

## DISSERTATION

Die 2,3-Bisphosphoglyceratmutase (BPGM) ist essentiell für die  
Aufrechterhaltung der Nieren-Homöostase.

2,3-Bisphosphoglycerate mutase (BPGM) is essential to maintain  
kidney homeostasis.

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vera Anna Kulow

Erstbetreuung: Prof. Dr. Christian Rosenberger

Datum der Promotion: 28.02.2025

# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis .....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
Zusammenfassung .....	XIII
Abstract .....	XIV
1    Einleitung .....	1
1.1  Die Niere .....	1
1.1.1  Aufbau der Niere .....	1
1.1.2  Die Niere und ihr Metabolismus .....	5
1.1.3  Akutes Nierenversagen .....	5
1.2  Die 2,3-Bisphosphoglyceratmutase (BPGM).....	7
1.2.1  Die Struktur und Funktion von BPGM .....	7
1.2.2  BPGM Mutationen .....	10
1.2.3  Vorkommen von BPGM .....	11
1.3  Fragestellung .....	13
2    Material .....	14
2.1  Geräte .....	14
2.2  Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien .....	15
2.3  Chemikalien .....	16
2.4  Fertiglösungen und Kits .....	17
2.5  Puffer und Lösungen .....	19
2.6  Oligonukleotide .....	23
2.6.1  Primer für qPCR.....	23
2.6.2  Primer für Genotypisierung.....	24
2.7  Antikörper .....	25
2.7.1  Primärantikörper.....	25
2.7.2  Sekundärantikörper .....	26
2.8  Software und Algorithmen .....	27
3    Methoden.....	28
3.1  Mäuse .....	28

3.2	Tierexperimente .....	29
3.3	Blutanalysen .....	29
3.4	Gewebeentnahme und –aufbereitung .....	29
3.5	Histologische Färbungen .....	30
3.5.1	Periodic acid-Schiff (PAS) Färbung .....	30
3.5.2	Pikro-Siriusrot-Färbung .....	30
3.5.3	Immunfluoreszenzfärbung .....	31
3.5.4	Immunhistochemie (Braunfärbung) .....	32
3.5.5	RNAscope™ Fluoreszenz Assay .....	32
3.6	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	34
3.6.1	Isolierung genomischer DNA aus Ohrbiopsien .....	34
3.6.2	Genotypisierung .....	34
3.6.3	Isolation der Gesamt-RNA .....	35
3.6.4	cDNA Synthese/Reverse Transkription .....	35
3.6.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion .....	36
3.7	Arbeiten mit Proteinen .....	37
3.7.1	Proteinpräparation .....	37
3.7.2	SDS-PAGE .....	37
3.7.3	Western Blot .....	37
3.7.4	Proteomische Analyse .....	38
3.8	Einzelzellsequenzierungsdaten .....	40
3.9	Statistische Auswertung und graphische Darstellung .....	41
4	Ergebnisse .....	42
4.1	Das Vorkommen von BPGM in murinen und humanen Nieren .....	42
4.1.1	Lokalisation der BPGM Expression in der Maus-Niere .....	42
4.1.2	Verstärkte Expression von <i>BPGM</i> in humanen Nieren im akuten Nierenversagen .....	45
4.2	Generierung eines induzierbaren Nephron-spezifischen <i>Bpgm</i> -Knockout Modells .....	47
4.3	Ein <i>Bpgm</i> Defizit verursacht morphologische Veränderung der Niere .....	49
4.3.1	Ein <i>Bpgm</i> Knockout verursacht Schäden im proximalen Tubulus .....	50
4.4	Auswirkung des <i>Bpgm</i> Defizits auf die Physiologie der Niere .....	54
4.4.1	Das Nieren-Proteom nach <i>Bpgm</i> Deletion .....	54
4.4.2	Ein <i>Bpgm</i> Defizit führt zur Dedifferenzierung von proximalen Tubuli .....	59
4.4.3	Einfluss des <i>Bpgm</i> Defizits auf den Distalen Tubulus .....	61
4.5	Interzelluläre Kommunikation zwischen dem distalen und proximalen Nephron .....	62

4.5.1	Rolle des Immunsystems im <i>Bpgm</i> -KO .....	63
4.5.2	Die Rolle von „ <i>advanced glycation end products</i> “ im <i>Bpgm</i> -KO .....	66
4.6	Die <i>Bpgm</i> Deletion führt zu renaler Fibrose .....	68
5	Diskussion .....	71
5.1	BPGM kommt im distalen Nephron vor und wird unter Stressbedingungen hochreguliert .....	71
5.2	Eine <i>Bpgm</i> Deletion führt zu Schäden am proximalen Tubulus .....	72
5.3	Der Einfluss von <i>Bpgm</i> auf die Physiologie der Niere.....	74
5.4	Ausblick .....	79
5.5	Schlussfolgerung .....	80
	Literaturverzeichnis.....	82
	Eidesstattliche Versicherung .....	103
	Lebenslauf .....	104
	Publikationsliste .....	105
	Danksagung .....	109

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lösungen für Histologie.....	19
Tabelle 2: Lösungen für Arbeiten mit RNA.....	20
Tabelle 3: Lösungen und Puffer für Proteinpräparation.....	20
Tabelle 4: Lösungen und Puffer für SDS-PAGE. ....	21
Tabelle 5: Lösungen und Puffer Western Blot.....	22
Tabelle 6: Lösungen und Puffer für Proteomics. ....	22
Tabelle 7: Verwendete Primer für qPCR. ....	23
Tabelle 8: Verwendete Primer für Genotypisierung. ....	24
Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper. ....	25
Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper.....	26
Tabelle 11: Verwendete Software. ....	27
Tabelle 12: PCR-Programm für die qPCR mit dem CFM Connect Cyclor. ....	36
Tabelle 13: Top 20 der hochregulierten Proteine nach 4 Tagen im <i>Bpgm</i> -KO.....	55
Tabelle 14: Top 20 der runterregulierten Proteine nach 4 Tagen im <i>Bpgm</i> -KO.....	56

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Nephrons.....	3
Abbildung 2: Der Rapoport-Luebering Zyklus der Glykolyse. ....	8
Abbildung 3: Sauerstoffbindungskurve. ....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Generierung der <i>Bpgm</i> -KO (Pax8-rtTA/LC1/ <i>Bpgm</i> <sup>flox/flox</sup> ) Maus. ....	28
Abbildung 5: Vorkommen von BPGM in der Maus-Niere.....	43
Abbildung 6: Lokalisation der BPGM Expression in renalen Tubuluszellen.....	44
Abbildung 7: <i>BPGM</i> ist in renalen Tubulus-Zellen des Menschen exprimiert und wird im akuten Nierenversagen hochreguliert. ....	46
Abbildung 8: <i>Bpgm</i> Knockout Verifikation. ....	48
Abbildung 9: Blut-Parameter und Gewichtsdiﬀerenz im <i>Bpgm</i> -KO. ....	49
Abbildung 10: Morphologische Veränderungen im proximalen Tubulus nach <i>Bpgm</i> -KO. ....	50
Abbildung 11: Ein <i>Bpgm</i> -KO führt zu einer Erhöhung der Schadensmarker KIM-1 und NGAL. ....	52
Abbildung 12: Lokalisation der KIM-1 und NGAL Expression im Tubulussystem der <i>Bpgm</i> -KO Maus. ....	53
Abbildung 13: Verifizierung der proteomischen Analyse durch EpCAM, NCCRP1 und PXDN. ....	57
Abbildung 14: Bubble Plots der proteomischen <i>Gene Set Enrichment Analysis</i> , 4 Tage nach Auslösung des <i>Bpgm</i> -KO. ....	59
Abbildung 15: KIM-1 positive proximale Tubuli im <i>Bpgm</i> -KO durchlaufen Proliferations- und Dedifferenzierungsprozesse. ....	60
Abbildung 16: Hochregulation der Hämoxygenase-1 (HO-1) nach <i>Bpgm</i> Deletion im TAL des Nephrons. ....	62
Abbildung 17: Makrophagen umlagern KIM-1 positive proximale Tubuli im <i>Bpgm</i> -KO.....	64
Abbildung 18: Hochregulation von NF-κB in Makrophagen und KIM-1 positiven Zellen nach <i>Bpgm</i> Deletion.....	65
Abbildung 19: Verstärkte Akkumulation von <i>advanced glycation end products</i> (AGEs) im renalen <i>Bpgm</i> -KO.....	67
Abbildung 20: RAGE Signal an interstitiellen Zellen im <i>Bpgm</i> -KO.....	68

Abbildung 21: 8 Tage nach der <i>Bpgm</i> Deletion kommt es zu einer beginnenden Fibrosierung im Nierengewebe.....	70
Abbildung 22: Hypothetischer Mechanismus der durch <i>Bpgm</i> -KO verursachten Schädigung der proximalen Tubuli.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Base)
Å	Ångström (Längeneinheit)
AB	englisch: „ <i>antibody</i> ”
ABC	Ammoniumhydrogencarbonat
ACN	Natriumazid
ADH	Antidiuretische Hormon <i>alias</i> Vasopressin
ADORA2B	Adenosin-A2B-Rezeptor
ADP	Adenosindiphosphat
AE	Elutionspuffer der Firma Qiagen
AGE	englisch: „ <i>advanced glycation end product</i> ”
AKI	englisch: „ <i>acute kidney injury</i> ”
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANV	Akutes Nierenversagen
APS	Ammoniumpersulfat
$\alpha$ -SMA	englisch: „ <i>alpha-smooth muscle actin</i> ”
Arg	Arginin (Aminosäure)
Asp	Asparaginsäure (Aminosäure)
ATP	Adenosintriphosphat
AW1/2	Waschpuffer 1/2 der Firma Qiagen
BLAST	englisch: „ <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ”
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
1,3-BPG	1,3-Bisphosphoglycerat
2,3-BPG	2,3-Bisphosphoglycerat
BPGM	2,3-Bisphosphoglyceratmutase
BSA	englisch: „ <i>bovine serum albumin</i> “
C	Cytosin (Base)
°C	Grad Celsius (Temperatureinheit)
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
CAA	2-Chloracetamid

CAS	englisch: „ <i>CRISPR associated</i> ”
<i>Ccl2</i>	Gensymbol: „ <i>CC-chemokine ligand 2</i> “ (Maus)
cDNA	englisch: „ <i>complementary DNA</i> ”
CD-PC	englisch: „ <i>collecting duct principal cells</i> “
CD-IC-A	englisch „ <i>collecting duct intercalated cells type A</i> ”
CD-IC-B	englisch „ <i>collecting duct intercalated cells type B</i> ”
CKD	englisch: „ <i>Chronic Kidney Disease</i> “
Cl <sup>-</sup>	Chloridion
CNT	englisch: „ <i>connecting tubule</i> “
CPM	englisch: „ <i>counts per million</i> “
Cre	Cre Rekombinase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DCT	englisch: „ <i>distal convoluted tubule</i> “
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	englisch: „ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”
dNTP	desoxy Nukleosidtriphosphat
DT	Distaler Tubulus
DTT	Dithiothreitol
EC	englisch: „ <i>endothelial cells</i> “
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	englisch: „ <i>Epithelial to mesenchymal transition</i> “
ENaC	englisch: „ <i>epithelial sodium channel</i> “
EpCAM	englisch: „ <i>epithelial cell adhesion molecule</i> ”
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESRD	englisch: „ <i>End-Stage Renal Disease</i> “
EZM	extrazelluläre Matrix
FDR	englisch: „ <i>false discovery rate</i> ”
Fibro	Fibroblasten
Flpe	Flippase Rekombinase
G	Guanin (Base)
g	Erdbeschleunigung 9.81 m/s <sup>2</sup>
g	Gramm (Masseneinheit)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate

Glu	Glutamat (Aminosäure)
GLUT-2	Glukosetransporter Typ 2
GSEA	englisch: „ <i>Gene Set Enrichment Analysis</i> “
h	Stunde (Zeiteinheit)
Hb	Hämoglobin
Hg	Quecksilber
H <sub>2</sub> O	Dihydrogenmonoxid
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
<i>Havcr1</i>	Gensymbol: „ <i>hepatitis A virus cellular receptor 1</i> “; <i>alias</i> KIM-1 (Maus)
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HIF	englisch: „ <i>Hypoxia Inducible Factor</i> “
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha
His	Histidin (Aminosäure)
<i>Hmox-1</i>	Gensymbol: Hämoxygenase-1 (Maus)
HO-1	Hämoxygenase-1
HRP	englisch: „ <i>horseradish peroxidase</i> “
<i>Icam-1</i>	Gensymbol: „ <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> “ (Maus)
IGFBP7	englisch: „ <i>Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7</i> “
<i>Il18</i>	Gensymbol: Interleukin-18 (Maus)
IL2	Interleukin-2 (Maus)
Ile	Isoleucin (Aminosäure)
<i>i. p.</i>	intraperitoneal
<i>in vitro</i>	lateinisch „ <i>im Glas</i> “
<i>in vivo</i>	lateinisch „ <i>im Lebendigen</i> “
K <sup>+</sup>	Kaliumion
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
KIM-1	englisch: „ <i>Kidney Injury Molecule-1</i> “ <i>alias</i> <i>Havcr1</i>
KO	englisch „ <i>knockout</i> “
l	Liter (Volumeneinheit)
<i>Lcn2</i>	Gensymbol: Lipocalin-2 <i>alias</i> NGAL (Maus)
Leu	Leucin (Aminosäure)
Leuko	Leukozyten
LRP2	englisch: „ <i>low density lipoprotein receptor-related protein 2</i> “ (Maus)

LY-6G	englisch: „ <i>lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i> “
Lys	Lysin (Aminosäure)
M	Molar
MCP1	englisch: „ <i>monocyte chemotactic protein 1</i> “
MEF	englisch: „ <i>mouse embryo fibroblast</i> “
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumion
min	Minute (Zeiteinheit)
mm	Millimeter (Längeneinheit)
mMol	Millimol (Stoffmengenkonzentration)
mosmol/L	milli-osmol pro Liter, Einheit für die Osmolarität (Anzahl gelöster osmotisch wirksamer Teilchen pro Volumen Lösungsmittel)
mRNA	englisch: „ <i>messenger ribonucleic acid</i> “
mTORC1	englisch: „ <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i> “
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCC	Na <sup>+</sup> -Cl <sup>-</sup> Cotransporter
NCCRP1	englisch: „ <i>nonspecific cytotoxic cell receptor protein 1</i> “
NF-κB	englisch: „ <i>Nuclear factor kappa B</i> “
NGAL	englisch: „ <i>Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin</i> “ alias <i>Lcn2</i> (Maus)
NKCC2	Na-K-2Cl-Cotransporter
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
P <sub>50</sub>	Sauerstoffhalbsättigungsdruck
PAGE	Polyacylamid-Elektrophorese
PAS	englisch: „ <i>periodic acid–Schiff reaction</i> “
Pax8	Gensymbol: „ <i>paired-box-protein 8</i> “ (Maus)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	englisch: „ <i>polymerase chain reaction</i> “
2-PG	2-Phosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat
PGAM1	Phosphoglycerat-Mutase 1
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
pH	Potential des Wasserstoffs
Phe	Phenylalanin (Aminosäure)

PIC	Protease Inhibitor Cocktail
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
Podo	Podozyten
<i>post mortem</i>	lateinisch: „nach dem Tod“
PT	Proximaler Tubulus
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PXDN	Peroxidasin
qPCR	quantitative PCR
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE	englisch: „ <i>receptor for advanced glycation end products</i> “
RNA	englisch: „ <i>ribonucleic acid</i> “
RNase	Ribonuklease
ROS	englisch: „ <i>reactive oxygen species</i> “
ROUT	englisch: „ <i>robust regression followed by outlier identification</i> “
Rpm	englisch: „ <i>rounds per minute</i> “
RTase	Reverse Transkriptase
s	Sekunde (Zeiteinheit)
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin (Aminosäure)
STAT5	englisch: „ <i>Signal transducer and activator of transcription 5</i> “
T	Thymin (Aminosäure)
TAL	englisch: „ <i>thick ascending limb of the loop of Henle</i> “
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	englisch: „ <i>TRIS-buffered saline</i> “
TBS-T	englisch: „ <i>TRIS-buffered saline with tween20</i> “
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-methylethylendiamin
TET2	Tet-Methylcytosin-Dioxygenase 2
<i>Tgfb1</i>	Gensymbol: „ <i>Transforming growth factor beta 1</i> “ (Maus)
tL	englisch: „ <i>thin limb of loop of Henle</i> “
TPI1	Triosephosphat-Isomerase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan (Aminosäure)

TRS	englisch: „ <i>target retrieval solution</i> ”
TSA	englisch: „ <i>tyramide signal amplification</i> ”
UMAP	englisch: „ <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i> “
UUO	englisch: „ <i>Unilateral Ureteral Obstruction</i> “
V	Volt (Einheit für Stromspannung)
Val	Valin (Aminosäure)
VHL	Von Hippel-Lindau Protein

#### Verwendete SI-Vorsätze

k	Kilo (Potenz $10^3$ )
d	Dezi (Potenz $10^{-1}$ )
m	Milli (Potenz $10^{-3}$ )
μ	Mikro (Potenz $10^{-6}$ )

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Die 2,3-Bisphosphoglyceratmutase (BPGM) synthetisiert in Erythrozyten 2,3-BPG, welches durch Bindung an Hämoglobin dessen Sauerstoffaffinität verringert und somit die Abgabe erleichtert. Die BPGM beeinflusst daher die Sauerstoffverfügbarkeit aller Gewebe und Organe. Eine BPGM Funktion außerhalb von Erythrozyten wurde bisher nicht beschrieben. Ihre weitverbreitete evolutionäre Konservierung deutet jedoch auf eine potenzielle Rolle jenseits der Sauerstoffregulation hin. Transkriptomische Analysen zeigten eine unerwartete Expression der *Bpgm* in der Niere, welche unter Bedingungen des akuten Nierenversagens verstärkt wurde. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion der BPGM in der Niere aufzuklären.

**Methoden:** Zur funktionellen Untersuchung wurde ein tubulus-spezifisches, durch Doxycyclin induzierbares *Bpgm*-Knockout-Mausmodell (Pax8-rtTA/LC1-*Bpgm*<sup>flox/flox</sup>; kurz: *Bpgm*-KO) etabliert. Immunfluoreszenzbasierte Untersuchungen dienten der BPGM-Lokalisation, sowie der Dokumentation tubulärer Schäden nach *Bpgm*-KO (bspw. anhand der Schadensmarker KIM-1 und NGAL). Histologische Analysen (PAS- und Piko-Siriusrot Färbungen) wurden zur strukturellen Darstellung und dem Nachweis fibrotischer Veränderungen verwendet. Proteomische Untersuchungen mit Genanreicherungsanalysen dienten zur Untersuchung der zugrundeliegenden Signalwege. Die Verifizierung regulierter Signalwege erfolgte mit Hilfe immunfluoreszenzbasierter Verfahren und quantitativer PCR.

**Ergebnisse:** Die renale BPGM Expression konnte in distalen Abschnitten des Tubulussystems der Maus lokalisiert werden, was in Einzelsequenzierungsanalysen auch bei humanen Nieren nachgewiesen werden konnte. Ein induzierbarer Knockout von *Bpgm* führte innerhalb von vier Tagen zur signifikanten Schädigung der proximalen Tubuli, zur Erhöhung molekularer Schädigungsmarker und, nach 8 Tagen, zu renaler Fibrose. Proteomische Analysen zeigten, dass der Knockout von *Bpgm* zu einem übersteigerten Glukosestoffwechsel und Entzündungsreaktionen führte. Darüber hinaus wurde ein komplexes Zusammenspiel zwischen verschiedenen Nephronsegmenten und Immunzellen beobachtet. Als mögliche Signalgeber konnten dabei *Advanced Glycation End-Products* (AGEs) identifiziert werden.

**Fazit:** Diese Studie zeigt, dass die Expression der BPGM in Tubuluszellen der Niere eine entscheidende Rolle zur Aufrechterhaltung der Nierenhomöostase spielt. Über die tubuläre BPGM-Aktivität werden wichtige Stoffwechselwege und Immunantworten in der Niere beeinflusst. Die Aufklärung der weitreichenden Konsequenzen des *Bpgm*-KO betont die Bedeutung der glykolytischen Stoffwechselregulation für die Nieren- (patho-) Physiologie.

## Abstract

**Background:** The enzyme 2,3-bisphosphoglycerate mutase (BPGM) produces 2,3-BPG in erythrocytes, which, by binding to hemoglobin, decreases its oxygen affinity, thereby facilitating oxygen delivery to tissues. BPGM thus influences the oxygen availability of all tissues and organs. Although a function for BPGM outside erythrocytes has not been described, its conservation across organisms suggests additional roles. Transcriptomic analyses revealed an unexpected expression of *Bpgm* in the kidney, which was enhanced under conditions of acute kidney failure. The aim of this study was to elucidate the function of BPGM in the kidney.

**Methods:** For functional investigation, a tubular-specific, doxycycline-inducible *Bpgm* knockout mouse model (Pax8-rtTA/LC1-*Bpgm*<sup>flox/flox</sup>; abbreviated as *Bpgm*-KO) was established. Immunofluorescence-based investigations were used for BPGM localization and documentation of tubular damage after *Bpgm*-KO (e.g., using damage markers KIM-1 and NGAL). Histological analyses (PAS and Picro-Sirius Red staining) depicted structural and fibrotic changes. Proteomic investigations with gene enrichment analyses served to examine the effects of tubular *Bpgm* knockout and the underlying signaling pathways. Verification of regulated pathways was done using immunofluorescence and quantitative PCR.

**Results:** Renal BPGM expression was localized to distal segments of the mouse tubular system, which was also confirmed in human kidneys through single cell sequencing analyses. An inducible knockout of *Bpgm* led to significant proximal tubular damage, increased molecular damage markers within four days, and, following 8 days, renal fibrosis. Proteomic analyses showed that the knockout of *Bpgm* resulted in excessive glucose metabolism and inflammatory responses. Furthermore, a complex interplay between different nephron segments and immune cells was observed and AGEs (advanced glycation end-products) were identified as potential signaling mediators.

**Conclusion:** This study shows that BPGM expression in kidney tubular cells is crucial for maintaining kidney homeostasis. Tubular BPGM activity influences important metabolic pathways and immune responses in the kidney. Elucidating the far-reaching consequences of *Bpgm* knockout underscores the significance of glycolytic metabolic regulation for kidney (patho-)physiology.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Niere

Die Niere als Exkretionsorgan spielt nicht nur bei der Ausscheidung von Wasser und der einhergehenden Regulation des Volumenhaushalts des Körpers eine wichtige Rolle,<sup>1,2</sup> sie reguliert weiterhin die Ausscheidung von Stoffwechselabbauprodukten und anderer Toxine.<sup>1,3</sup> Neben diesen Funktionen besitzt die Niere die Fähigkeit den Säure-Basen- sowie den Salz-Haushalt des Körpers zu regulieren bzw. im Gleichgewicht zu halten.<sup>3</sup> Weiterhin besitzt die Niere auch eine endokrine Funktion, wie bspw. die Synthese von Erythropoetin zur Blutbildung, Renin zur Regulation des Blutdrucks über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) oder auch das aktive Vitamin D3 (Calcitriol).<sup>2,3</sup> Aufgrund der vielfältigen Aufgaben der Nieren in verschiedenen physiologischen Abläufen des Körpers sind Nierenerkrankungen sehr komplex und vielschichtig.<sup>4</sup> Das akute und chronische Nierenversagen sind zwei sehr schwierig zu behandelnde Erkrankungen, welche in den letzten Jahren als globales Gesundheitsproblem immer mehr an Bedeutung gewannen.<sup>4,5</sup> Eine Studie von Foreman *et al.* zeigte beispielsweise, dass chronisches Nierenversagen im Jahr 2016 auf Platz 16 der Gründe für den höchsten Verlust an Lebensjahren lag. Die Prognose deutet darauf hin, dass chronisches Nierenversagen bis 2040 auf Platz 5 ansteigen wird.<sup>6</sup>

### 1.1.1 Aufbau der Niere

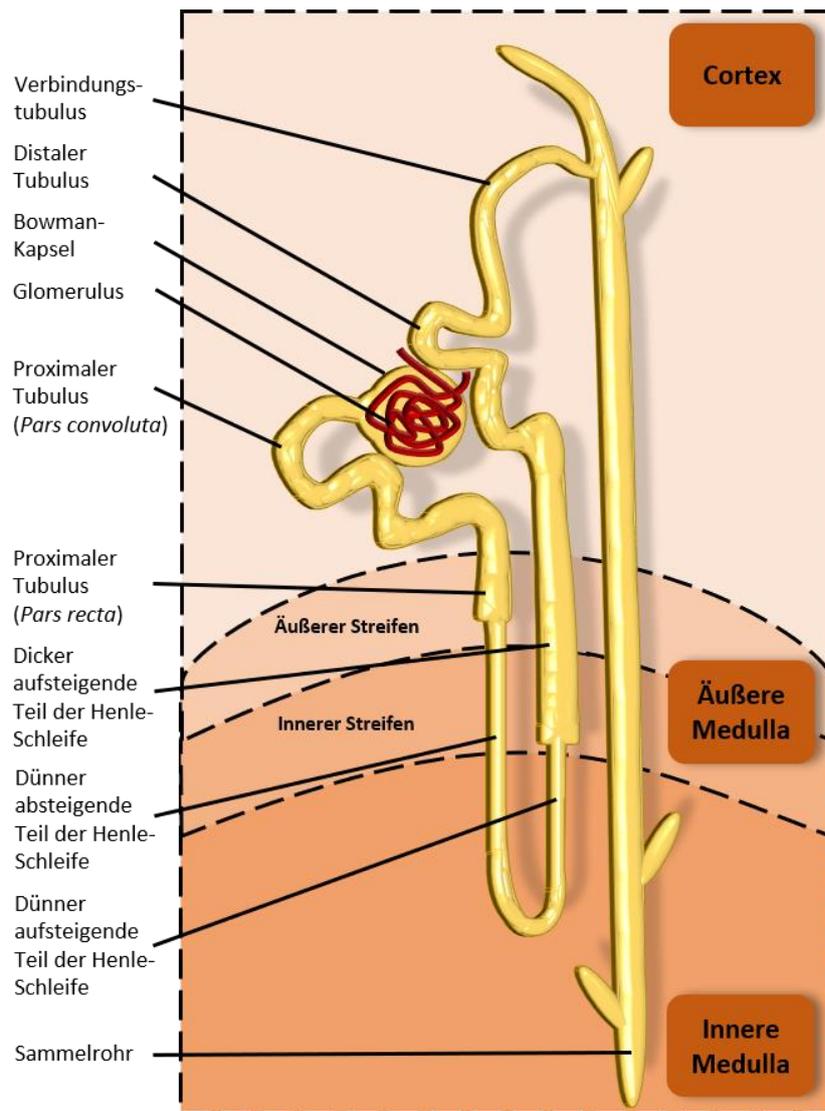
Die Nieren stellen ein paariges Organsystem dar. Sie gliedern sich von außen nach innen in Cortex (Nierenrinde), Medulla (Nierenmark) und Pelvis (Nierenbecken).<sup>7</sup> Die Medulla lässt sich dabei erneut in äußeres (bestehend aus inneren und äußeren Streifen) und inneres Mark (bestehend zum größten Teil aus der Papille) unterteilen.<sup>8</sup> Im Cortex und der Medulla liegen die funktionellen Einheiten der Niere: die Nephrone, von denen jede Niere etwa 1 Mio. besitzt.<sup>8</sup> Vom Nierenbecken ausgehend beginnt der Harnleiter, welcher den von den Nephrone gebildeten Urin zur Harnblase weiterleitet.<sup>7</sup>

Ein Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen mit der Bowman-Kapsel und dem Glomerulus, dem proximalen Tubulus (unterteilt in Segment 1 bis 3), dem dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleife, dem dünnen sowie dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, dem distalen Tubulus und einem Verbindungstubulus zum Sammelrohr (Abbildung 1). Über das

Nephron hinweg finden in der Niere verschiedene Resorptions- und Sekretionsprozesse statt, in denen der in den Nierenkörperchen gebildete Primärharn aufkonzentriert wird - bis am Ende, je nach Wasser- und Elektrolytbilanz des Körpers, ca. 1 % des Filtrates ausgeschieden wird.<sup>3</sup> Im Folgenden wird detaillierter auf die einzelnen Funktionen der Nephronsegmente eingegangen.

Das Nierenkörperchen (*renal corpuscle*) stellt den Beginn des Nephrons dar und ist die funktionelle Einheit, bei der das Blutplasma gefiltert wird und der Primärharn entsteht.<sup>7</sup> Ein Nierenkörperchen besteht aus einem kapillaren Gefäßknäuel (Glomerulus) sowie einer umhüllenden Bowman-Kapsel.<sup>7</sup> Weiterhin besitzen Glomeruli jeweils einen vaskulären Pol mit einer afferenten (*Vas afferens*) sowie efferenten (*Vas efferent*) Arteriole sowie einen Harnpol, an welchen sich die proximalen Tubuli anschließen.<sup>3,8</sup> Der glomeruläre Filter besteht aus einer fenestrierten Endothelschicht, der dreischichtigen Basalmembran und aus Podozyten.<sup>3</sup> Über die Basalmembran hinweg werden kleine Moleküle (< 4 nm oder < 50 kDa) wie Wasser, Elektrolyte, Glukose, Bikarbonate, Aminosäuren, Harnstoff und Kreatinin frei filtriert.<sup>7,9</sup> Im Gegensatz dazu können größere Blutbestandteile wie Proteine und Zellen wegen ihrer Ladung bzw. ihrer Größe nicht frei filtriert werden.<sup>7</sup>

Am Harnpol der Nierenkörperchen beginnt das Tubulussystem mit den proximalen Tubuli (PT), welche in ihrer Gesamtheit den größten Anteil an Zellen der Niere ausmachen.<sup>10</sup> Der PT ist hauptsächlich kortikal gelegen und läßt sich in einen gewundenen (Segment 1-2; *Pars convoluta*) und einen geraden (Segment 3; *Pars recta*) Abschnitt unterteilen, wobei sich Letzterer bis in den Außenstreifen der äußeren Medulla erstreckt.<sup>11</sup> Ein typisches Merkmal des PT ist der ausgeprägte Bürstensaum, welcher die Oberfläche der luminalen Epithelzellen vergrößert und die Resorptionskapazität erhöht.<sup>3,7</sup> Bereits im PT werden über einen Natrium-getriebenen Massentransport, welcher durch die ATP-abhängige Natrium-Kalium-Pumpe angetrieben wird, enorme Mengen filtrierter Substanzen wieder resorbiert (bspw. >65 % NaCl, 90 % Bikarbonat, nahezu 100 % Glukose). Aufgrund der hohen Wasserpermeabilität des PT, wird von den ca. 180 Litern Primärharn pro Tag bereits über 65 % des Wassers in diesem Abschnitt wieder resorbiert.<sup>8,12</sup> Um den dafür nötigen Energieverbrauch sicher zu stellen, besitzen die Zellen des PT daher eine große Dichte an Mitochondrien und müssen ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden.<sup>13</sup> Der PT steht zudem noch im Dienste der Blutglukosehomeostase (insbesondere im Hungerstoffwechsel), so dass überwiegend Enzyme der Glukoneogenese synthetisiert werden und die PT-Zellen dementsprechend keine bzw. kaum Glykolyse betreiben können. Dadurch ist der PT besonders vulnerabel gegenüber einer inadäquaten O<sub>2</sub>-Versorgung, da er nicht ohne Weiteres auf einen anaeroben Stoffwechsel umschalten kann.<sup>13,14</sup>



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Nephrons.** Diagramm eines Nephrons und seiner Lage innerhalb der adulten Niere.

An das Segment 3 des proximalen Tubulus, den sogenannten dicken absteigenden Teil der Henle-Schleife, schließt sich der dünne absteigende sowie der dünne und dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife an (Abbildung 1). Mit Hilfe der Henle-Schleife wird in der Medulla durch die Aufkonzentrierung von Natriumchlorid (NaCl) und Harnstoff ein hoher osmotischer Gradient aufgebaut, welcher im weiteren Verlauf im Sammelrohr für die Wasserresorption benötigt wird.<sup>7</sup> Im Detail diffundiert dabei im dünnen absteigenden Teil der Henle-Schleife Wasser passiv in den interstitiellen Raum mit gleichzeitigem Eindringen von Harnstoff und NaCl in das Lumen des Nephrons.<sup>8</sup> Im dünnen aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, welcher wasserundurchlässig ist, diffundiert im Gegensatz dazu NaCl passiv in den interstitiellen Raum.<sup>8</sup> Dabei entstehen hyperosmolare Bedingungen von bis zu 1200 mosmol/l (Interstitium des Cortex: 290 mosmol/l) in der Medulla der Niere.<sup>7</sup> Hierbei handelt es sich um ein Gegenstromprinzip, welches je länger

die Henle-Schleifen sind, einen großen Konzentrationsgradienten aufbauen kann.<sup>3,9</sup> Sich am dünnen aufsteigenden Teil anschließend liegt der dicke aufsteigende Teil der Henle-Schleife (TAL, englisch „*thick ascending limb of the loop of Henle*“). Der TAL ist wasserundurchlässig und leistet aufgrund der Resorption von Natrium und Chlorid (etwa 25 % der filtrierten Menge) über den NKCC2 -Transporter einen wichtigen Beitrag zum Aufbau des osmotischen Gradienten im Nierenmark.<sup>15</sup> Weiterhin werden im TAL noch über den parazellulären Transportweg weitere Elektrolyte wie Kalium ( $K^+$ ), Calcium ( $Ca^{2+}$ ) und Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) resorbiert.<sup>16</sup> Der TAL besitzt außerdem eine Verbindungsstelle zum vaskularen Pol des Glomerulus, deren Zellen als *Macula densa* bezeichnet werden.<sup>17</sup> An der *Macula densa* wird die im Lumen des TAL vorhandene NaCl Konzentration des Harns bestimmt, woraufhin die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Rückresorptionsrate über die Freisetzung von Adenosin angepasst werden kann. Dieses System wird als tubuloglomerulärer Feedback Mechanismus bezeichnet.<sup>18</sup>

Sich nach der *Macula Densa* des TAL anschließend beginnt im Cortex der Niere der gewundene Teil des distalen Tubulus (DCT, englisch „*distal convoluted tubule*“).<sup>17</sup> Im DCT beginnt die Hormon-regulierte Wasser- und NaCl Resorption, bspw. durch den DCT spezifischen  $Na^+-Cl^-$  Co-Transporter (NCC), welcher durch Aldosteron reguliert werden kann.<sup>7,19,20</sup> Durch seine Fähigkeit 5 - 10 % des gefilterten NaCl zu resorbieren, beeinflusst der DCT im weiteren Verlauf auch den Blutdruck.<sup>21</sup> Durch die Inhibition des NCC kann daher bspw. mittels eines Thiaziddiuretikums die Bluthochdruckbehandlung unterstützt werden.<sup>22</sup>

Nach dem DCT schließt sich im Nephron der Verbindungstubulus (CNT, englisch „*connecting tubule*“) und das Sammelrohr an.<sup>8</sup> Dieser Abschnitt besteht aus 2 verschiedenen Epithel-Zelltypen, die in Hauptzellen und Schaltzellen unterteilt werden.<sup>23</sup> Für das Nephron haben der CNT und das Sammelrohr eine große Bedeutung, da hier die finale Regulation der NaCl- und Wasser-Bilanzierung stattfindet.<sup>23</sup> Die Hauptzellen sind verantwortlich für die Resorption von NaCl über den Epithelialen Natriumkanal (ENaC, englisch „*epithelial sodium channel*“)<sup>23,24</sup>, während die Schaltzellen an der Cl-Resorption und der Regulation des Säure-Basen Haushalts beteiligt sind.<sup>23,25</sup> Durch den in der Henle-Schleife aufgebauten osmotischen Gradienten, kann aus dem Sammelrohr Wasser resorbiert werden.<sup>7</sup> Das für Wasser eigentlich undurchlässige Sammelrohr, kann durch Einbau von Aquaporin-2 in die luminale Membran durchlässig für Wasser gemacht werden, was einer hormonellen Kontrolle durch das Antidiuretische Hormon (ADH, *alias* Vasopressin) unterliegt.<sup>9,26</sup> Zusammengenommen ist dieser Tubulusabschnitt somit wesentlich für die Urinkonzentrierung und für die Feinregulation des Elektrolyt-Haushalts zuständig.<sup>26</sup>

### **1.1.2 Die Niere und ihr Metabolismus**

In den meisten Zellen unseres Körpers kann der Energiestoffwechsel sowohl aerob (unter Sauerstoffverbrauch: oxidative Phosphorylierung) als auch anaerob (sauerstoffunabhängig: Glykolyse) erfolgen. In der Niere ergeben sich jedoch Besonderheiten, so dass in den verschiedenen Abschnitten des Tubulus-Systems verschiedene Stoffwechselwege zur ATP-Produktion verwendet werden müssen.<sup>27</sup> Neben der Leber erfolgt auch im PT durch Glukoneogenese die Synthese von Glukose, bspw. aus Aminosäuren.<sup>28,29</sup> Aufgrund der Glukoneogenese-Aktivität werden Enzyme des gegenläufigen Prozesses (der Glykolyse) nicht bzw. kaum exprimiert. Somit müssen PT-Zellen ihren (aufgrund der enormen Resorptionsleistung sehr hohen) Energiebedarf über die oxidative Phosphorylierung insbesondere von Fettsäuren decken.<sup>27,30,31</sup> Obwohl die Nieren nur ca. 0,5 % der Körpermasse ausmachen, verbrauchen sie ca. 10 % des aufgenommenen Sauerstoffs durch Zellatmung.<sup>32</sup> PT-Zellen sind somit sehr empfindlich für hypoxische Bedingungen, obwohl sie auch unter zellulärem Stress kleine Mengen ihrer ATP Produktion über die anaerobe Glykolyse generieren können. Letzteres scheint für das Überleben der Zellen sowie anschließender Reparationsprozesse notwendig zu sein.<sup>27,33</sup> Einen weiteren Abschnitt des Tubulussystems mit einer Stoffwechselbesonderheit stellt der Teil der Henle-Schleife im inneren Mark juxtamedullärer Nephrone dar. Im inneren Mark ist der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) physiologisch sehr niedrig, so dass die Tubuluszellen in diesem Bereich auf einen glykolytischen Stoffwechsel angewiesen sind.<sup>32</sup>

### **1.1.3 Akutes Nierenversagen**

Etwa 20 % hospitalisierter Patienten und mehr als 50 % der Patienten auf den Intensivstationen erleiden ein akutes Nierenversagen (ANV), welches je nach Schweregrad einen negativen Einfluss auf die zukünftige Nierenfunktion sowie auf das Überleben der Patienten hat.<sup>34,35</sup> Ein ANV beginnt zumeist asymptomatisch und erfordert eine engmaschige Überwachung der Nierenfunktion.<sup>35</sup> Von einem ANV spricht man bei einer sich akut verschlechternden Nierenfunktion, welche durch eine Abnahme der GFR gekennzeichnet ist. Einer der klinisch wichtigsten Parameter zur Bestimmung der Nierenfunktion ist die Zunahme der Kreatininkonzentration über die Zeit.<sup>36</sup> Unter Berücksichtigung des Kreatininanstiegs im Serum und der verminderten Harnproduktion werden drei Schweregrade des ANV unterschieden.<sup>37</sup> Grundsätzlich werden die Ursachen zur Auslösung eines ANV in prä-renal (bspw. Volumenmangel), renal (bspw. Ischämie, Sepsis, Rhabdomyolyse) und post-renal (bspw. Obstruktionen der harnabführenden Wege) unterschieden. Auf den

Intensivstationen wird als häufigste Ursache eines ANV die Sepsis genannt.<sup>38</sup> Weitere Risikofaktoren sind: eine große Operation (Blutverlust), ein Kardio-Renales Syndrom (eine Herz-Nieren-Schwäche), eine Unterversorgung der Niere mit Sauerstoff aufgrund verschiedener Auslöser (Hypoxie), verschiedene Nephrotoxine (Schmerzmittel, Kontrastmittel), inflammatorische Prozesse lokal in der Niere oder systemisch, Dehydrierung, oder ein Anstieg des intraabdominellen Drucks.<sup>38</sup> Kreatinin wird in der Niere frei filtriert, jedoch nicht rückresorbiert.<sup>39</sup> Somit zeigt ein Anstieg im Plasma-Kreatinin eine Abnahme der GFR und damit eine nicht mehr ausreichende Nierenfunktion (Filtrationsleistung) an.<sup>40</sup> Kreatinin als Biomarker zur Erkennung eines ANVs gilt jedoch als wenig sensitiv, da erst nach mehreren Tagen post-ANV ein Anstieg zu erkennen ist.<sup>41</sup> Limitierend ist weiterhin, dass der Wert erst ansteigt, wenn ca. 50 % der Nierenfunktion bereits reduziert ist.<sup>40</sup> Aufgrund dieser Limitierung wird intensiv nach weiteren Biomarkern im Blut sowie Urin gesucht, welche frühe Stadien des ANV anzeigen.<sup>41</sup> Nach der Konsenskonferenz der *Acute Disease Quality Initiative* wurden 3 Typen von Biomarkern für die Identifikation eines ANV klassifiziert und empfohlen.<sup>41,42</sup> Hierbei wurden die Biomarker unterteilt in Stressmarker, welche den zellulären Stress anzeigen, wie zum Beispiel Dickkopf-3, die Gewebe Metalloproteinase-2 oder IGFBP7 (englisch „*Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7*“).<sup>41,42</sup> Weiterhin sind sie in Schadensmarkern unterteilt, welche unter strukturellen Schäden der Niere vermehrt exprimiert werden.<sup>41,42</sup> Beispiele für Schadensmarker sind unter anderem KIM-1 (englisch „*Kidney Injury Molecule-1*“), IL-18 (Interleukin-18), oder NGAL (englisch „*Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin*“).<sup>41,42</sup> Als letzte Kategorie der Biomarker wurden die funktionellen Marker (zum Beispiel Cystatin C oder Proenkephalin A) genannt, welche mit Veränderungen der glomerulären Filtrationsrate einhergehen.<sup>41,42</sup> Insbesondere der Biomarker KIM-1 hat als ANV Biomarker in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. So wurde, im Hinblick auf die präklinische Medikamentenentwicklung, KIM-1 von der Amerikanischen Behörde für Lebensmittelsicherheit als ANV Biomarker zugelassen.<sup>43-45</sup> KIM-1 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches in kleinen Mengen in der Niere und anderen Organen exprimiert wird.<sup>43,46</sup> So konnte bspw. nach renaler Ischämie eine stark erhöhte Expression von KIM-1 in den geschädigten Zellen des PT festgestellt werden.<sup>45,46</sup>

*In vitro* Experimente in Maus PT-Zellen zeigten, dass eine Verringerung der ATP Versorgung von 25 – 70 % in Apoptose (programmierter Zelltod) mündet sowie mit weiterer sinkender ATP Versorgung (unter 15 %) die Zellen nekrotisch wurden.<sup>47</sup> Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass PT-Zellen de-differenzieren können, wodurch womöglich auch die Fähigkeit zum anaeroben Energiestoffwechsel wiedererlangt wird und sich die Zellen somit retten bzw. regenerieren können.<sup>14</sup> Wird jedoch die Regeneration unterbrochen oder scheitert zum Beispiel

während eines massiven ANVs, kann das zu tubulärer Fibrose führen, welche die Progression eines chronischen Nierenversagens begünstigt.<sup>48,49</sup> Ein ANV zu behandeln bedarf einer genauen Ursachenuntersuchung. Eine medikamentöse Kausaltherapie des ANV ist aktuell leider nicht möglich. Ein Hauptaugenmerk liegt daher auch auf der Prävention.<sup>35</sup>

Mechanistische Untersuchungen zeigen prominente Einflüsse von Apoptose-Signalwegen, reaktiven Sauerstoffradikalen und Entzündungsreaktionen in der Pathogenese des akuten Nierenversagens.<sup>50</sup> In einem Genexpressions-Vergleich von sechs Modellen, die zum ANV führen (gram-negative Sepsis, gram-positive Sepsis, Ischämie-Reperfusion, Hypertonie, Rhabdomyolyse und Cisplatin-Toxizität), konnte durch Gen-Ontologie-Anreicherungsanalyse eine Übereinstimmung in allen Modellen für die schädlichen Prozesse Hypoxie, oxidativer Stress und Entzündung sowie für die zellulären Ereignisse Apoptose und Gewebeumbau in Form des epithelial-mesenchymalen Übergangs kategorisiert werden.<sup>51</sup> Eine bedeutende Rolle in diesen Prozessen kommt der Aktivierung von Immunzellen, insbesondere Makrophagen, zu.<sup>52</sup> Aufgrund der hohen Komplexität der Niere und den diversen Ursachen für ein ANV, ist jedoch weiterhin eine intensive Forschungstätigkeit in diesem Bereich nötig um unser Verständnis zu erweitern und neue Therapieansätze zu entwickeln.

