedenen, teilweise schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen einhergeht^{359,360}. Daher wird die Forderung nach zielgerichteten Therapieansätzen - auch in der neonatologischen Versorgung - zunehmend lauter^{273,361,362}. Das Zytokin IL-6 scheint insoweit ein geeigneter therapeutischer Angriffspunkt, als es in den letzten Jahren zunehmend als Schlüsselmediator im Kontext verschiedener entzündlicher Nierenpathologien^{10,350,363,364} (s. Abschnitt 1.4.2), sowie im Kontext pulmonaler und systemischer Beatmungsschäden^{126,129-132,171} identifiziert werden konnte. Außerdem haben klinische Studien im Rahmen der rezenten COVID-19-Pandemie gezeigt, dass die klinische Anwendung von IL-6-Rezeptor-Inhibitoren zu einer Mortalitätssenkung bei beatmungspflichtigen Patienten mit systemischer Entzündungsreaktion führen kann^{365,366}.

In der Summe lässt unser Nachweis einer effektiven Verhinderung der beatmungsbedingten Entzündungsreaktion im neonatalen Nierengewebe durch den *Il6*-Knockout (s. Abschnitt 3.1, Abb. 12 - 15) weiterführende Untersuchungen zur Klärung der langfristigen renalen Folgen einer *Il6*-Defizienz bzw. des renalen Effekts einer präventiven Anti-IL-6-Therapie (vor / unter Beatmung) sinnvoll und vielversprechend erscheinen (s. Ausblick).

4.5 Limitationen dieser Arbeit

Es wurde bereits mehrfach auf die translationalen Limitationen unseres Tiermodells eingegangen (s. insb. Abschnitt 4.2). Darüber hinaus wurde an einigen Stellen zusätzlich auf methodisch bedingte Einschränkungen der Aussagekraft unserer Ergebnisse verwiesen, die hier noch einmal systematisch zusammengefasst werden sollen:

Zum einen ist für das vorliegende Projekt ausschließlich das Nierengewebe der beatmeten Mäuse untersucht worden. Entsprechend können keine Rückschlüsse auf den Initiationsreiz der beobachteten renal-intrinsischen Entzündungsreaktion geschlossen werden, da wir die Einflussgrößen von hämodynamischen, nervalen oder immunologischen Beatmungseffekten (s. Abschnitt 1.3)) nicht differenzieren können (s. Ausblick).

Zum anderen fehlen funktionelle Daten, die auf das Vorliegen einer akuten Nierenschädigung im klinischen Sinne schließen lassen würden (s. *Acute Kidney Injury*, Abschnitt 1). Ohne die Erhebung solcher klinischen Endpunkte ist die Aussagekraft unserer Ergebnisse limitiert, da z. B. protektive Effekte einer *Il6*-Defizienz vermutet, jedoch nicht belegt werden können. Darüber hinaus ist ein *Il6*-Knockout nicht mit einer therapeutischen direkten Blockade des IL-6-Signalwegs gleichzusetzen (s. Ausblick), denn die Ausschaltung eines Gens kann erwiesenermaßen zu transkriptionellen Kompensationsmechanismen im Sinne einer Expressionssteigerung anderer Gene mit ähnlichen Wirkprofil führen³⁶⁷.

Was unsere Untersuchungsmethoden angeht, ist u. a. die begrenzte Aussagekraft der qRT-PCR-Untersuchungen zu nennen: Eine bloße Transkriptionssteigerung oder -senkung korreliert nicht unbedingt mit einer tatsächlichen Veränderung auf Proteinebene³⁴³. Konkret kann hier das Beispiel der beobachteten *Pdpr*-mRNA-Expressionssteigerung (s. Abb. 19 (B)) herangezogen werden, bei der bis auf Weiteres ungeklärt bleibt, ob sie mit der von anderen Arbeitsgruppen festgestellten Zunahme der podozytären PODOPLANIN-Proteinexpression^{252,342} vereinbar ist (z. B. als Kompensationsmechanismus bei beatmungsbedingtem Proteinuntergang (s. Abschnitt 4.3.2.2)).

Aus diesem Beispiel geht auch die Notwendigkeit weiterführender (sensitiverer) histologischer Untersuchungen hervor, mit denen akute strukturelle Beatmungsschäden an den Podozyten oder dem glomerulären Kapillarknäuel detektiert werden könnten (s. Abschnitt 3.6.1, s. Ausblick). Dasselbe gilt für einen direkten Nachweis einer Kollagenmehrproduktion, die aufgrund der von uns beobachteten *Serpine1*- und *Ctgf*-Transkriptionssteigerung unter Beatmung (s. Abb. 21) zwar erwartbar, aber nicht definitiv bewiesen ist. In diesem Kontext sei auch erneut darauf hingewiesen, dass sich insbesondere Nachuntersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt (mit größerer Latenz zum akuten Schädigungsgeschehen) anbieten. Diese sollten neben strukturellen auch funktionelle Gesichtspunkte beinhalten, um auf das langfristige Schädigungspotenzial der postnatalen Beatmung im Sinne einer frühen „Programmierung“ schließen zu können (s. Abschnitt 3.2, s. Ausblick).

Aus den vorgenannten Gründen sollte die Deutung unserer Ergebnisse insgesamt noch zurückhaltend erfolgen. Letztlich bleiben sie in vielerlei Hinsicht deskriptiver Natur, da die mechanistischen Zusammenhänge zwischen der Beatmungsintervention (und / oder dem *Il6*-Knockout) und den resultierenden Expressionsanpassungen weitgehend ungeklärt bleiben. Um diese Zusammenhänge besser zu verstehen, können auf Basis unserer Daten allerdings weiterführende, gezieltere Forschungsfragen formuliert werden, sodass dieses Projekt unseres Erachtens einen wichtigen frühen Beitrag zur Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze für postnatale renale Beatmungsschäden leisten konnte.

4.6 Ausblick

Deshalb sollen abschließend einige inhaltliche und methodische Vorschläge für mögliche Folgeprojekte gemacht werden:

Anpassung des Tiermodells zur besseren Abbildung des renalen Effekts von Frühgeburtlichkeit: Da die Nephronneubildung in den untersuchten Mäusen zu dem von uns gewählten Interventionszeitpunkt (P5) bereits als weitestgehend abgeschlossen anzunehmen ist^{41,48}, kann unser Tiermodell den strukturellen Beatmungseffekt unter laufender postnataler Nephrogenese (wie sie bei beatmeten Frühgeborenen anzunehmen ist⁴⁹⁻⁵¹) nicht abbilden (s. Abschnitt 4.2). Entsprechend sollte für zukünftige Projekte ein früherer Interventionszeitpunkt oder ggf. die alternative Untersuchung von Ratten, deren Nephrogenese postnatal länger anhält^{368,369}, erwogen werden.

Klärung des pulmorenalen Induktionsmechanismus der neonatalen VIKI: Unabhängig vom Alter der beatmeten Tiere wäre zudem eine zusätzliche Untersuchung der pulmonalen und plasmatischen Expression von Entzündungsmediatoren unter und nach Beatmung wünschenswert, um durch den Vergleich der jeweiligen zeitlichen Expressionsdynamiken (pulmonal / systemisch / renal) die Annahme einer sich von der Lunge systemisch ausbreitenden Inflammation als Induktionsmechanismus für das renalen Entzündungsgeschehen überprüfen zu können (s. Biotrauma-Hypothese, Abschnitt 1.3).

Weiterführende Untersuchung der mechanistischen Zusammenhänge unserer Beobachtungen: Wie oben bereits angemerkt, sind unsere Ergebnisse in großen Teilen deskriptiv, da die kausalen Zusammenhänge zumeist noch ungeklärt bleiben. Um diesen weiter nachzugehen, scheint etwa eine immunhistochemische Untersuchung zur quantitativen Bestimmung und Differenzierung von Entzündungszellen im Nierengewebe lohnend, um zu überprüfen, inwiefern eine IL-6-vermittelte Monozyteninvasion und -differenzierung tatsächlich zu der beobachteten *Il1b*-Expressionssteigerung beiträgt (s. Abschnitt 4.3.1). Möglich wäre zum Beispiel die Verwendung von CD68- und MHC-II-Antikörpern zur immunhistochemischen Darstellung von aktiven Makrophagen im Nierengewebe³⁷⁰.

Darüber hinaus empfehlen wir auch die Überprüfung einer DAMP-vermittelten Inflammasomaktivierung unter Beatmung (s. Abschnitt 4.3.1), etwa mittels Western-Blot-Analyse des renalen Caspase-1-Expressionslevels³⁷¹.

Um außerdem einen quantitativen Nachweis der von uns angenommenen DNA-Schädigung im Zuge einer vermehrten ROS-Bildung zu erbringen und damit das langfristige Schädigungspotenzial der Beatmung besser objektifizieren zu können (s. Abschnitt 4.3.2.1), sind arbeitsgruppenintern bereits immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen 8-Oxoguanin- und γ -H2AX geplant^{372,373}.

Sensitivere Erfassung des strukturellen Beatmungseffekts auf das neonatale Nierengewebe: Bezüglich der Untersuchung besagten langfristigen renalen Schädigungspotenzials einer postnatalen Beatmung sollte zudem in zukünftigen Projekten wie im Vorgängerprojekt von Jasmine Mohr et al. ein zweiter Untersuchungszeitpunkt mit ausreichender Latenz zur akuten Schädigungsphase eingeschlossen werden (d. h. ein Teil der Tiere sollte nicht unmittelbar nach Beendigung der Beatmung, sondern erst nach einem ausreichend langen beatmungsfreien Intervall getötet werden)¹⁰. Zu diesem späteren Untersuchungszeitpunkt empfiehlt sich der erneute Gruppenvergleich von durchschnittlicher Anzahl und Größe glomerulärer Strukturen, da sich diese Untersuchungen im vorliegenden Projekt zwar als nicht sensitiv genug für die Detektion akuter glomerulärer Beatmungsschäden erwiesen haben (s. Abschnitt 4.3.2.3), ein langfristiger hyperfiltrationsbedingter glomerulärer Untergang und kompensatorische Hypertrophie jedoch nicht auszuschließen sind. Zusätzlich erscheint eine histologische Untersuchung hinsichtlich einer durch die Akutschädigung angestoßenen renalen Fibrosierung (etwa durch eine Anfärbung kollagener Strukturen mittels Picro-Siriusrot-Färbung³⁷⁴) sinnvoll.

Um dennoch auch frühzeitige glomeruläre Veränderungen detektieren zu können, könnte z. B. in Anlehnung an das Vorgehen von Sutherland bzw. Staub et al. eine Bestimmung der glomerulären Kapillarlänge und der sich daraus ergebenden renalen Filtrationsoberfläche erfolgen^{285,349}, oder auch eine hochauflösende elektronenmikroskopische Untersuchung der renalen Filtrationseinheiten geplant werden. Dabei sollte insbesondere die strukturelle Integrität der Podozyten als wichtiger Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere untersucht werden, da unsere Ergebnisse eine beatmungsbedingte Dysregulation des podozytären Stoffwechsels anzeigen (s. Abschnitt 4.3.2.2). Gegebenenfalls könnte (alternativ) auch eine gezielte immunhistochemische Analyse der podozytären Proteinexpression erfolgen (denkbar wäre beispielsweise eine Untersuchung des Podoplanin- / Podocin-Expressionsmusters am histologischen Präparat^{252,341,342}).

Einbezug funktioneller Daten zur Anknüpfung an die klinische Forschung: Insgesamt sollte zudem die Erhebung funktioneller Daten angestrebt werden (z. B. GFR, Serum- und Urin-Kreatinin, Albuminausscheidung¹⁰), die die Beurteilung des Vorliegens einer beatmungsbedingten *Acute Kidney Injury* im klinischen Sinne erlauben und (bei entsprechenden späteren Nachuntersuchungen, s. o.) ggf. einen progressiven Nierenfunktionsverlust belegen würden. Zudem wäre so eine bessere Bezugnahme zu klinischen Studien gegeben, es ergäbe sich also ein translationaler Vorteil.

Untersuchung des renalen Benefits einer präventiven Anti-IL-6-Antikörpergabe vor Beatmung:

Insbesondere würde durch den Einbezug funktioneller Daten auch eine bessere Beurteilbarkeit des protektiven Effekts einer IL-6-Blockade ermöglicht. Wie bereits mehrfach angesprochen, sind zur abschließenden Bewertung der Sinnhaftigkeit einer solchen Blockade außerdem die Untersuchungen des (funktionellen und strukturellen) //6-Knockout-Langzeiteffekts notwendig. Um zusätzlich der möglichen Wirkdiskrepanz zwischen Gen-Knockout und direkter Blockade auf Proteinebene (s. Abschnitt 4.5) zu begegnen, sollte darüber hinaus parallel die Wirksamkeit einer antikörperbasierten Anti-IL-6-Therapie geprüft werden. Entsprechende Untersuchungen sind Bestandteil eines aktuellen Forschungsprojekts der Arbeitsgruppe Alcázar.

