

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin mit Gastroenterologie und Nephrologie
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische
Intensivmedizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Kai-Uwe Eckardt

Habilitationschrift
**Epitheliale Genregulation in der gesunden
und erkrankten Niere**

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin und Nephrologie
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité-
Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Dipl.-Math. Christian Hinze

Eingereicht: Januar 2023
Dekan: Prof. Dr. Joachim Spranger
1. Gutachter: Prof. Dr. Kerstin Amann
2. Gutachter: Prof. Dr. Rafael Kramann

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	4
1.1 Die Diversität renaler Zelltypen und Besonderheiten der renalen Anatomie.....	4
1.1.1 Einführung in die renale Physiologie und Anatomie	4
1.1.2 Besonderheiten des Nierenepithels am Beispiel der renalen Sammelrohrprinzipalzellen.....	6
1.1.3 Das Nierenepithel im akuten Nierenversagen	8
1.2 Möglichkeiten der Analyse renaler Genexpression und Genregulation	10
2. Eigene Arbeiten	15
2.1 Genregulation der epithelialen Dichtigkeit: was kann uns die Zellkultur lehren?	15
2.2 Genregulation der zellulären epithelialen Dichtigkeit und klinische Implikationen	29
2.3 Alternative epitheliale Genregulation von Aquaporin 2 im Sammelrohr	44
2.4 Einfluss der kortikomedullären Osmolarität auf die renale epitheliale Genexpression	63
2.5 Induktion distinkter epithelialer Genexpressionsprogramme beim akuten Nierenversagen	82
3. Diskussion.....	103
3.1 Klinische Auswirkung von Störungen physiologischer epithelialer Genregulation	103
3.1 Zelltyphomöostase in der gesunden Niere.....	105
3.2 Veränderungen zellulärer Identitäten im akuten Nierenversagen	108
4. Zusammenfassung.....	114
5. Literaturangaben.....	116
Danksagung	120
Erklärung.....	121

Abkürzungen

ANV	Akutes Nierenversagen
IRI	Ischemia reperfusion injury
RNA	Ribonukleinsäure
qPCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
Grhl2	Grainyhead-like 2

1. Einleitung

1.1 Die Diversität renaler Zelltypen und Besonderheiten der renalen Anatomie

1.1.1 Einführung in die renale Physiologie und Anatomie

Die Niere ist eines der zentralen Organe des menschlichen Organismus¹ und übernimmt eine Vielzahl an physiologischen Funktionen. Diese Funktionen beinhalten die enge Regulation des Salz- und Wasserhaushaltes des Körpers, des Säure-Basengleichgewichts sowie die Produktion lebenswichtiger Hormone^{1,2}. Hierfür erhalten die Nieren eine überdurchschnittliche Menge an Herzzeitvolumen, Sauerstoff und Energie^{3,4}. Circa 200 Liter Blut werden jeden Tag renal filtriert und hieraus circa in 1-2 Liter Urin produziert. Zudem werden bei diesem sehr eng orchestrierten Prozess Serumosmolarität, Gesamtkörpervolumen und Elektrolytkonzentrationen in sehr engen Grenzbereichen reguliert. Hierfür bedarf es natürlich eines hochspezialisierten Zellapparates, genauer gesagt, einer Vielzahl verschiedener hochspezialisierter Zelltypen, die diesen Aufgaben gerecht werden.

Die funktionelle Grundeinheit der Niere ist das Nephron bzw. das Glomerulum mit dem nachgeschalteten Tubulussystem bis zum renalen Sammelrohr, durch welches dann schließlich Urin ins Nierenbecken abgegeben wird⁵. Die Hauptzelltypen des Nierentubulussystems, welche dem Glomerulum nachgeschaltet sind, sind der proximale Tubulus, die Henle'sche Schleife, das distale Konvolut, die Verbindungstubuli und schließlich das genannte renale Sammelrohr. Diese Zellen werden in ihrer Gesamtheit als Nierenepithelzellen bezeichnet. Hierbei ist natürlich zu erwähnen, dass sich die genannten einzelnen Tubulusabschnitte selbst noch in eine Vielzahl an Subzelltypen und anatomische Subsegmente gliedern bzw. verschiedene Zelltypen inkorporieren. So besteht in klassischer Sicht der proximale Tubulus aus drei Segmenten, S1-3, das Sammelrohr hingegen aus mindestens sieben Zelltypen, mindestens fünf verschiedenen Typen der Sammelrohrprinzipalzellen (Prinzipalzellen des Kortex, der äußeren Medulla,

der inneren Medulla Typ 1-3) sowie mindestens zwei interkalierten Zelltypen (interkalierte Zellen Typ A und B)⁶⁻⁸.

Die genaue Funktionsbeschreibung jedes einzelnen Tubulusabschnitts übersteigt sicher den Umfang dieser Abhandlung. Es seien jedoch einige allgemeinere Prinzipien erwähnt: Durch den Besatz mit bestimmten apikalen Transportern, der selektiven Durchlässigkeit der Zell-Zellkontakte sowie der Präsenz von elektrischen und Konzentrationsgradienten erfolgt die segmentspezifische Resorption und Ausscheidung von Stoffen¹.

Eine weitere Besonderheit der renalen Anatomie neben der Vielzahl verschiedener Zelltypen sind sicher die intrarenalen Gradienten von Sauerstoffpartialdruck und Gewebsosmolalität. Die Niere selbst gliedert sich von außen zum Nierenbecken hin in Kortex oder Nierenrinde, äußere und innere Medulla oder Nierenmark⁹. Dieser räumlichen Trajektorie folgen auch die genannten Gradienten von Sauerstoff und Osmolalität mit arteriellem Sauerstoffpartialdruck und serumisoomolarer Osmolalität im Kortex bis hin zu Sauerstoffpartialdrücken von 10 mmHg in Teilen der inneren Medulla und Gewebsosmolalitäten von circa 1200 mosm/kg H₂O beim Menschen¹⁰⁻¹⁴. Die Existenz dieser Gradienten hat weitreichende physiologische Folgen. Zum einen beeinflussen diese Gradienten die in den Zellen vorhandene Genexpression, um sich beispielweise gegen die widrigen Bedingungen eines niedrigen Sauerstoffpartialdruckes oder einer erhöhten Gewebsosmolalität zu bestehen¹⁴⁻¹⁶. Zum anderen werden bestimmte Zelltypen empfindlicher gegen Schädigungen der Niere, welche diese ohnehin schon extremen Umgebungsbedingungen weiter aggravieren können. Handelt es sich hierbei um Zellen, die zudem noch viele Nährstoffe und Sauerstoff brauchen, aufgrund eines sehr hohen Stofftransportes, sind diese natürlich am empfindlichsten gegenüber äußeren Störungen. Das enge Gleichgewicht, in denen sich die Nierenepithelien bewegen, wird sowohl in der physiologischen Situation als auch im Falle renaler Pathologien deutlich. Das Verständnis physiologischer und pathologischer, renaler epithelialer Regulationsmechanismen ist essenziell für die Behandlung nephrologischer Patienten und Patientinnen.

1.1.2 Besonderheiten des Nierenepithels am Beispiel der renalen Sammelrohrprinzipalzellen

Wie bereits erwähnt, bildet das renale Sammelrohr den terminalen Abschnitt des Nierentubulussystems. Urin gelangt aus den Verbindungstubuli im Nierenkortex in die kortikalen Sammelrohre und gelangt schließlich bis in die innere Medulla, um dann Harn abzugeben an das Nierenbecken⁹. Das Sammelrohr hat mehrere anatomische Besonderheiten: 1. Renale Sammelrohre können sich vom Kortex der Niere bis zur Papillenspitze in der inneren Medulla erstrecken, was bedeutet, dass sie die gesamte kortikomedulläre Achse abbilden und entsprechend dem vollen Osmolalitäts- und Hypoxiegradienten der Niere ausgesetzt sind. 2. Die Sammelrohre selbst bestehen aus zwei verschiedenen Zelltypen in einer Art Salz-und-Pfeffer-Muster, den Prinzipalzellen und den interkalierten Zellen. Die Hauptzellpopulation des Sammelrohres sind jedoch die Prinzipalzellen.

Zu den Hauptaufgaben der Prinzipalzellen gehören die Feinjustierung des Urins über Wasser- und Salzretention sowie die Aufrechterhaltung des kortikomedullären Osmolalitätsgradienten¹⁷. Um diese Aufgaben ausführen zu können, sind die Prinzipalzellen mit besonderen Eigenschaften ausgestattet. Zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten (repräsentiert durch den renalen kortikomedullären Gradienten), der vom Kortex hin zur inneren Medulla stetig zunimmt, müssen ständig osmotische wirksame Substanzen (vor allem Natriumchlorid und Harnstoff) in das Niereninterstitium verbracht werden und vor allem nicht mehr in den Urin zurück diffundieren. Dies setzt die Existenz von Wasserkanälen (sogenannten Aquaporinen) und spezialisierten Transportern für Natrium und Harnstoff voraus^{18,19}. Zudem müssen zur Aufrechterhaltung des Gradienten die Zell-Zell-Kontakte der Prinzipalzellen vor allem in der inneren Medulla sehr dicht sein, so dass keine der genannten Substanzen wieder in den Urin zurück gelangen kann^{20,21}. Störungen einer dieser Komponenten führen zu einer Vielzahl von Krankheitsbildern.

Ist beispielsweise die renale Aquaporinexpression gestört, kann dies zu einem renalen Diabetes insipidus kommen mit enormen Mengen an Urin (10 Liter und mehr), die täglich von den betroffenen Patientinnen und Patienten ausgeschieden werden^{22,23}. Klassisch

sind hier Mutationen von Aquaporin-2 oder dem korrespondierenden Aquaporinrezeptor auf den Prinzipalzellen des Sammelrohres²⁴. Es gibt eine Vielzahl verschiedener renaler Aquaporine, auf den Sammelrohrzellen finden sich u.a. Aquaporin 2, 3 und 4²⁵. Dem Aquaporin 2 kommt dabei sicher besondere Bedeutung zu, da es durch systemische Perzeption des Serumosmolalität und teilweise des Blutvolumens reguliert werden kann²⁶.

Aktuell ist die Therapie von Patientinnen und Patienten mit renalem Diabetes insipidus schwierig, da es sich meist um genetische Defekte handelt. Aktuelle Ergebnisse zeigen jedoch die Möglichkeit die Aquaporinexpression anzupassen über alternative Signalwege²⁷. Normalerweise erfolgt die gesteigerte Expression der Prinzipalzellaquaporine über die Bindung von antidiuretischem Hormon (auch Vasopressin genannt) an den entsprechenden Rezeptor auf den Prinzipalzellen²⁸. Liegen nun Mutationen vor, die den Vasopressinrezeptor in seiner Funktion mindern, kommt es zu einem renalen Diabetes insipidus²⁴. Möchte man hier therapieren, muss der Wasserverlust über das Sammelrohr gedrosselt werden. Das ist nur möglich über eine normale Expression von Aquaporin 2 über einen alternativen Signalweg. Das aus der Pilzinfektionstherapie bekannte Medikament Fluconazol zeigte hier Möglichkeiten auf, Vasopressin-unabhängig die Aquaporin 2- Expression zu steigern²⁷. Hierzu läuft aktuell eine erste klinische Studie.

Um nun Wasser aus dem Urin zurück zu resorbieren, sind nicht nur die korrekte Expression der genannten Aquaporine notwendig, sondern auch das Vorhandensein intakter und sehr dichter Zell-Zell-Kontakte im Sammelrohr. Eine aktuelle Studie zeigte vergleichbare Tendenzen von renalem Diabetes insipidus in Mäusen bei einer gestörten Zell-Zell-Barriere der Prinzipalzellen^{21,29}. An der Konstitution der Zellbarrieren sind eine Vielzahl von Molekülen beteiligt, sehr maßgebliche und Eigenschafts-definierende Komponenten dieser Zell-Zell-Kontakte sind die Claudine. Zu diesem großen Feld sei hier nur gesagt, dass im renalen Sammelrohr vor allem sehr abdichtende Claudine wie Claudin 4 exprimiert sind^{21,29}.

Obwohl im pathophysiologischen Fall alle die genannten Prinzipalzellkomponenten Ausgangspunkt von Krankheit sein können, bieten sie natürlich auch generisch

Ansatzpunkte für zukünftige Therapien, insofern die Genexpressionsmechanismen und Regulationsprinzipien dahinter verstanden werden.