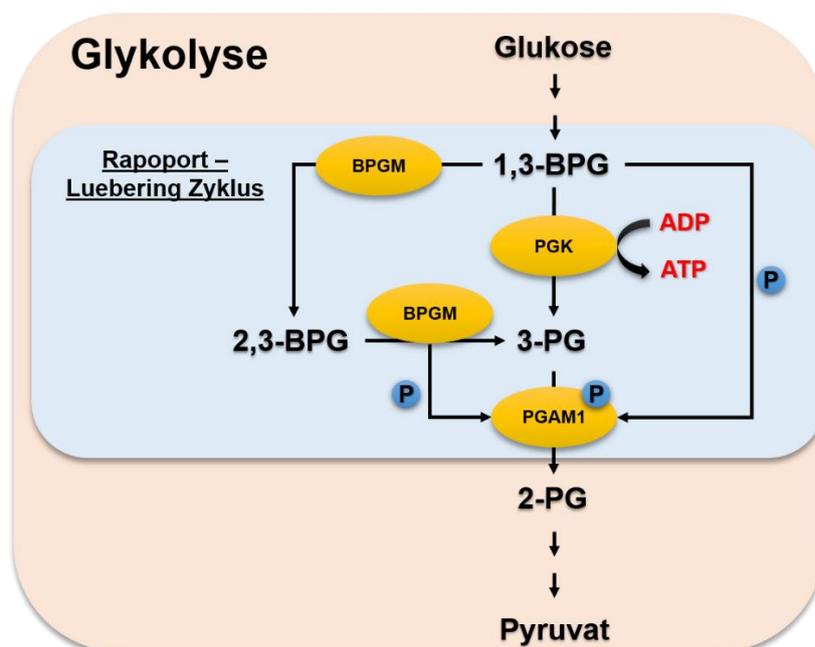
Im Rahmen solcher Untersuchungen zum ANV, ausgelöst durch Rhabdomyolyse, und dem Einfluss des Von-Hippel-Lindau (VHL) Proteins auf die Niere, hat die Arbeitsgruppe um Fähling *et al.* eine spannende Entdeckung gemacht.<sup>53</sup> Neben der Erkenntnis, dass eine durch VHL-Knockout vermittelte Aktivierung des Hypoxia Inducible Factors (HIF) gegen ein ANV schützt, fiel bei der Betrachtung der in der Arbeit durchgeführten transkriptomischen Analysen eine Hochregulation des Enzyms 2,3-Bisphosphoglyceratmutase (BPGM) im Rhabdomyolyse-induzierten ANVs auf (unpubliziert). Von dem Enzym war bislang ein renales Vorkommen unbekannt, wodurch BPGM und seine Funktionen in der Niere zum Forschungsschwerpunkt dieser Dissertation wurde.

## **1.2 Die 2,3-Bisphosphoglyceratmutase (BPGM)**

### **1.2.1 Die Struktur und Funktion von BPGM**

Die BPGM ist ein trifunktionales glykolytisches Enzym, welches Mutase-, Phosphatase- und Synthase-Aktivitäten kombiniert, wobei die Synthase-Aktivität gegenüber den anderen unter normal-physiologischen Bedingungen überwiegt.<sup>54</sup> Über seine Mutase Aktivität katalysiert BPGM

die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat (3-PG) zu 2-Phosphoglycerat (2-PG), jedoch mit einer sehr geringen Rate. In seiner zweiten Aktivität, als Phosphatase, hydrolysiert BPGM das Metabolit 2,3-Bisphosphoglycerat (2,3-BPG) zu 3- oder 2-PG und einem Phosphat. Das erzeugte Phosphat ist entscheidend für die primäre Umwandlung von 3-PG in 2-PG in der Glykolyse durch Aktivierung der Phosphoglycerat-Mutase 1 (PGAM1).<sup>55-57</sup> Oslund *et al.* konnten in verschiedenen Säugerzelllinien zeigen, dass eine Deletion der BPGM *in vitro* zu einer Erhöhung der PGAM1 Aktivität sowie erhöhten 3-PG Leveln führte, was im weiteren Verlauf eine erhöhte Serin Biosynthese bewirkte.<sup>56</sup> Die Hauptfunktion von BPGM in der Synthese-Aktivität besteht darin, durch die Umwandlung des Glykolyse-Zwischenprodukts 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) hohe Konzentrationen von 2,3-BPG zu erzeugen (Abbildung 2).<sup>54</sup> Dieser als Rapoport-Luebering-Zyklus beschriebene Nebenweg der Glykolyse wurde erstmals von Samuel Mitja Rapoport und Janet Luebering 1951 in Erythrozyten beschrieben.<sup>58</sup> In menschlichen Erythrozyten macht der Rapoport-Luebering-Zyklus etwa 15-25 % des Gesamtflusses durch die Glykolyse aus.<sup>59</sup> Das produzierte 2,3-BPG ist essentiell für die Regulation der Sauerstoffaffinität zum Hämoglobin durch direkte Bindung an das Hämoglobin-Tetramer in Erythrozyten.<sup>59,60</sup> Diese allosterische Wirkung von 2,3-BPG nimmt somit maßgeblichen Einfluss auf die Sauerstoffverfügbarkeit des Gewebes.

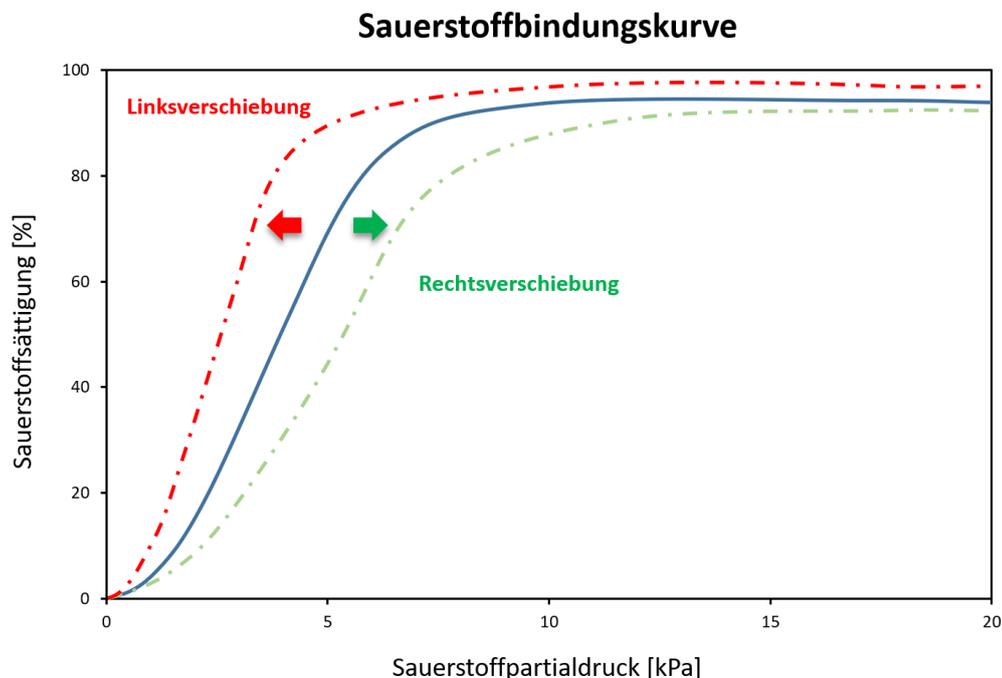


**Abbildung 2: Der Rapoport-Luebering Zyklus der Glykolyse.** BPGM wandelt über seine Synthase-Aktivität 1,3-BPG zu 2,3-BPG um. Weiterhin hydrolysiert BPGM 2,3-BPG zu 3- oder 2-PG und einem Phosphat mithilfe seiner Phosphatase-Aktivität. Das erzeugte Phosphat ist entscheidend für die primäre Umwandlung von 3-PG in 2-PG in der Glykolyse durch Aktivierung der Phosphoglycerat-Mutase 1 (PGAM1). Über seine Mutase-Aktivität katalysiert BPGM die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat (3-PG) zu 2-Phosphoglycerat (2-PG), jedoch mit einer sehr geringen Rate.

Hohe Konzentrationen von 2,3-BPG senken die O<sub>2</sub>-Affinität des Hämoglobins, was durch eine Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve dargestellt wird (Abbildung 3). Ein im klinischen Sinne verwendbares Maß für die O<sub>2</sub>-Hb-Affinität ist der P<sub>50</sub> Wert, welcher den pO<sub>2</sub> bei Halbsättigung (50 %) des Hämoglobins mit O<sub>2</sub> darstellt. Der P<sub>50</sub>-Normalwert beim Menschen liegt bei etwa 27 mmHg. Bei niedrigen 2,3-BPG-Spiegeln in den Erythrozyten ist die Sauerstoffaffinitätskurve nach links verschoben, was durch einen verringerten P<sub>50</sub> gekennzeichnet ist. Die Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe ist bei Linksverschiebung erschwert.<sup>61–64</sup> Unter normalen Bedingungen beträgt die Konzentration von 2,3-BPG etwa 4,13–19,4 µmol/g Hb, jedoch zeigt sich bei verschiedenen Herz-Kreislauf-Erkrankungen<sup>65–67</sup>, großer Höhe<sup>68</sup> oder Hypoxie<sup>69,70</sup> dass die Konzentration aufgrund von Änderungen des Blut-pH-Werts und dem Vorhandensein spezifischer Metabolite erhöht werden kann.<sup>61,71,72</sup> Lui *et al.* untersuchten in diesem Zusammenhang die molekularen Mechanismen, die Änderungen des 2,3-BPG-Spiegels in der Höhenlage zugrunde legen.<sup>73</sup> Anhand verschiedener *in vivo*- und *in vitro*-Mausmodelle sowie Humanstudien konnten sie zeigen, dass aufgrund von Hypoxie in großer Höhe die Aktivität von löslichem CD73 und Plasma-Adenosin schnell ansteigt, was zu signifikant höheren Erythrozyten-2,3-BPG-Spiegeln und einem höheren Sauerstoffgehalt im Gewebe führt. Darüber hinaus konnten sie darstellen, dass die Erhöhung der extrazellulären Adenosin-Signalübertragung über den in Erythrozyten exprimierten Adenosin-A2B-Rezeptor (ADORA2B) zur sequentiellen Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) führt. AMPK ist ein wichtiger Regulator der zellulären Energiehomöostase, der Stoffwechselwege reguliert, um die Nährstoffversorgung mit dem Energiebedarf in Einklang zu bringen.<sup>74,75</sup> Durch AMPK vermittelte Phosphorylierung der BPGM wird die Aktivität erhöht und die 2,3-BPG Produktion gesteigert.<sup>73</sup>

Fujita *et al.*<sup>76</sup> beschrieben die Inaktivierung von Erythrozyten-BPGM über die Glykation, indem sie Diabetiker untersuchten und eine *in vitro*-Analyse durchführten. Glykation ist ein Prozess, bei dem reduzierende Zucker, die chemisch an primäre Aminogruppen von Proteinen gebunden sind, chemisch instabile Schiffsche Basenbindungen bilden. Diese sogenannten Amadori-Produkte oder auch AGEs (englisch „*advanced glycation end products*“) können unter anderem durch Umlagerung oder Autooxidation abgebaut werden.<sup>77–79</sup> Während die Inkubation mit reduzierenden Zuckern (Glucose und Fructose) alle drei enzymatischen Aktivitäten von BPGM verringerte, führte die Inkubation mit einem nicht reduzierenden Zucker (Sorbit) zu keinen Änderungen der enzymatischen Aktivität des Enzyms. Die Wissenschaftler fanden heraus, dass BPGM *in vivo* auf Lys158 und *in vitro* auf Lys2, Lys4, Lys17, Lys42, Lys158 und Lys196 glykiert werden kann, was zum Verlust der enzymatischen Aktivität führt.<sup>76</sup>

Zusammenfassend zeigen uns diese Ergebnisse, wie die BPGM-Aktivierung und -Inaktivierung unter bestimmten Bedingungen wie Höhengaufenthalt und Diabetes mellitus erfolgt. Die genaue Regulation der BPGM Expression ist jedoch noch unbekannt.



**Abbildung 3: Sauerstoffbindungskurve.** Die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins wird durch eine Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve gesenkt. Eine Linksverschiebung der Kurve bewirkt daher eine Erhöhung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins.

### 1.2.2 BPGM Mutationen

Humane *BPGM*-Mutationen kommen nur sehr selten vor. Rosa *et al.* berichteten erstmals 1978 über den Fall eines 42-jährigen Franzosen mit vollständigem *BPGM*-Defizit.<sup>62</sup> Sie konnten zeigen, dass der 2,3-BPG-Spiegel in seinen Erythrozyten unter 3 % der normalen Werte lag, was zu einer nach links verschobenen Sauerstoffdissoziationskurve und einem verringerten  $P_{50}$  von 17,3 mmHg führte.<sup>62</sup> Der Hämoglobinwert des Patienten betrug 19,0 g/dl. Aufgrund des Fehlens von BPGM und des dadurch reduzierten 2,3-BPG-Spiegels entwickelte der Patient eine mäßige kompensatorische Erythrozytose und eine erhöhte Erythrozyten-Sauerstoffaffinität. Unabhängig davon zeigte der Patient keine Anzeichen einer Hämolyse oder Hypoxämie und wies eine normale körperliche Aktivität auf. Interessanterweise zeigten seine Kinder 50 % der normalen BPGM-Aktivität und erniedrigte 2,3-BPG-Spiegel. Es wurde gezeigt, dass das Fehlen von BPGM und damit 2,3-BPG, Auswirkungen auf die Metabolite der Erythrozyten-Glykolyse hatte. Im Einzelnen

zeigten die Erythrozyten des Patienten und seiner Kinder hohe Konzentrationen von 3-PG, Triosephosphaten und Fructose-1,6-diphosphat sowie niedrige Konzentrationen von sowohl Glucose-6-phosphat als auch Fructose-6-phosphat. Darüber hinaus war die ATP-Menge höher und Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) niedriger als normal. Rosa *et al.* kamen zu dem Schluss, dass aufgrund des Fehlens von BPGM die Gesamtmenge an 1,3-BPG für die Phosphoglyceratkinase (PGK) zu Verfügung steht, was zu einem Anstieg der Glykolyse und mehr ATP führt.<sup>62</sup> Die DNA-Analyse des Patienten ergab zwei Mutationen im *BPGM*-Gen. Die erste Mutation war von Arginin zu Cystein bei der Aminosäure Glu-89, die zu einer Substitution von Cystein zu Tyrosin bei Nukleotid 413 führte. Die Glu-89 befindet sich an der aktiven Bindungsstelle des Enzyms, was einen Verlust der Enzymaktivitäten von BPGM zur Folge hatte. Die zweite Mutation war eine Frame-Shift-Mutation.<sup>57,80-82</sup> Sechs Jahre später entdeckten Galacteros *et al.* in Zusammenarbeit mit Raymonde Rosa neue Fälle von vollständigem BPGM-Mangel in Verbindung mit Erythrozytose in zwei nicht verwandten Familien.<sup>83</sup> Wie im ersten Fall von Rosa *et al.* 1978, entwickelten die Patienten hohe ATP-Spiegel und die gleichen Veränderungen der glykolytischen Zwischenspiegel.<sup>62,83</sup> Im Gegensatz zu diesen Fällen haben Hoyer *et al.* 2004 über den ersten Fall eines 28-jährigen Mannes berichtet, mit einer rezessiv vererbten homozygoten Mutation im *BPGM*-Gen.<sup>81</sup> Der Patient zeigte eine Substitution von CGG zu CAG im 62. Codon, was zu einem Austausch von Arginin zu Glutamin an der 61. Aminosäure des BPGM-Proteins führte. Diese Mutation führte zu einem verringerten 2,3-BPG-Spiegel von 0,3 µmol/g Hb und die BPGM-Enzymaktivität war auf 0,16 IE/g Hb verringert.<sup>81</sup> Aufgrund des geringen 2,3-BPG-Spiegels entwickelte der Patient eine sekundäre Erythrozytose.<sup>81</sup>

### **1.2.3 Vorkommen von BPGM**

BPGM ist ein Enzym, welches bei Menschen und den meisten Säugetieren exklusiv in Erythrozyten exprimiert wird.<sup>84</sup> Im Jahr 2006 haben Pritlove *et al.* erstmals zeigen können, dass das BPGM-Vorkommen nicht ausschließlich auf menschliche Erythrozyten beschränkt ist.<sup>85</sup> Sie zeigten die Existenz von aktivem BPGM in der Synzytiotrophoblastenschicht der Plazentazotten an der feto-mütterlichen Schnittstelle.<sup>85</sup> Diese Ergebnisse unterstützend, haben von Versen-Höyneck *et al.* eine erhöhte Häufigkeit von ADORA2B im selben Gewebe gefunden, von dem gezeigt wurde, dass er AMPK und dadurch die BPGM-Expression aktivieren kann.<sup>73,86</sup> Pritlove *et al.* postulierten, dass BPGM sezerniert und durch ein unbekanntes spezifisches Transportsystem zu den nahe gelegenen maternalen Erythrozyten transportiert wird. Danach würde die Konzentration des maternalen Erythrozyten-2,3-BPGs ansteigen und die Sauerstoffversorgung des

Fötus unterstützen. Im Gegensatz zu adulten Erythrozyten, sind fötale Erythrozyten weniger empfindlich für die Wirkungen von 2,3-BPG aufgrund der Substitution von Aminosäuren ( $\beta 143\text{His}\rightarrow\text{Ser}$ ), die einen der positiv geladenen 2,3-BPG-Kontakte im fötalen Hämoglobin löscht. Die Unempfindlichkeit des fötalen Hämoglobins für 2,3-BPG, führt zu einer Erhöhung der fötalen  $\text{O}_2\text{-Hb-Affinität}$ .<sup>85,87,88</sup> Die Rolle sezernierten BPGMs, wie von Pritlove *et al.* vermutet, wurde jedoch nicht belegt und es wurde auch noch kein Transportsystem identifiziert.

Bei Untersuchungen zur Hb-Expression in Embryonen fanden Lim *et al.* in murinen *in vitro* abgeleiteten 2-Zell-Embryonen sowie in menschlichen *in vitro* Fertilisationsembryonen ein BPGM-Signal.<sup>89</sup> In diesem Zusammenhang zeigten sie durch Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktionsanalyse, dass eine erhöhte *in vivo* Hb-Expression in murinen Kumuluszellen von einer Herunterregulierung der *Bpgm* auf mRNA-Ebene begleitet wurde. In weiteren Forschungsarbeiten soll durch eine *Bpgm* Deletion genauer untersucht werden, ob das Vorhandensein von Hb in Embryonen unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen eine Hypoxie-ähnliche Reaktion zur Folge hat.<sup>89</sup> Erst vor kurzem konnte auch in Astrozyten des Nervensystems *in vitro* und *in vivo*, ähnlich wie in Erythrozyten, gezeigt werden, dass BPGM unter Hypoxie hochreguliert wird.<sup>90</sup> Weiterhin konnten die Arbeitsgruppe um E *et al.* nachweisen, dass BPGM einen supprimierenden Effekt auf die Glykolyse von Astrozyten besitzt, was auf die negative Regulation des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1-alpha (HIF-1 $\alpha$ , englisch „*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*“) und Tet-Methylcytosin-Dioxygenase 2 (TET2, englisch „*Ten-Eleven-Translocation oncogene family member 2*“) zurückgeführt wurde.<sup>90</sup>

Auch in Krebs-Zellen konnte BPGM nachgewiesen werden. Im Leberzellkarzinom zeigten eine Studie von Cai *et al.*, dass erhöhte BPGM-Level mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit Leberzellkarzinom assoziiert sind.<sup>91</sup> Weiterhin führt die Datenbank „The Human Protein Atlas“ BPGM als Marker für Nierenkrebs auf.<sup>92</sup>

Zusammenfassend wurde eine BPGM Expression auch außerhalb von Erythrozyten, insbesondere der Plazenta und Tumorzellen, beschrieben. Eine genaue Funktion der BPGM, unabhängig von der des allosterischen Effektors am Hämoglobin, konnte bisher nicht aufgezeigt werden. Das Vorkommen von BPGM in der Niere wurde noch nicht beschrieben.

### 1.3 Fragestellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll die Rolle der 2,3-Bisphosphoglyceratmutase (BPGM) in der Niere charakterisiert werden. Ziel ist es, ein tieferes Verständnis über die Funktion dieses Enzyms im Nierengewebe zu erlangen. Hierfür sind die folgenden Arbeitsschritte vorgesehen:

1. **Zelluläre Lokalisation der BPGM Expression in der Niere:** Durch verschiedene experimentelle Ansätze wie Immunhistochemie und Einzelzellsequenzierungs-Analysen soll die genaue Position von BPGM in den verschiedenen Zelltypen der humanen sowie murinen Niere bestimmt werden.
2. **Generierung einer Mauslinie mit konditioneller Inaktivierung von *Bpgm* in der Niere:** Mittels gezielter genetischer Manipulation soll eine Mauslinie entwickelt werden, bei der das *Bpgm*-Gen spezifisch in den Expressionsbereichen inaktiviert werden kann. Diese konditionelle Knockout-Technik soll es ermöglichen, die Auswirkungen des Verlustes von *Bpgm* gezielt und zeitlich kontrolliert zu untersuchen, ohne andere Gewebe zu beeinflussen.
3. **Charakterisierung der konditionellen *Bpgm* Knockoutmaus bezüglich Nierenstruktur und -funktion:** Diese Mäuse sollen umfassend analysiert werden, um mögliche Veränderungen in der Nierenstruktur und -funktion zu identifizieren. Dazu sollen histologische Untersuchungen, Genexpressionsanalysen sowie proteomische Analysen durchgeführt werden, um die Rolle von BPGM in der Nierenphysiologie zu untersuchen.

Von den Ergebnissen der geplanten Untersuchungen sind erste wichtige Erkenntnisse zur Funktion von BPGM in der Niere zu erwarten. Insbesondere könnten neue Mechanismen der Nierenphysiologie und mögliche pathophysiologische Zustände, die mit der Dysfunktion von BPGM assoziiert sind, ermittelt werden. Solche Erkenntnisse könnten langfristig zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Ansätze für Nierenerkrankungen beitragen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

<b>Verwendetes Gerät</b>	<b>Hersteller/ Firma</b>
ABL800 Flex Blutgasanalysator	Radiometer GmbH
Biomek i7 Arbeitsstation	Beckman Coulter
CFX Connect Real-Time PCR System	Bio-Rad
Chemostar Imager	Intas
DS-Ri2 Kamera	Nikon
Eclipse Ti2-A Mikroskop	Nikon
Elektrophorese-Kammer Agarose-Gel	VWR
Elektrophorese-Kammer, Mini-PROTEAN	Bio-Rad
Entwässerungsautomat Leica TP1020	Biosystems
Gewebeeinbettstation EC 350	Myr
Herdplatte	Clatronic
HybEZ™ II Hybridization System	Advanced Cell Diagnostics
HybEZ™ Humidity Control Tray	Advanced Cell Diagnostics
Kreisschüttler Certomat MO	Sartorius
LE220Rsc Focused-ultrasonicator	Covaris
Magnetrührer	IKA
Microcomputer electrophoresis Power Supply 500/500	Consort
Microtom, Cool-Cut and Section Transfer System	EpreDia
NanoDrop™ 2000	Thermo-Fisher Scientific
pH-Meter	Mettler Toledo
Power Supply für Western Blot	Bio-Rad
Q-Exactive Plus Massenspektrometer	Thermo-Fisher Scientific
Reagenzglasschüttler Genie®	Scientific Industries
RNAscope™ EZ-Batch™ Slide Rack	Advanced Cell Diagnostics
Schnellkochtopf	WMF
Tank Blot System	Bio-Rad
Thermoblock, T3	Biometra
Thermocycler GenePro	Bioer Technology

ThermoMixer F1.5	Eppendorf
Ultimate 3000 RSLnanoHPLC	Thermo-Fisher Scientific
Zentrifuge, 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge, Megafuge 8K	Thermo Scientific

## 2.2 Hilfsmittel und Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller/ Firma/ Bezug</b>
AFA-TUBE TPX Strip	Covaris
Anatomisches Präparierbesteck	Hammacher
Blottingpapier Whatman	GE Healthcare
Einmal-Injektions-Kanüle, 0,45 x 12 mm	Braun
Färbegestell	Carl Roth
Färbeschalen	Carl Roth
Gelkämme	PeqLab
Glasküvette	Carl Roth
Glasplatten SDS-PAGE	Bio-Rad
Lanzetten	Goldenrod
Mörser	Carl Roth
Objekträger, SuperFrost® Plus	R Langenbrinck
PapPen	Kisker Biotech
Paramagnetic beads für SP3 (Sera-Mag Speed Beads A und B)	Thermo-Fisher Scientific
PCR Platten, 96-well	Bio-Rad
PepMap C18	Thermo-Fisher Scientific
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Pipettenspitzen, Filter	Biozym
Pipettierhelfer accu-jet®	Brand
PVDF-Membranen	Carl Roth
Reaktionsgefäße, 0,5/1,5/2 ml	Carl Roth
Serologische Pipetten, 5/10/25 ml	Sarstedt
Spritze, 1 ml	BD Becton Dickinson
Stößel	Carl Roth
Szintillationsfläschchen, 20 ml	Kartell

## 2.3 Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller/ Firma/ Bezug</b>
Acetonitril	Biosolve Chemicals
Agarose	Biozym
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth
Ammoniumhydrogencarbonat (ABC)	Fluka Analytical
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Braun
Borsäure	Carl Roth
Bromphenolblau	Carl Roth
2-Chloracetamid (CAA)	Sigma-Aldrich
Chloroform	Carl Roth
Chlorwasserstoffsäure (HCl), 37 %	Carl Roth
DEPC	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Carl Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Doxycyclin-ratiopham® SF	Ratiopharm
Ethanol 99,6 %	Merck
Ethanol 99,6 %, vergällt	Carl Roth
Ethanol 96 %, vergällt	Carl Roth
Ethanol 70 %, vergällt	Carl Roth
Glycerin	Carl Roth
Glycin	Carl Roth
Para-Formalin, 4 %	ChemCruz™
Harnstoff	Carl Roth
Hematoxylin nach Mayer	Carl Roth
Hoechst 33342 (DAPI)	Thermo Scientific
Isopropanol	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka
Methanol	Merck
Methansäure	Biosolve Chemicals

Milchpulver	Carl Roth
Natriumazid (ACN)	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydroxid	Carl Roth
Nuklease freies Wasser	Invitrogen™
Periodsäure	Carl Roth
OrangeG	Carl Roth
Saccharose	Carl Roth
Schiff's Reagenz	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Sucrose	Carl Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth
Trifluoressigsäure	Biosolve Chemicals
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Carl Roth
Tris-HCl	Carl Roth
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 30 %	Merck
Xylencyanol	Carl Roth
Xylol	Carl Roth

## 2.4 Fertiglösungen und Kits

<b>Lösungen und Kits</b>	<b>Hersteller/ Firma/ Bezug</b>
Antibody-Diluent	Agilent Technologies
cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo-Fisher Scientific
DAB-Reagenz	Vector Laboratories
DNeasyKit	Qiagen
Go Taq® G2 Hot Start Green Mastermix	Promega
Immu-Mount™	Thermo-Fisher Scientific
ImmPRESS HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit, Peroxidase	Vector Laboratories
In Situ Cell Death Detection Kit	Roche
Marker 100 bp äquimolar	Carl Roth

Mayers Hämalaunlösung	Sigma Aldrich
Opal™ 690 Reagent Pack	Advanced Cell Diagnostics
DPBS, 1x	Gibco
Pikro-Siriusrot-Lösung	Morphisto
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo-Fisher Scientific
Presicion Plus Marker	Bio-Rad
Protease Inhibitor Cocktail (PIC)	Sigma Alsrich
RNAscope™ Hydrogen Peroxide	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ Protease Plus	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ 10X Target Retrieval	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ Multiplex FL v2 AMP 1	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ Multiplex FL v2 AMP 2	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ Multiplex FL v2 AMP 3	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ Multiplex FL v2 HRP-C1	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ Multiplex FL v2 HRP Blocker	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ Multiplex FL v2 DAPI	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ Multiplex TSA Buffer	Advanced Cell Diagnostics
RNAscope™ 50X Wash Buffer	Advanced Cell Diagnostics
RNA-STAT-60	Tel-Test Inc.
Roti®-Histokitt II	Carl Roth
SYBR™ Green Master Mix	Thermo-Fisher Scientific

SYBR Safe  
 Target Retrieval Solution 10x  
 Tween20  
 WesternBright™ Sirius/Peroxide

Invitrogen  
 Agilent Technologies  
 Carl Roth  
 Advansta

## 2.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 1: Lösungen für Histologie.

Lösungen	Zusammensetzung	
<b>PBS, 10x</b>	1,4 M NaCl 27 mM KCl 92 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	in <i>A. bidest</i>
<b>Sucrose</b>	70 mM Saccharose 10 % 10x PBS 3,1 mM Natriumazid	pH 7,3-7,4 einstellen in <i>A. bidest</i>
<b>TBS-T, 10x</b>	500 mM TRIS 3 M NaCl 3 % einer 37 % HCl Lösung 1 % Tween 20	pH 7,6 in <i>A. bidest</i>
<b>Wasserstoffperoxid/Methanol- Lösung, 3 %</b>	10 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30 %	in Methanol

**Tabelle 2: Lösungen für Arbeiten mit RNA.**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<b>DEPC- <i>A. bidest</i></b>	0,1 % DEPC	in <i>A. bidest</i>
<b>Orange 6-Ladepuffer, 6x</b>	10 mM TRIS-HCl pH 7,6 0,15 % OrangeG 0,03 % Xylencyanol 60 % Glycerin 60 mM EDTA	in <i>A. bidest</i>
<b>TBE, 5x</b>	450 mM TRIS 440 mM Borsäure 2% 0,5 M EDTA pH 8,0	pH 8,3-8,5 in <i>A. bidest</i>

**Tabelle 3: Lösungen und Puffer für Proteinpräparation.**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<b>1 M DTT</b>	1 M DTT	in <i>A. bidest</i> Lagerung bei -20 °C
<b>Lysis-Puffer</b>	1 ml SDS-Puffer, 2x 1 ml <i>A. bidest</i> 25 µl 1 M DTT	
<b>SDS-Puffer, 2x</b>	5 % 2 M TRIS-HCl, pH 6,8 160 mM Harnstoff 10 % SDS-Lösung (10 %)	in <i>A. bidest</i>

**Tabelle 4: Lösungen und Puffer für SDS-PAGE.**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<b>APS, 10 %</b>	10 % APS	in <i>A. bidest</i>
<b>Bromphenolblau (BPB)- Lösung, 0,5 %</b>	75 µM Bromphenolblau 25 % Glycerin 1 Spatelspitze Saccharose pro 10 ml Lösung	in <i>A. bidest</i>
<b>Laemmli-Puffer, 5x</b>	120 mM TRIS 1,3 M Glycin 17 mM SDS	pH 8,3-8,6 in <i>A. bidest</i>
<b>SDS-Lösung (10 %)</b>	350 mM SDS	in <i>A. bidest</i>
<b>SDS-PAGE Sammelgel 10 % Acrylamid/ Bisacrylamid für 1 Gel</b>	1,3 ml <i>A. bidest</i> 1,875 ml SDS-Puffer P2 0,5 ml Rotiphorese® Gel 30 37,5 µl 10 % APS 6,75 µl TEMED	
<b>SDS-PAGE Trenngel 10 % Acrylamid/ Bisacrylamid für 1 Gel</b>	1 ml <i>A. bidest</i> 3 ml SDS-Puffer P1 2 ml Rotiphorese® Gel 30 50 µl 10 % APS 5 µl TEMED	
<b>SDS-Puffer P1</b>	750 mM TRIS 2 % SDS-Lösung (10 %)	pH 8,8 mit HCl einstellen in <i>A. bidest</i>
<b>SDS-Puffer P2</b>	250 mM TRIS 2 % SDS-Lösung (10 %)	pH 6,8 mit HCl einstellen in <i>A. bidest</i>

**Tabelle 5: Lösungen und Puffer Western Blot.**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<b>Blottingpuffer</b>	23 mM TRIS	in <i>A. bidest</i>
	170 mM Glycin	Lagerung bei 4 °C
	0,045 % SDS-Lösung (10 %)	
	18 % Methanol	
<b>Natronlauge</b>	0,2 M NaOH	in <i>A. bidest</i>
<b>TBS, 10x</b>	20 mM TRIS	pH 7,6
	137 mM NaCl	in <i>A. bidest</i>
	0,015 % konzentrierte Salzsäure	
<b>TBS-T, 1x</b>	10 % 10x TBS pH 7,6	in <i>A. bidest</i>
	0,1 % Tween 20	

**Tabelle 6: Lösungen und Puffer für Proteomics.**

<b>Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
<b>Lysis-Puffer</b>	1 % SDS	in <i>A. bidest</i>
	0,1 M ABC	
	1,25 x PIC	
<b>Reduktions und Alkylierungs Puffer</b>	40 mM TCEP	in <i>A. bidest</i>
	160 mM CAA	
	200 mM ABC	
<b>Acetonitril/Wasser Puffer</b>	2:98 Acetonitril:Wasser	
	0,1 % Trifluoressigsäure	
<b>Puffer A</b>	0,1 % Methansäure	in <i>A. bidest</i>
<b>Puffer B</b>	80 % Acetonitril	
	0,1 % Methansäure	

## 2.6 Oligonukleotide

### 2.6.1 Primer für qPCR

Tabelle 7: Verwendete Primer für qPCR.

Name	Sequenzen
<i>Bpgm</i>	Forward: TGTGCGATGTGCCCTTGGAT Reverse: AACGGCACGCAGGTTCTCAT
<i>Ccl2</i>	Forward: GCAGTTAACGCCCACTCAC Reverse: CCATTCCTTCTTGGGGTCAGC
<i>Cre</i>	Forward: CGAACGCACTGATTTGACC Reverse: GGAAATCCATCGCTCGACCA
<i>Havcr1</i>	Forward: TCAGGGTCTCCTTCACAGCAG Reverse: TGACCCACCACCCCCTTTAC
<i>Hmox-1</i>	Forward: AACATCGACAGCCCCACCAA Reverse: GCTAGCAGGCCTCTGACGAA
<i>Icam1</i>	Forward: CCATCCCAAAGCTCGACACC Reverse: CTCCCTTCCGAGACCTCCAG
<i>Il18</i>	Forward: TCCAAGTGCAGACTGGCACA Reverse: AGGCGGCTTTCTTTGTCCTG
<i>Lcn2</i>	Forward: CCAGACTTCCGGAGCGATCA Reverse: GTGGTGGCCACTTGACATT
<i>Tgfb1</i>	Forward: CGGAGAGCCCTGGATACCAA Reverse: TTGCAGGAGCGCACAATCAT

## 2.6.2 Primer für Genotypisierung

Tabelle 8: Verwendete Primer für Genotypisierung.

Name	Sequenzen
<i>Pax8</i>	Forward: CCA TGT CTA GAC TGG ACA AGA Reverse: CTC CAG GCC ACA TAT GAT TAG
<i>Cre</i>	Forward: TCG CTG CAT TAC CGG TCG ATG C Reverse: CCA TGA GTG AAC GAA CCT GGT CG
<i>Bpgm_CAS</i>	TCG TGG TAT CGT TAT GCG CC
<i>Bpgm</i>	Forward: CAG TGT GGT TCC CTG CAC TC Reverse: TCC GTT CTA ATG GTG GGT TTC

## 2.7 Antikörper

### 2.7.1 Primärantikörper

Tabelle 9: Verwendete Primärantikörper.

<b>Antikörper</b>	<b>Katalog-Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>anti-<math>\alpha</math>-SMA</b>	orb195993	Biorbyt
<b>anti-AGE</b>	ab23722	Abcam
<b>anti-Aquaporin-2</b>	20102rs	BiCell Scientific
<b>anti-BPGM</b>	NBP1-86064	Novus Biologicals
<b>anti-Calbindin</b>	C9848	Sigma-Aldrich
<b>anti-CD3</b>	ab16669	Abcam
<b>anti-EpCAM</b>	ab221552	Abcam
<b>anti-F4/80</b>	Cl:A3- 1/MCA497GA	Bio-Rad
<b>anti-HO-1</b>	MA1-112	Invitrogen
<b>anti-KI-67</b>	ab15580	Abcam
<b>anti-KIM-1</b>	AF1817	R&D Systems
<b>anti-LRP2/Megalin</b>	ab184676	Abcam
<b>anti-LY-6G</b>	1A8/127601	BioLegend
<b>anti-NCC</b>	AB3553	Millipore
<b>Anti-NCCRP1</b>	PAS-71715	Invitrogen
<b>anti-NF-<math>\kappa</math>B</b>	D14E12	Cell Signaling
<b>anti-NGAL</b>	AF1857	R&D Systems
<b>anti-NKCC2</b>	LS-C313275 / 62410	LS Bio
<b>anti-RAGE</b>	PA1-075	Invitrogen
<b>anti-Vimentin</b>	ab92547	Abcam

## 2.7.2 Sekundärantikörper

Tabelle 10: Verwendete Sekundärantikörper.

<b>Antikörper</b>	<b>Katalog-Nummer</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Anti-Ziege Alexa Fluor 488</b>	705-545-147	Jackson Immuno Research Labs
<b>Anti-Ziege Alexa Fluor 594</b>	705-585-147	Jackson Immuno Research Labs
<b>Anti-Kaninchen-HRP</b>	R1255HRP	Acris Antibodies
<b>Anti-Kaninchen Cy3</b>	111-165-003	Jackson Immuno Research Labs
<b>Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488</b>	711-545-152	Jackson Immuno Research Labs
<b>Anti-Maus Cy3</b>	715-165-150	Jackson Immuno Research Labs
<b>Anti-Ratte Cy3</b>	712-165-150	Jackson Immuno Research Labs

## 2.8 Software und Algorithmen

Tabelle 11: Verwendete Software.