5. Fazit

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine postnatale mechanische Beatmung mit 21-prozentiger inspiratorischer Sauerstofffraktion im neonatalen Nierengewebe ein akutes Entzündungsgeschehen mit früher Aktivierung des IL-6/STAT3-Signalwegs induziert, wodurch eine Störung der zellulären Homöostase (im Sinne einer veränderten Expression von Markern der mitochondrialen Biogenese und der Zellzyklusregulation), sowie eine profibrotische Signalgebung und gegebenenfalls frühzeitige Zellalterungsprozesse angestoßen werden. Dadurch ergibt sich ein neuer Einblick in die intrarenalen Abläufe einer *Ventilation-Induced Kidney Injury*.

Dabei trägt insbesondere die Feststellung der mechanistischen Schlüsselrolle von IL-6 innerhalb des lokalen Schädigungsgeschehens zu einer wertvollen Erweiterung des aktuellen pathophysiologischen Verständnisses bei, zumal sich ein entzündungshemmender Effekt des //6-Knockouts erwartungsgemäß bestätigen ließ. Da unsere Ergebnisse zudem einige Parallelen zu den Erkenntnissen aus dem Hyperoxie-basierten nAKI-Vorgängermodell unserer Arbeitsgruppe aufweisen¹⁰, scheint die weitere Erforschung einer anti-IL-6-basierten Strategie zur zielgerichteten Therapie bzw. Prävention renaler Beatmungsschäden im postnatalen Setting durchaus vielversprechend. Zwar sind weiterführende Untersuchungen indiziert, um einen entsprechenden (kurz- und langfristigen) Benefit einer solchen therapeutischen Intervention zu belegen. *In Summa* machen unsere Ergebnisse jedoch Mut bezüglich künftiger Entwicklungen in der klinischen Versorgung Frühgeborener.

Literaturverzeichnis

- 1 Meier A, Kock KDS. Need for oxygen therapy and ventilatory support in premature infants in a hospital in Southern Brazil. *WJCCM* 2022; **11**: 160–8.
- 2 López ES, Rodríguez EM, Navarro CR, Sánchez-Luna M. Initial respiratory management in preterm infants and bronchopulmonary dysplasia. *Clinics* 2011; **66**: 823–7.
- 3 Wheeler CR, Smallwood CD. 2019 Year in Review: Neonatal Respiratory Support. *Respir Care* 2020; **65**: 693–704.
- 4 Chawla S, Natarajan G, Shankaran S, Carper B, Brion LP, Keszler M, Carlo WA, Ambalavanan N, Gantz MG, Das A, Finer N, Goldberg RN, Cotten CM, Higgins RD. Markers of Successful Extubation in Extremely Preterm Infants, and Morbidity After Failed Extubation. *J Pediatr* 2017; **189**: 113–9.
- 5 Burgmaier K, Zeiher M, Weber A, Cosgun ZC, Aydin A, Kuehne B, Burgmaier M, Hellmich M, Mehler K, Kribs A, Habbig S. Low incidence of acute kidney injury in VLBW infants with restrictive use of mechanical ventilation. *Pediatr Nephrol* 2023; **39**: 1279–88.
- 6 Fan Y, Ye J, Qian L, Zhao R, Zhang N, Xue L, Qiao L, Jiang L. Risk factors and outcomes of acute kidney injury in ventilated newborns. *Renal Failure* 2019; **41**: 995–1000.
- 7 Walker MW, Clark RH, Spitzer AR. Elevation in plasma creatinine and renal failure in premature neonates without major anomalies: terminology, occurrence and factors associated with increased risk. *J Perinatol* 2011; **31**: 199–205.
- 8 van den Akker JP, Egal M, Groeneveld JA. Invasive mechanical ventilation as a risk factor for acute kidney injury in the critically ill: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2013; **17**: R98.
- 9 Malhotra R, Kashani KB, Macedo E, Kim J, Bouchard J, Wynn S, Li G, Ohno-Machado L, Mehta R. A risk prediction score for acute kidney injury in the intensive care unit. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2017; **32**: 814–22.
- 10 Mohr J, Voggel J, Vohlen C, Dinger K, Dafinger C, Fink G, Göbel H, Liebau MC, Dötsch J, Alcazar MAA. IL-6/Smad2 signaling mediates acute kidney injury and regeneration in a murine model of neonatal hyperoxia. *FASEB j* 2019; **33**: 5887–902.
- 11 Sanford L, Wellman L, Ciavarra R, Oldfield E, Shams R, Copare J, Johnson D. Differential Effect of Light and Dark Period Sleep Fragmentation on Composition of Gut Microbiome and Inflammation in Mice. *Life* 2021; **11**: 1283.
- 12 Fontaine DA, Davis DB. Attention to Background Strain Is Essential for Metabolic Research: C57BL/6 and the International Knockout Mouse Consortium. *Diabetes* 2016; **65**: 25–33.
- 13 Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 1994; **368**: 339–42.
- 14 See EJ, Jayasinghe K, Glassford N, Bailey M, Johnson DW, Polkinghorne KR, Toussaint ND, Bellomo R. Long-term risk of adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and metaanalysis of cohort studies using consensus definitions of exposure. *Kidney International* 2019; **95**: 160–72.
- 15 Askenazi DJ, Feig DI, Graham NM, Hui-Stickle S, Goldstein SL. 3–5 year longitudinal follow-up of pediatric patients after acute renal failure. *Kidney International* 2006; **69**: 184–9.
- 16 Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Kidney International* 2012; **81**: 442–8.
- 17 Bienholz A, Kribben A. KDIGO-Leitlinien zum akuten Nierenversagen: Deutsche Übersetzung. *Nephrologie* 2013; **8**: 247–51.
- 18 Zappitelli M, Ambalavanan N, Askenazi DJ, Moxey-Mims MM, Kimmel PL, Star RA, Abitbol CL, Brophy PD, Hidalgo G, Hanna M, Morgan CM, Raju TNK, Ray P, Reyes-Bou Z, Roushdi A, Goldstein SL. Developing a neonatal acute kidney injury research definition: a report from the NIDDK neonatal AKI workshop. *Pediatr Res* 2017; **82**: 569–73.

- 19 KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements* 2013; **3**: 91–111.
- 20 Bikbov B, Purcell CA, Levey AS, Smith M, Abdoli A, Abebe M, Adebayo OM, Afarideh M, Agarwal SK, Agudelo-Botero M, Ahmadian E, Al-Aly Z, Alipour V, Almasi-Hashiani A, Al-Raddadi RM, Alvis-Guzman N, Amini S, Andrei T, Andrei CL, Anduaem Z, Anjomshoa M, Arabloo J, Ashagre AF, Asmelash D, Ataro Z, *et al.* Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* 2020; **395**: 709–33.
- 21 White SL, Perkovic V, Cass A, Chang CL, Poulter NR, Spector T, Haysom L, Craig JC, Salmi IA, Chadban SJ, Huxley RR. Is Low Birth Weight an Antecedent of CKD in Later Life? A Systematic Review of Observational Studies. *American Journal of Kidney Diseases* 2009; **54**: 248–61.
- 22 Eriksson JG, Salonen MK, Kajantie E, Osmond C. Prenatal Growth and CKD in Older Adults: Longitudinal Findings From the Helsinki Birth Cohort Study, 1924-1944. *American Journal of Kidney Diseases* 2018; **71**: 20–6.
- 23 Hirano D, Ishikura K, Uemura O, Ito S, Wada N, Hattori M, Ohashi Y, Hamasaki Y, Tanaka R, Nakanishi K, Kaneko T, Honda M. Association between low birth weight and childhood-onset chronic kidney disease in Japan: a combined analysis of a nationwide survey for paediatric chronic kidney disease and the National Vital Statistics Report. *Nephrol Dial Transplant* 2016; **31**: 1895–900.
- 24 Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 1990; **301**: 1111–1111.
- 25 Hoffman DJ, Reynolds RM, Hardy DB. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. 2018; **75**: 20.
- 26 Albertoni Borghese MF, Oronel LH, Ortiz MDC, Majowicz MP. Hypertension and renal disease programming: focus on the early postnatal period. *Clin Sci (Lond)* 2022; **136**: 1303–39.
- 27 Calkins K, Devaskar SU. Fetal Origins of Adult Disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 2011; **41**: 158–76.
- 28 Dörner G. Problems and terminology of functional teratology. *Acta biologica et medica Germanica* 1975; **34**: 1093–5.
- 29 Nobile S, Di Sipio Morgia C, Vento G. Perinatal Origins of Adult Disease and Opportunities for Health Promotion: A Narrative Review. *JPM* 2022; **12**: 157.
- 30 West-Eberhard MJ. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. *Annu Rev Ecol Syst* 1989; **20**: 249–78.
- 31 Welsch U. Lehrbuch Histologie, 4. Auflage. Münschen: Elsevier, Urban & Fischer, 2014.
- 32 Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, Nelson RG, Myers BD, Rennke HG, Coplon NS, Sun L, Meyer TW. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest* 1997; **99**: 342–8.
- 33 Kim YH, Goyal M, Kurnit D, Wharram B, Wiggins J, Holzman L, Kershaw D, Wiggins R. Podocyte depletion and glomerulosclerosis have a direct relationship in the PAN-treated rat. *Kidney International* 2001; **60**: 957–68.
- 34 Nyengaard JR, Bendtsen TF. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. *Anat Rec* 1992; **232**: 194–201.
- 35 Hughson M, Farris AB, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: The relationship to birth weight. *Kidney International* 2003; **63**: 2113–22.
- 36 Hoy WE, Douglas-Denton RN, Hughson MD, Cass A, Johnson K, Bertram JF. A stereological study of glomerular number and volume: Preliminary findings in a multiracial study of kidneys at autopsy. *Kidney International* 2003; **63**: S31–7.
- 37 Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and Blood Pressure: Less of One, More the Other? *American Journal of Hypertension* 1988; **1**: 335–47.

- 38 Brenner BM, Anderson S. The interrelationships among filtration surface area, blood pressure, and chronic renal disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; **19**: 1–7.
- 39 Zweyer M. Embryology of the Kidney. In: Quaia E, ed. *Radiological Imaging of the Kidney*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. DOI:10.1007/978-3-540-87597-0_1.
- 40 Hoar RM. Comparative Developmental Aspects of Selected Organ Systems. 11. Gastrointestinal and Urogenital Systems. *Environ Health Perspect* 1976; **18**: 61–6.
- 41 Davidson AJ. Mouse kidney development. *StemBook [Internet] Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute* 2009.
- 42 Gilbert. *Developmental Biology*, 9th Edition. Sunderland, Massachusetts USA: Sinauer Associates, Inc., 2010.
- 43 Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, 10. Elsevier, 2016.
- 44 Georgas K, Rumballe B, Valerius MT, Chiu HS, Thiagarajan RD, Lesieur E, Aronow BJ, Brunskill EW, Combes AN, Tang D, Taylor D, Grimmond SM, Potter SS, McMahon AP, Little MH. Analysis of early nephron patterning reveals a role for distal RV proliferation in fusion to the ureteric tip via a cap mesenchyme-derived connecting segment. *Developmental Biology* 2009; **332**: 273–86.
- 45 Rumballe BA, Georgas KM, Combes AN, Ju AL, Gilbert T, Little MH. Nephron formation adopts a novel spatial topology at cessation of nephrogenesis. *Developmental Biology* 2011; **360**: 110–22.
- 46 Cullen-McEwen L, Sutherland MR, Black MJ. The Human Kidney: Parallels in Structure, Spatial Development, and Timing of Nephrogenesis. In: *Kidney Development, Disease, Repair and Regeneration*. Elsevier, 2016. DOI:10.1016/B978-0-12-800102-8.00003-5.
- 47 Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest* 1991; **64**: 777–84.
- 48 Hartman HA, Lai HL, Patterson LT. Cessation of Renal Morphogenesis in Mice. *Developmental Biology* 2007; **310**: 379–87.
- 49 Rodríguez MM, Gómez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE. Histomorphometric Analysis of Postnatal Glomerulogenesis in Extremely Preterm Infants. *Pediatr Dev Pathol* 2004; **7**: 17–25.
- 50 Gubhaju L, Sutherland MR, Yoder BA, Zulli A, Bertram JF, Black MJ. Is nephrogenesis affected by preterm birth? Studies in a non-human primate model. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2009; **297**: 1668–77.
- 51 Carpenter J, Yarlagadda S, VandenHeuvel KA, Ding L, Schuh MP. Human Nephrogenesis Can Persist Beyond 40 Postnatal Days in Preterm Infants. *Kidney International Reports* 2023; **9**: 436–50.
- 52 Bueva A, Guignard J-P. Renal Function in Preterm Neonates. *Pediatr Res* 1994; **36**: 572–7.
- 53 Aperia A, Broberger O, Elinder G, Herin P, ZETTERSTRÖM R. Postnatal Development of Renal Function in Pre-term and Full-term Infants. *Acta Paediatrica* 1981; **70**: 183–7.
- 54 Momtaz H, Sabzehei M, Rasuli B, Torabian S. The main etiologies of acute Kidney injury in the newborns hospitalized in the neonatal intensive care unit. *J Clin Neonatol* 2014; **3**: 99–102.
- 55 Gouyon JB, Guignard JP. Management of acute renal failure in newborns. *Pediatric Nephrology* 2000; **14**: 1037–44.
- 56 Coleman C, Tambay Perez A, Selewski DT, Steflink HJ. Neonatal Acute Kidney Injury. *Front Pediatr* 2022; **10**: 1–13.
- 57 Preterm birth. World Health Organization. 2018. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/preterm-birth> (zuletzt abgerufen am 16.04.2021).
- 58 Ohuma EO, Moller A-B, Bradley E, Chakwera S, Hussain-Alkhateeb L, Lewin A, Okwaraji YB, Mahanani WR, Johansson EW, Lavin T, Fernandez DE, Domínguez GG, De Costa A, Cresswell