1.1.3 Das Nierenepithel im akuten Nierenversagen

Ein weiteres, hochrelevantes Krankheitsbild, welches zu sehr großen Teilen am renalen Epithel abläuft, ist das akute Nierenversagen (ANV). Wie der Name impliziert, handelt es sich beim ANV um einen kurzfristigen Verlust der Nierenfunktion (bis zu sieben Tage). Das Vorhandensein des ANV wird definiert über einen signifikanten Anstieg des Serumkreatinins oder einen Abfall der Urinausscheidung^{30,31}.

Das ANV ist eine der häufigsten stationären Komplikationen und betrifft bis zu 20% aller hospitalisierten Patientinnen und Patienten³². Neben dem individuellen Schicksal der Betroffenen hat das ANV auch beträchtliche wirtschaftliche Konsequenzen. Die jährlichen Gesamtkosten des ANV übersteigen diese von z. B. Diabetes oder Brustkrebs bei weitem. Nach dem Bericht des UK National Health Service werden jährlich durch ANV höhere Kosten verursacht als durch Haut-, Brust- und Lungenkrebs zusammen^{33,34}.

Leider sind die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung eines ANV limitiert. In vielen Fällen erfolgt lediglich die Optimierung des Wasserhaushaltes, des Blutdrucks und ggf. anderer hämodynamischer Parameter³⁰. Einer der hauptsächlich limitierenden Faktoren auf dem Weg zu einer gezielten Therapie des ANV sind das unvollständige Verständnis der zellulären Abläufe in der Niere im ANV und die Komplexität der Auslöser von ANV. Eine unüberschaubare Zahl klinischer Gegebenheiten können zu einem ANV führen, wie z. B. Überwässerung, Exsikkose, Medikamenteneinnahme, Kontrastmittel, systemische Erkrankungen, Nierensteine, Infektionen, Harnabflussstörungen, um nur einige zu nennen^{32,35}. Anknüpfend an den vorherigen Abschnitt sei hier erwähnt, dass auch das Vorliegen eines Diabetes insipidus eine genetische Prädisposition für ein akutes Nierenversagen darstellt.

Eine Vielzahl von Studien hat sich mit der Aufklärung der Abläufe innerhalb der Niere beim ANV befasst³⁶⁻⁴¹. Zur Verbesserung der Therapie von ANV pressieren eine Vielzahl von Fragen. Dies beginnt einmal mit der Frage danach, welche Genexpressionsprofile in den Nierenzellen aktiviert werden im Zuge eines akuten Nierenversagens. Denn dort wären Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien. Vereinfacht gesprochen, würde man

versuchen schädliche Signalwege, die Nierenzellen in den Zelluntergang bringen, zu unterbinden und regenerative Signalwege zu unterstützen.

Eine weitere wichtige Frage ist zudem, wie viele distinkte molekulare ANV-Subtypen zu den vielen genannten Ursachen von ANV gehören, denn unterschiedliche molekulare Subtypen müssten ggf. unterschiedliche Therapien erhalten. Es ist beispielsweise unklar, ob eine Nierenschädigung aufgrund einer postrenalen Obstruktion dieselben zellulären Mechanismen und Genexpressionsprofile auslöst wie ein Nierenschaden, der durch eine schwere Sepsis oder einen Diabetes insipidus verursacht wird, obwohl beide eventuell denselben Anstieg von Kreatinin oder Abfall der Urinausscheidung bei den Betroffenen auslösen. Es gibt Daten, die darauf hinweisen, dass ein ANV in der Maus aufgrund von Wassermangel oder Minderdurchblutung der Niere grundlegend unterschiedliche Genexpressionsmuster nach sich ziehen³⁶. Die Übertragbarkeit auf den Menschen ist in diesem Fall jedoch unklar.

Im Tiermodell wird vor allem die Maus zur Modellierung von ANV herangezogen. Hier sind viele verschiedene ANV-Modelle etabliert, ein sicher sehr verbreitetes Modell ist das Ischämie-Reperusionsmodell (IRI, ischemia reperfusion injury)^{37,38}. Hierbei wird die Nierenarterie für einen bestimmten Zeitraum abgeklemmt und dann der Blutstrom wieder frei gegeben. Durch die Zeit der Minderperfusion wird ein Schaden an der Niere gesetzt, da in dieser Zeit die Zellen nicht mehr mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Eine analoge Ursache des ANV bei Patientinnen und Patienten wäre z.B. das Aussetzen der Nierenperfusion bei kardiochirurgischen Eingriffen. Man muss jedoch hier erwähnen, dass es sich hierbei um nur eine kleine Anzahl der humanen ANV-Fälle handelt, die so ausgelöst werden.

Das histologische Bild des ANV kurze Zeit nach IRI in Mäusen zeigt ein klassisches Bild mit einem ausgeprägten Schaden vor allem an den proximalen Tubuluszellen^{37,38,42}. Hier ist vor allem das S3-Segment, das späteste Segment des proximalen Tubulus, meist sehr stark geschädigt. Grund hierfür sind die hohe Stoffwechsel- und Resorptionsaktivität dieses Segments und die anatomische Lage in einer Nierenregion mit nicht maximaler Sauerstoffversorgung⁴³. Die geschädigten proximalen Tubuluszellen zeigen sich nach IRI unter anderem abgeflacht, vakuolisiert, zum Teil zeigt sich Detritus im Lumen des

proximalen Tubulus‘ und die Zellen verlieren ihren Bürstensaum, ein Charakteristikum der proximalen Tubuluszellen^{37,38}.

Die histologische Situation beim humanen ANV zeigt sich etwas komplexer mit Schäden, die sich nicht nur dominant in einem Abschnitt des Nephrons befinden, sondern über das Nephron verteilt⁴⁴. Es besteht daher eine berechnigte Debatte darüber inwieweit unsere verfügbaren Mausmodelle die Vorgänge im humanen ANV widerspiegeln. Zudem muss hier auch erwähnt werden, dass wir in vielen Kontexten von humanem ANV regelhaft keine Histologien gewinnen, also auch keine Biopsie erfolgt und kein Gewebe zur Verfügung steht. Ein klassisches Beispiel sind die ANV im Kontext von intensivmedizinischen Patientinnen und Patienten. In diesen Situationen erfolgen zu allermeist keine Biopsien, schon allein wegen des periprozeduralen Risikos bei kritisch Kranken.

1.2 Möglichkeiten der Analyse renaler Genexpression und Genregulation

Wie am Beispiel des Diabetes insipidus und des ANV dargelegt, ist ein grundlegendes molekulares Verständnis zur Verbesserung der Therapie Betroffener notwendig. Hier stehen natürlich eine unüberschaubare Zahl an Techniken und Methoden zur Verfügung. In der Vergangenheit und auch aktuell noch hat sich die Analyse der Genexpression oder der „*transcriptomics*“, also der Messung der Menge an Ribonukleinsäure (RNA) eines bestimmten Gens, an vielen Stellen sehr bewährt.

Bei den Methoden zur Messung der Genexpression kann man grundsätzlich unterscheiden zwischen Methoden, die ein gezieltes Genset (z.B. qPCR) oder das gesamte Transkriptom messen (z.B. RNA sequencing), und zwischen Methoden, die die Genmengen in einzelnen Zellen (*single cell sequencing*) oder auf dem eingesetzten Gesamtgewebe messen können (*bulk RNA sequencing*)⁴⁵.

In aktuellen Studien werden zu allermeist Techniken angewandt, die das gesamte Transkriptom messen^{14,21,27,29,36-38,40,46}. Bislang war hier die gängigste Technik das *bulk RNA sequencing*. Es handelt sich hierbei um ein Verfahren, bei welchem RNA aus dem gesamten eingesetzten Gewebe extrahiert wird und nachfolgend Transkriptom-weit gemessen⁴⁷. Dieses Verfahren ist kostengünstig, sehr bewährt und bietet unzählige publizierte Vergleichs- und Referenzdatensätze. Dennoch hatten dieser Technik starke

Limitationen an. Die sicherlich größte Limitation ist das Messen von Genen im Gesamtgewebe, sprich in allen Zellen, die eben für das entsprechende Experiment eingesetzt werden. Da es sich z.B. bei der Niere meist um Gewebeteile handelt, führt das zur Messung von Durchschnittswerten über Millionen Zellen. Es ist offensichtlich, dass hierdurch Unterschiede in der Zelltypzusammensetzung erheblich das Ergebnis verzerren können. Teilweise umgehen kann man dieses Problem, in dem man möglichst reine Populationen von Zellen mikrodisseziert (beispielsweise einzelne proximale Tubuli) und dann dem *bulk RNA sequencing* zuführt^{48,49}.

In den letzten Jahren waren deswegen Ansätze zur Einzelzellsequenzierung sehr stark im Vormarsch⁵⁰. Wie der Name impliziert, ermöglichen diese Techniken das Messen der Genmenge aller Gene des Transkriptoms in einzelne Zellen, und das in vielen Zellen parallel. Auch hier gibt es wieder viele verschiedene Plattformen mit individuellen Vor- und Nachteilen⁵¹. Um letzten Endes den Ursprung eines RNA-Moleküls aus einer bestimmten Zelle zu rekonstruieren, werden die RNA-Moleküle unter anderem mit Zelltyp-spezifischen Barcodes (kurzen individuellen Oligonukleotidsequenzen) verbunden⁵². Zur Analyse dieser Daten hat sich eine enorme Anzahl an bioinformatischen Analysetools gesellt⁵³. Die Grundzüge der Analyse von Einzelzellsequenzierungsdaten sei hier kurz umrissen: Nach der Sequenzierung werden die so gewonnenen Reads (kurze Fragmente an sequenzierter RNA) an das entsprechende Genom aligniert. Über die Barcodes weiß man, welche Reads zu welcher Zelle gehören. Nicht bekannt ist, um was für Zelltypen es sich handelt und woher diese Zellen anatomisch stammen. Durch Clusteringansätze werden die Zellen in Gruppen ähnlicher Genexpression eingeordnet. Für jede der so generierten Gruppen werden dann im Folgenden Markergene berechnet, also Gene, die besonders stark in der betrachteten Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen exprimiert sind⁵⁴. Aufgrund der vorbestehenden Literatur kann man dann ableiten, um welche Zelltypen es sich bei welcher Gruppe (Cluster) handelt. Beispielsweise exprimieren die Prinzipalzellen als Markergene Aquaporin 2, Untereinheiten des *epithelial sodium channel* (EnAC) und bestimmte Claudine^{14,40}. Proximale Tubuluszellen exprimieren auf der anderen Seite sehr stark Megalin oder Cubulin sowie eine Vielzahl anderer sehr spezifischer Transporter⁵⁵. Finden sich also die genannten Marker überexprimiert in bestimmten Gruppen von Zellen, die durch ein

Clustering gewonnen wurden, so wertet man diese dann als Prinzipalzellen bzw. proximale Tubuluszellen.

Sowohl für die Prinzipalzellen des Sammelrohres also auch für die proximalen Tubuluszellen bzw. für das Nierenepithel im Allgemeinen nach Schädigung haben die Einzelzellansätze bahnbrechende Erkenntnisse erbracht^{8,14,39-41,56,57}. Insgesamt erlauben Einzelzellansätze das erste Mal die Untersuchung der Vielfalt der epithelialen Zelltypen und -Zustände, in denen sich Nierenzellen befinden können, ob nun im Sammelrohr im Speziellen^{8,14} oder im ANV^{40,41}.

Im Sammelrohr gelang so der Nachweis der Plastizität zellulärer Identitäten zwischen interkalierten Zellen und Prinzipalzellen⁵⁶. Vermittelt durch den Notch-Signalweg können die beiden Zelltypen ineinander übergehen. Eine unserer Arbeiten konnte zudem zeigen, dass die Zelltypen der Prinzipalzellen kontinuierlich ineinander übergehen (wenn man sich die Genexpression betrachtet) und nicht wie vorher angenommen scharf abgegrenzte Subzelltypen bilden¹⁴.