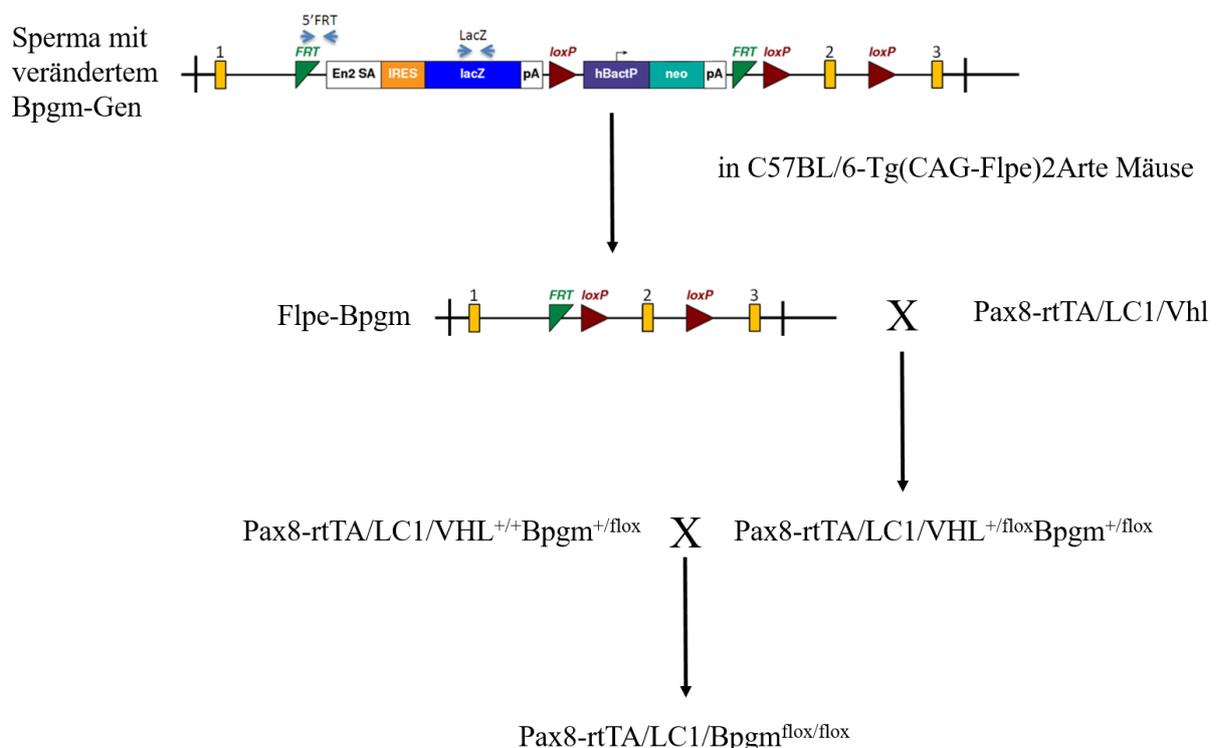
Software/ Algorithmus	Bezug	Hersteller
<b>DEP package for R</b> (version 1.16.0)	<a href="https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DEP.html">https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DEP.html</a>	Zhang. <i>et al.</i> , 2018 <sup>93</sup>
<b>GOplot package for R</b> (version 1.0.2)	<a href="https://wencke.github.io">https://wencke.github.io</a>	Walter <i>et al.</i> , 2015 <sup>94</sup>
<b>Fiji (version 1.52p)</b>	<a href="https://fiji.sc">https://fiji.sc</a>	Schindelin <i>et al.</i> , 2012 <sup>95</sup>
<b>Image Studio Lite (version 5.2)</b>	-	LI-COR Biosciences
<b>MSigDB</b>	<a href="https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/">https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/</a>	Liberzon <i>et al.</i> , 2015 <sup>96</sup>
<b>NanoDrop 2000/2000c</b>	-	Thermo-Fisher Scientific
<b>NIS-Elements (version 5.20.02)</b>	-	Nikon
<b>Primer-BLAST</b>	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>	NCBI
<b>Prism8 (version 8.3.0)</b>	-	GraphPad
<b>R (version 4.1.2)</b>	<a href="https://www.r-project.org">https://www.r-project.org</a>	R Core Team
<b>SetRank Paket für R</b> (version 1.1.0)	<a href="https://cran.rproject.org/web/packages/SetRank/index.html">https://cran.rproject.org/web/packages/SetRank/index.html</a>	Simillion, C. <i>et al.</i> , 2017 <sup>97</sup>

### 3 Methoden

#### 3.1 Mäuse

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Kennnummer G0198-18 genehmigt.

Für die Versuche wurden mit Hilfe der Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin transgene Mäuse gezüchtet, welche einen induzierbaren nephronspezifischen *Bpgm* Knockout besitzen. Hierfür wurde zunächst das Knock-out first Allel  $Bpgm^{tm1a(KOMP)Wtsi}$  (siehe Abbildung 4) als Sperma (vom Wellcome Sanger Institute) in weibliche C57BL/6-Tg(CAG-Flpe)2Arte Mäuse eingebracht wodurch der Mausstamm *Bpgm*-Flpe entstand. Die Nachkommen wurden nun mit dem Mausstamm Pax8-rtTA/LC1/Vhl<sup>98</sup> verpaart, wodurch sich heterozygote Mäuse für *Bpgm* (Pax8-rtTA/LC1/VHL<sup>+/flox</sup>*Bpgm*<sup>+/flox</sup>) ergaben. Das Transgen Pax8-rtTA (B6.Cg-Tg(Pax8-rtTA2S\*M2)1Koes/J) ermöglicht dabei die induzierbare Expression des Transgens Cre (Tg(tetO-cre)LC1Bjd) in allen renalen Tubuluszellen. Nach weiterer Rückkreuzung entstanden dann homozygote *Bpgm*-KO Mäuse (Pax8-rtTA/LC1/*Bpgm*<sup>flox/flox</sup>), die für die Experimente verwendet wurden.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Generierung der *Bpgm*-KO (Pax8-rtTA/LC1/*Bpgm*<sup>flox/flox</sup>) Maus.** Abbildung modifiziert nach White et al., 2013.<sup>99</sup>

### **3.2 Tierexperimente**

Für die Experimente wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter zwischen 10 und 16 Wochen verwendet. Zu allen Zeiten hatten die Tiere Zugang zu ausreichend Futter und Wasser. Um eine *Bpgm*-Deletion zu erreichen, wurden den Mäusen *i.p.* Doxyzyklin (1 mg pro 10 g Körpergewicht) injiziert. Vier bzw. acht Tage nach der Injektion wurde über den Wangenplexus Blut entnommen. Anschließend erfolgte nach kurzer Isofluran-Narkose die Tötung der Tiere über eine zervikale Dislokation. Als Kontrollen wurden Mäuse verwendet, die nach Doxyzyklin-Gabe keine Cre-Rekombinase Erhöhung in der quantitativen PCR zeigten.

### **3.3 Blutanalysen**

Das Blut, welches aus dem Wangenplexus der transgenen Mäuse gewonnen wurde, wurde hinsichtlich seiner Hämoglobin- und Kreatinin-Konzentration untersucht. Für die Hämoglobin-Mengen Bestimmung kam ein ABL800 Flex Blutgasanalysator zur Anwendung. Für die Kreatinin Messung wurde das Blut zunächst für ca. 5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Blut zur Gewinnung des Blut Serums bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die anschließende Serum-Kreatinin Konzentrations-Bestimmung erfolgte über das Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH (Berlin, Deutschland).

### **3.4 Gewebeentnahme und –aufbereitung**

Nach der Tötung wurden den Mäusen umgehend auf einer Kühlplatte die Nieren entnommen und diese halbiert. Drei Hälften der zwei Nieren wurden in flüssigen Stickstoff gegeben und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Eine weitere Hälfte wurde für histologische Färbungen in 4 % Para-Formalin Lösung für 24 h bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend für 2 h in einer Sucrose-Lösung bei 4 °C gelagert und im Entwässerungsautomaten nach folgendem Protokoll in Paraffin überführt:

1. 70 % Ethanol 1 h
2. 80 % Ethanol 1 h
3. 96 % Ethanol 1 h
4. 99 % Ethanol 1 h

5. 99 % Ethanol 1 h
6. Xylol 1 h
7. Xylol 1 h
8. Paraffin 1 h
9. Paraffin 1 h

Nach erfolgreicher Entwässerung wurde die Nierenhälfte mithilfe einer Gewebeeinbettstation in Paraffin eingebettet und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **3.5 Histologische Färbungen**

#### **3.5.1 Periodic acid-Schiff (PAS) Färbung**

Die Periodic acid-Schiff (PAS) Färbung ist eine histologische Färbung, welche zur Darstellung von Glykogen, Basalmembranen, Glycokonjugaten und der Gewebearchitektur Verwendung finden.<sup>100</sup> Hierfür wurden einparaffinierte Nieren mit Hilfe eines Mikrotoms in 1,5 µm Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger gezogen. Um überschüssiges Paraffin zu entfernen, wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten über Nacht bei 60 °C im Ofen inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 30-Minütige Entparaffinierung über Xylol und eine Rehydrierung über eine absteigende Ethanol-Reihe (jeweils 5 Minuten: 100 % Ethanol 2x; 96 % Ethanol 1x; 70 % Ethanol 1x; A. bidest 2x). Für die PAS Färbung wurden nun die Objektträger mit 0,5 % Periodsäure inkubiert mit anschließenden Waschschrinen in Leitungswasser. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem Schiff Reagenz. Nach weiteren Waschschrinen in Leitungswasser wurden die Objektträger mit Hilfe von Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden analysiert und fotografiert mit Hilfe des Eclipse Ti2-A Mikroskops und der DS-Ri2 Kamera sowie der NIS-Elements Software von Nikon.

#### **3.5.2 Pikro-Siriusrot-Färbung**

Die Pikro-Siriusrot-Färbung ist eine Methode, um im Gewebeschnitt Kollagene anzufärben. Eine verstärkte Kollagenfärbung ist kennzeichnend für Fibrose. Für die Pikro-Siriusrot-Färbung wurden einparaffinierte Nieren mit Hilfe eines Mikrotoms in 4 µm Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger gezogen. Um überschüssiges Paraffin zu entfernen, wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten über Nacht bei 60 °C im Ofen inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine

30-minütige Entparaffinierung über Xylol und eine Rehydrierung über eine absteigende Ethanol-Reihe (jeweils 5 Minuten: 100 % Ethanol 2x; 96 % Ethanol 1x; 70 % Ethanol 1x; *A. bidest* 2x). Die Schnitte wurden nachfolgend für eine Stunde in einer Pikro-Siriusrot-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Entwässerung der Schnitte über eine aufsteigende Ethanol-Reihe und Xylol (jeweils 5 Minuten: *A. bidest* 2x; 70 % Ethanol; 96 % Ethanol; 100 % Ethanol 2x sowie 30 Minuten Xylol). Die Schnitte wurden nach erfolgreicher Entwässerung mit Hilfe von Roti®-Histokitt II eingedeckt. Die gefärbten Schnitte wurden analysiert und fotografiert mit Hilfe des Eclipse Ti2-A Mikroskops und der DS-Ri2 Kamera sowie der NIS-Elements Software von Nikon. Die quantitative Auswertung der Fibrose erfolgte durch Dr. Robert Labes.

### **3.5.3 Immunfluoreszenzfärbung**

Die Immunfluoreszenzfärbung ist eine Methode, bei der Proteine oder andere Antigene mit Hilfe von Antikörpern gekoppelt mit einem fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht werden können. Hierfür wurden im ersten Schritt einparaffinierte Nieren mit Hilfe eines Mikrotoms in 1,5 µm Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger gezogen. Um überschüssiges Paraffin zu entfernen, wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten über Nacht bei 60 °C im Ofen inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine 30-minütige Entparaffinierung über Xylol und eine Rehydrierung über eine absteigende Ethanol-Reihe (jeweils 5 Minuten: 100 % Ethanol 2x; 96 % Ethanol 1x; 70 % Ethanol 1x; *A. bidest* 2x). Zur Demaskierung der Proteine wurde ein Schnellkochtopf der Marke WMF mit 2150 ml *A. bidest* befüllt, in welchem eine Plastikkuvette mit den Objektträgern mit 70 ml 1x TRS gestellt wurde. Die Demaskierung erfolgte zunächst für ca. 18 Minuten bei 120 °C unter Druck auf höchster Plattenstufe. Es erfolgten anschließend weitere 12 Minuten auf Stufe 3 der Kochplatte. Nach Beendigung der Demaskierung wurde die Plastikkuvette ohne Deckel in Eis überführt und ca. 20 Minuten gewartet, bis das 1x TRS Raumtemperatur erreichte. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Objektträger aus dem 1x TRS in 1x TBS-T überführt und dabei die Schnitte mittels eines PapPens umrundet. Zur Blockierung unspezifischer Proteine wurden die Objektträger in eine Feuchtkammer gelegt und 50 µl 5 % Milchpulver in 1x TBS-T pro Schnitt pipettiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mittels einer Saugpumpe die Blockier-Lösung entfernt und die Schnitte im Färbegestell 3x für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Flüssigkeit von den Schnitten abgesaugt, durch 50 µl der Primärantikörper-Lösung (Primärantikörper in AB-Diluent) ersetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Objektträger erneut 3x für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Auf die Schnitte wurde

dann der Sekundärantikörper 1:250 in AB-Diluent inklusive 1:2500 DAPI pipettiert und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 1 h inkubiert. Nach erneutem 3-maligen Waschen in TBS-T wurden die Schnitte mit Immu-Mount™ und Objektgläschen eingedeckt. Die gefärbten Schnitte wurden analysiert und fotografiert mit Hilfe des Eclipse Ti2-A Mikroskops und der DS-Ri2 Kamera sowie der NIS-Elements Software von Nikon.

#### **3.5.4 Immunhistochemie (Braunfärbung)**

Bei der immunohistochemischen Färbung werden wie bei der Immunfluoreszenzfärbung Antigene mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. Anders als bei der Fluoreszenzfärbung erfolgt die Sichtbarmachung nicht über einen Fluoreszenzfarbstoff, sondern über eine chemische Reaktion. Hierbei ist der Sekundärantikörper an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt. Bei Zugabe des Substrats Diaminobenzidin (DAB) wird dieses enzymatisch zu einem farbigen Niederschlag umgesetzt. Wie bei der Immunfluoreszenzfärbung (3.5.3.) erfolgten alle Schritte bis zur Demaskierung gleich. Nach dem Demaskieren der Schnitte wurden diese in 1x TBS-T überführt und dabei mittels PapPen umrundet. Zur Hintergrundreduzierung wurden nun die Schnitte für 10 Minuten mit einer 3 % Wasserstoffperoxid/Methanol Lösung inkubiert. Die Objektträger wurden dann 2x für 5 Minuten in TBS-T gewaschen. Die Blockierung unspezifischer Proteine erfolgte mit Hilfe einer 2,5 % Pferdeserum-Lösung aus dem ImmPRESS HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kit für 45 Minuten bei RT. Im Anschluss wurde der Primärantikörper in 2,5 % Pferdeserum verdünnt und für 120 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneuten 2-maligem Waschen für 5 Minuten in TBS-T, erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper des ImmPRESS HRP Horse Anti-Rabbit IgG Polymer Detection Kits für 1 Stunde bei RT. Danach fand ein weiterer Waschschriff in TBS-T. Die Entwicklung der Schnitte erfolgte mittels DAB Reagenz unter Sichtkontrolle am Mikroskop. Um die Reaktion zu stoppen, wurden die Schnitte im Anschluss 2x in *A. bidest* geschwenkt. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Objektträger mit Hilfe von Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt. Im letzten Schritt wurden die Schnitte mit Immu-Mount™ unter Deckgläschen eingebettet.

#### **3.5.5 RNAscope™ Fluoreszenz Assay**

RNAscope™ ist eine Methode zur mRNA Detektion auf Gewebeproben. Dabei wird eine spezifische Sonde gegen die zu untersuchende mRNA verwendet und diese mithilfe der *in situ* Hybridisierung und eines Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht. Die Methode erfolgte

angelehnt an das Protokoll von Wang *et al.*<sup>101</sup> Für die RNAscope™ Färbung wurden alle Lösungen aus den RNAscope™ Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 Assay und das spezifische HybEZ™ Hybridization System verwendet.

Für den RNAscope™ Assay wurden einparaffinierte Nieren mit Hilfe eines Mikrotoms in 1,5 µm Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger gezogen. Um überschüssiges Paraffin zu entfernen, wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten über Nacht bei 60 °C im Ofen inkubiert. Im ersten Schritt der RNAscope™ Hybridisierung erfolgt die Entparaffinierung der Schnitte. Hierfür wurden die Objektträger zunächst für 2x 10 Minuten in Xylol und danach 2x für je 2 Minuten in 100 % Ethanol inkubiert. Die Schnitte wurden für 5 Minuten luftgetrocknet und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt. Die Demaskierung der Schnitte vollzog sich im Dampfgerar. Für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung wurden auf den hingelegten Schnitten je 2 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Reagenz (Kit) getropft und diese bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nach 2-maligem Waschen in *A. bidest* wurden die Objektträger in ein Färbegestell überführt und dieses bei 98-102 °C für 15 Minuten in 200 ml 1x TRS gekocht. Danach wurden die Objektträger in 1x in *A. bidest* und 1x 3 Minuten in 100 % Ethanol gewaschen. Um die Schnitte wurde dann mittels PapPen eine Barriere aufgetragen und diese ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Im nächsten Schritt erfolgte die Protease-Behandlung. Hierfür wurden die Objektträger in das EZ-Batch gespannt und pro Schnitt 1 Tropfen Protease Plus Reagenz getropft. Das EZ-Batch wurde dann in eine feuchte Kammer gelegt und für 30 Minuten in einem 40 °C warmen Hybridisierungsöfen inkubiert. Im Anschluss wurde die Lösung abgeklopft und die Objektträger 3x in *A. bidest* gewaschen. Nun erfolgte der eigentliche RNAscope™ Assay. Zu Beginn wurden die Objektträger wieder in das EZ-Batch gespannt und pro Schnitt 1 Tropfen der spezifischen Sonde getropft. Die Hybridisierung erfolgte dann in einer feuchten Kammer bei 40 °C für 2 h im Hybridisierungsöfen. Anschließend wurden die Objektträger für 2x 2 Minuten in 1x Waschpuffer gewaschen. Zur Amplifikation des mRNA Signals wurden aufeinanderfolgend die Lösungen AMP1 (30 Minuten), AMP2 (30 Minuten) und AMP3 (15 Minuten) auf die Schnitte pipettiert und bei 40 °C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Zwischen den einzelnen Amplifikationsschritten wurden die Objektträger 2x für 2 Minuten in 1x Waschpuffer gewaschen. Nach der Amplifikation erfolgte die Kopplung mit dem Fluoreszenzfarbstoff durch Inkubation der Schnitte mit je 1 Tropfen HRP-C1 bei 40 °C im Hybridisierungsöfen für 15 Minuten. Nach 2-maligen Waschen in 1x Waschpuffer wurden die Schnitte mit ca. 100 µl Opal Dye 690 (1:750 in TSA Puffer) bei 40 °C für 30 Minuten im Hybridisierungsöfen inkubiert. Nach erneuten Waschschritten wurde auf die Schnitte 1 Tropfen HRP-Blocker getropft und diese bei 40 °C für 15 Minuten im Hybridisierungsöfen inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Objektträger erneut 2x 2 Minuten in 1x Waschpuffer gewaschen und

die Schnitte für 30 Sekunden mit einem Tropfen Dapi bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte sofort mit Immu-Mount™ unter Deckgläschen eingebettet. Die gefärbten Schnitte wurden analysiert und fotografiert mit Hilfe des Eclipse Ti2-A Mikroskops und der DS-Ri2 Kamera sowie der NIS-Elements Software von Nikon.

### **3.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren**

#### **3.6.1 Isolierung genomischer DNA aus Ohrbiopsien**

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte aus Ohrbiopsien der 3 Wochen alten Mäuse. Hierfür wurde das DNeasy Kit der Firma Qiagen verwendet. Im ersten Schritt der Isolierung wurden die Biopsien mit 180 µl vorgewärmten ATL Puffer und 20 µl Proteinase K des DNeasy Kits für ca. 3 h bei 56°C und 1400 rpm im Thermoblock lysiert. Das Lysat wurde anschließend mit 200 µl vorgewärmter AL Puffer sowie 200 µl absoluten Ethanol versetzt und anschließend über Säulen des DNeasy-Kits (Quiagen) entsprechend der Herstellerangaben gereinigt. Die isolierte genomische DNA wurde bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

#### **3.6.2 Genotypisierung**

5 µl der genomischen DNA diente als Template in einem 25 µl Ansatz mit dem Go Taq Hot Start Green Mastermix (Promega). Zum Nachweis der Transgene *Pax8*, *Cre* und *Bpgm* wurden die Primer der Tabelle 8 verwendet. Anschließend erfolgte ein PCR Programm nachfolgendem Ablaufschema:

1. 3 min 95°C
2. 30 sec 95°C Schritt 2 bis 4 insgesamt 32 Zyklen
3. 30 sec 62°C
4. 30 sec 72°C
5. 5 min 72°C
8. 4°C ∞

Die PCR Produkte sowie ein 100 bp Marker (äquimolar) (Roth) wurden in einem 1,5 %-igen Agarosegel zur Größenabschätzung separiert. Die Bilder wurden im Anschluss am Intas Chemostar Imager aufgenommen.

### 3.6.3 Isolation der Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Nierengewebe erfolgt mit Hilfe des RNA-STAT-60 Reagenz der Firma Tel-Test Inc. und wurde nach Anleitung der Firma durchgeführt.

Eine halbe Maus-Niere, welche nach Entnahme bei -80 °C lagerte, wurde zunächst mit Hilfe eines Mörsers und flüssigen Stickstoff zerrieben. Das entstandene Gewebepulver wurde dann in 1 ml 4°C kaltes RNA-STAT-60 überführt und für 15 Sekunden gevortext. Der Suspension wurden anschließend 200 µl Chloroform zugegeben und erneut für 15 Sekunden mit dem Vortexer gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe für 15 Minuten bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Überführung der oberen RNA-haltigen wässrigen Phase in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße. Die Präzipitation der Nukleinsäuren erfolgte durch die Zugabe von 600 µl Isopropanol. Nach erneutem Mischen wurde die Suspension 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach 10 Minuten bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 200 µl 75 % Ethanol gewaschen und bei 7500 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Lufttrocknung der Pellets für ca. 3 Minuten und das Lösen in 50 µl DEPC- A. *bidest*. Die Konzentration der RNA wurde spektralphotometrisch mit dem NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Der Quotient der Absorptionswerte bei 260 nm zu 280 nm diente der Reinheitsbestimmung (sollte für RNA bei 2 liegen).

Die gewonnenen RNA wurde mit Hilfe eines 1 %-igen Agarosegels auf mögliche Degradation überprüft. Hierfür wurde 1 µg RNA mit 8 µl nukleasefreiem Wasser versetzt und 2 µl 6x OrangeG-Ladepuffer hinzugegeben. Der Gesamte Ansatz wurde anschließend auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen und für 1 Stunde bei 100 V aufgetrennt.

### 3.6.4 cDNA Synthese/Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde der cDNA Reverse Transkriptions Kit der Firma Applied Biosystems<sup>TM</sup> verwendet. Für die Synthese wurden pro Ansatz 1 µg RNA auf 13,2 µl nuklease freiem Wasser, 2 µl RT-Puffer, 0,8 µl 20x dNTP, 2 µl 10x Random Primers, 1 µl RNase-Inhibitor sowie 1 µl RTase pipettiert. Die Reverse Transkription erfolgte im PCR-Cycler bei 37 °C für 2 h und wurde durch eine 5-minütige Inkubation bei 85 °C gestoppt. Die Ansätze wurden anschließend mit nuklease freiem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht.

### 3.6.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von cDNA und deren gleichzeitigen fluoreszenzbasierten Quantifizierung zur Bestimmung des Genexpressionsniveaus spezifischer Gene.

Die Quantifizierung der cDNA bei der qPCR erfolgt am Ende des Elongationsschrittes jedes Amplifikationszyklus mithilfe eines Fluoreszenzsignals. In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe eines fertigen SYBR Green Master Mixes gearbeitet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green erkennt jede Art von doppelsträngiger DNA. Während der Amplifikationsphase wird mit Hilfe spezifischer Primer ein Sequenzabschnitt des zu untersuchenden Gens vervielfältigt (amplifiziert). Da das exponentiell amplifizierte Amplikon doppelsträngig ist, verstärkt sich das SYBR Green basierte Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration des Templates im cDNA Gemisch.

Für die qPCR wurden die Reaktionsansätze in eine 96-Well-Platte pipettiert, wobei jeder Ansatz aus 1 µl cDNA-Probe (10 ng), 5,5 µl SYBR Green Master Mix, 0,5 µl der 100 µM verdünnten Vorwärts- und Rückwärtsprimer und 4 µl nuklease freies Wasser bestand. Die qPCR wurde mit dem CFX Connect Cycler durchgeführt (Tabelle 12). Als Qualitätskontrolle endete jeder Lauf mit einer Schmelzkurve.

**Tabelle 12: PCR-Programm für die qPCR mit dem CFM Connect Cycler.**

	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Anzahl der Zyklen
<b>Holding Stage</b>	95	10:00	1
<b>Amplifikation</b>	95	00:20	40
	60	00:40	
<b>Schmelzkurve</b>	95	00:10	1
	65 bis 95	00:05	

## **3.7 Arbeiten mit Proteinen**

### **3.7.1 Proteinpräparation**

Für die Proteinisolation wurde eine halbe Mausniere in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puder zerrieben, welches in 400 µl Lysispuffer aufgenommen wurde. Das Lysat wurde im Anschluss für 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Die Proteinmengenkonzentration wurde mittels Nanodrop bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm bestimmt.

### **3.7.2 SDS-PAGE**

Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zunächst wurden 100 µg Protein mit 0,2 µl einer 0,5 % Bromphenolblau-Lösung gemischt und mit *A. bidest* auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Bevor die Proteine auf das Gel beladen wurden, wurden diese für 2 Minuten bei 95 °C gekocht. Das gekochte Proteingemisch wurde im Anschluss auf ein 10 %-iges Polyacryamidgel (bestehend aus einem Sammel- und Trenngel) aufgetragen. Zur ungefähren Abschätzung des Molekulargewichts wurden ein Größenstandard (*Precision Plus molecular weight marker*) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte etwa für 15 Minuten bei 80 V und anschließend für ca. 60 Minuten bei 100 V in 1x Laemmli-Puffer.

### **3.7.3 Western Blot**

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE erfolgte die Übertragung der Proteine aufgrund ihrer hydrophoben und polaren Eigenschaften auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran mittels Tank-Blot-Verfahren. Im Detail wurde hierfür zunächst die PVDF Membran in Methanol äquilibriert und anschließend in Blottingpuffer überführt. Das Äquilibrieren der Membran wird benötigt, um die hydrophoben Eigenschaften der Membran zu reduzieren, damit der Blottingpuffer in Kontakt mit der Membran gelangen kann. Die Gele wurden im nächsten Schritt aus der Elektrophorese entnommen und der Blot nach folgendem Schema aufgebaut:

1 Schwamm  
1 Blottingpapier  
1 Gel  
1 Membran  
1 Blottingpapier  
1 Schwamm

Der Transfer erfolgte in eiskaltem Blottingpuffer unter Rühren auf einem Magnetrührer für 1 h bei 100 V. Im Anschluss wurde die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in 5 % BSA in 1x TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Membran wurde über Nacht bei 4 °C zum Nachweis spezifischer Proteine mit einem Primärantikörper auf einem Taumelschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBS-T für jeweils 5 Minuten, erfolgte die einstündige Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur. Anschließend wurde erneut die Membran dreimal für 5 Minuten in 1x TBS-T gewaschen. Die Membran wurde nun für 5 Minuten mit dem Western Bright Sirius Substat unter Lichtausschluss inkubiert. Die durch die Peroxidase-Aktivität entstehende Chemilumineszenz wurde mit dem Intas Chemostar Imager detektiert.

Für weitere Proteinnachweise (insbesondere Referenzproteine wie Tubulin oder Aktin) wurde nach Detektion die Membran für 2 Minuten mit 1x TBS-T und 5 Minuten mit *A. bidest* gewaschen. Zur Entfernung der bereits gebundenen Antikörper wurde die Membran in 0,2 M Natronlauge für 5 - 10 Minuten gespült. Nach erneutem Waschen für 5 Minuten mit *A. bidest* wurden die Membranen in 5 % BSA in 1x TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Im Anschluss erfolgte erneut eine Primär- und Sekundärantikörper Inkubation sowie die Proteindetektion, wie bereits beschrieben.

### **3.7.4 Proteomische Analyse**

Die Proben Präparation mit anschließender proteomische Analyse wurde durch die Core Facility-High-Throughput Mass Spectrometry, Charité -Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

#### **3.7.4.1 Proben Präparation**

Für die proteomische Analyse wurde ein  $\frac{1}{4}$  der Niere entnommen und in 70  $\mu$ l Lysis-Puffer überführt. Durch fokussierte Ultraschall-Behandlung in einem Covaris LE220Rsc in AFA-TUBE

TPX Stripes (PIP 350 W, DF 25%, CPB 200, 2 Wiederholungen, 300 Sekunden Pulse, 20 °C) wurden das Nierengewebe lysiert. Nach der Lyse wurden die Proben von Rückständen durch Zentrifugation mit 3000 x g für 5 Minuten befreit und die Protein-Menge mittels Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit bestimmt. Je 25 µg der Gewebe-Extrakte wurden für die SP3 Protein Präparation an einer Biomek i7 Arbeitsstation mit Einzel-Schritt Reduktion und Alkylierung verwendet (Müller *et al.*, 2020). Zunächst wurden hierfür 16,6 µl Reduktions und Alkylierungs Puffer zu den Proben hinzugegeben und für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, mit anschließendem Abkühlen auf Raumtemperatur innerhalb von 5 Minuten. Im nächsten Schritt wurden die Proteine durch Zugabe von 50 % Acetonitril an 500 µg paramagnetische Beads (1:1 hydrophile/hydrophobe Beads) gebunden. Nach 18 Minuten Schütteln bei 3500 rpm wurden die Proben zweimalig mit 80 % Ethanol und einmalig mit 100 % Acetonitrilgewaschen. Mit Hilfe von 35 µl einer 100 mM ABC Lösung wurden die Proteine im Anschluss rekonstruiert. Die Proteine wurden über Nacht bei 37 °C und 0,05 µg/µl Trypsin (Verhältnis 50:1 Protein:Enzym) proteolytisch gespalten und anschließend die Proteolyse mit 0,1 % Methansäure gestoppt. Die damit erstellten Peptide wurden bis zur Analyse mittels LC-MS/MS bei -80 °C gelagert.

#### **3.7.4.2 Proteomische Analyse mittels DIA LC-MS und DIA-NN**

Die Proteine aus dem Nierengewebe wurden mit Hilfe der Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung identifiziert und quantifiziert. Im ersten Schritt der proteomischen Analyse wurden die gereinigten Peptide (siehe 3.7.4.1.) durch Flüssigchromatographie separiert. Dies erfolgte mit Hilfe eines Wasser/Acetonitril Gradienten in dem Flüssigchromatographiesystem Ultimate 3000 RSLnanoHPLC welches gekoppelt an ein Q-Exactive Plus Massenspektrometer im datenunabhängigen Erfassungsmodus (DIA) war. Dabei wurden zur Aufkonzentrierung der Peptide jeweils 1,25 µg der trypsinisierten Peptide für 3 Minuten in einer Trap-Säule (PepMap C18, 5 mm x 300 µm x 5 µm, 100Å) angereichert. Dies erfolgte unter der Verwendung eines Acetonitril/Wasser Puffers und einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 µl/Minute. Danach wurden die Peptide mit einer 250 mm analytischen LC Säule (PepMap C18, 2 µm; 100 Å; 75µm) in einem linearen Gradienten von 3-45 % Puffer B innerhalb von 90 Minuten bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 300 nl/min (Puffer A und Puffer B) separiert. Die Massenspektrometrische Analyse erfolgte mittels Orbitrap im Schwerpunktmodus mit 24 m/z Isolationsfenstern (bei einer Auflösung von 17.500, AGC-Ziel 1e6, maximale Injektionszeit 60 ms und 27 NCE). Die Massenliste umfasste 51 Einträge. Vorläufige MS-Spektren (m/z 400–1000) wurden mit einer Auflösung von 35.000 nach 60 ms Akkumulation von Ionen auf einen Zielwert

von 1e6 analysiert. Die Ionenquelleneinstellungen waren wie folgt: Sprühspannung 1,9 kV; erhitzte Kapillartemperatur 275°C. Zusätzlich fungierten die Hintergrundionen m/z 445.1200 als Sperrmasse. Die Rohdaten wurden unter Verwendung von DIA-NN 1.8<sup>102</sup> verarbeitet, wobei die Scanfenstergröße auf 11 eingestellt war und die MS2- und MS1-Massengenauigkeiten auf 20 bzw. 10 ppm eingestellt wurden. Für die Annotation wurden ein spektralbibliotheksfreier Ansatz und Maus-UniProt (UP000000589, Reviewed, Canonical, heruntergeladen 20210127)<sup>103</sup> verwendet. DIA-NN verwendete einen Filter von 1 % Falscherkennungsrate auf Peptidebene. Dabei ergaben sich die differentiell exprimierten Proteine. Die proteomischen Daten wurden in der Proteomics IDentification Database (PRIDE)<sup>104</sup> unter dem Projektzugang PXD040789 hinterlegt und sind zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der zu dieser Dissertation gehörenden wissenschaftlichen Veröffentlichung öffentlich verfügbar.

### **3.7.4.3 Statistische Auswertung der Proteomischen Daten**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch Dr. Robert Labes. Für die Genset Anreicherungsanalyse (englisch „*Gene Set Enrichment Analysis*“, GSEA) wurde das SetRank Paket<sup>97</sup> von Program R verwendet. Die Analyse wurde durchgeführt nach Angaben der Entwickler mit Hilfe der *Hallmark* Annotierungstabellen von MSigDB.<sup>96</sup> Alle kartierten Proteine wurden als Hintergrund Set verwendet. Für die Bildung der Set Kollektion wurde eine maximale Set Größe von 500 verwendet. Die SetRank Analyse wurde mit Reihen und einer FDR-Grenze von 0,01 durchgeführt. Die Visualisierung der Daten erfolgte in einem Bubble Plot unter der Verwendung des GPlot<sup>94</sup> Pakets für R.

## **3.8 Einzelzellsequenzierungsdaten**

Transkriptomische Daten auf Einzel-Zellebene (englisch „*Single cell transcriptomic data*“) aus humanen Biopsien wurden, wie in Hinze *et al.* Beschrieben, erhoben.<sup>105</sup> Die Daten können unter <https://shiny.mdc-berlin.de/humAKI/> eingesehen werden. Ungefilterte Cell-Ranger-Ausgabedateien aller Proben wurden bei NCBI GEO unter der Zugangsnummer GSE210622 hinterlegt.

### 3.9 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Zur statistischen Auswertung der Daten sowie deren graphische Darstellung wurde das Programm GraphPad Prism (Version 8) für Windows verwendet. Von den Mittelwerten der einzelnen Messdaten wurden Standardabweichungen sowie Signifikanzen bestimmt. Die Identifikation von Ausreißern wurde mit Hilfe der ROUT Methode ( $Q = 5\%$ ) durchgeführt.<sup>106</sup> Die Normalverteilung wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Test analysiert. Um statistische Signifikanzen zwischen 2 Gruppen darzustellen, bei denen gleiche Standardabweichungen (Standardabweichungsdifferenz von  $< 2$ ) angenommen wurden, wurde ein Student's t-Test (Normalverteilung) oder ein Mann-Whitney Test (keine Normalverteilung) durchgeführt. Lag die Standardabweichungsdifferenz bei  $> 2$ , wurde entweder ein Student's t-Test mit Welch Korrektur (Normalverteilung) oder ein Kolmogorov-Smirnov Test (keine Normalverteilung) verwendet.

Bei mehr als 2 Gruppen wurde im Rahmen einer Varianzanalyse ein Kruskal-Wallis Test mit einem Dunn-Bonferroni-Test durchgeführt. Bei den Analysen galt ein Unterschied  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) und  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*) als statistisch signifikant.

Die graphische Darstellung erfolgte als Boxplot mit Median, unteres und oberes Quartil sowie minimaler und maximaler Wertebereich. Punkte repräsentieren dabei die Werte einzelner Tiere.

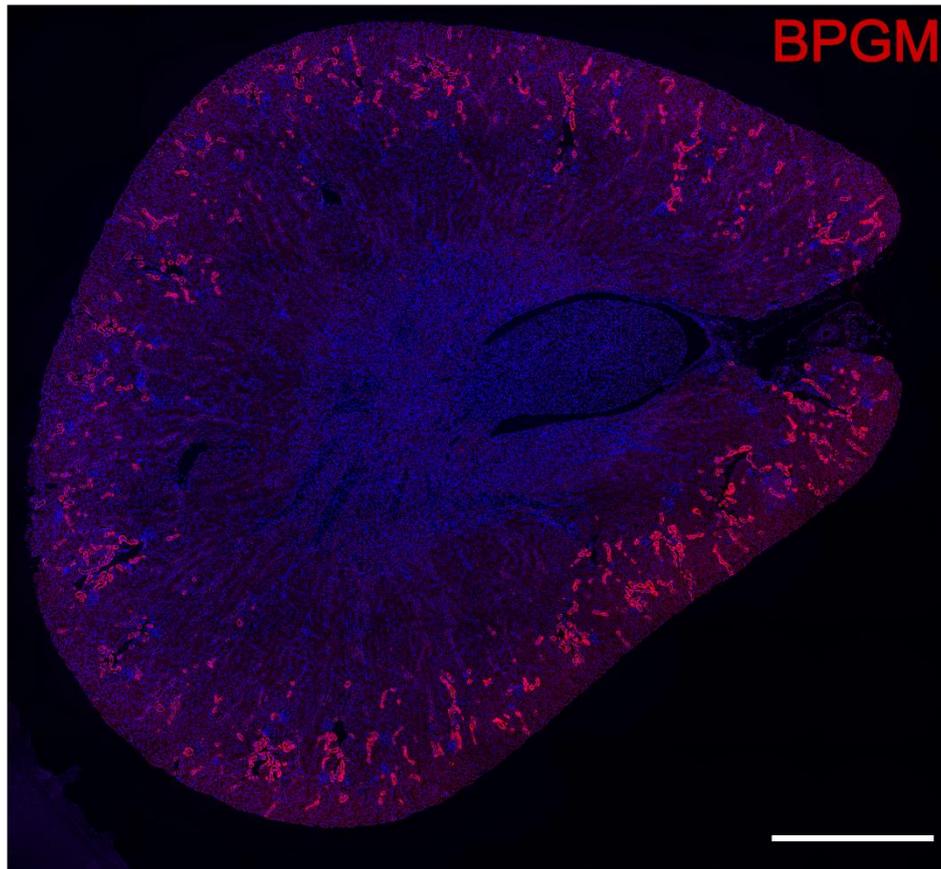
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Das Vorkommen von BPGM in murinen und humanen Nieren**

In einem Rhabdomyolyse-induziertem ANV Mausmodell (Fähling *et al.*<sup>53</sup>) wurde in transkriptomischen Untersuchungen eine *Bpgm* Expression in der gesunden Mausniere festgestellt, welche sich unter dem ANV verstärkte. Unabhängig von dieser Promotionsarbeit wurde die Beobachtung bereits auf mRNA- (qPCR) und Proteinebene (Western Blotting) bestätigt. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die renale Expression von BPGM näher charakterisiert werden. Hierfür wurden Analysen im gesunden Nierengewebe der Maus und in humanen *post mortem* ANV Biopsien durchgeführt.

#### **4.1.1 Lokalisation der BPGM Expression in der Maus-Niere**

Für die Charakterisierung der renalen BPGM Expression wurden Immunfluoreszenzfärbungen unter der Verwendung eines spezifischen anti-BPGM Antikörpers auf Gewebe einer gesunden Maus-Niere durchgeführt. Es zeigte sich, dass BPGM vorwiegend in Zellen des Tubulus-Systems im Cortex der Niere exprimiert wird (Abbildung 5).

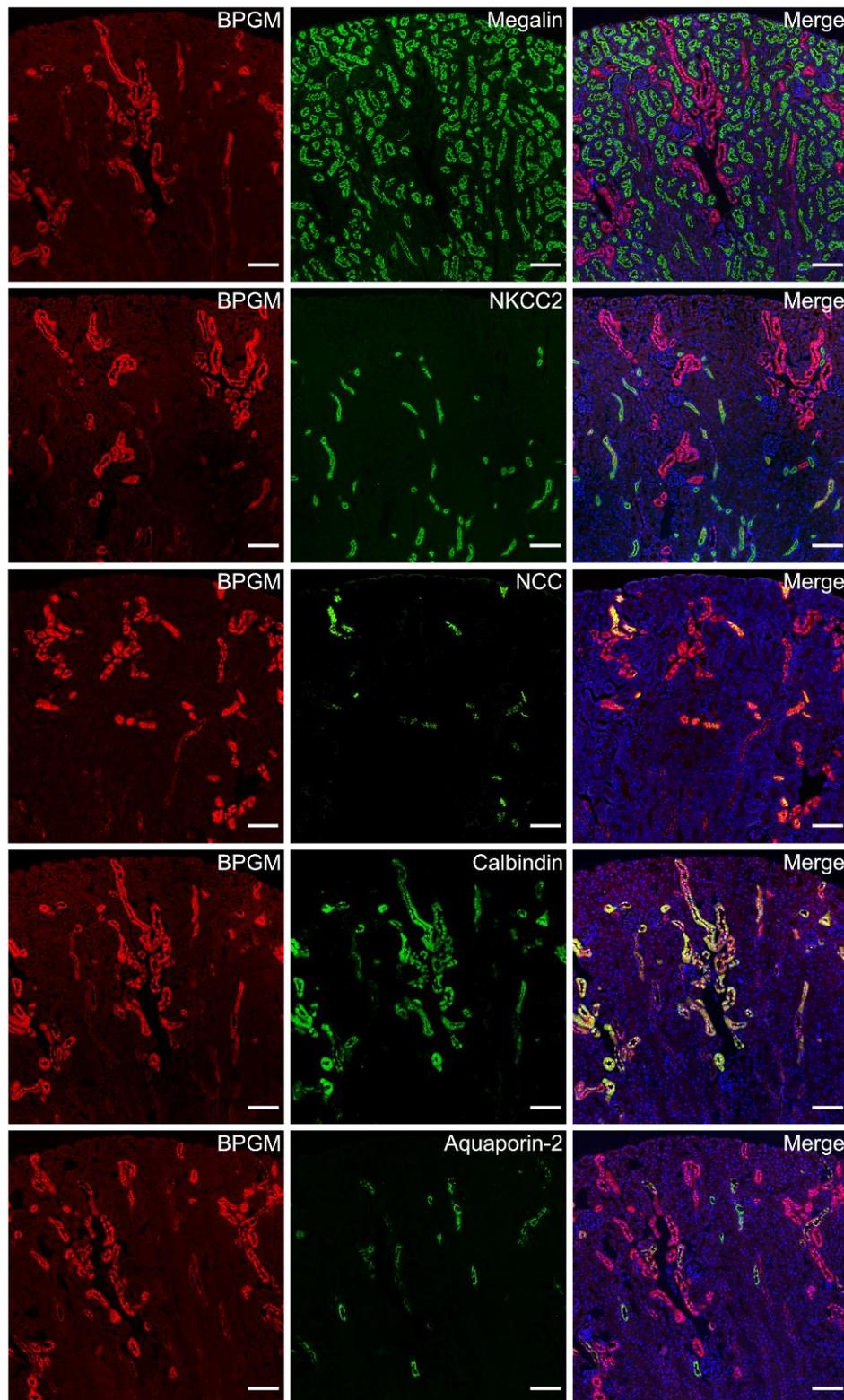


**Abbildung 5: Vorkommen von BPGM in der Maus-Niere.** Immunfluoreszenzfärbung von BPGM (rot) im Nierenquerschnitt der Maus. Die renale BPGM ist vorwiegend im Cortex der Mausniere zu finden. Im medullären Bereich zeigt sich im Gegensatz dazu nur eine geringe BPGM Färbung. Der Maßstabsbalken entspricht 1000  $\mu\text{m}$ .