- JA, Krasevec J, Lawn JE, Blencowe H, Requejo J, Moran AC. National, regional, and global estimates of preterm birth in 2020, with trends from 2010: a systematic analysis. *The Lancet* 2023; **402**: 1261–71.
- 59 Bundesauswertung zum Erfassungsjahr 2019 Geburtshilfe Qualitätsindikatoren und Kennzahlen. IQTIG – Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, 2020.
- 60 Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Walsh MC, Carlo WA, Shankaran S, Laptook AR, Sánchez PJ, Van Meurs KP, Wyckoff M, Das A, Hale EC, Ball MB, Newman NS, Schibler K, Poindexter BB, Kennedy KA, Cotten CM, Watterberg KL, D’Angio CT, DeMauro SB, Truog WE, Devaskar U, Higgins RD. Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *JAMA* 2015; **314**: 1039.
- 61 Berrington JE, Hearn RI, Bythell M, Wright C, Embleton ND. Deaths in Preterm Infants: Changing Pathology Over 2 Decades. *The Journal of pediatrics* 2012; **160**: 49–53.
- 62 Lee SK, Beltempo M, McMillan DD, Seshia M, Singhal N, Dow K, Aziz K, Piedboeuf B, Shah PS. Outcomes and care practices for preterm infants born at less than 33 weeks’ gestation: a qualityimprovement study. 2020; **192**: 11.
- 63 Patel R. Short- and Long-Term Outcomes for Extremely Preterm Infants. *Amer J Perinatol* 2016; **33**: 318–28.
- 64 Mornioli D, Tiraferri V, Maiocco G, De Rose DU, Cresi F, Coscia A, Mosca F, Gianni ML. Beyond survival: the lasting effects of premature birth. *Front Pediatr* 2023; **11**: 1–6.
- 65 Behrman RE, Butler AS. Preterm birth: causes, consequences, and prevention. Washington, D.C.: National Academies Press, 2007.
- 66 Crump C. An overview of adult health outcomes after preterm birth. *Early Human Development* 2020; **150**: 1–8.
- 67 Stritzke A, Thomas S, Amin H, Fusch C, Lodha A. Renal consequences of preterm birth. *Mol Cell Pediatr* 2017; **4**: 1–9.
- 68 Stelloh C, Allen KP, Mattson DL, Lerch-Gaggl A, Reddy S, El-Meanawy A. Prematurity in mice leads to reduction in nephron number, hypertension, and proteinuria. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 2012; **159**: 80–9.
- 69 Ikezumi Y, Suzuki T, Karasawa T, Yamada T, Hasegawa H, Nishimura H, Uchiyama M. Low Birthweight and Premature Birth Are Risk Factors for Podocytopenia and Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Am J Nephrol* 2013; **38**: 149–57.
- 70 Sutherland MR, Gubhaju L, Moore L, Kent AL, Dahlstrom JE, Horne RSC, Hoy WE, Bertram JF, Black MJ. Accelerated Maturation and Abnormal Morphology in the Preterm Neonatal Kidney. *JASN* 2011; **22**: 1365–74.
- 71 Mañalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. *Kidney International* 2000; **58**: 770–3.
- 72 Li J, Guandalini M, Mcinnes H, Kandasamy Y, Trnka P, Moritz K. The impact of prematurity on postnatal growth of different renal compartments. *Nephrology* 2020; **25**: 116–24.
- 73 Hughson M, Farris AB, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: The relationship to birth weight. *Kidney International* 2003; **63**: 2113–22.
- 74 Kandasamy Y, Smith R, Wright IMR, Lumbers ER. Extra-uterine renal growth in preterm infants: Oligonephropathy and prematurity. *Pediatr Nephrol* 2013; **28**: 1791–6.
- 75 Luyckx VA, Brenner BM. The Clinical Importance of Nephron Mass. *JASN* 2010; **21**: 898–910.
- 76 Starr MC, Hingorani SR. Prematurity and future kidney health: the growing risk of chronic kidney disease. *Current Opinion in Pediatrics* 2018; **30**: 228–35.
- 77 Good PI, Li L, Hurst HA, Serrano Herrera I, Xu K, Rao M, Bateman DA, Al-Awqati Q, D’Agati VD, Costantini F, Lin F. Low nephron endowment increases susceptibility to renal stress and chronic kidney disease. *JCI Insight* 2023; **8**: e161316.

- 78 Tain Y-L, Hsu C-N. Developmental Origins of Chronic Kidney Disease: Should We Focus on Early Life? *IJMS* 2017; **18**: 381.
- 79 Dötsch J, Plank C, Amann K. Fetal programming of renal function. *Pediatr Nephrol* 2012; **27**: 513–20.
- 80 Han SJ, Lee HT. Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury. *Kidney Res Clin Pract* 2019; **38**: 427–40.
- 81 Blinder JJ, Goldstein SL, Lee V-V, Baycroft A, Fraser CD, Nelson D, Jefferies JL. Congenital heart surgery in infants: Effects of acute kidney injury on outcomes. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2012; **143**: 368–74.
- 82 Garg PM, Tatum R, Ravisankar S, Shekhawat PS, Chen Y-H. Necrotizing enterocolitis in a mouse model leads to widespread renal inflammation, acute kidney injury, and disruption of renal tight junction proteins. *Pediatr Res* 2015; **78**: 527–32.
- 83 White KC, Serpa-Neto A, Hurford R, Clement P, Laupland KB, See E, McCullough J, White H, Shekar K, Tabah A, Ramanan M, Garrett P, Attokaran AG, Luke S, Senthuran S, McIlroy P, Bellomo R, the Queensland Critical Care Research Network (QCCRN), Ramanan M, Marella P, Young P, McIlroy P, Nash B, McCullough J, Tallott M, *et al.* Sepsis-associated acute kidney injury in the intensive care unit: incidence, patient characteristics, timing, trajectory, treatment, and associated outcomes. A multicenter, observational study. *Intensive Care Med* 2023; **49**: 1079–89.
- 84 Salerno SN, Liao Y, Jackson W, Greenberg RG, McKinzie CJ, McCallister A, Benjamin DK, Laughon MM, Sanderson K, Clark RH, Gonzalez D. Association between Nephrotoxic Drug Combinations and Acute Kidney Injury in the Neonatal Intensive Care Unit. *The Journal of Pediatrics* 2021; **228**: 213–9.
- 85 Goldstein SL, Mottes T, Simpson K, Barclay C, Muething S, Haslam DB, Kirkendall ES. A sustained quality improvement program reduces nephrotoxic medication-associated acute kidney injury. *Kidney International* 2016; **90**: 212–21.
- 86 Schindler T. Causes of death in very preterm infants cared for in neonatal intensive care units: a population-based retrospective cohort study. *BMC Pediatr* 2017; **17**: 59.
- 87 Muhe LM, McClure EM, Nigussie AK, Mekasha A, Worku B, Worku A, Demtse A, Eshetu B, Tigabu Z, Gizaw MA, Workneh N, Girma A, Asefa M, Portales R, Bekele T, Bezabih M, Metaferia G, Gashaw M, Abebe B, Berta H, Alemu A, Desta T, Hailu R, Gebreyesus G, Aynalem S, *et al.* Major causes of death in preterm infants in selected hospitals in Ethiopia (SIP): a prospective, cross-sectional, observational study. *The Lancet Global Health* 2019; **7**: e1130–8.
- 88 Avery ME. Surface Properties in Relation to Atelectasis and Hyaline Membrane Disease. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1959; **97**: 517.
- 89 Gould SJ, Webb AK, Kelsey A. Congenital abnormalities and pediatric lung diseases, including neoplasms. In: Hasleton P, Flieder DB, eds. *Spencer's Pathology of the Lung*, 6th edn. Cambridge University Press, 2013. DOI:10.1017/CBO9781139018760.006.
- 90 Locci G, Fanos V, Gerosa C, Faa G. Hyaline membrane disease (HMD): the role of the perinatal pathologist. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine* 2014; **3**: e030255.
- 91 Norbert Ulfig. *Kurzlehrbuch Histologie*, 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2011.
- 92 Mutius E, Gappa M, Eber E, Frey U. *Pädiatrische Pneumologie*, 3. Auflage. Springer-Verlag, 2013.
- 93 S Rehmann, D Bacha. *Embryology, Pulmonary*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.
- 94 Sun H, Xu F, Xiong H, Kang W, Bai Q, Zhang Y, Zhou C, Zhuang F, Wang X, Zhu C. Characteristics of Respiratory Distress Syndrome in Infants of Different Gestational Ages. *Lung* 2013; **191**: 425–33.
- 95 Roberts D, Brown J, Medley N, Dalziel SR. Antenatal corticosteroids for accelerating fetal lung maturation for women at risk of preterm birth. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017; **3**. <https://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004454.pub3> (zuletzt abgerufen am 21.11.2023).

- 96 Zhong Y, Li J, Liu Y, Zhao X, Male M, Song D, Bai Y. Early Intratracheal Administration of Corticosteroid and Pulmonary Surfactant for Preventing Bronchopulmonary Dysplasia in Preterm Infants with Neonatal Respiratory Distress Syndrome: A Meta-analysis. *CURR MED SCI* 2019; **39**: 493–9.
- 97 Northway WH, Rosan RC, Porter DY. Pulmonary Disease Following Respiratory Therapy of Hyaline-Membrane Disease: Bronchopulmonary Dysplasia. *N Engl J Med* 1967; **276**: 357–68.
- 98 Attar MA, Donn SM. Mechanisms of ventilator-induced lung injury in premature infants. *Seminars in Neonatology* 2002; **7**: 353–60.
- 99 Dionysis S. Bonikos, William H. Northway Jr., David K. Edwards, Klaus G. Bensch. Bronchopulmonary dysplasia: The pulmonary pathologic sequel of necrotizing bronchiolitis and pulmonary fibrosis. 1976; **7**: 643–66.
- 100 Thome U. Mechanische Beatmung in der Neonatologie. *Neonatologie Scan* 2015; **04**: 335–50.
- 101 Zysman-Colman Z, Tremblay GM, Bandedali S, Landry JS. Bronchopulmonary dysplasia – trends over three decades. *Paediatrics & Child Health* 2013; **18**: 86–90.
- 102 Schittny JC. Development of the lung. *Cell Tissue Res* 2017; **367**: 427–44.
- 103 Balinotti JE, Chakr VC, Tiller C, Kimmel R, Coates C, Kisling J, Yu Z, Nguyen J, Tepper RS. Growth of Lung Parenchyma in Infants and Toddlers with Chronic Lung Disease of Infancy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; **181**: 1093–7.
- 104 Jobe AJ. The New BPD: An Arrest of Lung Development. *Pediatr Res* 1999; **46**: 641–641.
- 105 Leroy S, Caumette E, Waddington C, Hébert A, Brant R, Lavoie PM. A Time-Based Analysis of Inflammation in Infants at Risk of Bronchopulmonary Dysplasia. *The Journal of Pediatrics* 2018; **192**: 60-65.e1.
- 106 Holzfurtner L, Shahzad T, Dong Y, Rekers L, Selting A, Staude B, Lauer T, Schmidt A, Rivetti S, Zimmer K-P, Behnke J, Bellusci S, Ehrhardt H. When inflammation meets lung development—an update on the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Mol Cell Pediatr* 2022; **9**: 7.
- 107 Weichert U, Cay R, Schmitz T, Strauss E, Sifringer M, Bühner C, Endesfelder S. Prevention of hyperoxia-mediated pulmonary inflammation in neonatal rats by caffeine. *Eur Respir J* 2013; **41**: 966– 73.
- 108 Güldner A, Braune A, Ball L, Silva PL, Samary C, Insorsi A, Huhle R, Rentzsch I, Becker C, Oehme L, Andreeff M, Vidal Melo MF, Winkler T, Pelosi P, Rocco PRM, Kotzerke J, Gama De Abreu M. Comparative Effects of Volutrauma and Atelectrauma on Lung Inflammation in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Critical Care Medicine* 2016; **44**: e854–65.
- 109 Cui X, Huang X, Yu X, Cai Y, Tian Y, Zhan Q. Clinical characteristics of new-onset acute kidney injury in patients with established acute respiratory distress syndrome: A prospective single-center post hoc observational study. *Front Med* 2022; **9**: 987437.
- 110 Clemens MS, Stewart IJ, Sosnov JA, Howard JT, Belenkiy SM, Sine CR, Henderson JL, Buel AR, Batchinsky AI, Cancio LC, Chung KK. Reciprocal Risk of Acute Kidney Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Ill Burn Patients. *Critical Care Medicine* 2016; **44**: e915–22.
- 111 Panitchote A, Mehkri O, Hastings A, Hanane T, Demirjian S, Torbic H, Mireles-Cabodevila E, Krishnan S, Duggal A. Factors associated with acute kidney injury in acute respiratory distress syndrome. *Ann Intensive Care* 2019; **9**: 74.
- 112 Heijden A, Guignard J. Effect of hypercapnic acidosis on renal function in the newborn rabbit. *Pediatr Res*; **20**: 798–801.
- 113 Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS. Effect of hypoxia on renal flow. *J Trauma* 1998; **28**: 955–61.
- 114 Chapman CL, Schlader ZJ, Reed EL, Worley ML, Johnson BD. Renal and segmental artery hemodynamic response to acute, mild hypercapnia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2020; **318**: R822–7.