Besonders aufschlussreich waren auch die Einzelzellarbeiten zur renalen epithelialen Genexpression beim akuten Nierenversagen. Hierzu gab es in der jüngeren Vergangenheit wichtige Studien in der Maus^{39,41,57}. Grundlage aller dieser Modelle war das IRI-Modell, bei dem die arterielle Perfusion der Niere kurzzeitig unterbrochen und so ein akuter Schaden verursacht wird. Gemeinsam war allen diesen Arbeiten, dass der hauptsächliche Schaden, bzw. als Readout die Veränderung der Genexpressionsantwort, in den proximalen Tubuluszellen festgestellt werden konnte. Interessanter Weise sah man zudem neue zelluläre Zustände (*cell states*) anhand der Genexpression, die sich sehr stark von gesunden proximalen Tubuluszellen unterschieden³⁹. Diese *cell states* waren definiert durch eine Herunterregulation von kanonischen Markergenen des proximalen Tubulus' (z.B. Megalin) und eine Hochregulation von bekannten Schädigungsmarkern wie z.B. *kidney injury molecule-1*. Die Vielfalt dieser transkriptionellen Zellzustände war bis dato im ANV unbekannt. Über Trajektorienanalysen konnten diese Zellzustände weiter funktionell charakterisiert werden, um festzustellen, ob diese sich wieder in normales Nierenepithel zurück entwickeln werden, also regeneratives Potenzial haben, oder, ob sie nicht mehr regenerativ sind. Ein Zellzustand wurde identifiziert, der aus transkriptioneller Sicht am

weitesten vom normalen proximalen Tubulus entfernt war und kein regeneratives Potenzial zeigte, diese Zellen wurden *failed repair cells* oder maladaptive Zellen genannt³⁹. Die Markergene dieser maladaptiven Zellen umfassten viele Gene des profibrotischen Signallings als auch proinflammatorische Gene. Über diese Zellen scheint die Niere also aktiv zum profibrotischen und proinflammatorischen Geschehen im ANV beizutragen. Zudem stellen diese Zellen quasi die Entität des irreversiblen renalen Schadens dar, da diese Zellen nicht mehr zu normalem proximalen Tubulusepithel regenerieren werden. Alles Erkenntnisse, die vorher ohne Einzelzellansätze unbekannt waren.

Essenziell ist natürlich die Frage inwieweit diese Resultate auf den Menschen übertragbar sind. Leider ist die Studienlage diesbezüglich äußerst begrenzt^{40,46}. Im Kontext des ANV ist es ohnehin sehr schwierig an humane Proben zu gelangen. Normalerweise werden Patientinnen und Patienten mit ANV ohne Hinweis auf eine Autoimmunerkrankung nicht biopsiert, schon gar nicht im Kontext der Intensivmedizin, wo die größte Zahl an schweren ANV auftreten. Verbleibende Möglichkeiten diesbezüglich an humanes Nierengewebe oder humane Nierenzellen zu gelangen, sind postmortale Nierenbiopsien oder Zellen aus dem Urin. Beide Ansätze wurden kürzlich erfolgreich von uns verfolgt und wir konnten erste Einblicke bieten zu den molekularen Vorgängen beim humanen akuten Nierenversagen^{40,46}.

Ähnlich der Maus sahen wir auch im proximalen Tubulus das Entstehen ANV-assoziiierter Zellzustände. Einige von diesen transkriptionellen Zellzuständen ähneln den in der Maus beschriebenen maladaptiven Zellen sehr. D.h. auch im humanen Kontext gelingt es mit Einzelzellansätzen die Stärke des irreversiblen Nierenschadens abzubilden. Allerdings zeigten die humanen Daten auch einen Schaden im gesamten Nephron und nicht nur im proximalen Tubulus. Interessanterweise waren zudem die Genexpressionsmuster der geschädigten Zellen in den unterschiedlichen Nephronabschnitten sehr ähnlich, was auf konservierte Genexpressionsmuster bei Schädigung hinweist⁴⁰.

Auch im Urin konnten die Cluster von geschädigten Nierenepithelzellen rekapituliert werden, inklusive der maladaptiven Zellen, die auch im proximalen Tubulus der Maus gefunden werden konnten. Das eröffnet neue Möglichkeiten hinsichtlich weiterer funktioneller Untersuchungen und Biomarkern. Es besteht nämlich die Möglichkeit die

maladaptiven Zellen aus dem Urin von ANV-Patientinnen und -Patienten zu sortieren (mittels spezifischer Oberflächenmarker). Diese so gewonnenen Zellen können in der Zellkultur weiter untersucht werden, z.B. in Co-Kultur mit gesunden Nierenepithelien sowie in ihrer Menge als Maß für den irreversiblen Schaden im ANV mit klinischen Verlaufsparemtern korreliert werden.

2. Eigene Arbeiten

2.1 Genregulation der epithelialen Dichtigkeit: was kann uns die Zellkultur lehren?

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, spielt die Dichtigkeit der Sammelrohre eine wichtige Rolle im Erhalt der Gesamtkörperwasserhomöostase und zur Verhinderung eines ANV. Diese Dichtigkeit wird durch die Zell-Zell-Kontakte und hier im Besonderen durch die *tight junctions* vermittelt. Diese bestehen aus einer Vielzahl von Molekülen. Unter ihnen befinden sich beispielsweise auch Claudine mit besonders hoher Dichtigkeit.

Die Genregulation der Tight Junctions im Sammelrohr ist unvollständig geklärt. Wir identifizierten bereits in früheren Studien den Transkriptionsfaktor Grainyhead-like 2 (Grhl2) als möglichen geeigneten Kandidaten der Regulation der Zelldichtigkeit im Sammelrohr. Vor Durchführung unserer Studie war bislang über die Funktion von Grhl2 diesbezüglich wenig bekannt.

Da ein globaler Knockout von Grh2 zu embryonaler Letalität führt, bieten sich Untersuchungen in der Zellkultur und im Embryo an. In diesem Zusammenhang generierten wir einen Knockdown von Grhl2 in immortalisierten Prinzipalzellen des innermedullären Sammelrohres (IMCD-3-Zellen). Diese verglichen wir in unseren Analysen mit nicht alterierten Kontrollzellen.

Genexpressions- und Immunopräzipitationsanalysen zeigten, dass es sich bei Grhl2 um einen starken transkriptionellen Aktivator handelt, der u. a. Claudin 4, E-Cadherin und Rab 25 hochreguliert. Zudem entdeckten wir eine bisher unbekannte Regulation des Transkriptionsfaktors Ovo-like 2 durch Grhl2. Ein Verlust von Grhl2 in der Zellkultur führte u.a. zu einem drastischen Einbruch des transepithelialen Widerstandes, einem Maß der epithelialen Dichtigkeit. Interessanterweise führte eine Re-Expression der Kombination aus Claudin 4 und Rab 25 oder von Ovo-like 2 allein zu einer Rekonstitution dieses Dichtigkeits- und Widerstandsverlustes. Über unsere Genexpressionsanalysen führte dies somit zur Entdeckung einer neuen Regulationsachse der epithelialen Dichtigkeit im renalen Sammelrohr.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

A Grainyhead-like 2/Ovo-Like 2 Pathway Regulates Renal Epithelial Barrier Function and Lumen Expansion

Aue A*, Hinze C*, Walentin K, Ruffert J, Yurtdas Y, Werth M, Chen W, Rabien A, Kilic E, Schulzke JD, Schumann M, Schmidt-Ott KM. *J Am Soc Nephrol.* 2015; 26(11):2704-2715. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2014080759>.

*Co-first authors

“Grainyhead transcription factors control epithelial barriers, tissue morphogenesis, and differentiation, but their role in the kidney is poorly understood. Here, we report that nephric duct, ureteric bud, and collecting duct epithelia express high levels of grainyhead-like homolog 2 (Grhl2) and that nephric duct lumen expansion is defective in Grhl2-deficient mice. In collecting duct epithelial cells, Grhl2 inactivation impaired epithelial barrier formation and inhibited lumen expansion. Molecular analyses showed that GRHL2 acts as a transcriptional activator and strongly associates with histone H3 lysine 4 trimethylation. Integrating genome-wide GRHL2 binding as well as H3 lysine 4 trimethylation chromatin immunoprecipitation sequencing and gene expression data allowed us to derive a high-confidence GRHL2 target set. GRHL2 transactivated a group of genes including Ovol2, encoding the ovo-like 2 zinc finger transcription factor, as well as E-cadherin, claudin 4 (Cldn4), and the small GTPase Rab25. Ovol2 induction alone was sufficient to bypass the requirement of Grhl2 for E-cadherin, Cldn4, and Rab25 expression. Re-expression of either Ovol2 or a combination of Cldn4 and Rab25 was sufficient to rescue lumen expansion and barrier formation in Grhl2-deficient collecting duct cells. Hence, we identified a Grhl2/Ovol2 network controlling Cldn4 and Rab25 expression that facilitates lumen expansion and barrier formation in subtypes of renal epithelia.”

2.2 Genregulation der zellulären epithelialen Dichtigkeit und klinische Implikationen

Die Ergebnisse unserer Studie in der Zellkultur ließen natürlich die Frage offen, inwieweit diese Ergebnisse auch im lebenden Organismus reproduzierbar wären und vor allem, welchen Phänotyp diese nach sich ziehen würden. Wie bereits erwähnt, führt ein globaler Verlust von Grhl2 in allen Körperzellen bei Mäusen zu einer embryonalen Letalität mit schwersten morphologischen Veränderungen wie z.B. einem unvollständigen Schluss des Neuralrohres oder schweren Herzfehlbildungen. Da die Niere zu diesem Zeitpunkt noch nicht entwickelt ist, kann so eine Untersuchung des Nierenepithels nicht stattfinden. Um die embryonale Letalität zu umgehen und dennoch den Verlust von Grhl2 im Sammelrohr zu erreichen, generierten wir Mäuse mit einem nur Sammelrohr-spezifischen Knockout über ein Hoxb7-getriebenes Cre-Rekombinasesystem. Hoxb7 wird spezifisch im Sammelrohr exprimiert und führt so zu einer Cre-Rekombinase-assoziierten Ausschaltung von Grhl2.

Die so generierten Mäuse waren fruchtbar, lebensfähig und zeigten zunächst grob makroskopisch keine Alterationen im Vergleich zu Kontrollmäusen. Unsere Genexpressionsanalysen bestätigten die Deregulation der in der Zellkultur gefundenen Zielgene und identifizierten weitere Zell-Zell-Kontakt-assoziierte Grhl2-Targets. Von den klinischen Parametern her zeigten die Knockoutmäuse keine Auffälligkeiten, insbesondere kein Nierenversagen oder Veränderungen des Säure-Basenhaushaltes oder der Elektrolyte.

Die Analyse der epithelialen Genexpression suggerierte einen Defekt der Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte der Prinzipalzellen im Sammelrohr bei Verlust von Grhl2. Diese Dichtigkeit ist von großer Bedeutung für die Rückresorption von Wasser, welches bei undichtem Epithel wieder zurück in den Urin diffundieren würde und ein ANV nach sich ziehen würde. Unter Basalbedingungen sahen wir passend zu dieser Vermutung ein gesteigertes Urinvolumen mit verdünntem Urin und eine gesteigerte Trinkmenge bei den Knockoutmäusen im Vergleich zu den Kontrollen. In isolierten Sammelrohren aus unseren Mäusen konnte wir zudem elektrophysiologisch den Barriere Defekt über einen verminderten transepithelialen Widerstand weiter konsolidieren.

Unter Durstbedingungen aggravierte sich die klinische Situation der Knockoutmäuse, die aufgrund des Barriere-bedingten renalen Diabetes insipidus schneller ein ANV entwickelten. Dies ist die erste Arbeit, die einen Diabetes insipidus und eine Prädisposition für eine ANV mit der renalen Barrierefunktion assoziiert hat. Grundlegend für diese Erkenntnisse war die Analyse der entsprechenden epithelialen Genexpression und -Regulation.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Renal adaptation to water deprivation depends on GRHL2-mediated collecting duct barrier function

Hinze C*, Ruffert J*, Walentin K*, Himmerkus N, Mutig K, Schumann M, Bachmann S, Bleich M, Schmidt-Ott KM. *J Am Soc Nephrol.* 2018; 29(3):857-868. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2017030353>.