Mit Hilfe von spezifischen Markern gegen die einzelnen Tubulussegmente wurde im Detail die Lokalisation von BPGM dargestellt (Abbildung 6). Hierfür wurden für den PT Megalin<sup>107</sup>, für den TAL der Na-K-2Cl-Cotransporter (NKCC2)<sup>108</sup>, für den DCT der NaCl-Cotransporter (NCC)<sup>109</sup>, für den DCT und CNT Calbindin<sup>110</sup> sowie Aquaporin-2 für das Sammelrohr<sup>26</sup> als spezifische Marker verwendet.

Im proximalen Teil des Tubulussystems konnte kein BPGM Signal detektiert werden. Dieses zeigte sich durch eine fehlende Ko-Lokalisation von BPGM mit dem Bürstensaum-Marker Megalin. Im Gegensatz dazu zeigte BPGM eine Ko-Expression mit dem NKCC2 des TALs sowie dem NCC des DCT. Weiterhin zeigte sich eine Expression von BPGM in den Calbindin positiven DCT und CNT Zellen. Auch konnte eine Expression im Sammelrohr der Niere durch die Ko-Expression von BPGM mit Aquaporin-2 gezeigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Daten ein bislang nicht beschriebenes Vorkommen von BPGM im distalen Nephron.



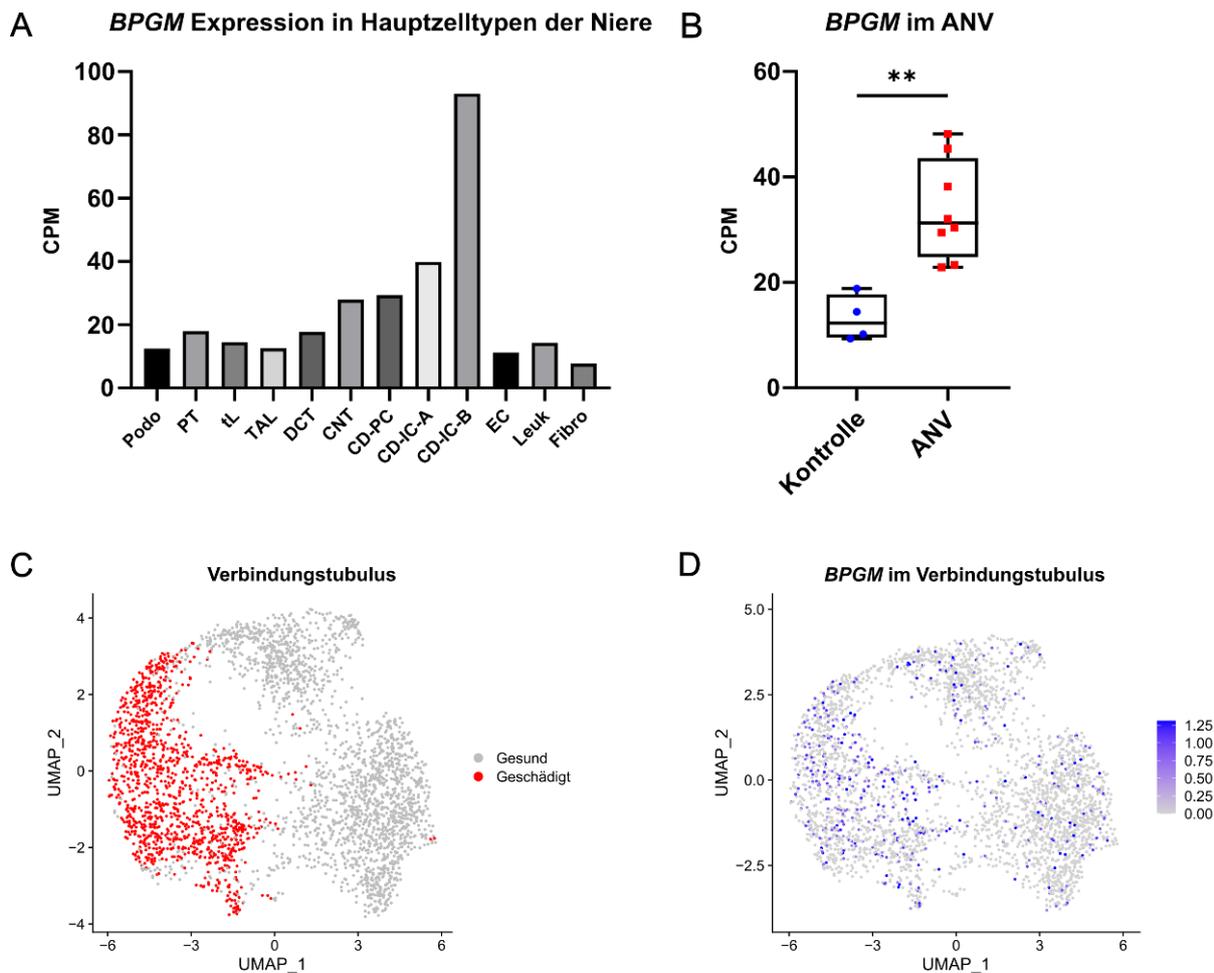
**Abbildung 6: Lokalisation der BPGM Expression in renalen Tubuluszellen.** Immunfluoreszenzfärbung von BPGM (rot) und verschiedenen Tubulusabschnitts-Markern (grün) im Nierengewebe der Maus. Von oben nach unten: Megalin (proximaler Tubulus), NKCC2 (dicker aufsteigende Ast der Henle-Schleife), NCC (distaler Tubulus), Calbindin (distaler Tubulus und Verbindungstubulus) und Aquaporin-2 (Verbindungstubulus und Sammelrohr). Eine Lokalisation von BPGM zeigte sich in wenigen Bereichen der Henle-Schleife sowie des Sammelrohrs. Besonders ausgeprägt war die Expression von BPGM in Bereichen des distalen Tubulussegments. Es konnte kein BPGM Nachweis im proximalen Tubulus erbracht werden. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2 Verstärkte Expression von *BPGM* in humanen Nieren im akuten Nierenversagen

In Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. K. Schmidt-Ott und Prof. Dr. K.-U. Eckardt der Medizinischen Klinik m. S. Nephrologie und Internistische Intensivmedizin (CCM) der Charité, wurden Einzel-Zell RNA Sequenzierungs-Daten (englisch „*Single Cell Sequencing*“) von 8 Patienten mit und 4 Patienten ohne ANV hinsichtlich ihrer *BPGM* Expression analysiert und statistisch ausgewertet (Abbildung 7). Die Daten stammten aus der Publikation von Hinze *et al.*<sup>105</sup> aus dem Jahr 2022 und wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht selbst erhoben. Die in der Publikation verwendeten Kontrollen stammen dabei aus tumorbenachbartem normalen Nierengewebe und aus *post mortem* Biopsien von Patienten ohne ANV. Die ANV Proben stammten aus *post mortem* Biopsien von Patienten in ANV Stadium 2 oder 3.

Zunächst konnte mit Hilfe der Daten gezeigt werden, dass die *BPGM* mRNA auch in der humanen Niere insbesondere im distalen Teil des Nephrons exprimiert wird. Besonders hohe *BPGM* Expressionswerte zeigten dabei der Verbindungstubulus sowie die interkalierten Zellen Typ B des Sammelrohrs (Abbildung 7 A). In ANV-Patienten zeigte sich im Vergleich zu Kontroll-Patienten, dass *BPGM* im Verbindungstubulus signifikant ( $p_{adj} = 0,0023$ ) erhöht exprimiert wird (Abbildung 7 B). Weiterhin konnte eine Anreicherung ( $p < 1e-20$ ) von *BPGM* in geschädigten Zellen beobachtet werden (Abbildung 7 C-D).

Zusammenfassend bestätigen die humanen Daten der Einzel-Zell RNA Sequenzierung eine Lokalisation der *BPGM* im distalen Nephron der Niere sowie eine verstärkte Expression im ANV. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte gezeigt werden, welche physiologische Rolle *BPGM* in der Niere hat.



**Abbildung 7: BPGM ist in renalen Tubulus-Zellen des Menschen exprimiert und wird im akuten Nierenversagen hochreguliert.** (A-D) Auswertung von Einzel-Zell RNA Sequenzierungs Daten<sup>105</sup> aus humanen Nierenbiopsien. (A) Expressionswerte der *BPGM* mRNA als Zählungen pro Millionen (CPM, englisch „counts per million“) in Podozyten (Podo), Proximalen Tubuli (PT), dünner Teil der Henle-Schleife (tL, englisch „thin limb of loop of Henle“), dicker aufsteigende Teil der Henle-Schleife (TAL, englisch „thick ascending limb“), Distaler Tubulus (DCT, englisch „distal convoluted tubule“), Verbindungstubulus (CNT, englisch „connecting tubule“), Sammelrohr Hauptzellen (CD-PC, englisch „collecting duct principal cells“) Sammelrohr interkalierte Zellen Typ A (CD-IC-A, englisch „collecting duct intercalated cells type A“) und Typ B (CD-IC-B, englisch „collecting duct intercalated cells type B“), Endothelzellen (EC, englisch „endothelial cells“), Leukozyten (Leuko) und Fibroblasten (Fibro). (B) Das Diagramm zeigt die statistische Analyse der *BPGM*-Expression im Verbindungstubulus von Kontrollproben (3 tumorbenachbarte normale Gewebeproben und eine *post mortem* Biopsie eines Nicht-ANV Patienten). Die ANV Proben stammen aus *post mortem* Biopsien von Patienten in ANV Stadium 2 oder 3. Für die statistische Analyse wurde ein Student’s t-Test verwendet.  $**p < 0,01$ . (C) UMAP (englisch „Uniform Manifold Approximation and Projection“) des Sub-Clustering für den Verbindungstubulus. Zellen von ANV-assoziierten potentiell geschädigten Verbindungstubulus-Clustern sind rot hervorgehoben. (D) Funktions Plot der *BPGM* Expression in Verbindungstubulus Zellen aus ANV- und Kontroll-Proben. Expressionswerte sind logarithmisch normalisiert. Die Anreicherungsanalyse zeigt, dass *BPGM* in geschädigten Zellen stark angereichert ist ( $p < 1e-20$ ).

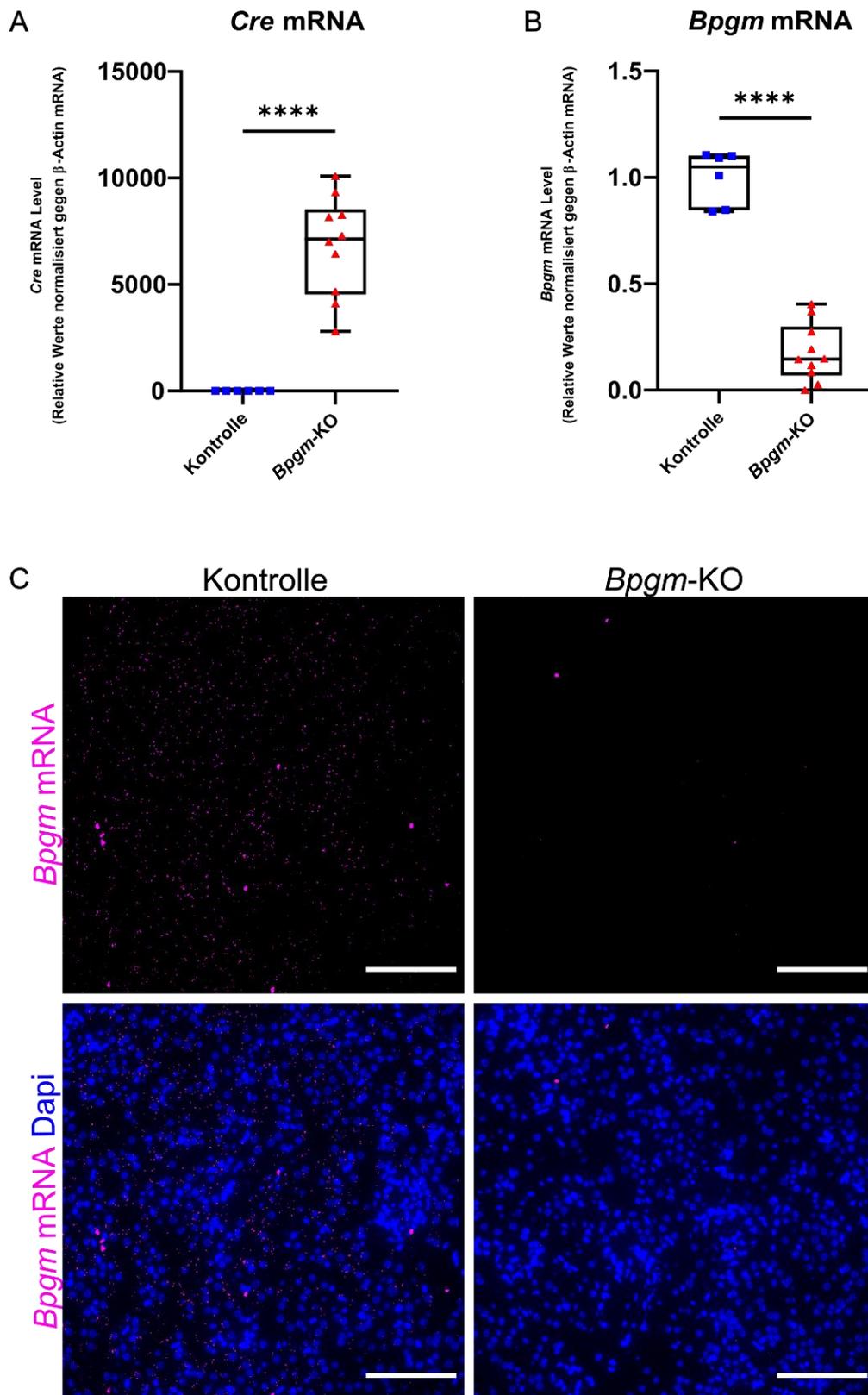
## 4.2 Generierung eines induzierbaren Nephron-spezifischen *Bpgm*-Knockout Modells

Zur Untersuchung der physiologischen Rolle von BPGM in der Niere, wurde ein Mausmodell generiert, bei dem es induzierbar zu einer nephronspezifischen Deletion von *Bpgm* kommt (siehe auch: Kapitel 3.1). Hierfür wurde das induzierbare Pax8 getriebene Cre-Rekombinase System verwendet, welches Doxyzyklin-abhängig *Bpgm* im gesamten Nephron vom proximalen Tubulus bis zum Sammelrohr deletiert (Pax8-rtTA/LC1/*Bpgm*<sup>flox/flox</sup>, Abgekürzt: *Bpgm*-KO). Als Kontrollen wurden im Versuch Mäuse verwendet, die nach Doxyzyklin-Gabe keine Cre-Rekombinase Erhöhung in der quantitativen PCR zeigten.

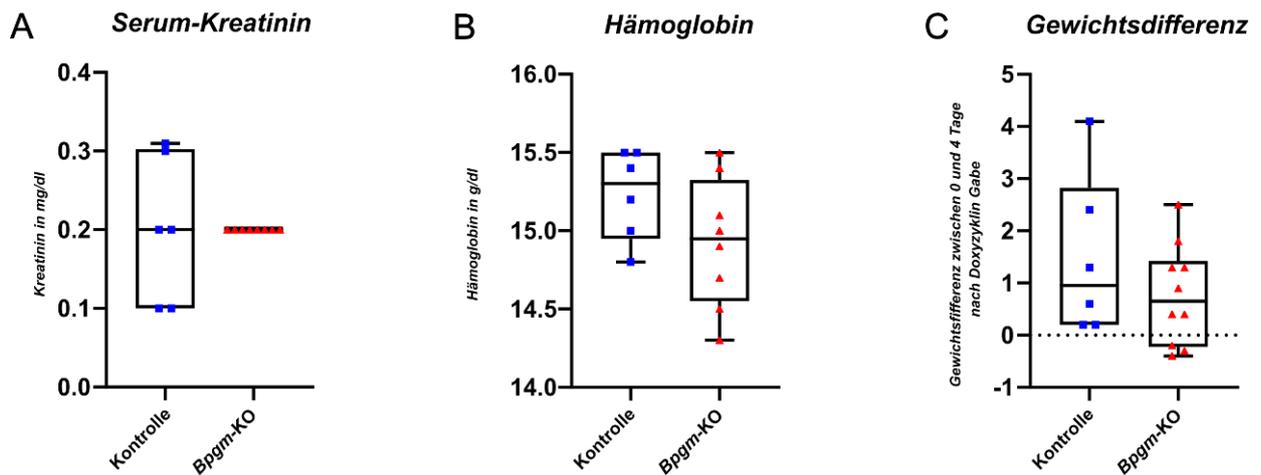
Im Versuchsablauf wurde den Tieren zunächst 1 mg pro 10 g Körpergewicht Doxyzyklin *i. p.* appliziert (Tag 0). Am Tag 4 erfolgten die Entnahme des Blutes und der Organe. Zur Verifizierung der *Bpgm* Deletion wurden zunächst qPCR Analysen gegen die Cre-Rekombinase und *Bpgm* durchgeführt. Bei den *Bpgm*-KO Mäusen zeigte sich durch die Doxyzyklin-Gabe eine signifikante Erhöhung der Cre (Abbildung 8 A) sowie eine signifikante Abnahme der *Bpgm* mRNA um > 80 % (Abbildung 8 B). Zur weiteren Bestätigung des *Bpgm*-KO wurde eine RNAscope™ Immunfluoreszenzfärbung auf Gewebeschnitten der Niere durchgeführt. Dabei bestätigte sich eine deutliche Verringerung der *Bpgm* mRNA Menge durch die Doxyzyklin-Injektion (Abbildung 8 C).

Der *Bpgm*-KO *per se* zeigte 4 Tage nach Induktion keine veränderte Nierenfunktion (Serum Kreatinin unverändert; Abbildung 9 A). Da durch den *Bpgm*-KO theoretisch auch eine Veränderung der zellulären Sauerstoffverfügbarkeit und damit ein Einfluss auf die Erythropoese ausgelöst werden könnte (unter der Hypothese, dass 2,3-BPG aus dem Nephron in die Erythrozyten gelangen könnte), wurde auch die Hämoglobinkonzentration bestimmt – welche jedoch unverändert blieb (Abbildung 9 B). Auch das Gewicht der Mäuse blieb unverändert, was auf einen unveränderten Allgemeinzustand hindeutet (Abbildung 9 C).

Zusammenfassend konnte damit im ersten Schritt der Arbeit ein induzierbares tubulus-spezifisches *Bpgm*-KO Modell für die funktionellen *in vivo* Untersuchungen generiert werden. Innerhalb von vier Tagen zeigte der nephronspezifische *Bpgm*-Knockout *per se* keine Veränderung der Nierenfunktion.



**Abbildung 8: *Bpgm* Knockout Verifikation.** mRNA Level der *Cre*-Rekombinase (A) und *Bpgm* (B) 4 Tage nach der Induktion des nephronspezifischen *Bpgm*-KOs. Es zeigte sich eine Hochregulation der *Cre* sowie eine Runterregulation der *Bpgm* mRNA in den induzierten *Bpgm*-KO Mäuse-Nieren. Als statistische Analyse wurde für die *Cre* mRNA ein Student's t-Test mit Welch-Korrektur und für die *Bpgm* mRNA ein Standard Student's t-Test verwendet. \*\*\*\* $p < 0,0001$  (C) RNAscope™ von *Bpgm* auf Nierengewebe in Kontrollen und *Bpgm*-KO 4 Tage nach Induktion. Im *Bpgm*-KO zeigt sich eine deutliche Abnahme der *Bpgm* mRNA in der Niere. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

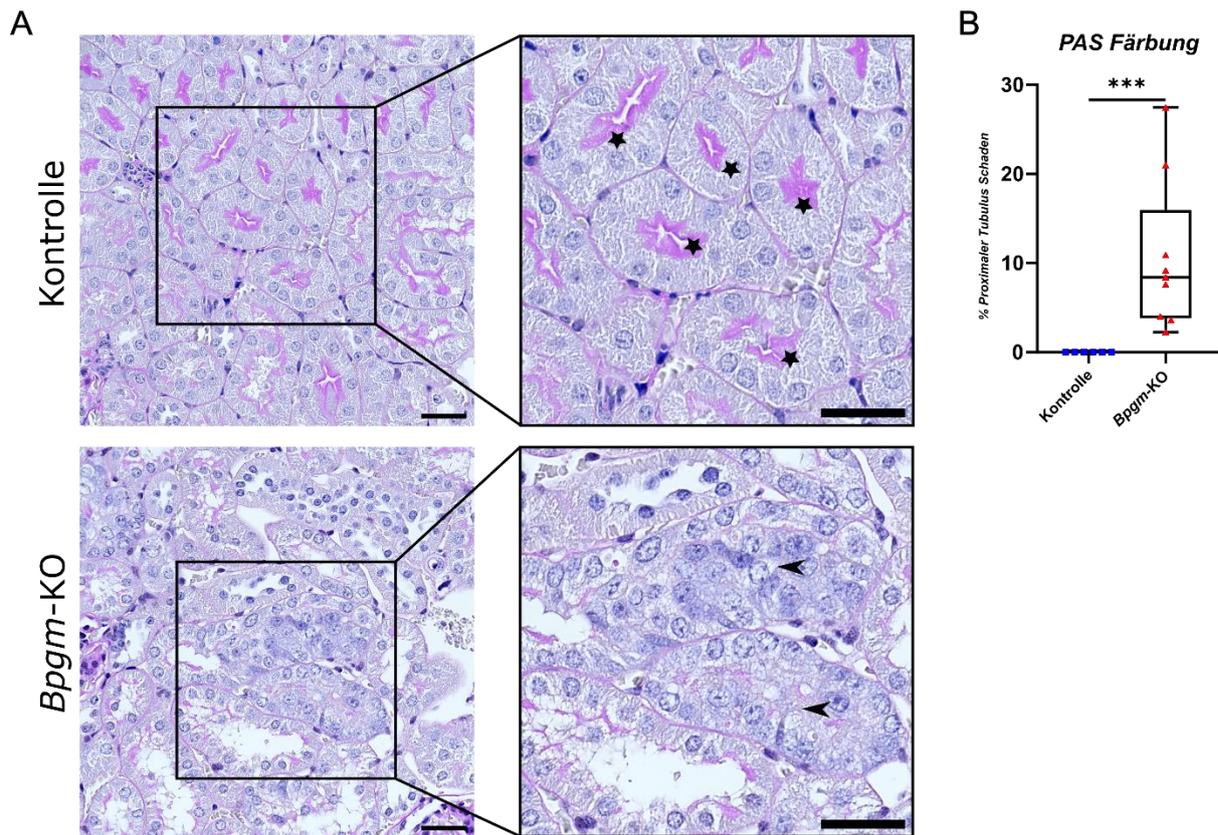


**Abbildung 9: Blut-Parameter und Gewichtsänderung im *Bpgm*-KO.** Es zeigte sich im *Bpgm*-KO keine Veränderungen im (A) Serum-Kreatinin, (B) Hämoglobin und im (C) Gewicht 4 Tage nach KO Induktion. Statistik: (A) Mann-Whitney Test; (B, C): Student's t-Test.

### 4.3 Ein *Bpgm* Defizit verursacht morphologische Veränderung der Niere

In der histologischen Analyse wurde die Periodic acid-Schiff (PAS) Färbung, zur Darstellung von Glykogen, Basalmembranen, Glycokonjugaten und der Gewearchitektur, verwendet.<sup>100</sup> Hierbei zeigte sich, dass es durch eine *Bpgm* Deletion in den Nieren zu morphologischen Veränderungen kommt. Die proximalen Tubuli zeigten deutliche Schadensmerkmale, wie den Verlust ihres Bürstensaums und ein verringertes tubuläres Lumen (Abbildung 10 A). Weiterhin zeigen die geschädigten Tubuli eine Mehrkernigkeit (Polyploidie). Diese morphologischen Veränderungen im *Bpgm*-KO wurden mit Hilfe einer semiquantitativen Zählung quantifiziert und zeigten eine signifikante Schädigung proximaler Tubulussegmente (Abbildung 10 B).

Diese Ergebnisse deuten auf eine beginnende Nierenschädigung 4 Tage nach Deletion von *Bpgm* in der Niere hin. Die Schädigungsmerkmale bezogen sich dabei ausschließlich auf den proximalen Tubulus. Es konnten keine Veränderungen an distalen Nephronsegmenten (Ort der BPGM Expression) festgestellt werden.



**Abbildung 10: Morphologische Veränderungen im proximalen Tubulus nach *Bpgm*-KO.** (A) PAS-Färbung einer Kontroll- und *Bpgm*-KO Niere 4 Tage nach Induktion. In der Färbung zeigen sich morphologische Veränderungen der proximalen Tubuli (Pfeilkopf) im Vergleich zu den gesunden proximalen Tubuli der Kontrolle (Stern). Die Tubuli verlieren den Bürstensaum und besitzen ein verringertes tubuläres Lumen. (B) Prozentualer Anteil veränderter proximaler Tubuli im Gesamt-Nierenquerschnitt. Durch einen 4-tägigen *Bpgm*-KO kommt es zu einer signifikanten Erhöhung von Tubulus-Schäden in der Niere im Vergleich zu Kontroll-Nieren. Als statistische Analyse wurde für die PAS-Färbung ein Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. \*\*\* $p < 0,001$ . Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

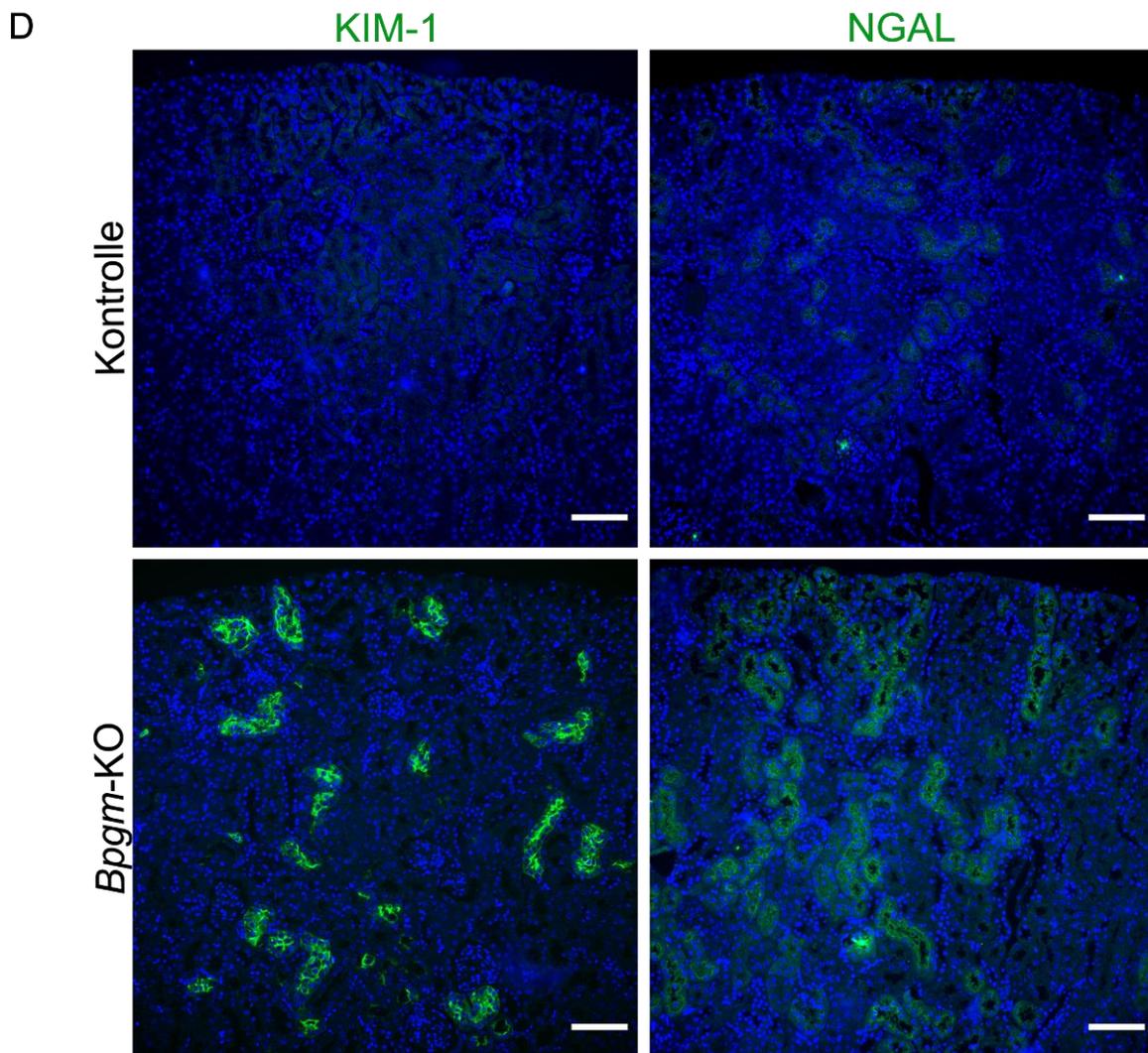
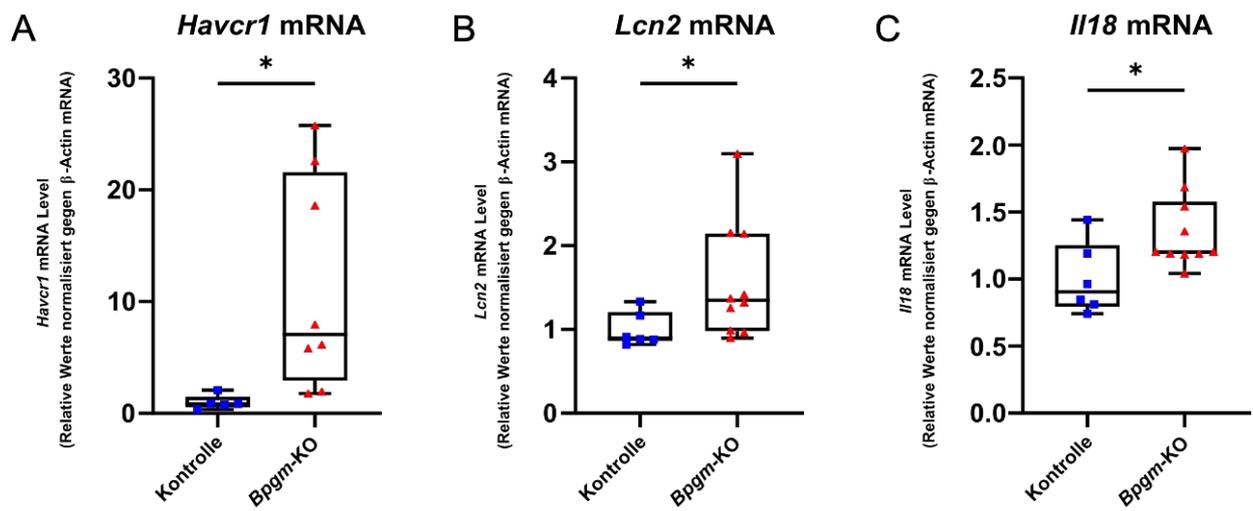
#### 4.3.1 Ein *Bpgm* Knockout verursacht Schäden im proximalen Tubulus

Mit Hilfe der molekularen (frühen) Nierenschädigungsmarker KIM-1 (englisch „*Kidney Injury Molecule-1*“), NGAL (englisch „*Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin*“) und Interleukin-18 (*Il18*) wurde der beginnende tubuläre Schaden näher charakterisiert. KIM-1 ist ein Typ 1 Transmembranprotein, welches in verschiedenen Nieren-Schädigungsmodellen im proximalen Tubulus der Niere hochreguliert wird, wodurch es als Schädigungsmarker für Nierengewebe und Urin an Bedeutung gewann.<sup>111,112</sup> NGAL ist ein Protein der Lipocalin Superfamilie, welches als Siderophor als auch in der Nierenentwicklung und der tubulären Regeneration eine Rolle spielt.<sup>113</sup> In Folge einer akuten Nierenschädigung zeigt NGAL im Tubulus sowie im Urin ein erhöhtes Vorkommen, wodurch es wie KIM-1 als früher Schädigungsmarker im ANV eine Rolle spielt.<sup>113</sup> Il18 ist ein Zytokin, welches Monozyten, Makrophagen und PT-Zellen im ANV verstärkt

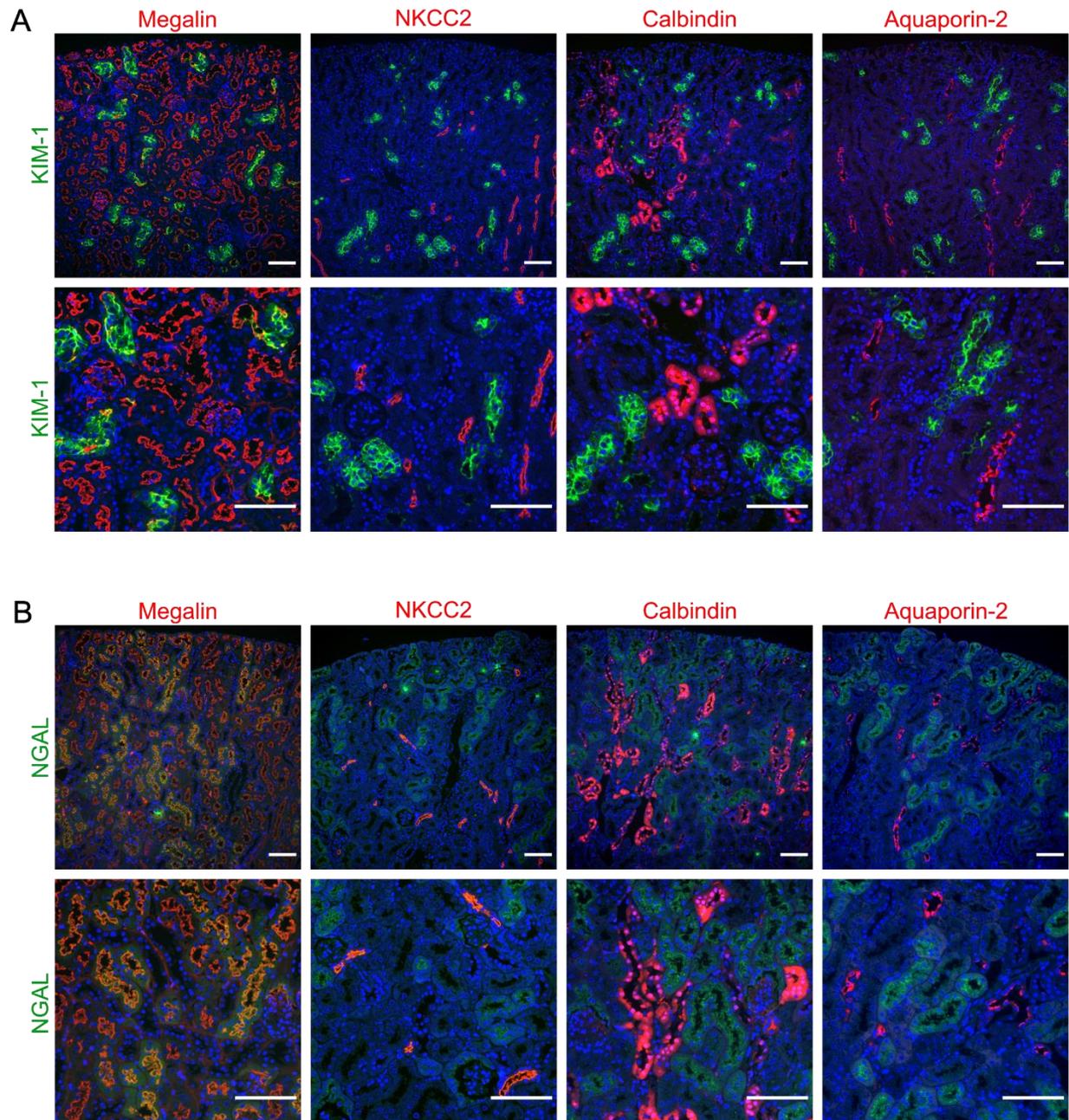
exprimieren, wodurch sein Vorkommen im Urin einen früheren Nierenschädigungsmarker als Serum-Kreatinin darstellt.<sup>114,115</sup>

In den Abbildungen 11 A, B und C sind qPCR Analysen von *Havcr1* (KIM-1) sowie *Lcn2* (NGAL) und *Il18* gezeigt. Alle untersuchten frühen Nierenschädigungsmarker werden signifikant durch den *Bpgm*-KO erhöht. Diese Ergebnisse konnten auch in der Immunfluoreszenzfärbung von KIM-1 und NGAL bestätigt werden (Abbildung 11 D).

Um die Lokalisation des Nierenschadens näher zu charakterisieren, wurden Co-Lokalisationsstudien von KIM-1 und NGAL mit Tubulussegmentmarkern durchgeführt (vgl. 4.1.1). Dabei zeigte sich, dass KIM-1 ausschließlich im proximalen Tubulus lokalisiert war (Abbildung 12 A). NGAL repräsentiert einen Schädigungsmarker, der im gesamten Nephron exprimiert werden kann.<sup>111</sup> Im *Bpgm*-KO konnte jedoch nur im proximalen Tubulus eine Anreicherung von NGAL gezeigt werden (Abbildung 12 B). Zusammenfassend bestätigen die Immunofluoreszenz-Studien eine Schädigung proximaler Tubulusabschnitte 4 Tage nach *Bpgm*-KO.



**Abbildung 11: Ein *Bpgm*-KO führt zu einer Erhöhung der Schadensmarker KIM-1 und NGAL.** Quantitative PCR Analyse der Nierenschädigungsmarker *Havcr1* (*Kim-1*) (A), *Lcn2* (*Ngal*) (B) und *Il18* (C) im *Bpgm*-KO. Alle gezeigten Schädigungsmarker zeigen eine signifikante Erhöhung 4 Tage nach *Bpgm*-KO. Für die statistische Analyse wurde für *Havcr1* ein Kolmogorov-Smirnov Test und für *Lcn2* und *Il18* ein Mann-Whitney Test verwendet. \* $p < 0,05$ . (D) Immunfluoreszenzfärbung von KIM-1 und NGAL in Kontroll- sowie *Bpgm*-KO Mäusen. Nach *Bpgm*-KO zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Nierenschadensmarker KIM-1 und NGAL im Nierengewebe der Maus. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 12: Lokalisation der KIM-1 und NGAL Expression im Tubulussystem der *Bpgm*-KO Maus.** (A) Immunfluoreszenzfärbung von KIM-1 (grün) mit den Tubulussegmentmarkern Megalin, NKCC2, Calbindin und Aquaporin-2 (rot). Der Schadensmarker KIM-1 zeigt nur eine Lokalisation im proximalen Tubulus (Megalin). (B) Immunfluoreszenzfärbung von NGAL (grün) mit den Tubulussegmentmarkern Megalin, NKCC2, Calbindin und Aquaporin-2 (rot). Der Schadensmarker NGAL zeigt nur eine Lokalisation im proximalen Tubulus (Megalin). Der beobachtete Schaden nach 4 Tagen im *Bpgm*-KO findet nur im proximalen Tubulussegment statt. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

## 4.4 Auswirkung des *Bpgm* Defizits auf die Physiologie der Niere

### 4.4.1 Das Nieren-Proteom nach *Bpgm* Deletion

Zur Untersuchung der veränderten Genexpression nach *Bpgm*-KO, wurden proteomische Analysen mit anschließender Charakterisierung beeinflusster Signalwege durchgeführt. Die Proteomanalyse wurde dabei von der Core Facility-High-Throughput Mass Spectrometry, Charité - Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die anschließende Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe einer von Dr. Robert Labes vorgefertigten Matritze im Programm R.