- 115 Kuiper JW, Groeneveld ABJ, Plötz FB. The Kidney During Mechanical Ventilation. In: Critical Care Nephrology, 3. Elsevier, 2019. DOI:10.1016/B978-0-323-44942-7.00122-9.
- 116 Drury DR, Henry JP, Goodman J. The Effects of Continuous Pressure Breathing on Kidney Function. *J Clin Invest* 1947; **26**: 945–51.
- 117 Annat G, Viale JP, Xuan BB, Aissa OH, Benzoni D, Vincent M, Gharib C, Motin J. Effect of PEEP Ventilation on Renal Function, Plasma Renin, Aldosterone, Neurophysins and Urinary ADH, and Prostaglandins. *Anesthesiology* 1983; **58**: 136–41.
- 118 Fewell JE, Bond GC. Renal Denervation Eliminates the Renal Response to Continuous Positive Pressure Ventilation. *Experimental Biology and Medicine* 1979; **161**: 574–8.
- 119 Fewell JE, Bond GC. Role of Sinoaortic Baroreceptors in Initiating the Renal Response to Continuous Positive-pressure Ventilation in the Dog. *Anesthesiology* 1980; **52**: 408–13.
- 120 Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced injury: From Barotrauma to Biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; **6**: 482–8.
- 121 Tremblay L, Valenza F, Ribeiro SP, Li J, Slutsky AS. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest* 1997; **99**: 944–52.
- 122 von Bethmann AN, Brasch F, Nüsing R, Vogt K, Volk HD, Müller K-M, Wendel A, Uhlig S. Hyperventilation Induces Release of Cytokines from Perfused Mouse Lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; **157**: 263–72.
- 123 Nof E, Artzy-Schnirman A, Bhardwaj S, Sabatan H, Waisman D, Hochwald O, Gruber M, Borenstein-Levin L, Sznitman J. Ventilation-induced epithelial injury drives biological onset of lung trauma in vitro and is mitigated with prophylactic anti-inflammatory therapeutics. *Bioengineering & Transla Med* 2022; **7**: e10271.
- 124 Guervilly C, Fournier T, Chommeloux J, Arnaud L, Pinglis C, Baumstarck K, Boucekine M, Valera S, Sanz C, Adda M, Bobot M, Daviet F, Gragueb-Chatti I, Forel J-M, Roch A, Hraiech S, Dignat-George F, Schmidt M, Lacroix R, Papazian L. Ultra-lung-protective ventilation and biotrauma in severe ARDS patients on veno-venous extracorporeal membrane oxygenation: a randomized controlled study. *Crit Care* 2022; **26**: 383.
- 125 Jaecklin T, Engelberts D, Otulakowski G, O’Brodivich H, Post M, Kavanagh BP. Lung-derived soluble mediators are pathogenic in ventilator-induced lung injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2011; **300**: L648–58.
- 126 Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, Tullio RD, Dayer JM, Brienza A, Bruno F, Slutsky AS. Effect of Mechanical Ventilation on Inflammatory Mediators in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA*; **1**: 54–61.
- 127 Hoegl S, Boost K, Flondor M, Scheiermann P, Muhl H, Pfeilschifter J, Zwissler B, Hofstetter C. Short-term exposure to high-pressure ventilation leads to pulmonary biotrauma and systemic inflammation in the rat. *Int J Mol Med* 2008; **21**: 513–9.
- 128 Hoegl S, Boost KA, Czerwonka H, Dolfen A, Scheiermann P, Muhl H, Zwissler B, Hofstetter C. Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respiratory Medicine* 2009; **103**: 463–70.
- 129 Kuiper J, Vaschetto R, Corte F, Plötz FB, Groeneveld AJ. Bench-to-bedside review: Ventilator-induced renal injury through systemic mediator release - just theory or a causal relationship? *Crit Care* 2011; **15**: 228.
- 130 Voiriot G, Razazi K, Amsellem V, Tran Van Nhieu J, Abid S, Adnot S, Mekontso Dessap A, Maitre B. Interleukin-6 displays lung anti-inflammatory properties and exerts protective hemodynamic effects in a double-hit murine acute lung injury. *Respir Res* 2017; **18**: 64.
- 131 Kotecha S, Wilson L, Wangoo A, Silverman M, Shaw RJ. Increase in Interleukin (IL)-1 β and IL6 in Bronchoalveolar Lavage Fluid Obtained from Infants with Chronic Lung Disease of Prematurity. *Pediatr Res* 1996; **40**: 250–6.

- 132 Mohr J, Kesler H, Hirani D, Odenthal M, Dötsch J, Alcazar MAA. Loss of IL-6 promotes alveolar progenitor cells and lung growth in newborn mice exposed to mechanical ventilation. *ERS Journal* 2020; **56**: 5243.
- 133 Kuiper J, Vaschetto R, Corte F, Plötz FB, Groeneveld AJ. Bench-to bedside review: Ventilation-induced renal injury through systemic mediator release - just theory or a causal relationship? *Crit Care* 2011; **15**: 228.
- 134 Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985; **82**: 5490–4.
- 135 Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, Tsunasawa S, Sakiyama F, Matsui H, Takahara Y, Taniguchi T, Kishimoto T. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; **324**: 73–6.
- 136 Regulation of the acute phase and immune responses: interleukin-6. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1989; **557**: 1–583.
- 137 Marin V, Montero-Julian FA, Grès S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G. The IL6-Soluble IL-6R α Autocrine Loop of Endothelial Activation as an Intermediate Between Acute and Chronic Inflammation: an Experimental Model Involving Thrombin. *J Immunol* 2001; **167**: 3435–42.
- 138 Chen Q, Fisher DT, Clancy KA, Gauguet J-MM, Wang W-C, Unger E, Rose-John S, von Andrian UH, Baumann H, Evans SS. Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism. *Nat Immunol* 2006; **7**: 1299–308.
- 139 Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Karolina Palucka A. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 2000; **1**: 510–4.
- 140 Bertolini JN, Benson EM. The Role of Human Interleukin-6 in B-Cell Isotype Regulation and Differentiation'. *Cellular immunology* 1990; **125**: 197–209.
- 141 Yang R, Masters AR, Fortner KA, Champagne DP, Yanguas-Casás N, Silberberger DJ, Weaver CT, Haynes L, Rincon M. IL-6 promotes the differentiation of a subset of naive CD8+ T cells into IL-21–producing B helper CD8+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 2016; **213**: 2281–91.
- 142 Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S, Hirose K, Watanabe N, Yokote K, Saito Y, Nakayama T, Grusby MJ, Iwamoto I, Nakajima H. Development and characterization of IL-21–producing CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 2008; **205**: 1369–79.
- 143 Mackiewicz A, Schooltink H, Heinrich PC, Rose-John S. Complex of soluble human IL-6receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1992; **149**: 2021–7.
- 144 Castell JV, Gómez-lechón MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: Regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990; **12**: 1179–86.
- 145 Tanaka T, Narazaki M, Ogata A, Kishimoto T. A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy. *Seminars in Immunology* 2014; **26**: 88–96.
- 146 Nechemia-Arbely Y, Barkan D, Pizov G, Shriki A, Rose-John S, Galun E, Axelrod JH. IL-6/IL6R Axis Plays a Critical Role in Acute Kidney Injury. *JASN* 2008; **19**: 1106–15.
- 147 Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver Failure and Defective Hepatocyte Regeneration in Interleukin-6-Deficient Mice. *Science* 1996; **274**: 1379–83.
- 148 Nechemia-Arbely Y, Shriki A, Denz U, Drucker C, Scheller J, Raub J, Pappo O, Rose-John S, Galun E, Axelrod JH. Early hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy is modulated by IL-6 trans-signaling and PI3K/AKT activation. *Journal of Hepatology* 2011; **54**: 922–9.

- 149 Camporeale A. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? *Front Biosci* 2012; **17**: 2306.
- 150 Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992; **4**: 96–100.
- 151 Rose-John S, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal* 1994; **300**: 281–90.
- 152 Nagayama Y, Braun GS, Jakobs CM, Maruta Y, Van Roeyen CR, Klinkhammer BM, Boor P, Villa L, Raffetseder U, Trautwein C, Görtz D, Müller-Newen G, Ostendorf T, Floege J. Gp130-dependent signaling in the podocyte. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2014; **307**: F346–55.
- 153 Coletta I, Soldo L, Polentarutti N, Mancini F, Guglielmotti A, Pinza M, Mantovani A, Milanese C. Selective Induction of MCP-1 in Human Mesangial Cells by the IL-6/sIL-6R Complex. *Nephron Exp Nephrol* 2000; **8**: 37–43.
- 154 Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. Cloning and Expression of the Human Interleukin-6 (BSF-2/IFN γ 2) Receptor. *Science (New York, N Y)*; **241**: 825–8.
- 155 Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 1990; **63**: 1149–57.
- 156 Ward LD, Howlett GJ, Discolo G, Yasukawa K, Hammacher A, Moritz RL, Simpson RJ. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *Journal of Biological Chemistry* 1994; **269**: 23286–9.
- 157 Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, Taga T, Kishimoto T. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 1993; **260**: 1808–10.
- 158 Wegenka UM, Buschmann J, Lütticken C, Heinrich PC, Horn F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 276–88.
- 159 Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. Differential Activation of Acute Phase Response Factor/STAT3 and STAT1 via the Cytoplasmic Domain of the Interleukin 6 Signal Transducer gp130. *Journal of Biological Chemistry* 1996; **271**: 12991–8.
- 160 Guschin D, Rogers N, Briscoe J, Witthuhn B, Watling D, Horn F, Pellegrini S, Yasukawa K, Heinrich P, Stark GR. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *The EMBO Journal* 1995; **14**: 1421–9.
- 161 Horn F, Claudia Lütticken, Ursula M. Wegenka, Juping Yuan, Jan Buschmann, Chris Schindler, Andrew Ziemiecki, Ailsa G. Harpur, Andrew F. Wilks, Kiyoshi Yasukawa, Tetsuya Taga, Tadimitsu Kishimoto, Giovanna Barbieri, Sandra Pellegrini, Michael Sendtner, Peter C. Heinrich, 1994; **263**: 4.
- 162 Zhang X, Blenis J, Li H, Schindler C, Chen-Kiang S. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 1995; **267**: 1990–4.
- 163 Seidel HM, Milocco LH, Lamb P, Darnell JE, Stein RB, Rosen J. Spacing of palindromic half sites as a determinant of selective STAT (signal transducers and activators of transcription) DNA binding and transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1995; **92**: 3041–5.
- 164 Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; **387**: 917–21.
- 165 Abdel Galil SM, Ezzeldin N, El-Boshy ME. The role of serum IL-17 and IL-6 as biomarkers of disease activity and predictors of remission in patients with lupus nephritis. *Cytokine* 2015; **76**: 280–7.

- 166 Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, Bruseghin M, Cernigoi AM, Saller A, Plebani M, Fioretto P. Acute-Phase Markers of Inflammation and Glomerular Structure in Patients with Type 2 Diabetes. *JASN* 2005; **16**: S78–82.
- 167 Shimazui T, Nakada T, Tateishi Y, Oshima T, Aizimu T, Oda S. Association between serum levels of interleukin-6 on ICU admission and subsequent outcomes in critically ill patients with acute kidney injury. *BMC Nephrol* 2019; **20**: 74.
- 168 Matesanz CM. Predictive value of plasma cytokines for acute kidney injury following lung resection surgery: prospective observational study. *Brazilian journal of anesthesiology (Elsevier)* 2019; **69**: 242–52.
- 169 Liu KD, Altmann C, Smits G, Krawczeski CD, Edelstein CL, Devarajan P, Faubel S. Serum Interleukin-6 and interleukin-8 are early biomarkers of acute kidney injury and predict prolonged mechanical ventilation in children undergoing cardiac surgery: a case-control study. *Critical Care (London, England)* 2009; **13**: R104.
- 170 Liu KD, Glidden DV, Eisner MD, Ware LB, Wheeler A, Korpak A, Taylor B, Chertow GM, Matthay MA, National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network Clinical Trials Group. Predictive and pathogenetic value of plasma biomarkers for acute kidney injury in patients with acute lung injury. *Critical care medicine* 2007; **35**: 2755–61.
- 171 Hirani D, Alvira CM, Danopoulos S, Milla C, Donato M, Tian L, Mohr J, Dinger K, Vohlen C, Selle J, V. Koningsbruggen-Rietschel S, Barbarino V, Pallasch C, Rose-John S, Odenthal M, Pryhuber GS, Mansouri S, Savai R, Seeger W, Khatri P, Al Alam D, Dötsch J, Alejandre Alcazar MA. Macrophage-derived IL-6 trans-signaling as a novel target in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Eur Respir J* 2022; **59**: 2002248.
- 172 Herbelin A, Ureña P, Nguyen AT, Zingraff J, Descamps-Latscha B. Elevated circulating levels of interleukin-6 in patients with chronic renal failure. *Kidney International* 1991; **39**: 954–60.
- 173 Garibotto G, Sofia A, Procopio V, Villaggio B, Tarroni A, Di Martino M, Cappelli V, Gandolfo MT, Aloisi F, De Cian F, Sala MR, Verzola D. Peripheral tissue release of interleukin-6 in patients with chronic kidney diseases: Effects of end-stage renal disease and microinflammatory state. *Kidney International* 2006; **70**: 384–90.
- 174 Chen W, Yuan H, Cao W, Wang T, Chen W, Yu H, Fu Y, Jiang B, Zhou H, Guo H, Zhao X. Blocking interleukin-6 trans-signaling protects against renal fibrosis by suppressing STAT3 activation. *Theranostics* 2019; **9**: 3980–91.
- 175 Hepokoski M, Englert JA, Baron RM, Crotty-Alexander LE, Fuster MM, Beitler JR, Malhotra A, Singh P. Ventilator-induced lung injury increases expression of endothelial inflammatory mediators in the kidney. *American journal of physiology Renal physiology* 2017; **312**: F654–60.
- 176 Alejandre Alcazar MA, Kaschwich M, Ertsey R, Preuss S, Milla C, Mujahid S, Masumi J, Khan S, Mokres LM, Tian L, Mohr J, Hirani DV, Rabinovitch M, Bland RD. Elafin Treatment Rescues EGFRKlf4 Signaling and Lung Cell Survival in Ventilated Newborn Mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018; **59**: 623–34.
- 177 Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 2006; **1**: 581–5.
- 178 Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 1987; **50**: 831–40.
- 179 Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* 1970; **226**: 1209–11.
- 180 Gubler U, Hoffman BJ. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 1983; **25**: 263–9.
- 181 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1986; **51**: 263–73.
- 182 Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real Time Quantitative PCR. *Genome research* 1996; **6**: 986–94.

- 183 Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' ---- 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991; **88**: 7276–80.
- 184 Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, Bell SM, Combaret V, Puisieux A, Mighell AJ, Robinson PA, Inglehearn CF, Isaacs JD, Markham AF. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 2003; **3**: 18.
- 185 Cao Y, Yu M, Dong G, Chen B, Zhang B. Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. *Molecules* 2020; **25**: 706.
- 186 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* 2001; **25**: 402–8.
- 187 Hjelmeland LM. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1980; **77**: 6368–70.
- 188 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 1985; **150**: 76–85.
- 189 Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680–5.
- 190 Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 1984; **1**: 41–55.
- 191 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1979; **76**: 4350–4.
- 192 Salinovich O, Montelaro RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 1986; **156**: 341–7.
- 193 Erickson PF, Minier LN, Lasher RS. Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: A method for their re-use in immunautoradiographic detection of antigens. *Journal of Immunological Methods* 1982; **51**: 241–9.
- 194 Du Prel J-B, Röhrig B, Hommel G, Blettner M. Choosing statistical tests: part 12 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Ärzteblatt international* 2010; **107**: 343–8.
- 195 Stüber F, Wrigge H, Schroeder S, Wetegrove S, Zinserling J, Hoeft A, Putensen C. Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med* 2002; **28**: 834–41.
- 196 Ranieri VM. Mechanical Ventilation as a Mediator of Multisystem Organ Failure in Acute Respiratory Distress Syndrome. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 2000; **284**: 40–1.
- 197 Gurkan OU, O'Donnell C, Brower R, Ruckdeschel E, Becker PM. Differential effects of mechanical ventilatory strategy on lung injury and systemic organ inflammation in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003; **285**: L710–8.
- 198 Held H-D, Boettcher S, Hamann L, Uhlig S. Ventilation-Induced Chemokine and Cytokine Release Is Associated with Activation of Nuclear Factor- κ B and Is Blocked by Steroids. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; **163**: 711–6.
- 199 Huxford T, Ghosh G. Structural Analysis of NF- κ B and I κ B Proteins. In: Liu H-C, ed. *NF- κ B/Rel Transcription Factor Family*. Boston, MA: Springer US, 2006: 1–11.
- 200 Rice NR, Ernst MK. In vivo control of NF- κ B activation by I κ B α . *The EMBO Journal* 1993; **12**: 4685–95.

- 201 Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B Proteins: New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol* 1996; **14**: 649–81.
- 202 Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996; **383**: 443–6.
- 203 Walsh MC, Kim GK, Maurizio PL, Molnar EE, Choi Y. TRAF6 Autoubiquitination-Independent Activation of the NF κ B and MAPK Pathways in Response to IL-1 and RANKL. *PLoS ONE* 2008; **3**: e4064.
- 204 Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li JW, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A. IKK-1 and IKK-2: Cytokine-Activated I κ B Kinases Essential for NF- κ B Activation. *Science* 1997; **278**: 860–6.
- 205 Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 1995; **9**: 1586–97.
- 206 Riedlinger T, Liefke R, Meier-Soelch J, Jurida L, Nist A, Stiewe T, Kracht M, Lienhard Schmitz M. NF- κ B p65 dimerization and DNA-binding is important for inflammatory gene expression. *FASEB j* 2019; **33**: 4188–202.
- 207 Libermann TA, Baltimore D. Activation of Interleukin-6 Gene Expression through the NF-KB Transcription Factor. *Molecular and cellular biology* 1990; **10**: 2327–34.
- 208 Sims JE, Acres RB, Grubin CE, McMahan CJ, Wignall JM, March CJ, Dower SK. Cloning the interleukin 1 receptor from human T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; **86**: 8946–50.
- 209 Dower SK, Kronheim SR, March CJ, Conlon PJ, Hopp TP, Gillis S, Urdal DL. Detection and characterization of high affinity plasma membrane receptors for human interleukin 1. *Journal of Experimental Medicine* 1985; **162**: 501–15.
- 210 Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, Martin MU. The Interleukin-1 Receptor Accessory Protein (IL-1RAcP) Is Essential for IL-1-induced Activation of Interleukin-1 Receptorassociated Kinase (IRAK) and Stress-activated Protein Kinases (SAP Kinases). *Journal of Biological Chemistry* 1997; **272**: 7727–31.
- 211 Casadio R, Frigimelica E, Bossù P, Neumann D, Martin MU, Tagliabue A, Boraschi D. Model of interaction of the IL-1 receptor accessory protein IL-1RAcP with the IL-1 β /IL-1R α complex. *FEBS Letters* 2001; **499**: 65–8.
- 212 Brikos C, Wait R, Begum S, O'Neill LAJ, Saklatvala J. Mass Spectrometric Analysis of the Endogenous Type I Interleukin-1 (IL-1) Receptor Signaling Complex Formed after IL-1 Binding Identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the Stable Components. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007; **6**: 1551–9.
- 213 Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. Sequential control of Toll-like receptor–dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 2008; **9**: 684–91.
- 214 Deng L, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, Slaughter C, Pickart C, Chen ZJ. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000; **103**: 351–61.
- 215 Fontecha-Barriuso M, Martín-Sánchez D, Martínez-Moreno JM, Carrasco S, Ruiz-Andrés O, Monsalve M, Sanchez-Ramos C, Gómez MJ, Ruiz-Ortega M, Sánchez-Niño MD, Cannata-Ortiz P, Cabello R, Gonzalez-Enguita C, Ortiz A, Sanz AB. PGC-1 α deficiency causes spontaneous kidney inflammation and increases the severity of nephrotoxic AKI. *J Pathol* 2019; **249**: 65–78.
- 216 Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* 1994; **93**: 2175–88.
- 217 Megyesi J, Udvarhelyi N, Safirstein RL, Price PM. The p53-independent activation of transcription of p21 WAF1/CIP1/SDI1 after acute renal failure. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 1996; **271**: F1211–6.

- 218 Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest* 1998; **101**: 777–82.
- 219 Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M. *Molecular Biology of Cell*, 4th edition. New York, NY: Garland Science, 2002.
- 220 Barnum KJ, O’Connell MJ. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. In: Noguchi E, Gadaleta MC, eds. *Cell Cycle Control*. New York, NY: Springer New York, 2014. DOI:10.1007/978-1-4939-0888-2_2.
- 221 Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *MBoC* 1995; **6**: 387–400.
- 222 Wade Harper J, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; **75**: 805–16.
- 223 Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 1995; **377**: 552–7.
- 224 Chen X, Zhang W, Gao YF, Su XQ, Zhai ZH. Senescence-like changes induced by expression of p21Waf1/Cip1 in NIH3T3 cell line. *Cell Res* 2002; **12**: 229–33.
- 225 Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM, Smith JR. Cloning of Senescent Cell-Derived Inhibitors of DNA Synthesis Using an Expression Screen. *Experimental Cell Research* 1994; **211**: 90–8.
- 226 Degregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular Targets for Activation by the E2F1 Transcription Factor Include DNA Synthesis- and G1/S-Regulatory Genes. *MOL CELL BIOL* 1995; **15**: 10.
- 227 Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-W, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, Waseem NH, Lane DP. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some, neoplasms. *J Pathol* 1990; **162**: 285–94.
- 228 Garcia E, Quiroz F, Uchiyama Y, Sakaguchi K, Vazquez-Ramos JM. Expression of a maize delta-type DNA polymerase during seed germination. *Physiol Plant* 2006; **127**: 268–76.
- 229 Li Y-Y, Wang L, Lu C-D. An E2F site in the 5'-promoter region contributes to serum-dependent up-regulation of the human proliferating cell nuclear antigen gene. *FEBS Letters* 2003; **544**: 112–8.
- 230 Tan CK, Castillo C, So AG, Downey KM. An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. *Journal of Biological Chemistry* 1986; **261**: 12310–6.
- 231 Waga S, Bauer G, Stillman B. Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *Journal of Biological Chemistry* 1994; **269**: 10923–34.
- 232 Jonsson ZO. Regulation of DNA replication and repair proteins through interaction with the front side of proliferating cell nuclear antigen. *The EMBO Journal* 1998; **17**: 2412–25.
- 233 Koundrioukoff S, Jónsson ZO, Hasan S, de Jong RN, van der Vliet PC, Hottiger MO, Hübscher U. A Direct Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Cdk2 Targets PCNA-interacting Proteins for Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 2000; **275**: 22882–7.
- 234 Forcina L, Miano C, Scicchitano BM, Rizzuto E, Berardinelli MG, De Benedetti F, Pelosi L, Musarò A. Increased Circulating Levels of Interleukin-6 Affect the Redox Balance in Skeletal Muscle. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019; **2019**: 1–13.
- 235 Wassmann S, Stumpf M, Strehlow K, Schmid A, Schieffer B, Böhm M, Nickenig G. Interleukin6 Induces Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction by Overexpression of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation Research* 2004; **94**: 534–41.
- 236 Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; **82**: 291–5.
- 237 Jones DP, Sies H. The Redox Code. *Antioxidants & Redox Signaling* 2015; **23**: 734–46.
- 238 Loschen G, Azzi A, Flohé L. Mitochondrial H₂O₂ formation: Relationship with energy conservation. *FEBS Letters* 1973; **33**: 84–8.