*Co-first authors

“Collecting ducts make up the distal-most tubular segments of the kidney, extending from the cortex, where they connect to the nephron proper, into the medulla, where they release urine into the renal pelvis. During water deprivation, body water preservation is ensured by the selective transepithelial reabsorption of water into the hypertonic medullary interstitium mediated by collecting ducts. The collecting duct epithelium forms tight junctions composed of barrier-enforcing claudins and exhibits a higher transepithelial resistance than other segments of the renal tubule exhibit. However, the functional relevance of this strong collecting duct epithelial barrier is unresolved. Here, we report that collecting duct–specific deletion of an epithelial transcription factor, grainyhead-like 2 (GRHL2), in mice led to reduced expression of tight junction–associated barrier components, reduced collecting duct transepithelial resistance, and defective renal medullary accumulation of sodium and other osmolytes. In vitro, Grhl2-deficient collecting duct cells displayed increased paracellular flux of sodium, chloride, and urea. Consistent with these effects, Grhl2-deficient mice had diabetes insipidus, produced dilute urine, and failed to adequately concentrate their urine after water restriction, resulting in

susceptibility to prerenal azotemia. These data indicate a direct functional link between collecting duct epithelial barrier characteristics, which appear to prevent leakage of interstitial osmolytes into urine, and body water homeostasis.”

2.3 Alternative epitheliale Genregulation von Aquaporin 2 im Sammelrohr

Dass genregulatorische Störungen im Sammelrohr zu ausgeprägten klinischen Beschwerden führen können und für ein ANV prädisponieren können, konnten unsere bereits genannten Vorarbeiten zeigen. Entscheidend bleibt bei alledem natürlich insbesondere die Frage nach klinischer Therapierbarkeit und Verbesserung der Patientenversorgung.

Nimmt man die Störungen der epithelialen Genexpression, die in der Literatur für ANV prädisponieren (wie z.B. für Diabetes insipidus) oder die in unserem Grhl2-Modell beschrieben wurden, so wäre eine Therapie der defizienten Gene erforderlich. Da dies in den meisten Kontexten nicht möglich ist, sind andere Strategien zu verfolgen. Eine davon wäre, die gängigen Signalkaskaden der entsprechenden Gene zu umgehen und entscheidende Zielmoleküle direkt zu aktivieren.

Ein gutes Beispiel bietet hier erneut der Wasserkanal Aquaporin-2, der sehr spezifisch in renalen Sammelrohrprinzipalzellen exprimiert ist. Im physiologischen Fall wird bei u.a. Mangel an freiem Wasser in der Blutbahn (erhöhte Osmolalität), das Hormon Vasopressin, auch antidiuretisches Hormon genannt, aus Zellen des Hypothalamus‘ sezerniert. Diese binden dann u.a. an Vasopressinrezeptoren auf den Prinzipalzellen des Sammelrohres. Diese Bindung führt zu einer Vielzahl intrazellulärer Prozesse, diese beinhalten sowohl eine gesteigerte Genexpression von Aquaporin-2 als auch den Einbau von gespeichertem Aquaporin-2 in die apikale Zellmembran. Insgesamt wird durch die Bindung von Vasopressin an die genannten Rezeptoren also mehr freies Wasser rückresorbiert.

Im Falle eines Diabetes insipidus renalis kann der Vasopressinrezeptor durch eine genetische Mutation in seiner Funktion gemindert sein. Das bedeutet, dass selbst bei ausreichenden Mengen an Vasopressin eine gesteigerte Wasserrückresorption nicht möglich ist. Die Betroffenen fallen bereits im Säuglingsalter auf durch einen lebensgefährlichen Wasserverlust mit schwerem ANV und müssen auch als Erwachsene enorme Flüssigkeitsmengen zu sich nehmen, um den renalen Verlust auszugleichen.

In unserer Studie stellten wir fest, dass das sonst in der Pilztherapie bekannte Medikament Fluconazol in der Lage ist, Aquaporin-2-Genexpression und apikale Translokation Vasopressin-Rezeptor-unabhängig zu induzieren. Wir testeten dies sowohl

in Mäusen als auch in Primärkulturen von isolierten Prinzipalzellen. Wir konnten zeigen, dass Fluconazol dazu in der Lage ist, die Wasserrückresorption zu steigern, unabhängig vom Vasopressin-Rezeptor. Es stellt somit einen neuen interessanten Therapieansatz dar zur Behandlung eines renalen Diabetes insipidus und kann helfen das Auftreten von ANV zu verhindern.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Fluconazole Increases Osmotic Water Transport in Renal Collecting Duct through Effects on Aquaporin-2 Trafficking

Vukićević T*, Hinze C*, Compton F, Ahlborn R, Dema A, Zühlke K, Eichhorst J, Wiesner B, Schmidt-Ott KM, Klussmann E. *J Am Soc Nephrol.* 2019; 30(5):795-810. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2018060668>.

*Co-first authors

“Background: Arginine-vasopressin (AVP) binding to vasopressin V2 receptors promotes redistribution of the water channel aquaporin-2 (AQP2) from intracellular vesicles into the plasma membrane of renal collecting duct principal cells. This pathway fine-tunes renal water reabsorption and urinary concentration, and its perturbation is associated with diabetes insipidus. Previously, we identified the antimycotic drug fluconazole as a potential modulator of AQP2 localization.

Methods: We assessed the influence of fluconazole on AQP2 localization in vitro and in vivo as well as the drug’s effects on AQP2 phosphorylation and RhoA (a small GTPase, which under resting conditions, maintains F-actin to block AQP2-bearing vesicles from reaching the plasma membrane). We also tested fluconazole’s effects on water flow across epithelia of isolated mouse collecting ducts and on urine output in mice treated with tolvaptan, a VR2 blocker that causes a nephrogenic diabetes insipidus–like excessive loss of hypotonic urine.

Results: Fluconazole increased plasma membrane localization of AQP2 in principal cells independent of AVP. It also led to an increased AQP2 abundance associated with alterations in phosphorylation status and ubiquitination as well as inhibition of RhoA. In

isolated mouse collecting ducts, fluconazole increased transepithelial water reabsorption. In mice, fluconazole increased collecting duct AQP2 plasma membrane localization and reduced urinary output. Fluconazole also reduced urinary output in tolvaptan-treated mice.

Conclusions: *Fluconazole promotes collecting duct AQP2 plasma membrane localization in the absence of AVP. Therefore, it might have utility in treating forms of diabetes insipidus (e.g., X-linked nephrogenic diabetes insipidus) in which the kidney responds inappropriately to AVP.”*

2.4 Einfluss der kortikomedullären Osmolarität auf die renale epitheliale Genexpression

Die vorhergehenden Studien konnten zeigen, dass das Sammelrohr eine wichtige Komponente darstellen kann, die für ANV prädisponiert. Entscheidend hierfür ist die spezifische epitheliale Genexpression in diesem Segment. Jedoch sind selbst die bereits viel genannten Prinzipalzellen unter sich keine homogene Zellpopulation. Ähnliche Heterogenitäten bezüglich der Zelltypidentität finden sich auch in den anderen Tubulusabschnitten. Eine zentrale Frage der nephrologischen Forschung ist deswegen auch die nach der Diversität der renalen epithelialen Zelltypen. Das ist nicht nur von rein anatomischem Interesse. Neben der traditionellen morphologischen und aus der Histologie stammenden Definition der Zelltypen, können diese natürlich auch basierend auf Genexpressionsprofilen charakterisiert und eingeteilt werden. Aus klinischer Sicht ist dies sogar von vordergründigem Interesse, da hier mögliche Therapeutika ansetzen könnten. Insofern ist es zum Prüfen therapeutischer Ansätze neben einem grundlegenden Interesse an der Vielfältigkeit renaler Biologie von großer Wichtigkeit, die Diversität renaler Zelltypen besser zu verstehen.

Die RNA-Einzelzellsequenzierung bietet eine sehr moderne Methode, um die Genexpression in tausenden einzelnen Zellen parallel zu ermitteln. Hiermit ist die Diversität renaler Zelltypen bis zu einem bestimmten Grad abbildbar. Eine große Limitation dieser Technologie ist der vollständige Verlust räumlicher Informationen zu den so sequenzierten Zellen. Anders ausgedrückt ist man durch die Anwendung dieser Technik zwar in der Lage zu bestimmen, ob es sich bei einer bestimmten Zelle um eine proximale Tubuluszelle oder eine Sammelrohrzelle handelt, jedoch weiß man in aller Regel nicht mehr, wo sich diese Zelle im renalen Gesamtkontext räumlich befand. Für den genannten ANV-prädisponierenden Dichtigkeitsverlust im Epithel wäre vor allem ein Verlust in der inneren Medulla entscheidend, da hier die größten Osmolalitätsgradienten vorliegen.

Verlust räumlicher Information, ist in einem räumlich äußerst heterogenen Organ wie der Niere natürlich eine erhebliche Limitation. In der nun präsentierten Studie konnten wir zeigen, dass die in der Niere intrinsisch vorhandene und zum Mark hin zunehmende Osmolalität bestimmte Genexpressionsmuster induziert. Sie kann somit genutzt werden,

um Zellen der Niere wieder räumlich anzuordnen. Dies erlaubt nicht nur eine Analyse der Genexpression in bestimmten Zelltypen, sondern auch eine Analyse entlang der kortikomedullären Achse der Niere. Wir konnten so für die Prinzipalzellen des Sammelrohres feststellen, dass diese sich nicht in diskrete Zelltypen aufteilen lassen, sondern vielmehr einen fließenden Zelltypübergang von der Nierenrinde zum -Mark hin aufweisen. Unser Ansatz kann zudem genutzt werden, um qualitativ die Osmolalität in unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Modellen semiquantitativ zu messen und zu vergleichen. Zudem konnten wir zelluläre Schutzmechanismen identifizieren wie sich beispielsweise Zellen der inneren Medulla gegen niedrige Sauerstoffpartialdrücke und die hohe Gewebsosmolalität schützen.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Kidney Single-cell Transcriptomes Predict Spatial Corticomedullary Gene Expression and Tissue Osmolality Gradients

Hinze C, Karaiskos N, Boltengagen A, Walentin K, Redo K, Himmerkus N, Bleich M, Potter SS, Potter AS, Eckardt KU, Kocks C, Rajewsky N, Schmidt-Ott KM. *J Am Soc Nephrol*. 2020 Nov 25:ASN.2020070930. doi: <https://doi.org/10.1681/ASN.2020070930>. Epub ahead of print.

“Background: *Single-cell transcriptomes from dissociated tissues provide insights into cell types and their gene expression and may harbor additional information on spatial position and the local microenvironment. The kidney’s cells are embedded into a gradient of increasing tissue osmolality from the cortex to the medulla, which may alter their transcriptomes and provide cues for spatial reconstruction.*

Methods: *Single-cell or single-nuclei mRNA sequencing of dissociated mouse kidneys and of dissected cortex, outer, and inner medulla, to represent the corticomedullary axis, was performed. Computational approaches predicted the spatial ordering of cells along the corticomedullary axis and quantitated expression levels of osmo-responsive genes. In situ hybridization validated computational predictions of spatial gene-expression patterns. The strategy was used to compare single-cell transcriptomes from wild- type*

mice to those of mice with a collecting duct–specific knockout of the transcription factor grainyhead- like 2 ($Grhl2^{CD2/2}$), which display reduced renal medullary osmolality.

Results: Single-cell transcriptomics from dissociated kidneys provided sufficient information to approximately reconstruct the spatial position of kidney tubule cells and to predict corticomedullary gene expression. Spatial gene expression in the kidney changes gradually and osmo-responsive genes follow the physiologic corticomedullary gradient of tissue osmolality. Single-nuclei transcriptomes from $Grhl2^{CD2/2}$ mice indicated a flattened expression gradient of osmo-responsive genes compared with control mice, consistent with their physiologic phenotype.

Conclusions: Single-cell transcriptomics from dissociated kidneys facilitated the prediction of spatial gene expression along the corticomedullary axis and quantitation of osmotically regulated genes, allowing the prediction of a physiologic phenotype.”

2.5 Induktion distinkter epithelialer Genexpressionsprogramme beim akuten Nierenversagen

In den bisher genannten Arbeiten wurden vor allem für das ANV prädisponierende Faktoren untersucht. Aus klinisch-nephrologischer Sicht kommt einem besseren Verständnis der molekularen Vorgänge während des ANV ein ebenso hoher Stellenwert zu. Die aktuelle Situation in der stationären Versorgung von Patientinnen und Patienten mit ANV bietet in den meisten Fällen keine zielgerichtete Therapie des ANV an. In den meisten Fällen beschränkt man sich in der Versorgung auf die Optimierung kardiovaskulärer Risikofaktoren.