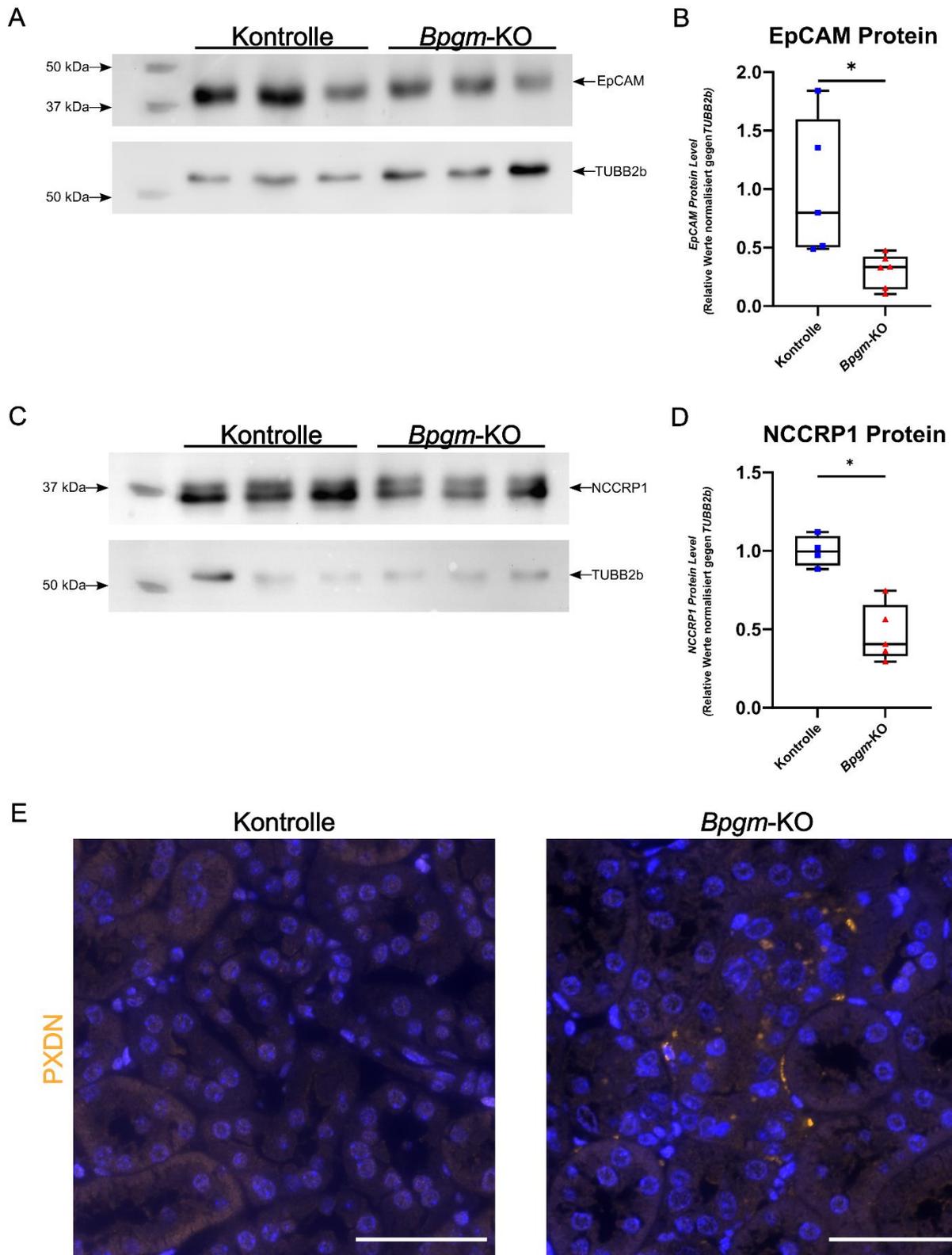
Insgesamt wurden im Vergleich *Bpgm*-KO vs. Kontrolle 241 einzelne Proteine signifikant reguliert. Davon wurden 136 Proteine verstärkt und 104 schwächer exprimiert. Auf der Basis des angepassten *p*-Wertes ( $p_{adj}$ ), wurden die Top 20 der im *Bpgm*-KO stärker und schwächer regulierten Proteine in den Tabellen 13 und 14 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass sich unter den signifikant hochregulierten Proteinen insbesondere Proteine des Lipid-Stoffwechsels (*Hsd17b11*, *Phyh*, *Rnf213*) und der Proteinbiosynthese (*Rars1*, *Ncln*, *Rpl17*) befinden (Tabelle 13). Weiterhin zeigten das glykolytische Enzym Triosephosphat Isomerase 1 (*Tpi1*) sowie die Ubiquitin Carboxyl-terminale Hydroxylase 15 (USP15) eine Hochregulation nach *Bpgm*-Deletion. Bei der Analyse der vermindert exprimierten Proteine im *Bpgm*-KO zeigten sich (ähnlich wie bei der Hochregulation) Proteine des Fettsäurestoffwechsels (*Cyp4a10*, *Cyp2d26*) (Tabelle 14). Mehrere der herunterregulierten Proteine konnten biologischen Signalwegen wie Zellproliferation, Zellwachstum (*Gspt1*, *Pds5a*, *Nccrp1*) und Zelladhäsion (*Epcam*, *Lama1*) zugeordnet werden. Zur Verifizierung der proteomischen Analyse wurden die Kandidatengene EpCAM (englisch „*epithelial cell adhesion molecule*“) und NCCRP1 (englisch „*nonspecific cytotoxic cell receptor protein 1*“) im Western Blot sowie PXDN (Peroxidasin) in der Immunfluoreszenz untersucht. Hier zeigte sich, bestätigend zu der Proteomanalyse, eine signifikante Herabregulation von EpCAM und NCCRP1 sowie eine Hochregulation von PXDN im Nierengewebe der *Bpgm*-KO Maus (Abbildung 13).

**Tabelle 13: Top 20 der hochregulierten Proteine nach 4 Tagen im *Bpgm*-KO.**

Uniprot-ID	Gen	Name (englisch)	Log <sub>2</sub> Expressionsverhältnis	angepasste p-Werte	Funktion
<b>Q8C0D5</b>	<i>Efl1</i>	Elongation factor-like GTPase 1	2,16	7,21E-10	Proteinbiosynthese
<b>Q64462</b>	<i>Cyp4b1</i>	Cytochrome P450 4B1	3,74	3,22E-09	Biphenyl-Metabolismus
<b>Q569Z6</b>	<i>Thrap3</i>	Thyroid hormone receptor-associated protein 3	2,06	1,50E-08	Transkription
<b>Q9EQ06</b>	<i>Hsd17b11</i>	Estradiol 17-beta-dehydrogenase 11	2,62	2,19E-07	Lipid Metabolismus, Steroid Biosynthese
<b>Q9D019</b>	<i>Rars1</i>	Arginine--tRNA ligase, cytoplasmic	2,20	4,16E-07	Proteinbiosynthese
<b>O35386</b>	<i>Phyh</i>	Phytanoyl-CoA dioxygenase, peroxisomal	1,74	3,43E-06	Lipid Metabolismus, Fettsäuremetabolismus
<b>P70372</b>	<i>Elavl1</i>	ELAV-like protein 1	1,59	7,49E-06	mRNA Stabilität
<b>Q3UQ28</b>	<i>Pxdn</i>	Peroxidasin homolog	2,05	1,07E-05	Extrazelluläre Matrix Signalübertragung
<b>Q8R5H1</b>	<i>Usp15</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 15	2,41	2,50E-05	TGF-beta-Rezeptor-Signalweg, NF-kappa-B- und RNF41/NRDP1-PRKN-Wege, Immunantwort
<b>Q8K009</b>	<i>Aldh112</i>	Mitochondrial 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1,68	9,57E-05	Biosynthese, Fettsäure-Betaoxidation
<b>Q8VCM8</b>	<i>Ncln</i>	Nicalin	1,66	1,36E-04	Protein Stabilisierung
<b>Q91ZV4</b>	<i>Mogat1</i>	2-acylglycerol O-acyltransferase 1	3,34	1,42E-04	Glycerolipid Metabolismus, Triacylglycerol Biosynthese
<b>Q6P4T2</b>	<i>Snrnp200</i>	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	1,87	1,70E-04	mRNA Prozessierung
<b>Q61207</b>	<i>Psap</i>	Prosaposin	1,95	1,86E-04	Lysosomale Degradation von Sphingolipiden
<b>Q8K0L9</b>	<i>Zbtb20</i>	Zinc finger and BTB domain-containing protein 20	1,47	1,95E-04	Transkriptionsfaktor für Hämatopoese, Onkogenese und Immunantworten
<b>Q9CPR4</b>	<i>Rpl17</i>	60S ribosomal protein L17	3,01	2,66E-04	Proteinbiosynthese
<b>E9Q555</b>	<i>Rnf213</i>	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213	1,69	3,30E-04	Protein Modifikation, Lipid Metabolismus
<b>O08749</b>	<i>Dld</i>	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	1,73	3,30E-04	Glycin-Spaltsystem sowie eine E3-Komponente von drei alpha-Ketosäure-Dehydrogenase-Komplexen
<b>Q9JIY7</b>	<i>Nat8</i>	N-acetyltransferase 8	1,87	3,56E-04	Schwefelmetabolismus, Glutathionmetabolismus
<b>P17751</b>	<i>Tpi1</i>	Triosephosphate isomerase	2,04	4,35E-04	Glykolyse, Gluconeogenese

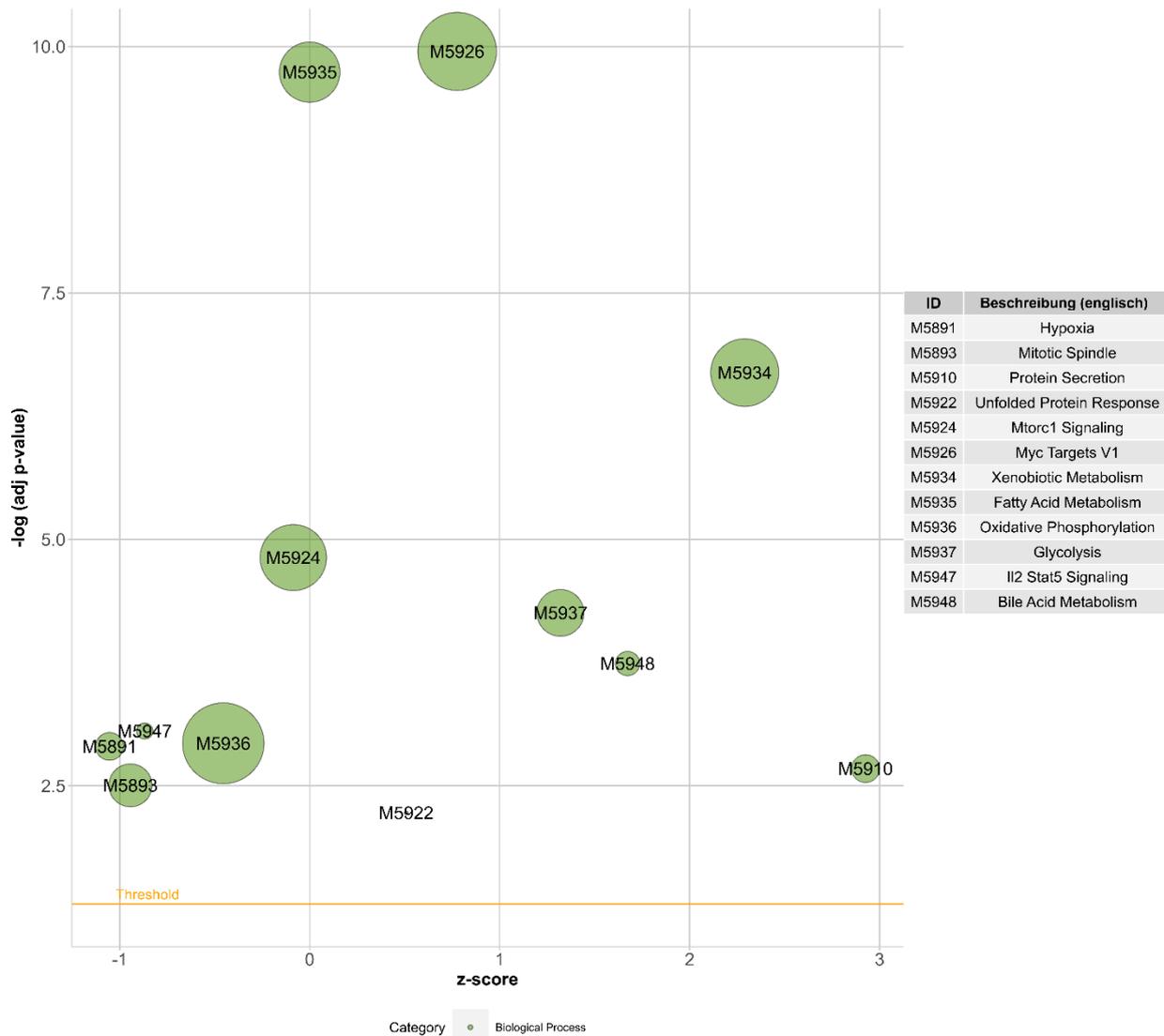
**Tabelle 14: Top 20 der runterregulierten Proteine nach 4 Tagen im *Bpgm*-KO.**

Uniprot-ID	Gen	Name (englisch)	Log <sub>2</sub> Expressionsverhältnis	angepasste p-Werte	Funktion
<b>Q8R050</b>	<i>Gspt1</i>	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A	-2,74	5,64E-12	Translations Termination, Zellwachstum
<b>O88833</b>	<i>Cyp4a10</i>	Cytochrome P450 4A10	-2,23	3,11E-11	Fettsäuremetabolismus, Anti-Inflammatorisch
<b>Q6A026</b>	<i>Pds5a</i>	Sister chromatid cohesion protein PDS5 homolog A	-2,51	2,22E-10	Mitose, DNA Reparatur
<b>Q61316</b>	<i>Hspa4</i>	Heat shock 70 kDa protein 4	-2,24	7,65E-10	Stress-Antwort
<b>P21447</b>	<i>Abcb1a</i>	ATP-dependent translocase ABCB1	-3,72	5,93E-09	Zelltransport
<b>Q8CIM7</b>	<i>Cyp2d26</i>	Cytochrome P450 2D26	-2,31	5,79E-08	Oxidation von Steroiden, Fettsäuren und Xenobiotika
<b>Q8K023</b>	<i>Akr1c18</i>	Aldo-keto reductase family 1 member C18	-3,53	2,99E-07	Progesteron Umbau
<b>Q99JW5</b>	<i>Epcam</i>	Epithelial cell adhesion molecule	-2,11	1,64E-06	Interaktion zwischen Interstitiellen Epithelzellen und Intraepithelialen Lymphozyten
<b>Q9WVM8</b>	<i>Aadat</i>	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase, mitochondrial	-1,68	1,69E-06	Biosynthese
<b>Q9C XK8</b>	<i>Nip7</i>	60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7 homolog	-2,64	6,91E-06	Ribosom-Biogenese
<b>Q9D114</b>	<i>Hddc3</i>	Guanosine-3',5'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase MESH1	-2,15	1,31E-05	Hungerreaktion
<b>Q9C WK8</b>	<i>Snx2</i>	Sorting nexin-2	-3,09	3,21E-05	Protein Transport
<b>Q06770</b>	<i>Serpina6</i>	Corticosteroid-binding globulin	-2,59	3,34E-05	Protein Transport
<b>P97315</b>	<i>Csrp1</i>	Cysteine and glycine-rich protein 1	-2,32	3,41E-05	Neuronale Entwicklung,
<b>G3X9C2</b>	<i>Nccrp1</i>	F-box only protein 50	-4,57	6,58E-05	Zellproliferation
<b>P19137</b>	<i>Lama1</i>	Laminin subunit alpha-1	-1,66	1,04E-04	Zelladhäsion
<b>Q8K003</b>	<i>Tma7</i>	Translation machinery-associated protein 7	-3,20	1,12E-04	Translation
<b>Q61767</b>	<i>Hsd3b4</i>	NADPH-dependent 3-keto-steroid reductase Hsd3b4	-2,04	1,14E-04	Steroid Metabolismus
<b>Q6DYE8</b>	<i>Enpp3</i>	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3	-1,56	1,25E-04	Nukleotid Metabolismus
<b>Q99JF8</b>	<i>Psip1</i>	PC4 and SFRS1-interacting protein	-1,70	2,50E-04	Transkription



**Abbildung 13: Verifizierung der proteomischen Analyse durch EpCAM, NCCRP1 und PXDN.** (A) Repräsentative Darstellung der EpCAM Western Blot Signale. (B) Statistische Auswertung der EpCAM Expression 4 Tage nach *Bpgm*-KO. EpCAM ist im *Bpgm*-KO deutlich schwächer exprimiert. (C) Repräsentative Darstellung der NCCRP1 Western Blot Signale. Der Nachweis von Tubulin (TUBB2B) diente zur Normalisierung. (D) Statistische Auswertung der NCCRP1 Expression. Die Ergebnisse bestätigen die proteomische Datenauswertung. Die Signifikanzbestimmung erfolgte mit dem Student's t-Test (EpCAM) und dem Mann-Whitney test (NCCRP1). \* $p < 0,05$ . (E) Die Immunfluoreszenzfärbung bestätigt die proteomische Datenauswertung, wonach PXDN im *Bpgm*-KO signifikant hochreguliert wird. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

Zur Identifizierung der durch den *Bpgm*-KO beeinflussten Signalwege wurde eine Anreicherungsanalyse regulierter Gene (englisch „*Gene Set Enrichment Analysis*“) durchgeführt. Hierfür wurden alle in der proteomischen Analyse identifizierten Proteine und die Hallmark-Annotierungs-Tabellen von MSigDB<sup>96</sup> verwendet. Dabei ergaben sich durch die *Bpgm* Deletion in der Mausniere insgesamt 12 signifikant regulierte Signalwege (Abbildung 14). Im Detail zeigte sich, dass glykolytische Faktoren im *Bpgm*-KO signifikant hochreguliert werden. Ein weiterer Stoffwechselweg, welcher signifikant im *Bpgm*-KO reguliert ist, ist der Fettsäurestoffwechsel – was bereits bei der Einzelkandidatbetrachtung auffällig wurde (siehe Tabellen 13 und 14). Interessant ist, dass der Signalweg „Fettsäurestoffwechsel“ einen neutralen Z-Score aufweist, da im gleichen Maß schwächer- als auch stärker exprimierte Proteine des Fettsäurestoffwechsels im *Bpgm*-KO beteiligt sind. Ein weiterer Signalweg, welcher durch eine *Bpgm* Deletion in der Niere hochreguliert wurde, ist der „Myc Targets V1“ Signalweg. Myc ist ein Transkriptionsfaktor, welcher eine große Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen wie Zellzyklus, Proliferation, Dedifferenzierung, Apoptose sowie micro-RNA Aktivierung spielt.<sup>116</sup> Weiterhin erwähnenswert ist die Anreicherung von Genen der Glykolyse – mit einem positiven Z-Score. Dieser Befund stimmt mit *in vitro* Ergebnissen von Kameliya Rögner überein, die eine verstärkte Glykolyserate nach *Bpgm*-knockdown in DCT Zellen zeigen konnte (unpubliziert). Zusammenfassend konnte hier gezeigt werden, dass eine Unterdrückung der renalen BPGM Expression einen großen Einfluss auf Signalwege des Energiestoffwechsels hat.



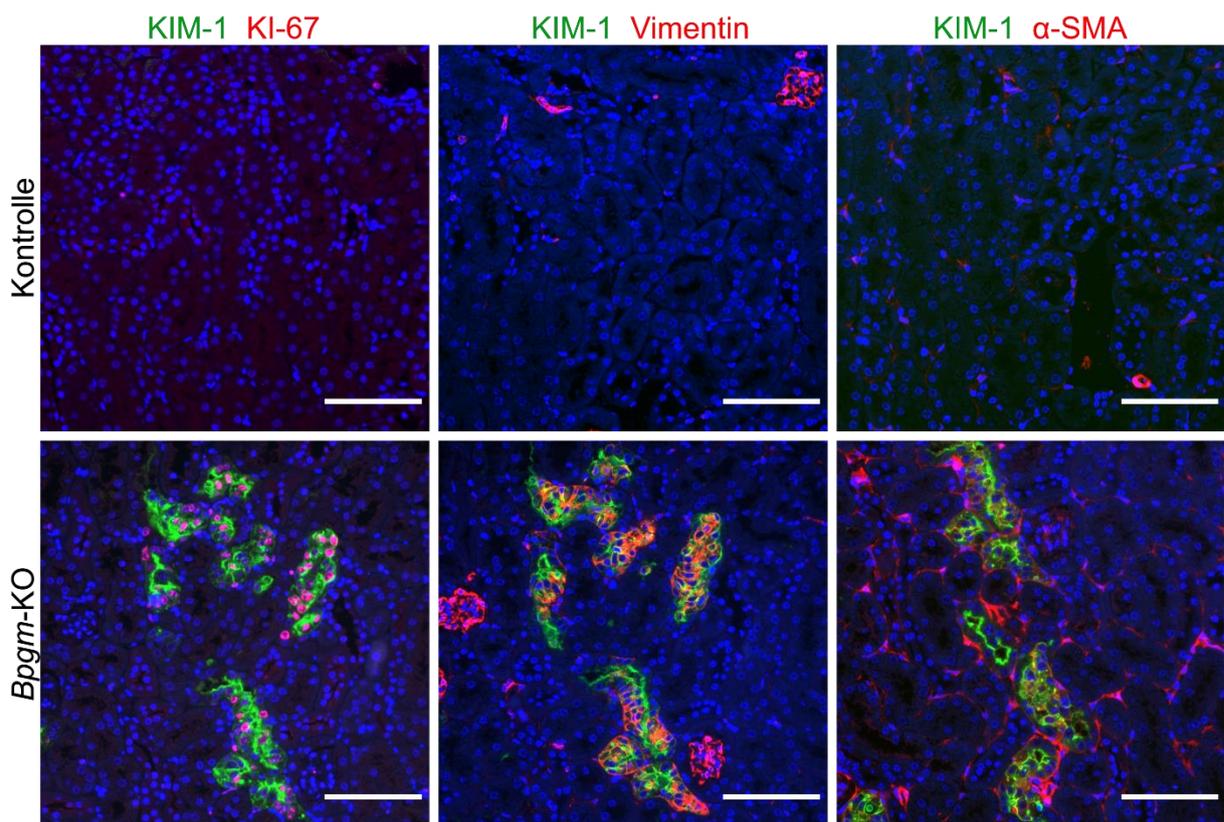
**Abbildung 14: Bubble Plots der proteomischen Gene Set Enrichment Analysis, 4 Tage nach Auslösung des *Bpgm*-KO.** Ein negativer Z-Score zeigt an, dass die Mehrzahl der in diesem Signalweg regulierten Gene schwächer exprimiert werden. Ein positiver Z-Score zeigt dementsprechend, dass die Mehrzahl der in diesem Signalweg regulierten Gene stärker exprimiert werden.

#### 4.4.2 Ein *Bpgm* Defizit führt zur Dedifferenzierung von proximalen Tubuli

In der proteomischen Analyse wurden durch den *Bpgm*-KO regulierte Signalwege wie „Myc Targets V1“ und „mTORC1“ identifiziert. Der „Myc Target V1“ Signalweg ist in verschiedensten biologischen Prozessen von großer Bedeutung wie zum Beispiel im Zellzyklus, der Dedifferenzierung von Zellen, bei apoptotischen Prozessen sowie bei vielen mRNA Aktivierungen.<sup>116</sup> Der mTORC1 (englisch „mammalian target of rapamycin complex 1“) Signalweg spielt eine wichtige Rolle für die Regulation des Zellzyklus und des Zellwachstums sowie des zellulären Metabolismus.<sup>117</sup> Somit zeigten sich durch einen tubulären *Bpgm*-KO

mehrere Signalwege reguliert, welche einen Einfluss auf das Wachstum sowie der Dedifferenzierung von Zellen besitzen. Um dies zu verifizieren, wurden Immunfluoreszenz-Studien zum Nachweis des Proliferationsmarkers KI-67 sowie der Dedifferenzierungsmarker Vimentin und  $\alpha$ -SMA verwendet. Weiterhin wurde der Schädigungsmarker KIM-1 angefärbt, um zu analysieren, ob die Proliferations- und Dedifferenzierungsprozesse in den durch den *Bpgm*-KO geschädigten proximalen Tubuli stattfinden. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich bei der Betrachtung des Nierengewebes im *Bpgm*-KO, dass die Marker KI-67, Vimentin und  $\alpha$ -SMA in KIM-1 positiven PT hochreguliert wurden.

Die Immunfluoreszenzfärbungen konnten damit zeigen, dass die KIM-1 positiven proximalen Tubuli umfassende Proliferations- sowie Dedifferenzierungsprozesse durchlaufen (Abbildung 15). Auch konnte bestätigt werden, dass die in den proteomischen Analysen durch den *Bpgm*-KO signifikant regulierten Signalwege hinsichtlich des Zellzyklus sowie der Dedifferenzierung einen möglichen Effekt auf die Morphologie der Tubulussegmente besitzen.



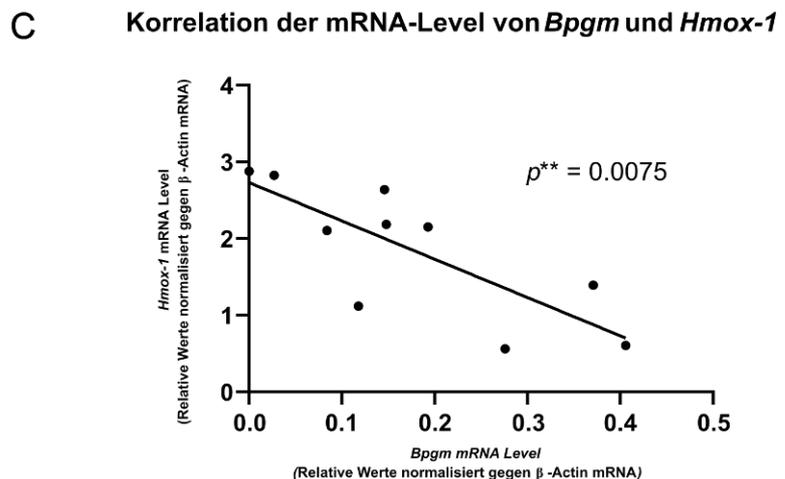
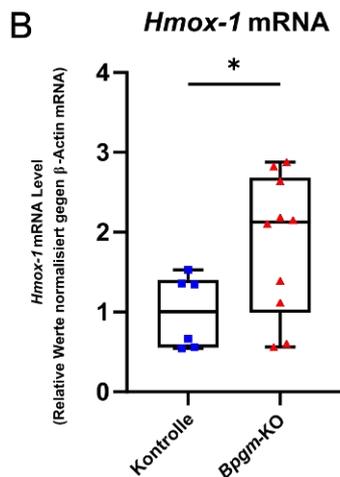
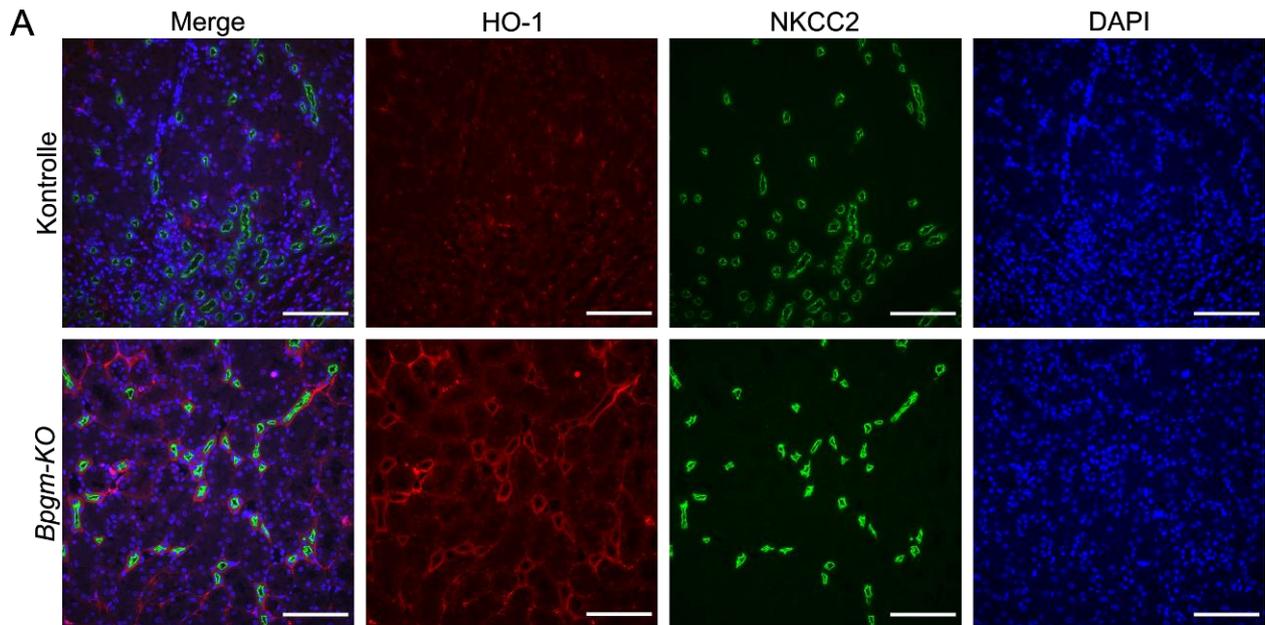
**Abbildung 15: KIM-1 positive proximale Tubuli im *Bpgm*-KO durchlaufen Proliferations- und Dedifferenzierungsprozesse.** Immunfluoreszenzfärbung von Nierenschädigungsmarker KIM-1 (grün) mit KI-67, Vimentin und  $\alpha$ -SMA (rot) in Kontrollen und *Bpgm*-KO. Die im *Bpgm*-KO KIM-1 positiven Tubuli zeigen eine Kollokalisation mit dem Proliferationsmarker KI-67 sowie mit den Dedifferenzierungsmarkern Vimentin und  $\alpha$ -sma. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

#### 4.4.3 Einfluss des *Bpgm* Defizits auf den Distalen Tubulus

Durch die Deletion von *Bpgm* zeigte sich die Glykolyse als einer der am stärksten hochregulierten Signalwege (Abbildung 14). Aufgrund der Verbindung zwischen einer erhöhten Glykolyse und dem daraus resultierenden oxidativen Stress für die Zelle<sup>118</sup> wurde das Vorkommen der Hämoxygenase-1 (HO-1) im *Bpgm*-KO näher untersucht. HO-1 ist ein antioxidatives Enzym, welches unter oxidativen Stress in der Zelle hochreguliert wird.<sup>119</sup>

Für die Untersuchung von HO-1 im *Bpgm*-KO wurden Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt. Hierbei konnte ein Vorkommen der HO-1 insbesondere in NKCC2 positiven TAL Zellen des Nephrons gezeigt werden (Abbildung 16 A). Mittels qPCR konnte eine moderate, jedoch signifikante Hochregulation der *Hmox-1* (Gensymbol für HO-1) mRNA unter *Bpgm* Deletion nachgewiesen werden (Abbildung 16 B). Unter Verwendung unterschiedlicher *Bpgm*-knockdown Raten, die zur graduellen Abnahme der *Bpgm* mRNA führte, konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen *Bpgm* und *Hmox1* nachgewiesen werden (Abbildung 16 C).

Mit Hilfe dieser Analysen konnte somit, neben dem schädigenden Einfluss des *Bpgm*-KO auf den PT (Kapitel 4.4.2.), auch ein Einfluss der *Bpgm* Deletion auf einen distalen Teil des Nephrons gezeigt werden.



**Abbildung 16: Hochregulation der Hämooxygenase-1 (HO-1) nach *Bpgm* Deletion im TAL des Nephrons.** (A) Immunfluoreszenzfärbung von HO-1 und NKCC2 in Kontrollen sowie *Bpgm*-KO. Durch die Deletion von *Bpgm* kommt es im NKCC2 positiven TAL zu einer Hochregulation von HO-1. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m. (B) Quantitative PCR von *Hmox-1*. Auch auf mRNA Ebene zeigt sich eine Hochregulation von *Hmox-1* durch die *Bpgm* Deletion. Als statistische Analyse wurde für die *Hmox-1* mRNA ein Student's t-Test verwendet. \* $p < 0,05$ . (C) Korrelations-Analyse der *Bpgm* mRNA gegen *Hmox-1* mRNA im *Bpgm*-KO. Es zeigt sich eine signifikante negative Korrelation zwischen *Bpgm* und *Hmox-1*. Für die Statistische Auswertung wurde eine Pearson Korrelation verwendet. \*\* $p = 0,0075$

#### 4.5 Interzelluläre Kommunikation zwischen dem distalen und proximalen Nephron

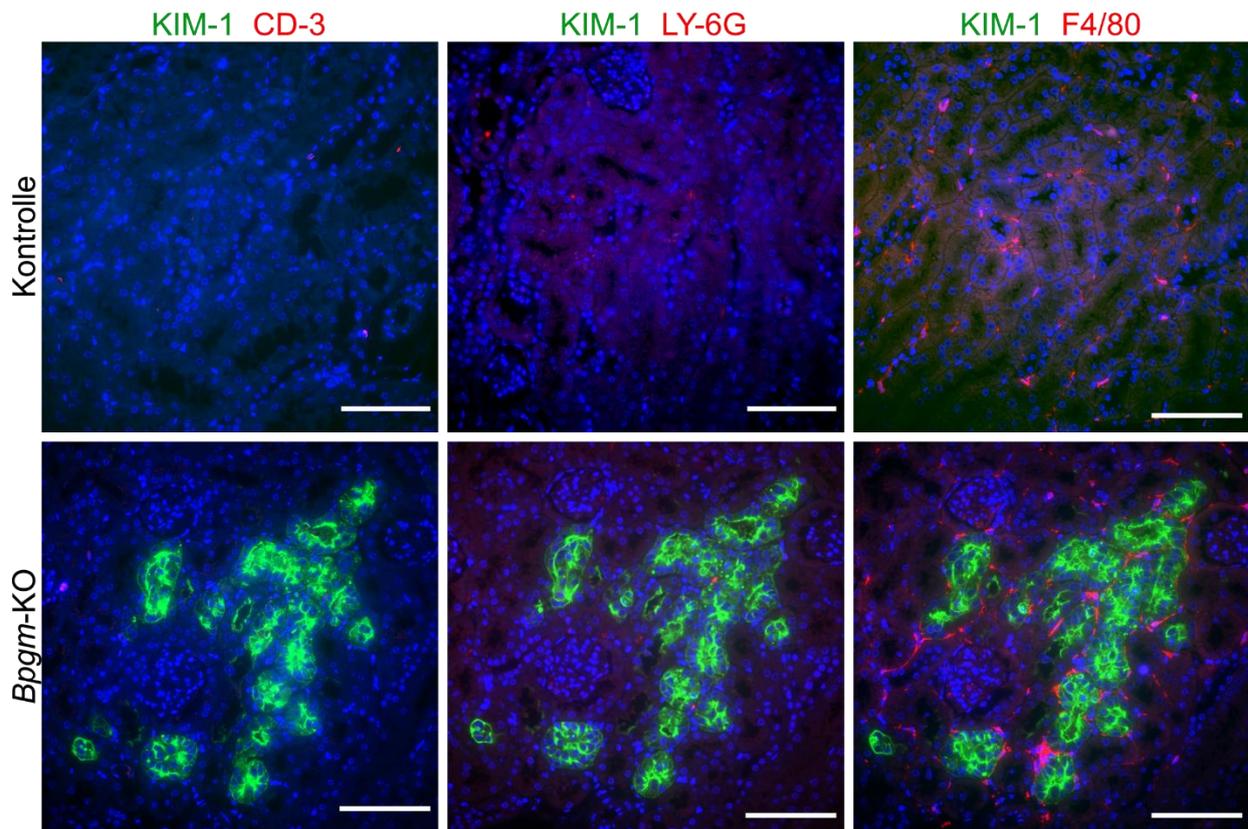
Im nachfolgenden Teil der Arbeit sollte näher untersucht werden, warum die Deletion der nur im distalen Nephron vorkommenden *Bpgm* zu einer Schädigung im proximalen Nephron führt. Die interzelluläre Kommunikation zwischen den einzelnen Tubulussegmenten könnte ein möglicher Weg der Signalübertragung innerhalb der Niere darstellen, welcher für die Pathophysiologie der

Niere auch in anderen Kontexten relevant ist. Die interzelluläre Kommunikation (englisch „*cross talk*“) zwischen spezifischen Zelltypen kann dabei bspw. verschiedene Transmittersubstanzen wie Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren sowie Hormon-ähnliche Substanzen umfassen.<sup>120–123</sup>

#### 4.5.1 Rolle des Immunsystems im *Bpgm*-KO

Für die Aufklärung der molekularen Prozesse hinter der Nierenschädigung im *Bpgm*-KO sowie der interzellulären Signalübertragung zwischen den distalen und proximalen Tubuli, wurde die proteomische Analyse und ihre signifikant regulierten Einzelkandidaten und Signalwege herangezogen (siehe auch Kapitel 4.5).

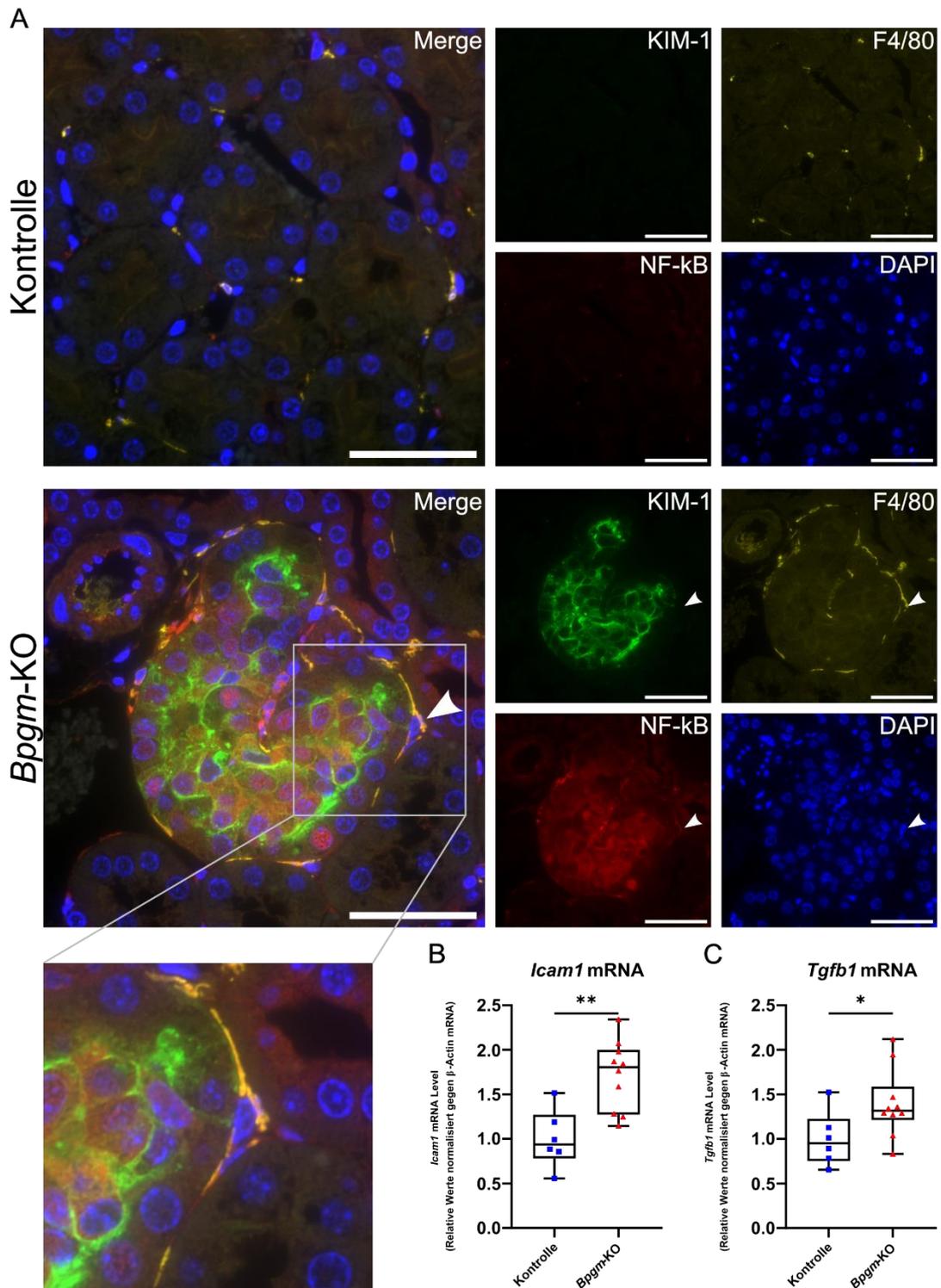
Der Interleukin-2 (IL2) Signalweg sowie der seines Zielgens „*Signal transducer and activator of transcription 5*“ (STAT5) ist einer der am stärksten herabregulierten Signalwege im *Bpgm*-KO (siehe Abbildung 14). Der IL2-STAT5 Signalweg modifiziert die funktionelle Aktivität von regulatorischen T-Zellen und zeigt insgesamt eine immunsuppressive Wirkung.<sup>124,125</sup> Bei Betrachtung aller hochregulierten Proteine fiel der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (englisch „*Nuclear factor kappa B*“) auf. NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher verschiedene Gene der Immunantwort sowie Signaltransmitter aktiviert und reguliert.<sup>126</sup> Eine Zunahme des inflammatorischen Aktivators NF- $\kappa$ B und eine Hemmung des immun-hemmenden IL2-STAT5-Weges deutet auf die Beteiligung von Immunzellen bei der Signalübertragung vom distalen zum proximalen Nephron hin. Zur näheren Charakterisierung wurden verschiedene Immunzellen sowie ihre Lokalisation zu den KIM-1 positiven geschädigten PT im Nierengewebe mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen genauer untersucht. Hierfür wurden die gängigen Immunzellmarker CD-3 für T-Zellen<sup>127</sup>, LY-6G für Neutrophile (Granulozyten)<sup>128</sup> sowie F4/80 gegen Makrophagen<sup>129</sup> verwendet. In den Kontrollen zeigten sich bei der Betrachtung der Immunzell-Marker keine über das gesunde Gewebe hinaus auffälligen Anlagerungen von Immunzellen (Abbildung 17). Auch fiel im *Bpgm*-KO kein vermehrtes Vorkommen von T-Zellen sowie Neutrophilen auf. Bei der Analyse der F4/80 positiven Makrophagen im *Bpgm*-KO zeigte sich jedoch eine vermehrte ringförmige Anlagerung der Makrophagen um die KIM-1 positiven proximalen Tubuli. Im normalen Gewebe liegen im Gegensatz dazu die Makrophagen unregelmäßig verteilt im interstitiellen Raum der Mauseiere.



**Abbildung 17: Makrophagen umlagern KIM-1 positive proximale Tubuli im *Bpgm*-KO.** Immunfluoreszenzfärbung vom Nierenschädigungsmarker KIM-1 (grün) mit Immunzellmarkern (rot) gegen T-Zellen (CD-3), Neutrophile (LY-6G) und Makrophagen (F4/80) auf Nierengewebe von *Bpgm*-KO und Kontrolltieren. Im *Bpgm*-KO zeigt sich eine Umlagerung der KIM-1 positiven Tubuli mit Makrophagen. Andere Immunzellen wie T-Zellen und Neutrophile zeigen keine lokale oder quantitative Veränderung. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.

Eine Immunfluoreszenz-Analyse von NF- $\kappa$ B zeigte eine verstärkte Präsenz in geschädigten Tubuli und Makrophagen welche an KIM-1 positiven Tubuli lagern (Abbildung 18 A). Weiterhin wurde exemplarisch das NF- $\kappa$ B Zielgen *Icam-1*<sup>130</sup> sowie einer der zahlreichen NF- $\kappa$ B Aktivatoren *Tgfb1*<sup>131</sup> in der quantitativen PCR untersucht. Hierbei zeigte sich für beide untersuchten Gene eine Hochregulation im *Bpgm*-KO (Abbildung 18 B und C).

Zusammenfassend deuten die NF- $\kappa$ B Aktivierung, die Hemmung des IL2-STAT5-Signalweges und die Umlagerung geschädigter KIM-1 positiven Tubuli mit Makrophagen auf eine Rolle des Immunsystems bzw. inflammatorischer Prozesse im *Bpgm*-KO hin. Inwieweit die Makrophagenrekrutierung zu den geschädigten PT Ursache oder Folge der Schädigung ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.



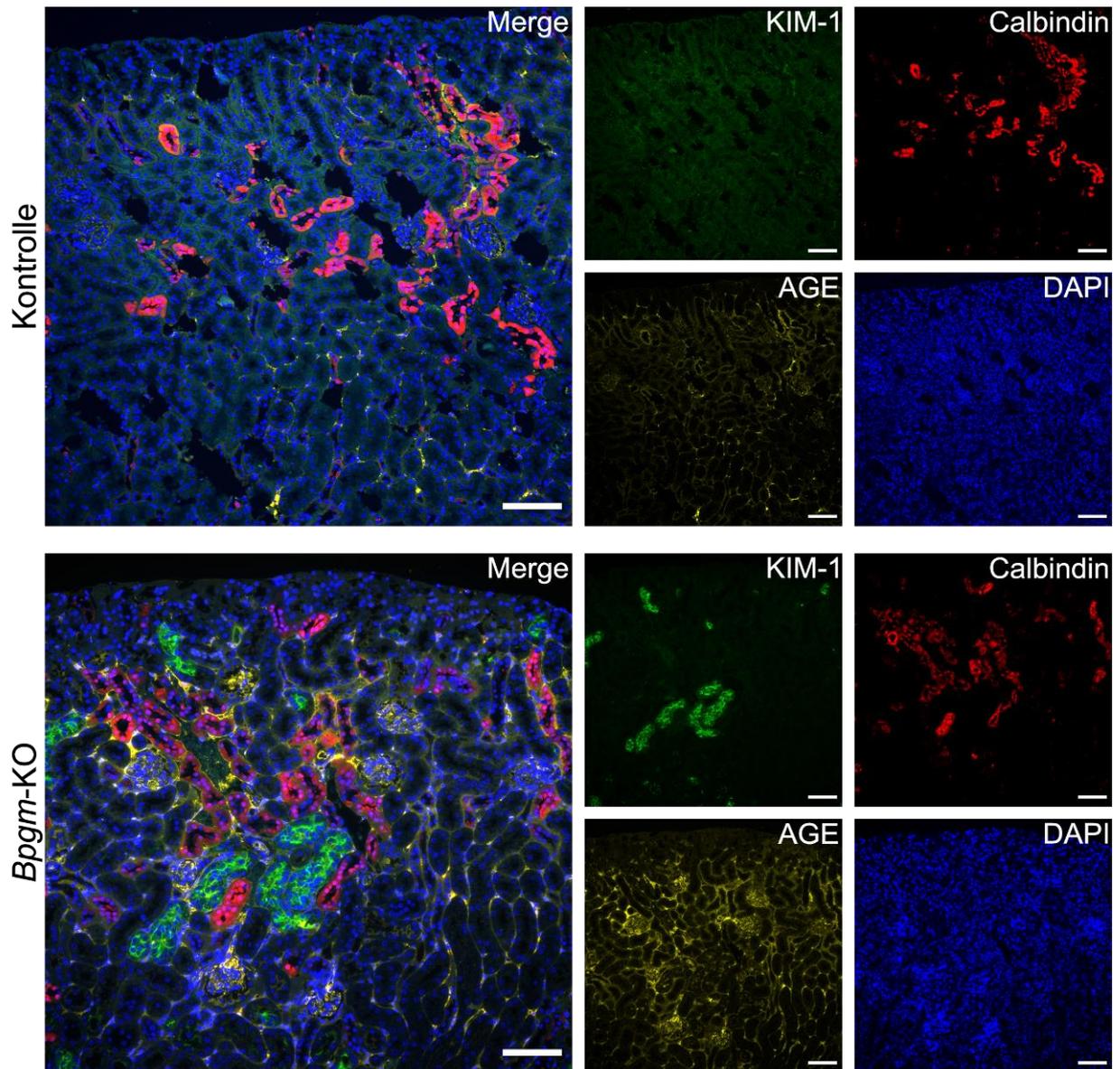
**Abbildung 18: Hochregulation von NF- $\kappa$ B in Makrophagen und KIM-1 positiven Zellen nach *Bpgm* Deletion.** (A) Immunfluoreszenzfärbung von NF- $\kappa$ B (rot), F4/80 (gelb) und KIM-1 (grün) in Kontrollen sowie *Bpgm*-KO. Nach *Bpgm* Deletion zeigen Makrophagen an den KIM-1 positiven geschädigten Tubuli sowie die geschädigten Tubuli selbst eine NF- $\kappa$ B Lokalisation. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m. (B, C) Quantitative PCR des NF- $\kappa$ B Target Gens *Icam-1* (B) und des NF- $\kappa$ B Aktivators *Tgfb1* (C). Beide Transkripte werden im *Bpgm*-KO verstärkt exprimiert. Für die statistische Analyse wurde für beide Gene ein Student's t-Test verwendet. \* $p < 0,05$  und \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.5.2 Die Rolle von „*advanced glycation end products*“ im *Bpgm*-KO

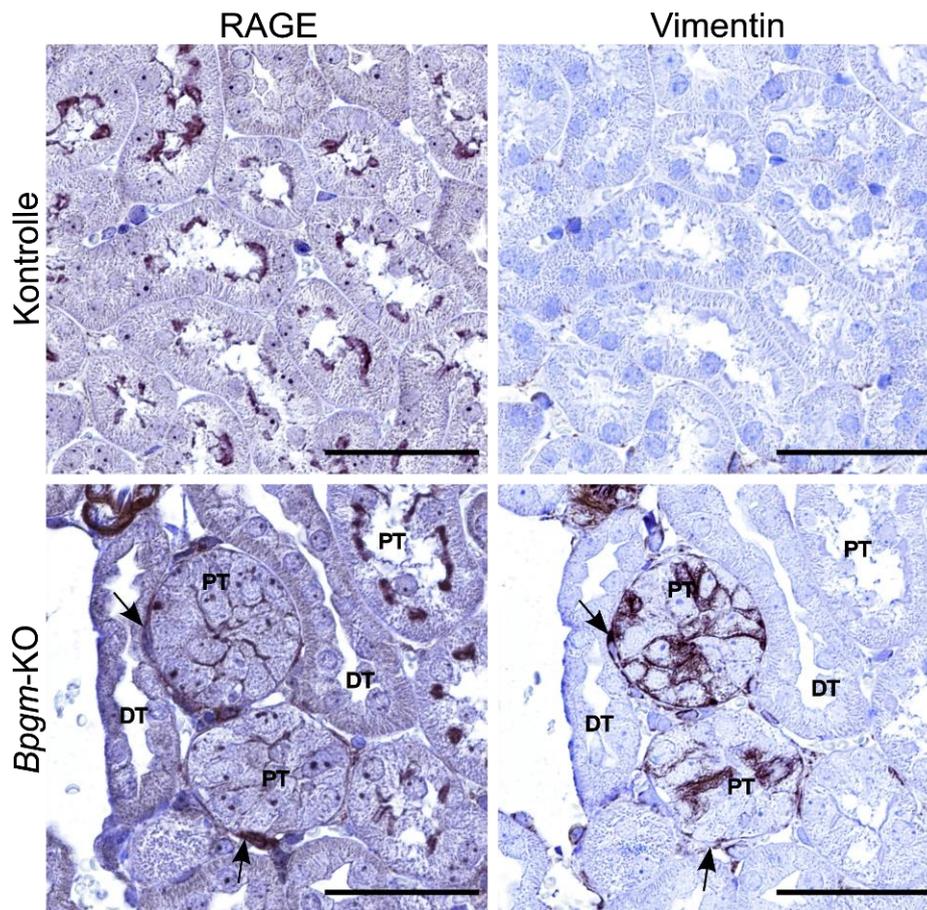
Die Deletion von *Bpgm* in der Niere führte zu einer verstärkten Expression glykolytischer Faktoren (siehe: Kapitel 4.5). Auch *in vitro* konnte im Rahmen der parallel durchgeführten Dissertation von Kameliya Rögner bereits gezeigt werden, dass ein knock-down von *Bpgm* in DCT Zellen sowie embryonalen Mausfibroblasten (englisch „*mouse embryo fibroblast*“, MEF) zu einer Erhöhung der Glykolyserate führt (Daten hier nicht gezeigt). Des Weiteren zeigte sich auch der Fettsäurestoffwechsels im *Bpgm*-KO signifikant reguliert (Abbildung 14). Sowohl bei gesteigerter Glykolyse als auch Fettsäurestoffwechsel können durch die sogenannte Maillard Reaktion glykierte Reaktionsprodukte (englisch „*advanced glycation end products*“, AGEs) entstehen.<sup>77,132,133</sup> Zur Aufklärung einer möglichen Entstehung von AGEs im *Bpgm*-KO wurden Immunfluoreszenzstudien mithilfe eines spezifischen anti-AGE Antikörpers, welcher verschiedene glykierte Proteine und Metabolite erkennt, durchgeführt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich im *Bpgm*-KO eine deutliche Akkumulierung von AGEs im Nierengewebe der Maus (Abbildung 19, gelbe Färbung). Durch die Ko-Färbung mit dem DCT-Marker Calbindin (Abbildung 19, rote Färbung) zeigte sich, dass das Vorkommen der AGEs auf den distalen Tubulus und seinen umgebenden intrazellulären Raum beschränkt ist. Im Vergleich dazu waren in der Kontrolle nur wenige AGEs in distalen Tubuli zu erkennen. Weiterhin kann gezeigt werden, dass die KIM-1 positiven proximalen Tubuli (Abbildung 19, grüne Färbung) in direkter räumlicher Nähe zu den mit AGE gefüllten distalen Tubulus stehen.

AGEs sind Signalmoleküle, die durch spezifische Rezeptoren erkannt werden. Einer der am Besten charakterisierten Rezeptoren stellt RAGE (englisch „*Receptor for advanced glycation end products*“, RAGE) dar. Im Nierengewebe der Kontrollen konnte kein RAGE detektiert werden (Abbildung 20). Im *Bpgm*-KO kommt es im Gegensatz dazu im interstitiellen Raum neben den geschädigten Tubuli und am distalen Nephron zu einer deutlichen RAGE Färbung interstitieller Zellen.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass geschädigte proximale Tubuli in direkter räumlicher Nähe zu distalen Tubulie liegen, die eine Akkumulation von AGEs aufweisen. Interstitielle Zellen im *Bpgm*-KO sind RAGE positiv und könnten an der Signalgebung beteiligt sein.



**Abbildung 19: Verstärkte Akkumulation von *advanced glycation end products* (AGEs) im renalen *Bpgm*-KO.** Immunfluoreszenzfärbung von Nierengewebe in *Bpgm*-KO und Kontrollen mit dem Nierenschädigungsmarker KIM-1 (grün), dem distalen Tubulus-Marker Calbindin (rot) und AGE (gelb). Im Vergleich zu den Kontrollen kommt es zu einer Erhöhung von AGEs in den distalen Tubuli der *Bpgm*-KO Niere. Des Weiteren zeigt sich, dass die KIM-1 positiven geschädigten Tubuli in direkter Nähe zu den mit AGE angereicherten distalen Tubuli liegen. Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu$ m.



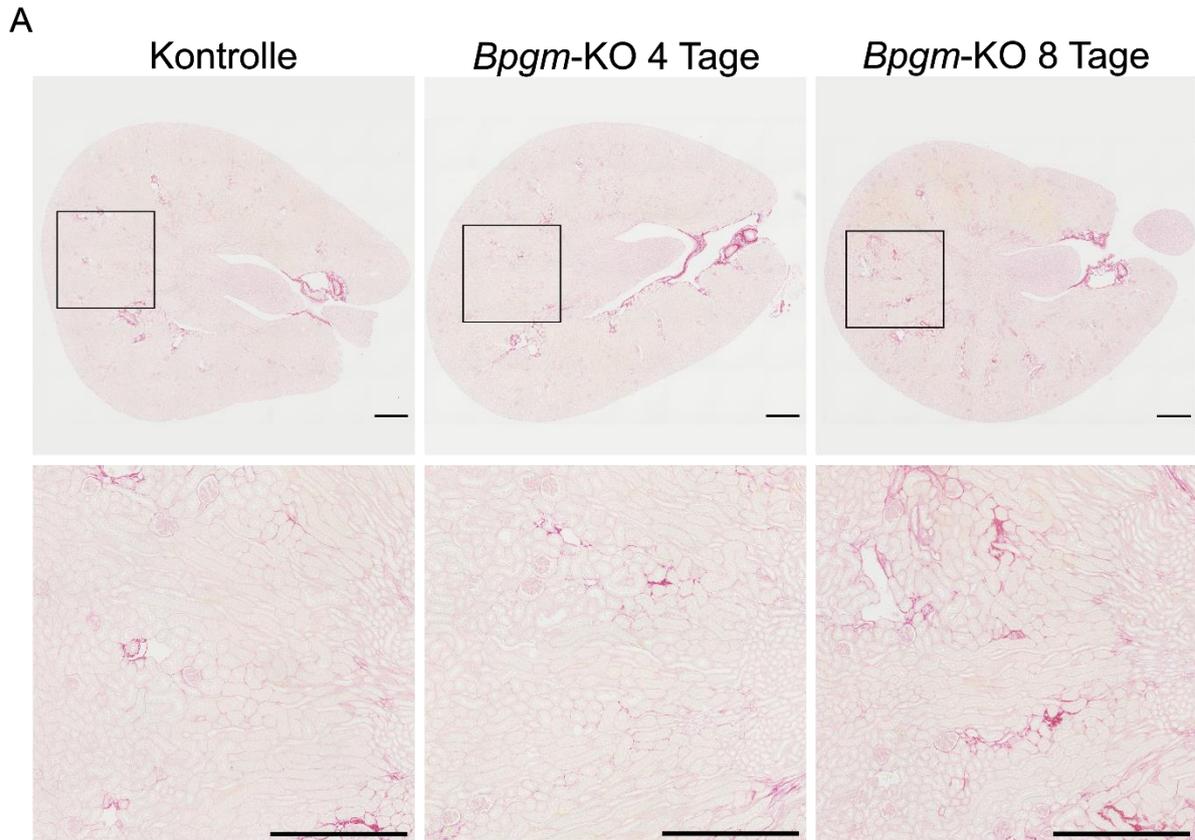
**Abbildung 20: RAGE Signal an interstitiellen Zellen im *Bpgm*-KO.** Immunhistochemie des AGE-Rezeptors RAGE und Vimentin auf Folgeschnitten vom Nierengewebe der Kontrollen und des *Bpgm*-KO. An Vimentin positiven geschädigten proximalen Tubuli (PT) lagern interstitielle Zellen, welche RAGE positiv (Pfeile) sind. Benachbart zu den geschädigten PT liegen distale Tubuli (DT). In der Kontrolle ist weder eine erhöhte RAGE noch Vimentin-Färbung zu sehen. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

#### 4.6 Die *Bpgm* Deletion führt zu renaler Fibrose

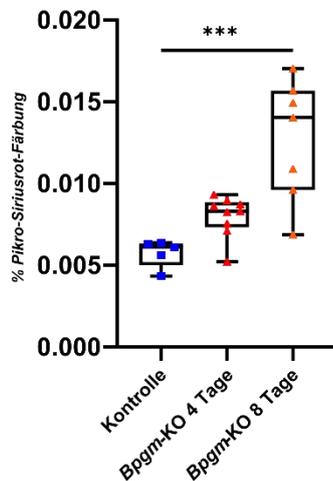
Ein akutes Nierenversagen ist potentiell reversibel und wird häufig von Betroffenen nicht bemerkt. Um eine mögliche Progression des tubulären Schadens nach *Bpgm*-KO abschätzen zu können, wurden Nieren 8 Tage nach Induktion des Knockouts in Hinblick auf fibrotische Veränderungen untersucht. Die interstitielle Nierenfibrose gilt als manifestes Schädigungsmerkmal in der Nierenpathologie,<sup>134</sup> wobei der Ausprägungsgrad die Progressivität des chronischen Nierenversagens begründet.<sup>134,135</sup> Zur histologischen Darstellung einer möglichen Fibrose wurde die Siriusrot-Färbung<sup>136</sup> verwendet. Die anschließende quantitative Auswertung erfolgte durch Dr. Robert Labes mit Hilfe der Nikon Software und eines eigens dafür entwickelten R-Scripts. Hierbei wurde der Anteil der Fibrose unter Diskriminierung großer Gefäße, welche auch durch Siriusrot gefärbt werden, berechnet. Dabei ergab sich zunächst im Vergleich Kontrolle zu 4 Tagen *Bpgm*-KO keinen signifikanten Unterschied in der renalen Fibrosierung (Abbildung 21 B). Nach 8 Tagen

*Bpgm*-KO kann jedoch eine signifikante Erhöhung des Fibrose-Grades festgestellt werden. Bei Betrachtung der Mikroskopiebilder in Abbildung 20 A fällt auf, dass die fibrotischen Bereiche nach 8 Tagen *Bpgm*-KO besonders im Bereich zwischen dem Kortex und der Medulla der Niere vorkommen. Unter der Verwendung der quantitativen PCR wurde weiterhin der Fibrosemarker *Ccl2* untersucht. *Ccl2* (englisch „*CC-chemokine ligand 2*“) auch bekannt als MCP1 (englisch „*monocyte chemotactic protein 1*“) ist als Schlüssel-Mediator in der chronischen Nierenschädigung<sup>137</sup> sowie der progressiven Fibrosierung der Niere<sup>138</sup> beschrieben. Im Vergleich zur Kontrolle zeigten sich nach 4 und 8 Tagen der *Bpgm* Deletion signifikant erhöhte *Ccl2* mRNA-Level (Abbildung 21 C).

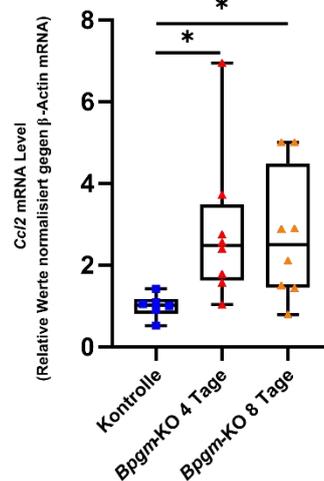
Diese Ergebnisse deuten tatsächlich auf eine Progression des renalen Schadens nach *Bpgm*-KO hin. Auch wenn aufgrund des begrenzten zeitlichen Rahmens dieser Promotionsarbeit weitere Zeitpunkte (8 Tage und später) nicht näher charakterisiert wurden, kann aufgrund des zunehmenden Fibrosierungsgrades davon ausgegangen werden, dass die gezeigten Veränderungen 4 Tage nach *Bpgm*-KO die Schlüsselmechanismen der Schadensbildung beinhalten.



**B Picro-Siriusrot Färbung**



**C Ccl2 mRNA**



**Abbildung 21: 8 Tage nach der *Bpgm* Deletion kommt es zu einer beginnenden Fibrosierung im Nierengewebe.**

(A) Picro-Siriusrot Färbung von Nierengewebe mit (B) statistischer Auswertung von Kontrollen sowie 4 und 8 Tage nach *Bpgm*-KO. 4 Tage nach *Bpgm* Deletion zeigen sich keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich des Fibrosierungs-Grades der Niere. Nach 8 Tagen *Bpgm*-KO kommt es zu einer signifikanten Erhöhung von fibrotischem Gewebe im Vergleich zu den Kontrollen. (C) Quantitative PCR des Fibrose-Treibers *Ccl2*. Sowohl nach 4 als auch nach 8 Tagen der *Bpgm* Deletion kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der *Ccl2* mRNA-Konzentration. Der Maßstabsbalken entspricht 500  $\mu$ m. Für die statistischen Analysen wurde ein Kruskal-Wallis Test mit einem Dunn-Bonferroni-Test durchgeführt. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

## 5 Diskussion

BPGM ist ein glykolytisches Enzym, welches bislang vorwiegend in Erythrozyten beschrieben wurde.<sup>84</sup> Die bisher einzige bekannte physiologische Funktion der BPGM liegt in der Generierung von 2,3-BPG, welches die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin und damit die Sauerstoffversorgung des Gewebes beeinflusst.<sup>59,60</sup> Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte die Expression der BPGM in der Niere hinsichtlich der Lokalisation und (patho-) physiologischen Funktion aufgeklärt werden. Dabei zeigte sich, dass die BPGM in Abschnitten des distalen Nephrons exprimiert wird. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Mausmodell mit induzierbarem *Bpgm*-KO im Tubulussystem der Mausniere etabliert werden. Funktionelle Untersuchungen zeigen, dass die BPGM eine essentielle Funktion im tubulären Metabolismus in der Adaptation an Stressbedingungen erfüllt. Nach Auslösung der *Bpgm* Deletion *in vivo*, können bereits nach 4 Tagen klare Schädigungsmerkmale nachgewiesen werden. 8 Tage nach *Bpgm*-KO entwickelt sich eine manifeste Fibrose als Kennzeichen einer Nierenschädigung.

### 5.1 BPGM kommt im distalen Nephron vor und wird unter Stressbedingungen hochreguliert

Mit Hilfe von spezifischen Tubulussegment-Markern konnte eine konstitutive Expression der BPGM im distalen Nephron nachgewiesen werden. Im Detail zeigte sich die BPGM Lokalisation im TAL, DCT, CNT und Sammelrohr der Niere. Im PT konnte keine Expression von BPGM gezeigt werden, was im Einklang mit einer enzymatischen Ausstattung steht, die vorrangig auf Glukoneogenese (dem der Glykolyse gegenläufigen Prozess) ausgerichtet ist.<sup>28</sup> Um den enorm hohen Energiebedarf aus Resorptionsleistung und Glukoneogenese zu decken, produzieren die PT das Energieäquivalent ATP vorwiegend aus der oxidativen Phosphorylierung von Fettsäuren.<sup>27,30,31</sup> Unter Stressbedingungen des ANV's, wie zum Beispiel einer Hypoxie oder einer mitochondrialen Dysfunktion, können epitheliale Zellen des proximalen Tubulus ihren Metabolismus jedoch zur Glykolyse hin umprogrammieren.<sup>27,33,139,140</sup> Dieser als zelluläre Transition oder auch Dedifferenzierung bezeichnete Prozess ermöglicht den PT-Zellen das Überleben unter hypoxischen Bedingungen.<sup>27,33,139,140</sup> Hält diese metabolische Veränderung jedoch zu lange an, kann eine verstärkte Glykolyse einschließlich einer reduzierten Fettsäure-Oxidation zu Inflammation, der Fettsäuren-Akkumulation oder einer Fibrose der Niere führen.<sup>139</sup>

Im Gegensatz zum PT, exprimieren Zellen des distalen Abschnittes des Nephrons (TAL, DCT, CNT und Sammelrohr) glykolytische Enzyme.<sup>141,142</sup>

Im Mausmodell konnte im Vorfeld dieser Arbeit eine verstärkte Expression der *BPGM* im Kontext eines Rhabdomyolyse-vermittelten ANV beobachtet werden. Um auch in der menschlichen Niere das Vorkommen von *BPGM* sowie seiner Hochregulation im ANV zu bestätigen, wurden Einzelzell-RNA Sequenzierungsdaten aus humanen ANV Biopsien, wie in Hinze *et al.*<sup>105</sup> beschrieben, näher untersucht. Hierbei bestätigte sich ein Vorkommen von *BPGM* in den distalen Tubulus-Segmenten. Besonders im Verbindungstubulus wurde *BPGM* im ANV signifikant hochreguliert. Auch im Urin von Patienten mit ANV, wie in Klocke *et al.*<sup>143</sup> beschrieben, konnte *BPGM* in Zell-Clustern des CNT und des Sammelrohrs identifiziert werden (nicht gezeigt; Datensatz verfügbar unter: <https://github.com/janklocke/Urine-single-cell-sequencing-AKI>). Weiterhin zeigte sich in diesem Datensatz eine Hochregulation von *BPGM* in Zellen, welche auch Schadensmarker exprimieren. Weitere Auswertungen von Einzelzell-transkriptomischen Datensätzen zeigen u.a. auch in Patienten mit einer Diabetischen Nephropathie eine Hochregulation von *BPGM* in Schaltzellen des CNT und Sammelrohrs.<sup>144</sup> Diese Ergebnisse bestätigen neben dem Vorkommen in der Maus auch eine humane Expression von *BPGM* im distalen Nephron der Niere sowie einen direkten Zusammenhang zwischen der Regulation der *BPGM*-Expression und verschiedenen Nierenpathologien. Als neuer Biomarker zum tubulären Schaden könnte *BPGM* im Urin von ANV Patienten an Bedeutung gewinnen, jedoch müsste dies in weiterführenden Studien noch näher analysiert werden.

## 5.2 Eine *Bpgm* Deletion führt zu Schäden am proximalen Tubulus

Beim verwendeten *Bpgm*-Knockout Modell wird die Cre Rekombinase unter dem Doxyzyklin induzierbaren *Pax8* Promotor exprimiert, welche durch spezifische *loxP* Seiten im *Bpgm* Gen das Exon 2 des Gens ausschneidet. *Pax8* ist ein Promotor spezifisch für das gesamte Nephron<sup>145</sup>, weshalb das Deletionssystem häufig Anwendung in der Nierenforschung findet.<sup>146,147</sup> 4 Tage nach der Doxyzyklin-Injektion erfolgte die Blut- sowie Nierenentnahme. In der routinemäßig durchgeführten histologischen PAS Färbung zeigten sich im *Bpgm*-KO *per se* überraschenderweise deutlich geschädigte, morphologisch veränderte Tubuli. Bei den Tubuli handelte es sich um Abschnitte des PT, welche bereits einen Verlust des Bürstensaums sowie eine Verringerung des tubulären Lumens zeigten. Der Bürstensaum-Verlust ist ein für den PT ein typisches Zeichen eines Schadens unter verschiedenen Nierenpathologien.<sup>148-150</sup> Weiterhin zeigen die PT eine Polyploidie, welche auch mit tubulären Schäden assoziiert ist.<sup>151</sup>

Ergänzend zeigte sich durch quantitative PCR und Immunfluoreszenz-Analysen eine signifikante Hochregulation der frühen tubulären Schadensmarker KIM-1 und NGAL. Hierbei konnte für beide Marker eine Lokalisation exklusiv im PT des Nephrons festgestellt werden. Da am Tag 4 nach *Bpgm*-KO kein Serumkreatinin-Anstieg nachgewiesen wurde, weisen die PAS-Färbung und frühen Schadensmarker KIM-1 und NGAL auf eine beginnende Schädigung ohne Funktionsverlust hin. Erste Ansätze zur Untersuchung des weiteren zeitlichen Verlaufes zeigen 8 Tage nach Auslösung des *Bpgm*-KO eine Zunahme von Fibrose, was eine weitere Progression des renalen Schadens nahelegt. Um zu verstehen, welche molekularen Mechanismen durch den tubulären *Bpgm*-KO induziert werden, die letztlich zu einer Schädigung des PT führen, erscheint der 4-Tagezeitpunkt für diese Untersuchungen daher besonders geeignet. Im direkten Fokus sollte dabei die Frage stehen, wie es zur Schädigung des PT kommt, obwohl eine BPGM Expression in diesem Tubulusabschnitt gar nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse deuten auf eine Wirkung des BPGM Verlustes über das distale Nephron, dem Ort der BPGM Lokalisation, hinaus hin. Im *Bpgm*-KO liegen die geschädigten PT in direktem Kontakt mit Calbindin-positiven DCT und CNT Zellen, welches eine interzelluläre Kommunikation der beiden Tubulus-Segmente nahelegt. Eine solche Signalübertragung kann entweder über parakrine oder endokrine Faktoren sowie über Nervenzellen vermittelt werden. Weiterhin sind direkte Zell-Zell-Kontakte (Gap Junctions) möglich.<sup>152</sup> Von einer parakrinen Kommunikation spricht man, wenn eine Zelle eine Substanz sezerniert, welche auf die umgebenden Zellen einen Einfluss besitzt.<sup>153</sup> Die endokrine Kommunikation beschreibt die Signalübertragung über die Blutbahn, bspw. durch Hormone.<sup>153</sup>

Die interzelluläre Kommunikation zwischen verschiedenen Tubuluszelltypen, neben dem Tubuloglomerulärem-Feedback, wurde in der Forschung noch nicht häufig beschrieben. Bislang konnte zum Beispiel die Arbeitsgruppe um El-Achkar *et al.* zeigen, dass TAL Zellen über das Tamm-Horsfall Protein inflammatorische Prozesse im *Pars recta* des PT regulieren können. Dies ist unter anderem möglich, da die beiden Segmente an einigen Stellen weniger als 500 nm voneinander getrennt im Gewebe vorliegen.<sup>120</sup> Takaori *et al.* zeigten, dass eine durch das Diphtherie-Toxin induzierte spezifische Schädigung der PT auch zu Schäden an den distalen Tubuli führt.<sup>154</sup> Weitere Beispiele zeigen, dass distale Tubuli extrazelluläre Vesikel des PT aufnehmen können, welches einen weiteren Weg der intrarenalen Kommunikation bietet.<sup>155</sup> Auch ist der distale Tubulus in der Lage viele verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und gefäßaktive Substanzen zu sezernieren, welche auf umliegende Nephronsegmente einen (parakrinen) Einfluss haben können.<sup>121</sup> Als „Vermittler“ aber auch Auslöser können letztlich auch gewebeständige

Immunzellen fungieren, die Signale aufnehmen, umwandeln und durch ihre veränderte Aktivität entzündliche Prozesse in der Umgebung fördern.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten daher mögliche Faktoren bzw. Substanzen identifiziert werden, welche den Schaden durch *Bpgm*-KO am PT provozieren könnten.

### 5.3 Der Einfluss von *Bpgm* auf die Physiologie der Niere

Um die Funktion von *Bpgm* in der Niere näher charakterisieren zu können, wurden die Nieren nach tubulärem *Bpgm*-KO einer massenspektrometrischen Proteom-Analyse unterzogen. Nach der Identifizierung regulierter Signalwege konnte zunächst gezeigt werden, dass verschiedene metabolische Stoffwechselwege, wie der Fettsäure-Stoffwechsel und die Glykolyse durch eine *Bpgm* Deletion in der Niere signifikant reguliert sind. Insbesondere zeigten sich Faktoren der Glykolyse signifikant hochreguliert. Dieser Befund legt nahe, dass BPGM einen hemmenden Einfluss auf die Glykolyserate hat. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte bspw. auch an Astrozyten gezeigt werden, dass die BPGM den glykolytischen Stoffwechselweg unterdrückt.<sup>90</sup> Weiterhin bestätigend zeigten *in vitro* Experimente in Maus DCT sowie MEF-Zellen (MEF, englisch „*mouse embryo fibroblast*“) in der parallel durchgeführten, noch nicht veröffentlichten Dissertation von Kameliya Rögner, dass ein si-RNA vermittelter Knock-down von *Bpgm* zu einem gesteigertem Glukoseverbrauch bei vermehrter Laktatakkumulation führt (persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Oslund *et al.* keinen Einfluss von BPGM auf die Glykolyse-Rate in humanen Zellenlinien nachweisen.<sup>56</sup> Von einem Maus-Mensch Spezies-Unterschied wird an dieser Stelle jedoch nicht ausgegangen, da Menschen mit *Bpgm* Mutationen in Erythrozyten hohe Werte an den glykolytischen Metaboliten 3-PG, Triosephosphaten und Fructose-1,6-diphosphat aufweisen, was auf eine erhöhte Glykolyse-Rate hindeutet.<sup>62</sup>

Eine Hemmung der Glykolyse durch BPGM sollte gravierende Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel haben, da glykolytische Intermediate als Substrate und Signalgeber für vielfältige Prozesse verantwortlich sind.<sup>156-158</sup> Ein im *Bpgm*-KO nennenswertes Beispiel ist die Triosephosphat-Isomerase (TPI1), welches eines der Top 20 hochregulierten Proteine darstellt. TPI1 ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse, welches die Umwandlung zwischen Glyceraldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat katalysiert.<sup>159,160</sup> Neben der Glykolyse trägt TPI1 auch zur Glukoneogenese, dem Pentose-Phosphat-Signalweg und der Fettsäure-Biosynthese bei.<sup>160</sup> Weiterhin kann TPI1 in Krebs-Zellen den PI3K/AKT/mTOR Signalweg aktivieren, welcher Auswirkungen auf die Glykolyse-Rate und die Zellproliferation besitzt.<sup>159</sup> Bestätigend hierzu war

auch im *Bpgm*-KO der Signalweg über mTORC1 signifikant reguliert. mTORC1 kann über verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert werden.<sup>161</sup> Eine veränderte mTOR Aktivität steht in Verbindung mit vielen Nierenpathologien wie renaler Fibrose<sup>162</sup>, chronischem Nierenversagen<sup>163</sup>, polyzystischen Nieren<sup>164</sup> oder auch glomerulären Erkrankungen<sup>161,165</sup>. Weil auch neben mTORC1 der Signalweg Myc Target V1 unter *Bpgm* Deletion reguliert war und dieser Auswirkungen unter anderem auf den Zellzyklus und der Dedifferenzierung von Zellen besitzt<sup>116</sup>, wurden Immunfluoreszenz-Studien mit dem Proliferationsmarker KI-67 sowie den Fibrose- und Dedifferenzierungsmarkern Vimentin und  $\alpha$ -SMA durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass nach *Bpgm*-KO eine Reihe von KIM-1 positiven (geschädigten) proximalen Tubuli auch Proliferations- sowie Dedifferenzierungsprozesse (Vimentin &  $\alpha$ -SMA positiv) durchlaufen. Eine mögliche Erklärung wurde von Endo *et al.* gezeigt: Um sich vor möglichen Schäden zu schützen bzw. geschädigte Epithelzellen zu ersetzen, können PT-Zellen Dedifferenzierungsprozesse durchlaufen.<sup>14</sup> Häufig wird dabei von der Epithelialen zur Mesenchymalen Transition (EMT, englisch „*Epithelial to mesenchymal transition*“) gesprochen. EMT ist ein Prozess, bei dem tubuläre Epithelzellen ihre metabolischen und phänotypischen Eigenschaften verlieren und zu Mesenchymzellen dedifferenzieren. Es wird davon ausgegangen, dass PT-Zellen unter Stress auf diese Weise wieder zur Glykolyseaktivität befähigt werden, wodurch sie einem hypoxischem Schaden entgehen. Dieser Mechanismus steht in der Niere im direkten Zusammenhang mit der Pathogenese von renaler interstitieller Fibrose.<sup>166,167</sup> Verschiedene Faktoren können den EMT Prozess induzieren. Im Typ 2 EMT, welcher zur anschließenden Fibrosierung des Gewebes führen kann, gehören unter anderem im umliegenden Gewebe lokalisierte Fibroblasten oder Immunzellen als Induktoren zu diesem Prozess.<sup>168,169</sup>

Gewebeständige Immunzellen könnten mögliche Signaltransmitter zwischen den distalen und proximalen Tubuli im *Bpgm*-KO darstellen. Entsprechende Untersuchungen zeigten eine Umlagerung von F4/80 positiven Makrophagen um die geschädigten KIM-1 positiven PT. In gesunden Nieren liegen Makrophagen gleichmäßig im Gewebe verteilt vor, wo sie als sogenannte „Wächter“ auf äußere und innere Einflüsse, reagieren können.<sup>170</sup> In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Makrophagen in der Niere hauptsächlich an inflammatorischen aber auch an regenerativen Prozessen beteiligt sind.<sup>171–173</sup> Im Rahmen dieser Studie konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob Makrophagen Auslöser entzündlicher Prozesse (einhergehend mit KIM-1 Positivität) nach *Bpgm*-KO am PT sind, oder ob KIM-1 als Attraktans zur Anlockung der Makrophagen führt. Für beide Möglichkeiten finden sich Beispiele in der Literatur: So zeigten verschiedene Studien, dass bspw. KIM-1 positive renale Epithelzellen auch Makrophagen im umliegenden Gewebe aktivieren können.<sup>174,175</sup> Im Gegensatz dazu können sich, als Antwort auf

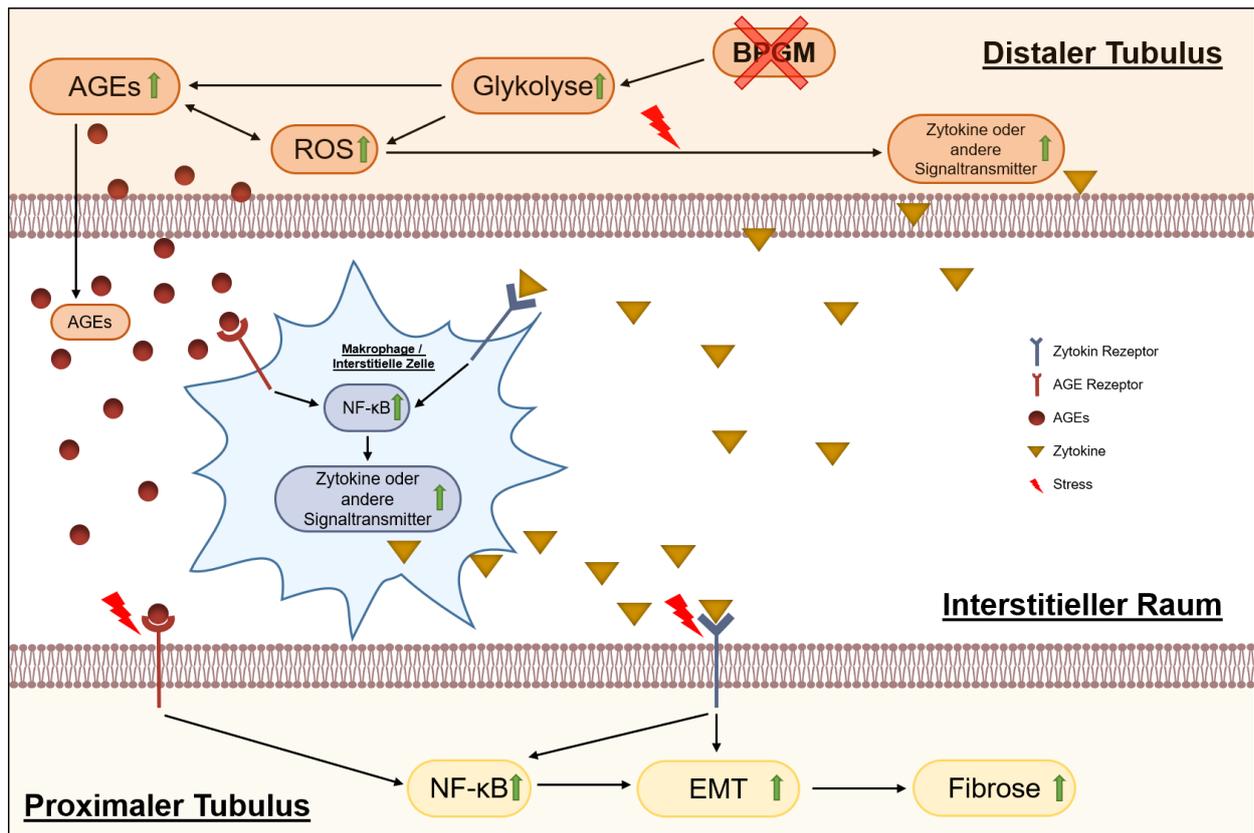
einen inflammatorischen Schaden, Makrophagen an geschädigtes Gewebe anlagern und Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten, welche zu einer verstärkten KIM-1 Akkumulation führen können.<sup>168,176</sup> Dass durch den *Bpgm*-KO inflammatorische Prozesse in der direkten Umgebung ausgelöst werden, wird durch die verstärkte Expression von NFκB, ICAM und TGF-β unterstützt. Weiterführende Studien mit Einzelzell-Transkriptom Analysen im zeitlichen Verlauf nach *Bpgm*-KO, sollen zu dieser Frage Aufschluss geben.

Wie bereits beschrieben, verursacht die *Bpgm* Deletion in der Niere eine Hochregulation der Glykolyse und eines ihrer Schlüsselenzyme TPI1. Bei einem hohen Vorkommen an Glycerinaldehyd-3-Phosphat, welches von TPI1 generiert wird, kann das Metabolit nicht-enzymatisch dephosphoryliert werden, was in einer Generierung von Glycerinaldehyd resultiert.<sup>177</sup> Aus der Verbindung von Glycerinaldehyd mit verschiedenen Proteinen können wiederum für die Zellen toxische glykierte Reaktionsprodukte (AGEs, englisch „*advanced glycation end products*“) entstehen, welche in hohen Konzentrationen zu verschiedenen zellulären Funktionsstörungen führen können.<sup>178</sup> Die Entstehung von AGEs ist auf verschiedenen Wegen möglich, wobei am häufigsten die Maillard Reaktion benannt wird. Bei der Maillard Reaktion verbinden sich nicht-enzymatisch ein reduzierter Zucker (Glukose oder Fruktose) mit einem Protein, Peptid oder einer freien Aminogruppe zu einer Schiff'schen Base.<sup>77</sup> Durch weitere chemische Reaktionen können im Verlauf sogenannte Amadori-Produkte entstehen, welche mit weiteren Aminogruppen an Proteinen oder über Degradation zu reaktiven Carbonylen zu AGEs werden.<sup>77</sup> Neben einer übersteigerten Glykolyserate können AGEs vermehrt auch durch die Lipid-Oxidation bzw. den Fettsäurestoffwechsel entstehen.<sup>77</sup> Überdies wird zwischen endogenen, von der Zelle produzierten, und exogenen, aus prozessierten Lebensmitteln aufgenommenen, AGEs unterschieden.<sup>77</sup> Im Organismus werden AGEs in der Niere frei filtriert und von Epithelzellen via Endozytose absorbiert. Die Moleküle können anschließenden zu AGE Peptiden degradiert und wieder in die Blutzirkulation oder den Urin abgegeben werden.<sup>77,179</sup>

Um eine mögliche Rolle von AGEs aufgrund der übermäßigen Glykolyserate durch den *Bpgm*-KO zu eruieren, wurden weitere Immunfluoreszenz-Studien durchgeführt. Dabei zeigte sich eine deutliche Akkumulation von AGEs im distalen Tubulus des *Bpgm* deletierten Nephrons, welche in direktem Kontakt mit den geschädigten KIM-1 positiven PT liegen. In einer Reihe von Studien zur diabetischen Nephropathie wurde eine Akkumulation von AGEs im PT - jedoch ohne erhöhte Akkumulation in distalen Tubuli - gezeigt.<sup>180-182</sup> Eine spezifische Akkumulation von endogenen AGEs in distalen Tubuli wurde bislang noch nicht beschrieben. Ergänzend dazu konnte der AGE-Rezeptor (RAGE) an interstitiellen Zellen des *Bpgm*-KO nachgewiesen werden, welche direkt an den distalen sowie den geschädigten (KIM-1 positiven) PT lagern. RAGE vermittelt

verschiedene intrazelluläre Signale, zum Beispiel in endothelialen Zellen, Makrophagen und Mikrogliazellen.<sup>183</sup> RAGE wird bei erhöhtem Vorkommen extrazellulärer AGEs verstärkt exprimiert.<sup>184</sup> Daher könnte sich seine verstärkte Präsenz im Interstitium nach *Bpgm*-KO durch eine Akkumulation nach Freisetzung von AGEs aus dem distalen Tubulus erklären. Über die Freisetzung von AGEs aus Zellen können auch benachbarte Zellen beeinflusst werden<sup>178</sup>, was einer parakrinen Signalübertragung entspricht. Hierbei wird in der Literatur vorrangig von der AGE-RAGE Achse gesprochen.<sup>178,185</sup> Durch die AGE-RAGE Bindung kann in der Zelle oxidativer Stress induziert werden - mit anschließender Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B.<sup>186,187</sup> Bestätigend hierzu findet sich auch im *Bpgm*-KO eine signifikante Hochregulation von NF- $\kappa$ B sowohl in Makrophagen als auch den geschädigten PT (siehe Abbildung 18 & Supplement: Tabelle „Differenzielle Genexpression“). Die Kausalität dieses Zusammenhangs muss jedoch noch in weiteren Versuchen näher untersucht werden, da NF- $\kappa$ B in fast allen Zellen der Niere vorkommt.<sup>187</sup>

Die durch RAGE Aktivierung veränderte Immunantwort führt zur Bildung von proinflammatorischen Zytokinen sowie reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffverbindungen.<sup>188</sup> Es wird an dieser Stelle postuliert, dass durch den *Bpgm*-KO distale Tubuli AGEs generieren und sezernieren, welche an RAGE von interstitiellen Zellen und/oder Makrophagen binden. In der Folge kommt es zur NF- $\kappa$ B Hochregulation und weiteren Freisetzung von Zytokinen oder anderen Signaltransmittern, die im weiteren Verlauf zu einer Stressantwort im PT führen. An einigen PT Zellen ist die Stressreaktion so stark, dass ein Dedifferenzierungsprogramm zur Rettung aktiviert wird (Abbildung 22). Tatsächlich konnte bereits eine Verbindung zwischen AGEs und EMT gezeigt werden.<sup>189</sup> In dieser Studie an Ratten zeigten renale Epithelzellen *in vitro*, dass AGEs die Transdifferenzierung stimulieren können<sup>190</sup>. Auch in humanen renalen PT (HK2) Zellen, führten AGEs zu einer verstärkten Expression von fibrotischen Molekülen, EMT-Markern, EZM (extrazelluläre Matrix) Proteinen und ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Stress-induzierten Molekülen.<sup>180</sup> So zeigten Nowotny *et al.*, dass AGEs auch Matrix-Proteine modifizierten, welche im weiteren Verlauf zur zellulären Dedifferenzierung, reduzierter Zelladhäsion - bis hin zum Zelltod beitragen.<sup>191</sup> Induziert durch AGEs, kommt es durch die erhöhte EZM Expression zur renalen Fibrose.<sup>180</sup>



**Abbildung 22: Hypothetischer Mechanismus der durch *Bpgm*-KO verursachten Schädigung der proximalen Tubuli.** Durch den *Bpgm*-KO kommt es zu einer gesteigerten Glykolyserate, was zur Bildung von AGEs und ROS führt. AGEs können in die Umgebung sezerniert werden und treffen als Stress-Signalmoleküle auf den Rezeptor RAGE. Die RAGE Aktivierung an Makrophagen/ interstitiellen Fibroblasten aktiviert NF-κB, was die Synthese weiterer Zytokine antreibt. Insgesamt ergibt sich eine stark pro-inflammatorische Konstellation, die Stress in den proximalen Tubuli auslöst. Diese können den Stress entweder kompensieren, oder versuchen sich durch Dedifferenzierung (EMT) zu retten. In dieser Kaskade werden zeitgleich pro-fibrotische Signalwege aktiviert, die zur Progression des Schadens führen. Abkürzungen: AGEs: englisch „advanced glycation end products“; BPGM: 2,3-Bisphosphoglycerat Mutase; EMT: epithelial-mesenchymale Transition; NF-κB: englisch „Nuclear factor kappa B“; ROS: englisch „Reactive Oxygen Species“.

Neben der verstärkten Bildung von AGEs, wurde eine erhöhte Glykolyse-Rate auch direkt mit einem erhöhtem oxidativen Stress der Zelle in Verbindung gebracht.<sup>192</sup> In einem *Circulus vitiosus* können reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS, englisch „reactive oxygen species“) auch die Entstehung von AGEs begünstigen, was bereits im Kontext der diabetischen Nephropathie näher untersucht wurde.<sup>193,194</sup> Dass es im *Bpgm*-KO zu einem oxidativen Stress kommt, zeigt sich durch die Erhöhung der antioxidativ wirkenden Hämoxigenase-1 (HO-1) in TAL Zellen des Nephrons. Eine Korrelationsanalyse der *Bpgm* und *Hmox1* mRNAs zeigte eine signifikante negative Korrelation, wodurch die These unterstützt wird, dass der *Bpgm*-KO zu verstärkter ROS Bildung führt. Unterstützend konnte im Rahmen der Promotionsarbeit von Kameliya Rögner zur zellulären Funktion der BPGM gezeigt werden, dass der si-RNA vermittelte *Bpgm*-Knockdown *in vitro* zu einer starken Abnahme der ROS-Eliminierungskapazität führt (persönliche Mitteilung). Auch die

ersten *in vivo* Ergebnisse zeigen Indizien für oxidativen Stress im distalen Tubulus nach *Bpgm*-KO, jedoch müssen hierzu noch umfassendere Experimente durchgeführt werden, um den genauen Ursprung der ROS sowie dessen direkte Auswirkungen auf das Nephron zu belegen.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass AGEs und ROS an der tubulären Schadensbildung im *Bpgm*-KO beteiligt sind. Um den genauen Prozess der möglichen AGE Akkumulation in den distalen Tubuli sowie der AGE-RAGE Achse bei der Schädigung der PT zu untersuchen, benötigt es eine genauere Auflösung der in den verschiedenen Zellen vorkommenden Metabolite. Hierfür könnte das neue Verfahren der Einzel-Zell-Metabolom-Analyse<sup>195</sup> für zukünftige Studien eingesetzt werden. Weiterhin muss noch näher untersucht werden, welche konkrete Rolle Makrophagen und interstitielle Zellen in der Pathogenese spielen.

#### 5.4 Ausblick

Der Prozess des EMT ist in vielen Organen (bspw. Niere, Lunge, Leber) mit einer beginnenden Bildung von Fibrose, welche im weiteren Verlauf zu Funktionsstörungen und Organversagen führt, verknüpft.<sup>196-198</sup> Die Fibrosierung der Niere ist ein Ergebnis der vermehrten Akkumulation von EZM im Gewebe, welches im Zusammenhang mit chronischen Nierenversagen (CKD, englisch „*Chronic Kidney Disease*“) zum Verlust der Nierenfunktion und zu einer terminalen Niereninsuffizienz (ESRD, englisch „*End-Stage Renal Disease*“) führen kann.<sup>135,199</sup> Bei der renalen Fibrose wird primär zwischen tubulointerstitieller Fibrose und glomerulärer Sklerose unterschieden.<sup>199,200</sup> Im *Bpgm*-KO konnte neben EMT als Fibrose-Treiber auch weitere Einzelkandidaten identifiziert werden, welche im Zusammenhang mit renaler Fibrose stehen. Hierbei fiel zum Beispiel Peroxidasin homolog (PXDN) auf, welches im *Bpgm*-KO hochreguliert wurde. PXDN ist eine Peroxidase, welche nach TGF- $\beta$ 1 Stimulation sekretiert wird und möglicherweise zur EZM Bildung der Niere beiträgt.<sup>201</sup> Eine veränderte PXDN Expression wurde bereits mit Karzinomen, der renalen Fibrose, angeborenen Augenfehlern und verschiedenen kardiovaskulären Störungen in Zusammenhang gebracht.<sup>202</sup> In verschiedenen Nierenschädigungsmodellen, wie der Unilateralen Uretalen Obstruktion (UUO, englisch „*Unilateral Ureteral Obstruction*“), kann eine Fibrosierung des Gewebes bereits nach 3 Tagen auftreten.<sup>203</sup> In dem hier vorgestellten *Bpgm*-KO Mausmodell, konnte 8 Tage nach *Bpgm* Deletion eine signifikante Erhöhung von fibrotischen Gewebe in der Niere nachgewiesen werden. Bestätigend zu der Sirius-Rot Färbung zeigte sich auch der Marker *Ccl2* signifikant nach 4 und 8 Tagen reguliert. *Ccl2* oder auch bekannt als MCP-1 ist ein Chemokin, welches die Infiltration und Migration von Monozyten/Makrophagen reguliert.<sup>191,204</sup> *Ccl2* wurde in der Literatur bislang mit

der Progressivität der Fibrosierung der Niere<sup>138</sup> in Zusammenhang gebracht und wird als Schlüssel-Mediator in der chronischen Nierenschädigung beschrieben.<sup>137</sup> Weiterhin kann *Ccl2* durch AGEs hochreguliert werden, wodurch im Nierengewebe auch inflammatorische Prozesse aktiviert werden können.<sup>191</sup> Diese Ergebnisse zeigen weitere Hinweise zur Bedeutung der BPGM in der Aufrechterhaltung der Nierenhomöostase. Die Rolle weiterer Schlüsselfaktoren wie PXDN oder CCL2 im *Bpgm*-KO sollte näher charakterisiert werden. In *in vitro* Versuchen sollte weiterhin näher darauf eingegangen werden, welche Funktion das von BPGM gebildete Metabolit 2,3-BPG in den Nierenzellen hat. In weiterführenden Untersuchungen sollten auch spätere Zeitpunkte nach *Bpgm*-KO betrachtet werden. Räumlich aufgelöste Metabolom-Analysen (englisch: *spatial metabolomics*) sollen bei der weiteren Aufklärung der physiologischen und pathophysiologischen BPGM Funktion in der Niere helfen. Es muss noch geklärt werden, ob BPGM oder 2,3-BPG einen spezifischen Transporter besitzen, durch den sie regulatorische Funktionen über die Zelle hinaus ausüben könnten. Ein besonderer Schwerpunkt sollte auch auf der Regulation der BPGM Expression liegen. Ist es möglich die BPGM Expression gezielt zu aktivieren? Wenn ja, führt das zum Schutz vor tubulären Schäden? In dieser Arbeit wurde „nur“ gezeigt, dass der Verlust der BPGM zum Schaden führt, jedoch nicht, ob eine BPGM Erhöhung auch tatsächlich schützen würde. Die verstärkte Expression der BPGM im ANV legt letzteren Zusammenhang jedoch nahe. In einer parallel zu dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass im durch Rhabdomyolyse induzierten ANV auch AGEs eine bedeutende pathologische Rolle spielen (Kulow *et al.* 2024)<sup>205</sup>. Wie bereits in der Einführung dargestellt, hemmen AGEs die BPGM Aktivität, was im *Bpgm*-KO aufgrund des BPGM Mangels jedoch nicht relevant ist. Die verstärkte BPGM Expression in der Rhabdomyolyse könnte somit als zellulärer Versuch der Kompensation betrachtet werden, da AGEs den vermutlich Nieren-protectiven Faktor BPGM blockieren. Somit ergibt sich auch über die BPGM-AGE Achse, durch Hemmung der AGE Formation, ein interessanter pharmakologischer Ansatz zum Schutz der Nierenfunktion im Stress.

## **5.5 Schlussfolgerung**

Die Expression der BPGM im distalen Nephron der Niere ist essentiell zur Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase und renalen Integrität. Die in dieser Arbeit charakterisierten Funktionen und die damit einhergehenden physiologischen Veränderungen der Niere durch eine *Bpgm* Deletion, zeigen eine bislang unbekannte Bedeutung des Enzyms für die Niere und dessen mögliche renoprotektive Funktion. Diese Erkenntnisse können für weiteren Studien zum Verständnis der Nierenerkrankungen und dessen Vermeidung von großer Bedeutung sein. Die

Ergebnisse dieser Studie zeigen auch, dass metabolische Veränderungen in distalen Tubulus-Segmenten zu Schäden des proximalen Tubulus führen können, ohne dass der distale Tubulus selbst Schädigungsmerkmale erkennen lässt. Dieser Befund zeigt deutlich, dass der bisher in der Nierenpathologie weniger berücksichtigte distale Tubulus stärker in die Untersuchungen einbezogen werden sollte. Die in dieser Arbeit aufgezeigte Signalübertragung, insbesondere die durch AGEs, stellt einen möglichen pharmakologischen Ansatzpunkt zum Schutz der Nierenfunktion dar.

## Literaturverzeichnis

1. Behrends, J. C., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., Hoth, M., Kurtz, A., Leipziger, J., Müller, F., Pedain, C., Rettig, J., Wagner, C. & Wischmeyer, E. *Duale Reihe Physiologie*. b000000462 (Georg Thieme Verlag KG, 2021). doi:10.1055/b000000462
2. Segerer, K. & Wanner, C. *Niere und Ableitende Harnwege*. (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-28236-2
3. Keller, C. K. & Geberth, S. *Praxis der Nephrologie: mit 63 Tabellen ; [nach den Leitlinien NKF National Kidney Foundation (K/DOQI), DHL Deutsche Hochdruckliga, EDTA European Best Practice Guidelines (EBPG), DGfN Deutsche Gesellschaft für Nephrologie, KDIGO Kidney Disease: Improving Global Outcome ; mit Dialyse und Transplantation]*. (Springer, 2010).
4. Zhang, W. R. & Parikh, C. R. Biomarkers of Acute and Chronic Kidney Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **81**, 309–333 (2019).
5. Uchino, S., Kellum, J. A., Bellomo, R., Doig, G. S., Morimatsu, H., Morgera, S., Schetz, M., Tan, I., Bouman, C., Macedo, E., Gibney, N., Tolwani, A., Ronco, C., & Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* **294**, 813–818 (2005).
6. Foreman, K. J., Marquez, N., Dolgert, A., Fukutaki, K., Fullman, N., McGaughey, M., Pletcher, M. A., Smith, A. E., Tang, K., Yuan, C.-W., Brown, J. C., Friedman, J., He, J., Heuton, K. R., Holmberg, M., Patel, D. J., Reidy, P., Carter, A., Cercy, K., Chapin, A., Douwes-Schultz, D., Frank, T., Goettsch, F., Liu, P. Y., Nandakumar, V., Reitsma, M. B., Reuter, V., Sadat, N., Sorensen, R. J. D., Srinivasan, V., Updike, R. L., York, H., Lopez, A. D., Lozano, R., Lim, S. S., Mokdad, A. H., Vollset, S. E. & Murray, C. J. L. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories. *Lancet Lond. Engl.* **392**, 2052–2090 (2018).
7. Schweda, F., Segerer, K. & Wanner, C. in *Niere Ableitende Harnwege* (eds. Steffel, J. & Luescher, T.) 3–14 (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-28236-2\_1
8. McBride, J. M. in *Kidney Compr. Guide Pathol. Diagn. Manag.* (eds. Hansel, D. E., Kane, C. J., Paner, G. P. & Chang, S. S.) 1–18 (Springer, 2016). doi:10.1007/978-1-4939-3286-3\_1

9. Lang, F. Grundlagen der Nierenphysiologie: Glomeruläre Filtration und tubulärer Transport. *Pharm. Unserer Zeit* **35**, 294–301 (2006).
10. Nakhoul, N. & Batuman, V. Role of proximal tubules in the pathogenesis of kidney disease. *Contrib. Nephrol.* **169**, 37–50 (2011).
11. Zhuo, J. L. & Li, X. C. in *Compr. Physiol.* 1079–1123 (John Wiley & Sons, Ltd, 2013). doi:10.1002/cphy.c110061
12. Johns, E. J. in *Handb. Clin. Neurol.* (eds. Buijs, R. M. & Swaab, D. F.) **117**, 203–214 (Elsevier, 2013).
13. Gewin, L. S. Renal Fibrosis: Primacy of the Proximal Tubule. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* **68–69**, 248–262 (2018).
14. Endo, T., Nakamura, J., Sato, Y., Asada, M., Yamada, R., Takase, M., Takaori, K., Oguchi, A., Iguchi, T., Higashi, A. Y., Ohbayashi, T., Nakamura, T., Muso, E., Kimura, T. & Yanagita, M. Exploring the origin and limitations of kidney regeneration. *J. Pathol.* **236**, 251–263 (2015).
15. Gonzalez-Vicente, A., Saez, F., Monzon, C. M., Asirwatham, J. & Garvin, J. L. Thick Ascending Limb Sodium Transport in the Pathogenesis of Hypertension. *Physiol. Rev.* **99**, 235–309 (2019).
16. Zacchia, M., Capolongo, G., Rinaldi, L. & Capasso, G. The importance of the thick ascending limb of Henle’s loop in renal physiology and pathophysiology. *Int. J. Nephrol. Renov. Dis.* **11**, 81–92 (2018).
17. Mount, D. B. Thick Ascending Limb of the Loop of Henle. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **9**, 1974–1986 (2014).
18. Bell, P. D., Lapointe, J. Y. & Peti-Peterdi, J. Macula densa cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 481–500 (2003).
19. McCormick, J. A. & Ellison, D. H. The Distal Convolute Tubule. *Compr. Physiol.* **5**, 45–98 (2015).
20. Cheng, L., Poulsen, S. B., Wu, Q., Esteva-Font, C., Olesen, E. T. B., Peng, L., Olde, B., Leeb-Lundberg, L. M. F., Pisitkun, T., Rieg, T., Dimke, H. & Fenton, R. A. Rapid Aldosterone-Mediated Signaling in the DCT Increases Activity of the Thiazide-Sensitive NaCl Cotransporter. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **30**, 1454–1470 (2019).
21. Tahaei, E., Coleman, R., Saritas, T., Ellison, D. H. & Welling, P. A. Distal convolute tubule sexual dimorphism revealed by advanced 3D imaging. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **319**, F754–F764 (2020).

22. Piper, W. Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems. *Inn. Med.* 1–180 (2013). doi:10.1007/978-3-642-33108-4\_1
23. Romero, C. A. & Carretero, O. A. A Novel Mechanism of Renal Microcirculation Regulation: Connecting Tubule-Glomerular Feedback. *Curr. Hypertens. Rep.* **21**, 8 (2019).
24. Frindt, G. & Palmer, L. G. Na channels in the rat connecting tubule. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F669-674 (2004).
25. Wall, S. M. & Lazo-Fernandez, Y. The role of pendrin in renal physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **77**, 363–378 (2015).
26. Leiz, J. & Schmidt-Ott, K. M. Claudins in the Renal Collecting Duct. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 221 (2019).
27. Schaub, J. A., Venkatachalam, M. A. & Weinberg, J. M. Proximal Tubular Oxidative Metabolism in Acute Kidney Injury and the Transition to CKD. *Kidney360* **2**, 355–364 (2020).
28. Swe, M. T., Pongchaidecha, A., Chatsudthipong, V., Chattipakorn, N. & Lungkaphin, A. Molecular signaling mechanisms of renal gluconeogenesis in nondiabetic and diabetic conditions. *J. Cell. Physiol.* **234**, 8134–8151 (2019).
29. Alsahli, M. & Gerich, J. E. Renal glucose metabolism in normal physiological conditions and in diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **133**, 1–9 (2017).
30. Lan, R., Geng, H., Singha, P. K., Saikumar, P., Bottinger, E. P., Weinberg, J. M. & Venkatachalam, M. A. Mitochondrial Pathology and Glycolytic Shift during Proximal Tubule Atrophy after Ischemic AKI. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **27**, 3356–3367 (2016).
31. Jang, H.-S., Noh, M. R., Jung, E.-M., Kim, W.-Y., Southeikal, S., Guda, C., Foster, K. W., Oupicky, D., Ferrer, F. A. & Padanilam, B. J. Proximal tubule cyclophilin D regulates fatty acid oxidation in cisplatin-induced acute kidney injury. *Kidney Int.* **97**, 327–339 (2020).
32. Chen, Y., Fry, B. C. & Layton, A. T. Modeling Glucose Metabolism in the Kidney. *Bull. Math. Biol.* **78**, 1318–1336 (2016).
33. Venkatachalam, M. A., Patel, Y. J., Kreisberg, J. I. & Weinberg, J. M. Energy thresholds that determine membrane integrity and injury in a renal epithelial cell line (LLC-PK1). Relationships to phospholipid degradation and unesterified fatty acid accumulation. *J. Clin. Invest.* **81**, 745–758 (1988).
34. Hoste, E. A. J., Bagshaw, S. M., Bellomo, R., Cely, C. M., Colman, R., Cruz, D. N., Edipidis, K., Forni, L. G., Gomersall, C. D., Govil, D., Honoré, P. M., Joannes-Boyau, O., Joannidis, M., Korhonen, A.-M., Lavrentieva, A., Mehta, R. L., Palevsky, P., Roessler, E., Ronco, C., Uchino, S., Vazquez, J. A., Vidal Andrade, E., Webb, S. & Kellum, J. A. Epidemiology of

- acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med.* **41**, 1411–1423 (2015).
35. Levey, A. S. & James, M. T. Acute Kidney Injury. *Ann. Intern. Med.* **167**, ITC66 (2017).
  36. Thomas, M. E., Blaine, C., Dawnay, A., Devonald, M. A. J., Ftouh, S., Laing, C., Latchem, S., Lewington, A., Milford, D. V. & Ostermann, M. The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney Int.* **87**, 62–73 (2015).
  37. Merker, L. Akutes Nierenversagen. *Diabetol.* **18**, 732–737 (2022).
  38. Scholz, H., Boivin, F. J., Schmidt-Ott, K. M., Bachmann, S., Eckardt, K.-U., Scholl, U. I. & Persson, P. B. Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection. *Nat. Rev. Nephrol.* **17**, 335–349 (2021).
  39. Chu, X., Bleasby, K., Chan, G. H., Nunes, I. & Evers, R. The Complexities of Interpreting Reversible Elevated Serum Creatinine Levels in Drug Development: Does a Correlation with Inhibition of Renal Transporters Exist? *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* **44**, 1498–1509 (2016).
  40. In *Dial. Nephrol. Für Fachpersonal* (eds. Nowack, R., Birck, R. & Weinreich, T.) 9–22 (Springer, 2009). doi:10.1007/978-3-540-72323-3\_2
  41. Ostermann, M., Zarbock, A., Goldstein, S., Kashani, K., Macedo, E., Murugan, R., Bell, M., Forni, L., Guzzi, L., Joannidis, M., Kane-Gill, S. L., Legrand, M., Mehta, R., Murray, P. T., Pickkers, P., Plebani, M., Prowle, J., Ricci, Z., Rimmelé, T., Rosner, M., Shaw, A. D., Kellum, J. A. & Ronco, C. Recommendations on Acute Kidney Injury Biomarkers From the Acute Disease Quality Initiative Consensus Conference: A Consensus Statement. *JAMA Netw. Open* **3**, e2019209 (2020).
  42. Yoon, S.-Y., Kim, J.-S., Jeong, K.-H. & Kim, S.-K. Acute Kidney Injury: Biomarker-Guided Diagnosis and Management. *Medicina (Mex.)* **58**, 340 (2022).
  43. Geng, J., Qiu, Y., Qin, Z. & Su, B. The value of kidney injury molecule 1 in predicting acute kidney injury in adult patients: a systematic review and Bayesian meta-analysis. *J. Transl. Med.* **19**, 105 (2021).
  44. Dieterle, F., Sistare, F., Goodsaid, F., Papaluca, M., Ozer, J. S., Webb, C. P., Baer, W., Senagore, A., Schipper, M. J., Vonderscher, J., Sultana, S., Gerhold, D. L., Phillips, J. A., Maurer, G., Carl, K., Laurie, D., Harpur, E., Sonee, M., Ennulat, D., Holder, D., Andrews-Cleavenger, D., Gu, Y.-Z., Thompson, K. L., Goering, P. L., Vidal, J.-M., Abadie, E., Maciulaitis, R., Jacobson-Kram, D., Defelice, A. F., Hausner, E. A., Blank, M., Thompson, A., Harlow, P., Throckmorton, D., Xiao, S., Xu, N., Taylor, W., Vamvakas, S., Flamion, B., Lima, B. S., Kasper, P., Pasanen, M., Prasad, K., Troth, S., Bounous, D., Robinson-Gravatt,

- D., Betton, G., Davis, M. A., Akunda, J., McDuffie, J. E., Suter, L., Obert, L., Guffroy, M., Pinches, M., Jayadev, S., Blomme, E. A., Beushausen, S. A., Barlow, V. G., Collins, N., Waring, J., Honor, D., Snook, S., Lee, J., Rossi, P., Walker, E. & Mattes, W. Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMEA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat. Biotechnol.* **28**, 455–462 (2010).
45. Al-bataineh, M. M., Kinlough, C. L., Mi, Z., Jackson, E. K., Mutchler, S. M., Emlet, D. R., Kellum, J. A. & Hughey, R. P. KIM-1-mediated anti-inflammatory activity is preserved by MUC1 induction in the proximal tubule during ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **321**, F135–F148 (2021).
  46. Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L. & Sanicola, M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* **273**, 4135–4142 (1998).
  47. Lieberthal, W., Menza, S. A. & Levine, J. S. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* **274**, F315–327 (1998).
  48. Leung, K. C. W., Tonelli, M. & James, M. T. Chronic kidney disease following acute kidney injury-risk and outcomes. *Nat. Rev. Nephrol.* **9**, 77–85 (2013).
  49. Chevalier, R. L. The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **311**, F145–F161 (2016).
  50. Parameswaran, P. & Devarajan, P. in *Crit. Care Nephrol. Third Ed.* (eds. Ronco, C., Bellomo, R., Kellum, J. A. & Ricci, Z.) 1194-1204.e2 (Elsevier, 2019). doi:10.1016/B978-0-323-44942-7.00198-9
  51. Hultström, M., Becirovic-Agic, M. & Jönsson, S. Comparison of acute kidney injury of different etiology reveals in-common mechanisms of tissue damage. *Physiol. Genomics* **50**, 127–141 (2018).
  52. Rayego-Mateos, S., Marquez-Expósito, L., Rodrigues-Diez, R., Sanz, A. B., Guiteras, R., Doladé, N., Rubio-Soto, I., Manonelles, A., Codina, S., Ortiz, A., Cruzado, J. M., Ruiz-Ortega, M. & Sola, A. Molecular Mechanisms of Kidney Injury and Repair. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1542 (2022).
  53. Fähring, M., Mathia, S., Paliege, A., Koesters, R., Mrowka, R., Peters, H., Persson, P. B., Neumayer, H.-H., Bachmann, S. & Rosenberger, C. Tubular von Hippel-Lindau Knockout Protects against Rhabdomyolysis-Induced AKI. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **24**, 1806 (2013).

54. Fothergill-Gilmore, L. A. & Michels, P. A. M. Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**, 105–235 (1993).
55. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
56. Oslund, R. C., Su, X., Haugbro, M., Kee, J.-M., Esposito, M., David, Y., Wang, B., Ge, E., Perlman, D. H., Kang, Y., Muir, T. W. & Rabinowitz, J. D. Bisphosphoglycerate mutase controls serine pathway flux via 3-phosphoglycerate. *Nat. Chem. Biol.* **13**, 1081–1087 (2017).
57. Wang, Y., Wei, Z., Bian, Q., Cheng, Z., Wan, M., Liu, L. & Gong, W. Crystal Structure of Human Bisphosphoglycerate Mutase. *J. Biol. Chem.* **279**, 39132–39138 (2004).
58. Rapoport, S. & Luebering, J. Glycerate-2,3-diphosphatase. *J. Biol. Chem.* **189**, 683–694 (1951).
59. Sasaki, R., Ikura, K., Narita, H., Yanagawa, S. & Chiba, H. 2,3-bisphosphoglycerate in erythroid cells. *Trends Biochem. Sci.* **7**, 140–142 (1982).
60. Chiba, H. & Sasaki, R. Functions, of 2,3-bisphosphoglycerate and its metabolism. *Curr. Top. Cell. Regul.* **14**, 75–116 (1978).
61. Patterson, A., Price, N. C. & Nairn, J. Unliganded structure of human bisphosphoglycerate mutase reveals side-chain movements induced by ligand binding. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 1415–1420 (2010).
62. Rosa, R., Prehu, M. O., Beuzard, Y. & Rosa, J. The first case of a complete deficiency of diphosphoglycerate mutase in human erythrocytes. *J. Clin. Invest.* **62**, 907–915 (1978).
63. McMullin, M. F. The classification and diagnosis of erythrocytosis. *Int. J. Lab. Hematol.* **30**, 447–459 (2008).
64. Patel, S., Jose, A. & Mohiuddin, S. S. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539815/>>
65. Shappell, S. D., Murray, J. A., Nasser, M. G., Wills, R. E., Torrance, J. D. & Lenfant, C. J. Acute change in hemoglobin affinity for oxygen during angina pectoris. *N. Engl. J. Med.* **282**, 1219–1224 (1970).
66. Woodson, R. D., Torrance, J. D., Shappell, S. D. & Lenfant, C. The effect of cardiac disease on hemoglobin-oxygen binding. *J. Clin. Invest.* **49**, 1349–1356 (1970).
67. Bersin, R. M., Kwasman, M., Lau, D., Klinski, C., Tanaka, K., Khorrami, P., DeMarco, T., Wolfe, C. & Chatterjee, K. Importance of oxygen-haemoglobin binding to oxygen transport in congestive heart failure. *Br. Heart J.* **70**, 443–447 (1993).

68. Samaja, M., Mariani, C., Prestini, A. & Cerretelli, P. Acid-base balance and O<sub>2</sub> transport at high altitude. *Acta Physiol. Scand.* **159**, 249–256 (1997).
69. Berglund, B., Gennser, M., Örnham, H., Östberg, C. & Wide, L. Erythropoietin concentrations during 10 days of normobaric hypoxia under controlled environmental circumstances. *Acta Physiol. Scand.* **174**, 225–229 (2002).
70. Wang, G., Huang, Y., Zhang, N., Liu, W., Wang, C., Zhu, X. & Ni, X. Hydrogen Sulfide Is a Regulator of Hemoglobin Oxygen-Carrying Capacity via Controlling 2,3-BPG Production in Erythrocytes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 8877691 (2021).
71. Mulquiney, P. J. & Kuchel, P. W. Model of 2,3-bisphosphoglycerate metabolism in the human erythrocyte based on detailed enzyme kinetic equations1 : equations and parameter refinement. 16 (1999).
72. Holter, P. H. & Refsum, H. E. Erythrocyte 2,3-diphosphoglycerate and erythropoietic activity in rabbits with severe bleeding anaemia superimposed on the early post-natal fall in haemoglobin. *Acta Physiol. Scand.* **124**, 543–547 (1985).
73. Liu, H., Zhang, Y., Wu, H., D’Alessandro, A., Yegutkin, G. G., Song, A., Sun, K., Li, J., Cheng, N.-Y., Huang, A., Wen, Y. E., Weng, T. T., Luo, F., Nemkov, T., Sun, H., Kellems, R. E., Karmouty-Quintana, H., Hansen, K. C., Zhao, B., Subudhi, A. W., Houten, S. J.-V., Julian, C. G., Lovering, A. T., Eltzschig, H. K., Blackburn, M. R., Roach, R. C. & Xia, Y. Beneficial Role of Erythrocyte Adenosine A<sub>2B</sub> Receptor-Mediated AMPK Activation in High Altitude Hypoxia. *Circulation* **134**, 405–421 (2016).
74. Wang, W. & Guan, K.-L. AMP-activated protein kinase and cancer. *Acta Physiol.* **196**, 55–63 (2009).
75. Oakhill, J. S., Scott, J. W. & Kemp, B. E. Structure and function of AMP-activated protein kinase. *Acta Physiol.* **196**, 3–14 (2009).
76. Fujita, T., Suzuki, K., Tada, T., Yoshihara, Y., Hamaoka, R., Uchida, K., Matuo, Y., Sasaki, T., Hanafusa, T. & Taniguchi, N. Human erythrocyte bisphosphoglycerate mutase: inactivation by glycation in vivo and in vitro. *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 1237–1244 (1998).
77. Fotheringham, A. K., Gallo, L. A., Borg, D. J. & Forbes, J. M. Advanced Glycation End Products (AGEs) and Chronic Kidney Disease: Does the Modern Diet AGE the Kidney? *Nutrients* **14**, 2675 (2022).
78. Ramamurthy, Höök & Larsson. An overview of carbohydrate–protein interactions with specific reference to myosin and ageing. *Acta Physiol. Scand.* **167**, 327–329 (1999).

79. Nandhini, A. T. A., Thirunavukkarasu, V. & Anuradha, C. V. Stimulation of glucose utilization and inhibition of protein glycation and AGE products by taurine. *Acta Physiol. Scand.* **181**, 297–303 (2004).
80. Lemarchandel, V., Joulin, V., Valentin, C., Rosa, R., Galactéros, F., Rosa, J. & Cohen-Solal, M. Compound heterozygosity in a complete erythrocyte bisphosphoglycerate mutase deficiency. *Blood* **80**, 2643–2649 (1992).
81. Hoyer, J. D., Allen, S. L., Beutler, E., Kubik, K., West, C. & Fairbanks, V. F. Erythrocytosis due to bisphosphoglycerate mutase deficiency with concurrent glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) deficiency. *Am. J. Hematol.* **75**, 205–208 (2004).
82. Rosa, R., Blouquit, Y., Calvin, M. C., Prome, D., Prome, J. C. & Rosa, J. Isolation, characterization, and structure of a mutant 89 Arg----Cys bisphosphoglycerate mutase. Implication of the active site in the mutation. *J. Biol. Chem.* **264**, 7837–7843 (1989).
83. Galacteros, F., Rosa, R., Prehu, M. O., Najean, Y. & Calvin, M. C. [Diphosphoglyceromutase deficiency: new cases associated with erythrocytosis]. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.* **26**, 69–74 (1984).
84. Rose, Z. B. The Purification and Properties of Diphosphoglycerate Mutase from Human Erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **243**, 4810–4820 (1968).
85. Pritlove, D. C., Gu, M., Boyd, C. A. R., Randeva, H. S. & Vatish, M. Novel Placental Expression of 2,3-Bisphosphoglycerate Mutase. *Placenta* **27**, 924–927 (2006).
86. von Versen-Höyneck, F., Rajakumar, A., Bainbridge, S. A., Gallaher, M. J., Roberts, J. M. & Powers, R. W. Human placental adenosine receptor expression is elevated in preeclampsia and hypoxia increases expression of the A2A receptor. *Placenta* **30**, 434–442 (2009).
87. Bauer, Ch., Ludwig, I. & Ludwig, M. Different effects of 2,3 diphosphoglycerate and adenosine triphosphate on the oxygen affinity of adult and foetal human haemoglobin. *Life Sci.* **7**, 1339–1343 (1968).
88. Weber, R. E. Lacking deoxygenation-linked interaction between cytoplasmic domain of band 3 and HbF from fetal red blood cells. *Acta Physiol.* **191**, 247–252 (2007).
89. Lim, M., Brown, H. M., Kind, K. L., Breen, J., Anastasi, M. R., Ritter, L. J., Tregoweth, E. K., Dinh, D. T., Thompson, J. G. & Dunning, K. R. Haemoglobin expression in in vivo murine preimplantation embryos suggests a role in oxygen-regulated gene expression. *Reprod. Fertil. Dev.* **31**, 724–734 (2019).
90. E, G., Sun, B., Liu, B., Xu, G., He, S., Wang, Y., Feng, L., Wei, H., Zhang, J., Chen, J., Gao, Y. & Zhang, E. Enhanced BPGM/2,3-DPG pathway activity suppresses glycolysis in hypoxic astrocytes via FIH-1 and TET2. *Brain Res. Bull.* **192**, 36–46 (2023).

91. Cai, F.-F., Song, Y.-N., Lu, Y.-Y., Zhang, Y., Hu, Y.-Y. & Su, S.-B. Analysis of plasma metabolic profile, characteristics and enzymes in the progression from chronic hepatitis B to hepatocellular carcinoma. *Aging* **12**, 14949–14965 (2020).
92. Expression of BPGM in renal cancer - The Human Protein Atlas. at <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000172331-BPGM/pathology/renal+cancer>>
93. Zhang, X., Smits, A. H., van Tilburg, G. B., Ovaa, H., Huber, W. & Vermeulen, M. Proteome-wide identification of ubiquitin interactions using UbIA-MS. *Nat. Protoc.* **13**, 530–550 (2018).
94. Walter, W., Sánchez-Cabo, F. & Ricote, M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **31**, 2912–2914 (2015).
95. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. & Cardona, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
96. Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P. & Tamayo, P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* **1**, 417–425 (2015).
97. Simillion, C., Liechti, R., Lischer, H. E. L., Ioannidis, V. & Bruggmann, R. Avoiding the pitfalls of gene set enrichment analysis with SetRank. *BMC Bioinformatics* **18**, 151 (2017).
98. Mathia, S., Paliege, A., Koesters, R., Peters, H., Neumayer, H.-H., Bachmann, S. & Rosenberger, C. Action of hypoxia-inducible factor in liver and kidney from mice with Pax8-rtTA-based deletion of von Hippel-Lindau protein. *Acta Physiol.* **207**, 565–576 (2013).
99. White, J. K., Gerdin, A.-K., Karp, N. A., Ryder, E., Buljan, M., Bussell, J. N., Salisbury, J., Clare, S., Ingham, N. J., Podrini, C., Houghton, R., Estabel, J., Bottomley, J. R., Melvin, D. G., Sunter, D., Adams, N. C., Sanger Institute Mouse Genetics Project, Tannahill, D., Logan, D. W., Macarthur, D. G., Flint, J., Mahajan, V. B., Tsang, S. H., Smyth, I., Watt, F. M., Skarnes, W. C., Dougan, G., Adams, D. J., Ramirez-Solis, R., Bradley, A. & Steel, K. P. Genome-wide generation and systematic phenotyping of knockout mice reveals new roles for many genes. *Cell* **154**, 452–464 (2013).
100. Lang, G. in *Histotechnik Praxislehrbuch Für Biomed. Anal.* (ed. Lang, G.) 169–250 (Springer, 2013). doi:10.1007/978-3-7091-1190-1\_10
101. Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.-C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H.-T., Ma, X.-J. & Luo, Y. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Diagn. JMD* **14**, 22–29 (2012).

102. Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S. & Ralser, M. DIA-NN: neural networks and interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nat. Methods* **17**, 41–44 (2020).
103. UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**, D480–D489 (2021).
104. Perez-Riverol, Y., Bai, J., Bandla, C., García-Seisdedos, D., Hewapathirana, S., Kamatchinathan, S., Kundu, D. J., Prakash, A., Frericks-Zipper, A., Eisenacher, M., Walzer, M., Wang, S., Brazma, A. & Vizcaíno, J. A. The PRIDE database resources in 2022: a hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.* **50**, D543–D552 (2022).
105. Hinze, C., Kocks, C., Leiz, J., Karaiskos, N., Boltengagen, A., Cao, S., Skopnik, C. M., Klocke, J., Hardenberg, J.-H., Stockmann, H., Gotthardt, I., Obermayer, B., Haghverdi, L., Wyler, E., Landthaler, M., Bachmann, S., Hocke, A. C., Corman, V., Busch, J., Schneider, W., Himmerkus, N., Bleich, M., Eckardt, K.-U., Enghard, P., Rajewsky, N. & Schmidt-Ott, K. M. Single-cell transcriptomics reveals common epithelial response patterns in human acute kidney injury. *Genome Med.* **14**, 103 (2022).
106. Motulsky, H. J. & Brown, R. E. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* **7**, 123 (2006).
107. Molitoris, B. A., Sandoval, R. M., Yadav, S. P. S. & Wagner, M. C. Albumin uptake and processing by the proximal tubule: physiological, pathological, and therapeutic implications. *Physiol. Rev.* **102**, 1625–1667 (2022).
108. Moser, S., Sugano, Y., Wengi, A., Fisi, V., Lindtoft Rosenbaek, L., Mariniello, M., Löffing-Cueni, D., McCormick, J. A., Fenton, R. A. & Löffing, J. A five amino acids deletion in NKCC2 of C57BL/6 mice affects analysis of NKCC2 phosphorylation but does not impact kidney function. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* **233**, e13705 (2021).
109. Rosenbaek, L. L., Rizzo, F., Wu, Q., Rojas-Vega, L., Gamba, G., MacAulay, N., Staub, O. & Fenton, R. A. The thiazide sensitive sodium chloride co-transporter NCC is modulated by site-specific ubiquitylation. *Sci. Rep.* **7**, 12981 (2017).
110. Lambers, T. T., Mahieu, F., Oancea, E., Hoofd, L., de Lange, F., Mensenkamp, A. R., Voets, T., Nilius, B., Clapham, D. E., Hoenderop, J. G. & Bindels, R. J. Calbindin-D28K dynamically controls TRPV5-mediated Ca<sup>2+</sup> transport. *EMBO J.* **25**, 2978–2988 (2006).

111. Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. & Bonventre, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* **62**, 237–244 (2002).
112. Ichimura, T., Hung, C. C., Yang, S. A., Stevens, J. L. & Bonventre, J. V. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am. J. Physiol.-Ren. Physiol.* **286**, F552–F563 (2004).
113. Soni, S. S., Cruz, D., Bobek, I., Chionh, C. Y., Nalesso, F., Lentini, P., de Cal, M., Corradi, V., Virzi, G. & Ronco, C. NGAL: a biomarker of acute kidney injury and other systemic conditions. *Int. Urol. Nephrol.* **42**, 141–150 (2010).
114. Qin, Z., Li, H., Jiao, P., Jiang, L., Geng, J., Yang, Q., Liao, R. & Su, B. The value of urinary interleukin-18 in predicting acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Ren. Fail.* **44**, 1717–1731
115. Parikh, C. R., Jani, A., Melnikov, V. Y., Faubel, S. & Edelstein, C. L. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. *Am. J. Kidney Dis. Off. J. Natl. Kidney Found.* **43**, 405–414 (2004).
116. Kim, J., Lee, J. & Iyer, V. R. Global Identification of Myc Target Genes Reveals Its Direct Role in Mitochondrial Biogenesis and Its E-Box Usage In Vivo. *PLoS ONE* **3**, e1798 (2008).
117. Zou, Z., Tao, T., Li, H. & Zhu, X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. *Cell Biosci.* **10**, 31 (2020).
118. Ighodaro, O. M. Molecular pathways associated with oxidative stress in diabetes mellitus. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* **108**, 656–662 (2018).
119. Hashem, R. M., Rashd, L. A., Hashem, K. S. & Soliman, H. M. Cerium oxide nanoparticles alleviate oxidative stress and decreases Nrf-2/HO-1 in D-GALN/LPS induced hepatotoxicity. *Biomed. Pharmacother.* **73**, 80–86 (2015).
120. El-Achkar, T. M. & Dagher, P. C. Tubular cross talk in acute kidney injury: a story of sense and sensibility. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **308**, F1317–F1323 (2015).
121. Gobe, G. C. & Johnson, D. W. Distal tubular epithelial cells of the kidney: Potential support for proximal tubular cell survival after renal injury. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 1551–1561 (2007).
122. Neuhofer, W. & Beck, F.-X. Cell survival in the hostile environment of the renal medulla. *Annu. Rev. Physiol.* **67**, 531–555 (2005).
123. Safirstein, R. L. Am I my brother's keeper?: fratricide in the kidney. *Kidney Int.* **79**, 149–150 (2011).

124. Mahmud, S. A., Manlove, L. S. & Farrar, M. A. Interleukin-2 and STAT5 in regulatory T cell development and function. *JAK-STAT* **2**, e23154 (2013).
125. Wu, Y., Liang, X., Ni, J., Zhao, R., Shao, S., Lu, S., Han, W. & Yu, L. Effect of ISM1 on the Immune Microenvironment and Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 681240 (2021).
126. Beinke, S. & Ley, S. C. Functions of NF- $\kappa$ B1 and NF- $\kappa$ B2 in immune cell biology. *Biochem. J.* **382**, 393–409 (2004).
127. Cossarizza, A., Chang, H.-D., Radbruch, A., Acs, A., Adam, D., Adam-Klages, S., Agace, W. W., Aghaepour, N., Akdis, M., Allez, M., Almeida, L. N., Alvisi, G., Anderson, G., Andrä, I., Annunziato, F., Anselmo, A., Bacher, P., Baldari, C. T., Bari, S., Barnaba, V., Barros-Martins, J., Battistini, L., Bauer, W., Baumgart, S., Baumgarth, N., Baumjohann, D., Baying, B., Bebawy, M., Becher, B., Beisker, W., Benes, V., Beyaert, R., Blanco, A., Boardman, D. A., Bogdan, C., Borger, J. G., Borsellino, G., Boulais, P. E., Bradford, J. A., Brenner, D., Brinkman, R. R., Brooks, A. E. S., Busch, D. H., Büscher, M., Bushnell, T. P., Calzetti, F., Cameron, G., Cammarata, I., Cao, X., Cardell, S. L., Casola, S., Cassatella, M. A., Cavani, A., Celada, A., Chatenoud, L., Chattopadhyay, P. K., Chow, S., Christakou, E., Čičin-Šain, L., Clerici, M., Colombo, F. S., Cook, L., Cooke, A., Cooper, A. M., Corbett, A. J., Cosma, A., Cosmi, L., Coulie, P. G., Cumano, A., Cvetkovic, L., Dang, V. D., Dang-Heine, C., Davey, M. S., Davies, D., De Biasi, S., Del Zotto, G., Cruz, G. V. D., Delacher, M., Bella, S. D., Dellabona, P., Deniz, G., Dessing, M., Di Santo, J. P., Diefenbach, A., Dieli, F., Dolf, A., Dörner, T., Dress, R. J., Dudziak, D., Dustin, M., Dutertre, C.-A., Ebner, F., Eckle, S. B. G., Edinger, M., Eede, P., Ehrhardt, G. R. A., Eich, M., Engel, P., Engelhardt, B., Erdei, A., Esser, C., Everts, B., Evrard, M., Falk, C. S., Fehniger, T. A., Felipe-Benavent, M., Ferry, H., Feuerer, M., Filby, A., Filkor, K., Fillatreau, S., Follo, M., Förster, I., Foster, J., Foulds, G. A., Frehse, B., Frenette, P. S., Frischbutter, S., Fritzsche, W., Galbraith, D. W., Gangaev, A., Garbi, N., Gaudilliere, B., Gazzinelli, R. T., Geginat, J., Gerner, W., Gherardin, N. A., Ghoreschi, K., Gibellini, L., Ginhoux, F., Goda, K., Godfrey, D. I., Goettlinger, C., González-Navajas, J. M., Goodyear, C. S., Gori, A., Grogan, J. L., Grummitt, D., Grützkau, A., Haftmann, C., Hahn, J., Hammad, H., Hämmerling, G., Hansmann, L., Hansson, G., Harpur, C. M., Hartmann, S., Hauser, A., Hauser, A. E., Haviland, D. L., Hedley, D., Hernández, D. C., Herrera, G., Herrmann, M., Hess, C., Höfer, T., Hoffmann, P., Hogquist, K., Holland, T., Höllt, T., Holmdahl, R., Hombrink, P., Houston, J. P., Hoyer, B. F., Huang, B., Huang, F.-P., Huber, J. E., Huehn, J., Hundemer, M., Hunter, C. A., Hwang, W. Y. K., Iannone, A., Ingelfinger, F., Ivison, S. M., Jäck, H.-M., Jani, P. K., Jávega, B., Jonjic, S.,

Kaiser, T., Kalina, T., Kamradt, T., Kaufmann, S. H. E., Keller, B., Ketelaars, S. L. C., Khalilnezhad, A., Khan, S., Kisielow, J., Klenerman, P., Knopf, J., Koay, H.-F., Kobow, K., Kolls, J. K., Kong, W. T., Kopf, M., Korn, T., Kriegsmann, K., Kristyanto, H., Kroneis, T., Krueger, A., Kühne, J., Kukat, C., Kunkel, D., Kunze-Schumacher, H., Kurosaki, T., Kurts, C., Kvistborg, P., Kwok, I., Landry, J., Lantz, O., Lanuti, P., LaRosa, F., Lehuen, A., LeibundGut-Landmann, S., Leipold, M. D., Leung, L. Y. T., Levings, M. K., Lino, A. C., Liotta, F., Litwin, V., Liu, Y., Ljunggren, H.-G., Lohoff, M., Lombardi, G., Lopez, L., López-Botet, M., Lovett-Racke, A. E., Lubberts, E., Luche, H., Ludewig, B., Lugli, E., Lunemann, S., Maecker, H. T., Maggi, L., Maguire, O., Mair, F., Mair, K. H., Mantovani, A., Manz, R. A., Marshall, A. J., Martínez-Romero, A., Martrus, G., Marventano, I., Maslinski, W., Matarese, G., Mattioli, A. V., Maueröder, C., Mazzoni, A., McCluskey, J., McGrath, M., McGuire, H. M., McInnes, I. B., Mei, H. E., Melchers, F., Melzer, S., Mielenz, D., Miller, S. D., Mills, K. H. G., Minderman, H., Mjösberg, J., Moore, J., Moran, B., Moretta, L., Mosmann, T. R., Müller, S., Multhoff, G., Muñoz, L. E., Münz, C., Nakayama, T., Nasi, M., Neumann, K., Ng, L. G., Niedobitek, A., Nourshargh, S., Núñez, G., O'Connor, J.-E., Ochel, A., Oja, A., Ordonez, D., Orfao, A., Orłowski-Oliver, E., Ouyang, W., Oxenius, A., Palankar, R., Panse, I., Pattanapanyasat, K., Paulsen, M., Pavlinic, D., Penter, L., Peterson, P., Peth, C., Petriz, J., Piancone, F., Pickl, W. F., Piconese, S., Pinti, M., Pockley, A. G., Podolska, M. J., Poon, Z., Pracht, K., Prinz, I., Pucillo, C. E. M., Quataert, S. A., Quatrini, L., Quinn, K. M., Radbruch, H., Radstake, T. R. D. J., Rahmig, S., Rahn, H.-P., Rajwa, B., Ravichandran, G., Raz, Y., Rebhahn, J. A., Recktenwald, D., Reimer, D., e Sousa, C. R., Remmerswaal, E. B. M., Richter, L., Rico, L. G., Riddell, A., Rieger, A. M., Robinson, J. P., Romagnani, C., Rubartelli, A., Ruland, J., Saalmüller, A., Saeys, Y., Saito, T., Sakaguchi, S., de-Oyanguren, F. S., Samstag, Y., Sanderson, S., Sandrock, I., Santoni, A., Sanz, R. B., Saresella, M., Sautes-Fridman, C., Sawitzki, B., Schadt, L., Scheffold, A., Scherer, H. U., Schiemann, M., Schildberg, F. A., Schimisky, E., Schlitzer, A., Schlosser, J., Schmid, S., Schmitt, S., Schober, K., Schraivogel, D., Schuh, W., Schüler, T., Schulte, R., Schulz, A. R., Schulz, S. R., Scottá, C., Scott-Algara, D., Sester, D. P., Shankey, T. V., Silva-Santos, B., Simon, A. K., Sitnik, K. M., Sozzani, S., Speiser, D. E., Spidlen, J., Stahlberg, A., Stall, A. M., Stanley, N., Stark, R., Stehle, C., Steinmetz, T., Stockinger, H., Takahama, Y., Takeda, K., Tan, L., Tárnok, A., Tiegs, G., Toldi, G., Tornack, J., Traggiai, E., Trebak, M., Tree, T. I. M., Trotter, J., Trowsdale, J., Tsumakidou, M., Ulrich, H., Urbanczyk, S., van de Veen, W., van den Broek, M., van der Pol, E., Van Gassen, S., Van Isterdael, G., van Lier, R. A. W., Veldhoen, M., Vento-Asturias, S., Vieira, P., Voehringer, D., Volk, H.-D., von Borstel, A., von

- Volkman, K., Waisman, A., Walker, R. V., Wallace, P. K., Wang, S. A., Wang, X. M., Ward, M. D., Ward-Hartstonge, K. A., Warnatz, K., Warnes, G., Warth, S., Waskow, C., Watson, J. V., Watzl, C., Wegener, L., Weisenburger, T., Wiedemann, A., Wienands, J., Wilharm, A., Wilkinson, R. J., Willimsky, G., Wing, J. B., Winkelmann, R., Winkler, T. H., Wirz, O. F., Wong, A., Wurst, P., Yang, J. H. M., Yang, J., Yazdanbakhsh, M., Yu, L., Yue, A., Zhang, H., Zhao, Y., Ziegler, S. M., Zielinski, C., Zimmermann, J. & Zychlinsky, A. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur. J. Immunol.* **49**, 1457–1973 (2019).
128. Lee, P. Y., Wang, J.-X., Parisini, E., Dascher, C. C. & Nigrovic, P. A. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 585–594 (2013).
129. Dos Anjos Cassado, A. F4/80 as a Major Macrophage Marker: The Case of the Peritoneum and Spleen. *Results Probl. Cell Differ.* **62**, 161–179 (2017).
130. Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D. & Maniatis, T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **9**, 899–909 (1995).
131. Freudlsperger, C., Bian, Y., Contag, S., Burnett, J., Coupar, J., Yang, X., Chen, Z. & Van Waes, C. TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* **32**, 1549–1559 (2013).
132. Thornalley, P. J. Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification--a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *Gen. Pharmacol.* **27**, 565–573 (1996).
133. Hamada, Y., Araki, N., Koh, N., Nakamura, J., Horiuchi, S. & Hotta, N. Rapid Formation of Advanced Glycation End Products by Intermediate Metabolites of Glycolytic Pathway and Polyol Pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**, 539–543 (1996).
134. RAUCHMAN, M. & GRIGGS, D. Emerging strategies to disrupt the central TGF- $\beta$  axis in kidney fibrosis. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* **209**, 90–104 (2019).
135. Liu, Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* **69**, 213–217 (2006).
136. Courtoy, G. E., Leclercq, I., Froidure, A., Schiano, G., Morelle, J., Devuyst, O., Huaux, F. & Bouzin, C. Digital Image Analysis of Picrosirius Red Staining: A Robust Method for Multi-Organ Fibrosis Quantification and Characterization. *Biomolecules* **10**, 1585 (2020).
137. Kashyap, S., Osman, M., Ferguson, C. M., Nath, M. C., Roy, B., Lien, K. R., Nath, K. A., Garovic, V. D., Lerman, L. O. & Grande, J. P. Ccl2 deficiency protects against chronic renal injury in murine renovascular hypertension. *Sci. Rep.* **8**, 8598 (2018).

138. Kitagawa, K., Wada, T., Furuichi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Takeya, M., Kuziel, W. A., Matsushima, K., Mukaida, N. & Yokoyama, H. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am. J. Pathol.* **165**, 237–246 (2004).
139. Zhu, Z., Hu, J., Chen, Z., Feng, J., Yang, X., Liang, W. & Ding, G. Transition of acute kidney injury to chronic kidney disease: role of metabolic reprogramming. *Metabolism.* **131**, 155194 (2022).
140. Li, Z., Lu, S. & Li, X. The role of metabolic reprogramming in tubular epithelial cells during the progression of acute kidney injury. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **78**, 5731–5741 (2021).
141. Vallon, V. & Nakagawa, T. Renal Tubular Handling of Glucose and Fructose in Health and Disease. *Compr. Physiol.* **12**, 2995–3044 (2021).
142. Schley, G., Klanke, B., Schödel, J., Forstreuter, F., Shukla, D., Kurtz, A., Amann, K., Wiesener, M. S., Rosen, S., Eckardt, K.-U., Maxwell, P. H. & Willam, C. Hypoxia-Inducible Transcription Factors Stabilization in the Thick Ascending Limb Protects against Ischemic Acute Kidney Injury. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **22**, 2004–2015 (2011).
143. Klocke, J., Kim, S. J., Skopnik, C. M., Hinze, C., Boltengagen, A., Metzke, D., Grothgar, E., Prskalo, L., Wagner, L., Freund, P., Görlich, N., Muench, F., Schmidt-Ott, K. M., Mashreghi, M.-F., Kocks, C., Eckardt, K.-U., Rajewsky, N. & Enghard, P. Urinary single-cell sequencing captures kidney injury and repair processes in human acute kidney injury. *Kidney Int.* **102**, 1359–1370 (2022).
144. Wilson, P. C., Muto, Y., Wu, H., Karihaloo, A., Waikar, S. S. & Humphreys, B. D. Multimodal single cell sequencing implicates chromatin accessibility and genetic background in diabetic kidney disease progression. *Nat. Commun.* **13**, 5253 (2022).
145. Tong, G.-X., Yu, W. M., Beaubier, N. T., Weeden, E. M., Hamele-Bena, D., Mansukhani, M. M. & O’Toole, K. M. Expression of PAX8 in normal and neoplastic renal tissues: an immunohistochemical study. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **22**, 1218–1227 (2009).
146. Rajendran, A., Poncet, N., Oparija-Rogenmozere, L., Herzog, B. & Verrey, F. Tissue-specific deletion of mouse basolateral uniporter LAT4 (Slc43a2) reveals its crucial role in small intestine and kidney amino acid transport. *J. Physiol.* **598**, 5109–5132 (2020).
147. Saritas, T., Cuevas, C. A., Ferdaus, M. Z., Kuppe, C., Kramann, R., Moeller, M. J., Floege, J., Singer, J. D. & McCormick, J. A. Disruption of CUL3-mediated ubiquitination causes proximal tubule injury and kidney fibrosis. *Sci. Rep.* **9**, 4596 (2019).
148. Zager, R. A. Susceptibility of the proximal tubular brush border to acute obstructive injury. *J. Urol.* **127**, 383–386 (1982).

149. Milagres, T., García-Arroyo, F. E., Lanaspa, M. A., Garcia, G., Ishimoto, T., Andres-Hernando, A., Kuwabara, M., Jensen, T., Sato, Y., Glaser, J., Sánchez-Lozada, L. G., Johnson, R. J. & Roncal-Jimenez, C. Rehydration with fructose worsens dehydration-induced renal damage. *BMC Nephrol.* **19**, 180 (2018).
150. Roncal Jimenez, C. A., Ishimoto, T., Lanaspa, M. A., Rivard, C. J., Nakagawa, T., Ejaz, A. A., Cicerchi, C., Inaba, S., Le, M., Miyazaki, M., Glaser, J., Correa-Rotter, R., González, M. A., Aragón, A., Wesseling, C., Sánchez-Lozada, L. G. & Johnson, R. J. Fructokinase activity mediates dehydration-induced renal injury. *Kidney Int.* **86**, 294–302 (2014).
151. De Chiara, L., Conte, C., Semeraro, R., Diaz-Bulnes, P., Angelotti, M. L., Mazzinghi, B., Molli, A., Antonelli, G., Landini, S., Melica, M. E., Peired, A. J., Maggi, L., Donati, M., La Regina, G., Allinovi, M., Ravaglia, F., Guasti, D., Bani, D., Cirillo, L., Becherucci, F., Guzzi, F., Magi, A., Annunziato, F., Lasagni, L., Anders, H.-J., Lazzeri, E. & Romagnani, P. Tubular cell polyploidy protects from lethal acute kidney injury but promotes consequent chronic kidney disease. *Nat. Commun.* **13**, 5805 (2022).
152. Birkmayer, J. G. D. Interzelluläre Kommunikation. *Tumorbiologie* 155–168 (1984). doi:10.1159/000430683
153. Richard, D., Chevalet, P., Pradere, F., Giraud, N. & Soubaya, T. in *Biol. Im Überbl. Grundwissen Lerneinheiten* (eds. Richard, D., Chevalet, P., Pradere, F., Giraud, N. & Soubaya, T.) 70–73 (Spektrum Akademischer Verlag, 2013). doi:10.1007/978-3-8274-2930-8\_13
154. Takaori, K., Nakamura, J., Yamamoto, S., Nakata, H., Sato, Y., Takase, M., Nameta, M., Yamamoto, T., Economides, A. N., Kohno, K., Haga, H., Sharma, K. & Yanagita, M. Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **27**, 2393–2406 (2016).
155. Gildea, J. J., Seaton, J. E., Victor, K. G., Reyes, C. M., Bigler Wang, D., Pettigrew, A. C., Courtney, C. E., Shah, N., Tran, H. T., Van Sciver, R. E., Carlson, J. M. & Felder, R. A. Exosomal transfer from human renal proximal tubule cells to distal tubule and collecting duct cells. *Clin. Biochem.* **47**, 89–94 (2014).
156. Ward, P. S. & Thompson, C. B. Signaling in Control of Cell Growth and Metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a006783 (2012).
157. Rajas, F. & Mithieux, G. in *Mol. Nutr. Carbohydr.* (ed. Patel, V. B.) 173–189 (Academic Press, 2019). doi:10.1016/B978-0-12-849886-6.00021-5

158. Li, T., Liu, M., Feng, X., Wang, Z., Das, I., Xu, Y., Zhou, X., Sun, Y., Guan, K.-L., Xiong, Y. & Lei, Q.-Y. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is activated by lysine 254 acetylation in response to glucose signal. *J. Biol. Chem.* **289**, 3775–3785 (2014).
159. Jin, X., Wang, D., Lei, M., Guo, Y., Cui, Y., Chen, F., Sun, W. & Chen, X. TPI1 activates the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway to induce breast cancer progression by stabilizing CDCA5. *J. Transl. Med.* **20**, 191 (2022).
160. Pekel, G. & Ari, F. Therapeutic Targeting of Cancer Metabolism with Triosephosphate Isomerase. *Chem. Biodivers.* **17**, e2000012 (2020).
161. Fantus, D., Rogers, N. M., Grahammer, F., Huber, T. B. & Thomson, A. W. Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* **12**, 587–609 (2016).
162. Jain, S., Bicknell, G. R., Whiting, P. H. & Nicholson, M. L. Rapamycin reduces expression of fibrosis-associated genes in an experimental model of renal ischaemia reperfusion injury. *Transplant. Proc.* **33**, 556–558 (2001).
163. Diekmann, F., Rovira, J., Carreras, J., Arellano, E. M., Bañón-Maneus, E., Ramírez-Bajo, M. J., Gutiérrez-Dalmau, A., Brunet, M. & Campistol, J. M. Mammalian target of rapamycin inhibition halts the progression of proteinuria in a rat model of reduced renal mass. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **18**, 2653–2660 (2007).
164. Shillingford, J. M., Murcia, N. S., Larson, C. H., Low, S. H., Hedgepeth, R., Brown, N., Flask, C. A., Novick, A. C., Goldfarb, D. A., Kramer-Zucker, A., Walz, G., Piontek, K. B., Germino, G. G. & Weimbs, T. The mTOR pathway is regulated by polycystin-1, and its inhibition reverses renal cystogenesis in polycystic kidney disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5466–5471 (2006).
165. Grahammer, F., Wanner, N. & Huber, T. B. mTOR controls kidney epithelia in health and disease. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* **29 Suppl 1**, i9–i18 (2014).
166. Liu, Y. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *J. Am. Soc. Nephrol.* **15**, 1–12 (2004).
167. Sheng, L. & Zhuang, S. New Insights Into the Role and Mechanism of Partial Epithelial-Mesenchymal Transition in Kidney Fibrosis. *Front. Physiol.* **11**, 569322 (2020).
168. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).

169. Cruz-Solbes, A. S. & Youker, K. in *Kidney Dev. Dis.* (ed. Miller, R. K.) 345–372 (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-51436-9\_13
170. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. *Nature* **496**, 445–455 (2013).
171. Munro, D. A., Wineberg, Y., Tarnick, J., Vink, C. S., Li, Z., Pridans, C., Dzierzak, E., Kalisky, T., Hohenstein, P. & Davies, J. A. Macrophages restrict the nephrogenic field and promote endothelial connections during kidney development. *eLife* **8**, e43271
172. Cao, Q., Harris, D. C. H. & Wang, Y. Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis. *Physiol. Bethesda Md* **30**, 183–194 (2015).
173. Rogers, N. M., Ferenbach, D. A., Isenberg, J. S., Thomson, A. W. & Hughes, J. Dendritic cells and macrophages in the kidney: a spectrum of good and evil. *Nat. Rev. Nephrol.* **10**, 625–643 (2014).
174. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Kaitani, A., Komeno, Y., Nakamura, M., Yamazaki, S., Enomoto, Y., Oki, T., Akiba, H., Abe, T., Komori, T., Morikawa, Y., Kiyonari, H., Takai, T., Okumura, K. & Kitamura, T. TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. *J. Exp. Med.* **207**, 1501–1511 (2010).
175. Humphreys, B. D., Xu, F., Sabbisetti, V., Grgic, I., Movahedi Naini, S., Wang, N., Chen, G., Xiao, S., Patel, D., Henderson, J. M., Ichimura, T., Mou, S., Soeung, S., McMahon, A. P., Kuchroo, V. K. & Bonventre, J. V. Chronic epithelial kidney injury molecule-1 expression causes murine kidney fibrosis. *J. Clin. Invest.* **123**, 4023–4035 (2013).
176. Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F. N., Yang, C.-Q., Kalluri, R., Müller, G. A., Neilson, E. G., Renziehausen, A. & Sasic, Z. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int.* **61**, 1714–1728 (2002).
177. Twarda-Clapa, A., Olczak, A., Białkowska, A. M. & Koziółkiewicz, M. Advanced Glycation End-Products (AGEs): Formation, Chemistry, Classification, Receptors, and Diseases Related to AGEs. *Cells* **11**, 1312 (2022).
178. Takeuchi, M. Toxic AGEs (TAGE) theory: a new concept for preventing the development of diseases related to lifestyle. *Diabetol. Metab. Syndr.* **12**, 105 (2020).
179. Miyata, T., Ueda, Y., Horie, K., Nangaku, M., Tanaka, S., van Ypersele de Strihou, C. & Kurokawa, K. Renal catabolism of advanced glycation end products: the fate of pentosidine. *Kidney Int.* **53**, 416–422 (1998).

180. Huang, K.-H., Guan, S.-S., Lin, W.-H., Wu, C.-T., Sheu, M.-L., Chiang, C.-K. & Liu, S.-H. Role of Calbindin-D28k in Diabetes-Associated Advanced Glycation End-Products-Induced Renal Proximal Tubule Cell Injury. *Cells* **8**, 660 (2019).
181. Al-Hussaini, H. & Kilarkaje, N. Trans-resveratrol mitigates type 1 diabetes-induced oxidative DNA damage and accumulation of advanced glycation end products in glomeruli and tubules of rat kidneys. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **339**, 97–109 (2018).
182. Gugliucci, A. & Bendayan, M. Renal fate of circulating advanced glycated end products (AGE): evidence for reabsorption and catabolism of AGE-peptides by renal proximal tubular cells. *Diabetologia* **39**, 149–160 (1996).
183. Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129–146 (2001).
184. Kay, A. M., Simpson, C. L. & Stewart, J. A. The Role of AGE/RAGE Signaling in Diabetes-Mediated Vascular Calcification. *J. Diabetes Res.* **2016**, 6809703 (2016).
185. Sanajou, D., Ghorbani Haghjo, A., Argani, H. & Aslani, S. AGE-RAGE axis blockade in diabetic nephropathy: Current status and future directions. *Eur. J. Pharmacol.* **833**, 158–164 (2018).
186. Yan, S. D., Schmidt, A. M., Anderson, G. M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y. S., Pinsky, D. & Stern, D. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 9889–9897 (1994).
187. Sanz, A. B., Sanchez-Niño, M. D., Ramos, A. M., Moreno, J. A., Santamaria, B., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. & Ortiz, A. NF-kappaB in renal inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **21**, 1254–1262 (2010).
188. Shen, C.-Y., Lu, C.-H., Wu, C.-H., Li, K.-J., Kuo, Y.-M., Hsieh, S.-C. & Yu, C.-L. The Development of Maillard Reaction, and Advanced Glycation End Product (AGE)-Receptor for AGE (RAGE) Signaling Inhibitors as Novel Therapeutic Strategies for Patients with AGE-Related Diseases. *Mol. Basel Switz.* **25**, 5591 (2020).
189. Burns, W. C., Twigg, S. M., Forbes, J. M., Pete, J., Tikellis, C., Thallas-Bonke, V., Thomas, M. C., Cooper, M. E. & Kantharidis, P. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **17**, 2484–2494 (2006).
190. Oldfield, M. D., Bach, L. A., Forbes, J. M., Nikolic-Paterson, D., McRobert, A., Thallas, V., Atkins, R. C., Osicka, T., Jerums, G. & Cooper, M. E. Advanced glycation end products

- cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J. Clin. Invest.* **108**, 1853–1863 (2001).
191. Nowotny, K., Jung, T., Höhn, A., Weber, D. & Grune, T. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules* **5**, 194–222 (2015).
  192. Zhou, J., Deo, B. K., Hosoya, K., Terasaki, T., Obrosova, I. G., Brosius, F. C. & Kumagai, A. K. Increased JNK phosphorylation and oxidative stress in response to increased glucose flux through increased GLUT1 expression in rat retinal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 3403–3410 (2005).
  193. Yuan, T., Yang, T., Chen, H., Fu, D., Hu, Y., Wang, J., Yuan, Q., Yu, H., Xu, W. & Xie, X. New insights into oxidative stress and inflammation during diabetes mellitus-accelerated atherosclerosis. *Redox Biol.* **20**, 247–260 (2019).
  194. Yamagishi, S. & Matsui, T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**, 101–108 (2010).
  195. Rappez, L., Stadler, M., Triana, S., Gathungu, R. M., Ovchinnikova, K., Phapale, P., Heikenwalder, M. & Alexandrov, T. SpaceM reveals metabolic states of single cells. *Nat. Methods* **18**, 799–805 (2021).
  196. Sisto, M., Ribatti, D. & Lisi, S. Organ Fibrosis and Autoimmunity: The Role of Inflammation in TGF $\beta$ -Dependent EMT. *Biomolecules* **11**, 310 (2021).
  197. Savin, I. A., Zenkova, M. A. & Sen'kova, A. V. Pulmonary Fibrosis as a Result of Acute Lung Inflammation: Molecular Mechanisms, Relevant In Vivo Models, Prognostic and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 14959 (2022).
  198. Yao, L., Hu, X., Dai, K., Yuan, M., Liu, P., Zhang, Q. & Jiang, Y. Mesenchymal stromal cells: promising treatment for liver cirrhosis. *Stem Cell Res. Ther.* **13**, 308 (2022).
  199. Chen, Y.-T., Jhao, P.-Y., Hung, C.-T., Wu, Y.-F., Lin, S.-J., Chiang, W.-C., Lin, S.-L. & Yang, K.-C. Endoplasmic reticulum protein TXNDC5 promotes renal fibrosis by enforcing TGF- $\beta$  signaling in kidney fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **131**, e143645
  200. Cho, M. H. Renal fibrosis. *Korean J. Pediatr.* **53**, 735–740 (2010).
  201. Péterfi, Z., Donkó, Á., Orient, A., Sum, A., Prókai, Á., Molnár, B., Veréb, Z., Rajnavölgyi, É., Kovács, K. J., Müller, V., Szabó, A. J. & Geiszt, M. Peroxidasin Is Secreted and Incorporated into the Extracellular Matrix of Myofibroblasts and Fibrotic Kidney. *Am. J. Pathol.* **175**, 725–735 (2009).
  202. Hanmer, K. L. & Mavri-Damelin, D. Peroxidasin is a novel target of the redox-sensitive transcription factor Nrf2. *Gene* **674**, 104–114 (2018).

203. Iwano, M., Plieth, D., Danoff, T. M., Xue, C., Okada, H. & Neilson, E. G. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J. Clin. Invest.* **110**, 341–350 (2002).
204. Yamagishi, S., Inagaki, Y., Okamoto, T., Amano, S., Koga, K., Takeuchi, M. & Makita, Z. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 20309–20315 (2002).
205. Kulow, V. A., Labes, R., Czopek, C. S., Rosenberger, C. & Föhling, M. Galectin-3 protects distal convoluted tubules in rhabdomyolysis-induced kidney injury. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* (2024). doi:10.1007/s00424-024-02987-0

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Vera Anna Kulow, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die 2,3-Bisphosphoglyceratmutase (BPGM) ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Nieren-Homöostase.“ „2,3-Bisphosphoglycerate mutase (BPGM) is essential to maintain kidney homeostasis.“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

---

Datum

---

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

# Publikationsliste

## Wissenschaftliche Publikationen

1. **Kulow, V. A.**, Labes, R., Czopek, C. S., Rosenberger, C. & Föhling, M. Galectin-3 protects distal convoluted tubules in rhabdomyolysis-induced kidney injury. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* (2024). doi:10.1007/s00424-024-02987-0. *JIP* (2024): 2.9
2. Labes, R., Brinkmann, L., **Kulow, V. A.**, Roegner, K., Mathia, S., Balcerek, B., Persson, P. B., Rosenberger, C. & Föhling, M. Daprodustat prevents cyclosporine-A mediated anemia and peritubular capillary loss. *Kidney International* (2022). doi:10.1016/j.kint.2022.04.025. *JIP* (2022): 18.9
3. **Kulow, V. A.** & Föhling, M. How to increase cellular oxygen availability in COVID-19? *Acta Physiol (Oxf)* 233, e13724 (2021). doi:10.1111/apha.13724. *JIP* (2021): 7.5
4. Schmidt, I. H. E., Gildhorn, C., Böning, M. A. L., **Kulow, V. A.**, Steinmetz, I. & Bast, A. Burkholderia pseudomallei modulates host iron homeostasis to facilitate iron availability and intracellular survival. *PLoS Negl Trop Dis* 12, (2018). doi: 10.1371/journal.pntd.0006096. *JIP* (2018): 4.4

## Eingereichte Manuskripte

1. **Kulow, V. A.**, Roegner, K., Labes, R., Kasim, M., Mathia, S., Czopek, C. S., Bernd, N., Becker, P. N., Ter-Avetisyan, G., Luft, F. C., Enghard, P., Hinze, C., Klocke, J., Eckardt, K.-U., Schmidt-Ott, K. M., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. Beyond Hemoglobin: Critical Role of 2,3-Bisphosphoglycerate Mutase (BPGM) in Kidney Function and Injury
2. Hartung, J., Reuter, S., **Kulow, V. A.**, Föhling, M., Spreckelsen, C., Mrowka, R. Experts fail to reliably detect AI-generated histological data. Published online January 25, 2024:2024.01.23.576647. doi:10.1101/2024.01.23.576647

## Preise

1. Poster-Preis: **Kulow, V. A.**, Rögner, K., Labes, R., Persson, P. B., Rosenberger, C., Fähling, M. (2022). Tubular *Bpgm* knockout leads to acute kidney failure. TRENAL-European Kidney Summer School (EUKISS) 2022.
2. Poster-Preis: Labes, R., Brinkmann, L., **Kulow, V. A.**, Rögner, K., Mathia, S., Balcerek, B., Persson, P. B., Rosenberger, C., Fähling, M. (2022). Cyclosporine-A mediated anemia and capillary rarefaction is ameliorated by Hif stabilizing through daprodustat. 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2022.

## Vorträge

1. Vortrag: Kulow, V. A. (2024). Fabricating Reality: Unveiling the Challenge of AI-Generated Histological Images through Human Perception. Joint Meeting des Institutes für Translationale Physiologie sowie dem Institut für Physiologie der Charité.
2. Vortrag: Kulow, V. A. (2023). The role of 2,3-bisphosphoglycerate mutase (BPGM) in the kidney. Joint Meeting des Institutes für Translationale Physiologie sowie dem Institut für Physiologie der Charité.
3. Postervortrag: Kulow, V. A. (2023). Knockout of renal *Bpgm* induces tubular injury and renal fibrosis. 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2023.
4. Postervortrag: Kulow, V. A. (2022). Knockout of renal BPGM provokes spontaneous kidney injury. 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2022.
5. Vortrag: Kulow, V. A. (2022). *Bpgm* knockout leads to acute kidney injury. Journal Club des Institutes für Translationale Physiologie.

## Poster

1. **Kulow, V. A.**, Rögner, K., Labes, R., Persson, P. B., Rosenberger, C., Fähling, M. (2023). Knockout of renal *Bpgm* induces tubular injury and renal fibrosis. 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2023.
2. Labes, R., **Kulow, V. A.**, Ashraf, M. I., Mathia, S., Leiz, J., Hinze, C., Persson, P. B., Rosenberger, C., Fähling, M. (2023). Cell type specific gene expression profiling following kidney transplantation and/or Cyclosporine A treatment. 15. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2023.

3. **Kulow, V. A.**, Föhling, M., Chernyakov, D., Engel, E., Edemir, B. (2023). Medullary Nfat5 deregulation results in substantial kidney fibrosis. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2023.
4. Labes, R., **Kulow, V. A.**, Ashraf, M. I., Mathia, S., Leiz, J., Hinze, C., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2023). Spatial resolution of gene expression by single cell sequencing analysis in a mouse model of kidney transplantation and immunosuppression. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2023.
5. Labes, R., Brinkmann, L., **Kulow, V. A.**, Rögner, K., Mathia, S., Balcerek, B., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2022). Cyclosporine-A mediated anemia and capillary rarefaction is ameliorated by Hif stabilizing through daprodustat. 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2022.
6. Rögner, K., **Kulow, V. A.**, Labes, R., Berndt, N., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2022). Cellular Function of renal 2,3-Bisphosphoglycerate Mutase (BPGM). 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2022.
7. **Kulow, V. A.**, Rögner, K., Labes, R., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2022). Knockout of Renal BPGM Leads to Acute Kidney Injury. Europhysiology 2022.
8. Rögner, K., **Kulow, V. A.**, Labes, R., Berndt, N., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2022). Function of 2,3-Bisphosphoglycerate Mutase (BPGM) in non-Hemoglobin Harbouring Cells. Europhysiology 2022.
9. Labes, R., Brinkmann, L., **Kulow, V. A.**, Rögner, K., Mathia, S., Balcerek, B., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2022). Phd inhibition reduces anemia and capillary rarefaction in the setting of Cyclosporine-A induced nephrotoxicity. Europhysiology 2022.
10. Rögner, K., **Kulow, V. A.**, Labes, R., Berndt, N., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2022). Function of 2,3-Bisphosphoglycerate Mutase (BPGM) in non-Hemoglobin Harbouring Cells. TRENAL-European Kidney Summer School (EUKISS) 2022.
11. **Kulow, V. A.**, Rögner, K., Labes, R., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2022). Tubular *Bpgm* knockout leads to acute kidney failure. TRENAL-European Kidney Summer School (EUKISS) 2022.
12. Spasova, K., **Kulow, V. A.**, Mrowka, R., Labes, R., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2021). Regulation of renal 2,3-bisphosphoglycerate mutase (BPGM). 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2021.
13. Labes, R., Brinkmann, L., **Kulow, V. A.**, Mathia, S., Balcerek, B., Spasova, K., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2021). Proteomic analysis of cyclosporine-A nephropathy. 13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2021.

14. Labes, R., Brinkmann, L., Mathia, S., Balcerek, B., **Kulow, V. A.**, Spasova, K., Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2020). Protein-Signature of Early Cyclosporin A-induced Renal Injury. 12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2020.
15. Labes, R., Brinkmann, L., Mathia, S., Balcerek, B., **Kulow, V. A.**, Persson, P. B., Rosenberger, C., Föhling, M. (2019). Pharmacological HIF Activation in Cyclosporin-A Mediated Nephrotoxicity. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft 2019.

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Pontus Persson meinen tiefsten Dank aussprechen, der es mir ermöglichte, meine praktischen Arbeiten zu diesem Thema am Institut für Translationale Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchzuführen.

Mein größter Dank gilt meinen beiden Betreuern, Prof. Dr. Michael Fähling und Prof. Dr. Christian Rosenberger, für ihre herausragende und unermüdliche Betreuung und Unterstützung während meiner Dissertation. Ich habe mehr gelernt, als ich mir zu Beginn hätte vorstellen können.

Ein herzliches Dankeschön geht an Dr. Robert Labes für seine Geduld und sein Wissen, mit dem er mir stets zur Seite stand. Auch möchte ich ihm danken für die Auswertung der Proteomischen Analyse sowie der Auswertung der Sirius-Rot Färbung.

Für die Bereitstellung der Einzelzell-Sequenzierungsdaten möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Kai Schmidt-Ott und Dr. Kai-Uwe Eckardt aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie der Charité bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Michael Mülleider und Dr. Kathrin Textoris-Taube vom Institut für Biochemie der Charité für die Durchführung der proteomischen Analyse.

Ein besonderer Dank geht an Jeannette Schmidt, deren praktische Anleitung mir stets eine große Hilfe war. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Studenten des Instituts für Translationale Physiologie bedanken, die für eine sehr angenehme Atmosphäre im Labor gesorgt und mich immer wieder tatkräftig unterstützt haben.

Danke auch an Prof. Dr. Holger Scholz für die Unterstützung im Feinschliff dieser Dissertation.

Mein tiefster Dank gilt auch meiner Mutter und meiner Schwester, die mir mit all ihrer Unterstützung stets zur Seite standen.

Zu guter Letzt möchte ich Julian Westphal ein riesiges Dankeschön aussprechen. Ohne dich an meiner Seite wäre mein Leben nur halb so schön.