- 239 Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006; **27**: 639–45.
- 240 Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; **47**: 143–83.
- 241 Hollensworth SB, Shen C-C, Sim JE, Spitz DR, Wilson GL, LeDoux SP. Glial cell type-specific responses to menadione-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 2000; **28**: 1161–74.
- 242 Yuan Y, Huang S, Wang W, Wang Y, Zhang P, Zhu C, Ding G, Liu B, Yang T, Zhang A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α ameliorates mitochondrial dysfunction and protects podocytes from aldosterone-induced injury. *Kidney International* 2012; **82**: 771–89.
- 243 Rasbach KA, Schnellmann RG. Signaling of Mitochondrial Biogenesis following Oxidant Injury. *Journal of Biological Chemistry* 2007; **282**: 2355–62.
- 244 Olmos Y, Sánchez-Gómez FJ, Wild B, García-Quintans N, Cabezudo S, Lamas S, Monsalve M. SirT1 Regulation of Antioxidant Genes Is Dependent on the Formation of a FoxO3a/PGC-1 α Complex. *Antioxidants & Redox Signaling* 2013; **19**: 1507–21.
- 245 Amat R, Planavila A, Chen SL, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. SIRT1 Controls the Transcription of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ Co-activator-1 α (PGC-1 α) Gene in Skeletal Muscle through the PGC-1 α Autoregulatory Loop and Interaction with MyoD. *Journal of Biological Chemistry* 2009; **284**: 21872–80.
- 246 Ventura-Clapier R, Garnier A, Veksler V. Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1. *Cardiovascular Research* 2008; **79**: 208–17.
- 247 Valle I, Alvarezbarrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1 α regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research* 2005; **66**: 562–73.
- 248 Mundel P, Heid HW, Mundel TM, Krüger M, Reiser J, Kriz W. Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *The Journal of Cell Biology* 1997; **139**: 193–204.
- 249 Buvall L, Wallentin H, Sieber J, Andreeva S, Choi HY, Mundel P, Greka A. Synaptopodin Is a Coincidence Detector of Tyrosine versus Serine/Threonine Phosphorylation for the Modulation of Rho Protein Crosstalk in Podocytes. *JASN* 2017; **28**: 837–51.
- 250 Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Faul C, Tomino Y, Kim K, Mundel P. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* 2006; **8**: 485–91.
- 251 Asanuma K, Kim K, Oh J, Giardino L, Chabanis S, Faul C, Reiser J, Mundel P. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α -actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest* 2005; **115**: 1188–98.
- 252 Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, Schaffner G, Kerjaschki D. Podoplanin, Novel 43-kd Membrane Protein of Glomerular Epithelial Cells, Is Downregulated in Puromycin Nephrosis. 1997; **151**: 1141–52.
- 253 Matsui K, Breiteneder-Geleff S, Kerjaschki D. Epitope-specific antibodies to the 43-kD glomerular membrane protein podoplanin cause proteinuria and rapid flattening of podocytes. *Journal of the American Society of Nephrology* 1998; **9**: 2013–26.
- 254 Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P. A Conditionally Immortalized Human Podocyte Cell Line Demonstrating Nephlin and Podocin Expression. *Journal of the American Society of Nephrology* 2002; **13**: 630–8.
- 255 Zhou L, Chen X, Lu M, Wu Q, Yuan Q, Hu C, Miao J, Zhang Y, Li H, Hou FF, Nie J, Liu Y. Wnt/ β catenin links oxidative stress to podocyte injury and proteinuria. *Kidney International* 2019; **95**: 830–45.
- 256 Zhu Y-T, Wan C, Lin J-H, Hammes H-P, Zhang C. Mitochondrial Oxidative Stress and Cell Death in Podocytopathies. *Biomolecules* 2022; **12**: 403.

- 257 Zhou Z, Wan J, Hou X, Geng J, Li X, Bai X. MicroRNA-27a promotes podocyte injury via PPAR γ -mediated β -catenin activation in diabetic nephropathy. *Cell Death Dis* 2017; **8**: e2658–e2658.
- 258 Black LM, Lever JM, Agarwal A. Renal Inflammation and Fibrosis: A Double-edged Sword. *J Histochem Cytochem* 2019; **67**: 663–81.
- 259 Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2011; **7**: 684–96.
- 260 Lv W, Booz GW, Fan F, Wang Y, Roman RJ. Oxidative Stress and Renal Fibrosis: Recent Insights for the Development of Novel Therapeutic Strategies. *Frontiers in physiology* 2018; **9**: 105.
- 261 Panizo S, Martínez-Arias L, Alonso-Montes C, Cannata P, Martín-Carro B, Fernández-Martín JL, Naves-Díaz M, Carrillo-López N, Cannata-Andía JB. Fibrosis in Chronic Kidney Disease: Pathogenesis and Consequences. *IJMS* 2021; **22**: 408.
- 262 Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of Progressive Nephropathies. *N Engl J Med* 1998; **339**: 1448–56.
- 263 Keijer J, Linders M, Wegman J, Ehrlich H, Mertens K, Pannekoek H. On the target specificity of plasminogen activator inhibitor 1: the role of heparin, vitronectin, and the reactive site. *Blood* 1991; **78**: 1254–61.
- 264 Chmielewska J, Rånby M, Wiman B. Evidence for a rapid inhibitor to tissue plasminogen activator in plasma. *Thrombosis Research* 1983; **31**: 427–36.
- 265 Matsuo S, Lepez-Guisa JM, Cai X, Okamura DM, Alpers CE, Bumgarner RE, Peters MA, Zhang G, Eddy AA. Multifunctionality of PAI-1 in fibrogenesis: Evidence from obstructive nephropathy in PAI1-overexpressing mice. *Kidney International* 2005; **67**: 2221–38.
- 266 Huang Y, Border WA, Lawrence DA, Noble NA. Noninhibitory PAI-1 enhances plasmin-mediated matrix degradation both in vitro and in experimental nephritis. *Kidney International* 2006; **70**: 515–22.
- 267 Dong J, Fujii S, Imagawa S, Matsumoto S, Matsushita M, Todo S, Tsutsui H, Sobel BE. IL-1 and IL-6 induce hepatocyte plasminogen activator inhibitor-1 expression through independent signaling pathways converging on C/EBP δ . *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2007; **292**: C209–15.
- 268 Yamamoto T, Noble NA, Cohen AH, Nast CC, Hishida A, Gold LI, Border WA. Expression of transforming growth factor- α isoforms in human glomerular diseases. *Kidney international* 1996; **49**: 461–9.
- 269 Isaka Y. Targeting TGF- β Signaling in Kidney Fibrosis. *IJMS* 2018; **19**: 2532.
- 270 Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *MBoC* 1993; **4**: 637–45.
- 271 Fandino W. Formulating a good research question: Pearls and pitfalls. *Indian J Anaesth* 2019; **63**: 611.
- 272 Fosse V, Oldoni E, Bietrix F, Budillon A, Daskalopoulos EP, Fratelli M, Gerlach B, Groenen PMA, Hölter SM, Menon JML, Mobasher A, Osborne N, Ritskes-Hoitinga M, Ryll B, Schmitt E, Ussi A, Andreu AL, McCormack E, on behalf of The PERMIT group, Banzi R, Demotes J, Garcia P, Gerardi C, Glaab E, Haro JM, *et al.* Recommendations for robust and reproducible preclinical research in personalised medicine. *BMC Med* 2023; **21**: 14.
- 273 Hepokoski ML, Malhotra A, Singh P, Crotty Alexander LE. Ventilator-Induced Kidney Injury: Are Novel Biomarkers the Key to Prevention? *Nephron* 2018; **140**: 90–3.
- 274 Mammen C, Al Abbas A, Skippen P, Nadel H, Levine D, Collet JP, Matsell DG. Long-term Risk of CKD in Children Surviving Episodes of Acute Kidney Injury in the Intensive Care Unit: A Prospective Cohort Study. *American Journal of Kidney Diseases* 2012; **59**: 523–30.
- 275 Fan Y, Ye J, Qian L, Zhao R, Zhang N, Xue L, Qiao L, Jiang L. Risk factors and outcomes of acute kidney injury in ventilated newborns. *Renal Failure* 2019; **41**: 995–1000.

- 276 Halbertsma FJJ, Vaneker M, Scheffer GJ. Cytokines and bio-trauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. 2005; **63**: 11.
- 277 Jetton JG, Boohaker LJ, Sethi SK, Wazir S, Rohatgi S, Soranno DE, Chishti AS, Woroniecki R, Mammen C, Swanson JR, Sridhar S, Wong CS, Kupferman JC, Griffin RL, Askenazi DJ, Selewski DT, Sarkar S, Kent A, Fletcher J, Abitbol CL, DeFreitas M, Duara S, Charlton JR, Guillet R, D'Angio C, *et al.* Incidence and outcomes of neonatal acute kidney injury (AWAKEN): a multicentre, multinational, observational cohort study. *The Lancet Child & Adolescent Health* 2017; **1**: 184–94.
- 278 Jha V, Al-Ghamdi SMG, Li G, Wu M-S, Stafylas P, Retat L, Card-Gowers J, Barone S, Cabrera C, Garcia Sanchez JJ. Global Economic Burden Associated with Chronic Kidney Disease: A Pragmatic Review of Medical Costs for the Inside CKD Research Programme. *Adv Ther* 2023; **40**: 4405–20.
- 279 Hussien H, Apetrii M, Covic A. Health-related quality of life in patients with chronic kidney disease. *Expert Review of Pharmacoeconomics & Outcomes Research* 2021; **21**: 43–54.
- 280 Austin CP. Opportunities and challenges in translational science. *Clinical Translational Sci* 2021; **14**: 1629–47.
- 281 TierSchG (2022): Tierschutzgesetz [online]. Gesetze-im-Internet. 2022. <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html> (zuletzt abgerufen am 05.03.2023).
- 282 Liang J, Liu Y. Animal Models of Kidney Disease: Challenges and Perspectives. *Kidney360* 2023; **4**: 1479–93.
- 283 Hosszu A, Kaucsar T, Seeliger E, Fekete A. Animal Models of Renal Pathophysiology and Disease. In: Pohlmann A, Niendorf T, eds. *Preclinical MRI of the Kidney*. New York, NY: Springer US, 2021: 27–44.
- 284 Sutherland MR, Ryan D, Dahl MJ, Albertine KH, Black MJ. Effects of preterm birth and ventilation on glomerular capillary growth in the neonatal lamb kidney. *Journal of Hypertension* 2016; **34**: 1988–97.
- 285 Staub E, Dahl MJ, Yost C, Bowen S, Aoki T, Blair A, Wang Z, Null DM, Yoder BA, Albertine KH. Preterm birth and ventilation decrease surface density of glomerular capillaries in lambs, regardless of postnatal respiratory support mode. *Pediatr Res* 2017; **82**: 93–100.
- 286 Hilgendorff A, Parai K, Ertsey R, Navarro E, Jain N, Carandang F, Peterson J, Mokres L, Milla C, Preuss S, Alcazar MA, Khan S, Masumi J, Ferreira-Tojais N, Mujahid S, Starcher B, Rabinovitch M, Bland R. Lung matrix and vascular remodeling in mechanically ventilated elastin haploinsufficient newborn mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2015; **308**: L464–78.
- 287 Akutes, nicht obstruktives Lungenversagen im Kindesalter (pädiatrisches ARDS, PARDS) - Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) und der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde (DGKJ). [Gültig bis 28.06.2026], 4. Auflage. AWMF online, 2021 <https://www.awmf.org/service/awmf-aktuell/akutes-nicht-obstruktives-lungenversagen-im-kindesalterpaediatrisches-ards-pards> (zuletzt abgerufen am 05.12.2023).
- 288 Koichi Y, Sophia K. Translational Role of Rodent Models to Study Ventilator-Induced Lung Injury. *Transl Perioper & Pain Med* 2021; **8**: 404–15.
- 289 Joelsson JP, Ingthorsson S, Krickler J, Gudjonsson T, Karason S. Ventilator-induced lung-injury in mouse models: Is there a trap? *Lab Anim Res* 2021; **37**: 30.
- 290 Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2009; **29**: 313–26.
- 291 Coletta I, Soldo L, Polentarutti N, Mancini F, Guglielmotti A, Pinza M, Mantovani A, Milanese C. Selective Induction of MCP-1 in Human Mesangial Cells by the IL-6/sIL-6R Complex. *Nephron Exp Nephrol* 2000; **8**: 37–43.
- 292 Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *Journal of Experimental Medicine* 1989; **169**: 1485–90.