Aus der Forschung der letzten Jahrzehnte ist bekannt, dass dem renalen Tubulusepithel eine herausragende Rolle bei den molekularen Vorgängen im ANV zukommt. Dies gilt sowohl für den Ort des akuten Schadens als auch für den weiteren Verlauf und das Risiko der Entwicklung einer Fibrose. Da Patientinnen und Patienten mit ANV in den meisten Fällen nicht biopsiert werden, sind die molekularen Daten aus dem Menschen zum ANV sehr beschränkt. Die Mehrheit der molekularen Erkenntnisse stammen aus gut beforschten Mausmodellen, die dem Epithelschaden im proximalen Tubulus eine gesteigerte Bedeutung bekommen ließen.

Unserer Hypothese nach glauben wir jedoch an eine Reaktion des gesamten Tubulusapparates, auch des renalen Sammelrohres, im humanen ANV. Um diese Behauptung zu stützen, etablierten wir ein Protokoll zur Gewinnung postmortaler Nierenbiopsien von Patientinnen und Patienten mit und ohne ANV. Dies erfolgte in enger Kooperation mit den Intensivstationen der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Die Patientinnen und Patienten mit ANV zeigten alle ein schweres (mind. Grad 2) Nierenversagen aufgrund eines schweren Atemwegsinfektes (z.T. auch schweres COVID-19).

Unter Nutzung der RNA-Einzelzellsequenzierung gelang so die Erstellung eines Atlas' der renalen epithelialen Genexpression im humanen ANV mit Einzelzellauflösung. Entsprechend unserer initialen Vermutung sahen wir – im Gegensatz zu den Mausdaten – eine starke Genexpressionsantwort auf das ANV im gesamten renalen Tubulussystem. Dies beinhaltete insbesondere auch die distalen Abschnitte, inklusive dem renalen Sammelrohr. Interessanterweise sahen wir nicht nur eine epitheliale Schädigung in all

den genannten Bereichen, sondern das Muster der Genexpression der geschädigten Zellen in den unterschiedlichen Nephronabschnitten zeigte große Übereinstimmung. Insofern führte unsere Studie zu einem gewissen Paradigmenwechsel im molekularen Verständnis des humanen ANV. Wir wissen jetzt, dass sowohl proximale als auch distale Abschnitte des Tubulusapparates im ANV involviert sind und dass die unterschiedlichen Teile des renalen Tubulussystems eine konservierte und vergleichbare Schädigungssignatur exprimieren.

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit:

Single-cell transcriptomics reveals common epithelial response patterns in human acute kidney injury

Hinze C, Kocks C, Leiz J, Karaikos N, Boltengagen A, Cao S, Skopnik CM, Klocke J, Hardenberg JH, Stockmann H, Gotthardt I, Obermayer B, Haghverdi L, Wyler E, Landthaler M, Bachmann S, Hocke AC, Corman V, Busch J, Schneider W, Himmerkus N, Bleich M, Eckardt KU, Enghard P, Rajewsky N, Schmidt-Ott KM. *Genome Med.* 2022 Sep 9;14(1):103. doi: <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01108-9>. PMID: 36085050; PMCID: PMC9462075.

“Background: *Acute kidney injury (ANV) occurs frequently in critically ill patients and is associated with adverse outcomes. Cellular mechanisms underlying ANV and kidney cell responses to injury remain incompletely understood.*

Methods: *We performed single-nuclei transcriptomics, bulk transcriptomics, molecular imaging studies, and conventional histology on kidney tissues from 8 individuals with severe ANV (stage 2 or 3 according to Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) criteria). Specimens were obtained within 1–2 h after individuals had succumbed to critical illness associated with respiratory infections, with 4 of 8 individuals diagnosed with COVID-19. Control kidney tissues were obtained post-mortem or after nephrectomy from individuals without ANV.*

Results: *High-depth single cell-resolved gene expression data of human kidneys affected by ANV revealed enrichment of novel injury-associated cell states within the major cell*

types of the tubular epithelium, in particular in proximal tubules, thick ascending limbs, and distal convoluted tubules. Four distinct, hierarchically interconnected injured cell states were distinguishable and characterized by transcriptome patterns associated with oxidative stress, hypoxia, interferon response, and epithelial-to-mesenchymal transition, respectively. Transcriptome differences between individuals with ANV were driven primarily by the cell type-specific abundance of these four injury subtypes rather than by private molecular responses. ANV-associated changes in gene expression between individuals with and without COVID-19 were similar.

Conclusions: *The study provides an extensive resource of the cell type-specific transcriptomic responses associated with critical illness-associated ANV in humans, highlighting recurrent disease-associated signatures and inter-individual heterogeneity. Personalized molecular disease assessment in human ANV may foster the development of tailored therapies.”*

3. Diskussion

3.1 Klinische Auswirkung von Störungen physiologischer epithelialer Genregulation

In mehreren Studien konnten wir wie oben beschrieben die Auswirkungen der Störung epithelialer Genregulation in der Niere näher untersuchen. Als Modell diente hierbei zunächst das renale Sammelrohr. Da sich die Sammelrohre von der Nierenrinde bis tief ins konstitutionell hypoxische und hyperosmolare Nierenmark ziehen, sehen sich die Zellen des Sammelrohres einem breiten Spektrum an Stressfaktoren und zellulären Umgebungen ausgesetzt.

Aus der klinischen Forschung sind Störungen im Bereich des Sammelrohres sehr gut bekannt durch das Krankheitsbild des renalen Diabetes insipidus, bei dem es durch einen Mangel an Wasserrückresorption zur Ausscheidung großer Mengen eines stark verdünnten Urins kommt²²⁻²⁴. Bisher waren in dieser Richtung vor allem Mutationen des Vasopressinrezeptors und des Aquaporin-2 bekannt²⁴.

In unseren Studien schlagen wir ein völlig neues Modell eines renalen Diabetes insipidus vor, nämlich basierend auf undichten Zell-Zell-Kontakten im Sammelrohr. Die Kernaussage dieser Behauptung konnten wir mittels molekularbiologischer Methoden der Genexpressionanalyse in verschiedenen Modellsystemen nachweisen.

Diese Systeme umfassten Zellkulturmodelle, Mausmodelle und isolierte primäre Zellen. Wir konnten per Genexpressionsanalyse und Analyse anderer Hochdurchsatzverfahren zeigen, dass der Transkriptionsfaktor Grhl2 essentielle Komponenten der *tight junctions* (ein Abschnitt der Zell-Zell-Kontakte) reguliert wie z.B. Claudin 4. Wir sahen zudem, dass ein Verlust von Grhl2 zu einem Verlust an Dichtigkeit der Zell-Zell-Kontakte im Sammelrohr führt. Wir konnten zudem zeigen, dass eine Rekonstitution von Claudin 4 in der Abwesenheit von Grhl2 diesen Dichtigkeitsverlust wieder aufhebt.

Im Tiermodell waren wir ebenfalls in der Lage den epithelialen Dichtigkeitsverlust zu zeigen. Zudem manifestierte sich dort der Verlust von Grhl2 in einem milden Diabetes insipidus mit gesteigertem Risiko für ein ANV. Um unsere These weiter zu stärken, dass in der Tat der Verlust epithelialer Dichtigkeit maßgeblich für dieses klinische Phänomen

ist, mussten alle anderen Regelachsen, die ebenfalls ein solches Phänomen nach sich ziehen könnten, auch untersucht werden.

Teile dieser Regelachsen sind eine normale Expression von Aquaporin-2 und normale Vasopressinlevel. Der zweite Punkt war beantwortbar über Messungen von Vasopressin im Plasma von Knockout- und Kontrolltieren, bei denen wir keine signifikanten Unterschiede sahen. Die Aquaporin-2-Expression zeigte sich in der Nierenrinde auf Kontrollniveau, jedoch im Nierenmark erniedrigt. Hierbei ist jedoch zu erwähnen, dass in unserem Grhl2-Knockout-Modell die Osmolalität im Nierenmark erniedrigt ist und auch das Expressionslevel von Aquaporin-2 an die Höhe der interstitiellen Osmolalität gekoppelt ist¹⁶.

Wir konnten jedoch in aus dem Nierenmark isolierten Prinzipalzellen unserer Knockouttiere zeigen, dass, wenn sie unter normalen Osmolalitätsbedingungen kultiviert werden, die Aquaporin-2-Expression wieder auf ein Kontrollniveau ansteigt. Die verminderte Aquaporin-2-Expression im Nierenmark unserer Knockouttiere ist somit auf die verminderte Gewebsosmolalität zurückzuführen und nicht auf eine Regulation von Aquaporin-2 durch Grhl2. Weiter unterstützt wird dies zudem durch eine vergleichbar hohe Expression von Aquaporin-2 in der Nierenrinde²¹.

Zur weiteren Stützung unserer Theorie konnten wir zudem zeigen, dass der parazelluläre Flux von Osmolyten in den Grhl2-Knockoutmäusen signifikant erhöht ist. Dies gelang über entsprechende Messungen an isolierten Sammelrohren. Es gelang somit zusammenfassend die Aufstellung eines neuen Paradigmas zur Genese eines renalen Diabetes insipidus und der einer Prädisposition für ein ANV. Grundlegend für diese Arbeiten waren die Analysen der epithelialen Genregulation^{21,29}. Kritisch anzumerken ist, dass es zu klären bleibt, inwieweit Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte zu renalen Pathologien disponieren. Es ist sicher so, dass die klassischen Diabetes insipidus-Mutationen von Aquaporin-2 oder dem Vasopressinrezeptor ein viel heftigeres klinisches Bild nach sich ziehen. Dennoch konnten wir überzeugend zeigen, dass auch mildere Störungen der epithelialen Homöostase eine Prädisposition für ANV nach sich ziehen können.

Zudem ist die klinische Bedeutung von Mutationen beispielsweise im Transkriptionsfaktor Grhl2 bzw. in anderen Molekülen, die die Dichtigkeit von Zell-Zell-Kontakten im

Sammelrohr betrifft, nur unzureichend geklärt. Es gibt bisweilen Kohorten von Patienten mit Mutationen in Grhl2, in denen jedoch die renale Funktion nur insuffizient analysiert wurde⁵⁸. Zudem ist anzumerken, dass es unwahrscheinlich ist, beim Menschen einen renalen vollständigen Knockout von Grhl2 anzutreffen. Wie bereits erwähnt, führt ein globaler Knockout von Grhl2 in der Maus (und sicher auch im Menschen) zu embryonaler Letalität⁵⁹. In unserem renalen Knockout nutzten wir einen Hoxb7-getriebenen Knockout von Grhl2, der sich entsprechend auf das distale Nephron beschränkte. Dabei handelt es sich natürlich um ein Konstrukt, welches so im humanen Kontext nicht angetroffen werden wird.

Neben der Frage nach der klinischen Relevanz von Mutationen in Grhl2 und nachgeschalteten Genen für eine ANV-Prädisposition oder renalen Diabetes insipidus kann dennoch der von uns entdeckte Mechanismus der epithelialen Undichtigkeit in zukünftige Studien und klinische Überlegungen mit einbezogen werden.

Unabhängig vom Mechanismus der epithelialen Störung konnten wir in einer weiteren Studie zudem noch zeigen, dass das gut bekannte Pilzmedikament Fluconazol Vasopressin-unabhängig die Aquaporin-2-Expression im Sammelrohr steigert und so einen neuen Therapieansatz darstellt für den Diabetes insipidus²⁷. Anzumerken ist hier, dass darauf beziehend in Kooperation mit dänischen Gruppen eine erste Studie zur weiteren klinischen Testung bei Kindern mit Diabetes insipidus angelaufen ist.

3.1 Zelltyphomöostase in der gesunden Niere

Es ist versucht worden herauszuarbeiten, dass das Nierenepithel einen Schlüsselrolle in einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Situationen einnimmt. Zur tieferen Erforschung der genregulatorischen Vorgänge im Nierenepithel ist es natürlich erforderlich, dass die Genexpression im Nierenepithel bzw. in den einzelnen renalen Zelltypen an sich auch experimentell zugänglich ist.

Herkömmliche Methoden waren bis vor kurzem nicht in der Lage diese Information zu liefern. Dies lag in den meisten Fällen daran, dass Expressionsinformationen – sei es nun auf DNA-, RNA- oder Proteinebene – zumeist in Gewebeteilen bestimmt wurden. Dies bringt auf natürliche Weise die Limitation mit sich, dass die so bestimmten

Expressionslevel einen Durchschnittswert der zu untersuchenden Gewebe repräsentieren, aber nicht zwingend molekulare Vorgänge in relevanten Zelltypen reflektieren müssen. Wo dies in beispielweise Zellkulturexperimenten mit vielen gleichartigen und homogenen Zellen keinen limitierenden Faktor darstellen muss, wird dies in Organen wie der Niere mit hoher Dichte an verschiedenen Zelltypen zu einer großen Einschränkung.

Einen Durchbruch stellten in diesem Kontext Techniken zur RNA-Einzelzellsequenzierung dar, die – wie der Name vermuten lässt - die Analyse auf Einzelzellniveau bzw. in einzelnen Zelltypen ermöglichen. Durch ein Labeling der mRNA-Moleküle mit Oligo-Barcodes kann so im Nachhinein nach der Sequenzierung nachempfunden werden, aus welcher Zelle welches Transkript ursprünglich stammte. Über moderne bioinformatische Ansätze kann dann per Clustering und der Analyse der Expression von Markergenen festgestellt werden, um welche Zelltypen es sich handelt. So können die bekannten Zelltypen in diesen Daten nachvollzogen werden.

Jedoch, ein weiterer entscheidender Vorteil der Einzelzellsequenzierungstechniken ist es aber auch, dass – basierend auf der eben diskutierten Genexpression – auch neue Zelltypen gefunden werden können, die sich eben nicht in die kanonischen Zelltypen einordnen lassen. Diese Erkenntnisse sind natürlich von großer Bedeutung für das Verständnis und die Beurteilung der Nierenbiologie. Wir nutzten diese Methode, um Nierenzellen aus verschiedenen Regionen der Niere bezüglich ihrer Genexpressionsmuster zu untersuchen¹⁴. Wir konnten zudem in einem völlig neuen Ansatz zeigen, dass in diesen Daten nicht nur Genexpressionsinformationen einzelner Zellen kodiert sind, sondern über die Genexpression auch Aussagen über die räumliche Lokalisation der Zellen gemacht werden können. So konnten wir zeigen, dass Zellen des distalen Nephrons über unsere Ansätze wieder entlang der kortikomedullären Achse räumlich angeordnet werden können. Somit konnten wir unseren Daten zusätzlich zur Auflösung im Zelltyp-spezifischen Bereich noch eine räumliche Dimension hinzufügen.

Dies ermöglicht auch erstmals die Analyse von Genen mit kortikomedullär ansteigender und abfallender Expression. Gene, die entlang der kortikomedullären Achse steigende Expressionslevel zeigen, waren u.a. assoziiert mit immunmodulatorischen und Stress-assoziierten Signalwegen. Wir konnten diese Technik so weit entwickeln, dass im Prinzip

auch publizierte Daten herangezogen werden können und räumlich neu sortiert. Uns gelang es zudem über die genannte räumliche Anordnung und die Expressionslevel von Osmolalitäts-responsiven Genen den kortikomedullären Osmolalitätsgradienten semi-quantitativ zu bestimmen.

Unser Ansatz trägt zudem auch weitere biologische Implikationen. Über die Analyse von Genen mit spezifischer lokaler Expression konnten wir zeigen, dass die Zelltypen des Nierenepithels kontinuierlich ineinander übergehen. Das war insoweit überraschend als dass man von den historisch-anatomischen Studien her eher eine Anzahl distinkter Zelltypen erwartet hätte.

In unserer Studie konnten wir zudem die Einzelzellsequenzierung mit der Einzelzellkernsequenzierung vergleichen. Bei der Einzelzellsequenzierung werden, wie der Name suggeriert, tausende einzelne Zellen individuell bezüglich ihrer Genexpression analysiert. Bei der Einzelzellkernsequenzierung analog die Zellkerne. Hierbei gehen natürlich Informationen zur Genexpression aus dem Zytoplasma verloren. Auf der anderen Seite konnte wir auch zeigen, dass bestimmte Verzerrungen, was den Gewebeverdau anbelangt, in den Einzelzellkernsequenzierungen nicht vorkommen. Beispielsweise das innere Mark der Niere ist sehr dicht und schwer verdaulich aufzuschließen in einem Einzelzellverdau. Nutzt man hingegen die Technik der Einzelzellkernsequenzierung kann dies problemlos erfolgen. Dennoch sollte in jedem Fall in Abhängigkeit vom Experiment Daten aus der Einzelzellkernsequenzierung immer abgeglichen werden mit eventuell verfügbaren Daten aus der Einzelzellsequenzierung. Aktuell gibt es starke Bestrebungen hinsichtlich Einzelzellsequenzierung mit räumlicher Auflösung. Hierbei werden räumlich fixierte Beads mit bestimmten, bekannten Barcodes genutzt, um den räumlichen Ursprung bestimmter RNA-Moleküle determinieren zu können⁶⁰⁻⁶³. Diese Techniken sind zumeist sehr teuer im Vergleich zur Einzelzellsequenzierung und bieten zudem keine Auflösung in einzelne Zellen oder Zellkerne, sondern Genexpression in bestimmten Bereichen des Gewebes, die auch mehrere Zellen umfassen können.

Die Qualität von Einzelzellsequenzierungsdaten hängt maßgeblich von der Anzahl an detektierten Genen und Transkripten pro Zelle ab. Diese Kennzahlen waren für unsere Studie relativ gering im Vergleich zu bestimmten kommerziell erhältlichen Kits¹⁴. Um dem

Rechnung zu tragen, validierten wir unsere Ergebnisse deswegen in einem zweiten Datensatz mit größerer transkriptioneller Tiefe⁶⁴. Unser Ansatz ist universell einsetzbar. Einschränkungen sind jedoch zu erwarten bei erkrankten Nieren mit einem räumlich heterogenen Befallsmuster wie zum Beispiel bestimmten entzündlichen Prozessen. Limitierend muss auch erwähnt werden, dass wir letztlich, was den räumlichen Freiheitsgrad anbelangt, im Eindimensionalen geblieben sind und dies validierten. Wir haben aktuell keine guten Informationen zur Nutzbarkeit unseres Ansatzes im zwei- oder dreidimensionalen Fall. Zusammenfassend ist davon auszugehen, dass unsere Technik und Herangehensweise vor allem dann erfolgversprechend zu sein scheint, wenn es klare die Genexpression treibende Gradienten in den zu untersuchenden Geweben gibt. Dann nämlich wäre eine räumliche Anordnung unter Nutzung unserer Algorithmen diesbezüglich sehr denkbar. Natürlich bleibt der vorgeschlagene Ansatz ein bioinformatischer Algorithmus auf der Basis von Genexpressionsdaten der Einzelzellsequenzierung und dient vor allem einem Screening und einer Hypothesenfindung, die selbstverständlich die üblichen Validierungsschritte nach sich ziehen muss, die zu guter wissenschaftlicher Praxis gehören.

Eine weitere Limitation unserer ist die Verwendung der Grhl2 Knockoutmaus als Beispiel für die semiquantitative Messbarkeit der kortikomedullären Osmolalität. Es ist nicht komplett auszuschließen, dass die genutzten Osmolalitäts-responsiven Gene eventuell auch direkt durch Grhl2 reguliert werden. Dem widerspricht jedoch, dass zum Teil dieselben Gene auch in anderen Nephronabschnitten im Grhl2-Knockout herunter reguliert waren, ohne dass in diesen Segmenten Grhl2 fehlen würde, da es sich um einen Sammelrohr-spezifischen Knockout handelte. Dies stützt eher die Theorie, dass die genutzten Gene zur Phänotypisierung des kortikomedullären Gradienten aufgrund der reduzierten Osmolalität herunter reguliert waren.

3.2 Veränderungen zellulärer Identitäten im akuten Nierenversagen

Wie die Ergründung prädisponierender Faktoren für ein ANV in den Vorarbeiten stellt das ANV an sich die klinische Medizin natürlich vor enorme Herausforderungen. Einer der am

stärksten limitierenden Faktoren hierbei ist unser unvollständiges Wissen über die molekularen Vorgänge in der Niere bei ANV.

Neben der Diversität renaler Zelltypen unter physiologischen Bedingungen konnten wir in einer Studie zeigen, dass krankhafte Zustände der Niere eine Fülle an neuen Zelltypen oder vielmehr Zellzuständen hervorrufen⁴⁰. Wir konnten erstmals im Kontext von humanem ANV die molekularen epithelialen Genexpressionsantworten auf Einzelzellebene untersuchen⁴⁰. Dies gelang als interdisziplinäres Projekt innerhalb der Charité-Universitätsmedizin in Kooperation mit den Intensivstationen, der Pathologie, Urologie und Nephrologie.

In der Tat konnten wir zeigen, dass, im Gegensatz zu ANV-Modellen in der Maus^{39,41}, das gesamte renale Tubulussystem in der Genexpressionsantwort auf das ANV involviert ist, das schließt sehr distale Segmente wie das Sammelrohr mit ein, was als Ergebnis zunächst überraschend war.

In der Tat handelt es sich in diesem Kontext um eine intensiv geführte Debatte im Bereich der Nephrologie⁴⁴. Ausgangspunkt des Problems ist die Nutzung von IRI in Mäusen. Hierbei kommt es zu einer abrupten Unterbrechung der gesamten Blutzufuhr der Nieren und nachfolgend zu einem Schaden vorrangig im proximalen Tubulus der Nieren^{37,38}. Kritisiert wurde in diesem Kontext jedoch die Gleichsetzung von Schaden im proximalen Tubulus durch IRI und den Vorgängen im humanen ANV⁴⁴.

Hier ist anzumerken, dass dies bislang insofern schwierig zu beantworten war, als dass humanes Nierengewebe im Kontext ANV quasi nicht zugänglich ist. Das liegt daran, dass die meisten Patientinnen und Patienten mit ANV gewöhnlich nicht biopsiert werden. Daraus folgt, dass man in den meisten Fällen von humanem ANV keine Nierenhistologie, geschweige denn molekulare Daten auf Einzelzellebene zur Verfügung hat. Dies gelang uns auch nur über den Umweg der postmortalen Nierenbiopsien. Hier können wir nur unterstreichen, dass, was in Vorarbeiten und Übersichtsartikeln bislang geahnt und angedeutet wurde, tatsächlich ein Schaden des proximalen Tubulus‘ auf Grundlage von IRI nicht gleichzusetzen ist mit den Gegebenheiten im humanen ANV. Wir gehen davon aus, dass diese Diskrepanz zu einem Teil in der persistierenden Nierenperfusion und dem damit aufrecht erhaltenen metabolischen Stress für das Nierenepithel einhergeht.

Wir konnten zudem zeigen, dass die Hauptantwort hinsichtlich der Änderungen der Genexpression im Nierenepithel stattfindet, andere Zelltypen hingegen in unserer Kohorte, wie Endothelzellen oder interstitielle Zellen, eher nicht so ausgeprägte Genexpressionsänderungen zeigen im ANV. Eine starke Antwort auf das ANV von Seiten des Nierenepithels war in der Tat zu erwarten (nicht jedoch wie erwähnt die starke Ausprägung entlang des gesamten Nephrons), dass es jedoch bei den anderen nicht-epithelialen Zelltypen zu einer derart schwachen Genexpressionsantwort kommt, war unerwartet, gerade im Hinblick auf die Leukozyten.

Im Kontext von ANV ist die Infiltration von Leukozyten ins Nierengewebe ein gut etablierter Schädigungsmechanismus⁶⁵. Dies konnte in unseren Daten so nicht nachvollzogen werden. Dafür bieten sich zwei grundlegende Erklärungsansätze an: 1. Es ist bekannt, dass Leukozyten in der Einzelzellkernsequenzierung, die wir als Datengrundlage in unserer Studie nutzten, nicht gut repräsentiert werden⁶⁶. Die Faktoren hierfür sind nicht abschließend geklärt. 2. In unserer Studie untersuchten wir einen recht frühen Zeitpunkt des ANV, nämlich einen Zeitraum von 5 Tagen, bei manchen Patienten eher. Es mag sein, dass sich die Wahl des Zeitpunktes mit der Sichtbarkeit und Nachweisbarkeit von bestimmten Leukozytenpopulationen überlagert.