- 293 Beall CJ, Mahajan S, Kuhn DE, Kolattukudy PE. Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. *Biochemical Journal* 1996; **313**: 633–40.
- 294 Jo S-K, Sung S-A, Cho W-Y, Go K-J, Kim H-K. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006; **21**: 1231–9.
- 295 Hsi ED, Remick DG. Monocytes Are the Major Producers of Interleukin-1 β in an *Ex Vivo* Model of Local Cytokine Production. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 1995; **15**: 89–94.
- 296 Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell* 2002; **10**: 417–26.
- 297 Cerretti D, Kozlosky C, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. 1992; **256**: 97–100.
- 298 Black RA, Kronheim SR, Sleath PR. Activation of interleukin- 1 β by a co-induced protease. *FEBS Letters* 1989; **247**: 386–90.
- 299 Dolinay T, Kim YS, Howrylak J, Hunninghake GM, An CH, Fredenburgh L, Massaro AF, Rogers A, Gazourian L, Nakahira K, Haspel JA, Landazury R, Eppanapally S, Christie JD, Meyer NJ, Ware LB, Christiani DC, Ryter SW, Baron RM, Choi AMK. Inflammasome-regulated Cytokines Are Critical Mediators of Acute Lung Injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; **185**: 1225–34.
- 300 Bortolotti P, Faure E, Kipnis E. Inflammasomes in Tissue Damages and Immune Disorders After Trauma. *Front Immunol* 2018; **9**: 1900.
- 301 Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, Irrera N, Marini H, Arcoraci V, Bitto A, Crea G, Pisani A, Squadrito F, Trichilo V, Bruschetta D, Micali A, Altavilla D. ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; **2016**: 1–10.
- 302 Cullen SP, Kearney CJ, Clancy DM, Martin SJ. Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 β Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Reports* 2015; **11**: 1535–48.
- 303 Gong T, Liu L, Jiang W, Zhou R. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2020; **20**: 95–112.
- 304 Medzhitov R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell* 2010; **140**: 771–6.
- 305 Ebert T, Pawelzik S-C, Witasp A, Arefin S, Hobson S, Kublickiene K, Shiels PG, Bäck M, Stenvinkel P. Inflammation and Premature Ageing in Chronic Kidney Disease. *Toxins* 2020; **12**: 227.
- 306 Wu J, Yan Z, Schwartz DE, Yu J, Malik AB, Hu G. Activation of NLRP3 Inflammasome in Alveolar Macrophages Contributes to Mechanical Stretch-Induced Lung Inflammation and Injury. *The Journal of Immunology* 2013; **190**: 3590–9.
- 307 Kuipers MT, Aslami H, Janczy JR, Van Der Sluijs KF, Vlaar APJ, Wolthuis EK, Choi G, Roelofs JJTH, Flavell RA, Sutterwala FS, Bresser P, Leemans JC, Van Der Poll T, Schultz MJ, Wieland CW. Ventilator-induced Lung Injury Is Mediated by the NLRP3 Inflammasome. *Anesthesiology* 2012; **116**: 1104–15.
- 308 Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; **10**: 826–37.
- 309 Tran M, Tam D, Bardia A, Bhasin M, Rowe GC, Kher A, Zsengeller ZK, Akhavan-Sharif MR, Khankin EV, Saintgeniez M, David S, Burstein D, Karumanchi SA, Stillman IE, Arany Z, Parikh SM. PGC-1 α promotes recovery after acute kidney injury during systemic inflammation in mice. *J Clin Invest* 2011; **121**: 4003–14.
- 310 Han SH, Wu M, Nam BY, Park JT, Yoo T-H, Kang S-W, Park J, Chinga F, Li S-Y, Susztak K. PGC-1 α Protects from Notch-Induced Kidney Fibrosis Development. *JASN* 2017; **28**: 3312–22.
- 311 Ruiz-Andres O, Sanchez-Niño MD, Cannata-Ortiz P, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. Histone lysine crotonylation during acute kidney injury in mice. *Disease models & mechanisms* 2016; **9**: 633–45.

- 312 Starke-Reed PE, Oliver CN. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1989; **275**: 559–67.
- 313 Bucher JR, Tien M, Aust SD. The requirement for ferric in the initiation of lipid peroxidation by chelated ferrous iron. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1983; **111**: 777–84.
- 314 Salmon TB. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 2004; **32**: 3712–23.
- 315 Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph KL, Kirkwood TBL, Von Zglinicki T. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Molecular Systems Biology* 2010; **6**: 347.
- 316 Masgras I, Carrera S, De Verdier PJ, Brennan P, Majid A, Makhtar W, Tulchinsky E, Jones GDD, Roninson IB, Macip S. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Sensitivity to Oxidative Stress Determine Induction of Cancer Cell Death by p21. *Journal of Biological Chemistry* 2012; **287**: 9845–54.
- 317 Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Safirstein RL, Price PM. Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. *Kidney International* 2001; **60**: 2164–72.
- 318 Blázquez-Prieto J, Huidobro C, López-Alonso I, Amado-Rodríguez L, Martín-Vicente P, LópezMartínez C, Crespo I, Pantoja C, Fernandez-Marcos PJ, Serrano M, Sznajder JI, Albaiceta GM. Activation of p21 limits acute lung injury and induces early senescence after acid aspiration and mechanical ventilation. *Translational Research* 2021; **233**: 104–16.
- 319 de Jesus BB, Blasco MA. Assessing Cell and Organ Senescence Biomarkers. *Circ Res* 2012; **111**: 97–109.
- 320 Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 1961; **25**: 585–621.
- 321 Ortiz-Montero P, Londoño-Vallejo A, Vernot J-P. Senescence-associated IL-6 and IL-8 cytokines induce a self- and cross-reinforced senescence/inflammatory milieu strengthening tumorigenic capabilities in the MCF-7 breast cancer cell line. *Cell Commun Signal* 2017; **15**: 17.
- 322 Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAK-STAT* 2013; **2**: e25763.
- 323 Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LCW, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS. Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network. *Cell* 2008; **133**: 1019–31.
- 324 Duan J, Duan J, Zhang Z, Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; **37**: 1407–20.
- 325 Venkatachalam G, Surana U, Clément M-V. Replication stress-induced endogenous DNA damage drives cellular senescence induced by a sub-lethal oxidative stress. *Nucleic Acids Research* 2017; **45**: 10564–82.
- 326 Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez P-Y, Campisi J. Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the p53 Tumor Suppressor. *PLoS Biol* 2008; **6**: e301.
- 327 Ungvari Z, Valcarcel-Ares MN, Tarantini S, Yabluchanskiy A, Fülöp GA, Kiss T, Csiszar A. Connective tissue growth factor (CTGF) in age-related vascular pathologies. *GeroScience* 2017; **39**: 491–8.
- 328 Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang T-W, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G, Morris KJ, Khan S, Jin H, Dharmalingam G, Snijders AP, Carroll T, Capper D, Pritchard C, Inman GJ, Longerich T, Sansom OJ, Benitah SA, Zender L, Gil J. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 978–90.

- 329 Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Lowe SW, Raulet DH. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* 2013; **210**: 2057–69.
- 330 Burton DGA, Stolzing A. Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy. *Ageing Research Reviews* 2018; **43**: 17–25.
- 331 Pereira BI, Devine OP, Vukmanovic-Stejic M, Chambers ES, Subramanian P, Patel N, Virasami A, Sebire NJ, Kinsler V, Valdovinos A, LeSaux CJ, Passos JF, Antoniou A, Rustin MHA, Campisi J, Akbar AN. Senescent cells evade immune clearance via HLA-E-mediated NK and CD8+ T cell inhibition. *Nat Commun* 2019; **10**: 2387.
- 332 Nelson G, Wordsworth J, Wang C, Jurk D, Lawless C, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. *Aging Cell* 2012; **11**: 345–9.
- 333 Schmitt R, Marlier A, Cantley LG. Zag Expression during Aging Suppresses Proliferation after Kidney Injury. *JASN* 2008; **19**: 2375–83.
- 334 Ferenbach DA, Bonventre JV. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. *Nat Rev Nephrol* 2015; **11**: 264–76.
- 335 Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med* 2010; **16**: 535–43.
- 336 Kitada K, Nakano D, Ohsaki H, Hitomi H, Minamino T, Yatabe J, Felder RA, Mori H, Masaki T, Kobori H, Nishiyama A. Hyperglycemia causes cellular senescence via a SGLT2- and p21-dependent pathway in proximal tubules in the early stage of diabetic nephropathy. *Journal of Diabetes and its Complications* 2014; **28**: 604–11.
- 337 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 p16^{INK4a}. *Hypertension* 2008; **52**: 123–9.
- 338 Lee SJ, Borsting E, Declèves A-E, Singh P, Cunard R. Podocytes Express IL-6 and Lipocalin 2/ Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Lipopolysaccharide-Induced Acute Glomerular Injury. *Nephron Exp Nephrol* 2012; **121**: e86–96.
- 339 He F, Bao D, Su H, Wang Y, Lei C, Zhang C, Ye C, Tang H, Wan C, You C, Zhang J, Xiong J, Zhang C. IL-6 increases podocyte motility via MLC-mediated focal adhesion impairment and cytoskeleton disassembly. *Journal Cellular Physiology* 2018; **233**: 7173–81.
- 340 Ning L, Suleiman HY, Miner JH. Synaptopodin Is Dispensable for Normal Podocyte Homeostasis but Is Protective in the Context of Acute Podocyte Injury. *JASN* 2020; **31**: 2815–32.
- 341 Kato T, Mizuno-Horikawa Y, Mizuno S. Decreases in Podocin, CD2-Associated Protein (CD2AP) and Tensin2 May Be Involved in Albuminuria during Septic Acute Renal Failure. *J Vet Med Sci* 2011; **73**: 1579–84.
- 342 Kasinath V, Yilmam OA, Uehara M, Yonar M, Jiang L, Li X, Qiu W, Eskandari S, Ichimura T, Abdi R. Urine podoplanin heralds the onset of ischemia-reperfusion injury of the kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2019; **316**: F957–65.
- 343 Maier T, Güell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Letters* 2009; **583**: 3966–73.
- 344 Matsui K, Nagy-Bojarsky K, Laakkonen P, Krieger S, Mechtler K, Uchida S, Geleff S, Kang DH, Johnson RJ, Kerjaschki D. Lymphatic Microvessels in the Rat Remnant Kidney Model of Renal Fibrosis: Aminopeptidase P and Podoplanin Are Discriminatory Markers for Endothelial Cells of Blood and Lymphatic Vessels. *Journal of the American Society of Nephrology* 2003; **14**: 1981–9.
- 345 Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, Wucherpfennig K, Turley S, Carroll MC, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation. *Immunity* 2011; **35**: 986–96.

- 346 Kerrigan AM, Navarro-Nuñez L, Pyz E, Finney BA, Willment JA, Watson SP, Brown GD. Podoplanin-expressing inflammatory macrophages activate murine platelets via CLEC-2. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2012; **10**: 484–6.
- 347 Delarue F, Hertig A, Alberti C, Vigneau C, Ammor M, Berrou J, Akposso K, Peraldi M-N, Rondeau E, Sraer J-D. Prognostic Value of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 mRNA in Microdissected Glomeruli from Transplanted Kidneys. *Transplantation* 2001; **72**: 1256–61.
- 348 Lv W, Booz GW, Wang Y, Fan F, Roman RJ. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *European Journal of Pharmacology* 2018; **820**: 65–76.
- 349 Sutherland MR, Ryan D, Dahl MJ, Albertine KH, Black MJ. Effects of preterm birth and ventilation on glomerular capillary growth in the neonatal lamb kidney. *Journal of Hypertension* 2016; **34**: 1988–97.
- 350 Srivastava T, Joshi T, Heruth DP, Rezaiekhalthigh MH, Garola RE, Zhou J, Boinpelly VC, Ali MF, Alon US, Sharma M, Vanden Heuvel GB, Mahajan P, Priya L, Jiang Y, McCarthy ET, Savin VJ, Sharma R, Sharma M. A mouse model of prenatal exposure to Interleukin-6 to study the developmental origin of health and disease. *Sci Rep* 2021; **11**: 13260.
- 351 Tachibana S, Zhang X, Ito K, Ota Y, Cameron AM, Williams G, Sun Z. Interleukin-6 is required for cell cycle arrest and activation of DNA repair enzymes after partial hepatectomy in mice. *Cell Biosci* 2014; **4**: 6.
- 352 Stallons LJ, Whitaker RM, Schnellmann RG. Suppressed mitochondrial biogenesis in folic acid-induced acute kidney injury and early fibrosis. *Toxicology Letters* 2014; **224**: 326–32.
- 353 Ruiz-Andres O, Suarez-Alvarez B, Sánchez-Ramos C, Monsalve M, Sanchez-Niño MD, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A, Sanz AB. The inflammatory cytokine TWEAK decreases PGC-1 α expression and mitochondrial function in acute kidney injury. *Kidney International* 2016; **89**: 399–410.
- 354 Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2011; **1813**: 878–88.
- 355 Strzelec M, Detka J, Mieszczak P, Sobocińska MK, Majka M. Immunomodulation—a general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system. *Front Immunol* 2023; **14**: 1127704.
- 356 Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2018; **10**: a028456.
- 357 Rose-John S. Blocking only the bad side of IL-6 in inflammation and cancer. *Cytokine* 2021; **148**: 155690.
- 358 Pandey V, Kumar D, Vijayaraghavan P, Chaturvedi T, Raina R. Non-dialytic management of acute kidney injury in newborns. *J Renal Inj Prev* 2016; **6**: 1–11.
- 359 Broad SR, Maxwell NC. Steroids on the neonatal unit. *Paediatrics and Child Health* 2017; **27**: 9–13.
- 360 Boscarino G, Cardilli V, Conti MG, Liguori F, Repole P, Parisi P, Terrin G. Outcomes of postnatal systemic corticosteroids administration in ventilated preterm newborns: a systematic review of randomized controlled trials. *Front Pediatr* 2024; **12**: 1344337.
- 361 Vemuri SV, Rolfsen ML, Sykes AV, Takiar PG, Leonard AJ, Malhotra A, Spragg RG, Macedo E, Hepokoski ML. Association Between Acute Kidney Injury During Invasive Mechanical Ventilation and ICU Outcomes and Respiratory System Mechanics. *Critical Care Explorations* 2022; **4**: e0720.
- 362 Mian AN, Askenazi DJ, Mhanna MJ. Therapeutic Options for Neonatal Acute Kidney Injury (AKI). *Curr Treat Options Peds* 2016; **2**: 69–81.
- 363 Zhang XL, Topley N, Ito T, Phillips A. Interleukin-6 Regulation of Transforming Growth Factor (TGF)- β Receptor Compartmentalization and Turnover Enhances TGF- β 1 Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 2005; **280**: 12239–45.

- 364 Zhang W, Wang W, Yu H, Zhang Y, Dai Y, Ning C, Tao L, Sun H, Kellems RE, Blackburn MR, Xia Y. Interleukin 6 Underlies Angiotensin II–Induced Hypertension and Chronic Renal Damage. *Hypertension* 2012; **59**: 136–44.
- 365 Plocque A, Mitri C, Lefèvre C, Tabary O, Touqui L, Philippart F. Should We Interfere with the Interleukin-6 Receptor During COVID-19: What Do We Know So Far? *Drugs* 2023; **83**: 1–36.
- 366 Kluge S, Janssens U, Welte T, Weber-Carstens S, Schälte G, Spinner CD, Malin JJ, Gastmeier P, Langer F, Bracht H, Westhoff M, Pfeifer M, Rabe KF, Hoffmann F, Böttiger BW, Weinmann-Menke J, Kersten A, Berlit P, Krawczyk M, Haase R, Müller OJ, Specker C, Nothacker M, Marx G, Karagiannidis C. S3-Leitlinie - Empfehlungen zur Therapie von Patienten mit COVID-19. 2023.
- 367 El-Brolosy MA, Stainier D.Y.R. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet* 2017; **13**: e1006780.
- 368 Maric C, Ryan GB, Alcorn D. Embryonic and postnatal development of the rat renal interstitium. *Anatomy and Embryology* 1997; **195**: 503–14.
- 369 Brown DL, Walling BE, Mattix ME. Postnatal Development of the Rat Kidney [WIL Research, Charles River Company]. https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/PostnatalDevelopmentoftheRatKidney.PDF (zuletzt abgerufen am 26.02.2024).
- 370 Matsuyama S, Karim MR, Izawa T, Kuwamura M, Yamate J. Immunohistochemical analyses of the kinetics and distribution of macrophages in the developing rat kidney. *J Toxicol Pathol* 2018; **31**: 207–12.
- 371 Krishnan SM, Dowling JK, Ling YH, Diep H, Chan CT, Ferens D, Kett MM, Pinar A, Samuel CS, Vinh A, Arumugam TV, Hewitson TD, Kemp-Harper BK, Robertson AAB, Cooper MA, Latz E, Mansell A, Sobey CG, Drummond GR. Inflammasome activity is essential for one kidney/deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension in mice. *British J Pharmacology* 2016; **173**: 752–65.
- 372 Kuo LJ, Yang L-X. γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In vivo (Athens, Greece)* 2008; **22**: 305–9.
- 373 Hahm JY, Park J, Jang E-S, Chi SW. 8-Oxoguanine: from oxidative damage to epigenetic and epitranscriptional modification. *Exp Mol Med* 2022; **54**: 1626–42.
- 374 Street JM, Souza ACP, Alvarez-Prats A, Horino T, Hu X, Yuen PST, Star RA. Automated quantification of renal fibrosis with Sirius Red and polarization contrast microscopy. *Physiol Rep* 2014; **2**: e12088.

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des Nierenaufbaus	14
	[Erstellt mit BioRender.com].	
Abb. 2:	Schematische Darstellung der stadienhaften Nierenentwicklung	15
	[Modifiziert nach Moore et al. (2016) ⁴³ , <i>Figure 12-6: Development of permanent kidney</i> . Abbildungsgenehmigung erteilt durch Elsevier (Lizenznummer: 1463325-1)].	
Abb. 3:	Gegenüberstellung des zeitlichen Ablaufs der Nierenentwicklung bei Mensch (reif- vs. frühgeboren) und Maus	16
	[Modifiziert nach Cullen-McEwen et al. (2016) ⁴⁶ , <i>Figure 3.6: Comparative timeline of nephrogenesis in different species</i> . Abbildungsgenehmigung erteilt durch Elsevier (Lizenznummer: 5747200692193)].	
Abb. 4:	Exemplarische Auflistung von gesundheitlichen Akut- und Spätkomplikationen nach Frühgeburtlichkeit	18
	[Modifiziert nach Morniroli et al. (2023) ⁶⁴ , <i>Table 1: Poor outcomes caused by prematurity and described in the literature</i> . Abbildungsgenehmigung per CC-BY-4.0-Lizenz (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)].	
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Hyperfiltrations-Hypothese nach Brenner	19
	[Erstellt mit BioRender.com].	
Abb. 6:	Schematische Gegenüberstellung der ursprünglichen und aktuellen Pathogenese einer Bronchopulmonalen Dysplasie	21
	[Erstellt mit BioRender.com].	
Abb. 7:	Pulmorenaler Crosstalk: Bekannte Pathomechanismen der beatmungsbedingten Nierenschädigung	22
	[Modifiziert nach Kuiper et al. (2019) ¹¹⁵ , <i>Figure 122.1: Mechanical ventilation affects the kidney through three distinct mechanisms</i> . Abbildungsgenehmigung erteilt durch: Elsevier (Lizenznummer: 5747180168700)].	
Abb. 8:	Schematische Darstellung des IL-6/JAK/STAT Signalwegs	24
	[Modifiziert nach Camporeale und Poli (2012) ¹⁴⁹ , <i>Figure 1: IL-6 signalling and trans-signalling</i> . Abbildungsgenehmigung erteilt durch Professorin Valeria Poli ^a (Urheberin). Erstellt mit Biorender.com].	
Abb. 9:	Schematische Darstellung des Tierversuchsaufbaus	27
	[Erstellt mit BioRender.com].	
Abb. 10:	Repräsentativer Nierenlängsschnitt (A) mit exemplarischer Kennzeichnung von B) Renaler Gesamtfläche; C) Kortexareal; D) Nephrogener Zone	41
	[Erstellt mit Paint S (Version 7.8.3, 勇 陈)].	
Abb. 11:	Prinzip der quantitativen Real-Time PCR nach dem SYBR-GREEN-I- und TaqMan-Verfahren	44
	[Modifiziert nach Cao et al. (2020) ¹⁸⁵ , <i>Figure 5: Schematic diagrams of SYBR Green I and TaqMan assays during PCR procedures of denaturation, annealing, and extension</i> . Abbildungsgenehmigung per CC-BY-4.0-Lizenz (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)].	
Abb. 12:	Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) <i>Il6</i> und B) <i>Il1b</i> nach 4h mechanischer Beatmung (MV)	50
	[Datenerhebung durch Dr. med. Celien Kuiper-Makris ^b . Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software)].	

Abb. 13:	Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) <i>Il6</i>; B) <i>Il1b</i>; C) <i>Mcp1</i> und D) <i>Tnfa</i> nach 8h mechanischer Beatmung (MV)	51
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software)].	
Abb. 14:	Messung der p65 Proteinmenge nach 8h mechanischer Beatmung MV (A) mit grafischer Darstellung der densitometrischen Western-Blot-Analysen (B)	52
	[Datenerhebung durch Frau Christina Vohlen ^b . Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software) und Image Lab (Version 5.2.1, Bio-Rad Laboratories GmbH)].	
Abb. 15:	Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) <i>Socs3</i> und der (p)STAT3-Proteinmenge (B) nach 8h mechanischer Beatmung (MV) mit grafischer Darstellung der densitometrischen Western-Blot-Analysen (C - E)	54
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software) und Image Lab (Version 5.2.1, Bio-Rad Laboratories GmbH)].	
Abb. 16:	Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) <i>Myd88</i>; B) <i>Irak4</i>; C) <i>Irak1</i>; und E) <i>Traf6</i> nach 8h mechanischer Beatmung (MV)	55
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software)].	
Abb. 17:	Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) <i>Cdkn1a</i> und B) <i>E2f1</i> und der PCNA-Proteinmenge (C) nach 8h mechanischer Beatmung (MV) mit grafischer Darstellung der densitometrischen Western-Blot-Analyse (D)	57
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software) und Image Lab (Bio-Version 5.2.1, Rad Laboratories GmbH)].	
Abb. 18:	Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) <i>Sirt1</i> und B) <i>Ppargc1a</i> nach 8h mechanischer Beatmung (MV).....	58
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software)].	
Abb. 19:	Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) <i>Synpo</i>; B) <i>Pdpn</i> und C) <i>Pdcn</i> nach 8h mechanischer Beatmung (MV)	60
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software)].	
Abb. 20:	Messung der β-CATENIN-Proteinmenge nach 8h mechanischer Beatmung (MV) (A) mit grafischer Darstellung der densitometrischen Western-Blot-Analysen (B)	61
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software) und Image Lab (Version 5.2.1, Bio-Rad Laboratories GmbH)].	
Abb. 21:	Messung der relativen renalen mRNA-Expression von A) <i>Serpine1</i> und B) <i>Ctgf</i> nach 8h mechanischer Beatmung (MV)	62
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software)].	
Abb. 22:	Repräsentative Bildausschnitte aus den untersuchten Nierenlängsschnitten mit exemplarischer Kennzeichnung der ausgewerteten glomerulären Strukturen (A). Gruppenvergleichende Gegenüberstellung des Durchschnittswerts der Anzahl erfasster Glomeruli innerhalb der untersuchten Nierenkortexfläche (B) und des glomerulären Durchmesser (μm) (C)	63
	[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software) und Microsoft Powerpoint (Version 16.84.1, Microsoft Corporation)].	
Abb. 23:	Repräsentative Nierenlängsschnitte mit exemplarischer Kennzeichnung der nephrogenen Zone bzw. des Nierenkortex (A). Gruppenvergleichende Gegenüberstellung des durchschnittlichen Flächenverhältnisses von kortikaler zu Gesamtfläche (B) und nephrogener Zone zu Gesamtkortex	

(C)	64
[Erstellt mit GraphPad Prism (Version 7.04, GraphPad Software) und Microsoft Powerpoint (Version 16.84.1, Microsoft Corporation)].	

Abb. 24: Schematische Ergebniszusammenfassung und schlussfolgerndes Arbeitsmodell	66
[Erstellt mit BioRender.com].	

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Chemikalien und Reagenzien	29
Tab. 2:	Puffer und Lösungen	31
Tab. 3:	Kits	32
Tab. 4:	Gele für Western-Blot-Verfahren	32
Tab. 5:	Antikörper für Western-Blot-Verfahren	33
Tab. 6:	Primer für TaqMan-qRT-PCR	33
Tab. 7:	Primer für SYBR-Green-I-qRT-PCR	34
Tab. 8:	Verbrauchsmaterial	35
Tab. 9:	Geräte und Ausrüstung	37
Tab. 10:	Software	39
Tab. 11:	Auftragungsschema für die Mikrotiterplatte im Rahmen der kolorimetrischen Proteinkonzentrationsbestimmung	46