Zusätzlich zu der Tatsache der starken Antwort auf Genexpressionsebene auf ANV im Nierenepithel sahen wir zudem die Induktion distinkter Zellzustände durch das ANV. Mit Zellzuständen werden Subpopulationen von Zellen definiert, die prinzipiell ihrem Ursprungszelltyp noch zuordenbar sind, jedoch ein von der physiologischen Genexpression stark abweichendes Expressionsprofil zeigen.

Derartige Zellzustände konnte ebenfalls im gesamten Tubulusapparat nachgewiesen werden. Wir konnten somit zeigen, dass ANV nicht nur eine starke Genexpressionsantwort im gesamten Nephron hervorruft, sondern auch ANV-assoziierte Zellzustände nach sich zieht. Interessanterweise konnten wir zudem zeigen, dass die molekularen Antworten eben der genannten ANV-assoziierten Zellzustände in den unterschiedlichen Abschnitten der Niere über ähnliche Markergene definiert werden kann. Das verleitet zu der Annahme, dass im humanen ANV konservierte molekulare Vorgänge im gesamten Tubulusepithel stattfinden und sich manifestieren in der Entstehung von distinkten Nierenzellsubpopulationen mit spezifischen Markergenen. Die

Existenz der in den Transkriptomdaten gefundenen Zellzustände konnten wir zudem mittels In-situ-Hybridisierung in verschiedenen renalen Epithelien validieren.

Eine der grundlegenden Fragen in der Beforschung des ANV ist die Existenz von ANV-Subtypen. Um dies vorweg zu nehmen, diese konnten wir bei unseren Patientinnen und Patienten nicht herausarbeiten. Unsere Kohorte bestand aus kritisch Kranken, die ein ANV aufgrund schwerer respiratorischer Infekte zeigten. Hier sahen wir sehr ähnliche molekulare Mechanismen unter den Patientinnen und Patienten, jedoch waren die genannten ANV-assoziierten Zellzustände in individueller Abundanz zu beobachten. Hieraus schlussfolgern wir, dass die transkriptionelle Heterogenität, die wir in unseren Daten beobachten aus einer individuellen Komposition von konservierten ANV-assoziierten Zellzuständen resultiert und nicht aus verschiedenen molekularen ANV-Subtypen. Kritisch anzumerken an dieser Stelle ist jedoch, dass die Anzahl an Patientinnen und Patienten in unserer Studie (8 ANV-Fälle versus 4 Kontrollen) nicht ausreicht, um die Frage nach möglichen ANV-Subtypen final beantworten zu können.

Unsere humanen Daten decken sich weitestgehend mit den publizierten Resultaten für den proximalen Tubulus aus ANV-Mausmodellen^{39,41,57}. Auch die genannten Studien identifizierten ANV-assoziierte Zellzustände, die mit epithelialer Dedifferenzierung und Expression von proinflammatorischen und profibrotischen Genen einhergehen. Jedoch ist zu sagen, dass die genannten Zellzustände in einer anderen zeitlichen Reihenfolge zu beobachten waren. Vielmehr zeichneten sich in den Mausmodellen eine distinkte zeitliche Reihenfolge des Auftretens bestimmter Zellzustände ab. Im humanen Fall sahen wir jedoch ein gleichzeitiges Vorhandensein dieser Zustände (zumindest bezogen auf den proximalen Tubulus) zum Zeitpunkt unserer Analyse. Die Ursachen dieser Beobachtung können wir natürlich nicht letztlich klären. Es ist jedoch anzumerken, dass die verwendeten ANV-Mausmodelle in den meisten Fällen zu einem definierten Zeitpunkt einen renalen Schaden setzen. Diese Situation gibt es im humanen Kontext natürlich nur in den seltensten Fällen (z.B. kardiochirurgische Eingriffe mit einem definierten Zeitpunkt des Abklemmens der Nierenperfusion) und ist im Fall kritisch Kranker nicht zu erwarten. In diesem Kontext ist eher von einem kontinuierlichen Schädigungsprozess der Nieren auszugehen.

Sowohl die Beobachtung der starken Antwort auf ANV im gesamten Nierenepithel wie auch die beschriebene Heterogenität der Erkrankten und die vom Mausmodell abweichende zeitliche Reihenfolge unterstreichen abermals die Wichtigkeit und den Stellenwert humaner Daten im Kontext der Nephrologie.

Neben ihrer bloßen Existenz stellen die entdeckten Zellzustände im Nierenepithel im ANV auch neue Angriffspunkte für eine gezielte Therapie des ANV dar. Wir konnten insgesamt vier verschiedene Zellzustände (Cluster) identifizieren (als New 1-4 bezeichnet). Zellen des New 1-Clusters zeigten eine hohe Expression von Zielgenen des Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*. Dieser Pathway hat bereits im Kontext des ANV Erwähnung gefunden, da Zielgene bei zellulärem Stress aktiviert werden und vor den Folgen von ANV schützen können⁶⁷⁻⁶⁹. Im Vergleich mit den verfügbaren Mausdaten zeigen sich Zellen aus New 1 assoziiert mit einem milderem früheren Schädigungsmuster. Zellen des New 2-Clusters zeigten eine starke Aktivierung von Hypoxie-responsiven Genen. Hypoxie an sich ist ein hochetablierter Mechanismus im ANV, die Stabilisierung von Hypoxie-induzierbaren Faktoren führte in diversen Tiermodellen zu einer Verbesserung des Outcomes⁷⁰. Wieder im Vergleich zu den Mausdaten zeigte sich eine Assoziation (bezogen auf den proximalen Tubulus) mit geschädigten Mauszellen der sehr Hypoxie-empfindlichen S3-Segmente des proximalen Tubulus'. Die Zellen des New 3- und New 4-Clusters zeigten eine verstärkte Expression von Entzündungsgenen und Genen der epithelialen-mesenchymalen Transition. Diese konnten mit irreversibel geschädigten Mausnierenepithelzellen assoziiert werden und stellen sehr wahrscheinlich irreversibel geschädigtes Nierenepithel in der humanen Niere dar.

Alle diese Zellzustände oder Cluster sind potentiell Angriffspunkte für neue Therapeutika für das ANV. Sie zeichnen sich durch die Aktivierung distinkter Signalwege aus und können entsprechend unterstützt werden (dies gilt für geschädigte Zellen mit potentiell regenerativem Potential) oder inhibiert werden (dies gilt für Zellen mit potentiell irreversiblen Schaden). Die weitere Nutzbarkeit dieser Zellzustände in der Therapie von ANV setzt jedoch weiterführende Studien voraus, die auch die biologische Funktion der genannten Zellpopulationen näher charakterisiert.

Unsere Studie konnte zudem die Nutzbarkeit von postmortalem Nierengewebe in der Analyse der molekularen Antworten im ANV zeigen. Kritisch ist in diesem Kontext

natürlich auch die Frage, was man mit den so gewonnenen Daten misst, denn es sollen ANV-spezifische Signaturen gemessen werden und nicht postmortale Genexpressionseffekte innerhalb der Niere. Wir kontrollierten diesen Effekt deswegen mit postmortalen Nierenbiopsien von Kontrollpatienten ohne ANV. Darüber hinaus konnten wir auch darlegen, dass die molekularen Resultate unserer Studie auch über die Analyse von Urinzellen nachweisbar sind⁴⁶. Das könnte eine zukunftsweisende Technologie sein, um auch bei lebenden Patientinnen und Patienten im Kontext von ANV an Nierenzellen zu gelangen.

4. Zusammenfassung

Nephrologische Erkrankungen stellen nach wie vor eine erhebliche wirtschaftliche Bürde für unser Gesundheitssystem dar und eine enorme Belastung für die betroffenen Patientinnen und Patienten. Bei den meisten nephrologischen Erkrankungen stehen keine gezielten molekularen Therapien zur Verfügung, das betrifft leider auch das akute Nierenversagen, einer sehr häufigen klinischen Diagnose, die mit erhöhter Mortalität und Morbidität assoziiert ist. Bis auf für wenige Ausnahmefälle stehen uns nur supportive Maßnahmen zur Therapie zur Verfügung.

Moderne molekulare Ansätze können dabei helfen, die genauen Vorgänge, die im akuten Nierenversagen vorliegen und dafür prädisponieren, besser zu verstehen. Die Niere selbst ist ein komplexes Konstrukt vieler verschiedener Zelltypen unterschiedlichen Ursprungs. Eine herausragende Rolle in der Pathogenese des akuten Nierenversagens kommt hierbei den Epithelzellen der Niere zu, die das renale Tubulussystem auskleiden. Zugang zu den Regulationsvorgängen im Nierenepithel setzen zum einen Kenntnis der Vielfalt renaler epithelialer Zelltypen voraus und daran anknüpfend gezielte Zelltyp-spezifische molekulare Studien zum besseren Verständnis der entsprechenden Pathomechanismen.

Genexpressionsstudien als Datengrundlage zusammen mit den nachgeschalteten bioinformatischen Analysen und abgeleiteten Genregulationsmechanismen zeigen sich als sehr nutzbare Grundlage in diesem Kontext. Über die vorgeschlagene Strategie konnten wir am Sammelrohr der Niere einen neuen epithelialen Mechanismus, der für akutes Nierenversagen prädisponiert, erarbeiten. Uns gelang der Nachweis eines transkriptionellen Netzwerkes des Transkriptionsfaktor Grhl2, der in Epithelzellen des Sammelrohres essenzielle Komponenten der Zell-Zell-Kontakte reguliert. Kommt es zum Verlust dieser Faktoren, zieht dies eine erhöhte Durchlässigkeit des sonst dichten Sammelrohres nach sich und eine Unfähigkeit der Niere beispielsweise Elektrolyte und vor allem Wasser zurück zu resorbieren. Dies führte vor allem in Situationen der verminderten Flüssigkeitszufuhr zu deutlich erhöhten Frequenzen von akutem Nierenversagen.

Zur medikamentösen Verhinderung von akutem Nierenversagen zeigten wir die Wirksamkeit des bekannten Pilzmedikamentes Fluconazol über einen bisher

unbekannten Mechanismus am Sammelrohr, der die Wasserrückresorption steigert und so, vor allem in Kontexten eines genetisch prädisponierten Wasserverlustes, vor akuter Nierenschädigung schützen kann. Diese Erkenntnisse werden gerade in einer klinischen Studie weiterverfolgt.

Uns gelang zudem die Durchführung einer der ersten Studien zum humanen akuten Nierenversagen unter Nutzung von Einzelzellsequenzierungsansätzen. Auch hier zeigten wieder die renalen Epithelzellen die stärkste transkriptionelle Antwort. Zudem zeigten wir, dass der gesamte renale Tubulusapparat in die genregulatorischen Vorgänge beim akuten Nierenversagen eingebunden ist, was aus den bisherigen Mausstudien nicht bekannt war. Wir sahen zudem eine konservierte und molekular sehr ähnliche Antwort auf die Schädigung durch das akute Nierenversagen im gesamten Tubulussystem. Hierfür identifizierten wir distinkte Nierenversagen-assoziierte Zellpopulationen, die auch vielversprechende Ziele für neue therapeutische Ansätze darstellen können.

Insgesamt gelang uns die Aufdeckung relevanter Pathomechanismen ausgehend vom renalen Epithel mit besonderem Bezug zum akuten Nierenversagen unter zentraler Nutzung von Transkriptom-weiten Genexpressionsdaten und nachgeschalteten bioinformatischen Analysen. Gerade von den erst seit Kurzem verfügbaren Plattformen zur Einzelzellsequenzierung versprechen wir uns weitere neue Ansätze zur Verbesserung der nephrologischen Therapie.

5. Literaturangaben

1. Ogbuiri, I. & Tuma, F. Physiology, Renal. in *StatPearls* (Treasure Island (FL), 2022).
2. Robson, L. The kidney--an organ of critical importance in physiology. *J Physiol* **592**, 3953-3954 (2014).
3. Hansell, P., Welch, W.J., Blantz, R.C. & Palm, F. Determinants of kidney oxygen consumption and their relationship to tissue oxygen tension in diabetes and hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **40**, 123-137 (2013).
4. Avesani, C.M., *et al.* Decreased resting energy expenditure in non-dialysed chronic kidney disease patients. *Nephrol Dial Transplant* **19**, 3091-3097 (2004).
5. Wallace, M.A. Anatomy and physiology of the kidney. *AORN J* **68**, 800, 803-816, 819-820; quiz 821-804 (1998).
6. Chen, L., Chou, C.L. & Knepper, M.A. Targeted Single-Cell RNA-seq Identifies Minority Cell Types of Kidney Distal Nephron. *J Am Soc Nephrol* (2021).
7. Chen, L., *et al.* Renal-Tubule Epithelial Cell Nomenclature for Single-Cell RNA-Sequencing Studies. *J Am Soc Nephrol* **30**, 1358-1364 (2019).
8. Chen, L., *et al.* Transcriptomes of major renal collecting duct cell types in mouse identified by single-cell RNA-seq. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E9989-E9998 (2017).
9. Martinoli, C., Bertolotto, M., Pretolesi, F., Crespi, G. & Derchi, L.E. Kidney: normal anatomy. *Eur Radiol* **9 Suppl 3**, S389-393 (1999).
10. Brezis, M., Heyman, S.N., Dinour, D., Epstein, F.H. & Rosen, S. Role of nitric oxide in renal medullary oxygenation. Studies in isolated and intact rat kidneys. *J Clin Invest* **88**, 390-395 (1991).
11. Brezis, M. & Rosen, S. Hypoxia of the renal medulla--its implications for disease. *N Engl J Med* **332**, 647-655 (1995).
12. Leichtweiss, H.P., Lubbers, D.W., Weiss, C., Baumgartl, H. & Reschke, W. The oxygen supply of the rat kidney: measurements of intrarenal pO₂. *Pflugers Arch* **309**, 328-349 (1969).
13. Sands, J.M. & Layton, H.E. The physiology of urinary concentration: an update. *Semin Nephrol* **29**, 178-195 (2009).
14. Hinze, C., *et al.* Kidney Single-cell Transcriptomes Predict Spatial Corticomedullary Gene Expression and Tissue Osmolality Gradients. *J Am Soc Nephrol* **32**, 291-306 (2021).
15. Haase, V.H. Hypoxia-inducible factors in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F271-281 (2006).
16. Schulze Blasum, B., *et al.* The kidney-specific expression of genes can be modulated by the extracellular osmolality. *FASEB J* **30**, 3588-3597 (2016).
17. Lashhab, R., Ullah, A. & Cordat, E. Renal collecting duct physiology and pathophysiology (1). *Biochem Cell Biol* **97**, 234-242 (2019).
18. Knepper, M.A., *et al.* Renal aquaporins. *Kidney Int* **49**, 1712-1717 (1996).
19. Klein, J.D., Blount, M.A. & Sands, J.M. Urea transport in the kidney. *Compr Physiol* **1**, 699-729 (2011).
20. Leiz, J. & Schmidt-Ott, K.M. Claudins in the Renal Collecting Duct. *Int J Mol Sci* **21**(2019).

21. Hinze, C., *et al.* GRHL2 Is Required for Collecting Duct Epithelial Barrier Function and Renal Osmoregulation. *J Am Soc Nephrol* **29**, 857-868 (2018).
22. Kavanagh, C. & Uy, N.S. Nephrogenic Diabetes Insipidus. *Pediatr Clin North Am* **66**, 227-234 (2019).
23. Di Iorgi, N., *et al.* Diabetes insipidus--diagnosis and management. *Horm Res Paediatr* **77**, 69-84 (2012).
24. Birnbaumer, M. Vasopressin receptor mutations and nephrogenic diabetes insipidus. *Arch Med Res* **30**, 465-474 (1999).
25. Su, W., Cao, R., Zhang, X.Y. & Guan, Y. Aquaporins in the kidney: physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* **318**, F193-F203 (2020).
26. Wilson, J.L., Miranda, C.A. & Knepper, M.A. Vasopressin and the regulation of aquaporin-2. *Clin Exp Nephrol* **17**, 751-764 (2013).
27. Vukicevic, T., *et al.* Fluconazole Increases Osmotic Water Transport in Renal Collecting Duct through Effects on Aquaporin-2 Trafficking. *J Am Soc Nephrol* **30**, 795-810 (2019).
28. Jung, H.J. & Kwon, T.H. Molecular mechanisms regulating aquaporin-2 in kidney collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F1318-F1328 (2016).
29. Aue, A., *et al.* A Grainyhead-Like 2/Ovo-Like 2 Pathway Regulates Renal Epithelial Barrier Function and Lumen Expansion. *J Am Soc Nephrol* **26**, 2704-2715 (2015).
30. Khwaja, A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron Clin Pract* **120**, c179-184 (2012).
31. Chawla, L.S., *et al.* Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup. *Nat Rev Nephrol* **13**, 241-257 (2017).
32. Kellum, J.A., *et al.* Acute kidney injury. *Nat Rev Dis Primers* **7**, 52 (2021).
33. Lewington, A.J., Cerda, J. & Mehta, R.L. Raising awareness of acute kidney injury: a global perspective of a silent killer. *Kidney Int* **84**, 457-467 (2013).
34. *in Acute Kidney Injury: Prevention, Detection and Management Up to the Point of Renal Replacement Therapy* (London, 2013).
35. Ostermann, M., *et al.* Recommendations on Acute Kidney Injury Biomarkers From the Acute Disease Quality Initiative Consensus Conference: A Consensus Statement. *JAMA Netw Open* **3**, e2019209 (2020).
36. Xu, K., *et al.* Unique Transcriptional Programs Identify Subtypes of AKI. *J Am Soc Nephrol* **28**, 1729-1740 (2017).
37. Marko, L., *et al.* Tubular Epithelial NF-kappaB Activity Regulates Ischemic AKI. *J Am Soc Nephrol* **27**, 2658-2669 (2016).
38. Vigolo, E., *et al.* Canonical BMP signaling in tubular cells mediates recovery after acute kidney injury. *Kidney Int* **95**, 108-122 (2019).
39. Kirita, Y., Wu, H., Uchimura, K., Wilson, P.C. & Humphreys, B.D. Cell profiling of mouse acute kidney injury reveals conserved cellular responses to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 15874-15883 (2020).
40. Hinze, C., *et al.* Single-cell transcriptomics reveals common epithelial response patterns in human acute kidney injury. *Genome Med* **14**, 103 (2022).

41. Rudman-Melnick, V., *et al.* Single-Cell Profiling of AKI in a Murine Model Reveals Novel Transcriptional Signatures, Profibrotic Phenotype, and Epithelial-to-Stromal Crosstalk. *J Am Soc Nephrol* **31**, 2793-2814 (2020).
42. Scholz, H., *et al.* Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection. *Nat Rev Nephrol* **17**, 335-349 (2021).
43. Lee, H.T., Park, S.W., Kim, M. & D'Agati, V.D. Acute kidney injury after hepatic ischemia and reperfusion injury in mice. *Lab Invest* **89**, 196-208 (2009).
44. Heyman, S.N., Rosenberger, C. & Rosen, S. Experimental ischemia-reperfusion: biases and myths-the proximal vs. distal hypoxic tubular injury debate revisited. *Kidney Int* **77**, 9-16 (2010).
45. Segundo-Val, I.S. & Sanz-Lozano, C.S. Introduction to the Gene Expression Analysis. *Methods Mol Biol* **1434**, 29-43 (2016).
46. Klocke, J., *et al.* Urinary single-cell sequencing captures kidney injury and repair processes in human acute kidney injury. *Kidney Int* (2022).
47. Hong, M., *et al.* RNA sequencing: new technologies and applications in cancer research. *J Hematol Oncol* **13**, 166 (2020).
48. Lee, J.W., Chou, C.L. & Knepper, M.A. Deep Sequencing in Microdissected Renal Tubules Identifies Nephron Segment-Specific Transcriptomes. *J Am Soc Nephrol* **26**, 2669-2677 (2015).
49. Chen, L., Chou, C.L. & Knepper, M.A. A Comprehensive Map of mRNAs and Their Isoforms across All 14 Renal Tubule Segments of Mouse. *J Am Soc Nephrol* (2021).
50. Wu, H. & Humphreys, B.D. The promise of single-cell RNA sequencing for kidney disease investigation. *Kidney Int* **92**, 1334-1342 (2017).
51. Haque, A., Engel, J., Teichmann, S.A. & Lonnberg, T. A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med* **9**, 75 (2017).
52. Macosko, E.Z., *et al.* Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* **161**, 1202-1214 (2015).
53. Zappia, L. & Theis, F.J. Over 1000 tools reveal trends in the single-cell RNA-seq analysis landscape. *Genome Biol* **22**, 301 (2021).
54. Luecken, M.D. & Theis, F.J. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol* **15**, e8746 (2019).
55. Nielsen, R., Christensen, E.I. & Birn, H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: from experimental models to human disease. *Kidney Int* **89**, 58-67 (2016).
56. Park, J., *et al.* Single-cell transcriptomics of the mouse kidney reveals potential cellular targets of kidney disease. *Science* **360**, 758-763 (2018).
57. Gerhardt, L.M.S., Liu, J., Koppitch, K., Cippa, P.E. & McMahon, A.P. Single-nuclear transcriptomics reveals diversity of proximal tubule cell states in a dynamic response to acute kidney injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **118**(2021).
58. Petrof, G., *et al.* Mutations in GRHL2 result in an autosomal-recessive ectodermal Dysplasia syndrome. *Am J Hum Genet* **95**, 308-314 (2014).
59. Werth, M., *et al.* The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development* **137**, 3835-3845 (2010).

60. Maniatis, S., *et al.* Spatiotemporal dynamics of molecular pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **364**, 89-93 (2019).
61. Rodrigues, S.G., *et al.* Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science* **363**, 1463-1467 (2019).
62. Stahl, P.L., *et al.* Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* **353**, 78-82 (2016).
63. Thrane, K., Eriksson, H., Maaskola, J., Hansson, J. & Lundeberg, J. Spatially Resolved Transcriptomics Enables Dissection of Genetic Heterogeneity in Stage III Cutaneous Malignant Melanoma. *Cancer Res* **78**, 5970-5979 (2018).
64. Ransick, A., *et al.* Single-Cell Profiling Reveals Sex, Lineage, and Regional Diversity in the Mouse Kidney. *Dev Cell* **51**, 399-413 e397 (2019).
65. Tenzi, J., *et al.* Renal histopathology in critically ill patients with Septic Acute Kidney Injury(S-AKI). *J Crit Care* **68**, 38-41 (2022).
66. O'Sullivan, E.D., Mylonas, K.J., Hughes, J. & Ferenbach, D.A. Complementary Roles for Single-Nucleus and Single-Cell RNA Sequencing in Kidney Disease Research. *J Am Soc Nephrol* **30**, 712-713 (2019).
67. Nezu, M., Suzuki, N. & Yamamoto, M. Targeting the KEAP1-NRF2 System to Prevent Kidney Disease Progression. *Am J Nephrol* **45**, 473-483 (2017).
68. Shelton, L.M., Park, B.K. & Copple, I.M. Role of Nrf2 in protection against acute kidney injury. *Kidney Int* **84**, 1090-1095 (2013).
69. Wei, W., Ma, N., Fan, X., Yu, Q. & Ci, X. The role of Nrf2 in acute kidney injury: Novel molecular mechanisms and therapeutic approaches. *Free Radic Biol Med* **158**, 1-12 (2020).
70. Schley, G., *et al.* Hypoxia-inducible transcription factors stabilization in the thick ascending limb protects against ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* **22**, 2004-2015 (2011).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, hier insbesondere meinen Eltern und meiner Frau Julia, die mich immer in allen Lebenslagen liebevoll unterstützt haben und ohne die dieses große Vorhaben nicht möglich gewesen wäre.

Ich bedanke mich zudem bei meinem Mentor, Prof. Dr. Kai Schmidt-Ott, der mich stets gefördert und unterstützt hat.

Des Weiteren gilt mein Dank allen meinen Kolleginnen und Kollegen aus der Klinik und der Forschung, mit denen ich in wunderbaren Projekten zusammenarbeiten durfte. In diesem Kontext möchte ich mich nochmals im besonderen Maße bei Herrn PD Dr. Philipp Enghard, Frau Dr. Christine Kocks, Herrn Prof. Dr. Markus van der Giet, Herrn Prof. Dr. Kai-Uwe Eckardt, Herrn Prof. Dr. Nikolaus Rajewsky, Frau Dr. Katharina Walentin, Frau Dr. Janna Leiz, Frau Dr. Janett Ruffert und Herrn Dr. Nikos Karaiskos bedanken.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift