

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**RESIDENTE DENDRITISCHE ZELLEN BEGRENZEN DIE
POSTISCHÄMISCHE AKUTE NIERENSCHÄDIGUNG
MIT HILFE VON
SINGLE IMMUNOGLOBULIN IL-1 RECEPTOR-RELATED PROTEIN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Alejandro Avila Ferrufino

aus München

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesniler
Prof. Dr. Thomas Brocker
PD Dr. med. Ulrich Dendorfer

Betreuung durch

promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. hum. biol. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2013

Die vorliegende Dissertation wurde von Januar 2008 bis Dezember 2010 in der Abteilung für klinische Biochemie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität durchgeführt (Direktor Prof. Dr. med. M. Reincke).

Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders
und PD Dr. rer. hum. biol. Maciej Lech

„El grado supremo de la medicina es el amor. El amor es lo que guía al arte y fuera de él nadie puede ser llamado médico. Hablar y decir buenas palabras es oficio de la boca. Ayudar y ser útil es oficio del corazón. El médico procede de Dios, crece en el corazón y se perfecciona con la luz natural de la experiencia. En ningún sitio es el amor más grande que en el corazón de un médico“

-Paracelsus-

Es ese el amor que mis padres plantaron en mi corazón, Doña Juana Irene Ferrufino de Avila y Don Roso Avila Bejarano. Es a ellos a quien dedico esta tesis con amor profundo y gratitud eterna, al igual que a mis queridos hermanos y a toda mi amada familia en el Viejo y Nuevo Mundo.

Gracias por estar siempre a mi lado.

DANKSAGUNG

Mein aufrichtigster Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders dafür, dass er mich in seiner Arbeitsgruppe aufnahm und mir so die Chance gab meine ersten Schritte in der Forschung zu tun und an diesem für mich persönlich sehr interessanten Thema zu arbeiten. Auch für seine fachliche und motivierende Unterstützung und die exzellente Betreuung sei ihm herzlich gedankt. Durch seinen starken persönlichen Einsatz war es mir und meinen Kollegen ermöglicht, unsere Arbeiten zum Teil auf internationalem Niveau zu präsentieren und so wunderschöne und wertvolle Erfahrungen zu sammeln. Nicht zuletzt dank seines Engagements gab er mir die Chance, in das DFG-Graduierten Kolleg 1202 der LMU aufgenommen zu werden.

Ich danke daher auch Herrn Prof. Dr. med. Stephan Endres für die freundliche Aufnahme in das Graduiertenkolleg. Durch seine sehr menschliche Art und seine persönliche Unterstützung war die Zeit als Stipendiat des Graduiertenkollegs eine zusätzliche Bereicherung.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. rer. hum. biol. Maciej Lech. Er hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, in dem er mich sehr viele Methoden lehrte und mit steter Motivation und seinem gesunden Humor durch diese sehr intensive Zeit geführt hat. Ohne seine Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Für seine Freundschaft auch über die Zeit im Labor hinaus bin ich ihm sehr dankbar.

Besonders danken möchte ich auch Stephanie Pfeiffer, Heni Eka Susanti und Patricia Lemnitzer für ihre professionelle Unterstützung und Assistenz bei der Planung und Durchführung von Versuchen. Ohne sie wäre die Zeit im Labor längst nicht so schön gewesen

Ewa Randomska danke ich für ihre ruhige und höfliche Art, und ihre unersetzbare Hilfe bei allen Belangen der EDV. Jana Mandelbaum und Dan Draganovici danke ich für die Hilfe bei sämtlichen immunhistologischen und histologischen Techniken.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach und Herrn Dr. Alexander Khandoga MD für ihren exzellenten Beitrag. Die Intravitalmikroskopie-Daten sind eine Bereicherung für dieses Thema.

Die Besten am Schluss: Holger Hägele, Dr. med. Liliana Castrezana Lopez, Dr. hum. biol. Onkar Kulkarni, Mi Ryu, Dr. med. Veronika Skuginna, Dr. hum. biol. Ramanjaneyulu Allam, Dr. hum. biol. Sufyan Ali Sayyed, Dr. med. Peter Kurktschiev, Dr. med. Sebastian Clauß, Dr. hum. biol. Rahul D. Pawar und Dr. med. Katharina Flür. Dank ihnen war die Laborzeit nicht nur intensiv und anstrengend sondern auch eine Zeit voller schöner Momente und wundervoller Erfahrungen, die ich nicht missen will. Lange Diskussionen, lange und internationale Abende, Hilfe und Unterstützung, wertvoller Input, Motivation, Kreativität, Witz, Kaffee, Talent, Kritik, Sultan's, schöne Ausflüge, Musik und Konzerte: ich danke Euch für alles!

Förderung der Arbeit

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 1202: „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft absolviert und durch dieses gefördert.

Rechtliche Grundlage der Tierversuche

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffe an Versuchstieren wurde darauf geachtet, das Leiden der Versuchstiere auf ein Minimum zu reduzieren. Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche waren durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt worden.

Aus dieser Arbeit ging folgende Publikation hervor

Lech M.* & Avila-Ferrufino A.*, Ramanjaneyulu A., Segerer S., Khandoga A., Krombach F., Garlanda C., Mantovani A., Anders H.-J., Resident Dendritic Cells Prevent Postischemic Acute Renal Failure by Help of Single Ig IL-1 Receptor-Related Protein, *J Immunol* 2009; 183:4109-18

* geteilte Erstautorenschaft

Die Ergebnisse wurden präsentiert

Vorträge

1. Alejandro Avila Ferrufino, *Ischämie – und Reperfusionssimulation in vitro bei Tubulusepithelzellen und renalen Dendritischen Zellen*, „Junge Niere“, Mai 2008, Charité Berlin-Mitte
2. Alejandro Avila Ferrufino, *SIGIRR/TIR8 suppresses Innate Immunity in Ischemia/Reperfusion-Injury*, *GraKo Annual Retreat - Statusseminar des Graduiertenkollegs 1202 Oligonucleotides in Cell Biology and Therapy*, 18. September 2008, Kloster Frauenchiemsee, Fraueninsel

3. Alejandro Avila-Ferrufino, Maciej Lech, Alexander Khandoga, Fritz Krombach, Cecilia Garlanda, Alberto Mantovani, Hans-Joachim Anders, *Intrarenale dendritische Zellen unterdrücken postischämes Nierenversagen mittels SIGIRR, einem endogenen TLR/IL-1R Inhibitor*, Munich Nephrology Forum Award, Fellows Night des Münchner Nephrologischen Forums am 14. Juli 2009, Physiologisches Institut der LMU, München

Auszeichnungen

Posterpreis der DGIM beim 115. Kongress der DGIM am 21. April 2009, Wiesbaden
Alejandro Avila Ferrufino, Maciej Lech, Hans-Joachim Anders, *Intrarenale CD11b+ Antigen-präsentierende Zellen unterdrücken die postischämische akute Nierenschädigung mittels SIGIRR, einem endogenen Toll-like Rezeptor/IL-1R Inhibitor*

Erklärung:

Von der Vielzahl der aufgeführten Methoden hat Herr Avila folgende unter Anleitung alleine durchgeführt: sämtliche histopathologischen Auswertungen (SIGIRR vs. Wildtyp, chimäre Tieren nach KM-Transplantation), alle Fotografien, die Etablierung und Durchführung aller *in vitro*-Ischämie/Reperfusion-Versuche, die Analyse der verschiedenen Kulturmedien nach I/R mittels ELISA (IL-6, CCL2/MCP-1, CXCL2/MIP-2, CCL5/RANTES), die Isolierung und Kultur der primären Tubulusepithelzellen und primären CD11b⁺-Zellen und deren Analyse bei I/R *in vitro*, die Vorbereitung der Proben für die RNA-Analyse, sowie die statistische Auswertung. Bei folgenden hat er assistiert: Induktion der unilateralen Ischämie bei den Versuchstieren, RNA-Analysen mittels PCR. Die *in-vivo*-Mikroskopieversuche wurden dankenswerterweise am Walter Brendel Zentrum für Chirurgische Forschung von der AG Prof. Krombach durchgeführt und sind deshalb nicht im Methodenteil aufgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	DAS AKUTE NIERENVERSAGEN	1
1.1.	DEFINITION DER AKUTEN NIERENSCHÄDIGUNG	1
1.2.	EPIDEMIOLOGIE DER AKUTEN NIERENSCHÄDIGUNG	3
1.3.	ÄTIOLOGIE DER AKUTEN NIERENSCHÄDIGUNG	4
1.4.	PATHOPHYSIOLOGIE DER ISCHÄMISCHEN AKUTEN NIERENSCHÄDIGUNG.....	7
2.	DIE ROLLE DES IMMUNSYSTEMS BEI ISCHÄMIE UND REPERFUSION	14
2.1.	DAS IMMUNSYSTEM	15
2.1.1.	<i>Das angeborene Immunsystem.....</i>	<i>15</i>
2.1.2.	<i>Das adaptive Immunsystem.....</i>	<i>17</i>
2.2.	DIE ROLLE DER TOLL-LIKE REZEPTOREN BEI ISCHÄMIE UND REPERFUSION	18
2.2.1.	<i>Toll-like Rezeptoren</i>	<i>18</i>
2.2.2.	<i>Toll-like Rezeptoren und die akute ischämische Nierenschädigung.....</i>	<i>21</i>
2.3.	RENALE DENDRITISCHE ZELLEN UND IHRE ROLLE BEI ISCHÄMIE UND REPERFUSION	26
2.3.1.	<i>Ursprung und Eigenschaften der dendritischen Zellen</i>	<i>26</i>
2.3.2.	<i>Renale dendritische Zellen</i>	<i>28</i>
2.3.3.	<i>Renale dendritische Zellen bei Ischämie/Reperfusion</i>	<i>30</i>
2.4.	TOLL-LIKE REZEPTOREN UND IHRE REGULATION	32
2.4.1.	<i>Charakterisierung von SIGIRR.....</i>	<i>33</i>
2.4.2.	<i>Die (inhibitorische) Funktion von SIGIRR/TIR8</i>	<i>37</i>
2.4.3.	<i>Hypothese: Die Rolle von SIGIRR/TIR8 bei renaler Ischämie/Reperfusion.....</i>	<i>39</i>
3.	MATERIAL UND METHODEN	41
3.1.	MATERIAL.....	41
3.1.1.	<i>Tierhaltung</i>	<i>41</i>
3.1.2.	<i>Geräte</i>	<i>41</i>
3.1.3.	<i>Chemikalien und Material.....</i>	<i>43</i>
3.1.4.	<i>Narkose der Versuchstiere</i>	<i>49</i>
3.1.5.	<i>Clodronat.....</i>	<i>49</i>
3.1.6.	<i>Software.....</i>	<i>50</i>
3.2.	METHODEN.....	50
3.2.1.	<i>Tierversuche</i>	<i>50</i>
3.2.1.1.	<i>Versuchstierhaltung</i>	<i>50</i>
3.2.1.2.	<i>Versuchstiere: SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäuse.....</i>	<i>50</i>
3.2.1.3.	<i>Induktion einer transienten Ischämie und Reperfusion</i>	<i>50</i>
3.2.1.4.	<i>Versuchstiere: Chimäre Mäuse.....</i>	<i>54</i>
3.2.1.5.	<i>Clodronat-Injektion</i>	<i>55</i>
3.2.1.6.	<i>Bestimmung der Serumkreatinin-Konzentration.....</i>	<i>55</i>

3.2.2. Zellkultur	56
3.2.2.1. Kulturbedingungen.....	56
3.2.2.2. Auftauen und Einfrieren der MTC-Zelllinie	56
3.2.2.3. Kulturbedingungen und Zellpassage	57
3.2.2.4. Isolation und Kultur primärer muriner Tubulusepithelzellen.....	58
3.2.2.5. Isolation und Kultur primärer renaler Antigen-präsentierender Zellen	59
3.2.2.6. Experiment zu Ischämie und Reperfusion <i>in vitro</i>	60
3.2.3. Gewebe- und Immunhistochemie und histopathologische Auswertung	63
3.2.3.1. Gewebe- und Immunhistochemie	63
3.2.3.2. Histopathologische Auswertung.....	65
3.2.4. ELISA.....	67
3.2.4.1. Prinzip	67
3.2.4.2. Bestimmung der IL-6-Konzentration	68
3.2.4.3. Bestimmung der CCL2/MCP-1-Konzentration.....	68
3.2.4.4. Bestimmung der CXCL2/MIP-2-Konzentration.....	69
3.2.4.5. Bestimmung der CCL5/RANTES-Konzentration.....	70
3.2.5. Western Blot.....	70
3.2.6. RNA-Analyse	71
3.2.6.1. Isolierung von RNA aus Gewebe	72
3.2.6.2. Synthese der cDNA.....	73
3.2.6.3. RT-PCR (Light Cycler 480).....	74
4. ERGEBNISSE	76
4.1. EFFEKTE VON RENALER ISCHÄMIE UND REPERFUSION BEI SIGIRR-DEFIZIENZ IN VIVO	76
4.1.1. <i>SIGIRR/TIR8</i> wird bei Ischämie und Reperfusion exprimiert	76
4.1.2. <i>SIGIRR</i> -Defizienz führt zu einer verstärkten akuten ischämischen Nierenschädigung	81
4.1.3. <i>SIGIRR/TIR8</i> unterdrückt die frühe Expression von IL-6, CCL2/MCP-1 und CXCL2/MIP2... ..	85
4.1.4. Gesteigerte postischämische Leukozyteninfiltration bei <i>SIGIRR</i> ^{-/-}	89
4.1.5. Transendotheliale Leukozytenmigration bei Reperfusion	92
4.2. EFFEKTE VON ISCHÄMIE UND REPERFUSION IN VITRO.....	97
4.2.1. Etablierung eines <i>in vitro</i> -Ischämie/Reperfuionsmodells.....	98
4.2.2. Postischämische Zyto- und Chemokinfreisetzung in renalen Zellen.....	101
4.2.3. <i>SIGIRR</i> -Defizienz in Antigen-präsentierenden Zellen bestimmt den Phänotyp nach Ischämie/Reperfusion.....	104
4.3. DEPLETION SIGIRR-DEFIZIENTER DENDRITISCHER ZELLEN VERHINDERT DAS POSTISCHÄMISCHE AKUTE NIERENVERSAGEN	108
5. DISKUSSION	111
6. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	125
LITERATURVERZEICHNIS.....	128
ABKÜRZUNGEN	136

1. Das Akute Nierenversagen

Das akute Nierenversagen hat viele unterschiedliche Definitionen und eine bisher recht uneinheitliche Klassifikation. Eine Untersuchung fand über 35 unterschiedliche Definitionen in der wissenschaftlichen Literatur [1]. Sogar die pathophysiologischen Grundlagen sind noch lange nicht erschöpflich und detailliert erforscht, von einer absolut einheitlichen Definition und einheitlichen diagnostischen Kriterien abgesehen [2]. Zumindest die RIFLE-Kriterien stellen eine sinnvolle und praktikable Klassifikation für die klinische Anwendung dar. Nach den neuen Erkenntnissen ist es notwendig geworden, den Begriff „akutes Nierenversagen“ (ANV, engl. *acute renal failure [ARF]*) auf Grund seiner uneinheitlichen Anwendung durch den Begriff „akute Nierenschädigung“ (engl. *acute kidney injury [AKI]*) zu ersetzen [3],[4], da dieser Begriff den Ursachen, den pathophysiologischen Vorgängen und Veränderungen gerechter wird. Dieser Begriff beschreibt ein Syndrom, dessen Spektrum von kleinen, kaum messbaren Veränderungen der Nierenfunktion bis hin zum totalen Nierenversagen mit indizierter Nierenersatztherapie reicht. Akute Nierenschädigung ist daher nicht gleich akutes Nierenversagen und auch nicht gleich akute Tubulusnekrose (ATN), sondern beinhaltet Elemente beider Entitäten und noch weitere [5].

1.1. Definition der Akuten Nierenschädigung

Der Begriff akute Nierenschädigung beschreibt eine Erkrankung der Niere bzw. ein Syndrom mit akutem Beginn und einem raschen und potentiell lebensgefährlichen Verlauf, wenn nicht schnellst möglich die adäquate Therapie begonnen wird [6]. Dabei lassen sich klinisch folgende drei Phänomene beim Patienten beobachten: es kommt zu einer anhaltenden relevanten Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) innerhalb weniger Stunden bis Tage, die mit einer Oligurie (Urinproduktion < 500ml/24 Stunden [7]) bzw. Anurie (Urinproduktion < 100 ml/24 Stunden [7]) einhergeht und es lässt sich ein Anstieg des Serumkreatininspiegels > 50 % des Ausgangswertes [7] bis hin zum Anstieg des Serumharnstoffes bzw. anderer harnpflichtiger Substanzen feststellen. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass bei bis zu 30 % der Patienten auch eine normale Harnproduktion oder gar eine Polyurie auftritt und in diesen Fällen keine Änderung der Diurese beobachtet werden kann [2, 6, 7]. Zusätzlich tritt eine Störung des extrazellulären Kompartimentes in Form von Elektrolytverschiebung, Veränderungen der Menge freien Wassers und Retention stickstoffhaltiger Metaboliten ein. Als weitere Komplikation ist mit einer Störung des Säure-Basen-Haushaltes zu rechnen. Ebenso können die Synthese des Renins, des Erythropoetins und die Vitamin-D3-Decarboxylierung beeinträchtigt sein. Dabei ist die akute Nierenschädigung prinzipiell

reversibel, wenn die Ursachen erkannt und beseitigt werden [6]. Die vor einigen Jahren durch mehrere Fachgesellschaften, hier v.a. durch die *Acute Dialysis Quality Initiative* (ADQI), festgelegten RIFLE-Kriterien (s. Abb. 1), bieten einen Konsensus in der Diagnostik der akuten Nierenschädigung. Die RIFLE-Kriterien sind wie bei den anderen beiden großen Erkrankungsentitäten der Intensivmedizin, nämlich die Sepsis und das ARDS, standardisiert und allgemeingültig festgelegt, um Vergleichbarkeit und eine einheitliche Diagnose- und Therapiebasis sicherzustellen. Dabei ist RIFLE ein Akronym für drei Schweregrade, nämlich **Risk** (engl. Risiko), **Injury** (engl. Schaden) und **Failure** (engl. Ausfall) und zwei Outcome-Grade, nämlich **Loss of renal function** (engl. Verlust der Nierenfunktion) und **End Stage Kidney Disease** (engl. terminale Nierenerkrankung). Die Einteilung in drei Schweregrade basiert auf Veränderung der Serumkreatinin-Konzentration oder der Diurese. Die Outcome-Grade beziehen sich auf die Dauer der Nierenfunktionsstörung [8, 9].

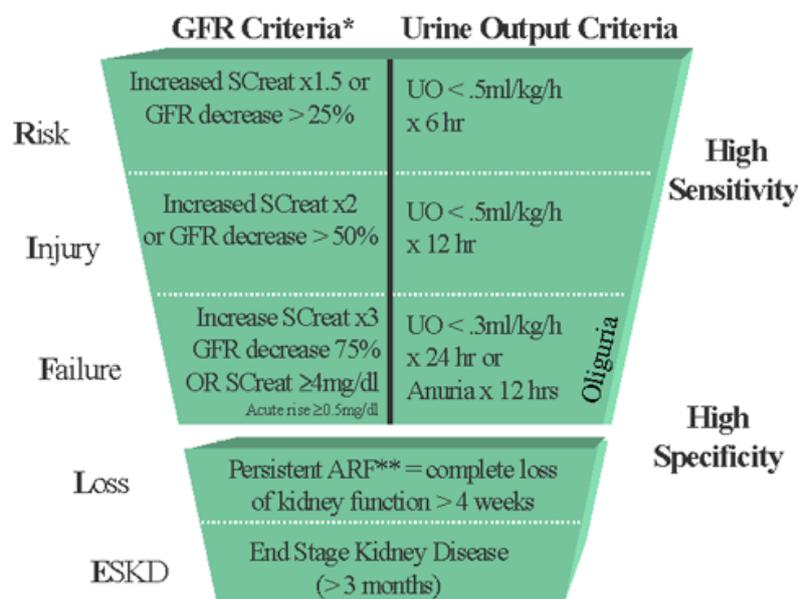


Abb. 1: RIFLE-Kriterien

2004 konnte erstmals ein Konsens durch die ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative) veröffentlicht werden, die sog. RIFLE-Kriterien. SCreat = Serumkreatinin, UO = Urinoutput/Diurese, GFR = glomeruläre Filtrationsrate, aus *Bellomo et al.* [9].

1.2. Epidemiologie der akuten Nierenschädigung

Auf Grund der vielen Definitionen und Diagnosekriterien der akuten Nierenschädigung finden sich in der wissenschaftlichen Literatur zum Teil sehr unterschiedliche Angaben zu Inzidenz und Prävalenz. So zeigte eine große Studie aus dem Jahr 2006, dass sich im Zeitraum von 1988 bis 2002 die Inzidenz der akuten Nierenschädigung vervierfacht hat, nämlich von 610 auf 2880 pro 1.000.000 Einwohner [10], während sich die Anzahl stationärer Aufnahmen wegen akuter Nierenschädigung von 1995 bis 2007 in den USA stetig auf das sechsfache des Ausgangsniveaus vergrößert hat (s. Abb. 2).

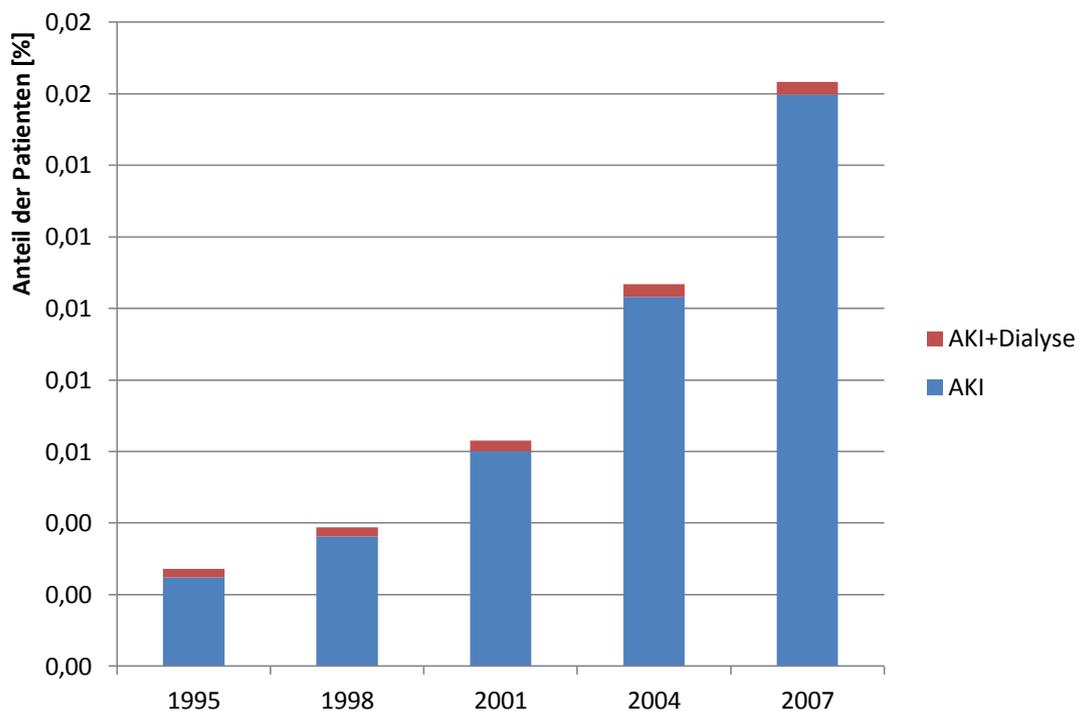


Abb. 2: Anteil der stationären Aufnahmen auf Grund akuter Nierenschädigung (AKI) von 1995 bis 2007 mit bzw. ohne Dialyse. Der Anteil der hospitalisierten Patienten mit akuter Nierenschädigung an der Gesamtzahl stationärer Patienten hat sich innerhalb von 12 Jahren mehr als versechsfacht [11].

Andere Autoren gehen davon aus, dass 5 – 40 % aller hospitalisierten Patienten ein akutes Nierenversagen entwickeln [6, 12], bzw. bis zu 30 % aller Patienten, die auf Intensivstationen behandelt werden [6], bei einer unakzeptabel hohen Mortalität zwischen 15 und 60 % [13-15]. Kommen weitere komplizierende Faktoren wie etwa ein vorliegendes Multiorganversagen (MOV, v.a. bei Patienten mit arterieller Hypotension) oder ein ARDS (engl. *acute respiratory distress*

syndrome) hinzu, so steigt die Mortalität auf bis zu 80 % [16-20]. Desweiteren kann die Ausprägung der akuten Nierenschädigung so deutlich sein, dass 20 bis 60 % der Patienten im akuten Nierenversagen einer Nierenersatztherapie, in erster Linie der Dialyse, zugeführt werden müssen[21, 22]. Die akute Nierenschädigung ist dabei ein unabhängiger Risikofaktor für den Tod und kann in einigen ungünstigen Fällen zum chronischen Nierenversagen führen. Daher sind mit der akuten Nierenschädigung auch hohe Kosten im Gesundheitswesen verbunden, die sich vor allem durch die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie (Dialyse und Transplantation) ergeben [23, 24].

1.3. Ätiologie der Akuten Nierenschädigung

Wie bereits erwähnt müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein, um von einer akuten Nierenschädigung sprechen zu können. Grundsätzlich hat sich eine Einteilung in

- prärenale
- intrarenale oder intrinsische
- und eine postrenale akute Nierenschädigung bewährt.

Dabei ist die prärenale Läsion die häufigste Form, die zu 55 – 60 % auftritt, gefolgt von intrarenalen Ursachen mit ca. 35 – 40 % und die seltenste Ursache, das postrenale Nierenversagen mit rund 5 % der Gesamtfälle [6, 7]. Die prärenale akute Nierenschädigung ist zunächst als eine Art physiologische Reaktion auf eine arterielle Hypoperfusion zu sehen, welche bei milder arterieller Minderperfusion und prompter Reperfusion rasch reversibel ist und folgenlos abheilt. Schäden der tubulären und glomerulären Strukturen sind primär nicht zu finden, anders beim intrarenalen akuten Nierenversagen. Es handelt sich um eine ischämische Erkrankung, das heißt eine Erkrankung basierend auf einer gestörten, oder ungenügenden Durchblutung. Kommt es aber, im Gegensatz zur erwähnten passageren Ischämie, zu einer totalen Ischämie, so wirkt sich diese auf das Nierengewebe deutlich drastischer aus und dies führt beim Patienten zu einer stark aggravierten Form des akuten Nierenschadens. Bei dieser Form der akuten Nierenschädigung findet auch ein nahtloser Übergang vom prärenalen zum intrarenalen akuten Nierenschaden statt, bei dem nach Definition auch morphologische Korrelate der akuten renalen Schädigung zu finden sind. Der entstehende morphologische Schaden ist dabei im Wesentlichen auf die Hypoxämie sowie die Mangelversorgung mit frischen Metaboliten und Oxidationsmitteln zurückzuführen [6]. Zu den Ursachen der renalen Ischämie bzw. des prärenalen akuten Nierenschadens gehört in erster Linie die akute Hypovolämie, also der Schock durch starke und rasche Blut- und Flüssigkeitsverluste.

Auch der Niereninfarkt bzw. eine Aortendissektion können zu einer Verlegung der A. renalis führen. Je nach Ausmaß der Verlegung kann es zu einer totalen Ischämie der Nieren kommen. Dies ist ein unumgängliches Problem in der Transplantationsmedizin, bei der nach einer ärztlich herbeigeführten totalen Ischämie das Spenderorgan im Empfänger verpflanzt wird. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der Ursachen einer akuten prärenalen Schädigung, bzw. des prärenalen akuten Nierenversagens.

Tabelle 1: Ursachen des prärenalen akuten Nierenversagens [6]

I. Hypovolämie

- A Hämorrhagie, Verbrennung, Dehydratation
- B Gastrointestinaler Flüssigkeitsverlust: Erbrechen, Diarrhö, chirurgische Drainage
- C Renaler Flüssigkeitsverlust: Diuretika, osmotische Diurese (z.B. Diabetes Mellitus)
- D Volumenverschiebung in das extravasale Kompartiment bei Peritonitis, Trauma, schwerer Hypoalbuminämie

II. Vermindertem Schlagvolumen/Herzzeitvolumen

- A Erkrankungen des Myokards, der Herzklappen und des Perikards, Herzinsuffizienz
- B Andere: Pulmonale Hypertonie, Lungenembolie, maschinelle Beatmung

III. Veränderungen des Verhältnisses renaler zu systemischer Gefäßwiderstand

- A Systemische Vasodilatation: Sepsis, antihypertensive Therapie, Anaphylaxie, Anästhesie
- B Renale Vasokonstriktion: Hyperkalzämie, Katecholamine, Cyclosporin, Tacrolimus, Amphotericin B
- C Leberzirrhose und Aszites (Hepatorenales Syndrom)

IV. Renale Hypoperfusion und Beeinträchtigung der Autoregulation

- COX-Hemmer, ACE-Hemmer

V. Hyperviskositätssyndrom (Multiples Myelom, Polyzythämie)

Die intrarenale akute Nierenschädigung, oder manchmal auch intrinsisches akutes Nierenversagen genannt, hat als Ursache eine Erkrankung des Nierenparenchyms, oder aber auch Erkrankungen der intrarenalen Gefäße und der Glomeruli. Diese Gefäßerkrankungen teilt man ein in Erkrankungen der großen Gefäße, also makrovaskuläre Erkrankungen, bzw. der kleinen Gefäße, also mikrovaskuläre Erkrankungen. Ein akutes Nierenversagen lässt sich daher auch durch Koagulopathien, wie der disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) im Rahmen einer Sepsis, erklären. Desweiteren gehören auch interstitielle Nephritiden und Glomerulonephritiden dazu. Die akute Tubulusnekrose (ATN) soll an anderer Stelle gründlicher erläutert werden. Klassisch wird eine toxische von einer ischämischen unterschieden. Es ist bereits bekannt, dass manche Pharmaka bzw. Toxine im Zusammenwirken mit einer ischämischen Nierenschädigung ebenfalls ein akutes

Tabelle 2: Ursachen der intrinsischen akuten Nierenschädigung [6]

I. Renaler Gefäßverschluss, Makrovaskuläre Erkrankungen

A Nierenarterienverschluss: Thrombose, Embolie, Gefäßdissektion, Vaskulitis

B Nierenvenenverschluss: Thrombose, Kompression

II. Mikrovaskuläre Erkrankungen und Erkrankungen der Glomeruli

A Glomerulonephritis und Vaskulitis

B HUS, TTP, DIC, SLE, Gestose, Strahlennephritis

III. Akute Tubulusnekrose (ATN)

A Ischämie (vgl. Prärenales ANV)

B Toxine

1. exogen: RKM, Cyclosporine, Antibiotika (Aminoglykoside), Chemotherapeutika (Cisplatin)

2. endogen: Rhabdomyolyse, Hämolyse, Harnsäure, Oxalat

IV. Interstitielle Nephritis

A allergisch: Antibiotika (z.B. β -Laktame, Sulfonamide, Trimethoprim, Rifampicin), NSAID, Diuretika, ACE-Hemmer

B Infektion: bakteriell (z.B. akute Pyelonephritis, Leptospirose), viral (CMV), Pilze (Candida)

C Infiltration (Lymphom, Leukämie, Sarkoidose)

D idiopathisch

V. Intratubuläre Deposition und Obstruktion

Immunglobuline, Harnsäurekristalle, Oxalat, Acyclovir, Methotrexat, Sulfonamide

VI. Nierentransplantatabstoßung

Nierenversagen herbeiführen können. Es kombiniert sich dabei die ischämische Schädigung mit der Wirkung des Pharmakon beziehungsweise des Toxins. Zusammen kann das in einem ANV resultieren, vor allem bei schwerkranken Patienten mit Sepsis, Leukämien oder auch AIDS [25, 26]. Antibiotika wie Aminoglykoside, Sulfonamide und Penicilline, die eine interstitielle Nephritis auslösen, können auch ein ANV herbeiführen. Die interstitielle Nephritis ist dabei als allergische Reaktion auf die Pharmaka zu bewerten [6, 7, 12]. Tabelle 2 zeigt die soeben genannten Gründe, so wie weitere Ursachen des akuten intrinsischen Nierenversagens. Ein postrenales akutes Nierenversagen (vgl. Tabelle 3) kann dann entstehen, wenn an einer Stelle der ableitenden Harnwege der Abfluss gestört ist. Man kann die Ursachen dabei in angeborene und erworbene Ursachen einteilen. Einer der Hauptgründe für eine Obstruktion der ableitenden Harnwege ist die benigne Prostatahyperplasie (BPH), Tumoren der Prostata bzw. der Zervix sowie Erkrankungen des retroperitonealen Raumes [27]. Im Allgemeinen bewirken raumfordernde Prozesse eine mechanische Obstruktion von außen, so dass es zum Rückstau des Harns bis in die Nieren geben kann. Intraluminale Läsionen, Konkremete beziehungsweise Kristalle können ebenfalls zur Entstehung eines ANV beitragen. Postrenale Ursachen sollten ähnlich den prärenal schnell ausgeschlossen beziehungsweise behandelt werden, da die Schädigung und das ANV umso ausgeprägter sind, je länger die Abflussbehinderung anhält [12].

Tabelle 3: Ursachen des postrenalen akuten Nierenversagens [6]

I. Ureterobstruktion
Konkremente, Koagel, Tumor
II. Blasenhal
Konkremente, Benigne Prostatahyperplasie, Neurogene Blase, Tumor
III. Urethra
Strikatur, Urethralklappe, Phimose

1.4. Pathophysiologie der ischämischen akuten Nierenschädigung

Wie bereits behandelt, stellt die Ischämie eine der wichtigsten Ursachen für ein akutes Nierenversagen und die akute Nierenschädigung dar. Daher sollen die genauen Vorgänge innerhalb der Nieren und die strukturellen und morphologischen Veränderungen in diesem Abschnitt näher erläutert werden. Auch soll an dieser Stelle auf die Geschehnisse und Vorgänge eingegangen werden, die unter dem Begriff akute Tubulusnekrose (ATN) zusammengefasst werden. Dabei ist der Begriff „ischämische akute Tubulusnekrose“ verwirrend und nicht ganz klar. Zum einen kann die ATN als eigene Krankheitsentität betrachtet werden, die eine Form des intrarenalen ANV darstellt. Zum anderen aber kann die ATN als das Ergebnis einer ausreichend lang anhaltenden Hypoperfusion, oder einer totalen Ischämie bei völligem Sistieren der arteriellen Perfusion des Gewebes betrachtet werden. Tatsache ist, dass es bei einem ischämischen Insult des Nierengewebes zu Nekrosen im Bereich des tubulären Epithels kommt. Jedoch müssen dabei längst nicht alle Tubulusepithelzellen betroffen sein. Ein Teil stirbt den nekrotischen Zelltod, ein anderer Teil hat das Stadium der Nekrose noch nicht erreicht und ist lebendig. Entweder sind diese Epithelzellen dann völlig gesund und intakt, oder sie sind zwar beschädigt, aber der Schaden ist von der Zelle reparierbar. Eine dritte Möglichkeit neben Nekrose oder reversibler hypoxämischer Schädigung ist die Apoptose. So können Tubulusepithelzellen nach einer Ischämie der Nieren beobachtet werden, die offenbar trotz gravierender Hypoxie noch dazu in der Lage waren, den programmierten Zelltod zu sterben [28]. Was sind also die Vorgänge und Veränderungen im Nierengewebe, wenn die arterielle Perfusion kritisch reduziert ist oder gar völlig sistiert? Und was geschieht mit dem ischämisch geschädigten renalen Gewebe im postischämischen Stadium, also wenn die Reperfusion erfolgt ist?

Das ischämische akute Nierenversagen geht im Allgemeinen in drei Phasen vor sich: die erste Phase, auch Initialphase oder Anfangsphase genannt dauert wenige Stunden bis ca. ein Tag. Dabei spielen sich vorrangig alle Vorgänge ab, die zur Entstehung von strukturellen und funktionellen Schäden beitragen, die weiter unten genauer beschrieben werden. In Folge dessen kommt es zur Abnahme der GFR, des Filtrationsdruckes und der renalen Perfusion. Der morphologische Schaden entsteht dabei vorrangig im proximalen Tubulus beziehungsweise im S3-Segment desselben und im Bereich der dicken aufsteigenden Henle'schen Schleife. Die Initialphase ist durch Reperfusion reversibel [6]. Dem schließt sich die sogenannte Erhaltungsphase oder Maintenancephase (engl. *maintenance*, Erhaltung, Beibehaltung) an. Diese Phase dauert eine bis zwei Wochen. Der Ischämie- und Reperfusionsschaden reift dabei aus, die GFR stabilisiert sich in dieser Zeit. Die Diurese befindet sich in der Erhaltungsphase am Tiefpunkt und klinisch manifestieren sich in dieser Phase urämische Komplikationen. Als letztes tritt dann die Phase der Erholung ein. Es kommt dank der einzigartigen Regenerationsfähigkeit der Niere zur Proliferation und Ausheilung des renalen Tubulusepithels und damit im günstigsten Fall zum Wiederanstieg der GFR und zur Normalisierung der Diurese [6]. Diese recht grobe Beschreibung der Vorgänge im Rahmen von Ischämie und Reperfusion soll nun etwas detaillierter betrachtet werden. Man kann davon ausgehen, dass die Niere auf Grund ihrer Architektur ein Organ ist, das sehr sensibel auf Hypoxie reagiert [29]. Der mikrovaskuläre Aufbau dient zum einen, den hohen Sauerstoffbedarf des proximalen Tubulusapparates zu decken, zum anderen den zur Harnkonzentration notwendigen osmotischen Gradienten der Vasa recta im Nierenmark aufrechtzuerhalten [30]. Auf Grund des hohen Sauerstoff- und Energiebedarfs des proximalen Tubulus wird die Niere mit ca. 20-25 % des Herzminutenvolumens (HMV) durchblutet, obwohl ihr Gewicht nur ca. 0,5 % des Gesamtkörpergewichts ausmacht. Unter normalen Bedingungen konsumiert der proximale Tubulus bis zu 80 % des arteriellen Sauerstoffs. Die Energie, die mit der Reduktion des Sauerstoffes generiert wird, wird dabei vor allem durch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase des proximalen Tubulusepithels verbraucht. Mit Hilfe der Ionenpumpen ist das Tubulusepithel in der Lage, 2/3 des NaCl aus dem Primärfiltrat zu resorbieren. Der hohe Sauerstoffverbrauch erklärt den großen Gradienten des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes zwischen renalem Kortex und Medulla. Der arterielle pO_2 beträgt im Kortex ca. 70 mmHg und fällt auf ca. 20 mmHg im Bereich des Nierenmarks [31, 32]. Zusammenfassend hängt die adäquate Versorgung mit Sauerstoff vom Gleichgewicht zwischen ausreichendem Sauerstofftransport und dem renalen Sauerstoffverbrauch ab, der hauptsächlich von der Aktivität der Ionenpumpen bestimmt wird [30]. Eine Hypoxie ist definiert als Sauerstoffmangelzustand, also ein Sauerstoffbedarf, der durch ungenügende Versorgung mit Sauerstoff nicht gedeckt ist [33]. Kommt es nun zu einer partiellen Unterversorgung mit arteriellem Blut beziehungsweise zu einer totalen Ischämie, kann man eine Fülle an

Veränderungen innerhalb der Niere beobachten. Was bisher an biochemischen und strukturellen Vorgängen bekannt und relativ gut erforscht ist soll im Folgenden dargestellt werden. Die Summe struktureller und biochemischer Änderungen führt zunächst zu einer Vasokonstriktion im betroffenen Bereich, vor allem bedingt durch eine Störung der empfindlichen Balance vasoaktiver Substanzen [28]. Fällt der mittlere renale Perfusionsdruck unter die kritische Grenze von ca. 80 mmHg, sind die autoregulatorischen Möglichkeiten zur Aufrechterhaltung einer geregelten Perfusion und konstanten GFR erschöpft. Das postglomeruläre Kapillarbett, bzw. die peritubulären Gefäße erleiden folglich einen verminderten Blutfluss und einen reduzierten Perfusionsdruck, die Tubuli bleiben aber zunächst noch intakt. Erst eine länger anhaltende oder schwere Ischämie führt dann zu strukturellen Schäden an den Tubuli. Es kommt zu einer Desquamation, also einer Abschilferung von Tubulusepithelzellen in das tubuläre Lumen, was zu einer Verstopfung des Lumens führt. Die tubuläre Schädigung führt folglich zu einer unkontrollierten transtubulären Absorption des glomerulären Filtrats in das renale Interstitium (engl. *transtubular back-leakage*) [12, 34, 35]. Betroffen sind dabei v.a. Regionen im äußeren Nierenmark, wo prinzipiell ein höherer Sauerstoffbedarf auf Grund der hohen biochemischen Aktivität des Tubulusepithels herrscht. Die Ischämie führt dort zum Anschwellen von Tubulusepithelzellen, was sich zusätzlich negativ auf die peritubuläre Mikrozirkulation auswirkt und letztlich in Kompression der peritubulären Gefäße und zusätzlicher Hypoperfusion endet [12]. In der frühen Phase der Ischämie kommt es zum raschen Mangel an Adenosintriphosphat (ATP), was kritische Änderungen im Zellstoffwechsel zur Folge hat, gerade in Zellen bzw. Bereichen mit hohem Energiebedarf. Es kommt zum Verlust der Zellpolarität und zu strukturellen Veränderungen des Zytoskelettes in der Art, dass die apikal gelegenen Strukturen, v.a. der Bürstensaum des Tubulusepithels disloziert und in das Tubuluslumen verloren geht [28]. Zellen des proximalen Tubulusepithels verändern sich desweiteren durch Verlust der interzellulären Adhäsionsmoleküle wie den Tight junctions und Integrine, beziehungsweise deren Bestandteile. Die bei gesunden Tubulusepithelzellen basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase transloziert nach apikal, was zur Abnahme des an Na^+ gekoppelten vektoriellen Transportes führt und sich auch negativ auf die Natriumrückresorption auswirkt. In Folge der gerade genannten gravierenden strukturellen Veränderungen, kommt es zur Auflösung der Epithelintegrität und zur bereits genannten Desquamation. Die abgeschilferten Tubulusepithelzellen, lebendig wie tot, so wie deren Bestandteile verlegen das Tubuluslumen. Dabei entstehen gipsartige Formationen (engl. *cast formation*), die das Tubuluslumen vollständig auskleiden [28].

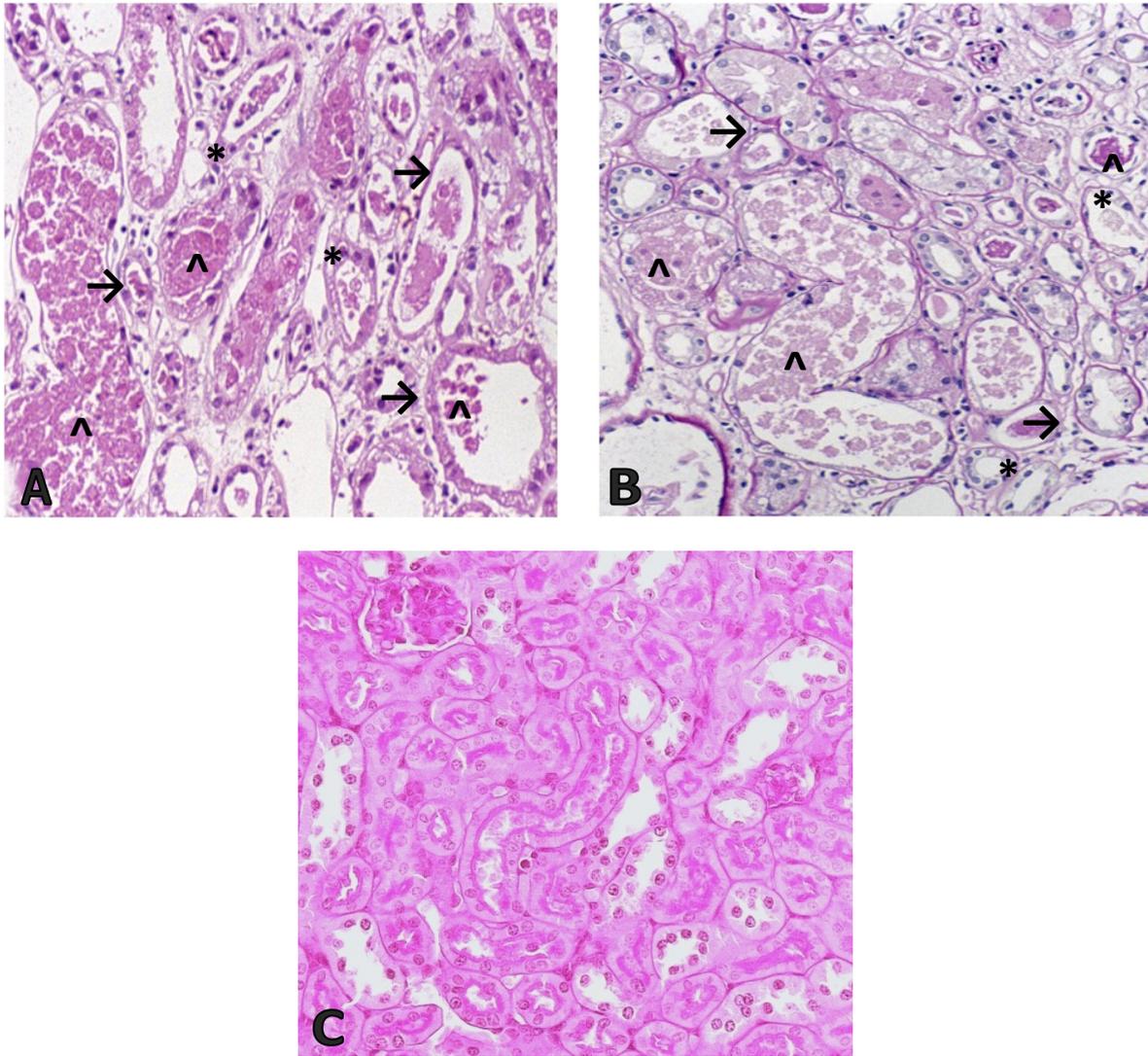


Abb. 3: Typisches histopathologisches Bild der akuten ischämischen Tubulusnekrose

Bei ischämischer Nierenschädigung entsteht das Bild der akuten Tubulusnekrose. Erkennbar sind abgeflachte Epithelzellen des proximalen Tubulusapparates (→), nekrotische, teils vakuolisierte Tubulusepithelzellen (*), sowie abgeschilfter Zellschutt (^), der sich im Tubuluslumen ansammelt und das Lumen verlegt. **A** HE-Färbung, Vergrößerung 200 x; **B** PAS-Färbung, Vergrößerung 400 x, aus *Atlas of Renal Pathology No. 1* [36]. **C** Zum Vergleich das gesunde Nierengewebe, PAS-Färbung, Vergrößerung 200 x (eigener Schnitt).

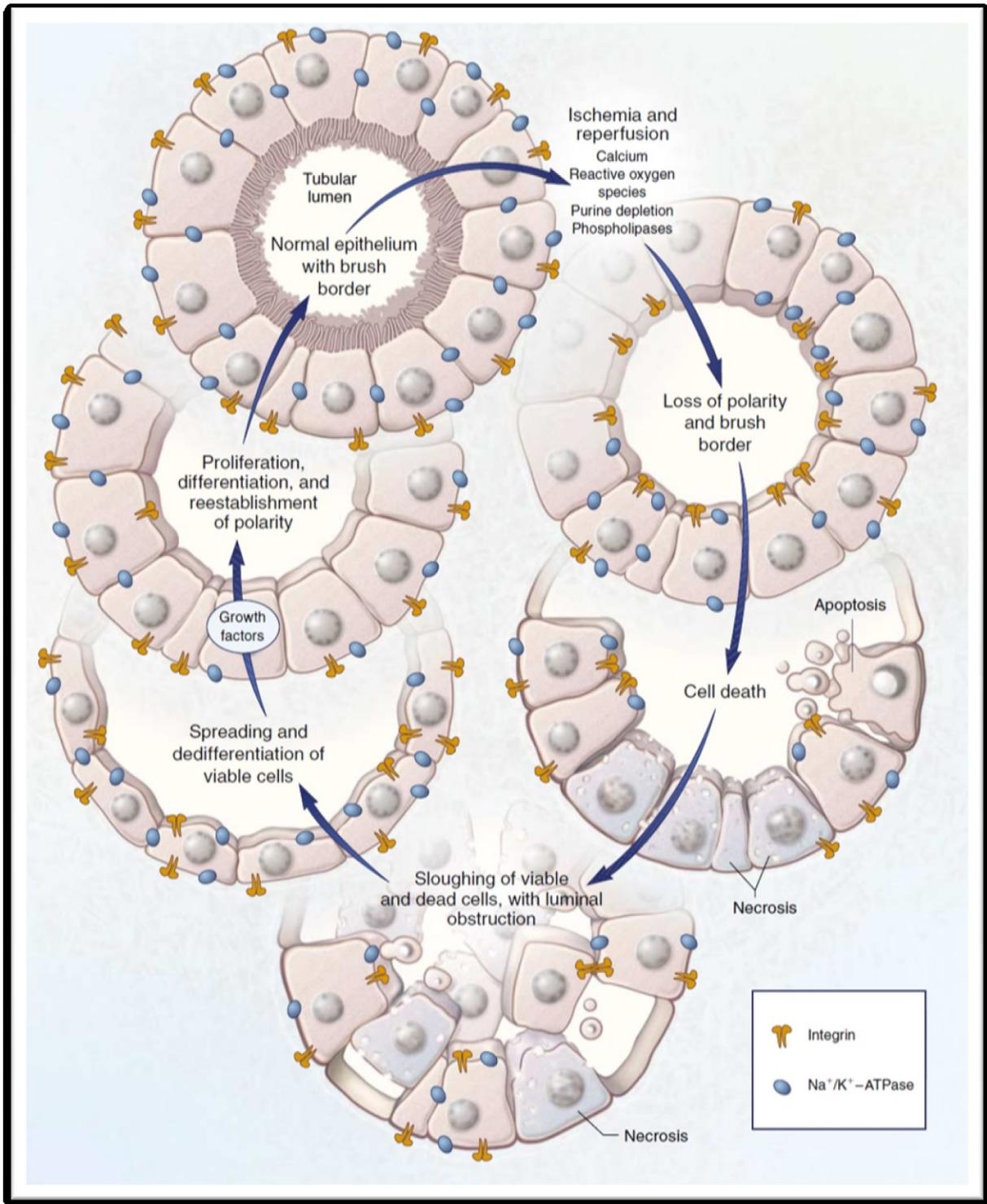


Abb. 4: Schaden und Regeneration des Tubulusepithels bei ischämischer Nierenschädigung

Nach Ischämie und Reperfusion kommt zu einer Fülle an morphologischen Veränderungen im Bereich der proximalen Nierentubuli. Dazu zählen der Verlust des Bürstensaumes, Verlust der Zellpolarität und eine Umverteilung von Integrinen und der Na⁺/K⁺-ATPase von basolateral nach apikal. Gesunde, nekrotische und apoptotische Epithelzellen schilfern in das tubuläre Lumen ab und bewirken u.a. die Entstehung gipsartiger Formationen und sind der Hauptgrund für die funktionelle Einschränkung der Nierenfunktion bzw. des ANV. Allerdings kann sich das Gewebe bei Reperfusion im Laufe der Zeit wieder vollständig regenerieren, was wohl auch auf die Beteiligung von Wachstumshormonen (engl. *growth factors*) zurückzuführen ist. Aus *Thadhani et al.* [12].

Einen weiteren Beitrag zur Entstehung der so eben genannten gipsartigen Formationen, oder casts liefert das Tamm-Horsfall-Protein. Dieses normalerweise im Bereich der Henle'schen Schleife sezernierte Protein polymerisiert, beziehungsweise präzipitiert gelartig im Tubuluslumen durch die gesteigerte intratubuläre Na^+ -Konzentration, die durch eine unzureichend funktionierende Natriumabsorption bedingt ist [35, 37] (s. Abb. 3 und 4). Der ATP-Mangel führt aber auch zur Aktivierung von Phospholipasen und schädigender Proteasen mit der Konsequenz, dass oxidativer Stress auf die Zellen, vor allem bei Reperfusion des ischämisch geschädigten Gewebes einwirkt und den entstandenen Schaden noch weiter intensivieren kann. Ähnliche Effekte hat die Ischämie aber nicht nur auf die Tubulusepithelien, sondern auch auf die Endothelzellen der peritubulären Kapillaren. Der oxidative Stress wirkt zusammen mit einer Balancestörung vasoaktiver lokaler Hormone, mit Überwiegen vasokonstriktiver Substanzen, wie beispielsweise Endothelin. In Folge dessen kommt es neben einer Vasokonstriktion zu zusätzlicher Hypoperfusion und zur Expression von Adhäsionsmolekülen [28]. Diese sind essentiell für die Leukozyten, um in das ischämisch geschädigte Gewebe infiltrieren zu können. Dabei werde sie in ihrer destruktiven Aktivität gesteigert von lokalen Zyto- und Chemokinen, die aus dem Bereich der lädierten Tubulusepithelien stammen [3], was etwas später in dieser Arbeit behandelt werden soll. Die Rolle der Immunzellen ist dabei wichtig für das Verständnis der weiteren Gewebeschädigung, die vor allem bei der Reperfusion entsteht. Biochemisch sind vor allem Folgende Veränderungen bei Ischämie von Bedeutung: der initiale ATP-Mangel bewirkt auch einen Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration. Dies führt im Bereich der Gefäße ebenfalls zu einer Vasokonstriktion und hat daneben auch Effekte auf den Zellstoffwechsel. Das Kalzium kann dabei eine Rolle bei der Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen spielen, die wiederum destruktive Effekt auf das Zytoskelett ausüben. Auch hat das Kalzium die Fähigkeit, mit dem mitochondrialen Stoffwechsel auf störende Art und Weise zu interagieren. Obwohl der Ca^{2+} -Anstieg einen der frühen Effekte bei Ischämie ausmacht, ist es nicht wirklich klar, welchen Wert dessen Beitrag am ischämischen Schaden der Tubulusepithelzellen tatsächlich hat [12]. Einen weiteren Beitrag zur ischämischen Schädigung des Nierengewebes bringt die Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies (engl. *reactive oxygen species* – ROS) bei. Dabei entstehen diese, auch unter dem Namen Sauerstoffradikale bekannten, reaktionsfreudigen Metaboliten vor allem nach plötzlicher Reperfusion. Multiple Enzymsysteme wie die Cyclooxygenase, Xanthinoxidase, Oxidasen des endoplasmatischen Retikulums und leukozytäre Enzyme der infiltrierenden neutrophilen Granulozyten sind an der Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt [12]. Die Ischämie bewirkt aber auch eine Disbalance der Purine, die sich nicht nur auf die Neubildung von ATP durch eine fehlende Adenosinversorgung auswirkt. Auch andere Purine wie

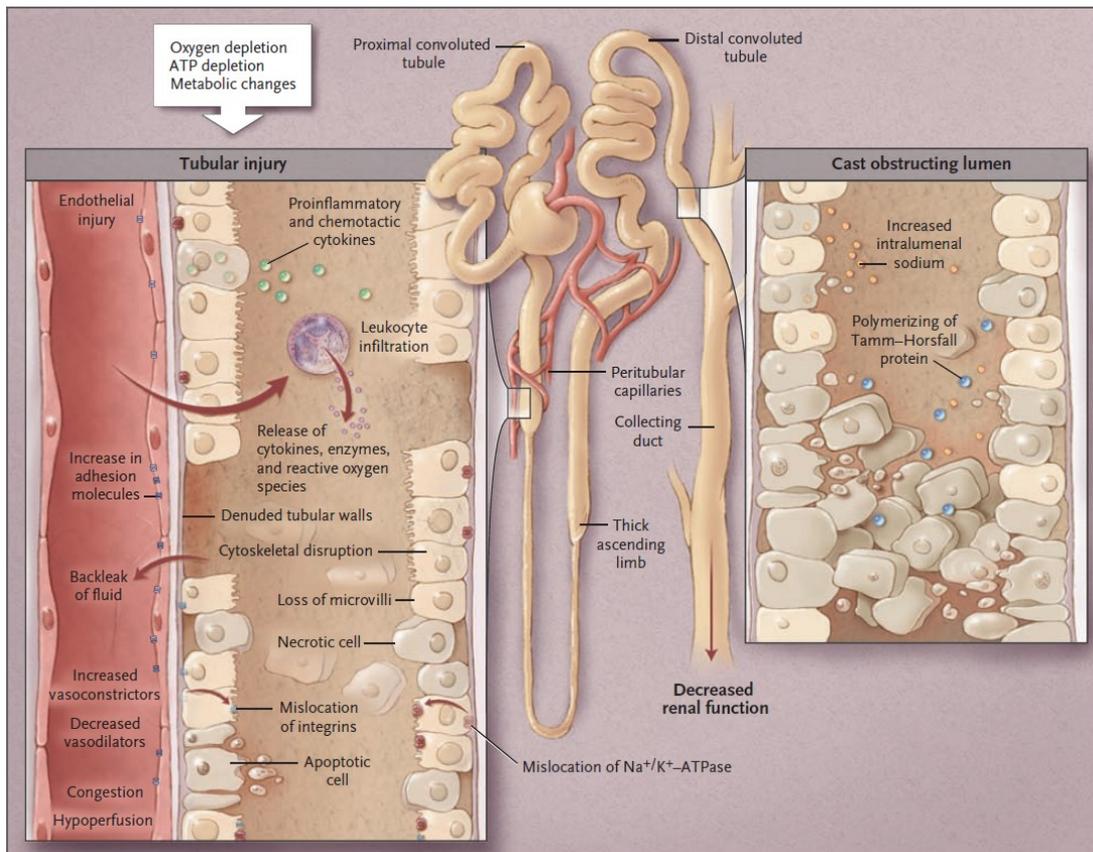


Abb. 5: Pathophysiologie der akuten ischämischen Nierenschädigung

Die renale Ischämie führt zu einer schweren Schädigung des Nierenparenchyms, allen voran der Tubulusepithelien. Die destruktive Wirkung auf Tubuluszellen ist dabei direkte Folge von Veränderungen des intra- und extrazellulären Stoffwechsels, die unter Ischämie auftreten. Der Gewebeschaden wird aber erst durch die entstehende Entzündung und vaskuläre Beteiligung potenziert. Aus *Abuelo, J. Gary* [3].

Xanthin, Inosin, die neben Adenosin aus den nekrotischen Zellen freigesetzt werden, bewirken eine Vasokonstriktion der intrarenalen Arteriolen und können an der Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt sein [12]. Auch die Familie der Phospholipasen, v.a. Phospholipase A₂ übt einen destruktiven Effekt auf Tubulusepithelzellen aus. Die Phospholipase A₂ hydrolysiert Phospholipide und setzt dabei Anionen der Fettsäuren frei, welche die umgebenden Zellen bei ausreichender Konzentration beschädigen oder gar zerstören können. Die aktivierte Phospholipase beeinflusst die Membranpermeabilität, sowohl der Zellmembran, als auch der mitochondrialen Membran, mit entsprechendem Effekt auf den intrazellulären Energiehaushalt. Ganz allgemein kann die Peroxidation von Membranlipiden, die durch Ischämie und Reperfusion aktiviert wird, bewirken, dass der Phospholipase eine große Menge an Substrat zur Verfügung steht. Die dabei auch freigesetzte Arachidonsäure, die dann zu diversen Eicosanoiden verstoffwechselt wird, tut ihr Übriges. Es kommt zur Vasokonstriktion und zur Chemotaxis von Leukozyten [12]. Abbildung 5 zeigt

eine Übersicht der intrarenalen Vorgänge bei Ischämie und Reperfusion. Die Summe aller Vorgänge während einer Nierenischämie bewirkt letztlich eine gravierende Einschränkung der Nierenfunktion, deren Ausmaß das klinische Bild deutlich prägt. Dabei ist klar zu erkennen, dass die Wiederherstellung einer geregelten Nierenperfusion und die damit verbundene Restauration des arteriellen Blutflusses aber nicht nur vorteilhaft sind. Wie man gleich sehen wird, ist mit der Reperfusion auch ein fortgesetzter und weiterhin aktiver schädigender Prozess verbunden. Dabei spielt das angeborene Immunsystem die entscheidende Rolle, das dem ischämischen Gewebe, bei Einsatz der Reperfusion, weiteren Schaden zufügt. Trotz aller Schädigung des Nierengewebes hat dieses Organ dennoch im Vergleich zum Herzen oder dem Gehirn, bei dem der ischämische Zellschaden unumkehrbar ist, die einzigartige Fähigkeit zur Regeneration. So finden sich charakteristischerweise in humanen Nieren, die ein akutes Nierenversagen durchgemacht haben, rege Mitose und Epithelzellregeneration. Das könnte auf die hohe lokale Expression an Wachstumshormonen (engl. *growth factors*) zurückzuführen sein, die in postischämischen Nieren nachgewiesen werden konnte [38] (vgl. Abb. 4). Die Rolle der einzelnen Komponenten des Immunsystems, allen voran die Prozesse und Auswirkungen durch das angeborene Immunsystem sollen im folgenden Kapitel näher erläutert werden.

2. Die Rolle des Immunsystems bei Ischämie und Reperfusion

In der letzten Zeit ist ein neues Konzept des ischämischen akuten Nierenversagens entstanden, bei dem die Aufmerksamkeit und das Interesse mehr und mehr auf die immunologischen Prozesse innerhalb der ischämischen Niere gelenkt wurden. Es zeichnet sich zur Zeit ein klares Bild innerhalb des Verständnisses zu Ischämie und Reperfusion ab, das zeigt, wie dieser Schaden zu einem sehr großen Teil durch verschiedene Bestandteile des Immunsystems verursacht wird. Vor allem das angeborene Immunsystem spielt dabei eine wichtige Rolle. Mit Beteiligung von Zyto- und Chemokinen kommt es zur Aktivierung des Immunsystems. Neutrophile Granulozyten und Makrophagen gelangen zum Ort des Geschehens direkt aus der Blutbahn, u.a. herbeigerufen von renalen dendritischen Zellen und den beschädigten Tubulusepithelzellen. Vereinfacht gesagt führt Ischämie und Reperfusion zu einer Aktivierung des (angeborenen) Immunsystems, die man auch bei Infektion beobachtet [39-42]. Man beobachtet im Prinzip eine Entzündung, eine charakteristische immunologische Reaktion, so wie man sie von Infektionen her kennt, nur dass hier keine Pathogene, im klassischen Sinne, vorliegen. Das durch Ischämie und Reperfusion aktivierte Immunsystem unterhält einen fokalen Entzündungsprozess, den man folglich als sterile Entzündung bezeichnen kann [40].

2.1. Das Immunsystem

Der menschliche Organismus sieht sich ununterbrochen mit pathogenen Mikroorganismen konfrontiert, beziehungsweise anderen schädlichen Partikeln aus der Umwelt. Dazu zählen Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Helminthen. Diese müssen erkannt und so schnell wie möglich effektiv bekämpft werden. Aber das Immunsystem ist nicht nur in der Lage fremde Strukturen zu erkennen, sondern auch eigene Strukturen. Dabei dürfen diese nicht einfach zerstört und eliminiert werden, sondern müssen geschont werden. Das Immunsystem kann daher körpereigenes Material, das von nekrotischen beziehungsweise apoptotischen Zellen, oder auch aus traumatisch zerstörtem Gewebe stammt erkennen und, wenn erforderlich, eliminieren. Die Diskrimination zwischen „Freund“ und „Feind“ ist eine der wichtigsten Aufgaben des Immunsystems. Unser Immunsystem kann man folglich auch als „System der inneren und äußeren Abwehr“ bezeichnen [43].

Prinzipiell lassen sich zwei Arten innerhalb des Immunsystems unterscheiden, die sich ergänzen, eng interagieren und unscharf voneinander getrennt sind. Zum einen das angeborene oder unspezifische Immunsystem, zum anderen das erworbene, adaptive oder auch spezifische Immunsystem. Das angeborene Immunsystem reagiert mit seinem Repertoire an Zellen, Strukturen und Stoffen sofort auf das Pathogen und bestimmt somit die erste, frühe Phase einer Immunantwort. Das adaptive Immunsystem braucht für eine Reaktion etwas länger, da es spezialisiert und gerichtet gegen ein Pathogen wirkt. Es ist durch eine höhere Komplexität gekennzeichnet als die angeborene Immunität. Das erklärt auch die Latenz bis zum vollen Entfalten der adaptiven Immunantwort [44].

2.1.1. Das angeborene Immunsystem

Die erste Abwehrlinie, die ein pathogener Organismus überwinden muss, ist hauptsächlich mechanischer Art. Dazu zählen Grenzflächen wie die Haut und Schleimhäute. Ihre Abwehrmechanismen sind zum einen die mechanische Barriere der Haut mit ihrem sauren pH, zum anderen besitzen die Schleimhäute (Epithelien der Haut, des Verdauungs-, Respirations- und Urogenitaltraktes) chemische Schutzmechanismen, wie gelöstes Lysozym oder unspezifische IgA-Antikörper.

Die ersten zellulären Bestandteile der primären Immunantwort befinden sich unmittelbar hinter dieser physisch-chemischen Barriere. Ihre wichtigsten Elemente sind neutrophile Granulozyten,

Monozyten/Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Neutrophile Granulozyten und Monozyten bzw. Makrophagen, deren Hauptaufgabe die Phagozytose von Pathogenen ist, wandern durch das Prinzip der Chemotaxis aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe. Dabei sind sie nicht nur befähigt Pathogene zu phagozytieren, sondern auch hochreaktive Sauerstoffmetabolite (ROS) in das entzündete Gewebe zu sezernieren. NK-Zellen dienen der primären Abwehr von viralen Infektionen, indem befallene Zellen von ihnen erkannt und in die Apoptose geschickt werden, um die Virusreplikation zu beenden.

Die Infiltration des entzündeten Gewebes (Chemotaxis) geschieht entlang eines Konzentrationsgradienten von (pro-) entzündlichen Mediatoren. Diese Entzündungsmediatoren werden in Chemokine und Zytokine unterteilt. Es handelt sich dabei um lösliche Substanzen, die von diversen Zellen des entzündeten Gewebes freigesetzt werden, und die der Aktivierung einer Immunantwort dienen. Diese kann dann lokal beschränkt sein oder sich systemisch manifestieren. Es kommt dabei lokal zur Aktivierung des Endothels, das dann die notwendigen Adhäsionsmoleküle zur Leukozytenrekrutierung exprimiert. Diese rollen entlang des aktivierten Endothels und gelangen mittels Diapedese an den Ort der Entzündung. Auf systemischer Ebene kommt es unter anderem durch die löslichen Mediatoren zu Fieberinduktion, gesteigerter Antikörperproduktion, Anregung der Myelopoese im Knochenmark und Synthesesteigerung der Akute-Phase-Proteine, die in der Leber gebildet werden [43].

Ein weiteres wichtiges Element der angeborenen Immunität ist das Komplementsystem. Durch eine aktivierte proteolytische Kettenreaktion, ähnlich dem Prinzip der Blutgerinnungskaskade, wird am Ende zum einen ein Pathogen opsoniert und so die Phagozytose seitens der Makrophagen und Neutrophilen erleichtert. Zum anderen kann das Komplement dazu beitragen, die Entzündungsreaktion zu erhalten beziehungsweise zu erweitern [44, 45].

Um eine Immunantwort generieren zu können, ist es für den Organismus entscheidend, fremde Pathogene überhaupt erst zu erkennen. Anders gesagt werden Pathogene nur anhand gewisser Strukturen und Merkmale der pathogenen Oberfläche erkannt. Diese sog. PAMP (engl. *pathogen associated molecular patterns*) können beispielsweise Bestandteile der bakteriellen Zellwand sein, der zellulären Glykokalyx, oder des Genoms und andere [46]. Für die Erkennung der PAMP sind diverse Rezeptoren nötig, die in erster Linie von Immunzellen exprimiert werden, aber auch von Zellen, die nicht primär dem Immunsystem zugerechnet werden, wie zum Beispiel renale Tubulusepithelzellen [45-47]. Diese Mustererkennungsrezeptoren (PRR, engl. *pattern recognition receptors*) sind Kern der Diskrimination zwischen fremden (PAMP) und eigenen molekularen Strukturen. Zur Familie der PRR werden allen voran Toll-ähnliche Rezeptoren (engl. *Toll-like receptors*, TLR), NOD-ähnliche Rezeptoren (engl. *nucleotide-binding oligomerization domain-like*

receptors, NOD-like receptors, NLR) und RIG-ähnliche Rezeptoren (engl. *retinoic-acid-inducible protein-like helicases, RIG-like helicases, RLH*) gezählt. Sie sind an der Koordination der primären Immunantwort in synergistischer und/oder kooperativer Weise beteiligt (s. 2.2.) [48].

2.1.2. Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist im Vergleich zur primären Immunität ein hoch spezifisches und selektives Mittel des Immunsystems, um auf Pathogene zu reagieren und sie zu eliminieren. Es kommt immer nach der primären Immunantwort zum Einsatz und ist vor allem dann überlebensnotwendig für den Organismus, wenn die primäre Immunantwort nicht in der Lage war, den Eindringling vollständig zu eliminieren. Die adaptive Immunantwort ist eine völlig individualisierte Abwehrstrategie und ist über das „immunologische Gedächtnis“ in der Lage, aus einer Infektion zu lernen und bei der nächsten Infektion mit einem gleichen oder ähnlichen Pathogen, diesen sofort zu eliminieren.

Die zellulären Hauptkomponenten der adaptiven Immunität werden in zwei Subtypen unterteilt. Es sind die Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten oder B-Zellen, sowie die T-Lymphozyten oder T-Zellen. B-Zellen, die sich nach Aktivierung in Antikörper-sezernierende Plasmazellen umwandeln, bekämpfen Erreger im extrazellulären Kompartiment. Sie sind für die humorale Immunantwort zuständig. T-Zellen bekämpfen intrazelluläre Erreger, in dem infizierte Zellen ihnen Fragmente des Erregers präsentieren.

Eine dritte Komponente, zu der man auch die B-Zellen rechnen kann, sind die Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), also Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen [44]. Diese Antigen-präsentierenden Zellen, allen voran dendritische Zellen, agieren im Überschneidungsbereich der angeborenen und der adaptiven Immunität. Sie sind dadurch charakterisiert, in dem sie inkorporierte und prozessierte Fragmente der Pathogene mittels MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche diversen Effektorzellen (T-Zellen) präsentieren [44, 49]. Dabei kann man zwei Klassen der MHC-Moleküle (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) unterscheiden: MHC-Klasse-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert. Sie werden auch HLA-I-Rezeptoren genannt (HLA – humanes Leukozytenantigen). MHC-Klasse I-Moleküle präsentieren den Immunzellen zelleigene Peptide und zeigen so ihre Zugehörigkeit zum eigenen Organismus an. MHC-I-Moleküle interagieren dabei vorrangig mit CD8-positiven T-Zellen. Ist eine Zelle infiziert, so werden die in der Zelle synthetisierten fremden Peptide auf MHC-I-Molekülen den zytotoxischen CD8-positiven T-Zellen dargeboten. Diese können dann die infizierte Zelle in die Apoptose schicken und so abtöten. Die Bedeutung der MHC-I-Moleküle liegt vor allem in ihrer Funktion, den Organismus vor einer autoimmunen Reaktion zu schützen, da sie permanent

eigene Strukturen präsentieren und so zur Diskrimination von fremd und selbst beitragen. MHC-Klasse II-Moleküle (analog HLA-II-Rezeptoren) werde hauptsächlich von B-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert. Wird ein Erreger von diesen Zellen intrazellulär abgebaut, so werden einige fremde Peptide des Pathogens auf MHC-II-Rezeptoren geladen und so den CD4-positiven T-Helferzellen präsentiert. Die T-Helferzellen aktivieren so die APZ beziehungsweise die B-Zelle zurück und stimulieren so die humorale Immunantwort. Die aktivierten B-Zellen können als Plasmazellen dann durch somatisches Rearrangement hochselektive, gegen den Erreger gerichtete Immunglobuline synthetisieren. Im Zuge der adaptiven Immunantwort werden auch sogenannte Gedächtniszellen generiert. Es handelt sich dabei um eine ausdifferenzierte klonale Population von Lymphozyten, die bei wiederholter Infektion binnen kürzester Zeit die adaptive Immunantwort induzieren und so einen erneuten Krankheitsausbruch verhindern können [44].

2.2. Die Rolle der Toll-like Rezeptoren bei Ischämie und Reperfusion

2.2.1. Toll-like Rezeptoren

Benannt ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) nach den Toll-Proteinen der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, auf Grund der strukturellen Ähnlichkeit zu diesen [50]. Das Toll-Protein ist u.a. für die ontogenetische Entwicklung der dorsoventralen Polarität von *Drosophila melanogaster* verantwortlich und spielt eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr von Pilzinfektionen. Entdeckt wurden die Toll-like Rezeptoren Mitte der 1990er und sind seitdem Gegenstand intensivster Forschung [51, 52].

Die Toll-like Rezeptoren werden natürlich von Immunzellen wie dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert, aber man hat sie auch auf Nicht-Immunzellen wie renalen Parenchymzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Myozyten und Neuronen gefunden [53-58]. TLR gehören zur Familie der Typ I Transmembranproteine. Bisher weiß man, dass der Mensch zehn verschiedene Arten an funktionellen TLR hat, die Maus besitzt 13 TLR, wovon 12 funktional sind. TLR11, 12 und TLR13 sind im humanen Genom nicht mehr vorhanden. Bei der Maus ist TLR 9 auf Grund einer retroviralen Insertion nicht funktional [52]. TLR3, 7, 8 und 9 sind die einzigen Toll-like Rezeptoren, die sich intrazellulär befinden, genauer gesagt innerhalb endosomaler, lysosomaler und endolysosomaler Membranen. Diese Gruppe der TLR erkennt in erster Linie virale und bakterielle Nukleinsäuren. Die restlichen TLR sind an der Zellmembran lokalisiert und haben eine Fülle an Liganden. Diese Gruppe der TLR sucht das extrazelluläre Kompartiment permanent nach PAMP ab [52, 59] (s. Tab. 4).

Die Toll-like Rezeptoren tragen als Charakteristikum eine Leucin-reiche Ektodomäne (LRR, engl. *leucin rich repeats*). Diese Ektodomäne ist verantwortlich für die Erkennung der Pathogenmuster (PAMP). Intrazellulär besitzen die Toll-like Rezeptoren eine Domäne, die homolog zur zytoplasmatischen Domäne des Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) ist, auch TIR-Domäne genannt (TIR, engl. *Toll-interleukin-1-receptor*). Die TIR-Domäne ist dabei Teil eines Adaptormoleküls, von dem bisher vier identifiziert sind, nämlich MyD88, TIR-assoziiertes Protein (TIRAP, auch bekannt als Mal), TRIF (engl. *TIR-domain containing adaptor protein inducing Interferon β* , auch bekannt als TICAM 1) und TRAM (engl. *TRIF-related adaptor molecules*, TICAM 2). Die Adaptormoleküle induzieren, nach Erkennung des PAMP durch den jeweiligen TLR, die Signaltransduktionskaskade. Sie stehen am Anfang einer Kaskade, die in der Expression von proentzündlichen Zytokinen und Chemokinen, Typ I Interferonen zur viralen Abwehr und kostimulatorischer Moleküle mündet [46, 52, 59].

Tabelle 4: Pathogen-assoziierte molekulare Muster und zugehörige Toll-like Rezeptoren

Pathogen	Molekulares Muster	Toll-like Rezeptor
<i>Bakterienwand</i>		
Alle Bakterien	Peptidoglykan	TLR2
Gram - Bakterien	Lipopolysaccharid	TLR4
Gram + Bakterien	Triacyl-Lipopetide	TLR1/TLR2
	Lipoteichonsäure	TLR2-TLR6
	Diacyl-Lipopetide	TLR2-TLR6
	Porine	TLR2
	Mykobakterien	Lipoarabinomannan
	Triacyl-Lipopetide	TLR1/TLR2
<i>Mikrobielle oder virale Nukleinsäuren</i>		
DNA	CpG-DNA	TLR9
	dsDNA	–
RNA	dsRNA	TLR3
	ssRNA	TLR7/TLR8
	3P-RNA	–
<i>Andere Pathogenbestandteile</i>		
Flagella	Flagellin	TLR5
E. coli (uropathogen)	?	mTLR11
Virale Hüllproteine	RSV-Hüllprotein	TLR4
	Masern-Virus-Hämagglutinin	TLR2
	CMV-, HSV1-Proteine	TLR2
<i>Pilzzellwand</i>	Candida-Phospholipomannan	TLR2
	Candida-Mannan	TLR4
	Saccharomyces-Zyosan	

Doppelsträngige DNA (dsDNA) wird nicht von TLR erkannt, 5`Triphosphat RNA wird von RIG-like Helikasen erkannt. CMV, Zytomegalie-Virus; HSV1, Herpes-simplex Virus Typ I; RSV, respiratorisches Synzytial-Virus. Aus *H-J Anders* [53].

MyD88 war das erste identifizierte Adaptormolekül und es ist Bestandteil der Signalkaskade aller TLR, mit Ausnahme von TLR3. Es kommt folglich zur Aktivierung von MAP-Kinasen und des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der dann in den Zellkern transloziert, um dort die Transkription proentzündlicher Gene anzuregen. TLR3 hingegen nutzt TRIF als Adaptormolekül, das gilt ebenfalls für TLR4. Es kommt zur Induktion alternativer Signaltransduktionspfade, an deren Ende die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und NF- κ B und die konsequente Expression von Typ I Interferonen und proentzündlicher Zytokine stehen.

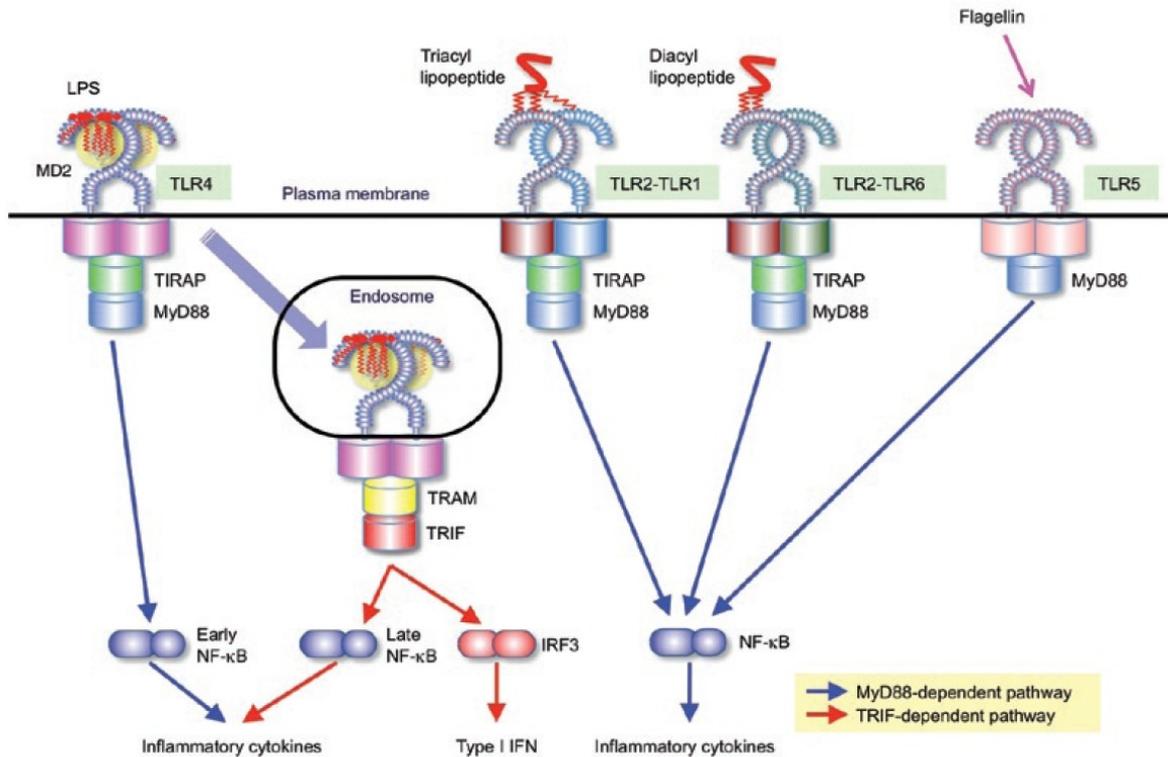


Abb. 6: PAMP-Erkennung an der Zelloberfläche durch Toll-like Rezeptoren

Die pathogenen Muster aus dem extrazellulären Kompartiment werden spezifisch von einem TLR erkannt und gebunden, was zur Aktivierung der Signalkaskade führt. Einige Rezeptoren bilden Homodimere, andere Heterodimere. Ziel der Kaskade ist die Expression von proentzündlichen Zytokinen und von Interferonen im Rahmen der primären Immunantwort. TLR4 ist der einzige Rezeptor der Toll-Familie der sowohl MyD88- als auch TRIF-abhängig zur Induktion der Immunantwort befähigt ist. Aus *T. Kawai et al.* [52].

TRAM und TIRAP haben rekrutierende Funktion. TRAM rekrutiert TRIF an TLR4, während TIRAP das Adaptormolekül MyD88 an TLR2 bringt. Man kann zusammenfassend von zwei möglichen Signalkaskaden der TLR-Aktivierung ausgehen, nämlich eine MyD88-abhängige und eine TRIF-abhängige Signalkaskade (vgl. Abb. 6 und 7). Der MyD88-abhängige Pfad induziert die Expression von inflammatorischen Zytokinen, TRIF führt zur Expression von inflammatorischen Zytokinen und

Typ I Interferonen, die in der viralen Abwehr von großer Bedeutung sind [52]. Die Schlüsselfunktion der Toll-like Rezeptoren liegt also in der Zündung einer inflammatorischen Kettenreaktion.

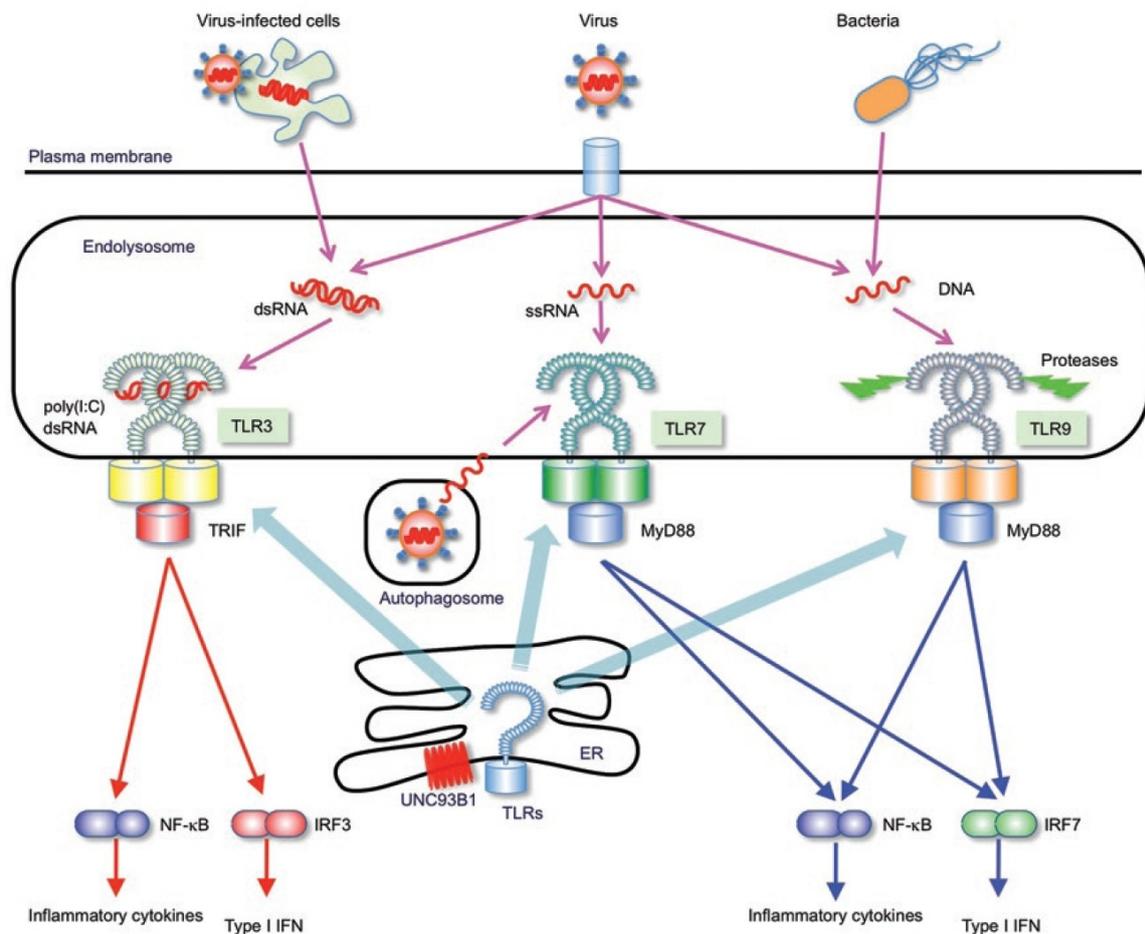


Abb. 7: PAMP-Erkennung im Zellinneren durch Toll-like Rezeptoren

Pathogene Muster, die endosomal oder endolysosomal eingeschlossen sind, werden spezifisch von einem der TLR3, 7, 8 oder 9 erkannt. Es handelt sich bei den PAMP hauptsächlich um Nukleinsäuren jeglicher Art. Ihre Bindung an den jeweiligen Toll-like Rezeptor führt zu Dimerisierung desselben und führt zu Aktivierung der proentzündlichen Signalkaskade. TLR3 ist der einzige Toll-like Rezeptor, der ausschließlich mit TRIF als Adaptormolekül kommuniziert. Aus T. Kawai et al. [52].

2.2.2. Toll-like Rezeptoren und die akute ischämische Nierenschädigung

Neben den intrarenalen Immunzellen sind es vor allem die Tubulusepithelzellen und Mesangialzellen, die Toll-like Rezeptoren exprimieren. Dabei steht natürlich im Vordergrund, dass TLR, als wichtige Sensoren der angeborenen Immunität, wesentlich an der Infektionsabwehr beteiligt sind [53, 60].

Aber das Konzept der Pathogenerkennung- und eliminierung wird im Kontext der ischämischen akuten Nierenschädigung einer Tatsache nicht ganz gerecht: man erkennt ganz eindeutig eine lokale inflammatorische Reaktion, allerdings in einem sterilen Milieu [61]. Es konnte gezeigt werden, dass Toll-like Rezeptoren eine ganz wesentliche Rolle spielen bei Ischämie und Reperfusion. Sie werden ähnlich aktiviert, wie im Fall einer Infektion und das mit denselben Konsequenzen: es kommt zur proentzündlichen Immunantwort. In diversen Studien zu Ischämie und Reperfusion wurde beobachtet, dass sich TLR4- und TLR2-Defizienz bei Mäusen günstig auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden in Organen wie der Leber [62], dem Herzen [63, 64], dem ZNS [58], der Lunge [65] und der Niere [45, 66, 67] auswirkt. Für die Niere scheinen dabei vor allem TLR2 und TLR4 von besonderer Bedeutung zu sein. Beide Toll-like Rezeptortypen werden ständig auf renalen Tubulusepithelzellen exprimiert. Einen kurzen Überblick über die TLR-Expression auf renalen und anderen Parenchymzellen gibt Tabelle 5. Es konnte bewiesen werden, dass vor allem TLR2 und TLR4 nach Ischämie und Reperfusion stark von renalem Tubulusepithel exprimiert werden, beziehungsweise deren mRNA. Diese beiden Toll-like Rezeptoren führen in der ischämischen Niere zu einer starken Expression von Zyto- und Chemokinen.

Tabelle 5: TLR-Expression in diversen Geweben (Auswahl)

Niere	Leber	Herz	Intestinum	Gehirn
Niere gesamt: TLR1, 2, 3, 4, 5 und 7 häufiger als TLR6, 8, 9 und 10	Hepatozyten: TLR2, 3, 4 und 5	Herz gesamt: TLR2, 3, 4, 5, 7 und 9	Intestinale Mukosa: TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 9	Mikroglia: TLR 1-9
Tubulusepithelzellen: TLR1, 2, 3, 4 und 6	Kupfferzellen: TLR 2, 3, 4 und 9	Kardiale Myozyten: TLR2, 3, 4, 6 und 8	Mononukleäre Zellen der Lamina propria: TLR4	Astrozyten: TLR1-9
Epithel der Bowman'schen Kapsel: TLR2	Gallengangsepithel: TLR2, 3, 4 und 5	Koronarendothel: TLR2 und 4	Glatte Muskulatur: TLR4	Oligodendrozyten: TLR2 und 3
Epithel distaler Tubulus, dünne Schenkel der Henle'schen Schleife und Sammelrohre: TLR4	Sinusoidalepithel: TLR4			Neurone: TLR2, 3, 4, 8 und 9
Intrarenale DC: TLR1-6	Heaptische DC: TLR4, 7 und 9 NK-Zellen: TLR1, 2, 3, 4, 6, 7 und 9			

TLR werden in nahezu jedem Organ exprimiert, sowohl auf Parenchymzellen als auch auf residenten Immunzellen. Nach *H-J Anders* [53] und *T. V. Arumugam et al.* [68].

Damit ist gezeigt, dass Toll-like Rezeptoren, allen voran TLR2 und 4 und deren Aktivierung eine proentzündliche Antwort bedingen, die wesentlich am Ischämie- und Reperfusionsschaden beteiligt ist [42, 45, 66, 67].

Dabei stellt sich die Frage, wie die TLR bei Ischämie und Reperfusion aktiviert werden, nachdem es sich bei der akuten ischämischen Nierenschädigung nicht um eine Infekt-getriggerte Erkrankung handelt. Ischämie und Reperfusion bewirken, wie in 1.4. erwähnt, dass das betroffene Gewebe apoptotisch und nekrotisch wird. Das geschädigte Gewebe setzt darauf hin eine Fülle an Liganden frei, die offenbar in der Lage sind, TLR genauso zu aktivieren wie die klassischen Liganden, die Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMP) [41, 69]. Dieses Konzept der Eigenaktivierung des Immunsystems, in völliger Abwesenheit klassischer PAMP, ist in der sogenannten „Danger-Hypothese“ (engl. Gefahr) beschrieben, die Matzinger et al. 1994 erstmals formulierte. Dabei ging man davon aus, dass sich vor allem das adaptive Immunsystem entwickelte, um nicht nur einer Infektion zu begegnen, sondern auch dem nicht-physiologischen Zelltod, beziehungsweise dem Zellschaden allgemein [70].

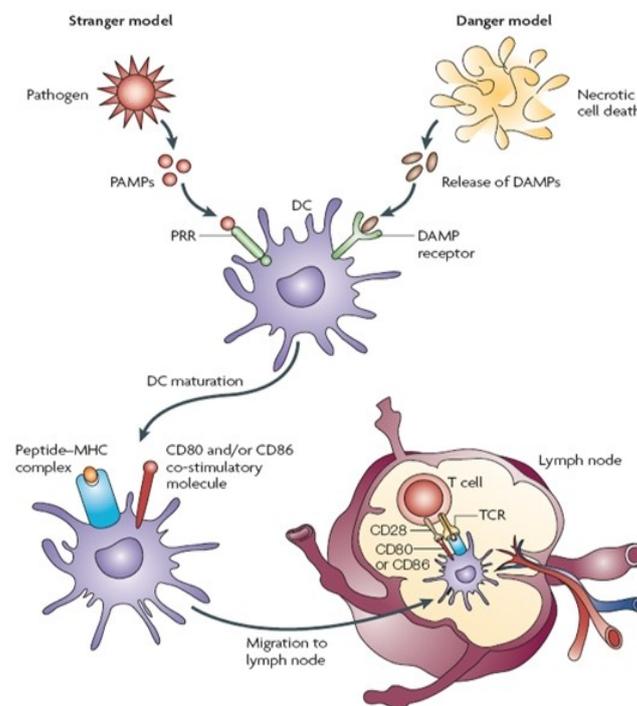


Abb. 8: Aktivierung dendritischer Zellen durch PAMP und DAMP

Dendritische Zellen sind in allen Geweben vertreten und in der Lage, mit ihren PRR diverse Liganden zu erkennen. Dazu gehören sowohl PAMP der Erreger, als auch endogene DAMP aus nekrotischen Zellen. Durch Bindung sowohl von PAMP, als auch DAMP, kommt es zur Aktivierung und Ausreifung der DC. Kostimulatorische membranständige Proteine wie CD80 und CD86 werden exprimiert und die Reife DC wandert in den regionalen Lymphknoten, bzw. das drainierende lymphatische Gewebe und induzieren dort die T-Zellaktivierung. PAMP = *pathogen associated molecular pattern*, DAMP = *damage associated molecular pattern*, DC = dendritische Zelle, PRR = *pathogen recognition receptor*, TCR = *T cell receptor*. Aus H. Kono et al. [41]

Demnach stellt der unnatürliche Zelltod eine Gefahrensituation für den Organismus dar, unabhängig davon, ob er auf Grund einer Infektion oder eines anderen pathologischen Prozesses entsteht. Der Zelltod kann, im Falle einer Infektion, synergistisch zur Immunantwort beitragen. Das würde erklären, wieso das Immunsystem sowohl durch klassische PAMP-Muster aktiviert wird, als auch durch andere Liganden, die im sterilen Milieu freigesetzt werden. Dabei scheint deren aktivierende Wirkung auf das Immunsystem ähnlich der Adjuvanswirkung bei Immunisierungsprozessen zu sein [41, 70].

Diese endogenen Liganden, die bei Zellschädigung freigesetzt werden, werden analog zu den PAMP der Erreger DAMP (engl. *damage associated molecular patterns*) genannt [41]. DAMP aus nekrotischen Zellen können folglich analog zu PAMP von dendritischen Zellen oder andern Antigen-

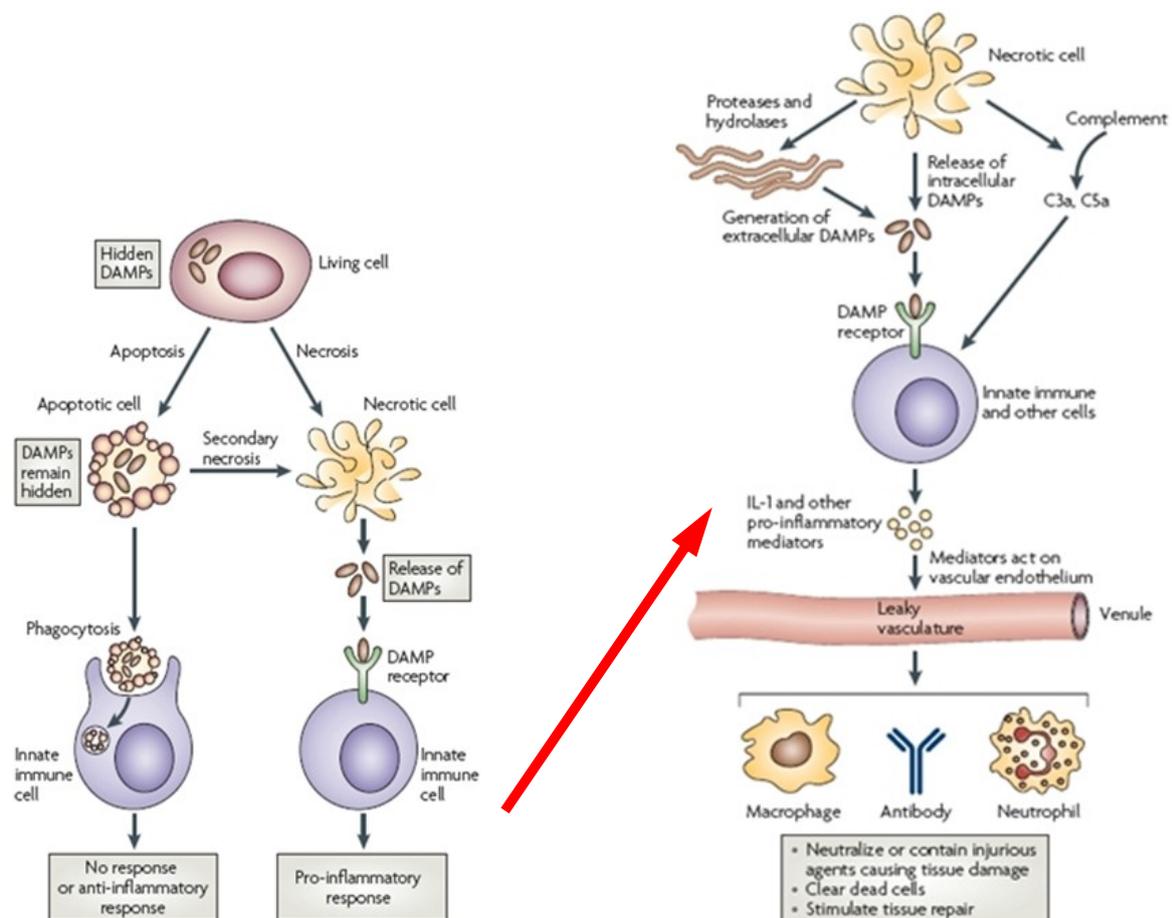


Abb. 9: Zelltod und Entzündungsreaktion

Nekrotische Zellen sind instabil und ihre Zellmembran rupturiert, so dass es zur Freisetzung von DAMP kommt. Diese sind endogenen Liganden, die physiologisch intrazellulär „versteckt“ liegen. Werden die DAMP von den PRR der residenten Immunzellen, allen voran der dendritischen Zellen, erkannt, so induzieren sie analog zur PAMP-Erkennung eine lokale Entzündung mit Mediator-Kaskade und den sich anschließenden inflammatorischen Vorgängen. Aus H. Kono et al. [41]

präsentierenden Zellen präsentiert werden, was sowohl zu deren eigenen Reifung beziehungsweise Aktivierung führt und sie in die Lymphknoten zur T-Zellaktivierung wandern lässt (s. Abb. 8) [71-73]. Der Ursprung der DAMP ist wohl intrazellulär zu suchen, ob auch membranständige DAMP vorhanden sind, beziehungsweise wirken, ist nicht völlig geklärt [74]. Geht also eine Zelle in die Nekrose, bedeutet das den Verlust der Integrität der Zellmembran und die Freisetzung von DAMP ist die Folge. Zu unterscheiden ist dabei der primäre vom sekundären nekrotischen Zelltod. Die primäre Nekrose ist charakterisiert durch Vakuolenbildung im Zytoplasma und Anschwellen der Organellen, wie Zellkern und Mitochondrien (Onkose). Dies führt zur Ruptur der Zellmembran. Sekundäre Nekrose bezeichnet den Vorgang, der sich in apoptotischen Zellen abspielt, wenn diese nicht (rechtzeitig) phagozytiert und eliminiert werden. Es kommt dabei ebenfalls zum Verlust der Membranintegrität und Ruptur (vgl. Abb. 9). Der programmierte Zelltod schützt folglich vor dem ungewollten Freisetzen endogener Liganden [41]. In vivo konnte sogar gezeigt werden, lange bevor die Danger-Hypothese aufkam, dass der Zelltod auch zu einer Entzündungsreaktion führt (vgl. Abb. 9) [41, 75, 76]. Toll-like Rezeptoren können dabei einige der DAMP erkennen und binden. In diversen Studien wurde erkannt, dass so eine proentzündliche Antwort generiert werden kann [41]. Tabelle 6 gibt einen kurzen Überblick über bisher identifizierte DAMP und ihre mögliche Aktivierung von Toll-like Rezeptoren.

Tabelle 6: Proentzündliche Aktivität von intrazellulären DAMP

DAMP	Proentzündliche Aktivität	Potentielle Rezeptoren
HMGB1 (High mobility group box 1 Protein)	<i>in vitro</i> : Chemotaxis, Zytokininduktion	TLR2, TLR4, RAGE
Harnsäure (MSU)	<i>in vivo</i> : Gichtinduktion, Leukozytenrekutierung <i>in vitro</i> : Zytokininduktion	TLR2, TLR4, CD14
Chromatin, Nukleosomen	<i>in vivo</i> : Neutrophilenrekutierung <i>in vitro</i> : Zytokininduktion	TLR9 u.a.
HSP (Hitzeschockprotein)	<i>in vitro</i> : Zytokininduktion (HSP60, HSP70, HSP90)	TLR2 u. TLR4 (HSP60), CD14 (HSP70 und -60), CD40 (HSP70)
Defensin	<i>in vitro</i> : Chemotaxis	TLR4, CCR6

Auswahl nach H. Kono et al. [41]

2.3. Renale dendritische Zellen und ihre Rolle bei Ischämie und Reperfusion

Das angeborene und das adaptive Immunsystem sind wichtige Akteure im ständigen Bemühen um die Abwehr von Erregern. Jedoch sind diese beiden Bestandteile des Immunsystems keinesfalls scharf getrennt und isoliert voneinander. Genau im Überschneidungsbereich beider Systeme liegt eine ganz bestimmte Art von Immunzellen, nämlich die dendritischen Zellen, die sowohl Eigenschaften des angeborenen Immunsystems, wie auch des adaptiven Immunsystems in sich vereinen. Dendritische Zellen sind eine Population von Antigen-präsentierenden Zellen und dazu befähigt, eine Reaktion seitens des Immunsystems auszulösen. Sie befinden sich in sämtlichen lymphatischen Geweben und in den meisten nichtlymphatischen Geweben, so auch in der Niere. Sie sind es, die zwischen beiden Immunsystemen vermitteln. Auch im Rahmen der sterilen Entzündung, wie sie beispielsweise bei Ischämie und Reperfusion vorliegt, sind dendritische Zellen von entscheidender Bedeutung sind [77, 78].

2.3.1. Ursprung und Eigenschaften der dendritischen Zellen

Erstmals von Steinman in den 1970er Jahre beschrieben [79], der sie im Milzgewebe zuerst beobachtet hat, handelt es sich bei den dendritischen Zellen um eine Immunzellpopulation mit Antigen-präsentierenden und immunregulatorischen Eigenschaften [79]. Der Name leitet sich von ihrer charakteristischen Morphe, die durch viele zweigartige Zellfortsätze (Dendriten, gr. *dendrites*, zum Baum gehörend) charakterisiert ist. Sie entstammen von CD34⁺ Stammzellen des Knochenmarks ab, von wo sie als unreife Zellen im Blut in periphere Gewebe gelangen. So entstehen unausgereifte gewebeständige dendritische Zellen. Die bekanntesten unter ihnen sind die Langerhans'schen Zellen der Haut [73, 80].

Die dendritischen Zellen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Induktion einer adaptiven Immunantwort, sowie für das Ausmaß und die Qualität derselben. Dendritische Zellen, als unreife Wächterzellen, finden sich in sämtlichen lymphatischen Geweben, aber auch in vielen anderen peripheren Geweben und einige Unterarten zirkulieren auch im Blut, wo sie ihre Umgebung ständig nach Erregern beziehungsweise nach PAMP absuchen. So können sie im Falle einer Infektion aktiviert werden und Alarm schlagen oder sie können das Warnsignal auch von Vertretern des angeborenen Immunsystems erhalten, welches sich mit Erregern konfrontiert sieht. Im ersten Fall kommt es zur Phagozytose von Antigenen und zu ihrer endolysosomalen Degradation mit anschließender Expression von Peptidfragmenten des Erregers auf der Oberfläche der dendritischen Zellen. Diese Fragmente werden auf den MHC-Klasse-II-Molekülen und zusammen

mit weiteren kostimulatorischen Oberflächenproteinen präsentiert. Im anderen Fall, in dem die dendritischen Zellen durch Mediatoren des angeborenen Immunsystems aktiviert werden, wandern sie entlang eines Konzentrationsgradienten von inflammatorischen Chemokinen wie zum Beispiel TNF- α und IL-1 zum Ort des Geschehens. Dabei besteht die primäre Aufgabe der dendritischen Zellen in der Aktivierung von Immunzellen des erworbenen Immunsystems, um eine gezielte Erregerabwehr zu ermöglichen. Dendritische Zellen tragen sozusagen die Information eines mikrobiellen und pathologischen Geschehens zu den spezifischen Immunzellen, die sie anhand ihrer Oberflächenmerkmale aktivieren und stimulieren, um diese zu Hilfe zu rufen. Dendritischen Zellen sind aber auch in der Lage, durch endogene Liganden (DAMP), die von sterbenden Zellen freigesetzt werden, stimuliert zu werden [67, 73, 77, 80, 81]. Bis sie dazu in der Lage sind, das spezifische Immunsystem, unter anderem durch Antigenpräsentation, zu aktivieren, haben die dendritischen Zellen einen sehr komplexen Wandlungs- und Reifungsprozess durchlaufen. Aus der Fülle an Veränderungen seien hier folgende genannt:

- Morphologische Veränderungen, wie der Verlust von Adhäsionsmolekülen und die Restrukturierung des eigenen Zytoskelettes, beides dient dem Zweck der Lösung aus dem umgebenden Gewebe und damit dem Erwerb von Mobilität. Die aktivierten dendritischen Zellen migrieren in den drainierenden Lymphknoten bzw. andere sekundäre lymphatische Organe, um T- und B-Zellen zu aktivieren [82].
- Veränderungen im Bereich der Rezeptoren, die für die Phago- und Endozytose zuständig sind, wie beispielsweise CD11b (auch MAC-1 genannt) und F4/80. Diese Marker werden auch unter anderem von Makrophagen exprimiert. Diese Tatsache führte dazu, dass man die residenten dendritischen Zellen auch als residente Gewebsmakrophagen bezeichnete [83, 84]. Die Expression von Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR5 und CXCR1, werden durch den Reifungsprozess dendritischer Zellen drastisch vermindert. Es findet ein Wechsel statt in der Expression von Rezeptoren für entzündliche Chemokine, hin zu einer Expression von Rezeptoren für lymphoide Chemokine, was unter anderem mit der autokrinen Stimulation durch MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES erklärt werden kann [85]. Gleichzeitig kommt es zur Hochregulation von den Rezeptortypen CXCR4, CCR4 und CCR7 und weitere [77, 80].
- Synthese und Exkretion von löslichen Mediatoren (Chemo- und Zytokine), um Immunzellen anzulocken, sie zu aktivieren und sie zu differenzieren. RANTES, MCP-1 und MCP-2 und andere haben dabei beispielsweise sowohl autokrine als auch parakrine Funktionen. Sie sorgen neben dem Reifungsprozess der dendritischen Zelle auch zur Aufrechterhaltung des entzündlichen Prozesses, in dem Monozyten, unreife dendritische Zellen (durch IP-10) und Granulozyten herbeigerufen werden [77, 80, 85].

- Gesteigerte Synthese und Expression der kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80 und CD86 (CD80 und CD86 gehören zu Molekülen der B7-Familie), die vor allem für die Interaktion mit T-Zellen von Bedeutung sind. MHC-Klasse-II-Moleküle translozieren vermehrt an die Zelloberfläche [77].

Die dendritischen Zellen verlassen also den Ort der lokalen Entzündung und migrieren in das drainierende lymphatische Gewebe, meist in den drainierenden Lymphknoten. Dort angelangt, werden die prozessierten Antigene, die an MHC-II gebunden sind, den unreifen, naiven T-Zellen in der parakortikalen Region präsentiert. Diese werden darauf hin aktiviert, verlassen den residenten Lymphknoten und wandern aus in das entzündete Gewebe, um dort im Sinne der spezifischen Immunabwehr zu agieren. Für die Aktivierung der naiven T-Zellen benötigt es außer der Antigenpräsentation noch weitere kostimulatorische Signale. Mindestens drei weitere Arten von kostimulatorischen Mediatoren und Oberflächenproteinen sind dazu nötig. Es handelt sich um gewisse Zytokine, die Oberflächenmoleküle der B7-Familie und die TNF-Familie [73, 77].

2.3.2. Renale dendritische Zellen

Es war zwar immer bekannt, dass auch in der Niere residente dendritische Zellen zu finden sind, aber neuere Erkenntnisse haben zu einem neuen Denken in der Nierenforschung geführt. In den frühen 1980ern konnten residente, sternartige Zellen mit Merkmalen der mononukleären Phagozyten im renalen Interstitium und Mesangium identifiziert werden, die auch MHC-II-positiv waren, was zu der Schlussfolgerung führte, es handle sich um professionelle antigenpräsentierende Zellen [86, 87]. Daraus konnte man schließen, dass es sich bei diesen dendritischen Zellen um Zellen aus der myeloischen Reihe handelt und sie damit Teil des so genannten mononukleären Phagozytensystems sind (MPS) [88-90]. Zwar wird CD11c als einer der Hauptmarker für murine dendritische Zellen gesehen, dennoch konnte gezeigt werden, dass CD11b von mehr als 90 % der renalen CD11c⁺ dendritischen Zellen ebenfalls exprimiert wird (vgl. Tab. 7).

Einige Studien zeigten zwar, dass sich dendritische Zellen im intertubulären Raum aufhalten (vgl. [87, 88, 91-93], ob sie sich auch in den Glomeruli, im intratubulären Raum, oder zufällig verteilt liegen, war bisher nicht klar [89].

Soos et al. und konnten 2006 zeigen, dass heterozygote CX₃CR1^{GFP/+}-Mäuse in ihren Nieren ein kontinuierliches, interdigitierendes Netzwerk dendritischer Zellen besitzen, das sich wie eine Hülle um Nephrone legt (vgl. Abb. 10) [89]. Davor war man davon ausgegangen, dass die renalen dendritischen Zellen (rDC) eher in kleiner Zahl, und mehr oder weniger zufällig, im renalen Interstitium verteilt lagen, ohne dass eine bedeutende Verbindung oder Kommunikation

untereinander bestand beziehungsweise stattfand [83, 89]. Dieses weitläufige interstitielle anatomische Netzwerk unreifer renaler dendritischer Zellen stellt ein hochkomplexes

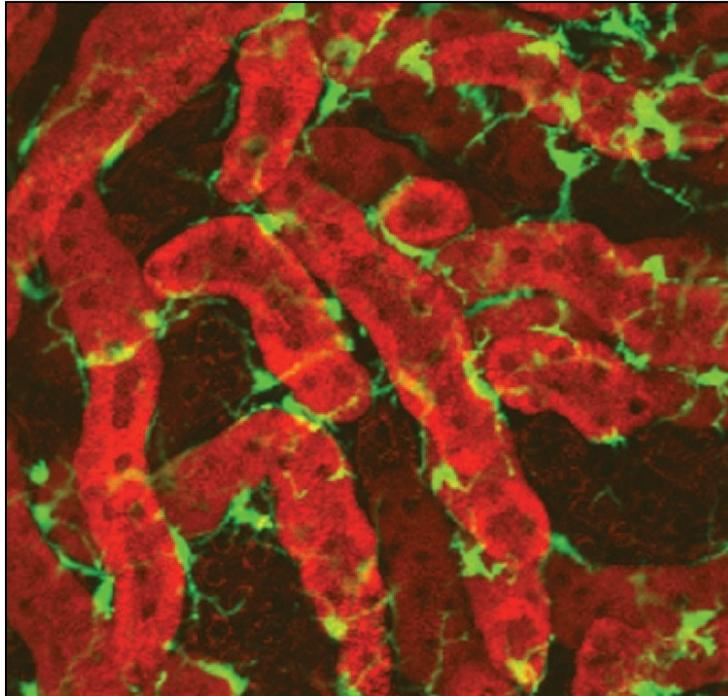


Abb. 10: Das renale Netzwerk interdigitierender dendritischer Zellen

Dargestellt sind residente dendritische Zellen (grün leuchtend), die weitläufig mit einander in Verbindung stehen und ein eigenes anatomisches Kompartiment bilden. Dieses ist peritubulär, ähnlich einer Hülle, angeordnet und umfasst damit die Tubuli (rot gefärbt). Die residenten dendritischen Zellen überwachen so in ihrem eigenen Kompartiment das umliegende Gewebe. Es handelt sich hierbei um „knock-in“-Mäuse, bei denen ein Allel des Chemokinrezeptor-CX₃CR1-Gens durch ein open reading frame des GFP-Proteins (green fluorescent protein) ersetzt wurde. Aus *John et al.* und *Soos et al.* [86, 89].

Überwachungssystem dar, das permanent nach Gefahrensignalen in der Niere Ausschau hält. So kann schnell und effektiv auf Antigene, egal ob fremden, oder eigenen Ursprungs, reagiert werden [40, 86, 89].

Tab. 7: FACS-Analyse renaler CX₃CR1⁺ dendritischer Zellen bezüglich ihres Expressionsverhaltens von Oberflächenmarkern im Vergleich zu Splenozyten

Marker	CX ₃ CR1 ⁺ CD11c ⁺		CX ₃ CR1 ⁺ CD11c ⁻		CX ₃ CR1 ⁻ CD11c ⁺	
	Niere	Milz	Niere	Milz	Niere	Milz
CD11b	+	+	+	+	+	+
MHC II	+	+	+ (75 %)	- (< 10 %)	+ (75 %)	+
F4/80	niedrig (66 %)	niedrig	niedrig (75 %)	niedrig	niedrig (50 %)	niedrig
CD4	- (< 5 %)	+ (35 %)	-	-	+ (30 %)	+ (55 %)
CD8α	- (< 5 %)	+ (20 %)	-	-	+ (10 %)	+ (13 %)
B220	-	-	-	-	-	-
NK1.1	-	- (6 %)	-	- (7 %)	-	-
CD3ε	-	-	-	-	-	-
GR-1	-	-	-	-	-	+
CD80	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig
CD86	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig	niedrig
CD40	-	-	-	-	-	-
FcγR II/III	+	+ (65 %)	+	+	+ (50 %)	+ (80 %)
2 Mda dextran	+ (39 %)	- (7 %)	+ (52 %)	- (3 %)	+ (15 %)	- (3 %)

Aus Soos et al. [89]

2.3.3. Renale dendritische Zellen bei Ischämie/Reperfusion

Das Netzwerk dendritischer Zellen in der Niere zeichnet für eine Reihe immunologischer Vorgänge innerhalb der Niere verantwortlich, die während einer akuten Nierenschädigung ablaufen. Die schwere Hypoxie, die der ischämischen akuten Nierenschädigung zu Grunde liegt, hat einen wichtigen Einfluss auf die Reifung der renalen dendritischen Zellen, ihre Aktivität und das Immunsystem im Allgemeinen [94].

Die Immunantwort auf Ischämie und Reperfusion, die zur sterilen Entzündung führt, wird vor allem in der Anfangsphase von den dendritischen Zellen innerhalb der Niere getragen. Dabei stellt die renale Hypoxie an sich einen Stimulus zur Reifung der renalen dendritischen Zellen dar. Die unreifen dendritischen Zellen durchlaufen in vitro bei Hypoxie einen Reifungsprozess, der mit einer Differenzierung dendritischer Zellen bei mikrobieller Stimulation vergleichbar ist. Es kommt zu einer erhöhten Expression von kostimulatorischen Oberflächenproteinen, wie CD40 [95]. Auf genetischer Ebene führt Ischämie in renalen dendritischen Zellen zu einer Stabilisation und folglich

zu einer Akkumulation des Hypoxie-sensitiven Transkriptionsfaktor HIF-1 α (engl. *hypoxia inducible factor 1 α*). HIF-1 α beeinflusst direkt die Expression von mehr als 60 Genen, und reguliert bis zu 5 % des menschlichen Genoms [96, 97]. HIF-1 α (in den meisten Zelltypen exprimiert) und HIF-2 α (vor allem exprimiert im Kortexinterstitium, Endothel, glomeruläre Zellen, nicht in renalen Tubulusepithelzellen) sind heterodimere Transkriptionsfaktoren, die eine Sauerstoff-sensitive α -Untereinheit besitzen. Diese Untereinheit wird unter normoxischen Bedingungen rasch nach ihrem Entstehen durch die pVHL-E3-Ubiquitinligase abgebaut, während die β -Untereinheit ständig exprimiert bleibt. HIF reguliert unter anderem die Expression wichtiger Haushaltsgene, die am zellulären Metabolismus, der zellulären Proliferation und Differenzierung beteiligt sind. Zu den Proteinen dieser Haushaltsgene gehören klassischerweise der Glukosetransporter GLUT-1 (engl. *glucose transporter 1*) und die Phosphoglyceratkinase 1 (engl. *phosphoglycerat kinase 1, PGK-1*). Desweiteren reguliert HIF auch die Expression des vaskulären Wachstumsfaktors VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) und das die Erythropese stimulierende Hormon Erythropoetin (EPO) [98]. Durch HIF-1 α werden die unreifen renalen dendritischen Zellen aktiviert und zur Einleitung einer Immunantwort stimuliert [94, 95]. Das Ausmaß der Aktivierung und Stimulation ließ sich in vitro wesentlich steigern, in dem den dendritischen Zellen neben der Hypoxie noch ein weiterer Reiz gegeben wurde. *Jantsch et al.* zeigten, dass renale dendritische Zellen, bei einer synergistischen Stimulation durch den TLR4-Liganden LPS (Lipopolysaccharid, ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien) ein deutlich höheres Aktivierungsprofil zeigen, als unter alleiniger hypoxischer Stimulation. Dabei kam es zur deutlichen Erhöhung der Expression von MHC-II, CD80 und CD86 und damit konsequent zu einem hohen Aktivierungspotential für T-Zellen. Diese Erkenntnisse suggerieren, dass die Hypoxie alleingegenommen für renale dendritische Zelle nicht unbedingt der potenteste Stimulus ist, noch, dass Hypoxie allein dazu ausreicht, eine potente Immunantwort durch die renalen dendritischen Zellen zu induzieren. Auch in dem Fall mit zusätzlicher LPS-Stimulation war eine deutlich erhöhte Aktivität von HIF-1 α zu verzeichnen [99]. Ein weiterer Effekt der Hypoxie, beziehungsweise der renalen Ischämie, auf dendritische Zellen der Niere zeigt sich in der Sekretion von potenten proentzündlichen Mediatoren. In der frühen Phase bis 24 Stunden nach Ischämie und Reperfusion zeigte sich, dass die residenten dendritischen Zellen die dominierenden TNF α -sezernierenden (Tumornekrosefaktor) Zellen der Niere sind. Erst später setzt die Produktion von TNF α durch das Endothel ein [100]. Die allermeisten Zellen besitzen Rezeptoren für TNF α . Hohe Pegel von TNF α führen unter anderem zur Apoptoseinduktion im Bereich des renalen Endothels und damit eventuell zur Freisetzung von DAMP (s. oben). Auch ist TNF α an der Diapedese der Leukozyten beteiligt. Dieser sehr früh sezernierte Mediator erklärt unter anderem die leukozytäre Infiltration, die nach Ischämie/Reperfusion zu beobachten ist. Es ist auch, mit anderen, für den Schaden am Organ verantwortlich. Interessanterweise sind auch Toll-

like Rezeptoren der dendritischen Zellen, allen voran TLR4 an der Produktion von TNF α beteiligt. Auch produzieren die residenten dendritischen Zellen eine Fülle weiterer Zyto- und Chemokine wie IL-6, MCP-1 und RANTES (CCL5), deren Funktion die Stimulation einer Immunantwort ist. Selbstverständlich können andere Zellarten der Niere, allen voran die Tubulusepithelzellen, ebenfalls lösliche Mediatoren freisetzen. Jedoch zeigten *Dong et al.* ebenfalls, dass es die renalen dendritischen Zellen sind, die jene Mediatoren am stärksten sezernieren. Das betont ihre Bedeutung an der Entstehung des Schadens nach Ischämie und Reperfusion [78, 101, 102].

2.4. Toll-like Rezeptoren und ihre Regulation

Die Familie der Toll-like Rezeptoren sind essentielle Mediatoren beziehungsweise Rezeptoren auf Zellen der angeborenen, als auch der adaptiven Immunität. Allerdings darf eine Abwehrreaktion, egal welcher Art, in keinem Fall sich selbst überlassen bleiben. Die Exzessive und unkontrollierte Immunreaktion auf einen Stimulus, egal ob durch PAMP oder DAMP bedingt, ist konsequenterweise vom Organismus unerwünscht und verursacht nur mehr Schaden, als ohnehin schon eingetreten ist. Eine unkontrollierte und exzessive Immunantwort, die auf eine ungehinderte Aktivierung des Immunsystems durch TLR-Liganden beruht, beinhaltet eine schwere Entzündungsreaktion, die mit einem vermeidbaren und daher unnötigen Gewebeschaden assoziiert ist [103].

Es nur eine logische Schlussfolgerung, dass die Natur zum Schutz des Organismus vor dem eigenen Immunsystem, die Möglichkeit der Kontrolle und Überwachung der eigenen Abwehrreaktion eingerichtet haben muss. Ein Ansatz zur Regulation der Toll-like Rezeptor-abhängigen Immunantwort besteht darin, in die Signaltransduktionskaskade der Toll-like Rezeptoren auf verschiedenen Ebenen einzugreifen. Unter anderem existieren Splicevarianten von Adaptorproteinen wie TRAM und verwandte Adaptorproteine wie SARM, die in die Signaltransduktionskaskade der TRIF-abhängigen Toll-like Rezeptoren eingreifen und so diese Signalkaskade blockieren [104, 105]. Auch die klassischen Degradationsenzyme, die sonst auch im alltäglichen Zellmetabolismus eingebunden sind, wie Ubiquitinligasen und Deubiquitinasen, können mildernd und regulierend auf die TLR-Aktivität einwirken [106, 107]. Ebenfalls dienen Mikro-RNA-Moleküle wie beispielsweise miR-16, das regulierend auf die TLR4-abhängige Signaltransduktion wirkt und miR-146, das NF- κ B-abhängig induziert wird, der Regulation der TLR-abhängigen Immunantwort [108, 109]. Es konnte gezeigt werden, dass TANK-defiziente Mäuse spontan eine Autoimmunglomerulonephritis entwickeln, was im Umkehrschluss zeigt, dass TANK als

physiologischer Regulator innerhalb der TLR-Signaltransduktionskaskade agiert. TANK bindet die Adaptorproteine TBK1 und IKKi und somit sowohl mit Aktivierung von NF- κ B als auch von IRF3 assoziiert. Dabei scheint sich die TANK-Defizienz vor allem auf B-Zellen und Makrophagen, beziehungsweise deren Funktion, auszuwirken [52, 110]. Es können aber auch klassische Negativ-Feedback-Mechanismen bei der Regulation der TLR-abhängigen Immunantwort beobachtet werden. So wurde gezeigt, dass eine TLR-Aktivierung auch gleichzeitig durch „Abzweigung“ aus der Signaltransduktionskaskade zu einer erhöhten Expression von regulatorischen Proteinen wie beispielsweise Zc3h12a führt. Zc3h12a ist ein Protein, das eine CCCH-Zinkfingerdomäne besitzt und gleichzeitig über eine RNaseaktivität verfügt. Dabei zielt Zc3h12a auf das untranslatierte 3'-Ende der mRNA proentzündlicher Mediatoren, wie IL-6 und IL-12p40, um diese mRNA mittels seiner RNasefähigkeit der Degradation zuzuführen [52, 111].

Es gibt noch eine Fülle weiterer mehr, oder minder gut erforschter Regulatoren im Bereich der TLR-Signaltransduktion, die in der vorhergehenden kurzen Übersicht nicht eingegangen sind. In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk allerdings auf einem ganz bestimmten Inhibitor der TLR-Signaltransduktionskaskade: es handelt sich dabei um das *Single Immunoglobulin IL-1 Receptor-related protein* kurz SIGIRR. Seine Charakteristika sowie die Rolle von SIGIRR für das akute ischämische Nierenversagen beziehungsweise die akute ischämische Nierenschädigung sind Gegenstand der folgenden Erläuterungen.

2.4.1. Charakterisierung von SIGIRR

SIGIRR, auch TIR8 genannt, ist ein Mitglied einer transmembranären Rezeptorenfamilie: die transmembranären TIR-Familie. Diese spielt eine wichtige Rolle bei der Generierung von Immunantworten. Ihre wohl bekanntesten Mitglieder sind mit Sicherheit die Toll-like Rezeptoren (s. 2.2.1). TIR steht hierbei für Toll-Interleukin-1 Rezeptor (engl. *Toll-Interleukin-1 receptor*) [112, 113]. Die Proteine der TIR-Familie haben als gemeinsames Merkmal eine intrazelluläre TIR-Domäne. Die Toll-IL-1R-Familie lässt sich dabei in zwei Untergruppen einteilen, deren Unterschied auf der Beschaffenheit der extrazellulären Domäne beruht [112]:

- Zum einen gibt es die Untergruppe der TIR-Familie, die dadurch gekennzeichnet ist, dass ihre Rezeptoren über eine extrazelluläre Immunglobulindomäne (Ig-Domäne) verfügen. Ihre wichtigsten Vertreter sind der Interleukin-1-Rezeptor (IL-1RI und IL-1RII, obwohl IL-1RII nicht über eine TIR-Domäne verfügt [114]). Er dient als negativer Regulator, in dem er IL-1 bindet [115]), daneben der Interleukin-18-Rezeptor (IL-18R), ST2 (auch bekannt als T1) und eben SIGIRR [112].

- Zum anderen existiert eine Unterfamilie der TIR-Familie, die durch ein extrazellulär gelegenes Leucin-reiches Wiederholungsmotiv gekennzeichnet ist (engl. *leucin-rich repeat motif-containing receptors*) und über keine extrazelluläre Ig-Domäne verfügen. Diese Untergruppe beinhaltet die Toll-like Rezeptoren (vgl. 2.2.1) [112, 116, 117].

Das Molekül SIGIRR ist innerhalb seiner Untergruppe der Ig-Ektodomäne der einzige Rezeptor mit TIR-Domäne, der eine einzelne Ig-Ektodomäne besitzt (vgl. Abb. 11). Trotz seiner offensichtlichen genetischen Ähnlichkeit mit den anderen Rezeptoren der TIR-Familie, die auf Chromosom 2 codiert liegen, befindet sich das SIGIRR/TIR8-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 bei 11p15 [118, 119]. Der humane SIGIRR/TIR8 existiert in 4 Transkriptionsvarianten, die zwischen 0,9 kb und 4,4 kb lang sind, während die Maus nur ein einziges Transkript besitzt [119-121].

Die extrazelluläre Ig-Domäne von SIGIRR besteht in ihrer Primärstruktur aus 118 Aminosäuren und ist damit in ihrer Möglichkeit zur Bildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen stark eingeschränkt. Die Kürze der Ig-Domäne macht eine Faltung des Proteins unmöglich und birgt damit die Unfähigkeit, einen Liganden (selbst IL-1) zu binden, da keine Bindungsstelle zur Verfügung steht [122]. Die einzelne Ig-Domäne ist durch den transmembranären Teil des SIGIRR/TIR8-Moleküls mit der intrazellulären Domäne verbunden, die eine Gesamtlänge von 268 Aminosäuren umfasst. Sie ist damit um 77 Aminosäuren länger als die intrazelluläre Domäne des klassischen IL-1 Rezeptors. Dabei besteht eine große Ähnlichkeit mit dem Toll-Protein von *Drosophila melanogaster* [119]. Die offensichtlich nicht funktionelle Ektodomäne suggeriert also eine Bedeutung der wesentlich längeren intrazellulären Domäne für die Funktionalität von SIGIRR/TIR8.

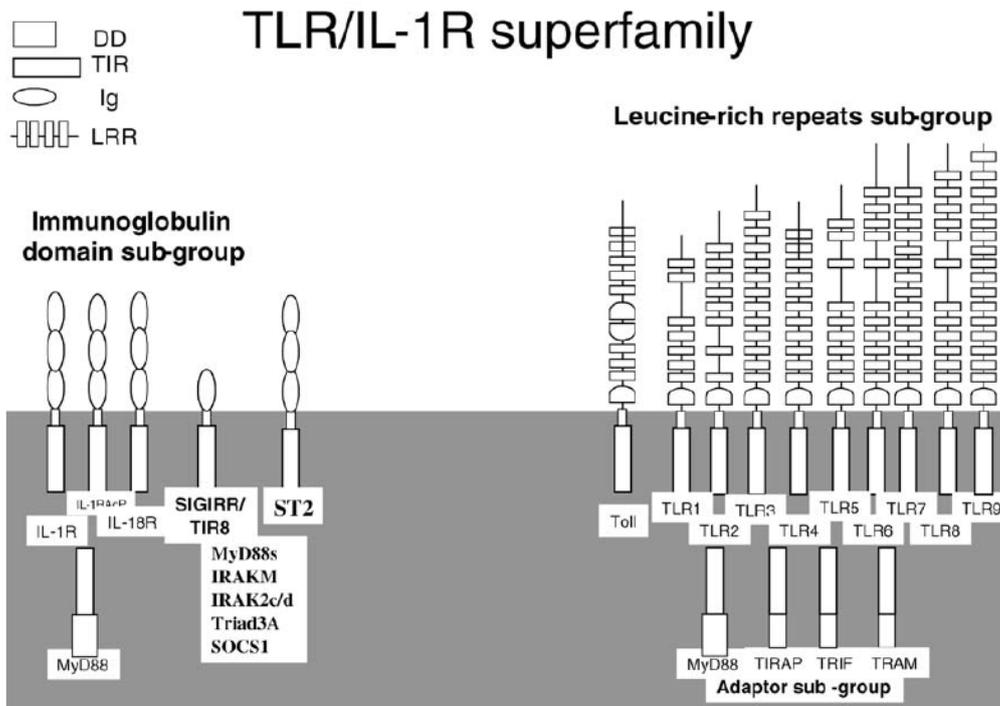


Abb. 11: Die Familie der Toll-like Rezeptoren/IL-1 Rezeptoren

Klar erkennbar sind die beiden Unterfamilien der TIR-Gruppe, links die Familie der Rezeptoren mit der Immunglobulinektodomäne, rechts die Familie mit dem Leucin-reichen Wiederholungsmotiv (LRR). Beachte die singuläre Ig-Domäne von SIGIRR/TIR8. Aus *Li et al.* [123]

SIGIRR konnte in den allermeisten humanen und murinen Organen nachgewiesen werden. Die größten Mengen konnten dabei in der Niere, der Leber und dem Gastrointestinaltrakt gefunden werden. Dabei scheinen vor allem die Epithelzellen SIGIRR/TIR8 bevorzugt zu exprimieren, genauso wie Dendritische Zellen, aber nicht primäre Makrophagen, beziehungsweise konnte hier nur ein sehr niedriges Expressionsniveau gezeigt werden [116, 124]. Eine äußerst bedeutende Beobachtung bezüglich der Wirkung von SIGIRR/TIR8 innerhalb der murinen Nieren machten *Lech et al.* Dabei zeigte sich, dass SIGIRR/TIR8, obwohl es sowohl in renalen Tubulusepithelzellen, als auch residenten renalen dendritischen Zellen exprimiert wird, in diesen Zelltypen unterschiedlich wirkt (s. Abb. 12). Es konnte zum einen gezeigt werden, dass eine durch den TLR4-Liganden LPS stimulierte proentzündliche Antwort lediglich in den residenten renalen dendritischen Zellen durch SIGIRR/TIR8 unterdrückt wird, nicht aber in den renalen Tubulusepithelzellen. So zeigten Tubulusepithelzellen des SIGIRR/TIR8-Wildtyps und des SIGIRR/TIR8-Knock out nämlich keinen Unterschied in der Produktion proentzündlicher Chemokine, wenn sie mit LPS stimuliert wurden. Ganz im Gegensatz zu den SIGIRR/TIR8-defizienten dendritischen Zellen, deren Antwort auf die Stimulation mit LPS, gemessen an der Produktion proentzündlicher Zyto- und Chemokine, deutlich erhöht war. Mit anderen Worten scheint SIGIRR/TIR8 keine Rolle für die Unterdrückung einer Immunantwort in renalen Tubulusepithelzellen zu spielen. Das liegt daran, dass SIGIRR/TIR8 in den

Tubulusepithelzellen und renalen dendritischen Zellen eine unterschiedliche postrtranslationale Modifikation erfährt. Der Unterschied lag dabei nicht in verschiedenen Splicevarianten der SIGIRR/TIR8-mRNA, sondern in einer unterschiedlichen N- und O-Glykosylierung, die letztlich in den Tubulusepithelzellen zu einer Inaktivität von SIGIRR/TIR8 führt. Das unterstreicht die Rolle der Tubulusepithelzellen als Sensoren für mikrobielle Infektion [124].

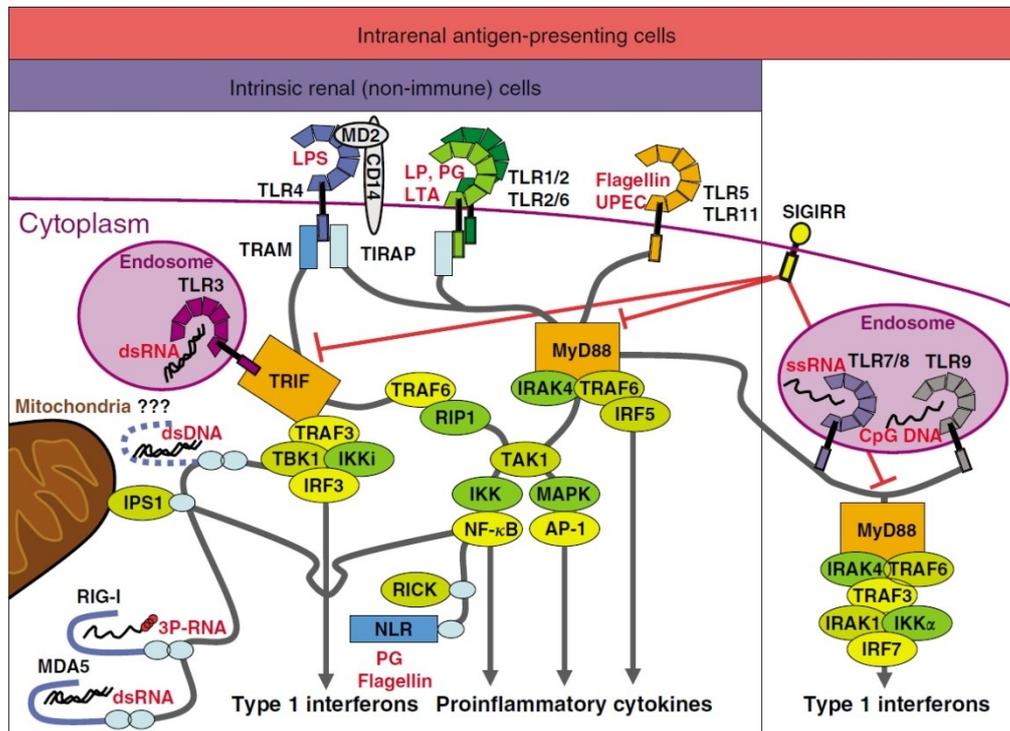


Abb. 12: Übersicht der Rezeptoren der angeborenen Immunität in der Niere

Die Expression von Toll-like Rezeptoren und anderen Rezeptoren wie RLHs und NLRs in den Zelltypen der Niere ist unterschiedlich. Die intrarenalen Antigen-präsentierenden Zellen (dendritische Zellen) weisen eine größere Vielfalt an Rezeptoren auf und sind im Vergleich zu den intrinsischen Zellen durch SIGIRR/TIR8 reguliert. Eine hemmende Wirkung von SIGIRR/TIR8 konnte nur in den dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Aus *H-J Anders* [53].

2.4.2. Die (inhibitorische) Funktion von SIGIRR/TIR8

Auf Grund der viel zu kurzen extrazellulären Ig-Struktur des SIGIRR/TIR8 muss davon ausgegangen werden, dass keine Aktivierung vom extrazellulären Kompartiment aus erfolgen kann. Mit anderen Worten gesagt: es ist wohl kein Ligand vorhanden, der in irgendeiner Weise mit der Ektodomäne interagieren kann und SIGIRR/TIR8 auch überhaupt erst gar keine Antigenbindungsstelle besitzt [122]. Die intrazellulär gelegene TIR-Domäne von SIGIRR/TIR8 hingegen kann sehr wohl mit einer beginnenden Signaltransduktionskaskade interagieren, beziehungsweise auf eine solche einwirken. Das hatte zur Annahme geführt, SIGIRR/TIR8 habe eher eine regulatorische Funktion. Diese Annahme gilt mittlerweile als bewiesene Tatsache [116, 117]. Hierzu müssen aber zunächst ein paar Erläuterungen gegeben werden, auch wenn noch nicht völlig klar ist, welche genauen Mechanismen ablaufen, wenn SIGIRR, besser gesagt seine TIR-Domäne aktiviert wird.

SIGIRR bildet, ähnlich einiger Toll-like Rezeptoren, homodimere Strukturen, die mit einigen Toll-like Rezeptoren und IL-1 Rezeptoren interagieren. Dabei spielt die TIR-Domäne des SIGIRR-Moleküls die Hauptrolle, da sie analog zu den TIR-Domänen der Toll-like Rezeptoren mit den jeweiligen Adaptermolekülen kommunizieren/interagieren, die da wären MyD88, Mal/TIRAP, TRIF/TICAM 1 und TRAM/TICAM 2 (vgl. 2.2.1 oben). In dem Moment, da SIGIRR/TIR8 involviert ist, kommt es allerdings zu keiner Aktivierung der Signalkaskade. Es konnte gezeigt werden, dass heterodimere TIR-Komplexe, welche die SIGIRR-TIR-Domäne enthalten, nicht, wie von den Toll-like Rezeptoren gewöhnt, zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen. Auch kommt es zu keiner Aktivierung von Kinasen innerhalb der Signalkaskade wie JNK, oder p38. Ganz im Gegenteil unterdrückt SIGIRR/TIR8 sogar die TLR/IL-1R-Kaskade. Das ist auf eine bauliche Besonderheit innerhalb der Primärstruktur der TIR-Domäne des SIGIRR-Moleküls zurückzuführen. Es fehlen zwei Aminosäuren, nämlich Serin an Position 447 und Tyr 536, die sonst bei den anderen hochkonservierten TIR-Domänen anderer Rezeptoren vorhanden sind [116, 117, 119]. Abbildung 13 zeigt ein mögliches Verhalten von SIGIRR bei der Hemmung einer TLR4-abhängigen Signaltransduktionskaskade. Offensichtlich hilft die konstitutionelle Expression von SIGIRR/TIR8 an der Zellmembran diverser Zelltypen dabei, dass nicht einfach ungehindert und unkontrolliert proentzündliche Signalkaskaden ablaufen können, wenn diese auf einer Aktivierung von Toll-like Rezeptoren beruhen. Mit anderen Worten agiert SIGIRR als Bremse und Regulator innerhalb des Systems der PAMP-/DAMP-Erkennung durch TLRs [117].

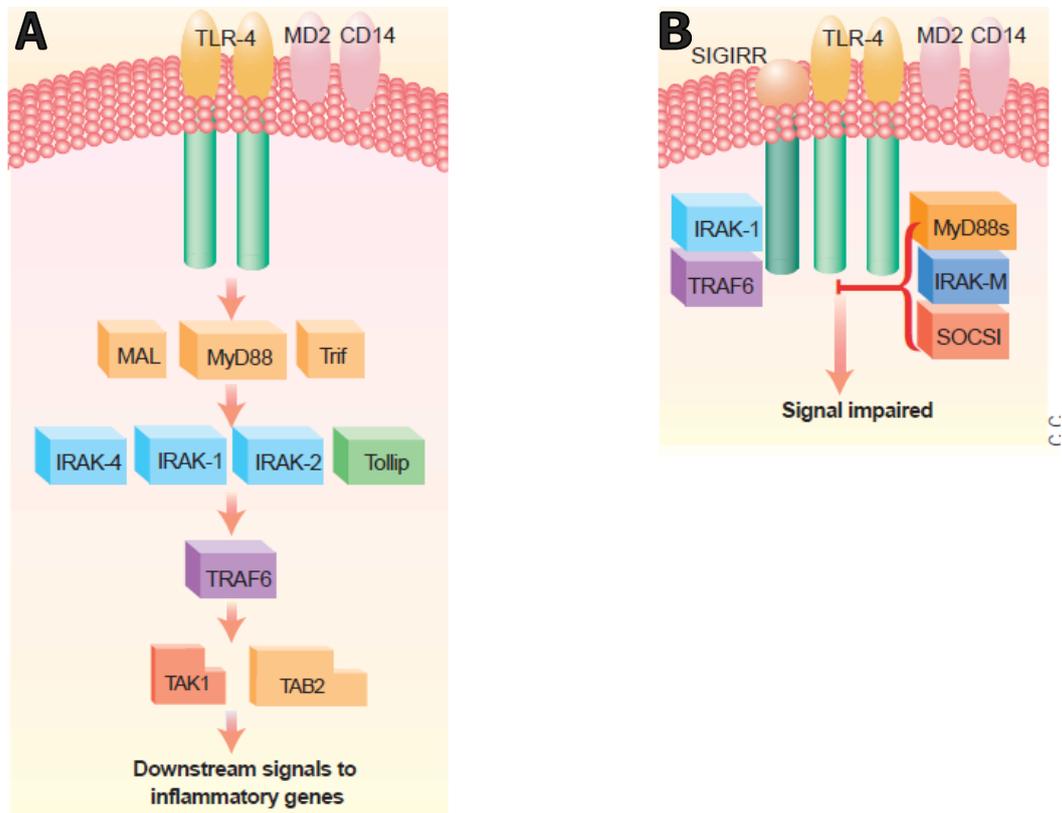


Abb. 13: Der inhibitorische Mechanismus von SIGIRR

Am Beispiel der Signalkaskade von TLR4 ist hier die Funktion von SIGIRR/TIR8 schematisiert. **A** Das TLR4-Signal wird eingeschaltet, wobei drei Adaptormoleküle rekrutiert werden, die jeweils über eine TIR-Domäne verfügen. Dabei handelt es sich um die Adapter Mal, MyD88 und TRIF. Es folgt die Aktivierung von IRAK-4, welches durch Phosphorylierung zur Aktivierung von IRAK-1 führt. Dadurch kann TRAF6 an den Komplex konjugiert werden, was dann schließlich zur Aktivierung der Kinase TAK 1 führt. Dies alles benötigt der Transkriptionsfaktor NF- κ B um die Expression proentzündlicher Gene einzuleiten. **B** Die transmembranäre beziehungsweise die intrazelluläre TIR-Domäne von SIGIRR/TIR8 wird im Sinne einer Signalinhibition in diesem Beispiel an TLR4 rekrutiert. Durch die Heterodimerisierung mit der jeweiligen TIR-Domäne wird verhindert, dass IRAK-1 und konsequenterweise TRAF6 aktiviert werden können. Aus Luke AJ O'Neill [117].

Wald *et al.* zeigten in einem Experiment, dass bei einer Überexpression von SIGIRR/TIR8 in Jurkat- und HepG2-Zellen *in vitro* und anschließender Stimulation dieser Zellen mit IL-1 und IL-18 eine deutlich reduzierte Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B resultierte. *In vivo* zeigten Wald *et al.*, dass SIGIRR-defiziente Mäuse bei einer Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS eine mehr als deutlich gesteigerte Immunantwort generieren und eine höhere Mortalität im septischen Schock (durch LPS-Stimulation generiert) aufweisen als die Wildtypkontrolle, das gleiche galt für andere Stimuli wie IL-1 und CpG-DNA [116]. *In vitro* wurde exakt das gleiche beobachtet und zwar diesmal bei SIGIRR-defizienten dendritischen Zellen. Diesen wurden im Versuch ebenfalls mit LPS und CpG-DNA stimuliert und zeigten ein sehr hohes Aktivierungs- und Stimulationsniveau, das im Vergleich zur Wildtypkontrolle deutlich höher ausfiel [121]. Auch in einer Studie zur Rolle

von SIGIRR bei Rheumatoider Arthritis zeigten sich günstige Effekte auf der Ebene von Entzündungsmediatoren [125]. Selbst im ZNS scheint SIGIRR bei Entzündungen modulierend beteiligt zu sein [126]. *Véliz Rodriguez et al.* beschrieben die protektive Wirkung von SIGIRR/TIR8 in Mäusen bei pulmonaler Infektion mit *P. aeruginosa* [127]. Somit sind Hinweise dafür gesammelt, dass SIGIRR/TIR8 hemmende Wirkung auf die Signaltransduktionskaskaden der Toll-like Rezeptoren TLR4, 5, 9 und auf den IL-1-Rezeptor hat. Gemessen wurde dieses Phänomen dabei unter anderem an der Menge produzierter proentzündlicher Mediatoren, deren Expression bei SIGIRR-Defizienz nicht nur gesteigert sondern auch länger anhielt. Interessanterweise hat SIGIRR/TIR8 wohl keinen Einfluss auf die TNF α -abhängige Signalkaskade, da der TNF α -Rezeptor nicht zur Familie der TLR-IL-1-Rezeptoren zählt [116].

2.4.3. Hypothese: Die Rolle von SIGIRR/TIR8 bei renaler Ischämie/Reperfusion

Zusammenfassend basiert die vorliegende Arbeit auf folgender Annahme: SIGIRR/TIR8, neben anderen Faktoren, agiert spezifisch als Inhibitor der Toll-like Rezeptor-abhängigen Signaltransduktionskaskade der intrarenalen Antigen-präsentierenden Zellen bei Ischämie und Reperfusion.

Die exakte Regulation einer Immunantwort bedarf grundsätzlich einer intensiveren Betrachtung. Der Organismus reagiert nicht pauschal auf eine Infektion, bei der es zur Freisetzung von PAMP kommt. Das gilt auch für den Fall einer Gewebeschädigung anderer Art, bei der DAMP freigesetzt werden, beispielsweise im Rahmen von Ischämie und Reperfusion. Keine immunologische Reaktion darf einfach beginnen, und dann unkontrolliert ablaufen.

Aus der Forschung weiß man, dass die Aktivierung, vor allem von TLR2 und TLR4 in renalen Parenchymzellen zum Ischämie- und Reperfusionsschaden beiträgt [66, 67]. Wir sehen es aber hier anders. In dieser Arbeit wird die Rolle eines inhibitorischen Faktors, nämlich SIGIRR/TIR8, in murinen renalen dendritischen Zellen näher untersucht. Man ist davon ausgegangen, dass das intrarenale Netzwerk dendritischer Zellen eine wichtige Überwachungsfunktion für die Niere hat. Außerdem, dass diese Zellen im Rahmen der renalen Ischämie und Reperfusion durch DAMP, die aus den nekrotischen und sterbenden Zellen des renalen Gewebes freigesetzt werden, aktiviert werden. Dabei sind es vor allem Rezeptoren der angeborenen Immunität, die auf solche endogene Liganden ansprechen. Diese Aktivierung führt in einer Art Teufelskreis zu einer zusätzlichen Gewebeschädigung durch die bei der Reperfusion herbeieilenden Leukozyten. Ohne eine spezifische Hemmung (nicht Unterdrückung!) dieser initialen Aktivierung der residenten dendritischen Zellen durch Moleküle wie SIGIRR/TIR8, fällt der Gewebeschaden durch Ischämie und

Reperfusion deutlich stärker aus. Folglich ist die Hemmung der Immunantwort in residenten renalen dendritischen Zellen, die bei Ischämie/Reperfusion aktiviert werden, eine wesentliche Instanz zur Schadensbegrenzung und zur Verhinderung der akuten Nierenversagens beziehungsweise der akuten Nierenschädigung.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Tierhaltung

Makrolone Typ II Käfige

Tecniplast, Hamburg

Tierfutter

Ssniff Spezialdiäten, Soest

TIR8/SIGIRR-defiziente Mäuse

Alberto Mantovani, Mailand

C57BL/6J-Wildtypmäuse

Charles River Laboratories, Sulzfeld

3.1.2. Geräte

Waagen

Analytische Waage, BP 110 S

Sartorius, Göttingen

Mettler PJ 3000

Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz

Inkubatoren

Type B5060 EC-CO2

Heraeus Sepatech, München

ELISA-Geräte

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus

Tecan, Crailsheim

ELISA-Washer ELx50

Bio Tek, Bad Friedrichshall

Mikroskope/Kameras

Cohu4920-Monochrome Cooled Camcorder

Cohu, Poway CA, USA

Entwickler Curix 60

AGFA, Köln

Leica DC 300F

Leica Microsystems, Cambridge, UK

NIKON D50 DSLR

Nikon, Tokyo, Japan

Olympus BX50 (auch für intravitale Mikroskopie)

Olympus Microscopy, Hamburg

SIGMA EX MACRO 50 mm 1:2.8 D Makroobjektiv

Sigma Corporation, Tokyo, Japan

Zentrifugen

Heraeus, Biofuge primo

Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

Heraeus, Minifuge T

VWR International, Darmstadt

Heraeus, Sepatech Biofuge A

Heraeus Sepatech, München

LightCycler®480 Real-Time PCR System

Roche, Basel, Schweiz

Klebefolie	Roche, Basel, Schweiz
LightCycler 480 Multiwell-Platte 96	Roche, Basel, Schweiz
Bestrahlung	
GC 40 107	MDS Nordion, Canada
In vitro-Hypoxie	
Flowmeter, SFM 3001	Billups-Rothenberg Inc., Del Mar CA, USA
Modular Incubator Chamber	Billups-Rothenberg Inc., Del Mar CA, USA
N ₂ -Gas	Linde Gas, Linde AG, München
Sonstiges	
Creatinin FS*-Kit	DiaSys Diagnostic System, Holzheim
Cryostat CM 3000	Leica Microsystems, Bensheim
Cryostat RM 2155	Leica Microsystems, Bensheim
Einbettkassetten, Plastik Histosette	neoLab Migge, Heidelberg
Einweg-Küvetten 1m5 ml Plastibrand®	Brand, Gießen
Eppendorf-Gefäße 1,5 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Gel-Kammer (PCR)	PeqLab Biotechnologie, Erlangen
Homogenizer ULTRA-TURAXX T25	IKA GmbH, Staufen
Immobilon PVDF Transfermembran	Millipore, Schwalbach
Kodak BioMax XAR Film	Sigma Aldrich, Deutschland
Kryobox Cryo 1 °C Freezing cont	Nalgene™, Rochester NY, USA
Kryovials	Alpha Laboratories, Eastleigh, UK
Küvetten 1,5 ml Plastibrand®	Brand, Gießen
Mikronaeurysmaklemme	Medicon, Tuttlingen
Mikrotom HM 340E	Microm, Heidelberg
Multikanalpipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg
Nunc-Immuno™ 96 Microwell™-Platten	Nunc, Wiesbaden
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim
Photometer Ultrospec 1000	Amersham, Freiburg
Pipettenspitzen 1 - 1000 µl Typ Gilson®	Peske, Aindling-Arnhofen
QuadroMACS™-Seperator	Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA, USA
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, und 25 ml	BD, Heidelberg
Spritzen BD Plastipak 1000 µl, 5 ml	BD, Heidelberg
Steril Card Hood Class II Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, ME, USA

SuperFrost® Plus Microscope Slides	Menzel-Gläser, Braunschweig
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
UV-Licht	Bachhofer Laborgeräte, Reutlingen
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Bensheim
Whatman-Papier	Millipore, Schwalbach
Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.3. Chemikalien und Material

Chemikalien für molekularbiologische Techniken

<u>ELISA-Kit IL-6 (BD OptEIA™ Set Mouse IL-6)</u>	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>Antikörper</i>	
Bindeantikörper: monoklonaler Anti-Maus IL-6 AK	BD Biosciences, San Diego CA, USA
Detectorantikörper: monoklon. biotin. Anti-Maus IL-6 AK	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>IL-6 Standard: rekombinantes lipophilisiertes Maus-IL-6</i>	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>Enzymreagenz: Streptavidin-Meerrettichperoxidasekonjugat</i>	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>Beschickungspuffer (Eigenherstellung)</i>	
Natriumcarbonat Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid NaOH	Merck, Darmstadt
<i>Probenverdünner (Eigenherstellung)</i>	
Fötale bovines Serum (FBS)	Biochrom KG, Berlin
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
<i>Waschpuffer</i>	
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Polysorbat Tween®-20	Merck, Darmstadt
<i>Substratlösung</i>	
Tetramethylbenzidin TMB	BD Biosciences, San Diego CA, USA
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>Stopplösung 2 N H₂SO₄</i>	Merck, Darmstadt
<u>ELISA-Kit MIP-2 (DuoSet® ELISA mouse MIP-2 DY452)</u>	R&D Systems, Inc., Minneapolis MN, USA
<i>Antikörper</i>	

Bindeantikörper: monoklonaler Ratten-Anti-Maus	
MIP-2 AK	R&D Systems, Inc., Minneapolis MN, USA
Detectorantikörper: monoklon biotin.	
Ziegen-Anti-Maus MIP-2 AK	R&D Systems, Inc., Minneapolis MN, USA
<i>MIP-2 Standard: rekombinantes Maus-MIP-2</i>	R&D Systems, Inc., Minneapolis MN, USA
<i>Enzymreagenz: Streptavidin-Meerrettichperoxidasekonjugat</i>	R&D Systems, Inc., Minneapolis MN, USA
<i>Beschickungspuffer (Eigenherstellung)</i>	
Natriumcarbonat Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid NaOH	Merck, Darmstadt
<i>Probenverdünner (Eigenherstellung)</i>	
Fötale bovines Serum (FBS)	Biochrom KG, Berlin
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
<i>Waschpuffer</i>	
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Polysorbat Tween®-20	Merck, Darmstadt
<i>Substratlösung</i>	
Tetramethylbenzidin TMB	BD Biosciences, San Diego CA, USA
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>Stopplösung 2 N H₂SO₄</i>	Merck, Darmstadt
<u>ELISA-Kit MCP-1 (BD OptEIA™ Set Mouse MCP-1)</u>	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>Antikörper</i>	
Bindeantikörper: monoklonaler Anti-Maus MCP-1 AK	BD Biosciences, San Diego CA, USA
Detectorantikörper: monoklon. Anti-Maus MCP-1 AK, konjug. an MPO	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>MCP-1 Standard: rekombinantes lipophilisiertes Maus-MCP-1</i>	BD Biosciences, San Diego CA, USA
<i>Beschickungspuffer (Eigenherstellung)</i>	
Natriumcarbonat Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
<i>Probenverdünner (Eigenherstellung)</i>	
Fötale bovines Serum (FBS)	Biochrom KG, Berlin
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
<i>Waschpuffer</i>	

Dulbecco's PBS

Polysorbat Tween®-20

Substratlösung

Tetramethylbenzidin TMB

Wasserstoffperoxid H₂O₂

Stopplösung 2 N H₂SO₄

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Merck, Darmstadt

BD Biosciences, San Diego CA, USA

BD Biosciences, San Diego CA, USA

Merck, Darmstadt

Rneasy Mini Kit

Qiagen GmbH, Hilden

RT-PCR

RT-PCR primers 300 nM (vgl. Tab. XX)

Metabion International AG, Martinsried

2xSYBRgreen-Mastermix (10 ml)

2 ml 10x-Taq-Puffer

150 µl dNTP (25 mM)

4 ml PCR-Optimizer

200 µl BSA PCR grade (20 mg/ml)

40 µl SYBRgreen I (1:100, 20 % DMSO)

2m4 ml MgCl₂ (25 mM)

1,21 ml Rnase-freies Wasser

Fermentas, St.-Leon-Rot

Biotop AG, Witten

Fermentas, St.-Leon-Rot

Fluka/Sigma-Aldrich, München

Fermentas, St.-Leon-Rot

Braun

Primär-Antikörper

Ratte Anti-F4/80 (1:50)

Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada

Ratte Anti-Mausneutrophile (1:50)

Serotec, Oxford, UK

Schaf AntiCCL2

Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA

Sekundär-Antikörper

Anti-Ratte IgG

Vector Laboratories, Burlingame, USA

Anti-Schaf IgG

Vector Laboratories, Burlingame, USA

Chemikalien für Isolation primärer muriner APC und primärer TEC

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Invitrogen, Karlsruhe

Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)

Roche, Mannheim, Deutschland

CD11b MicroBeads

Miltenyi Biotec, Auburn CA, USA

Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM-Medium)

Biochrom KG, Berlin

Dulbecco's PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Fötale bovines Serum (FBS)	Biochrom KG, Berlin
Hank's balanced Salt Solution (HBSS)	Invitrogen, Karlsruhe
K1-Medium (Eigenherstellung)	
DMEM-Medium	Biochrom KG, Berlin
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
FBS	Biochrom KG, Berlin
PS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
epidermaler Wachstumsfaktor EGF	
Hormonmischung (Eigenherstellung)	
HBSS	Invitrogen, Karlsruhe
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
ITSS (Insulin-Transferrin-Sodium-Selenite)	Roche, Mannheim, Deutschland
Prostaglandin E1 (PGE-1)	
Trijodthyronin T3	
Hydrocortison	
Kollagen Typ IV (humane Plazenta)	Flukatec, Buchs, Schweiz
Penicillin/Streptomycin (PS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
rekombinantes murines rm GM-CSF	ImmunoTools, Friesoythe
RPMI-1640 Medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK
Trypsine/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Material für die Isolation primärer muriner APC und TEC

Isolation primärer renaler dendritischer Zellen

12Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden
24-Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden
6-Well-Platten (Zellkulturschalen)	Nunc, Wiesbaden
Falcons 15 ml und 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kanülen	BD Drogheda, Irland
MACS™ Pre-Separationfilter 30µm	Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA, USA
MACS™ Separationssäulen 25 LS	Miltenyi Biotec Inc., Auburn CA, USA
Neubauerzählkammer	
Pinzetten	
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg

Scheren

Skalpell No. 20

Spritze 10ml

Tissue culture dish (Petrischale), steril

Feather Safety Razor Co., Japan

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

TPP, Trasadingen, Schweiz

Isolation primärer renaler Tubulusepithelzellen

12Well-Platten (Zellkulturschalen)

Nunc, Wiesbaden

24-Well-Platten (Zellkulturschalen)

Nunc, Wiesbaden

6-Well-Platten (Zellkulturschalen)

Nunc, Wiesbaden

chirurg. Pinzetten

chirurg. Scheren

Falcons 15 ml und 50 ml

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Kanülen

BD Drogheda, Irland

Pipettenspitzen

Eppendorf AG, Hamburg

Skalpell No. 20

Feather Safety Razor Co., Japan

Spritze 10ml

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Tissue culture dish (Petrischale), steril

TPP, Trasadingen, Schweiz

Chemikalien für die Zellkultur

Fötales bovines Serum (FBS)

Biochrom KG, Berlin

K1-Medium (Eigenherstellung, s. oben)

Penicillin/Streptomycin (PS)

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

rekombinantes murines rm GM-CSF

ImmunoTools, Friesoythe

RPMI-1640 Medium

GIBCO/Invitrogen, Paisley, Scotland, UK

Material für die Zellkultur

12Well-Platten (Zellkulturschalen)

Nunc, Wiesbaden

24-Well-Platten (Zellkulturschalen)

Nunc, Wiesbaden

6-Well-Platten (Zellkulturschalen)

Nunc, Wiesbaden

Falcons 15 ml und 50 ml

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Pipetten Pipetman®P

Gilson, Middleton WI, USA

Pipettenspitzen

Eppendorf AG, Hamburg

Pipettierhilfe Pipetus®

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml

BD, Heidelberg

RNA-Gewinnung und cDNA-Synthese

0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe
15 µg/ml Linear Acrylamide	Ambion, Darmstadt
25nM dNTPS	dNTP-Set, GE Healthcare, München
40 U/µl rNasin	Promega, Mannheim
5*First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe
Diethyl-Pyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen
DNAse Set (enthält Dnase, RDD-Puffer, Rnase freies Wasser)	Qiagen GmbH, Hilden
Hexanucleotide	Roche, Mannheim
Natriumacetat (CH ₃ COONa)	Merck, Darmstadt
RNA Sample Loading Buffer	Sigma Aldrich, Deisenhofen
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

Western blot

10 % Ammoniumpersulfat (APES)	BioRad, München
10 % SDS	BioRad, München
2-Buthanol	Merck, Darmstadt
30 % Acrylamide (Rotiphorese Gel 30)	Roth, Karlsruhe
Bio-Rad Protein Assay	BioRad, München
Blockierlösung Western Blocking Reagent	Roche, Mannheim
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Desoxycholicacid	Sigma Aldrich, Deisenhofen
ECL (Chemilumineszenz) NEN™	Life Science Prod., Boston, USA
ECL Rabbit-IgG HRP-linked	GE Healthcare, München
EDTA	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Esel Anti-Ziege-IgG.Antikörper (1:10000)	Dianova, Hamurg
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
HCL	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt

NaCl	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Proteasen-Inhibitor-Cocktail Complete	Roche, Mannheim
Standard peqGOLD Protein-Marker II	Peqlab, Erlangen
TEMED	BioRad, München
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen
Tween 20	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen
Ziege Anti-SIGIRR-Antikörper (1:1000)	R&D Systems Inc., Emeryville, CA, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

PAS-Färbung

Ammoniumpersulfat (APES)	Bio-Rad, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehydlösung 37 %	Merck, Darmstadt
Mounting Medium Vecta Mount	Vector, Burlingame, CA, USA
PAS	Bio-Optica, Mailand, Italien
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.4. Narkose der Versuchstiere

Narkoselösung

- 10 ml Midazolam (1 mg/ml)
- 2 ml Fentanyl (0,05 mg/ml)
- 1 ml Dormitor (1 mg/ml)

Antagonistenlösung

- 5 ml Anexate (0,1 mg/ml)
- 0,5 ml Antisedan (5 mg/ml)
- 3 ml Naloxon (0,4 mg/ml)

3.1.5. Clodronat

Clodornatliposomen Cl2MDP	Roche Diagnostics, Basel, Schweiz
---------------------------	-----------------------------------

3.1.6. Software

Acrobat Writer	Adobe
Adobe Lightroom 3	Adobe
Endnote X4	Thomson
Firefox	Mozilla
Office 2003	Microsoft
Qwin	Leica
SigmaStat	Systat Software
Windows Vista	Microsoft

3.2. Methoden

3.2.1. Tierversuche

3.2.1.1. Versuchstierhaltung

Jeweils fünf bis sechs Mäuse wurden in Käfigen vom Typ Makrolone II (s. Material) bei 12-stündigem Hell-/Dunkelrhythmus gehalten. Dabei bestand uneingeschränkter und zeitlich zu keinem Zeitpunkt limitierter Zugang zu Futter und Wasser. Die Käfige, das Streu, Futter und Wasser wurden vor Verwendung durch Autoklavierung sterilisiert. Sämtliche Tierexperimente wurden entsprechend den deutschen Tierschutzbestimmungen durchgeführt und waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2.1.2. Versuchstiere: SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäuse

Homozygot defiziente SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäuse wurden durch homologe Rekombination des SIGIRR/TIR8-Gens durch die Arbeitsgruppe um Prof. Alberto Mantovani im 129/Sv-Hintergrund generiert. Anschließend genotypisiert und mit Mitgliedern des C57BL/6-Stammes verpaart, bis in die F6-Generation [120, 121, 128].

3.2.1.3. Induktion einer transienten Ischämie und Reperfusion

Kern der *in vivo* Studie war eine operativ induzierte transiente Ischämie der Niere mit einer sich unmittelbar anschließenden Reperfusion. Die Versuchstiere waren sechs Wochen alt und männlichen Geschlechts.

Zu Beginn der Operation wurde eine Narkosemischung angesetzt, die aus einem Barbiturat zur Hypnose, einem Benzodiazepin zur Sedierung und Muskelrelaxation, sowie einem Opiat zur Analgesie bestand. Zu diesem Zweck wurden zu 13 ml physiologischer NaCl-Lösung 1 mg Medetomidin, 10 mg Midazolam und 0,1 mg Fentanyl gegeben. Neben der Narkosemischung wurde auch eine Antagonistenmischung vorbereitet. Diese bestand aus 2,5 mg Atipamezol, 0,5 mg Flumazenil und 1,2 mg Naloxon. Diese Pharmaka wurden in 8,5 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Zur Narkoseeinleitung wurde zwischen 130 und 200 µl der Narkosemischung intraperitoneal verabreicht, je nach Gewicht, so dass die Dosis der einzelnen Narkosemittel 0,5 mg pro kg Körpergewicht Medetomidin, 5 mg pro kg Körpergewicht Midazolam sowie 0,05 mg pro kg Körpergewicht Fentanyl entsprach. Nach etwa 10 bis 20 Minuten war eine ausreichende Sedierung und Analgesie für chirurgische Eingriffe von mindestens einer Stunde Dauer gegeben. Während der Narkose wurde das Tier mittels Wärmelampe bei 37 °C warm gehalten und mit Bepanthen-Augensalbe zur Prophylaxe von Hornhautschäden versorgt. Im Anschluss daran wurde das Tier mittels Klebestreifen an allen Extremitäten an der Unterlage für den sich anschließenden Eingriff fixiert.

Nach Desinfektion des Operationsgebietes mit Ethanol erfolgte eine unilaterale Flankeninzision (bzw. in einem weiteren Teilversuch bilateral, da beide Nieren einer totalen Ischämie zugeführt wurden) von ca. 1,5 cm Länge unter sterilen Bedingungen dorsolateral. Nach Inzision und Separation der subkutanen Schichten, sowie der Muskulatur, wurde die Niere in der Tiefe des Retroperitonealraumes dargestellt und vorsichtig mit einer kleinen Pinzette aus ihrem Lager luxiert. Es folgte die vorsichtige Präparation des jeweiligen Hilum renale, um es dann im Anschluss mit einer Mikroaneurysmaklemme (vgl. Abb. 14) abzuklemmen, die an einem speziellen Adapter geführt wurde. Die Niere war damit vollständig von der arteriellen Perfusion isoliert. Dieser Zustand der totalen Ischämie wurde für jeweils 45 Minuten aufrecht erhalten. Nach genau 45-minütiger Klemmung des Hilum renale wurde die arterielle Perfusion durch Entfernen der mikrovaskulären Klemme wieder hergestellt. Das so reperfundierte Organ wurde in das Nierenlager reponiert. Es folgte die Wundnaht sowie die Klammerung der Hautinzision durch Fellklammern (vgl. Abb. 15). Der gesamte Eingriff lag bei rund 60 Minuten Dauer. Um einen möglichen Volumenverlust zu korrigieren wurde jedem Tier nach etwa der Hälfte der Ischämiezeit 1 ml steriler Kochsalzlösung subkutan injiziert. Nach Beendigung der Operation wurde die Narkose mittels Antagonistenlösung aufgehoben.

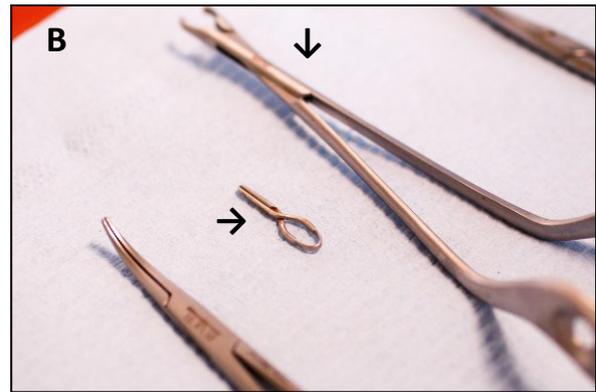


Abb. 14: Übersicht Operationsbesteck und Mikroaneurysmaklemme

A Operationsinstrumentarium, bestehend aus diversen Pinzetten und Scheren, die zuvor autoklaviert wurden, sowie Nadelhalter und Wundspreizer. **B** Mikroaneurysmaklemme (→) und zugehöriger Adapter (↓), um die Klemme zu steuern und präzise an das Hilum renale zu dirigieren. **C** Übersichtsaufnahme der Mikroaneurysmaklemme im Abbildungsmaßstab 3:1.

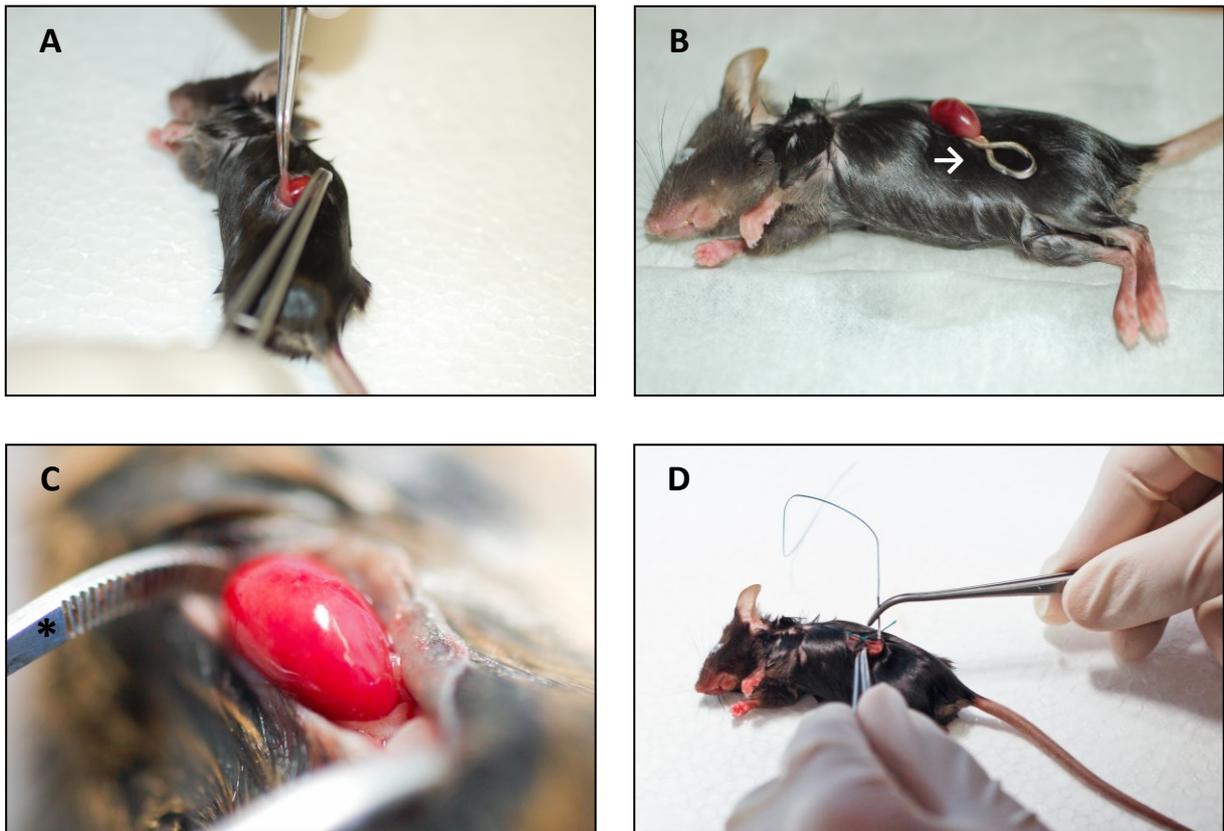


Abb. 15: Operative Prozedur der unilateralen transienten Ischämie

A Freilegung und Präparation der linken Niere, die Nierenkapsel ist eröffnet, das Organ kann nun vorsichtig aus dem Nierenlager luxiert werden. **B** Die Mikroaneurysmaklemme (→) unterbindet die arterielle Perfusion der Niere durch Klemmung der A. renalis am Hilum renale (im Bild unmittelbar unterhalb der Niere). Zeitpunkt der Klemmung ca. 10 Minuten. **C** Dargestellt ist das reperfundierte, hyperämische Organ unmittelbar nach Entfernung der Klemme. Eine geöffnete Moskitoklemme (*) dient hier als Wundspreizer. **D** Z.n. Ischämie/Beginn der Reperfusion. Die Niere wurde in das Nierenlager reponiert und der Situs wird durch Hautnaht verschlossen.

3.2.1.4. Versuchstiere: Chimäre Mäuse

Um chimäre Mäuse für den *in vivo*-Ischämie/Reperusionsversuch zu generieren, wurde eine Knochenmarktransplantation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde Knochenmark aus 5 – 6 Wochen alten Spendermäusen, die entweder gesunde Wildtypmäuse, oder homozygot SIGIRR/TIR8-defiziente Tiere waren, isoliert.

Insgesamt 6 6-Wochen alte C57/BL6J-Mäuse wurden mit einer für das eigene Knochenmark letalen Dosis bestrahlt. Die totale Strahlendosis bei der Ganzkörperbestrahlung der Empfängertiere betrug 9 Gy. Innerhalb von sechs Stunden nach Bestrahlung der Empfängertiere, bei der das Knochenmark nahezu vollständig zerstört wurde, wurde die Transplantation mit zuvor gewonnenem Spenderknochenmark, entweder SIGIRR/TIR8^{+/+}, oder SIGIRR/TIR8^{-/-}, durchgeführt. Zu diesem Zweck bekam jedes Empfängertier 200 µl einer Suspension, bestehend aus Spenderknochenmarkzellen und HBSS, in die Schwanzvene injiziert. Dabei erhielt jedes Empfängertier rund $4,5 \times 10^6$ Knochenmarkzellen transplantiert. Im Anschluss an die Transplantation wurde den Tieren eine 8-wöchige Rekonvaleszenz gegeben, damit sich das (transplantierte) Knochenmark regenerieren konnte. Die Reinheit des allogenen Spenderknochenmarks wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft, bei der sich eine durchschnittlich > 95 %-ige Reinheit ergab.

Im Folgenden die Darstellung der Gewinnung des Spenderknochenmarks: nach Tötung der Spendermaus wurden Femur und Tibia beidseits entnommen und nach grober Entfernung von Haut- und Muskelgewebe in eine Schale mit Nährlösung gegeben. Dabei bestand diese Nährlösung aus 10 ml HBSS mit einem Zusatz von 1 % FCS. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurden die zuvor entnommenen Röhrenknochen Femur und Tibia durchgespült. Zu diesem Zweck wurde eine Spritze (1 ml) mit aufgesetzter Kanüle (27G) auf die Öffnung des Röhrenknochens gesetzt. Gespült wurde jeweils mit 1 ml einer Lösung bestehend aus RPMI-Medium und 5 % FCS. Das Gesamtvolumen der Spüllösung pro Knochen lag bei 1 ml. Die so gewonnene Suspension von Knochenmarkzellen wurde im Anschluss für fünf Minuten bei 100-facher Erdbeschleunigung (100 g) in einem 15 ml-Falcon zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und es wurden jeweils 3 ml Lysepuffer hinzugegeben (0,155 M NH₄CL in doppelt destilliertem Wasser) und die Zellen dann bei 4 °C drei Minuten lang inkubiert. Es wurden dann 10 ml HBSS hinzugegeben und die Knochenmarkzellen darin durch vorsichtiges auf- und abpipettieren resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für drei Minuten bei 50 g. Der Überstand wurde wieder behutsam abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml HBSS resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und mit HBSS so verdünnt, dass eine Konzentration der Zellen von gut $4,5 \times 10^6/200$ µl resultierte, die für das Empfängertier vorgesehen war.

3.2.1.5. Clodronat-Injektion

Das Clodronat, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, war ein Geschenk der Firma *Roche Diagnostics*, was an dieser Stelle dankend erwähnt sein soll.

Clodronat (Dichlormethylenbisphosphonat) ist ein Wirkstoff aus der Gruppe der Bisphosphonate. Neben seiner inhibierenden Wirkung auf Osteoklasten hat es auch, in ausreichender Konzentration, einen toxischen Effekt auf phagozytierende Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen. Da freies Clodronat auf Grund seiner hydrophilen Eigenschaften nicht dazu in der Lage ist, die Phospholipiddoppelmembran zu durchdringen und damit in das Zellinnere zu gelangen, muss es besonders verarbeitet werden. Das Clodronat wird daher in Liposomen, die als Trägersubstanz dienen, gebunden. Die Liposomen können dann von Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen leicht inkorporiert werden. Die in die Zellen aufgenommenen Liposomen werden dann von der zellulären lysosomalen Phospholipase verdaut und setzen das Clodronat dann frei. Erreicht dieses im Zellinneren eine gewisse Konzentration, führt dies zur irreversiblen Schädigung der Zelle. Sie stirbt den apoptotischen Zelltod [129, 130]. Somit kann durch Gabe von Clodronat eine Depletion von dendritischen Zellen *in vivo* erreicht werden. Die Firma *Roche Diagnostics* stellte dabei das fertig applizierbare Clodronat-Liposomenkonjugat zur Verfügung.

Jeweils 6 Mäuse des SIGIRR/TIR8-Knockouts beziehungsweise des Wildtyps wurden mit 200 µl i.v. pro Individuum in die Schwanzvene injiziert. Dabei handelte es sich entweder um das Clodronat oder Clodronat-freie Liposomen als Kontrolle. Die Versuchstiere wurden dabei am dritten und am zweiten Tag vor Induktion der bilateralen Ischämie mit Clodronat beziehungsweise den Kontrollliposomen injiziert.

3.2.1.6. Bestimmung der Serumkreatinin-Konzentration

Um das Ausmaß des Ischämie-/Reperfusionsschadens *in vivo* auf die Nierenfunktion zu beurteilen, wurde bei den Wildtyp- und SIGIRR-Knock-out-Mäusen der Serumkreatininspiegel gemessen. Kreatinin ist ein Abfallprodukt, das zum Großteil glomerulär filtriert wird und beim Gesunden relativ konstant ausgeschieden wird und daher im Serum kaum variiert. Erhöhte Serumkreatininwerte können also auf eine eingeschränkte oder beeinträchtigte Nierenfunktion schließen lassen. Dazu wurde das kommerziell erhältliche *Creatinin FS**-Kit von *DiaSys* verwendet. Es handelt sich dabei um einen kinetischen Test ohne Enteiweißung nach der Methode von *Jaffé*. Das Prinzip der Methode basiert auf der Tatsache, dass Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen orangefarbenen Farbkomplex bildet. Die zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessene

Extinktionsdifferenz ist dabei proportional zur Kreatininkonzentration. Den Versuchstieren wurde dazu Blut aus der Schwanzvene entnommen, Serum gewonnen und wie folgt analysiert.

Zunächst wurde das Gebrauchsreagenz gemischt, bestehend aus vier Teilen Reagenz 1 (Natriumhydroxid) und einem Teil Reagenz 2 (Pikrinsäure). Dann wurde der Extinktionsleerwert der 1-cm-Küvette bei 492 nm Wellenlänge im Photometer gemessen. Schließlich wurden je Küvette 30 µl der Serumprobe beziehungsweise des Standards, beziehungsweise destilliertes Wasser als Negativkontrolle gegeben und anschließend 200 µl des vorher gefertigten Gebrauchsreagenz pro Küvette hinzugefügt und gemischt. Die Extinktion E1 wurde nach 60 Sekunden ermittelt, die Extinktion E2 nach weiteren 120 Sekunden gemessen. Anhand folgender Formel konnte dann die Kreatininkonzentration der Serumprobe berechnet werden:

$$C_{\text{Krea}} [\text{mg/dl}] = \frac{\Delta E \text{ Probe} - \Delta E \text{ Leerwert}}{\Delta E \text{ Standard} - \Delta E \text{ Leerwert}} \times C_{\text{Krea-Standard}} [\text{mg/dl}]$$

bei $\Delta E = E2 - E1$

Die Messung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.2. Zellkultur

3.2.2.1. Kulturbedingungen

Um eine Methode zu finden, beziehungsweise zu etablieren, die eine *in vitro* Versuchsreihe für isolierte primäre Zellen ermöglichen sollte, wurden die ersten *in vitro* Ischämie/Reperfusionsexperimente an der murinen Tubulusepithelzelllinie mTEC (engl. *murine tubular cells*) durchgeführt.

3.2.2.2. Auftauen und Einfrieren der MTC-Zelllinie

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten eingefrorenen Zellen der MTC-Zelllinie werden wie folgt aufgetaut: nach behutsamer Entnahme der Cryovials (Kälteaufbewahrungsröhrchen) aus dem flüssigen Stickstoff wurde die Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C Wassertemperatur für circa 3 Minuten aufgetaut und aufgewärmt. Die aufgetauten Zellen wurden daraufhin in 5 ml angewärmten DMEM-Kulturmedium unter Zusatz von Kälberserum FCS (5 %) und Penicillin-

Streptomycin (1 %) durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert. Es folgte eine vier-minütige Zentrifugation bei 1400 Umdrehungen/Minute. Dies hatte den Zweck, die Zellen von Resten des zytotoxischen Gefriermediums DMSO (Dimethylsulfoxid, Verwendet bei der Kryokonservierung von lebenden Zellen) zu separieren. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und der Bodensatz (Zellen) erneut in 5 ml des oben genannten Kulturmedium suspendiert. Dieser Waschschrift diente der Reinigung der allerletzten DMSO-Reste. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Bodensatz zum letzten Mal in 10 ml des Kulturmediums resuspendiert und unter sterilen Bedingungen auf die Petrischalen verteilt und im Brutschrank inkubiert. Das Kulturmedium wurde nach 24 Stunden erneuert, diesmal mit dem Standardanteil von 10 % FCS.

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen, analog zur Zellpassage (s. unten), nach Absaugung des Kulturmedium mit PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit einer Lösung, bestehend aus PBS und EDTA (1,5 mM) benetzt und für zehn Minuten im Brutschrank inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann wie oben beschrieben zentrifugiert und der Bodensatz in 2 ml FCS mit 10 % DMSO resuspendiert. Jeweils ein Milliliter der Zellsuspension wurde in die speziellen Cryovials gegeben und diese dann in einer Kryobox bei -80 °C für 48 Stunden eingefroren, ehe die Cryovials im flüssigen Stickstoff gelagert werden konnten.

3.2.2.3. Kulturbedingungen und Zellpassage

Die Zellen der murinen Tubulusepithelzelllinie mTEC wurden in einem Kulturmedium, bestehend aus dem kommerziell erhältlichen DMEM-Medium, mit variierendem Anteil purifiziertem und Hitze-inaktiviertem fötalen Kälberserum FCS gehalten. Der Anteil des Kälberserums FCS wurde je nach gewünschter Wachstums- und Proliferationsgeschwindigkeit zwischen 5 und 10 % gewählt. Um das Risiko einer Kontamination und Infektion der Zellkultur zu minimieren, wurde jeweils eine Antibiotikaphylaxe, bestehend aus einem Penicillin-Streptomycin-Konzentrat in das Kulturmedium gemischt. Der Anteil der Antibiotikallösung betrug jeweils 1 % des Kulturmediumvolumens. Kultiviert wurden die mTEC-Zellen in sterilen Petrischalen. Desweiteren wurden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Anteil gehalten. Eine lichtmikroskopische Überprüfung der Zellkultur fand alle 24 Stunden statt, wobei auf Konfluenzgrad und eventuelle morphologische Veränderungen geachtet wurde, beziehungsweise auf Veränderungen der Indikatorfarbe und Klarheit des Kulturmediums, was Hinweise auf eine mögliche Verunreinigung und Kontamination liefern könnte.

Waren die Kulturschalen zu ca. 90 % konfluent mit Zellen bewachsen, erfolgte die Zellpassage in frische Kulturschalen. Das alte Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Das PBS wurde ebenfalls entfernt und die Kulturschalen anschließend mit einer Lösung aus PBS und

EDTA (1,5 mM) befüllt und für zehn Minuten im Brutschrank bebrütet. Der abgelöste Zellrasen wurde dann vier Minuten bei 1400 Umdrehungen/pro Minute zentrifugiert. Das Pellet wurde dann, nach Absaugen des Überstandes, in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Das Suspensat wurde dann im gewünschten Verhältnis (etwa 1 : 5 oder 1 : 10 beispielsweise) mit frischem Medium verdünnt. Die so verdünnten mTEC-Zellen wurden dann auf frische sterile Kulturschalen, je nach Hypoxieversuch, verteilt.

3.2.2.4. Isolation und Kultur primärer muriner Tubulusepithelzellen

Die Zellkulturschalen wurden am Abend vor der Isolation mit jeweils 6 µg Kollagen IV pro cm² Fläche beschickt.

Das Tier wurde durch zervikale Dislokation getötet. Es folgte die Hautinzision mit der Schere von kaudal nach kranial bis zum Handgriff des Sternums. Nach Eröffnung des Peritoneums und seitlicher Verdrängung des Darmes waren die Beiden Nieren freigelegt (Abb. 16). Die beiden Organe wurden nahe dem Hilum abgesetzt und in einer sterilen Petrischale von der Capsula fibrosa befreit. Sofort im Anschluss wurden die Nieren mit 0,5 ml kaltem HBSS-HEPES Medium (Hank's balanced salt solution mit 10 mM 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) bedeckt und mit dem sterilen Skalpell in etwa 1 mm³ große Stücke zerstoßen. Es wurden daraufhin erneut 5 ml kaltes HBSS-HEPES hinzugegeben und die Suspension mit einer sterilen Spritze aufgezogen und durch einen 30 µm-Filter (MACS Pre-Separation Filter) in ein steriles Falcon filtriert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 4 °C mit 1100 RPM für fünf Minuten in der Kältezentrifuge zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen des Bodensatzes mit 10 ml Medium, bestehend aus DMEM-Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin, resuspendiert und in einer sterilen Petrischale bei 37 °C zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Während der Inkubation konnten sich Makrophagen am Schalengrund festsetzen, wohingegen Tubulusepithelzellen in Suspension verblieben. Nach Ablauf der zweistündigen Inkubation wurde das Medium zusammen mit den nicht adhärenen Zellen behutsam abgesaugt und erneut zentrifugiert, diesmal bei Raumtemperatur. Der Überstand wurde dekantiert, der Bodensatz mit dem Kulturmedium K1 resuspendiert und auf die mit Kollagen IV vorbehandelten Platten ausgesät. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt, bis die Zellen zu ca. 80 % konfluent waren, um die *in vitro*-Experimente durchzuführen.

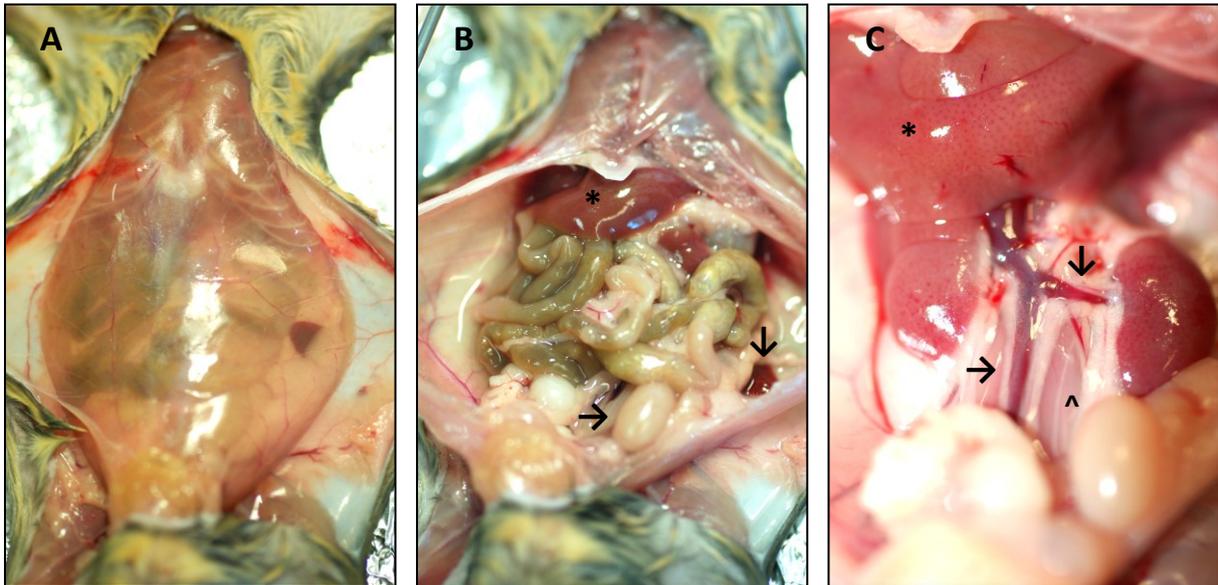


Abb. 16: Isolation primärer Tubulusepithelzellen, Präparation

Gezeigt sind einige Präparationsschritte zur Darstellung der beiden Nieren, aus denen Tubulusepithelzellen für die Ischämie-/Reperfusionsexperimente *in vitro* gewonnen wurden. **A** Dargestellt ist der Situs unmittelbar nach Hautinzision, die beginnend in der Umbilikalregion vom kaudal (im Bild unten) nach kranial (im Bild oben) bis zum Jugulum geführt wurde. Das Peritoneum ist noch verschlossen. **B** Situs nach Eröffnung des Peritoneums. Beachte die in die Cavitas abdominalis luxierten Testes (→). Darmschlingen verdecken noch den Zugang zu den Nieren. * = Leber, ↓ = Milz. **C** Gezeigt ist der Retroperitonealraum nach Exzision des Darmes. * = Leber; → = Pars abdominalis aortae, ↓ = A. renalis; ^ = M. psoas major.

3.2.2.5. Isolation und Kultur primärer renaler Antigen-präsentierender Zellen

Basierend auf der Tatsache, dass die residenten renalen dendritischen Zellen oder Antigen-präsentierenden Zellen unter anderem das HLA-Merkmal CD11b auf der Oberfläche tragen [89], wurden die renalen Antigen-präsentierenden Zellen bei ihrer Isolation mit einem CD11b-Antikörper markiert, der am Fc-Ende ein magnetisches Mikrokügelchen trägt. Durch diese magnetische Markierung war eine Separation mittels Magnetsortierung möglich (vgl. Abb. 17) [131]. Diese Methode wurde im Vorfeld dieser Arbeit durch Herrn PD Dr. M. Lech in der eigenen Arbeitsgruppe etabliert [132]. Im Folgenden die Details der Isolation dieser CD11b⁺-Zellen aus der murinen Niere.

Das Tier (entweder SIGIRR/TIR8^{+/+} oder SIGIRR/TIR8^{-/-}) wurde durch zervikale Dislokation getötet. Die Haut wurde mit einem Medianschnitt, beginnend in der Umbilikalregion, von kaudal nach kranial bis zum Proc. xyphoideus inzidiert. Nach Eröffnung der Peritonealhöhle und der seitlichen Luxation von Darmschlingen war der Zugang zu den Nieren freigelegt (Abb. 16). Die beiden Organe

wurden aus dem Nierenlager luxiert und durch organnahe Durchtrennung des Hilum renale abgesetzt. In einer sterilen Petrischale wurden jeweils die Capsula fibrosa entfernt und danach rasch die Organe in 300 µl kaltem RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % PS mit einem Skalpell in etwa 1 mm³ große Stückchen zerschnitten. Die Zellsuspension wurde mit einer 10 ml Spritze aufgezogen und in ein steriles Falcon durch einen 30 µm Filter (MACS Präseparationsfilter) filtriert. Die Zellzahl wurde unverzüglich mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer durch einen Assistenten ermittelt. Die Zellsuspension wurde währenddessen bei 300 g zehn Minuten lang in der Kältezentrifuge zentrifugiert, um die Kühlkette nicht abreißen zu lassen. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet pro 1 x 10⁷ Zellen in jeweils 90 µl gekühltem Puffer (PBS mit 0,5 % FCS und 2 mM EDTA) mit 10 µl der sogenannten Microbeads durchgemischt. Diese Microbeads sind Metallkügelchen, die in diesem Fall mit einem Anti-CD11b-(Mac-1α) IgG 2b-Antikörper der Ratte konjugiert sind und eine magnetische Zellsortierung ermöglichen. Der konjugierte Antikörper wurde im Dunkeln mit den isolierten renalen Zellen bei 4 °C genau 15 Minuten lang inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit 5 ml Puffer erfolgte eine weitere Kältezentrifugation bei 300 g für 10 Minuten. Mit 2 ml kaltem Puffer pro 1 x 10⁷ Zellen wurde das Pellet resuspendiert.

Es folgte die magnetische Separation der CD11b⁺-Antigen-präsentierenden Zellen an der MACS Separationssäule (MACS Separation columns, 25 LS), die unmittelbar vorher mit 3 ml Puffer gespült wurde. Das Zellsuspensat wurde nach Auftragung auf die Säulen insgesamt drei Mal mit kaltem Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde zur späteren Kultur in DMEM-Kulturmedium, das mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 10 % FCS versetzt war, in einem sterilen Falcon gesammelt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Säule vom Magneten entfernt und die mit den magnetischen Antikörper markierten CD11b⁺-Zellen in RPMI-Kulturmedium, dem 10 % FCS, 1 % Penicillin-Streptomycin sowie das Hormon GM-CSF (c = 1 ng/ml) in entsprechenden Schalen kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage erneuert, bis die Platten zu 70 – 80 % konfluent bewachsen waren.

3.2.2.6. Experiment zu Ischämie und Reperfusion *in vitro*

Die bei den Isolationen gewonnen primären renalen Tubulusepithelzellen und Antigen-präsentierenden Zellen dienten der Untersuchung von Ischämie/Reperfusion *in vitro*. Ziel eines jeden *in vitro*-Versuchs muss es sein, die ischämischen Bedingungen und vor allem das ischämisch-hypoxische Mikromilieu *in vivo* so gut wie möglich zu reproduzieren. Gleichzeitig muss man sich auch dessen bewusst sein, dass man die *in vivo*-Bedingungen nie zu 100 % reproduzieren kann. Kern der Überlegungen war, dass Ischämie bei weitem nicht nur aus der Hypoxie besteht. Wie bereits erwähnt, besteht die Ischämie im Wesentlichen aus vier Hauptphänomenen, die zu beobachten und zu beachten sind: allen voran die Hypoxie, der lokale Anstieg des CO₂-

Partialdruckes (= Hyperkapnie), die eingeschränkte bis unzureichende Versorgung des ischämischen Gewebes mit Nährstoffen (Glukose), sowie die Akkumulation von Metaboliten, die vor allem durch den Wechsel zum anaeroben Stoffwechsel entstehen. Diese Hauptmerkmale bedingen dann in ihrer Summe eine pH-Änderungen hin zum Säuren, *in vivo* die lokale Gewebeazidose [133]. Im Allgemeinen wird in der Literatur ein Sauerstoffpartialdruck von ≤ 35 mmHg als hypoxisch angesehen. An diesem Wert orientieren sich viele Arbeiten zur Hypoxie- und Ischämieforschung *in vitro*, jedoch muss berücksichtigt werden, dass einige Arbeiten erst ab Werten des $pO_2 < 6$ mmHg einen Wechsel von aeroben zu anaeroben Metabolismus bei renalen Zellen finden konnten, die sich ja bereits unter physiologischen Bedingungen, je nach Lokalisation in der Niere, extrem niedrigen Sauerstoffpartialdrücken gegenüber sehen [134, 135]. Der Wechsel des Zellstoffwechsels von aerob zu anaerob sollte bei *in vitro*-Versuchen berücksichtigt werden, und auch als Parameter für einen Hypoxiebeweis genommen werden. Allerdings kommt komplizierend hinzu, dass selbst Zelllinien, wie die LLC-PK1-Linie, bereits bei normoxischen Bedingungen (21 % O_2 im Medium) auf anaeroben Stoffwechsel umgestellt sind [136]. Desweiteren ist bekannt, dass andere Parameter wie Volumen des Kulturmediums, Dicke der Flüssigkeitsschicht über der Zellkultur, Zusammensetzung des Kulturmediums und viele andere einen wichtigen Einfluss auf den Sauerstoffanteil und das Verhalten der Zellen haben [133]. Eine weitere Besonderheit aus der bisherigen Erfahrung aus Ischämieversuchen *in vitro* ist, dass Zellkulturen besonders empfänglich für Effekte der Hypoxie sind, wenn ihnen Nährstoffe, vor allem Glukose, entzogen werden. Beispielsweise reagiert die MDCK-Zelllinie (Tubulusepithelzelllinie des distalen Tubulus und der Sammelrohre) nur unter Glukose-freien Kulturbedingungen [133, 137]. Auch *Jantsch et al.* konnten für ihre Ischämie/Reperfusionversuche *in vitro* erkennen, wie wichtig die Glukose- beziehungsweise Serumklarrenz für Zellkulturen sind [99].

Die zweite Hauptrolle neben der Ischämie spielt die Reperfusion. Sie sorgt *in vivo* erst für den destruktiven Effekt und aggraviert somit erst recht den zellulären Schaden und den Gewebeschaden (vgl. 1.4., [138, 139]). Im Allgemeinen wird die Reperfusion *in vitro* simuliert, in dem die zuvor hypoxische Zellkultur wieder unter Standardbedingungen, vor allem der Raumluft, gehalten werden. Dies führt zur raschen Normalisierung des pCO_2 und pO_2 *in vitro*, und damit zur Normalisierung des pH. Aber auch die Versorgung mit frischem Kulturmedium ist von entscheidender Bedeutung. Es zeigte sich, dass *in vitro* das unzureichende Nährstoffangebot und die laufende Akkumulation von Metaboliten des anaeroben Stoffwechsels weiter bestehen, wenn die Zellkultur nicht mit frischem Kulturmedium versorgt wird [133].

Um das Verhalten unter künstlichen hypoxischen Bedingungen zu beobachten, wurde die Hypoxie beziehungsweise Ischämie durch eine Sauerstoffdeprivation bei 100 % N_2 in der Umgebungsluft

erreicht. Zu diesem Zweck wurde mit einer Hypoxiekammer, der *Modular Incubator Chamber*TM gearbeitet (vgl. Abb. 19). Das Prinzip der Hypoxiekammer beruht auf dem Prinzip der freien Gasdiffusion, wobei es zu einem Konzentrationsgleichgewicht bzw. Ausgleich zwischen Raumluft und dem im Kulturmedium gelösten Gas kommt (vgl. Abb. 18).

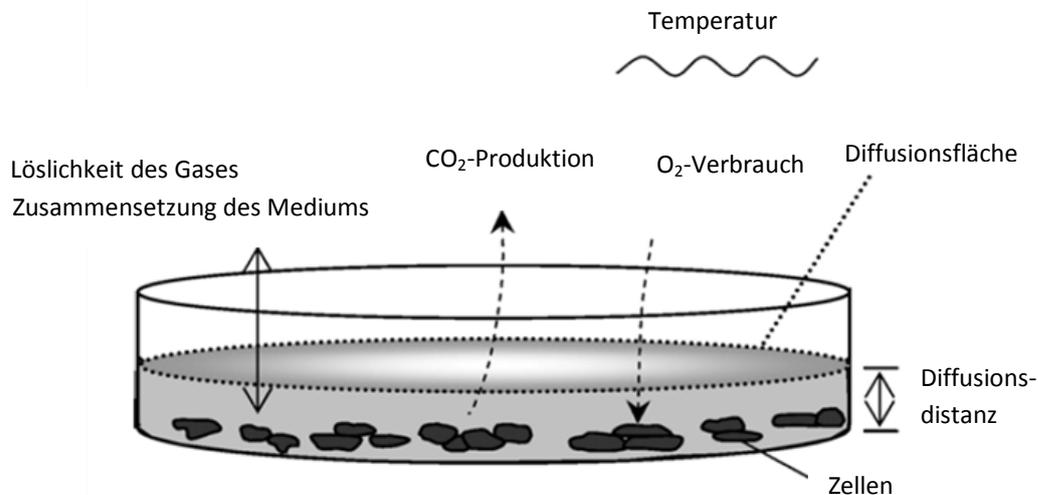


Abb. 18: Prinzip der Sauerstoffdeprivation durch freie Diffusion

Viele Faktoren beeinflussen den Sauerstoffpartialdruck und den Sauerstoffgehalt des Kulturmediums. In den Versuchen zur Hypoxie *in vitro* wurden die Kulturschalen in einer geschlossenen Umgebung mit einem Gehalt von 100 % inertem N₂ inkubiert. Durch die freie Diffusion kommt es dabei zum Ausgleich der unterschiedlichen O₂-Gehalte der Umgebung und des Kulturmediums. Durch Nachbegasung mit N₂ wurde sichergestellt, dass der Sauerstoff vollständig aus dem Kompartiment entfernt wurde. Aus Russ *et al.* [133]

Die murine Tubulusepithelzelllinie für die Etablierungsversuche, sowie die primären Tubulusepithelzellen bzw. die renalen Antigen-präsentierenden Zellen wurden wie folgt auf die Hypoxie vorbereitet: um die Tubulusepithelzellen beziehungsweise die renalen CD11b⁺-Zellen für die Hypoxie zu sensibilisieren, wurde sie in einem Hungermedium präkonditioniert (*starving*). Das Hungermedium bestand aus dem jeweiligen Kulturmedium (K1-Medium bzw. RPMI) mit einem deutlich reduzierten Serumanteil. Bei den isolierten Tubuluszellen betrug der Serumanteil im Hungermedium 0,5 % FCS, bei den CD11b⁺-Zellen 0,0 % FCS. Die Zellen wurden jeweils drei Stunden vor Beginn der Hypoxie im Hungermedium bebrütet, das jeweils mit LPS in der Konzentration 1 µg/ml versetzt war. Nach Ablauf der Hungerzeit wurde die Zellen in die Hypoxiekammer gegeben und diese dann mit sterilem 100 %-igen N₂ geflutet. Nach Herstellerangaben reicht eine Begasung der Hypoxiekammer von vier Minuten bei einem Gasfluss von 20 l/min aus, um die Kammer komplett von Raumluft auszuwaschen. Für die Experimente wurde die Kammer bei einem Gasfluss von 20 l/min N₂ sechs Minuten lang geflutet (Abb. 19). Die Kammer wurde im Anschluss luftdicht

versiegelt und drei Stunden lang im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der drei-stündigen simulierten Ischämie/Hypoxie wurden Mediumproben zur weiteren Analyse entnommen. Dabei wurde die Hälfte des hypoxischen Mediums entnommen, und der Rest in den Kulturschalen belassen. Es folgte die simulierte Reperfusion, bei der zu dem belassenen hypoxischen Medium das ja auf die Hälfte reduziert war, das jeweilige frische Kulturmedium hinzugegeben wurde. Das frische Reperusionsmedium hatte dabei einen Anteil von 20 % FCS, der sich ja durch Mischung mit dem belassenen ischämisch/hypoxischen Medium auf den normalen Zellkulturanteil von 10 % FCS verdünnte. Die Zellen, jetzt aus der Hypoxiekammer befreit, wurden dann bei normalen normoxischen Kulturbedingungen im Brutschrank für 24 Stunden bebrütet. Nach Ablauf der 24-stündigen Reperusionsphase, in der sich die Zellkulturen erholen konnten, erfolgte die zweite Probenentnahme, diesmal aus dem Reperusionsmedium.

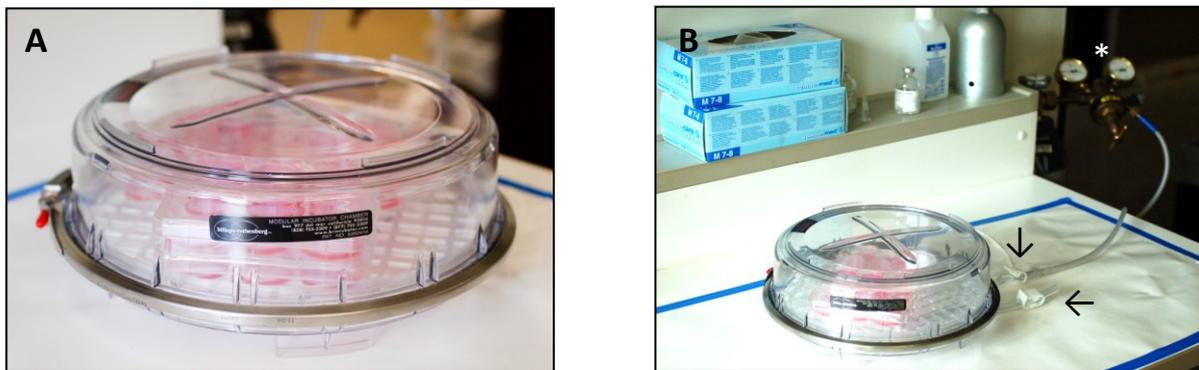


Abb. 19: Hypoxiekammer und Versuchsaufbau

A Dargestellt ist eine Übersicht der **Modular Incubator Chamber™** des Unternehmens **Billups-Rothenberg**, mit der alle *in vitro*-Experimente zu Ischämie/Reperfusion durchgeführt wurden. Deutlich zu sehen der Metallverschlussring, der zusammen mit dem Kunststoffgehäuse die Hypoxiekammer luftdicht versiegelt. **B** Versuchsaufbau für einen Ischämie/Reperusionsversuch, hier bei Flutung mit inertem und sterilem N₂, das aus der Gasflasche (*) mit integriertem Flussmesser, über einen sterilen Schlauch mit der Hypoxiekammer verbunden ist. Die Kammer wurde für sechs Minuten bei einem Flow von 20 l/Min begast. Dabei entsteht in der Kammer eine hundertprozentige N₂-Atmosphäre. Beachte den luftdicht verschließbaren Eingangskanal (↓) und den ebenfalls luftdicht verschließbaren Ausgangskanal (←). Zum Belüften mit normaler Raumluft wurden beide Kanäle nach drei-stündiger Hypoxie im Brutschrank geöffnet, was zu einer sofortigen Belüftung mit Raumluft führte.

3.2.3. Gewebe- und Immunhistochemie und histopathologische Auswertung

3.2.3.1. Gewebe- und Immunhistochemie

Die aus den Tierversuchen gewonnen Nieren wurden lichtmikroskopisch analysiert. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Färbemethoden, sowohl histochemische, als auch

immunohistochemische angewandt. Die entnommenen Organe wurden in sog. Histosettes gegeben. Es folgte die Fixierung des Gewebes in einer Lösung aus PBS mit 10 % Formalin. Daraufhin wurden die Organe in Paraffin eingebettet. Diese Paraffinblöcke wurden in Scheibchen von je 2 µm Dicke geschnitten, in der Art, dass die Nieren in der Frontalebene geschnitten wurden. Die Schnitte wurden auf mit APES vorbehandelte Objektträger gegeben. Diese Schnitte wurden anschließend in einer Alkohollösung absteigender Konzentration vom Paraffin rein gewaschen und rehydriert. Dazu wurden die Schnitte jeweils drei Minuten in Xylol, 100 % Ethanol, 95 % Ethanol, 80 % Ethanol, 50 % Ethanol und in PBS gewaschen. Es folgte die Blockierung (für 20 Minuten, im Dunkeln) der endogenen Peroxidase mit 30 % H₂O₂ in Methanol. Nach erneutem kurzen Waschen in PBS (2 x 5 Minuten) wurde Antigen demaskiert mit je 300 ml destilliertem Wasser mit Zusatz von 3 ml sog. *antigen unmasking Solution*.

PAS-Färbung

Um den histopathologischen Effekt von Ischämie und Reperfusion zu analysieren und den I/R-Schaden zu quantifizieren, wurden die vorbereiteten Nierenschnitte nach Herstellerangaben mit periodensaurem Schiffreagenz (*engl. Periodic Acid Schiff, PAS*) angefärbt und anschließend ausgewertet.

Neutrophilenfärbung

Um eine Quantifizierung der postischämischen Neutrophileninfiltration vorzunehmen, wurden die zu den Zeitpunkten 1 Tag, 5 Tage und 10 Tage nach Ischämie/Reperfusion isolierten Nieren immunohistochemisch gefärbt. Dabei kam ein Ratten-Anti-Maus-Neutrophilen-Ak (1:50) als Primärantikörper zum Einsatz.

Makrophagenfärbung

Für die Erfassung der infiltrierenden Makrophagen nach Ischämie/Reperfusion wurden die Schnitte der isolierten Nieren wie folgt gefärbt: es kam als Primärantikörper ein Ratten-Anti-F4/80-Ak zum Einsatz (1:50).

CCL2/MCP-1-Färbung

Um intrazellulär gelegenes synthetisiertes MCP-1 darzustellen wurde das postischämische Gewebe zum Zeitpunkt 5 Tage nach Ischämie/Reperfusion wie folgt gefärbt: als Primärantikörper wurde ein Schaf-Anti-CCL2/MCP-1-Ak verwendet (1:1000).

Der Primärantikörper wurde dabei jeweils über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Sekundärantikörper kamen Anti-Ratte-IgG beziehungsweise Anti-Schaf-IgG zum Einsatz.

3.2.3.2. Histopathologische Auswertung

Die entnommenen Organe wurden für die Quantifizierung und Analyse des Ischämie- und Reperfusionsschadens, wie oben beschrieben, PAS gefärbt. Dabei wurden die kortikalen Regionen der SIGIRR/TIR8^{+/+}- beziehungsweise der SIGIRR/TIR8^{-/-}-Nieren, sowie deren jeweiligen Kontrollen zu den Entnahmezeitpunkten 1 Tag, 5 Tage und 10 Tage nach Ischämie/Reperfusion unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Pro Individuum wurden zehn sich nicht überlappende Gesichtsfelder bei einer 100-fachen Vergrößerung von zwei verblindeten Untersuchern ausgewertet. Jedes Gesichtsfeld wurde einer Schadenskategorie, die von 0 – 5 Punkten reichte, zugeordnet. Aus den zehn individuellen Schadenszuordnungen pro Individuum wurde das individuelle Ausmaß des Ischämie- und Reperfusionsschadens arithmetisch gemittelt.

Bei der Zuordnung und Quantifizierung des interstitiellen I/R-Schadens wurde nach folgenden morphologischen Veränderungen eingeteilt:

0 entspricht einer Gewebeintegrität in der PAS-Färbung von annähernd 100 %, was dem Zustand der unbehandelten Kontrollniere entspricht. Dabei war jeweils zu beobachten, dass die Basalmembran des Tubulusepithels durchgehend war, die proximalen Tubuli einen deutlich erkennbaren und in das Lumen prominenten Bürstensaum präsentierten. Desweiteren, dass normale freie Tubuluslumina ohne Anzeichen einer Dilatation oder intraluminärer Ablagerungen vorhanden waren. Auf zellulärer Ebene zeigten sich intakte und gesunde Epithelzellen ohne Anzeichen für apoptotischen oder nekrotischen Zelluntergang, ohne Zeichen einer zellulären Schwellung oder Läsion des Zellkerns. Außerdem keine Hinweise für ein interstitielles Ödem oder fibrinös-exsudative Prozesse.

Deutlich erkennbare histopathologische Veränderungen des postischämischen Parenchyms, des Interstitiums und der zellulären Integrität wurden anhand ihrer prozentuellen Ausprägung den Punktwerten 1 bis 5 zugeordnet (Abb. 20). Ganz allgemein sind Zeichen und Kriterien für pathologische Veränderungen auf Grund vorausgegangener Ischämie/Reperfusion oder anderer zirkulatorischer Krankheiten der Niere: Zeichen des apoptotischen oder nekrotischen Zelluntergangs, interstitielles Ödem mit einhergehender Schwellung, Verlust bzw. Minderung des Bürstensaums der proximalen Tubuli. Eine diskontinuierliche Basalmembran als Zeichen für eine Läsion der peritubulären Basalmembranscheide. Gewertet wurden auch Veränderungen wie tubuläre Dilatation, Abriss und konsekutive Abscherung von Tubulusepithelzellen in das Tubuluslumen. Daraus resultieren intraluminäre gipsartige Zylinder (*casts*), die das Tubuluslumen verlegen. Der Ausprägungsgrad hängt vom prozentuellen Anteil des geschädigten Gewebes am gesamten Gesichtsfeld, unter Berücksichtigung der eben genannten morphologischen Kriterien.

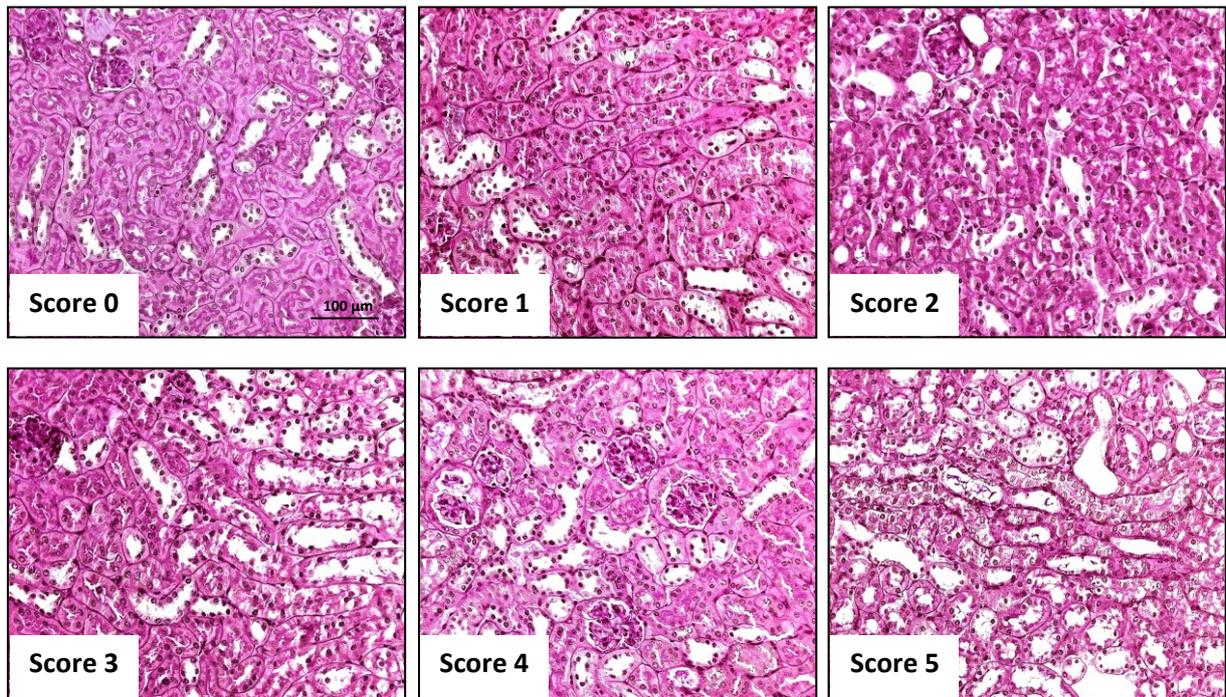


Abb. 20: Quantifizierung des histopathologischen Ischämie-/Reperfusionsschadens

Abgebildet sind repräsentative histologische Schnitte in PAS-Färbung. 0 entspricht dem Zustand der unbehandelten Kontrollniere, 5 dem maximalen I/R-Schaden, der bei > 76 % des Gesichtsfeldes liegt. Vergrößerung 100 x.

Die Zuordnung des I/R-Schadens zum jeweiligen Punktwert (Score) wurde wie folgt vorgenommen:

- **0 Punkte** standen für ein absolut unbehandeltes, nicht verändertes renales Gewebe
- **1 Punkt** entsprachen einer Schädigung des Nierengewebes von $\leq 10\%$
- **2 Punkte** entsprachen einem Schadensanteil von $11 - \leq 25\%$
- **3 Punkte** wurden vergeben, wenn der I/R-Schaden $26 - \leq 45\%$ betrug
- **4 Punkte** entsprachen einem Schadensanteil von $46 - \leq 75\%$
- **5 Punkte** beschrieben den maximalen I/R-Schadensanteil von $> 76\%$ des Gesichtsfeldes.

3.2.4. ELISA

3.2.4.1. Prinzip

ELISA ist die englische Abkürzung für *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Es handelt sich dabei um eine immunologische Methode, mit der sich, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion, Proteine nachweisen, beziehungsweise deren Konzentration in Lösung messen lassen [140, 141]. Vereinfacht dargestellt kommt ein Antikörper zum Einsatz, der spezifisch an das (nachzuweisende) Antigen bindet. Der Antikörper ist dabei mit einem Enzym konjugiert, welches eine Farbreaktion katalysiert, die dann die Präsenz des nachzuweisenden Proteins beweist.

In dieser Arbeit kam eine Variante des ELISA zum Einsatz, nämlich der sog. „Sandwich“-ELISA. Einziger Unterschied bei dieser Methode ist die Tatsache, dass zwei Antikörper verwendet werden, die an jeweils unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Moleküls binden. Für die in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen wurde der erste Antikörper (*engl. coating-antibody*) auf eine 96-well-Microtiterplatte aufgetragen. Dieser benetzt dort die Oberfläche. Die Probe wird auf den ersten *Coating*-Antikörper gegeben und dort proportional zu ihrer Konzentration gebunden. Im nächsten Schritt wird der zweite Antikörper (*engl. detection antibody*) zugegeben. Dieser ist mit einem Enzym konjugiert, der Meerrettichperoxidase (HRP, *engl. horseradish peroxidase*). Der *Detection*-Antikörper bindet nun ebenfalls an das nachzuweisende Protein, das ja im vorherigen Schritt durch den *Coating*-Antikörper gebunden worden ist. Es entsteht ein Komplex bestehend aus dem ersten Antikörper, dem nachzuweisenden Antigen und dem zweiten Antikörper, der zusätzlich an die Peroxidase gekoppelt ist. Dieser Komplex erinnert schematisch an ein Sandwich. Im folgenden Schritt wurde ein Chromogen (bestehend aus Tetramethylbenzidin und H_2O_2) hinzugegeben, welches das Substrat der Meerrettichperoxidase ist, und es konnte ein Farbumschlag beobachtet werden. Dieser Farbumschlag wurde photometrisch analysiert. Dabei ist die gemessene Absorption proportional zur Konzentration des enzymatisch entstandenen Farbstoffes und damit proportional zur Konzentration der nachzuweisenden Substanz. Die so erhobenen Absorptionswerte wurden dann mit den Absorptionswerten von bekannten Konzentrationen der jeweiligen Substanz verglichen, woraus sich die gesuchten Konzentrationen rückrechnen ließen.

3.2.4.2. Bestimmung der IL-6-Konzentration

Die Bestimmung der IL-6-Produktion der Zellkulturen wurde mit ELISA durchgeführt. Gemessen wurde dabei die Konzentration von IL-6 aus den Mediumüberständen.

Am Vorabend der Messung wurden die 96-well-Microtiterplatten mit dem ersten Antikörper, dem *Capture*-Antikörper (monoklonaler Anti-Maus-IL-6-Antikörper), beschickt, und im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht inkubiert. Dabei wurden jeweils 100 µl der Antikörper-Beschickungslösung in ein well pipettiert. Am Tag der Messung wurde nach Waschen der Microtiterplatten (drei Mal, jeweils mit 300 µl Waschpuffer pro well) diese mit Reaktionsverdünner für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (PBS mit 10 % FCS, 200 µl pro well), um unspezifische Reaktion zu verhindern. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen. Im Anschluss wurde der IL-6-Standard in einer Verdünnungsreihe von 1000 pg/ml bis 7,8 pg/ml und die zu messenden Proben aufgetragen. Standard und Proben waren dabei in Reaktionsverdünner gelöst, das Volumen pro well betrug 100 µl. Es folgte eine zweistündige Inkubation der Proben und des Standards bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der zwei Stunden wurden die Mikrotiterplatten erneut gewaschen (fünf Mal). Es folgte die Zugabe des zweiten Antikörpers, der sog. *Detection*-Antikörper, zusammen mit dem Reaktionsenzymkonjugat aus Streptavidin und Meerrettichperoxidase (wieder 100 µl/well). Bei dem *Detection*-Antikörper handelte es sich um einen biotinylierten monoklonalen Anti-Maus-IL-6-Antikörper. Damit sich der „Sandwich-Komplex“ aus erstem Antikörper, Antigen (bzw. zu messende Substanz) und zweitem Antikörper bilden konnte, wurden die Mikrotiterplatten eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden dann insgesamt 7 Mal gewaschen. Es folgte die Zugabe des chromogenen Substratgemisches, bestehend aus Tetramethylbenzidin und H₂O₂, im Verhältnis 1:1 zu 100 µl/well. Die Mikrotiterplatten wurden dann unverzüglich im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach Ablauf der halbstündigen Inkubation durch Zugabe von jeweils 50 µl/well Schwefelsäure (2 N H₂SO₄) gestoppt. Anschließend folgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm einem ELISA-Lesegerät. Anhand der Absorptionswerte der Standard-Verdünnungsreihe und der so errechneten Kurve, konnte, unter Betrachtung der Absorptionswerte der Proben, deren Konzentration ermittelt werden.

3.2.4.3. Bestimmung der CCL2/MCP-1-Konzentration

Auch die MCP-1-Produktion der Zellkulturen wurde mittels ELISA gemessen. Gemessen wurde aus Proben der Mediumüberstände der Zellkulturen.

Dazu wurden 96-well-Mikrotiterplatten am Vorabend der Messung mit dem ersten Antikörper (*Capture*-Antikörper) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Beim *Capture*-Antikörper handelte es sich um

einen monoklonalen Anti-Maus-MCP-1-Antikörper. Am nächsten Morgen wurde die Mikrotiterplatte gewaschen (drei Mal) und mit dem Reaktionsverdünner blockiert, um unspezifische Reaktion zu verhindern. Für die Blockierung wurden die Platten mit dem Reaktionsverdünner eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute Waschung (drei Mal). Es folgte die Zugabe des rekombinanten MCP-1-Standards in einer Verdünnungsreihe von 1000 pg/ml bis 7,8 pg/ml und der Proben, Volumen pro well jeweils 100 µl. Standard und Proben waren in Reaktionsverdünner gelöst. Die Mikrotiterplatten wurden zwei Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneutes Waschen (fünf Mal). Dann wurde jeweils 100 µl des zweiten Antikörpers, sog. *Capture*-Antikörper, hinzugegeben. Es handelte sich dabei um einen monoklonalen Anti-Maus-MCP-1-Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Nach Ablauf der einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur folgte wieder ein Waschschrift (sieben Mal). Es wurde dann die chromogene Substratlösung (Tetramethylbenzidin und H₂O₂ im Verhältnis 1:1, jeweils 100 µl/well) hinzugegeben und die Mikrotiterplatten im Dunkeln für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 2N Schwefelsäure gestoppt. Abschließend wurde die Absorption im ELISA-Lesegerät bei $\lambda = 450$ nm ermittelt.

3.2.4.4. Bestimmung der CXCL2/MIP-2-Konzentration

Für die Messung der MIP-2-Produktion der Zellen *in vitro* wurde aus deren Kulturmediumüberständen die Konzentration von MIP-2 ermittelt.

Die mit *Capture*-Antikörper beschichteten 96-well-Mikrotiterplatten waren über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert worden. Nach dreimaligem Waschen mit 400 µl Waschpuffer pro well wurden die Mikrotiterplatten mit 300 µl Reaktionsverdünner blockiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneutes dreimaliges Waschen. Dann wurden, wie gehabt, 100 µl Standard und Proben hinzugefügt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Enzym in Form eines Streptavidin-Meerrettichperoxidasekonjugat (je 100 µl) hinzugegeben, verdünnt in Reaktionsverdünner. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem Waschen wurden pro well 100 µl der Substratlösung (Tetramethylbenzidin und H₂O₂ im Verhältnis 1:1) hinzugefügt und die Platten im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit je 50 µl 2N Schwefelsäure beendet. Die Absorption wurde ebenfalls bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

3.2.4.5. Bestimmung der CCL5/RANTES-Konzentration

Bei den Ischämie-/Reperfusionsversuchen *in vitro* wurde als Parameter für eine positive Reaktion bei den Etablierungsversuchen das Chemokin CCL5/RANTES gewählt.

Die mit *Capture*-Antikörper beschichteten 96-well-Mikrotiterplatten waren über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert worden. Nach dreimaligem Waschen mit 400 µl Waschpuffer pro well wurden die Mikrotiterplatten mit 300 µl Reaktionsverdünner blockiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneutes dreimaliges Waschen. Die Platten waren dann bereit für die Inkubation mit Standard bzw. Proben. Wie gehabt wurden 100 µl Standard und Proben hinzugefügt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde das Enzym in Form eines Streptavidin-Meerrettichperoxidasekonjugat (je 100 µl) hinzugegeben, verdünnt in Reaktionsverdünner. Es folgte eine Inkubation von diesmal 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem Waschen wurden pro well 100 µl der Substratlösung (Tetramethylbenzidin und H₂O₂ im Verhältnis 1:1) hinzugefügt und die Platten im Dunkeln bei Raumtemperatur ebenfalls für 20 Minuten inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit je 50 µl 2N Schwefelsäure beendet. Die Absorption wurde ebenfalls bei 450 nm Wellenlänge gemessen.

3.2.5. Western Blot

Der Western Blot ist eine Nachweismethode für Proteine. Die Methode beruht auf dem Prinzip einer Übertragung der nachzuweisenden Proteine auf eine Membran im Sinne eines „Proteinkleckses“ (*engl. blotting*). Das untersuchte und auf der Membran konzentrierte Protein kann dann mit einem spezifischen Antikörper, der beispielsweise radioaktiv strahlt, markiert werden und somit nachgewiesen werden. Doch zunächst muss das gesuchte Protein aus dem untersuchten Gewebe bzw. den Zellen extrahiert werden.

Proteinextraktion aus murinem Nierengewebe

Die aus den SIGIRR-TIR8^{-/-}- bzw. Wildtypmäusen entnommenen Nieren wurden manuell zerkleinert und in Flüssigstickstoff schockgefroren und zu feinsten Stückchen pulverartig zerkleinert. Es folgte die Homogenisierung in 1 ml des Lysepuffers bestehend aus 50 mM TrisHCl, 150 mM NaCl, 100 µM Natriumorthovanadat Na₃VO₄, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 4 % NP-40, 2 % Triton-X-100, 5 mM EDTA, 300 mM Sucrose und Proteaseinhibitoren. Die Suspension wurde homogenisiert und 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es folgte eine 45-minütige Zentrifugation bei 30000 g. Die Proteindichte wurde mittels Bradford Test gemessen.

Western Blot

Die zuvor extrahierten und gereinigten Proteine wurden im Anschluss in 2 x Laemmli-Puffer (30 mM TRIS, 5 % Glycerol, 1 % SDS und 0,0025 % Bromophenolblau) mit Beta-Mercaptoethanol gelöst und bei 65 °C eine halbe Stunde lang im Thermomixer inkubiert. Die Proben wurden dann auf 12 % SDS-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese nach ihrer Ladung und Masse bei einer Spannung von 120 V in 4 Stunden aufgetrennt. Die getrennten und konzentrierten Proteine wurden im Anschluss auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Immobilon-P-Membran übertragen. Dabei kam das kommerzielle erhältliche BioRad Semi-Dry Blotting System zum Einsatz. Es folgte das einstündige Blotting bei 25 V. Die Membran wurde dann für etwa 10 Minuten auf dem Taumler in Ponceau-Farblösung (0,5 % Ponceau S in 1 % Eisessig, gelöst in Millipore-Wasser) gegeben, um den Standard (peqGOLD Proteinmarker) sichtbar zu machen, sowie den erfolgreichen Transfer des Proteins zu überprüfen. Nach kurzem Waschen in Wasser wurden die Standardbanden markiert und anschließend eine Stunde mit 1 %-iger Western Blockierlösung geblockt. Es folgte die Zugabe des ersten Antikörpers und die Inkubation mit diesem über Nacht. Es handelte sich um einen polyklonalen Ziegen-Anti-SIGIRR-Antikörper (1:1000), der in 0,5 % Western Blockierlösung gelöst war. Es folgte dann, nach fünfmaligem Waschen mit TBS und TBS-Tween, am nächsten Tag die Zugabe des zweiten Antikörpers. Dieser diente zur Markierung der über Nacht entstandenen Immunkomplexe aus Anti-SIGIRR-Ak und SIGIRR. Es handelte sich bei dem zweiten Antikörper um einen Esel-Anti-Ziegen-IgG-Ak (1:10000, in 0,5 % Blockierlösung), der an eine Peroxidase konjugiert war. Inkubiert wurde der Blot dann für eine Stunde mit dem zweiten Antikörper, woran sich ein erneutes fünfmaliges Waschen mit TBS und TBS-Tween anschloss. Für den Nachweis des untersuchten Proteins kam die Darstellungsmethode der verstärkten Chemilumineszenz zur Anwendung (*engl. enhanced chemiluminescence, ECL*). Für die Entwicklung wurde je Membran 2 ml der Lösungen 1 und 2 der ECL in der Dunkelkammer zusammen gegeben und der Blot dann jeweils eine Minute mit der Lösung in der Dunkelkammer inkubiert, während die enzymatische Farbreaktion ablief. Der Blot, getrocknet und in Frischhaltefolie gewickelt wurde dann zur Belichtung des Filmstreifens auf selbigen gelegt. Belichtungszeit betrug jeweils eine Minute, wobei nach Entwicklung des Films entschieden wurde, ob die Belichtungszeit evtl. verlängert werden sollte, um eine höhere Abbildungsqualität zu erhalten.

3.2.6. RNA-Analyse

Um das Genexpressionsprofil bestimmter Gene genauer bestimmen zu können, kam die Methode der RT-PCR zur Anwendung (*engl. real-time polymerase chain reaction*). Im Rahmen der Ischämie/Reperfusion war es wichtig, sich das Expressionsverhalten proentzündlicher Proteine

näher anzuschauen, um so auf die Auswirkungen des I/R-Schadens auf genetischer Ebene schließen zu können. Die geschah mit der Methode der quantitativen RT-PCR, bei der zuvor gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben werden muss, und diese wird dann vervielfältigt. Im Prinzip kommt es dabei zur künstlich-herbeigeführten Replikation eines denaturierten DNA-Stranges in mehreren Zyklen. Die vorhandene DNA-Helix wird bei 95 °C denaturiert und dadurch in ihre beiden Einzelstränge getrennt. Nun kann die Replikation stattfinden. Dazu sind pro untersuchtem Gen zwei Primer notwendig (je einen pro Komplementärstrang), ein sog. *Forward primer* und ein sog. *Reverse primer*. Es handelt sich bei einem Primer um ein Gen-spezifisches synthetisches Oligodesoxyribonukleotid. Diese legen sich an die denaturierte DNA an (sog. *annealing*). Am jeweiligen 3'-OH-Ende der Primer setzt das replizierende Enzym, eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), die aus dem thermostabilen „*Thermus aquaticus*“-Bakterium stammt. Mittels zugegebenen Desoxyribonukleotidtriphosphat-Mix (dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP), die den Taq-Polymerase als Substrat dienen, kann die Replikation und damit die Amplifikation des gesuchten DNA-Abschnittes ablaufen. Durch diese Methode können prinzipiell geringste DNA-Mengen spezifische vervielfältigt bzw. amplifiziert werden, und somit nachgewiesen werden. Für die Quantifizierung der amplifizierten DNA gibt es unterschiedliche Methoden.

In dieser Arbeit kam eine Quantifizierungs-Variante der RT-PCR zur Anwendung, die SYBR-Green-qRT-PCR genannt wird. Im Prinzip wird dabei ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) hinzugegeben, der sich an Doppelstrang-DNA (dsDNA) anlagert. Gemessen wird die Fluoreszenzintensität am Ende jedes Replikationszyklus, also in Echtzeit. Folglich ist die Fluoreszenzintensität proportional zur DNA-Menge, da sich nach einem Replikationszyklus die DNA-Menge verdoppelt. Auf Grund der ursprünglich bekannten Konzentration der mRNA bzw. der cDNA zu Beginn der Amplifikation kann so auf die endgültige DNA-Menge geschlossen werden. Da SYBR Green ein basales Hintergrundrauschen auch im ungebundenen Zustand zeigt (sog. C_t -Wert, engl. *cycle threshold*), wird dieser Wert während der Fluoreszenzintensitätsmessung subtrahiert.

3.2.6.1. Isolierung von RNA aus Gewebe

Von jeder der Versuchsmäuse wurden kleine Nierenteile nach der Entnahme gesondert gelagert, um aus ihnen RNA zu gewinnen um diese dann weiter zu analysieren. Dazu wurden die Nierenstückchen bei -80 °C gelagert, nachdem sie im Flüssigstickstoff schockgefroren wurden. Zur Anwendung kam die modifizierte Methode von *Chomczynski* mit beinhaltender DNase-Degradation. Ein kleines Gewebestück wurde in ein 15 ml Falcon gegeben unter Zusatz von 3 ml der Lösung D. Diese enthielt 8 µl β-Mercaptoethanol pro ml. Es folgte die Homogenisierung des Gewebes mit dem Dispergiergerät ULTRA-TURAXX T25 (Geschwindigkeitsstufe 2) und die

anschließende Lagerung auf Eis. Im Anschluss daran wurden 300 µl einer 2M Natriumacetatlösung hinzugegeben und vorsichtig gemischt, ehe 3 ml Roti-Aqua-Phenol zugegeben wurden. Es folgte die Zugabe von 1,6 ml einer Lösung, bestehend aus Chloroform und Isoamylalkohol, im Verhältnis 49:1. Es wurde dann vorsichtig für etwa 20 Sekunden gemischt, bis eine milchig-weiße Suspension entstand. Die Suspension wurde für 15 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 4 °C mit dem 4000-fachen der Erdbeschleunigung zentrifugiert. Die resultierende obere Phase (ca. 3 ml) wurde zusammen mit 3 ml Isopropanol in ein frisches Falcon pipettiert und 30 Minuten bei – 20 °C inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und wieder 4000 g. Der Überstand wurde behutsam verworfen, um das Pellet nicht zu verlieren, und das Falcon wurde umgedreht auf Papier gestellt, damit restliches Isopropanol und Lösung ablaufen konnten. Es folgte die Resuspension des Pellets in 0,5 ml einer Lösung, die DNase, RNase-Hemmer, 1mM DTT, 0,05 M TrisHCL und 5 mM MgCl₂ enthielt und die anschließende Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Es folgte die Zugabe von 15 µl 2 M Natriumacetat. Das Gemisch wurde dann zusammen mit 0,8 ml Isopropanol in frische mit DEPC vorbehandelte Reaktionsgefäße gegeben, neu gemischt und für 40 Minuten bei – 20 °C inkubiert. Anschließend 15 Minuten bei 4 °C und 4000g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet mit Ethanol (80 %) in DEPC-Wasser gewaschen und 15 Minuten lang gemischt. Es folgte wieder die Zentrifugation mit 4000 g bei 4 °C. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Reaktionsgefäß erneut auf Papier gestellt, so dass restliche Lösung ablaufen konnte, und das Pellet zurück blieb. Das halbtrockene Pellet wurde 100 µl DEPC-Wasser gelöst und 10 µl dieser Suspension als Stichprobe zur Qualitätskontrolle herangezogen. Die restliche RNA-DEPC-Suspension wurde bis zu ihrer Umschreibung in cDNA bei – 80 °C gelagert. Die RNA-Menge und ihre Qualität wurden wie folgt bestimmt: 2 µl der RNA-Lösung aus der Stichprobe wurde 50-fach in DEPC-Wasser verdünnt, in die Photometerküvette gegeben und das Verhältnis der Extinktion bzw. der optischen Dichte 260/280 nm mit dem Photometer bestimmt. Um die gewünschte RNA-Konzentration der Probe zu erhalten [µg/ml] wurde die Extinktion mit der Verdünnung multipliziert, wobei ein Verhältnis der optischen Dichte 260/280 nm von etwa 1,6 als akzeptabel angenommen wurde.

3.2.6.2. Synthese der cDNA

Die zuvor isolierten RNA-Proben in DEPC-Wasser wurden verdünnt, bis eine Konzentration von 1 µg/20 µl entstand beziehungsweise 0,05 µg/µl. Der sogenannte Mastermix wurde vorbereitet, indem 9 µl 5x-Puffer, 1 µl 25 mM dNTP-Mischung, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 40 U/µl RNasin, 0,5 µl Hexanucleotide, 0,5 µl lineares Acrylamid [15µg/ml] 1 µl Superscript beziehungsweise ddH₂O als Kontrolle gemischt wurden. 15 µl des Mastermix wurden zusammen der jeweiligen RNA-Probe [1

µg/ 20 µl] in DEPC-behandelte Reaktionsgefäße gegeben, vorsichtig gemischt und in konstanter Wärme von 42 °C unter ununterbrochener Bewegung im Thermomixer inkubiert. Die Proben, die jetzt als cDNA vorlagen, wurden dann bis zur RT-PCR-Analyse bei – 20 °C gelagert.

3.2.6.3. RT-PCR (Light Cycler 480)

Zunächst musste ein 2x-Mastermix hergestellt werden. 10 ml des 2x-Mastermix beinhalteten 2 ml 10x-Taq-Puffer (ohne Detergenzien), 150 µl dNTP (25 mM), 4 ml PCR-Optimizer, 200 µl BSA PCR grade (20 mg/ml), 40 µl SYBRgreen-Farbstoff (1:100 in 20 % DMSO), 2,4 ml MgCl₂ (25 mM) und schließlich 1,21 ml RNase-freies Wasser. Dieser konnte auch, bei Bedarf, bei – 20 °C gelagert werden. Der eigentliche PCR-Mix wurde wie folgt hergestellt: pro 20 µl PCR-Mix wurden 10 µl 2x-SYBRGreen-Masermix mit 0,16 µl Taq-Polymerase und 8,4 µl RNase-freiem Wasser und den jeweiligen Primern (vgl. dazu Tab. 8), 300 nM *Forward primer*, 0,6 µl und 300 nM *Reverse Primer*, 0,6 µl), sowie 0,2 µl der cDNA gemischt. Jedes Well der 96-Well-Multiplatte wurde dabei mit 20 µl des PCR-Mixes versehen, RNase-freies Wasser diente als Negativkontrolle. Als Referenz wurde das Haushaltsgen 18s RNA getestet. Die Platte wurde dann mit einer Folie versiegelt und in das Light Cycler 480-Gerät gegeben. Die PCR dauerte insgesamt etwas über eine Stunde. Insgesamt liefen 40 Amplifikationszyklen ab, die Messungen am Ende eines jeden Zyklus fanden bei einer Temperatur von 60 °C statt. Ein Amplifikationszyklus dauerte 15 Sekunden bei 95 °C (Denaturierung des DNA-Stranges) und dann eine Minute bei 60 °C (Replikation). Nach dem 40. Zyklus erfolgte die Erstellung der sog. Schmelzkurve (*engl. melting curve*). Dabei wurden die Proben fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und dann auf 65 °C abgekühlt und dann wieder langsam auf 95 °C erhitzt. Es schloss sich eine erneute Messung an. Diese Kurve dient der Prüfung der Primer-Schmelzeigenschaften. War eine gute Qualität gegeben, so sollte nur ein Peak gemessen werden. Die Proben wurden dann auf 4 °C herunter gekühlt.

Tabelle 8: Verwendete Primer (Forward und Reverse primer) der untersuchten proentzündlichen Zyto- und Chemokingene.

Gen	Zugangsnummer	Sequenz
SIGIRR/TIR8	NM023059	Forward primer: 5'-AGAGGTCCCAGAAGAGCCAT-3' Reverse primer: 5'-AAGCAACTTCTCTGCCAAGG-3'
CCl2/MCP-1	NM011333	Forward primer: 5'-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3' Reverse primer: 5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'
CXCL2/MIP2	NM009140	Forward primer: 5'-CGGTCAAAAAGTTTGCCTTG-3' Reverse primer: 5'-TCCAGGTCAGTTAGCCTTGC-3'
IL-6	NM031168	Forward primer: 5'-TGATGCACTTGCAAAAACA-3' Reverse primer: 5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'
TNF-α	NM011609	Forward primer: 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' Reverse primer: 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'
18S-RNA	NR003278	Forward primer: 5'-GCAATTATCCCATGAACG-3' Reverse primer: 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3'

3.2.7. Statistische Auswertung

Die hier präsentierten Daten und Werte werden als arithmetisches Mittel dargestellt. Zur Darstellung der Fehlerkorrektur wird der SEM (*engl. standard error of the mean*) angegeben. Dieser wird gebildet als Quotient aus der Varianz s und der Quadratwurzel der Einzelbeobachtungen n ; $SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$; [142]. Die Daten der Wildtyp-Mäuse und der SIGIRR/TIR8-defizienten Mäuse wurden mittels ANOVA (*Analysis of Variance*) und anschließendem Student-Newman-Keuls-Test untereinander verglichen. Dazu wurde *SigmaStat*-Software verwendet. Für den direkten Vergleich zwischen Wildtyp- und SIGIRR^{-/-}-Zellen wurde ein t-Test durchgeführt. Auch werden die Daten als Mittelwert mit SEM-Fehlerkorrektur dargestellt. Statistische Signifikanz galt ab $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Effekte von renaler Ischämie und Reperfusion bei SIGIRR-Defizienz in vivo

Zunächst sollte untersucht werden, ob SIGIRR/TIR8 in der murinen Niere Auswirkungen auf eine akute Nierenschädigung hat, nach chirurgisch induzierter renaler Ischämie. Dabei wurde zum einen die Expression von SIGIRR/TIR8 im Sinne seiner genetischen Expression untersucht, zum anderen wurde erforscht, welche Konsequenzen sich für das renale Gewebe auf morphologischer Ebene ergeben. Dabei wurde der Gewebeschaden histopathologisch quantifiziert. Auch das Ausmaß der sich an die Reperfusion anschließenden leukozytären Infiltration in das zuvor ischämische Nierengewebe wurde untersucht, sowie die funktionelle renale Beeinträchtigung bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion.

4.1.1. SIGIRR/TIR8 wird bei Ischämie und Reperfusion exprimiert

Basierend auf der Annahme, dass SIGIRR/TIR8 eine protektive Funktion bei der akuten ischämischen Nierenschädigung spielt, musste zunächst gezeigt werden, inwiefern sich die Belastung durch Ischämie mit anschließender Reperfusion auf die Expression von SIGIRR/TIR8 auswirkt. Mit anderen Worten: es sollte ausgeschlossen werden, dass SIGIRR/TIR8 in Folge der Ischämie in seiner Expression reduziert wird, so dass nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Präsenz von SIGIRR bei Ischämie/Reperfusion gegeben ist.

Dazu wurden zunächst gesunde, männliche 6 Wochen alte C57BL/6-Wildtyp-Mäuse einer unilateralen transienten Ischämie der Niere zugeführt. Zu diesem Zwecke wurde jeweils eine Niere von der Zirkulation durch eine 45-minütige Unterbindung des Blutflusses getrennt, während die kontralaterale Niere des selben Individuums zur Kontrolle als *sham* nicht behandelt wurde (engl. Täuschung), also ungeklemmt blieb. Zu diesem Zwecke wurde das Hilum renale der behandelten Niere mit einer Mikroaneurysmaklemme abgeklemmt, was dazu führte, dass kein arterielles Blut mehr durch die A. renalis in die Niere gelangen konnten. Nach 45 Minuten wurde dann die Reperfusion durch Entfernen der Mikroaneurysmaklemme wiederhergestellt (Abb. 21).



Abb. 21: Durchführung der operativen unilateralen Ischämie

Fotographisch dargestellt ist der intraoperative Befund bei Induktion der transienten unilateralen Ischämie. Die Gesamtdauer der Unterbindung der arteriellen Perfusion betrug pro Individuum 45 Minuten. **A** Gezeigt ist eine ischämische rechte Niere zum Zeitpunkt 20 Minuten nach Beginn der totalen Ischämie. **B** Hier dasselbe Individuum unmittelbar vor Entfernung der Mikroaneurysmaklemme, also zum Zeitpunkt 45 Minuten nach Beginn der Ischämie. **C** Reperfusion, beachte die entfernte Mikroaneurysmaklemme und das deutlich hyperämische Organ. * Mikroaneurysmaklemme, Abbildungsmaßstab ca. 1:2

Nach jeweils einem, fünf und zehn Tagen wurden sowohl die behandelte, als auch die kontralateralen Kontrollnieren untersucht. Dabei wurde die Menge der SIGIRR/TIR8 mRNA zu den verschiedenen Zeitpunkten bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion mittels *real time* RT-PCR bei der operierten Population (n = 6) quantifiziert, als auch bei einer Kontrollpopulation, die nicht operiert wurde, um die Basalexpression von SIGIRR/TIR8 zu messen. Es zeigte sich dabei, dass sowohl in der Niere, die Ischämie und Reperfusion erlitt, als auch die unbehandelte *sham*-Niere

SIGIRR/TIR8 mRNA deutlich exprimiert wurde. Dabei lag das Expressionsniveau in den behandelten und den *sham*-Nieren bei der operierten Population am Tag 1 nach I/R über der Basalexpression der nicht operierten Kontrollpopulation. Am Tag 5 war die gesteigerte mRNA-Expression von SIGIRR/TIR8 nur noch signifikant bei den unbehandelten *sham*-Nieren. Der weitere Verlauf zeigte, dass am 10. Tag bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion die mRNA-Menge auf das basale Expressionsniveau der nicht-operierten Kontrollnieren zurückfiel (vgl. Abb. 22).

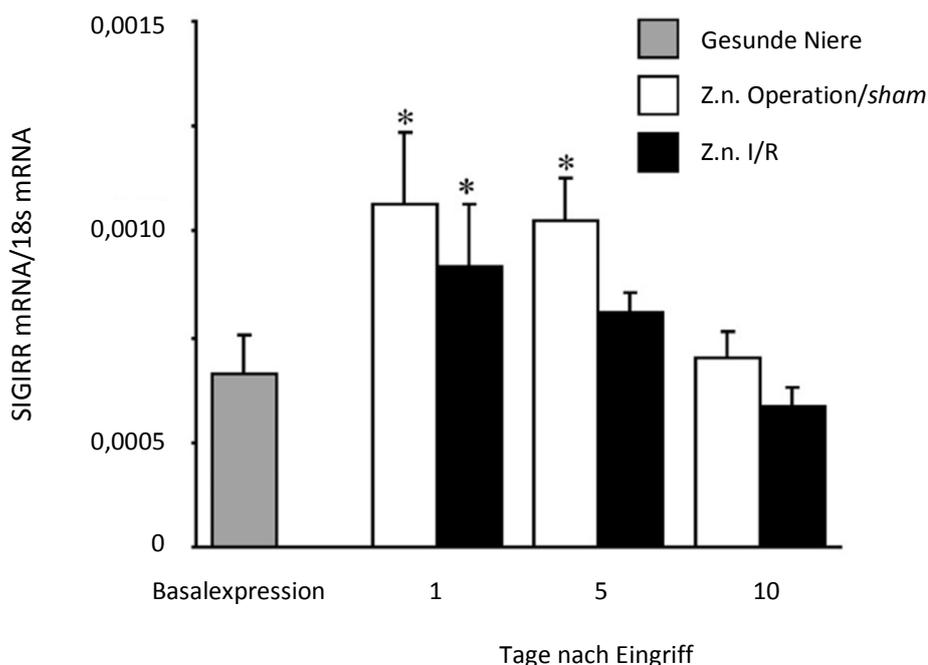


Abb. 22: Renale Expression der SIGIRR/TIR8 mRNA

Die mRNA von SIGIRR/TIR8 zur Bestimmung des basalen Expressionsniveaus wurde aus gesunden, 6 Wochen alten männlichen C57BL/6J-Mäusen extrahiert (n = 5) und durch RT-PCR quantifiziert. Desweiteren aus ebenfalls gesunden Versuchstieren, die einer 45-minütigen unilateralen Ischämie mit anschließender Reperfusion ausgesetzt wurden. Dabei wurde die mRNA der ischämischen wie auch der kontralateralen *sham*-Niere gewonnen, amplifiziert und quantifiziert. Die mittleren Werte der Expressionsniveaus ± SEM der Versuche wurde hierbei in Relation zur ribosomalen 18s mRNA gesetzt. * = p < 0,05 vs. Basalexpression.

Der nächste Schritt war die Erfassung der Menge an exprimierten Protein, beziehungsweise die Menge exprimierten SIGIRR/TIR8. Dazu wurden zum einen wieder die Basalmengen von unoperierten Kontrollpopulationen untersucht, ein Mal bei SIGIRR/TIR8^{+/+} Wildtyp-Mäusen, zum anderen bei der Population der genetisch homozygoten SIGIRR-defizienten Mäuse (SIGIRR/TIR8^{-/-}).

Wie erwartet zeigte sich im Western Blot, dass es bei homozygoter SIGIRR/TIR8-Defizienz zu keiner Expression des SIGIRR-Moleküls kommt. Bei den Wildtyp-Mäusen zeigte sich die Expression von SIGIRR/TIR8. Die Menge wurde zum relativen Vergleich mit dem folgenden Versuch mit 1 gleichgesetzt (vgl. Abb. 22).

Es folgte nun die Western Blot-Analyse der Menge exprimierten SIGIRR/TIR8 bei Ischämie/Reperfusion. Dazu wurde Analog zur RT-PCR-Analyse bei Wildtypmäusen eine transiente unilaterale Ischämie mit anschließender Reperfusion induziert. Die ischämischen Organe und die unbehandelten *sham*-Nieren wurden dann ebenfalls an den Tagen eins, fünf und zehn nach I/R entnommen. Dabei zeigte sich im Western Blot, dass sowohl in den postischämischen Organen als auch den kontralateralen Kontrollorganen keine wesentliche Induktion, das heißt keine wesentlich gesteigerte Proteinmenge zu messen war. Lediglich am ersten Tag nach Ischämie/Reperfusion zeigte sich eine unwesentliche, aber statistisch signifikante Erhöhung der SIGIRR/TIR8-Expression in den unbehandelten Kontrollnieren. Desweiteren am zehnten Tag eine statistisch signifikante leichte Reduktion der Proteinmenge in den postischämischen Organen im Verhältnis zur Basalexpression (vgl. Abb. 23).

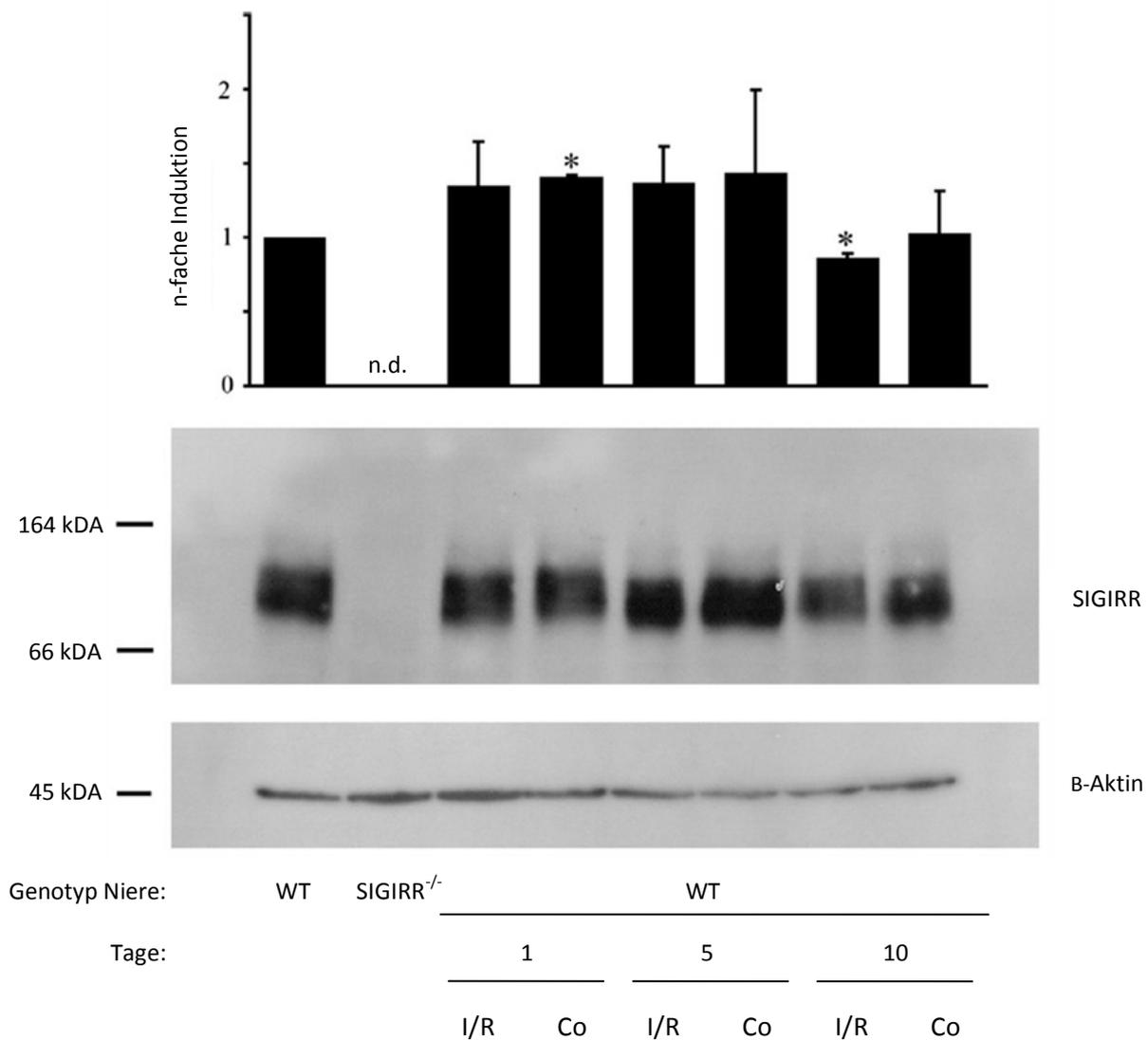


Abb. 23: Proteinexpression von SIGIRR

Die Menge des exprimierten SIGIRR/TIR8-Proteins bei unbehandelten Wildtypmäusen und SIGIRR^{-/-}-Mäusen wurde durch eine Western Blot-Analyse ermittelt. Zusätzlich wurde die Menge des exprimierten Proteins in beiden Versuchsgruppen nach unilateraler Ischämie/Reperfusion jeweils in operierten und den kontralateralen *sham*-Nieren gemessen. Dies geschah einen, fünf und zehn Tage nach Operation. Das obere Balkendiagramm zeigt die densitometrische Auswertung dreier Western Blots von drei unterschiedlichen Proben. Dabei wurde die durchschnittliche Dichte ± SEM des akkumulierten Proteins aus drei Messungen, die ebenfalls aus drei unterschiedlichen Proben gemacht wurden, erfasst und die Dichte des SIGIRR^{+/+}-Wildtyps als 1 definiert. * = p < 0,05 vs. Wildtyp.

Zusammenfassend lässt sich aus den Daten ableiten, dass SIGIRR/TIR8 auch im Rahmen von Ischämie/Reperfusion konstitutiv exprimiert wird und kaum Schwankungen unterliegt.

4.1.2. SIGIRR-Defizienz führt zu einer verstärkten akuten ischämischen Nierenschädigung

Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit näher erläutert, spielt das Immunsystem eine wesentliche Rolle bei der akuten ischämischen Nierenschädigung [143, 144]. Es war nun wichtig zu zeigen, dass SIGIRR-Defizienz, also eine fehlende Kontroll- und Regulationsinstanz innerhalb des renalen Immunsystems, einen negativen und verstärkenden Effekt auf die akute ischämische Nierenschädigung hat. Dabei wurden funktionelle Beeinträchtigungen der Niere analysiert, genauso wie morphologische Veränderungen berücksichtigt. Wesentlich dabei war, neben der Bestimmung des Serumkreatininspiegels bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion, eine vergleichende histopathologische Auswertung des Ischämie-/Reperfusionsschadens.

Um einen möglichen funktionellen Schaden der normalen Nierenfunktion bei der Versuchstieren zu messen, wurde ein akutes ischämisches Nierenversagen bei den Wildtyp- und den SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäusen induziert, bei jeweils n = 5-6. Es wurde also in beiden Versuchsgruppen eine bilaterale transiente renale Ischämie für ebenfalls 45 Minuten induziert, mit anschließender Reperfusion (vgl. 4.1.1.). Um eine mögliche funktionelle Beeinträchtigung der Nierenfunktion zu quantifizieren, wurde bei den Versuchstieren die Serumkreatinin-Konzentration als Parameter für die renale Funktion erhoben. Die Messung erfolgte dabei genau 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion. Die Ergebnisse wurden dann mit den Kontrollmessungen in beiden Gruppen verglichen, die vor Induktion des akuten ischämischen Nierenversagens erhoben wurden. Es zeigte sich dabei, dass eine homozygote SIGIRR-Defizienz eine signifikante Verschlechterung ($p < 0,05$) der renalen Funktion bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion mit sich bringt (Abb. 24). Bei den Wildtypmäusen wurde in der ersten Messung ein basales Serumkreatinin von $0,4 \text{ mg/dl} \pm 0,2 \text{ mg/dl}$ gemessen. Nach Induktion der bilateralen Nierenischämie zeigte sich 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion eine Erhöhung des Serumkreatinins in dieser Gruppe um gut das Dreifache des basalen Serumkreatinins. Die zweite Messung offenbarte eine durchschnittliche Serumkreatinin-Konzentration von $1,4 \text{ mg/dl} \pm 0,2 \text{ mg/dl}$. Bei den SIGIRR/TIR8-defizienten Mäusen zeigte sich in der zweiten Messung (24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion) eine Steigerung des basalen Serumkreatinins um das ca. Siebenfache auf durchschnittlich $2,9 \text{ mg/dl} \pm 0,7 \text{ mg/dl}$. Die erste Messung bei der Gruppe der SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäuse vor Induktion des akuten ischämischen Nierenversagens ergab für das basale Serumkreatinin, ähnlich wie bei der Wildtyp-Mäusen, eine mittlere Serumkreatininkonzentration um die $0,4 \text{ mg/dl} (\pm 0,2 \text{ mg/dl})$. Das Überleben 24 Stunden nach bilateraler Ischämie betrug in beiden Gruppen jeweils 100 %. Das Ergebnis dieser Studie über die Auswirkung einer homozygoten SIGIRR/TIR8-Defizienz auf den funktionellen Schaden zeigt

deutlich, dass diese SIGIRR-Defizienz zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion im akuten ischämischen Nierenversagen führt.

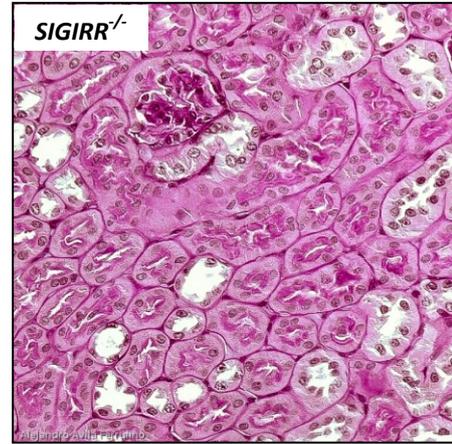
Die deutlich gesteigerte ischämische Nierenschädigung, gemessen der Erhöhung des Serumkreatinins bei den SIGIRR-defizienten Mäusen, muss auch ein Korrelat in der Morphologie der Niere haben. Der nächste Schritt war dann eine histopathologische Analyse der ischämischen Nieren von SIGIRR/TIR8-defizienten Mäusen im Vergleich zu ihrem Wildtyp. Für dieses Experiment wurden die Organe zu drei verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie/Reperfusion untersucht. Dazu wurden die beiden Versuchsgruppen, nämlich die Gruppe SIGIRR^{+/+} gegen SIGIRR^{-/-}, in jeweils drei Untergruppen aufgeteilt. So entstanden die Vergleichsgruppen für die drei unterschiedlichen Zeitpunkte nach Ischämie/Reperfusion, nämlich 24 Stunden, fünf und zehn Tage nach I/R.

Analog dem Experiment, das unter 4.1.1 durchgeführt wurde, ist auch hier für 45 Minuten eine unilaterale Ischämie induziert worden mit anschließender Reperfusion. Zu den drei unterschiedlichen oben genannten Zeitpunkten wurden die ischämische Niere und die unbehandelte Kontrollniere der jeweiligen Untergruppen entnommen. Die Organe wurden wie in Kapitel 3 beschrieben in Paraffin eingebettet und in feine 2 µm dicke Scheiben in der Longitudinalebene geschnitten. Es wurden dann im Anschluss jene feinen Gewebeschnitte PAS-gefärbt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Pro Individuum, sowohl aus der Wildtyp- als auch aus der SIGIRR/TIR8^{-/-}-Gruppe wurde pro Niere jeweils ein Schnitt ausgewertet.

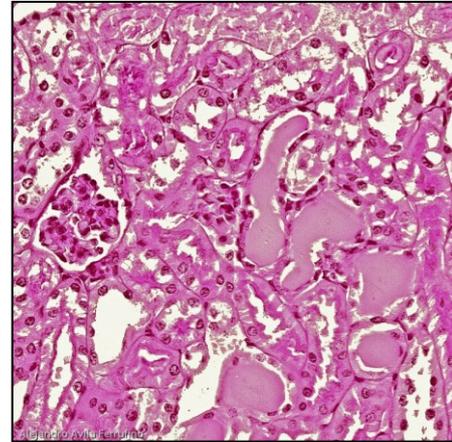
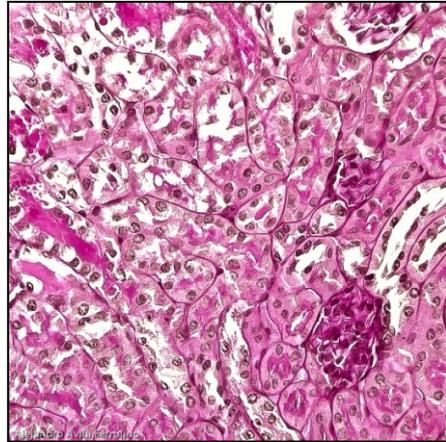
Wie in 1.4. beschrieben, kommt es zu einer Fülle von histopathologischen Veränderungen in der Niere nach Ischämie/Reperfusion. Um die histopathologischen Veränderungen bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion zu quantifizieren, wurde ein Punktesystem eingeführt, nach dem der durchschnittliche morphologische Ischämieschaden am Tubulussystem, wie in 3.2.3.2 beschrieben, bewertet wurde. Ein völlig normales und unverändertes renales Gewebe wurde mit 0 bewertet, während eine maximal ausgedehnte Schädigung des Tubulusapparates von über 75 % mit 5 bewertet wurde (vgl. Abb. 24). Es zeigte sich durchgehend ein deutlich erhöhter Gewebeschaden bei den SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den SIGIRR/TIR8^{+/+}-Mäusen. Dieser Unterschied blieb im zeitlichen Verlauf von 1 – 10 Tage nach Ischämie/Reperfusion zwischen den beiden Versuchsgruppen signifikant, wobei die ausgeprägteste Schädigung am Tag 1 gemessen wurde, und dieser sich im Verlauf offenbar zurückbildete (vgl. Abb. 25). Die kontralateralen, normal perfundierten Organe zeigten dabei keine Beteiligung und waren somit nicht durch Ischämie/Reperfusion des kontralateralen Organs beeinflusst. Auch der Genotyp des jeweiligen Organismus spielte dabei offensichtlich keine Rolle.

Ischämie/Reperfusion

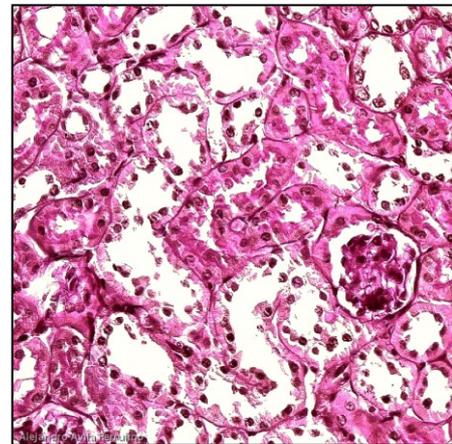
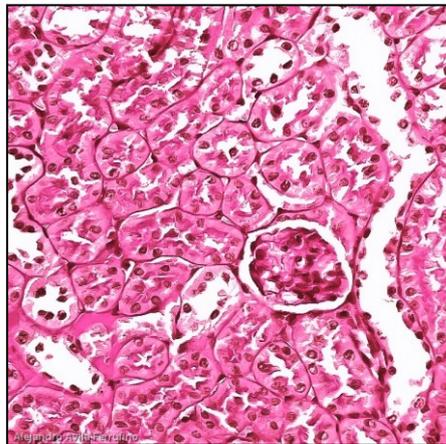
Kontrolle



Tag 1



Tag 5



Tag 10

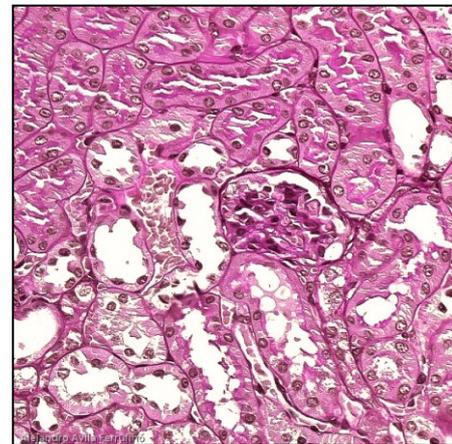
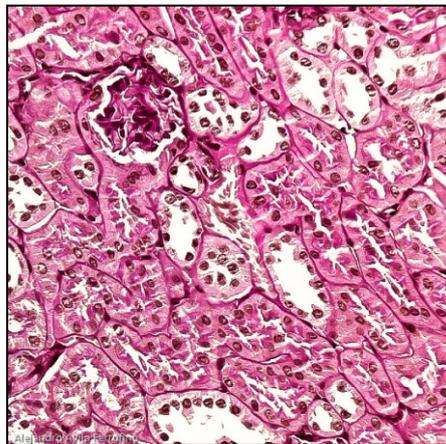


Abb. 24: Histopathologie. Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der histopathologischen Bewertung des Ischämie/Reperfusionsschadens in den SIGIRR^{+/+} und SIGIRR^{-/-}-Versuchstieren. Vergrößerung 100 x. PAS-Färbung.

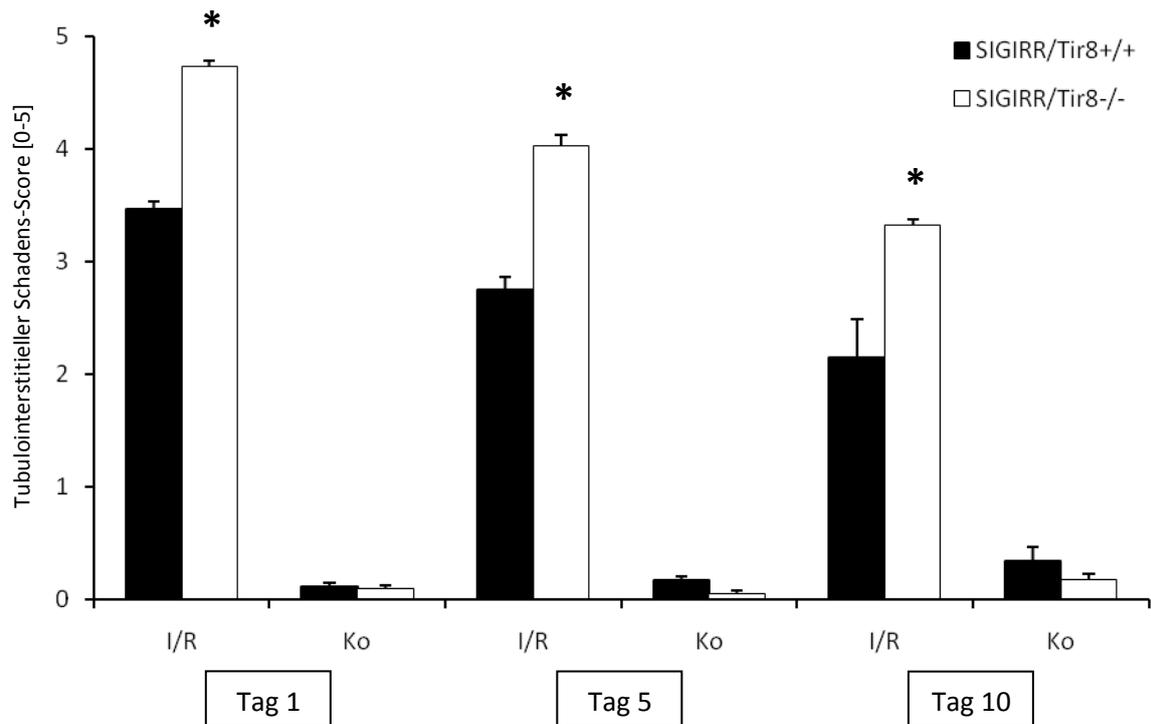


Abb. 25: Quantifizierung des histopathologischen Schadens nach I/R

Dargestellt ist die morphometrische Auswertung der PAS-gefärbten Schnitte der ischämischen als auch der unbehandelten kontralateralen Niere beider Versuchsgruppen. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SEM des etablierten 5-Punkte-Systems aller Individuen des Experiments. * $p < 0,05$ für SIGIRR^{-/-} vs. Wildtyp.

Zusammengenommen: SIGIRR/TIR8 lindert die funktionelle renale Beeinträchtigung und eine unangemessen hohe morphologische Schädigung der Niere bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion. SIGIRR/TIR8-Defizienz scheint im akuten ischämischen Nierenversagen von Nachteil zu sein. Diese Ergebnisse suggerieren im Umkehrschluss, dass SIGIRR/TIR8 eine wichtige Rolle bei der Verhinderung des ischämischen akuten Nierenversagens spielt.

4.1.3. SIGIRR/TIR8 unterdrückt die frühe Expression von IL-6, CCL2/MCP-1 und CXCL2/MIP2

Die Tatsache, dass SIGIRR/TIR8 in der Lage ist, die Expression von Zyto- und Chemokinen zu unterdrücken, führte zu folgender Überlegung. Wie ja bereits bekannt ist, kann die Expression proentzündlicher Mediatoren wie CCL2/MCP-1 und CXCL2/MIP2 durch SIGIRR/TIR8 unterdrückt werden. Auch die Zytokinproduktion, die durch bakterielles LPS angestoßen wird, fällt unter die Kontrolle von SIGIRR/TIR8 [116, 124]. Folglich wurde für den folgenden Versuch angenommen, dass die homozygote SIGIRR-Defizienz zu einer erhöhten lokalen Chemo- und Zytokinexpression im Rahmen von Ischämie und Reperfusion führt.

Es war also wichtig, die Expression der Zytokine und Chemokine MCP-1, MIP2 und IL-6 zu untersuchen, die das schwere akute Nierenversagen der SIGIRR-defizienten Tiere im vorherigen Experiment erklären könnte. Dabei sollte die Expression von MCP-1, MIP2 und IL-6 auf Ebene der mRNA-Expression gemessen werden. Es wurden erneut 6 Wochen alte C57BL/6-Mäuse ($n = 5 - 6$) mit 6 Wochen alten SIGIRR/TIR8-defizienten Mäusen verglichen. Auch in dieser Gruppe betrug die Anzahl der Untersuchten Individuen 5 bis 6. Die beiden Versuchsgruppen wurden ebenfalls in drei Untergruppen eingeteilt, die zu den Zeitpunkten 24h, fünf Tage und zehn Tage nach Ischämie/Reperfusion untersucht wurden. Ganz genau wie im Versuch zur Bestimmung der histopathologischen Veränderungen aus 4.1.2. wurde auch bei dieser Versuchsreihe eine unilaterale transiente Ischämie für eine Gesamtdauer von 45 Minuten pro Individuum induziert, während die kontralaterale Niere des Individuums völlig unangetastet blieb. Nach Ablauf der 45-minütigen Ischämie wurde der Blutfluss durch Entfernung der Mikroaneurysmaklemme wieder freigegeben. Die Entnahme des behandelten Organs und der unbehandelten Kontrollniere erfolgte in den jeweiligen Gruppen und den Untergruppen dann 24 Stunden nach I/R, desweiteren am fünften und am zehnten Tag nach Operation. Diese Proben wurden dann, wie weiter oben beschrieben, verarbeitet und bezüglich ihres mRNA-Expressionsniveaus der proentzündlichen Mediatoren MCP-1, IL-6, MIP2 analysiert. Als Referenzniveau diente ebenfalls die Expression des sogenannten Haushaltsgens 18S rRNA. Dabei zeigte sich das höchste Expressionsniveau für alle drei untersuchten Zyto- und Chemokine bei 24 Stunden nach Ischämie beziehungsweise Reperfusion. Das mRNA-Expressionsniveau der Mediatoren sank an den Zeitpunkten 5 und 10 Tage nach I/R beträchtlich und war in den untersuchten Gruppen nicht mehr signifikant unterschiedlich (Abb. 26). Die wichtigste Beobachtung war jedoch, dass eine SIGIRR/TIR8-Defizienz zu einer signifikant gesteigerten Expression von proentzündlichen Mediatoren auf Ebene der jeweiligen mRNA führt. Für alle drei betrachteten Mediatoren zeigte sich bei der Gruppe der SIGIRR/TIR8^{-/-}-Tiere am ersten Tag eine signifikant erhöhte Expression der mRNA ($p < 0,05$).

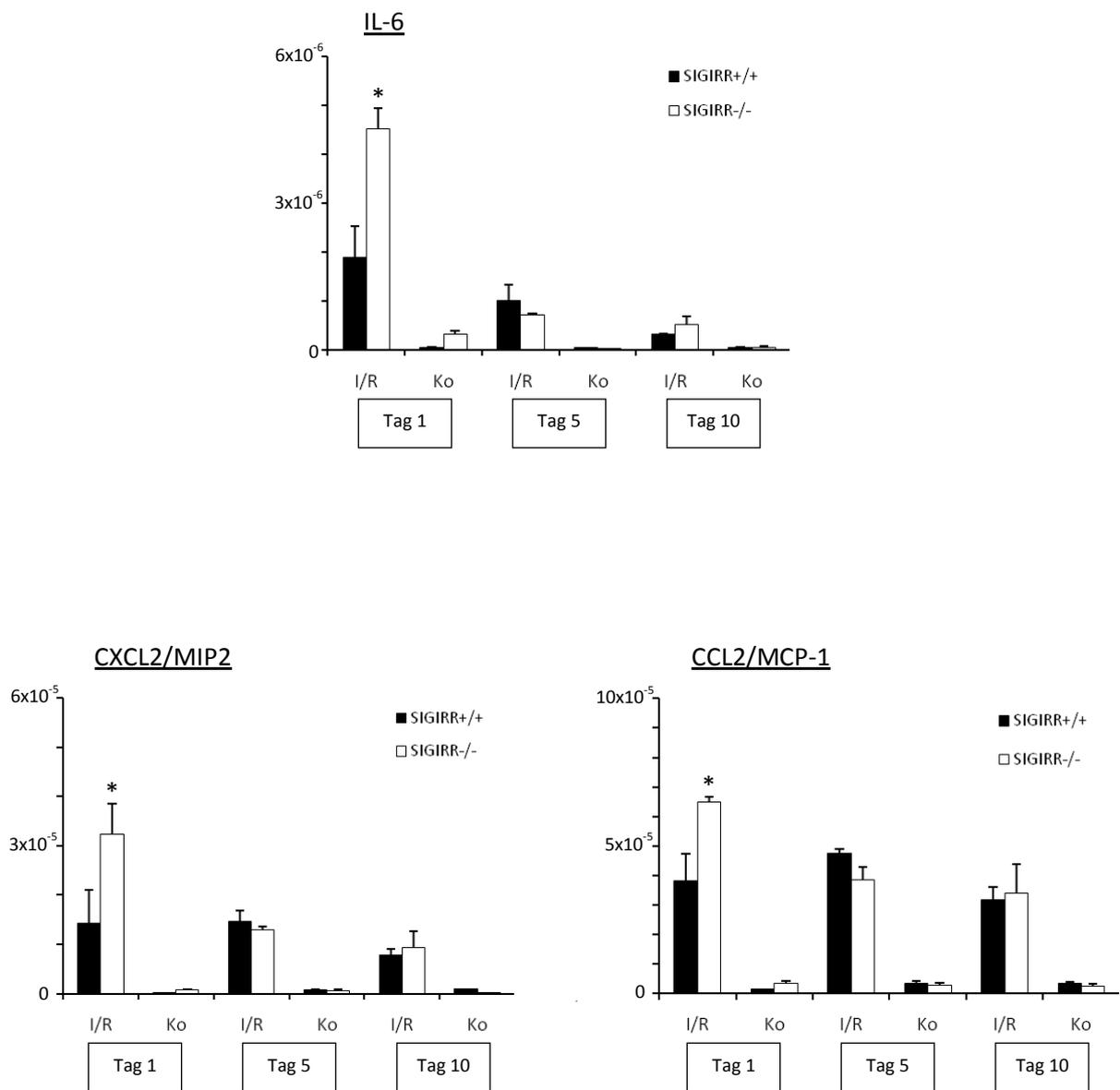


Abb. 26: Renale Zyto- und Chemokinexpression nach Ischämie/Reperfusion

An den Zeitpunkten 1, 5 und 10 nach Ischämie/Reperfusion wurden beide Nieren des Versuchstieres entnommen. Die mRNA-Proben wurden gepoolt und auf das Expressionsniveau des Zytokins IL-6 sowie der beiden (Zyto-)Chemokine CXCL2/MIP2 und CCL2/MCP-1 durch die Nukleinsäureamplifikationsmethode RT-PCR untersucht. Dargestellt ist die Expressionshöhe in Relation zur Expressionshöhe der 18S mRNA ± SEM. * = p < 0,05 vs. SIGIRR/TIR8^{+/-}-Wildtyp.

Um die Auswirkungen der signifikant erhöhten mRNA-Expressionsniveaus am ersten Tag nach Ischämie/Reperfusion auf die tatsächliche Freisetzung beziehungsweise Transkription dieser lokalen proentzündlichen Mediatoren zu beobachten, wurde folgender ergänzender Versuch durchgeführt: stellvertretend für die drei oben genannten Mediatoren wurde eine immunhistochemische Analyse

der lokalen CCL2/MCP-1-Produktion zu den drei Zeitpunkten nach I/R durchgeführt. Wie oben beschrieben wurden die beiden Organe, postischämisch wie unbehandelt, mit einem MCP-1-spezifischen Antikörper markiert und das Chemokin MCP-1 so zur Darstellung gebracht. Es folgte eine lichtmikroskopische Untersuchung der immunhistochemisch angefärbten Schnitte (Abb. 27a). Es zeigte sich hier das stärkste Signal bei den Proben des fünften Tages nach Ischämie/Reperfusion. Dabei konnten positive Anfärbungen sowohl im Bereich des Tubulusepithels, als auch bei interstitiellen Zellen beobachtet werden. Allerdings konnte ein positives Farbsignal für MCP-1 in den interstitiellen Zellen (bei entsprechend hoher Vergrößerung) ausschließlich bei den SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäusen beobachtet werden, nicht aber beim Wildtyp. Es zeigte sich aber auch ganz allgemein als erste Tendenz, dass positive Farbsignale für die MCP-1-Produktion in den Zellen der SIGIRR/TIR8-defizienten Versuchstiere, gegenüber der Wildtypkontrolle, in ihrer Anzahl dominierten.

Um diesen Eindruck objektiv zu erfassen, wurden die MCP-1-positiv angefärbten Zellen in den verschiedenen Nierenschnitten gezählt. Dabei fand sich, dass die Anzahl der MCP-1-positiven Zellen im Durchschnitt am höchsten bei den postischämischen Nieren der SIGIRR/TIR8-defizienten Gruppe war, und zwar zu allen drei Zeitpunkten im Vergleich zum Wildtyp. Die höchste durchschnittliche Anzahl an MCP-1-positiven Zellen konnte bei den SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäusen in den Proben des fünften Tages bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion festgestellt werden. Die Wildtypgruppe zeigte in den postischämischen Proben zwar auch eine erhöhte durchschnittliche Menge der MCP-1-positiven Zellen, deren Anzahl aber in jedem Fall und zu jedem der drei Zeitpunkte signifikant unter der Anzahl der SIGIRR-defizienten Gruppe lag ($p < 0,05$). Die kontralateralen Nieren, die also bei der Operation der Mäuse unbehandelt geblieben waren, zeigte in beiden Versuchsgruppen ein recht ähnliches Bild. Die Anzahl der MCP-1-positiven Zellen in den unbehandelten Kontrollnieren beider Versuchsgruppen lag ähnlich niedrig und wies keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (Abb. 27b).

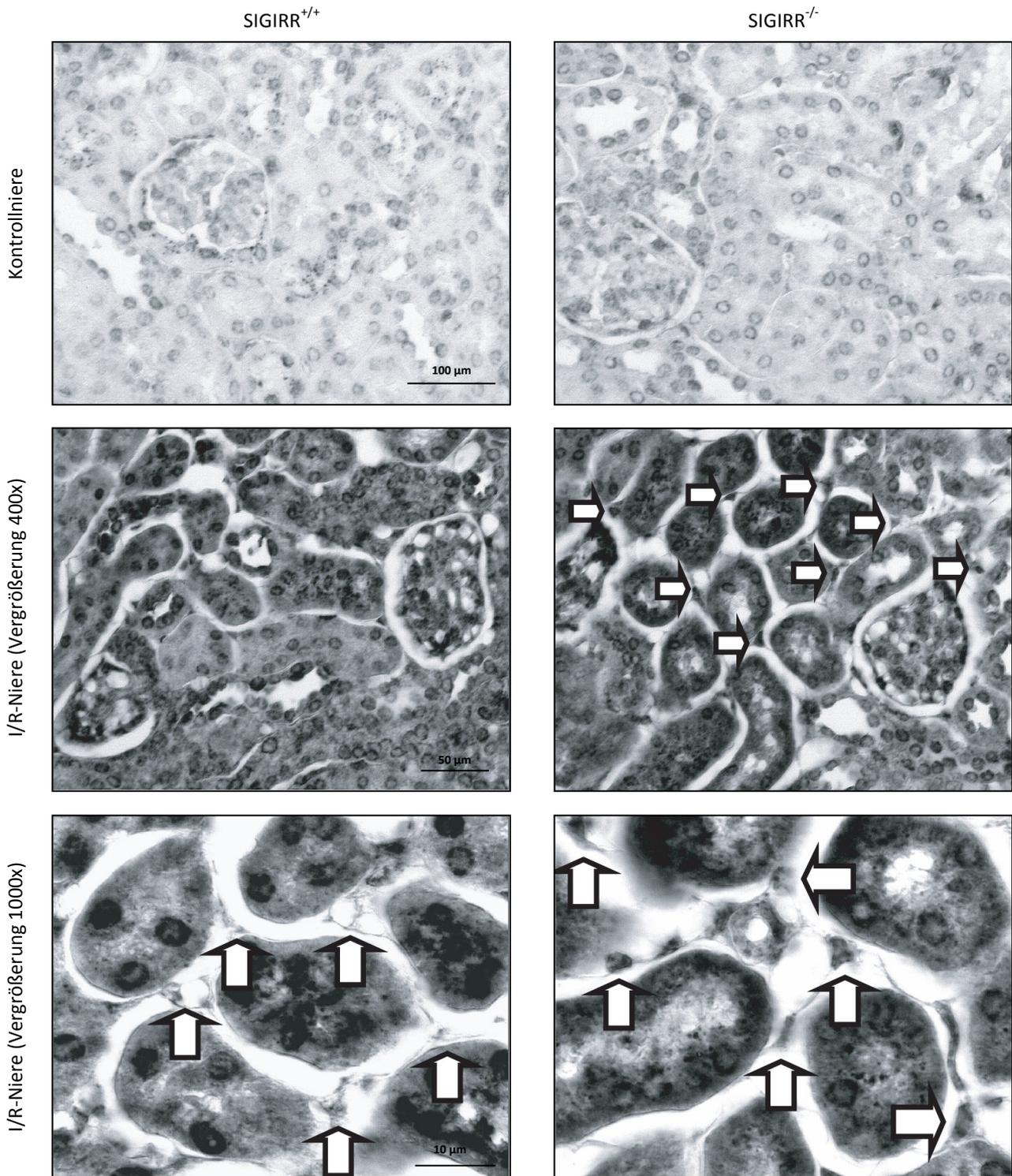


Abb. 27a: Immunhistochemische Nachweis von CCL2/MCP-1

Dargestellt sind repräsentative Schnittbilder einer vergleichenden immunhistochemischen Analyse der reaktiven CCL2/MCP-1-Produktion in postischämischen Nieren, sowohl von SIGIRR/TIR8-knock out-Mäusen als auch von Wildtypmäusen. Die hier gezeigten Nieren wurden am fünften postoperativen Tag isoliert. Das unterste Modul zeigt bei einer Vergrößerung von 1000x, dass nur bei den Nieren des SIGIRR/TIR8^{-/-}-Genotyps eine positive CCL2/MCP-1-Anfärbung der interstitiellen Zellen (markiert durch die Pfeile) vorlag.

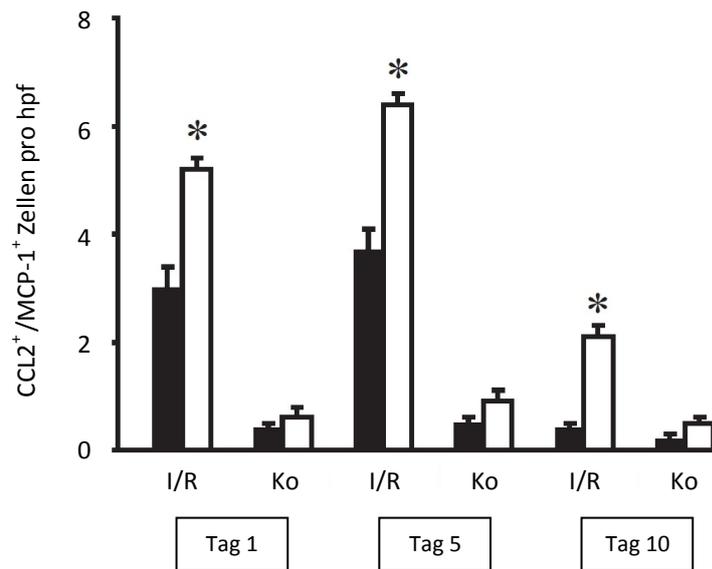


Abb. 27b: Anzahl der CCL2/MCP-1⁺ interstitiellen Zellen

Die durchschnittliche Anzahl CCL2/MCP-1 positiver interstitieller Zellen war zu allen drei untersuchten Zeitpunkten signifikant höher bei den SIGIRR-Knock outs (weiße Balken). Pro Individuum wurden 10 sich nicht überlappende Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 200 x analysiert und die ermittelte Zellzahl gemittelt. Pro Gruppe wurden 5 Versuchstiere beobachtet. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, * = p < 0,05 vs. Wildtyp (schwarze Balken).

Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung verdeutlichen, wie SIGIRR/TIR8 an der Regulation der Expression proentzündlicher Mediatoren beteiligt ist. Im Kontext der akuten ischämischen Nierenschädigung unterdrückt SIGIRR/TIR8 signifikant die Expression der Zytokine CXCL2/MIP2 und IL-6, sowie die Expression des Makrophagen rekrutierenden Chemokins CCL2/MCP-1 nach Ischämie/Reperfusion.

4.1.4. Gesteigerte postischämische Leukozyteninfiltration bei SIGIRR^{-/-}

Der postischämische Gewebeschaden ist durch eine absolute Ischämie, und vor allem durch die alleinige Hypoxie, nicht ausreichend erklärbar [99]. Gerade die Reperfusion zeichnet für den Großteil der pathologischen Vorgänge und Veränderungen im postischämischen Gewebe verantwortlich. Dabei ist die bei der Reperfusion stattfindende Leukozytenrekrutierung von zentraler Bedeutung, der eine gesteigerte Expression chemotaktischer und proentzündlicher Mediatoren und die Aktivierung des Endothels vorausgeht. Das ist ähnlich einer Entzündung, allerdings in diesem Fall in einem sterilen Gewebe [39, 145]. Infiltrierende neutrophile Granulozyten schädigen das ischämische Gewebe durch die Freisetzung der reaktiven

Sauerstoffspezies ROS und proteolytischer Enzyme und sind eine Leukozytenklasse, die sich früh im postischämischen Gewebe bei Reperfusion tummelt. Eine weitere wichtige Leukozytenklassen sind Makrophagen. Sie können bereits zwei Stunden nach Reperfusion in den Vasa recta nachgewiesen werden. Sie unterhalten die sterile postischämische Entzündung durch Zytokinsekretion, aber auch Phagozytose und die Möglichkeit zur Apoptoseinduktion. Dabei mehren sich aber auch Hinweise auf eine mögliche positive Beteiligung am postischämischen Heilungs- bzw. Reparaturprozesses [143, 144, 146].

Die im vorrangegangene Experiment nachgewiesene Expression von MCP-1 und MIP2 ließ annehmen, dass eine gesteigerte Zyto- und Chemokinsekretion auch den entsprechenden Effekt auf die leukozytäre Infiltration bei Reperfusion hat. Dabei war zu vermuten, dass der SIGIRR^{-/-}-Genotyp dabei durch eine signifikant höhere leukozytäre Infiltration in das reperfundierte Gewebe auffällt.

Die im vorherigen Experiment gewonnenen Nierenschnitte wurden daraufhin immunhistochemisch, mit einem Neutrophilen-spezifischen Marker versehen, angefärbt. Es folgte eine lichtmikroskopische Auswertung der postischämischen Neutrophileninfiltration zu den drei bekannten Zeitpunkten nach Ischämie. Auch hierbei sind pro Schnitt zehn Gesichtsfelder bei 100-facher Vergrößerung ausgewertet worden. In jedem Gesichtsfeld wurden die angefärbten Neutrophilen gezählt und dann der Durchschnittswert aller zehn Gesichtsfelder pro Organschnitt ausgerechnet (vgl. Abb. 28). In die Auswertung sind nur positiv-gefärbte Zellen des peritubulären Gewebes eingegangen. Zellen, die intraglomerulär oder sich in den Tubuluslumina befanden, wurden nicht gewertet. Dabei zeigte sich sowohl bei der SIGIRR/TIR8-defizienten Population als auch bei der Wildtypkontrollpopulation 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion die stärkste Neutrophileninfiltration. Der SIGIRR^{-/-}-Genotyp zeigte zu diesem Zeitpunkt die durchschnittlich höchste Anzahl von infiltrierenden Neutrophilen (ca. 23 Zellen pro Gesichtsfeld). Im Vergleich zum Wildtyp, bei dem durchschnittlich 13 Zellen pro Gesichtsfeld gezählt wurden, war die höhere Neutrophilenzahl im SIGIRR^{-/-}-Genotyp statistisch signifikant ($p < 0,05$). Im zeitlichen Verlauf sank die Anzahl der interstitiell gelegenen neutrophilen Granulozyten in den postischämischen Nieren kontinuierlich und erreichte am zehnten Tag nach Ischämie/Reperfusion ähnlich niedrige Werte wie in den unbehandelten kontralateralen Kontrollnieren. Dabei war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den SIGIRR/TIR8-defizienten Mäusen und der Wildtypkontrolle mehr feststellbar ($p > 0,05$).

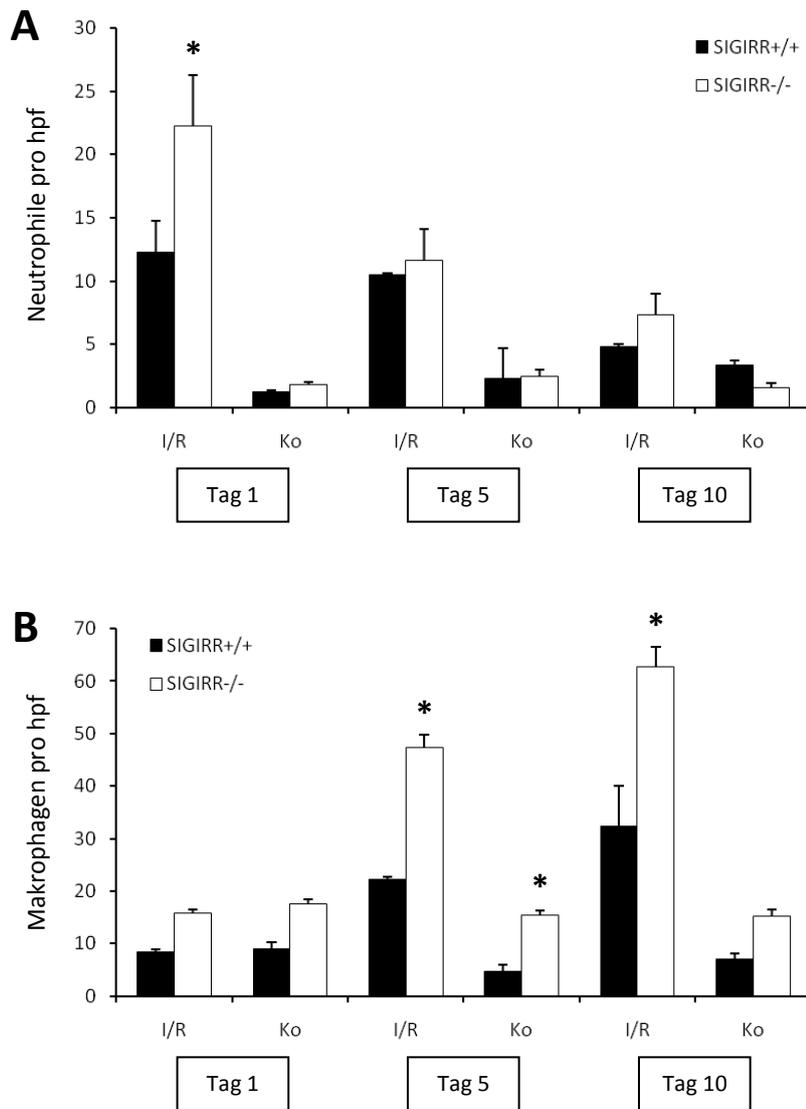


Abb. 28: Leukozytenrekutierung nach renaler I/R

SIGIRR-Defizienz ist mit einer höheren postischämischen Leukozyteninfiltration assoziiert. **A** Am ersten Tag nach Ischämie/Reperfusion ist die Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten bei homozygot defizienten Mäusen signifikant höher als im Wildtyp. **B** Im Verlauf von zehn Tagen nach Ischämie/Reperfusion steigt die Anzahl interstitieller Makrophagen bei SIGIRR^{-/-}-Mäusen signifikant über das Niveau der interstitiellen Makrophageninfiltration im SIGIRR^{+/+}-Wildtyp. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus jeweils 10 Gesichtsfeldern pro Organ ± SEM. * = p < 0,05 vs. Wildtyp; hpf = *high power field*.

Die renale Reperfusion nach 45-minütiger Ischämie war auch mit einer erhöhten Zahl infiltrierender Makrophagen assoziiert (Abb. 28). Analog zur Neutrophilenzählung wurde in diesem Teilversuch das postischämisch-reperfundierte und das *sham*-behandelte renale Gewebe immunhistochemisch auf Makrophagen gefärbt. Die Auswertung geschah auf gleiche Art und Weise wie in der Auswertung der granulozytären Infiltration. Im zeitlichen Verlauf stieg die Anzahl der renalen

Makrophagen in den postischämischen beziehungsweise reperfundierten Organen kontinuierlich an. Im Einklang mit den Daten zur postischämischen Infiltration von neutrophilen Granulozyten, konnte auch hier die Gruppe der SIGIRR/TIR8-defizienten Mäuse einen bedeutsamen und damit statistisch signifikanten Unterschied verbuchen. Sowohl am fünften, als auch am zehnten Tag nach Ischämie/Reperfusion war die Anzahl der infiltrierenden Makrophagen im SIGIRR^{-/-}-Genotyp signifikant höher als im C57BL/6J-Wildtyp. Eine interessante Nebenbeobachtung dabei war, dass auch in den unbehandelten kontralateralen Kontrollnieren ein signifikanter Anstieg der Makrophagen in der SIGIRR/TIR8-defizienten Gruppe zu verzeichnen war. Allerdings war dieses Phänomen lediglich am fünften Tag bei Zustand nach Ischämie/Reperfusion feststellbar.

Die zu Beginn der Untersuchung formulierte Hypothese, dass eine homozygote SIGIRR-Defizienz zu einer gesteigerten postischämischen Infiltration durch Zellen der angeborenen Immunität führt, fand sich durch die vorliegenden Daten bestätigt. Die sterile Entzündung, die sich vor allem nach Restauration des renalen Blutflusses einstellt, war in diesem Fall bei der genetisch gesunden Wildtyppopulation deutlich milder und schwächer im Umfang. Die in dieser Gruppe intakte Regulation der postischämischen Immunantwort durch SIGIRR/TIR8 war deutlich dazu in der Lage, eine inadäquate und überschießende Entzündungsreaktion im reperfundierten Nierengewebe zu unterdrücken.

4.1.5. Transendotheliale Leukozytenmigration bei Reperfusion

Die erhöhte Zellzahl der infiltrierenden Leukozyten in der Gruppe der SIGIRR/TIR8-defizienten Gruppe ist durch eine gesteigerte Diapedeseaktivität dieser Leukozyten am aktivierten Endothel zu erklären. Das könnte zum einen auch die gesteigerte mRNA-Expression der proentzündlichen Mediatoren MCP-1 und MIP2 erklären, zum anderen eine mögliche Ursache für eine erhöhte transendotheliale Migration sein. Um dieses Hypothese zu überprüfen, wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Krombach und Herrn Dr. Khandoga MD vom Walter Brendel Institut für Experimentelle Medizin ein *in vivo*-Versuch durchgeführt, bei dem in Echtzeit mittels Intravitalmikroskopie das transendotheliale Migrationsverhalten der Leukozyten nach Ischämie/Reperfusion analysiert wurde. An dieser Stelle sei für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit herzlich gedankt.

Bekanntermaßen führt die akute ischämische Nierenschädigung neben der Aktivierung des angeborenen Immunsystems auch zu einer Aktivierung der intrarenalen Endothelzellen. Die Summe dieser Vorgänge, die während der renalen Ischämie beginnen und durch die Reperfusion beschleunigt und intensiviert werden, führt zum Bild der sterilen Entzündung. Neben dem

postischämischen Gewebeschaden und der Infiltration durch Zellen der angeborenen Immunität, lassen sich oft auch weitere Phänomene beobachten. Die postischämische Niere zeigt histopathologisch oft auch ein interstitielles Ödem, was als Hinweis für eine gesteigerte Membranpermeabilität gedeutet werden kann. Diese Annahme deckt sich mit der Tatsache, dass ja auch bei Reperfusion das renale Gewebe von Leukozyten infiltriert wird. Im mikrovaskulären Bereich des renalen Gefäßsystems findet eine komplizierte Interaktion von aktivierten Endothelzellen und den herbei eilenden Leukozyten statt. Bereits innerhalb einer Stunde nach Ischämie/Reperfusion steigt die Expression von ICAM-1, einem Adhäsionsmolekül aus der Familie der Integrine, sowie einige weitere Oberflächenmerkmale, die für eine leukozytäre Adhäsion benötigt werden [30, 143, 147].

Tabelle 9: Hämodynamik aus dem M. cremaster-Modell in der Intravitalmikroskopie

	<i>SIGIRR^{+/+}-Sham</i> (n = 6)	<i>SIGIRR^{+/+}-IR</i> (n = 6)	<i>SIGIRR^{-/-}-Sham</i> (n = 2)	<i>SIGIRR^{-/-}-IR</i> (n = 6)
Gefäßdurchmesser [μm]	25,50 \pm 0,70	27,40 \pm 1,40	24,80 \pm 1,10	24,80 \pm 0,90
Fließgeschwindigkeit des zentralen Blutstroms [$\mu\text{m/s}$]	1,80 \pm 0,03	1,84 \pm 0,04	1,85 \pm 0,02	1,81 \pm 0,02
Leukozytenanzahl [10^6 Zellen/m]	4,80 \pm 0,80	4,00 \pm 0,50	3,80 \pm 0,30	5,50 \pm 0,50
Gefäßwand-Scherkraft [s^{-1}]	570 \pm 20	551 \pm 33	602 \pm 21	590 \pm 16

Bei jedem Individuum der Gruppen und jeweiligen Untergruppen wurde routinemäßig eine Erhebung der hämodynamischen Ausgangssituation in Ruhe, also vor der Klemmung der Arterie, gemessen. Dabei zeigten sich keine auffälligen oder signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen.

In diesem Experiment wurde die transendotheliale Leukozytenmigration *in vivo* entlang der postkapillären Venulen durch die von Herrn Prof. Krombach etablierte Intravitalmikroskopie quantifiziert. Ziel des Versuchs war es, den Unterschied in der leukozytären Diapedeseaktivität zwischen den SIGIRR/TIR8-defizienten Versuchstieren und der C56BL/6J-Wildtypkontrolle im postischämischen, reperfundierten Gewebe zu erfassen. Die intravitalmikroskopische Analyse durch RLOT-Technik (engl. *reflected light oblique translumination*) wurde dabei am freipräparierten M. cremaster des lebenden Versuchstiers durchgeführt. Unmittelbar vor Klemmung der versorgenden Arterie wurde eine Basalmessung durchgeführt. Im Anschluss daran wurde eine 45 minütige totale Ischämie induziert. Die zweite Messung erfolgte dann genau 30 Minuten nach Beginn der Reperfusion und die dritte Messung nach genau 120 Minuten. Die beiden untersuchten Versuchsgruppen SIGIRR^{-/-} und SIGIRR^{+/+} wurden jeweils in 2 Untergruppen zu je 6 Individuen

aufgeteilt: eine unbehandelte *sham*-Gruppe und eine operierte Gruppe, in der die Ischämie induziert wurde. Es wurde bei jedem Individuum eine standardisierte Erhebung der Parameter Gefäßdurchmesser, Fließgeschwindigkeit des zentralen Blutstroms und die Scherkraft der Gefäßwand. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Versuchsgruppen (Tabelle 9). Es zeigte sich, dass Ischämie/Reperfusion die leukozytäre Diapedese entlang der hochkapillären Venulen im Vergleich zur *sham*-Kontrolle signifikant zu den Zeitpunkten 30 Minuten und 120 Minuten nach Beginn der Reperfusion ansteigen ließ (vgl. Abb. 29 u. 30). Die homozygote SIGIRR/TIR8-Defizienz war dabei signifikant mit der größten transendothelialen Migrationsaktivität assoziiert. In maximaler Übereinstimmung mit der Annahme, dass es im SIGIRR^{-/-}-Genotyp zu einer ungehemmten Diapedese kommt, wurden in dieser Gruppe die meisten Leukozyten sowohl 30 Minuten als auch 120 Minuten nach Ischämie/Reperfusion gezählt (Abb. 30).

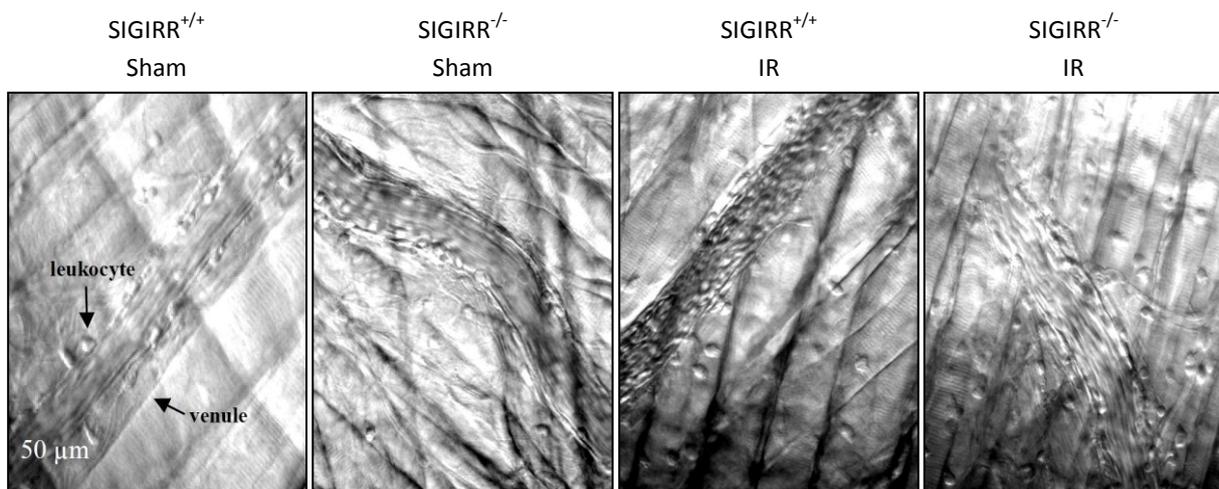


Abb. 29: In vivo-Mikroskopie aus dem Cremaster-Ischämie-/Reperfusionsmodell

Im Bereich der postkapillären Venulen treten Leukozyten in der Reperfusion nach Ischämie in das postischämische Gewebe über. Diese rollen entlang des aktivierten Endothels. Die Abbildungen zeigen repräsentative Beispiele für das unterschiedliche postischämische Verhalten der beiden Versuchsgruppen nach Ischämie/Reperfusion. Bei der Darstellung handelt es sich um das typische Bild der RLOT-Technik (engl. *reflected light oblique transillumination*), wobei am hauchdünnen, freipräparierten M. cremaster der Maus *in vivo* die Phänomene der postischämischen Leukozytentransmigration beobachtet wurden, sowohl in unbehandelten Wildtyp-, beziehungsweise SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäusen (*sham*-Gruppe), als auch in den jeweiligen IR-Gruppen der beiden untersuchten Genotypen. Vergrößerung 20 x.

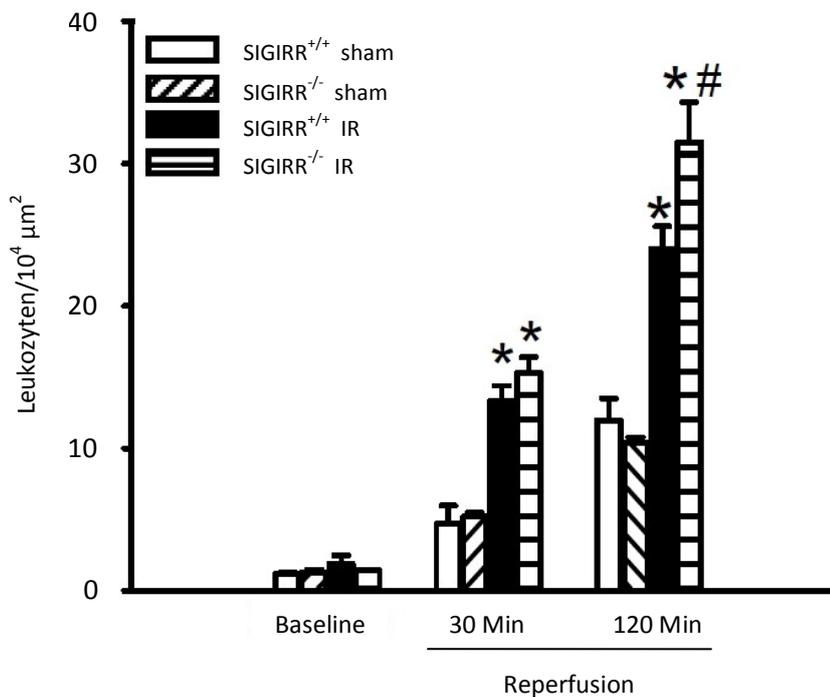


Abb. 30: Postischämische Leukozytentransmigration

Diese Abbildung zeigt die verschieden hohe Anzahl transmigrierender Leukozyten in der Reperfusion nach einer 45 minütigen Ischämie des M. cremaster. Zu beiden untersuchten Zeitpunkten nach IR zeigten SIGIRR/TIR8^{-/-}-Mäuse eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Anzahl diapedetischer Leukozyten, die im Bereich des hochepithelialen Endothels in das reperfundierte muskuläre Gewebe infiltrierten. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel ± SEM aus n = 6 in jeder der vier Gruppen. * = p < 0,05 vs. sham-Gruppe, # = p < 0,05 vs. IR-Wildtyp.

Um genauere Aussagen über die Klasse der infiltrierenden Leukozyten des *in vivo*-Cremaster - Ischämie-Versuchs zu treffen, wurde Analog zum Modell der renalen Ischämie hier eine immunhistochemische Analyse der infiltrierenden Zellen durchgeführt (Abb. 31). Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob es sich wie im renalen Ischämiemodell auch bei der M. cremaster-Ischämie um neutrophile Granulozyten handelt, die durch das aktivierte Endothel aus dem intravasalen Kompartiment in das Interstitium des Muskels treten. Die hierbei untersuchten Proben aller untersuchten Gruppen stammten vom Zeitpunkt 120 Minuten nach Ischämie/Reperfusion. Es wurde immunhistochemisch das Ly6G-Antigen dargestellt, das ein spezifisches Mausentigen auf murinen neutrophilen Granulozyten ist [148].

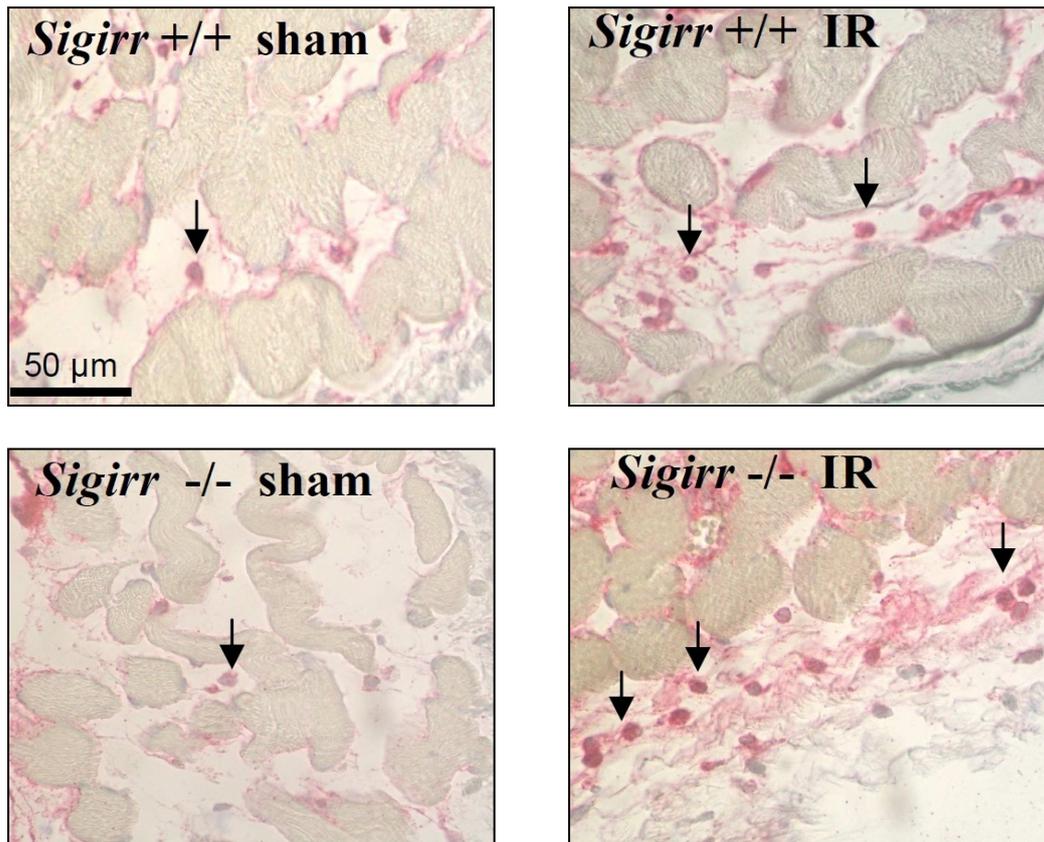


Abb. 31: Neutrophile Granulozyten sind der dominierende Zelltyp der postschämischen Leukozyteninfiltration der frühen Phase. Die Abbildung zeigt repräsentative histologische Schnitte des unbehandelten oder reperfundierten M. cremaster-Gewebes der sham- beziehungsweise der I/R-Gruppe, hier zum Zeitpunkt 120 Minuten nach Ischämie, welches mit dem neutrophilentypischen Marker Ly6G angefärbt wurde. Die interstitiell gelegenen Ly6G⁺ Zellen beziehungsweise neutrophilen Granulozyten (↓) waren auch hier, in Übereinstimmung mit zuvor erhobenen Daten bei der postschämischen SIGIRR/TIR8-defizienten Population, signifikant am zahlreichsten. Lichtmikroskopie, Vergrößerung 400 x.

Die Ly6G-gefärbten Proben wurden daraufhin mit einem CD45-Antikörper gegengefärbt. CD45 gilt als universelles Leukozytenantigen [149]. Die so gefärbten Schnitte des M. cremaster beider Versuchsgruppen wurden dann bei 400-facher Vergrößerung lichtmikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich in der Auswertung, dass in Übereinstimmung mit dem renalen Ischämie/Reperfusionmodell auch im M. cremaster-Modell die frühe postschämische Infiltration durch neutrophile Granulozyten bestimmt wird. Circa 80 – 90 % aller interstitiellen CD45-positiven Zellen waren positiv für das Ly6G-Antigen.

Zusammenfassend konnte durch die intravitalmikroskopische Analyse des reperfundierten M. cremaster die Annahme bestätigt werden, dass:

- Zum einen eine homozygote SIGIRR-Defizienz zu einer erhöhten leukozytären Migration am postischämisch-aktivierten Endothel führt,
- zum anderen, analog zum renalen Ischämie-/Reperfusionmodell, auch im Cremastermodell die neutrophilen Granulozyten in der frühen entzündlichen Infiltration des Interstitiums dominieren.
- SIGIRR/TIR8 im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschaden aktiv an der Inhibition der postischämischen Leukozyteninfiltration in das reperfundierte Gewebe beteiligt ist und die Anzahl rekrutierter Leukozyten mindert.

4.2. Effekte von Ischämie und Reperfusion *in vitro*

Die Beobachtungen aus den vorangegangenen Studien *in vivo* zeigen, wie das Verhalten des angeborenen Immunsystems bei renaler Ischämie/Reperfusion zu den entsprechenden Konsequenzen führt. Mit Beginn der totalen Ischämie wird eine immunologische Kettenreaktion losgetreten, die dann erst recht bei einsetzender Reperfusion stark an Umfang und Intensität gewinnt. Im Vordergrund stehen hier morphologische Veränderungen des postischämischen Gewebes und eine lokale sterile Entzündung. Die Summe dieser Vorgänge ist dafür verantwortlich, dass es zum ischämischen akuten Nierenversagen kommt. Im gesunden Organismus existiert jedoch eine wirksame Schutzinstanz, die in der Akutphase der Ischämie/Reperfusion in der Lage ist, die Immunantwort effektiv abzufangen und eine inadäquat starke lokale Entzündung des ischämischen/reperfundierten Gewebes verhindert. SIGIRR/TIR8 ist hierbei maßgeblich beteiligt.

Durch die Erkenntnisse aus den *in vivo* Versuchen erklärt sich aber noch nicht ausreichend, in welchen Zellen der Niere, die SIGIRR/TIR8-Inhibition am stärksten, beziehungsweise effektivsten greift. Zu diesem Zweck wurden *in vitro* –Versuche an primären renalen Tubulusepithelzellen und primären renalen Antigen-präsentierenden Zellen durchgeführt. Es war zunächst wichtig, eine Methode zu etablieren, die die Ischämie und die anschließende Reperfusion *in vitro* gut simuliert. Daher wurde zu Beginn der *in vitro*-Versuchsreihe Experimente an Tubulusepithelzellen der mTEC-Zelllinie durchgeführt, mit dem Ziel eine optimale Versuchsanordnung für eine simulierte Ischämie/Reperfusion zu etablieren.

4.2.1. Etablierung eines *in vitro*-Ischämie/Reperfusionmodells

Die physiologischen und pathophysiologischen Prozesse, die sich in einem ischämischen Gewebe abspielen, sind äußerst vielfältig und komplex. Kommt es nach der Ischämie zur Reperfusion, so stellt diese den zweiten Teil einer ischämischen Erkrankung dar. Die physiologischen und pathophysiologischen Prozesse, die dabei geschehen, sind in ihrer Vielfalt und Komplexität nicht geringer als die der Ischämie (vgl. 1.4.). Eine Fülle von Methoden, die von chemisch induzierter Hypoxie, bis hin zur Immersion in Silikonöl reicht, sind bekannt und wurden auch mehrmals im Bereich der Ischämieforschung eingesetzt [133]. Für die vorliegende Arbeit wurde eine Methode gewählt, die auf der Schaffung eines ischämisch-hypoxischen extrazellulären Milieus beruht (vgl. 3.2.2.6)

Wie im Methodenteil beschrieben, kann mittels der Hypoxiekammer und einer hundertprozentigen N₂-Atmosphären, nach Herstellerangaben, eine ausreichende Hypoxie erreicht werden. Um eine geeignete Grundeinstellung der vielen Parameter (Ischämiezeit, Reperfusionszeit, Zusammensetzung des Hungermediums, Hungerzeit etc.) für die Experimente mit isolierten renalen Zellen zu finden, wurde für diese Etablierungsexperimente mit der murinen Tubulusepithelzelllinie mTEC gearbeitet. Abbildung 32 zeigt dabei die Ergebnisse des ersten Experiments. Hier wurden die Zellen 12 Stunden vor Beginn der Hypoxie, angelehnt an die Empfehlungen von *Russ et al.*, in einem Hungermedium inkubiert [133]. Dabei handelte es sich um das normale DMEM-Medium, das jedoch kein fetales Kälberserum mehr enthielt. Nach Ablauf der 12 Stunden Hungerzeit wurden die Zellen für 6 Stunden in der Hypoxiekammer bei 100 % N₂-Atmosphäre inkubiert. Die Kontrollgruppe wurde im normalen Brutschrank, ohne Hypoxie, inkubiert. Dabei wurde ein Teil der sowohl hypoxischen als auch der normoxischen Proben unmittelbar vor Induktion der Hypoxie als Positivkontrolle mit LPS stimuliert. Die Konzentration dabei betrug 1 µg/ml im Hungermedium. Nach Ablauf der 6 Stunden Hypoxie, beziehungsweise Normoxie, wurde das Kulturmedium asserviert. Die Reperfusion erfolgte mit dem gewöhnlichen Kulturmedium unter normoxischen Kulturbedingungen. Dabei enthielt das Reperfusionsmedium 10 % FCS. 24 Stunden nach Beginn der simulierten Reperfusion wurden die Proben aus dem Reperfusionskulturmedium zur Analyse entnommen. Als Marker für eine Induktion proentzündlicher Mediatoren wurde das Chemokin CCL5, oder auch RANTES genannt, genommen und seine Konzentration mittels ELISA gemessen.

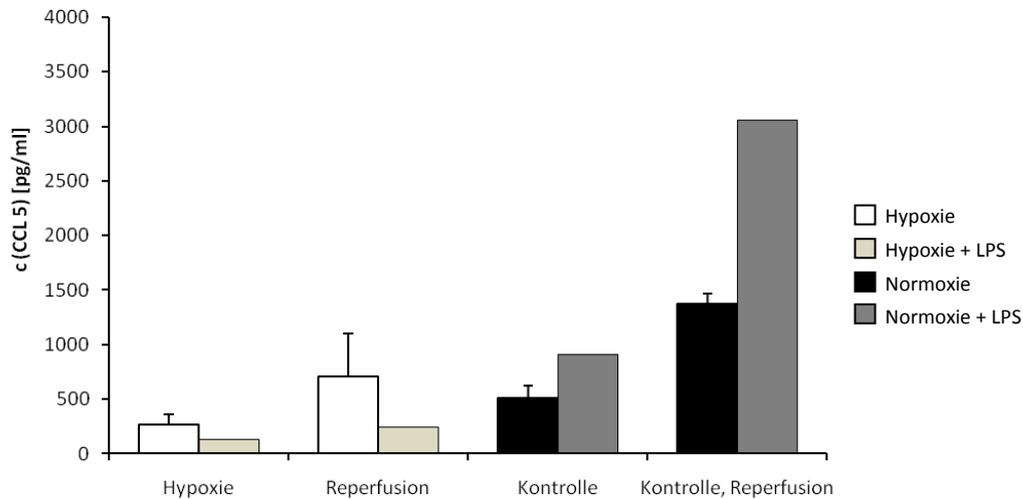


Abb. 32: 1. Versuchsreihe zur Etablierung eines Ischämie-Reperfuisionsmodells in vitro

Dargestellt sind die Ergebnisse eines der ersten Experimente mit der murinen Tubulsepithelzelllinie. Sowohl die Hypoxie- (weiße Balken) als auch die Kontrollgruppe (schwarze Balken) wurden bei 0 % FCS 12 Stunden lang präkonditioniert (Starving), ehe die 6 stündige Hypoxie bzw. Normoxie induziert wurde. In jeder Gruppe wurde zusätzlich eine LPS-Positivkontrolle ($c = 1\mu\text{g/ml}$) durchgeführt (graue Balken). Es folgte die erste Probenasservation aus dem Hungermedium. Die Reperfusion wurde durch Zugabe von frischem Kulturmedium (10 % FCS) nach entweder 6 Stunden Hypoxie oder 6 Stunden Normoxie simuliert. Nach 24 Stunden simulierter Reperfusion unter nomoxischen Bedingungen, wurden die Proben für die ELISA-Analyse aus dem Kulturmedium gewonnen.

Es zeigte sich dabei kein deutlicher Unterschied zwischen der Hypoxie- und der Kontrollgruppe, was die Produktion von CCL5 angeht. Die Präkonditionierung im Serum freien Kulturmedium hatte bei der Kontrollgruppe zu einer leichten Induktion von CCL5 geführt, die ähnlich ausgeprägt bei der Hypoxiegruppe war. Also hatte die 6 stündige Hypoxie zu keiner erhöhten Induktion von CCL5 geführt. 24 Stunden nach Reperfusion war die Induktion des Chemokins CCL5 in beiden Gruppen wieder ähnlich hoch. Es wäre wohl hier ein leichter Unterschied zu Gunsten der Hypoxie-Gruppe zu erwarten gewesen. Interessanterweise fanden sich etliche vom Boden der Petrischale losgelösten Zellen, die in makroskopisch sichtbaren Platten an der Oberfläche trieben, was hier als Zeichen von Zelltod gedeutet wurde. Bei der LPS-Positivkontrolle der Hypoxiegruppe zeigte sich ebenfalls kein Effekt der zusätzlichen LPS-Stimulation auf die Sekretion des Chemokins CCL5. Anders hingegen bei der Normoxiegruppe. Hier verhielt sich zu beiden gemessenen Zeitpunkten die Positivkontrolle wie erwartet. Hier lag die Produktion des proentzündlichen Chemokins CCL5 jeweils ca. doppelt so hoch, wie in der mit LPS unstimulierten Kontrolle.

Daraus ließ sich folgendes Ableiten: offenbar war die 12-stündige Karrenz im Hungermedium zusammen mit der 6-stündigen Hypoxie ein zu starker Reiz, der wohl zur ausgeprägten Apoptoseinduktion geführt hatte. Auch konnte die zusätzliche Stimulation mit LPS zu keiner wesentlichen Induktion des Chemokins CCL5 beitragen. Allerdings scheint eine Präkonditionierung im Serum-freien Kulturmedium, mit anschließender Restauration der normalen Versorgungslage mit frischen Nährstoffen (Reperfusion), bereits ein starker Stimulus für die Induktion des Chemokins CCL5 zu sein. Dieser Effekt ließ sich unter weiterer Stimulation mit LPS steigern.

Basierend auf den Erkenntnissen des ersten Versuchs, wurden folgende Parameter beim zweiten Experiment modifiziert: Die Hungerzeit zur Präkonditionierung wurde von 12 auf 3 Stunden reduziert. Auch die Hypoxiedauer wurde reduziert, von 6 auf 3 Stunden. Der Anteil des fetalen Kälberserums wurde im Hungermedium nicht völlig eliminiert. In diesem zweiten Versuch wurde ein geringer Anteil von 0,5 % FCS belassen. Es sollte verhindert werden, dass zu viele Zellen der murinen Tubulusepithelzelllinie durch eine Präkonditionierung bei 0 % FCS und die anschließende Hypoxie zu Grunde gehen. Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse dieses zweiten Experiments. Insgesamt viel die Induktion von CCL5 stärker aus als im vorhergehenden Experiment. Gerade in der Hypoxiegruppe war ein deutlicher Anstieg der CCL5-Freisetzung zu verzeichnen, der rund vier Mal so hoch wie im ersten Versuch war. Auch war die Positivkontrolle (zusätzliche LPS-Stimulation) in diesem Versuch erfolgreich. Der Kombinierte Stimulus aus Hypoxie und dem TLR4-Liganden führte zu einer deutlich gesteigerten CCL5-Induktion, im Vergleich zur alleinigen Hypoxie. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits durch *Jantsch et al.* gemacht und beschrieben [99]. Ebenfalls in der Kontrollgruppe kam es zu einer erhöhten Konzentration von CCL5 im Kulturmedium, was auf eine gesteigerte CCL5-Sekretion zurückzuführen ist. Dies ließ sich sowohl nach dem Hungern im Hungermedium, als auch 24 Stunden nach Reperfusion nachweisen. Da diesmal die Induktion stärker als im ersten Experiment ausfiel, wäre eine möglich Erklärung dafür, dass die kürzere Karrenzzeit in Kombination mit dem nicht völlig Serum-freien Hungermedium die günstigere Konstellation für den *in vitro* Versuch darstellt (s. Abb. 32).

Zusammenfassend konnte durch die hier beschriebenen Befunde ein gute Basis für weitere Ischämie-/Reperfusionstudien *in vitro* gefunden werden. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde als nächstes das Verhalten primärer, also isolierter Nierenzellen durch simulierte Ischämie und Reperfusion *in vitro* analysiert.

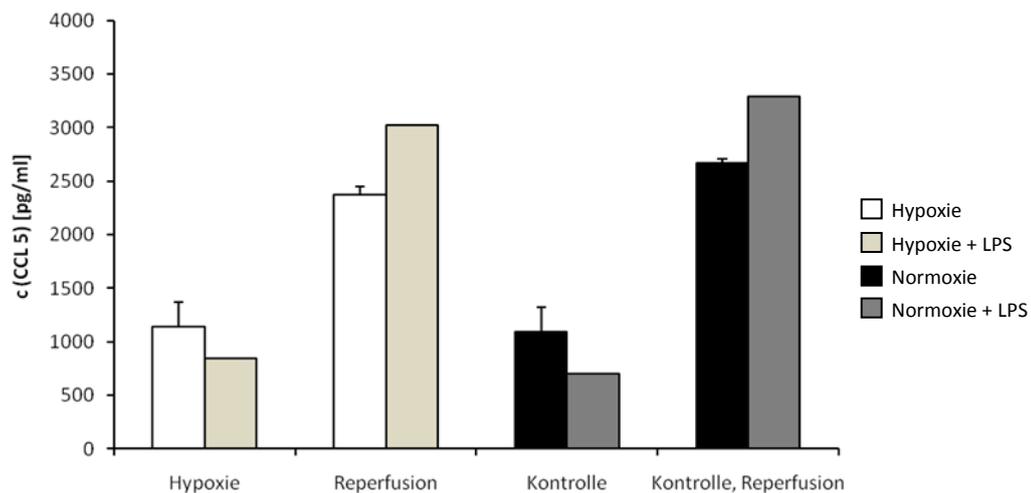


Abb. 32: 2. Versuchsreihe zur Etablierung eines Ischämie-Reperfuionsmodells in vitro

Dargestellt sind die Ergebnisse des zweiten Experiments mit der murinen Tubulusepithelzelllinie. Die Hypoxie- (weiße Balken) als auch die Kontrollgruppe (schwarze Balken) wurden diesmal bei 0,5 % FCS drei Stunden lang präkonditioniert (Starving), ehe die ebenfalls drei stündige Hypoxie bzw. Normoxie induziert wurde. In jeder Gruppe wurde erneut eine LPS-Positivkontrolle ($c = 1 \mu\text{g/ml}$) durchgeführt (graue Balken). Die Reperfusion wurde durch Zugabe von frischem Kulturmedium (10 % FCS) nach entweder drei Stunden Hypoxie oder drei Stunden Normoxie simuliert. Die Probenentnahme für die 2. Messung erfolgte 24 Stunden nach Beginn der simulierten Reperfusion.

4.2.2. Postischämische Zyto- und Chemokinfreisetzung in renalen Zellen

Die Tatsache, dass das akute ischämische Nierenversagen vor allem durch das aktivierte Immunsystem verursacht wird, ist ausreichend belegt [3, 34, 39, 150, 151]. Dabei scheint das intrarenal gelegene interdigitierende Netzwerk residenter Antigen-präsentierender Zellen (bzw. dendritischer Zellen) eine herausragende Rolle zu spielen [40, 60, 101, 124]. Es gilt aber auch als gesichert, dass eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems ebenfalls durch andere Zellarten innerhalb der Niere stattfindet. Allen voran kann das renale Tubulusepithel nach Ischämie/Reperfusion ebenfalls zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems beitragen. Dabei sind die renalen Tubulusepithelzellen dazu in der Lage, Zyto- und Chemokine wie MCP-1, MIP2, IL-1 β , IL-6 oder IP-10 freizusetzen und so auch zur Alarmierung des angeborenen Immunsystems beizutragen [66, 67, 152].

Daher war das Ziel der folgenden Versuche zum einen festzustellen, welche der beiden renalen Zellarten in der Freisetzung von proentzündlichen Mediatoren dominiert. Zum anderen sollte gezeigt werden, bei welchen Zellen SIGIRR/TIR8 die Freisetzung dieser proentzündlichen Zyto- und

Chemokine reguliert, beziehungsweise hemmt. Es ist bekannt, dass SIGIRR/TIR8 auf Grund einer etwas anders gearteten posttranslationalen Modifikation in den renalen Tubulusepithelzellen nicht hemmend auf die Produktion und Freisetzung lokaler Entzündungsmediatoren wirkt [124]. Diese Tatsache wurde aber bislang lediglich unter der Annahme einer intrarenalen Infektion überprüft und basiert auf der alleinigen Stimulation der Tubulusepithelzellen mit dem TLR4-Liganden LPS. Dabei zeigte sich, dass renale Tubulusepithelzellen deutlich auf diesen Bestandteil der bakteriellen Zellwand gramnegativer Organismen reagieren [124]. In der folgenden Untersuchung stand aber das Verhalten der isolierten Tubulusepithelzellen und der isolierten CD11b⁺ dendritischen Zellen bei Ischämie/Reperfusion im Vordergrund. Basierend auf der eigenen Beobachtung aus den zuvor beschriebenen Etablierungsexperimenten und der Tatsache, dass die Hypoxie *in vitro* als alleiniger Stimulus nicht ausreicht, um die Zellen in hohem Maß zu aktivieren, wurde ein zweiter Reiz für die Aktivierung der hypoxischen Zellen gesetzt [99]. Jede Gruppe wurde zusätzlich mit LPS in einer Konzentration von 1 µg/ml stimuliert, nachdem eine jeweils dreistündige Präkonditionierung der renalen Tubulusepithelzellen und der dendritischen Zellen in einem extrem nährstoffarmen Kulturmedium stattgefunden hatte, nämlich bei 0,5 % FCS. Die sich sofort anschließende totale Hypoxie bei einer 100 %-igen N₂-Atmosphäre in der Hypoxiekammer dauerte insgesamt jeweils drei Stunden pro Versuchsgruppe. Sofort im Anschluss daran wurden die ersten Kulturmediumproben aus dem Überstand gewonnen und für die spätere ELISA-Messung eingefroren. Die Reperfusion wurde durch die unverzügliche Zugabe von frischem Kulturmedium, nach Probenentnahme, simuliert. Die Versuchszellen wurden dann für genau 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion unter den gewohnten normoxischen Bedingungen inkubiert. Nach Ablauf der 24 Stunden wurde die nächste Probenentnahme für die zweite Messung durchgeführt.

Es zeigte sich bei diesem Versuch deutlich, dass die größte Induktion von proentzündlichen Mediatoren in den renalen CD11b⁺ dendritischen Zellen ausging, während die isolierten renalen Tubulusepithelzellen kaum oder nur wenig auf die kombinierte LPS-Stimulation mit *in vitro*-Ischämie/Reperfusion reagierten (Abb. 33). Desweiteren wurde, in Übereinstimmung mit den zuvor erhobenen Ergebnissen, erneut demonstriert, dass eine fehlende Inhibition durch SIGIRR/TIR8 zu einer starken Freisetzung proentzündlicher Moleküle führt. Für die drei untersuchten Zyt- und Chemokine IL-6, MIP2 und MCP-1 ergab sich zum Zeitpunkt 24h nach Ischämie/Reperfusion der größte Unterschied zwischen SIGIRR-defizienten und Wildtyp CD11b⁺ renalen APC. Es zeigte sich bei dem Zytokin IL-6 und dem Chemokin MIP2 dabei die größte Differenz zwischen den isolierten CD11b⁺- Zellen beider Versuchsgruppen. Die kombinierte LPS-/I/R-Stimulation ergab eine gut 8-fach höhere Induktion der beiden proentzündlichen Mediatoren bei der homozygot SIGIRR/TIR8-defizienten Zellkultur der

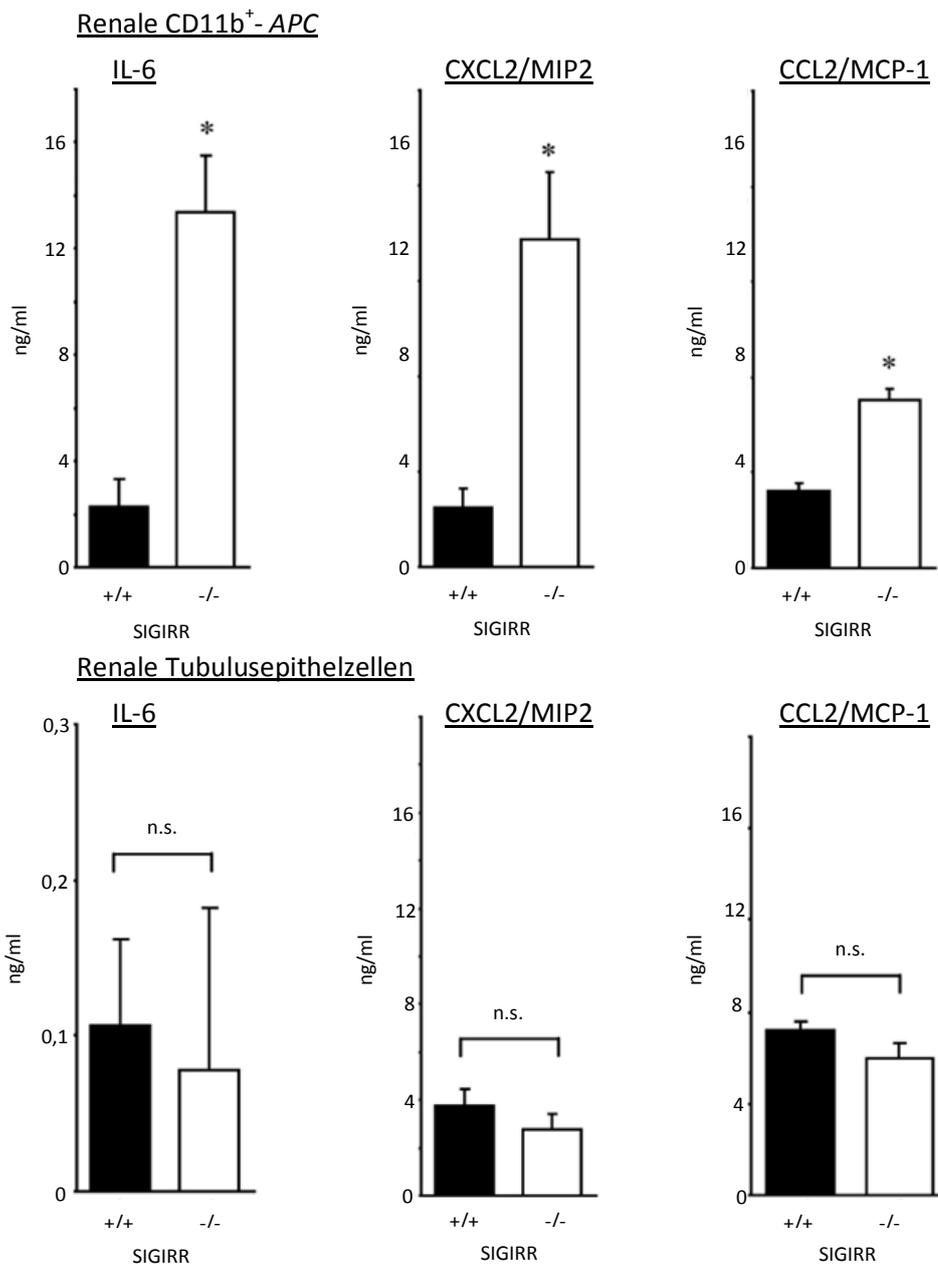


Abb. 33: In vitro-Studie mit primären renalen CD11b⁺-Zellen und Tubulusepithelzellen

Die isolierten primären Tubulusepithelzellen (SIGIRR^{+/+} bzw. SIGIRR^{-/-}), sowie die renalen CD11b⁺ APC (ebenfalls SIGIRR^{+/+} bzw. SIGIRR^{-/-}) wurden unter LPS-Stimulation und Zellkulturbedingungen bei einer 100 %-igen N₂-Atmosphäre einer dreistündigen Hypoxie in der Hypoxiekammer zugeführt, nachdem sie eine dreistündige Hungerzeit durchlaufen hatten. Die Kulturmedien wurden asserviert und mittels ELISA auf Induktion proentzündlicher Mediatoren (IL-6, MIP2, MCP-1) untersucht. Die Daten zeigen die durchschnittlichen Ergebnisse von fünf unabhängigen Isolationen ± SEM. Jede einzelne Probe wurde als Duplikat im ELISA-Test gemessen. * = p < 0,05 vs. SIGIRR^{+/+}-Wildtyp; n.s. = nicht signifikant.

CD11b⁺ dendritischen Zellen als bei der Wildtyp-Kontrolle und war dabei statistisch signifikant unter den angenommen Signifikanzniveau von p < 0,05. Die Induktion des Chemokins MCP-1 war weniger ausgeprägt, rund doppelt so hoch im Vergleich zu den isolierten Wildtyp CD11b⁺-Zellen, aber immer

noch signifikant ($p < 0,05$). Bei den isolierten primären Tubulusepithelzellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen SIGIRR/TIR8-defizienten Zellen und den isolierten Zellen aus den C56BL/6J-Wildtypmäusen festgestellt werden. Zwar führte die LPS-Stimulation zu einer leichten Induktion proentzündlicher Moleküle bei den hypoxischen Tubulusepithelzellen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle, aber lag die Serumkonzentration aller drei gemessenen proentzündlicher Mediatoren deutlich unter den Serumkonzentrationen der isolierten Antigen-präsentierenden Zellen unter hypoxischen Bedingungen. Diese Beobachtung deckt sich mit der oben genannten unterschiedlichen Wirkung von SIGIRR/TIR8 bei intrarenalen Zellen. In diesem Fall konnten auch die kombinierten Stimuli aus LPS und Ischämie/Reperfusion beziehungsweise Hypoxie und Reperfusion keinen Unterschied bezüglich der hemmenden SIGIRR/TIR8-Wirkung zwischen SIGIRR-defizienten und gesunden Wildtyp-Zellen erkennen lassen.

Zusammenfassend konnte aus diesem *in vitro*-Versuch abgeleitet werden, dass SIGIRR/TIR8 spezifisch in CD11b⁺ APC hemmende Wirkung besitzt. Die postischämische Zyto- und Chemokinfreisetzung aus primären CD11b⁺ dendritischen Zellen wird dabei deutlich und effektiv durch SIGIRR/TIR8 gehemmt. Eine *loss of function*-Mutation des SIGIRR/TIR8-Gens ist mit einer übertrieben starken Freisetzung proentzündlicher Mediatoren aus residenten Antigen-präsentierenden Zellen assoziiert. Primäre Tubulusepithelzellen zeigen im Rahmen der *in vitro*-Ischämie/Reperfusion eine nur geringe Induktion proentzündlicher Mediatoren. SIGIRR/TIR8 besitzt hierbei keine hemmende Funktion für die Freisetzung von IL-6, MCP-1 und MIP2.

4.2.3. SIGIRR-Defizienz in Antigen-präsentierenden Zellen bestimmt den Phänotyp nach Ischämie/Reperfusion

Wie aus den Ergebnissen der Ischämie/Reperfusionsstudie *in vitro* abgeleitet werden konnte, waren die intrarenalen CD11b-positiven Zellen hauptsächlich für die Manifestation des SIGIRR/TIR8-defizienten Phänotyps im Kontext einer verschlimmerten postischämischen Nierenschädigung verantwortlich. SIGIRR-Defizienz in isolierten Tubulusepithelzellen hatte keine Auswirkung auf die Freisetzung proentzündlicher Mediatoren im Vergleich zum gesunden Genotyp. Außerdem ist man auf Grund der eher geringen Konzentration in den Kulturen der isolierten Tubulusepithelzellen von einer eher untergeordneten Rolle der Tubulusepithelzellen bei der Freisetzung proentzündlicher Proteine beziehungsweise bei der Rekrutierung infiltrierender Leukozyten ausgegangen, wenn man sich im Vergleich dazu die deutlich höhere Zyto- und Chemokinfreisetzung aus den intrarenalen SIGIRR^{-/-} dendritischen Zellen anschaut. Anders formuliert war in unseren Augen die Summe der proentzündlichen Vorgänge nach

Ischämie/Reperfusion zum Großteil auf die ungehemmte Aktivität des intrarenalen Netzwerks Antigen-präsentierender Zellen zurückzuführen (hier stellvertretend an den CD11b-positiven Zellen untersucht).

Um diese Hypothese noch weiter zu untermauern wurde im Anschluss an die *in vitro*-Studie erneut ein Versuch am lebenden Tier durchgeführt. Bei diesem Experiment galt es zu zeigen, dass der postischämische Gewebeschaden vor allem durch die proentzündliche Aktivität des intrarenalen interdigitierenden Netzwerks Antigen-präsentierender Zellen hervorgerufen wird. Anders formuliert, dass residente Immunzellen, die homozygot SIGIRR-defizient sind, auch im gesunden SIGIRR/TIR8^{+/+}-Organismus den gleichen Phänotyp nach Ischämie/Reperfusion reproduzieren. Zu diesem Zweck wurde eine *in vivo*-Studie an chimären Versuchstieren durchgeführt. Mittels Transplantation von Spenderknochenmark aus SIGIRR^{-/-}-Mäusen in gesunde 8C57BL/6J-Empfänger (n = 6) konnten chimäre Mäuse generiert werden, deren renales Tubulusepithel den SIGIRR^{+/+}-Genotyp aufwies, während die Immunzellen auf Grund der Knochenmarktransplantation mit SIGIRR/TIR8-defizientem Spenderknochenmark den SIGIRR^{-/-}-Genotyp besaßen. Die SIGIRR^{+/+}-Kontrollgruppe bekam Knochenmark von ebenfalls SIGIRR^{+/+}-Spendertieren transplantiert.

Wie im Methodenteil beschrieben, wurden 6 Wochen alte SIGIRR/TIR8^{-/-}-Tiere und genetisch gesunde Wildtyp-Mäuse mit einer Gesamtdosis von 9 Gy bestrahlt. Durch diese relativ hohe Dosis wurde sichergestellt, dass das gesamte ursprüngliche Knochenmark letal geschädigt wurde. Es folgte die Transplantation entweder von SIGIRR^{-/-}-Knochenmark oder von SIGIRR^{+/+}-Knochenmark in den Wildtypempfänger durch i.v.-Injektion in die Schwanzvene. Den Versuchstieren wurde acht Wochen Zeit gelassen, in denen sich das Spenderknochenmark regenerieren konnte und stabil war. Mittels Durchflusszytometrie konnten > 95 % der Immunzellen aus der Milz als SIGIRR^{-/-}-Spenderzellen, respektive als SIGIRR^{+/+}-Spenderzellen identifiziert werden. Es folgte erneut die operative Induktion einer transienten unilateralen renalen Ischämie in beiden Versuchsgruppen. Die zum Zeitpunkt Tag 1 nach Ischämie/Reperfusion entnommenen Nieren wurden wieder mittels PAS-Färbung histopathologisch untersucht, um das Ausmaß des Ischämie/Reperfusionsschadens durch die zuvor beschriebene 5-Punkte-Klassifikation zu messen. Auch die bereits beschriebene und in anderen Experimenten durchgeführte immunhistochemische Ly6G-Färbung für die Zählung postischämisch infiltrierender neutrophiler Granulozyten wurde für diesen Versuch wiederholt.

Es zeigte sich dabei in Übereinstimmung mit zuvor erhobenen Daten, dass der histopathologische Ischämie/Reperfusionsschaden bei den Versuchstieren, in denen entweder das SIGIRR/TIR8-defiziente Knochenmark oder das genetisch gesunde Wildtyp-Knochenmark implantiert wurde genauso ausgeprägt war, wie beim *in vivo*-Versuch, der in 4.1.2. beschrieben steht. Zum Zeitpunkt 1 Tag nach I/R konnte auch hier der größte Schaden bei den transplantierten Mäusen mit SIGIRR^{-/-}-

defizienten Immunzellen im Vergleich zur SIGIRR^{+/+}-Kontrolle erhoben werden, ähnlich dem Experiment aus 4.1.2. (Abb. 34). Währenddessen konnte der Schadensphänotyp bei I/R in der gesunden SIGIRR^{+/+}-Kontrollgruppe ebenfalls reproduziert werden, verglichen mit der histopathologischen Analyse aus 4.1.2. Dabei fiel insgesamt der histopathologische Schaden in den chimären SIGIRR^{+/+} * ^{-/-}- Versuchstieren signifikant höher aus als bei der gesunden Kontrollgruppe. Auch bezüglich der postischämischen Infiltration neutrophiler Granulozyten zeigte sich zum Zeitpunkt Tag 1 nach Ischämie/Reperfusion ein ähnliches Bild (s. Abb. 35). Auch in diesem Teilversuch entsprach das Ausmaß der Neutrophileninfiltration den Erwartungen. Insgesamt fiel die durchschnittliche Zahl neutrophiler Granulozyten pro Gesichtsfeld in der chimären Versuchsgruppe höher aus, die SIGIRR/TIR8-defizientes Spenderknochenmark erhalten hatte. Der Unterschied war statistisch signifikant zur chimären SIGIRR^{+/+} * ^{+/+}-Kontrollgruppe. Bemerkenswerterweise konnte in der gesunden chimären Wildtypkontrollgruppe eine ähnliche Anzahl infiltrierter neutrophiler Granulozyten bestimmt werden, wie aus dem ersten Versuch aus 4.1.2.

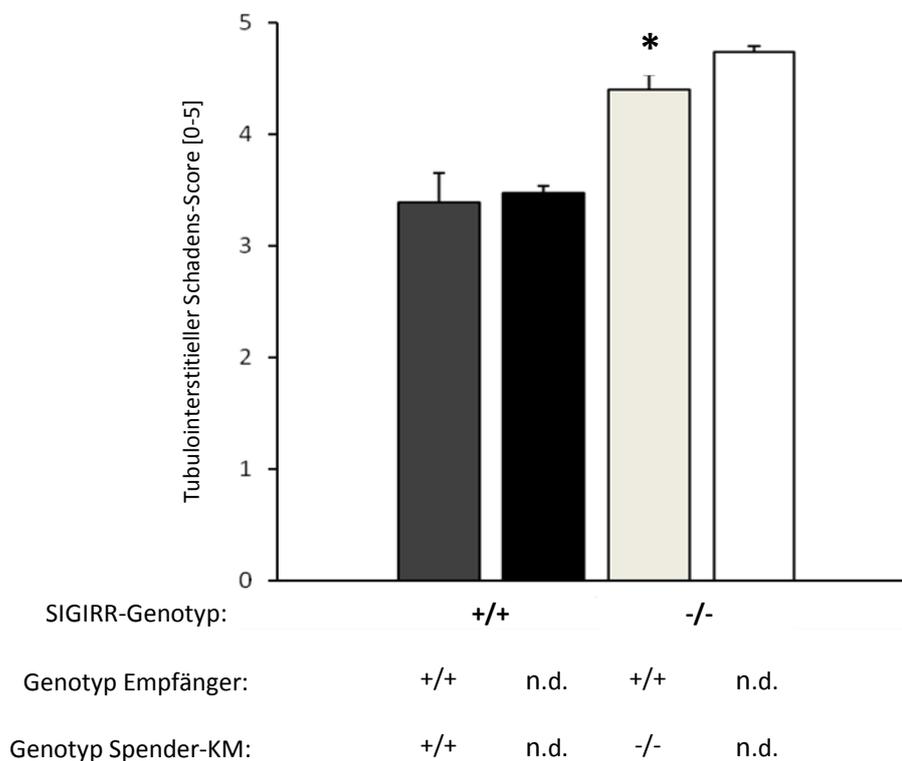


Abb. 34: Transplantierte SIGIRR-defiziente Immunzellen reproduzieren den morphologischen Schaden im Wildtyp. Die Abbildung zeigt eine semiquantitative Erhebung des tubulusinterstitiellen Schadens 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion von Knochenmarktransplantierten Wildtyp-Mäusen (n = 6 je Gruppe), die entweder SIGIRR^{-/-} oder gesundes SIGIRR^{+/+}-Spenderknochenmark erhalten hatten (dunkelgrauer bzw. hellgrauer Balken). Im Vergleich dazu die Daten aus dem Versuch aus 4.1.2. (schwarzer bzw. weißer Balken). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ± SEM; KM = Knochenmark; n.d. = nicht durchgeführt.

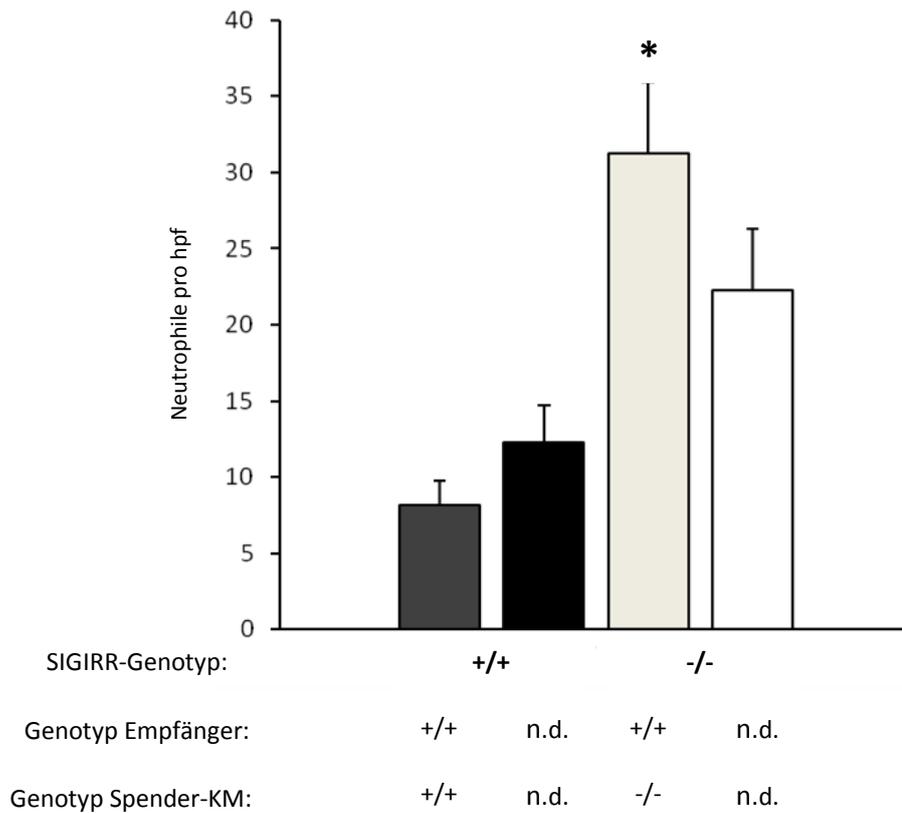


Abb. 35: Transplantierte SIGIRR-defiziente Immunzellen reproduzieren die postischämische Neutrophileninfiltration im Wildtyp. Die Abbildung zeigt, analog zu vorangegangenen Untersuchungen, die Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten 24 Stunden nach unilateraler I/R von Knochenmarktransplantierten Wildtyp- Mäusen (n = 6 je Gruppe), die entweder SIGIRR^{-/-}- oder gesundes SIGIRR^{+/+}-Spenderknochenmark erhalten hatten (dunkelgrauer bzw. hellgrauer Balken). Im Vergleich dazu die Daten aus dem Versuch aus 4.1.2. (schwarzer bzw. weißer Balken), bei dem ebenfalls eine Zählung der neutrophilen Granulozyten durchgeführt wurde. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte aus jeweils 10 Gesichtsfeldern pro Individuum ± SEM; hpf = *high power field*; KM = *Knochenmark*; n.d. = *nicht durchgeführt*.

Fasst man die Erkenntnisse aus diesem Experiment zusammen, so lässt sich feststellen, dass der renale Schaden bei Zustand nach Ischämie und Reperfusion vor allem durch das intrarenale residente Netzwerk von Immunzellen bestimmt wird. Auch in diesem Experiment konnte eine weitere Bestätigung für die These gefunden werden, dass SIGIRR/TIR8 spezifisch inhibierend in den residenten Immunzellen, also den residenten Antigen-präsentierenden Zellen, wirkt. Die Befunde sprechen weiter auch dafür, dass SIGIRR/TIR8 durch die spezifische Hemmung der Antigen-präsentierenden Zellen dazu in der Lage ist, die postischämische Aktivierung dieser residenten dendritischen Zellen zu hemmen. Dadurch trägt SIGIRR zur Prävention einer übertriebenen und daher schädlichen Immunantwort bei.

4.3. Depletion SIGIRR-defizienter dendritischer Zellen verhindert das postischämische akute Nierenversagen

In direktem Zusammenhang mit der Studie an Knochenmark-transplantierten chimären Mäusen, wurde für den folgenden Versuch eine andere Methode gewählt. Diese sollte ebenfalls beweisen, dass es die SIGIRR-defizienten Antigen-präsentierenden Immunzellen aus dem intrarenalen Netzwerk dendritischer Zellen sind, die für das akute ischämische Nierenversagen verantwortlich sind. Desweiteren, dass SIGIRR/TIR8 durch die spezifische Hemmung der proentzündlichen Aktivität dieser CD11b⁺-Zellen zur Prävention des akuten postischämischen Nierenversagens beiträgt.

Für diesen Versuch wurde eine Depletion der renalen CD11b-positiven Zellen der Niere mittels Clodronat durchgeführt. Clodronat (Dichlormethylenbisphosphonat, Cl₂MBP) ist ein Arzneimittel aus der Gruppe der stickstofffreien Bisphosphonate, welches zur medikamentösen Therapie der Osteoporose zugelassen ist. Dieser Wirkstoff hat neben der günstigen Osteoklasten-hemmenden Wirkung auch die Eigenschaft, von Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS), und damit von den intrarenalen CD11b-positiven APZ inkorporiert beziehungsweise phagozytiert zu werden. Durch Konjugation dieses Wirkstoffes an Liposomen wird das Konjugat von Makrophagen und Antigen-präsentierenden Zellen leichter phagozytiert. Auf Grund der intrazellulären Verdauung mittels lysosomaler Phospholipasen, kommt es dann zur Zerstörung der liposomalen doppelten Lipidmembran. Das so freigesetzte hydrophile Clodronat kann dann die Zelle nicht mehr verlassen und akkumuliert intrazellulär. Hat die Antigen-präsentierende Zelle erst ein Mal das Clodronat aufgenommen, baut sich dieses durch eine Aminoacyl-transfer-RNA-Transferase in ATP ein und wirkt letztlich so zytotoxisch [101, 129, 153]. Die Individuen der beiden Versuchsgruppen, ein Mal SIGIRR^{-/-} (n = 6) und der genetische gesunde Wildtyp (n = 6) wurden, wie im Methodenteil ausführlich dargestellt, zweimal mit jeweils 200 µl des liposomal konjugierten Clodronat intraperitoneal injiziert. Die erste Injektion wurde drei Tage, die zweite Injektion zwei Tage vor der operativ induzierten bilateralen Ischämie mit anschließender Reperfusion durchgeführt. Auch in diesem Experiment wurden die Aa. renales sinister et dexter für 45 Minuten abgeklemmt. Als Parameter für das akute ischämische Nierenversagen wurden hier die Serumkreatinin-Konzentrationen der jeweiligen Versuchsgruppen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion herangezogen und mit den Serumkreatinin-Konzentrationen der operierten Mäuse verglichen, die aus dem ersten Experiment zur Charakterisierung der renalen Funktionseinschränkung nach Ischämie/Reperfusion erhoben wurden (vgl. 4.1.2.).

Dabei zeigte sich zum einen, dass es 24 Stunden nach Ischämie Reperfusion keinen statistisch signifikanten Unterschied der Serumkreatinin-Konzentration zwischen den SIGIRR/TIR8-defizienten

Versuchstieren und den gesunden Wildtypkontrollen gab, die zuvor mit Clodronat behandelt wurden. Durch das Clodronat war mit einer deutlich reduzierten Zahl von Makrophagen und renalen Antigen-präsentierenden Zellen zu rechnen, als die Tiere operiert wurden (Abb. 36).

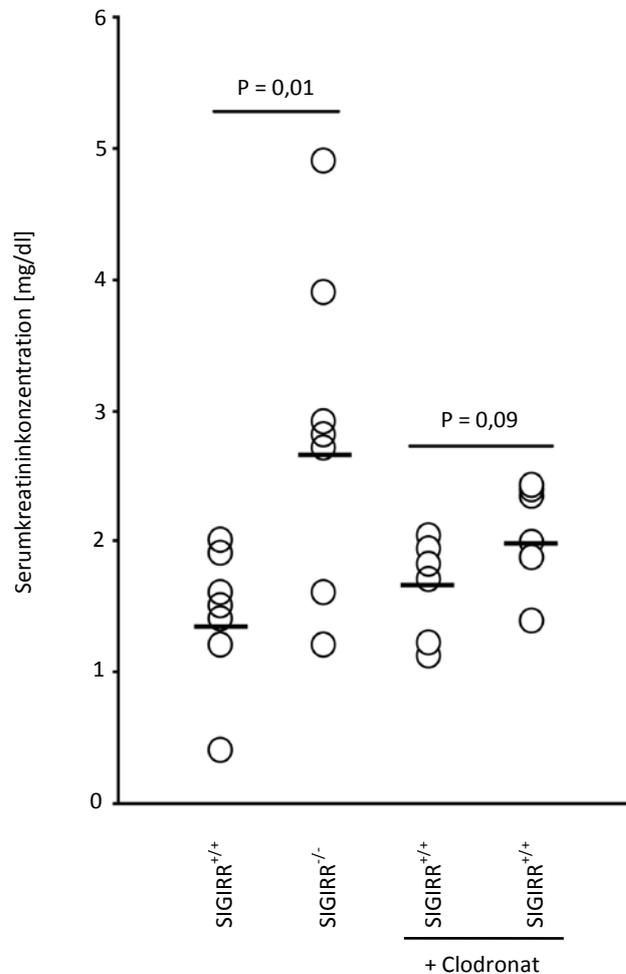


Abb. 36: Depletion intrarenaler Antigen-präsentierender Zellen mittels Clodronat lindert das postischämische ANV. Nach intraperitonealer Injektion des Bisphosphonats *Clodronat* wurde eine bilaterale Ischämie für 45 Minuten induziert. Die Serumkreatininspiegel wurden 24 Stunden nach Reperfusion im Serum bestimmt. Dargestellt sind die individuellen Serumkreatinin-Konzentrationen aus jeweils 6 – 7 untersuchten Individuen pro Gruppe als kleine Kreise. Die Mittelwerte sind durch die kurzen horizontalen Balken dargestellt.

Das bedeutet, dass die Depletion der intrarenalen dendritischen Zellen im SIGIRR/TIR8^{-/-}-Genotyp durch Clodronat eine protektive Wirkung auf das postischämische Nierenversagen hat. Diese Beobachtung wiederum stützt die These, dass intrarenale residente Immunzellen für das akute postischämische Nierenversagen bei Ischämie/Reperfusion mitverantwortlich sind, wenn sie nicht in ihrer proentzündlichen Aktivität inhibiert werden. Zum anderen zeigte sich in dem Experiment, dass die Depletion intrarenaler Antigen-präsentierender Zellen mit Clodronat im Wildtyp keinen Effekt auf das Ausmaß des postischämischen akuten Nierenversagens hat. Dies geschah in

Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass es unter Behandlung mit Clodronat zu einer Reproduktion der akuten ischämischen Nierenschädigung des Wildtyps gekommen war, der ohne Clodronatbehandlung einer bilateralen Ischämie zugeführt worden war. Auch dies belegt die protektive inhibierende Wirkung von SIGIRR/TIR8 im gesunden Wildtyp beim postischämischen ANV.

5. Diskussion

Die in dieser Arbeit abgehandelten Studien zur Wirkung von SIGIRR/TIR8 im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionsschadens zeigen deutlich, wie wichtig die Kontrolle der (angeborenen) Immunantwort ist. Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass das intrarenale Netzwerk dendritischer Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des IR-Schadens spielt, und dass SIGIRR/TIR8 ein wirksamer regulierender Faktor im Rahmen des IR-Schadens ist.

SIGIRR/TIR8 ist bereits als ein Inhibitor der LPS-Signaltransduktionskaskade bekannt [116, 121, 154]. Dabei ist die Rolle von SIGIRR/TIR8, als konstitutiver negativer Regulator residenter myeloischer Zellen bei der postischämischen akuten Nierenschädigung, bisher nicht untersucht worden. Unsere Daten zeigen deutlich, dass SIGIRR/TIR8 durch seine konstitutive Expression, auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden einen lindernden und hemmenden Effekt hat, da es die Signaltransduktion von residenten Immunzellen zu unterdrücken vermag.

Die neuere Forschung um den Formenkreis der zirkulatorischen und ischämischen Erkrankungen weist in eine zuvor wenig beachtete Richtung. Dabei steht das Konzept der sterilen Entzündung im Fokus. Dem akuten Nierenversagen liegt nach den neueren Erkenntnissen eine Immunreaktion, eben dieser Zustand der sterilen Inflammation, zu Grunde. Die Entzündung ist im Rahmen der Infektionsabwehr ein überlebenswichtiger Mechanismus, und die Vorteile einer entzündlichen Immunantwort überwiegen ihre Nachteile deutlich. Bei der sterilen entzündlichen Immunantwort, die eben nicht durch PAMP, sondern körpereigene endogene Liganden ausgelöst wird, ist die Entzündungsreaktion eher von Nachteil. Genau dies wird bei einer ischämischen Schädigung des Gewebes beobachtet. Die mit der Restauration der arteriellen Perfusion einhergehende Infiltration von Immunzellen, hauptsächlich bestimmt durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen, hat daher auch nachteilige Effekte auf das postischämische ANV und ist nicht als Teil des Heilungsprozesses zu verstehen [34, 39, 61, 155]. Dabei spielen chemotaktische und proentzündliche Mediatoren aus der Familie der Zyto- und Chemokine die entscheidende Rolle. Ohne die Freisetzung dieser chemotaktischen Mediatoren, v.a. der CC- und CXC-Chemokine, gäbe es für die Immunzellen kaum einen Reiz, das postischämische Gewebe zu infiltrieren [42, 53, 145, 156]. Wir haben dabei ein besonderes Augenmerk auf die beiden Mediatoren CXCL2/MIP2 und CCL2/MCP-1 gelegt. Für CXCL2/MIP2 konnte gezeigt werden, dass es in der frühen Phase der Reperfusion für die Rekrutierung der Granulozyten in das interstitielle Kompartiment verantwortlich ist. CCL2/MCP-1 hingegen zeigt ein hohes chemotaktisches Potential für Makrophagen [157, 158]. Unsere Daten zeigen, dass SIGIRR/TIR8 durch seine ständige Expression in

residenten renalen Zellen myeloischen Ursprungs, wesentlich an der Regulation der frühen Expression von MIP2 und MCP-1 beteiligt ist. Die ständige Expression von SIGIRR/TIR8 ist nach unseren Befunden daher eine wichtige Voraussetzung für die Hemmung der postischämischen MIP2- und MCP-1-Produktion und verhindert so eine exzessive Infiltration primärer Immunzellen in das postischämische Gewebe.

Eine homozygote SIGIRR/TIR8-Defizienz war mit einer deutlich gesteigerten Immunantwort und damit einem aggravierten Ischämie-/Reperfusionsschaden assoziiert. Auch die Nierenfunktion der Versuchstiere, gemessen an der Serumkreatinin-Konzentration, war deutlich eingeschränkt. Wir schließen daraus, dass SIGIRR/TIR8 ein weiterer endogener Hemmer des Immunsystems ist, der unangemessen starke Immunantworten im Zaun hält. Folglich mindert SIGIRR/TIR8 den postischämischen Gewebeschaden.

Damit reiht sich SIGIRR/TIR8 in eine Gruppe anderer bereits untersuchter endogener Inhibitoren ein, wie etwa das Tamm-Horsfall-Protein oder Lipoxin A₄, Protektin D1 und andere [159-161]. SIGIRR/TIR8 agiert dabei in der Niere spezifisch in bestimmten Zellen. Zwar exprimiert das renale Tubulusepithel SIGIRR/TIR8 regelmäßig, aber auf Grund einer unterschiedlichen posttranslationalen Modifikation ist es dort nicht an der Immunregulation beteiligt. SIGIRR/TIR8 ist in den Tubulusepithelzellen, wenn diese mit LPS stimuliert werden, nicht in der Lage, die Freisetzung von proentzündlichen Mediatoren signifikant zu senken oder zu hemmen [124]. Das gilt auch für die Aktivierung der Tubuluszellen durch Ischämie/Reperfusion. Aber im Gegensatz dazu hat es sehr wohl einen hemmenden Effekt auf die Aktivierung von CD11b⁺ myeloischen Zellen, wenn diese zuvor mit LPS stimuliert wurden. Wir gehen davon aus, dass es sich bei diesen CD11b⁺ Zellen um residente renale dendritische Zellen handelt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass residente Antigen-präsentierende Zellen in der Niere sehr zahlreich sind, und weniger sporadisch und zufällig verteilt sind, wie es früher angenommen wurde. Die residenten dendritischen Zellen bilden ein weit ausge dehntes interdigitierendes Netzwerk in der Niere und es muss davon ausgegangen werden, dass ihre Funktion wichtig für die intrarenale Homöostase ist. Unter Umständen ist der Beitrag dieser residenten Antigen-präsentierenden Zellen größer, als bisher angenommen. Jedoch ist noch zu wenig über die Rolle dieses interdigitierenden Netzwerkes bei Beginn und Fortschritt renaler Erkrankungen bekannt [73, 83, 87, 89, 124].

Neuere Forschungserkenntnisse um den Ischämie-/Reperfusionsschaden und das ischämische ANV rücken die renalen dendritischen Zellen mehr in den Mittelpunkt. So zeigten *Dong et al.*, dass das Zytokin TNF α eines der ersten proentzündlichen Mediatoren ist, die nach renaler Ischämie freigesetzt werden [101]. Interessanterweise wird dieses TNF α zum absoluten Großteil von den renalen dendritischen Zellen freigesetzt und ist u.a. für die Infiltration von weiteren Leukozyten und

den damit entstehenden Gewebeschaden verantwortlich. Ohne die Anwesenheit der residenten dendritischen Zellen fällt auch die maximale TNF α -Produktion anderer Immunzellen geringer aus, was den dendritischen Zellen die Rolle des Anheizers gibt, der die nötige Motivation zur Induktion einer kompetenten Immunantwort anheizt. Es ist ebenfalls bekannt, dass hohe Konzentrationen von TNF α bei Entzündungen oder Transplantationen die Apoptose von Tubulusepithelzellen induzieren kann, beziehungsweise ebenfalls die Expression von Toll-like-Rezeptoren hoch regulieren kann [40, 68, 101, 162]. Auch in einer Studie zum hepatischen Ischämie-/Reperfusionsschaden erwiesen sich die residenten dendritischen Zellen und Makrophagen als Hauptquelle der proentzündlichen Zytokine TNF α , IL-6 und IL-1 β [163]. Wir sind daher in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass diesem Netzwerk residenter dendritischer Zellen eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der sterilen postischämischen Entzündung und des postischämischen Gewebeschadens zukommt. Die residenten renalen Zellen sind auf Grund ihrer Natur an der Induktion der frühen proentzündlichen Immunantwort beteiligt und müssen daher spezifisch kontrolliert, und dementsprechend auch in ihrer Aktivierung und ihrer proentzündlichen Aktivität gehemmt werden. Folglich stellt eine Loss of function-Mutation im SIGIRR/TIR8-Gen einen Risikofaktor für eine aggravierte postischämische Nierenschädigung dar.

Im Rahmen des Ischämie-/ und Reperfusionsschadens ist die Hypoxie ein Kernmerkmal, das zu einer Aktivierung und Reifung renaler dendritischer Zellen führt. Dieser Prozess ist durch den Hypoxie-sensiblen Transkriptionsfaktor HIF-1 α bedingt und ist sogar steigerbar, wenn gleichzeitig eine Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS erfolgt. Entscheidend ist dabei ein Synergismus von Hypoxie und gleichzeitiger Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS, was zur Folge hat, dass stimulatorische und kostimulatorische Oberflächenmerkmale verstärkt auf der Oberfläche exprimiert werden. Zu ihnen gehören beispielsweise CD80, CD86 und MHC-II. Aber auch die Freisetzung proentzündlicher Zyto- und Chemokine wird letztlich drastisch verstärkt [99]. Wir konnten in den Versuchen mit isolierten CD11b⁺-Zellen diesen Effekt reproduzieren. Eine homozygote SIGIRR/TIR8-Defizienz führte dabei zu einer signifikant gesteigerten Aktivierung der renalen dendritischen Zellen *in vitro*, während bei isolierten Tubulusepithelzellen kein signifikanter inhibitorischer Effekt von SIGIRR/TIR8 in der *in vitro*-Hypoxie gemessen werden konnte. Die immunmodulierende Regulation von SIGIRR in den dendritischen Zellen ist so deutlich, dass wir den postischämischen Phänotyp bei SIGIRR/TIR8-knock out Mäusen in chimären Mäusen reproduzieren konnten, deren Immunzellen durch eine Knochenmarktransplantation SIGIRR/TIR8-defizient waren. Ein weiteres Argument bringen wir vor, in dem wir zeigen konnten, dass die pharmakologisch induzierte Depletion von Makrophagen und dendritischen Zellen in SIGIRR-defizienten Mäusen durch die Gabe von Clodronat die akute Nierenschädigung abschwächen konnte.

Bei der Induktion einer Immunantwort sind Toll-like Rezeptoren von entscheidender Bedeutung. Sie stellen phylogenetisch eine der frühesten Rezeptorenarten zur Erkennung von DAMP dar und sind sowohl in Immunzellen, als auch in Nicht-Immunzellen zu finden [42, 53-58]. Die TLR sind ein möglicher Weg der Aktivierung einer primären Immunantwort und es wurde gezeigt, dass sie beim Ischämie-/Reperfusionsschaden wesentlich beteiligt sind. Ihre Fähigkeit durch endogene DAMP aktiviert zu werden ist daher ein Nachteil für den Organismus. Ein hypoxisch bzw. ischämisch geschädigtes Gewebe ist erstaunlich gut in der Lage, TLRs zu aktivieren [41, 69].

Das sogenannte Danger-Modell von *Matzinger et al.* steht dabei in völligem Einklang mit dem bisher genannten. Die beobachtete sterile Entzündung setzt pathophysiologisch die gleiche Aktivierung (pro-) inflammatorischer Gene voraus, wie sie bei einer Infektion auftreten. Das heißt wiederum, dass Rezeptoren der angeborenen Immunität aktiviert werden müssen, um die rege entzündliche Aktivität erklären zu können. Dabei stehen die endogenen Liganden, die DAMP im Fokus [41, 42, 70, 73]. In der Niere spielen dabei vor allem die Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 eine entscheidende Rolle. Es konnte durch *Wu et al.* und *Leemans et al.* gezeigt werden, dass TLR2 und TLR4 in den Tubulusepithelzellen wesentlich für den postischämischen Schaden des Nierengewebes verantwortlich sind. Dies wurde durch die Beobachtung deutlich, dass TLR2^{-/-}- und TLR4^{-/-}-Mäuse nahezu unempfindlich gegen den postischämischen Gewebeschaden sind [66, 67, 164]. Dabei wurde gesunden Mäusen TLR2- und TLR4-defizientes Knochenmark transplantiert, was keinerlei Einfluss auf das Ausmaß des postischämischen Schadens und das konsekutive akute Nierenversagen hatte. In Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass der Transfer von gesunden Wildtyp-Knochenmark in TLR2- und TLR4-defiziente Mäuse den Phänotyp der TLR2^{-/-} bzw. - TLR4^{-/-}-Mäuse reproduzierte. Das heißt, TLR2- und TLR4-defiziente Mäuse waren in gewisser Weise vor der akuten postischämischen Nierenschädigung geschützt. Damit wurde gleichzeitig bewiesen, dass die Aktivität der TLR in der postischämischen Niere, allen voran TLR2 und TLR4, bei den renalen Tubulusepithelzellen dominiert. Durch das Experiment der Knochenmarktransplantation wurde verdeutlicht, dass das Signaling dieser TLR in den residenten myeloischen Zellen von untergeordneter Bedeutung ist. Ähnlich führte die Blockade von TLR2 mit Antisenseoligonukleotiden zu einem gemäßigeren IR-Schaden [66, 67, 152].

Aber auch, wenn Adaptermoleküle der TLR-Signalkaskade wie beispielsweise MyD88 durch Loss-of-function-Mutation ausgeschaltet wurden, konnte dabei ein wichtiger Überlebensvorteil durch einen milderen IR-Schaden beobachtet werden. Hier jedoch fand *Shigeoka et al.*, dass MyD88-Knock out Mäuse im Vergleich zu den TLR2-Knock out Tieren etwas schlechter gegen den IR-Schaden geschützt sind. Daraus wurde geschlossen, dass es wohl TLR2-abhängige aber gleichzeitig auch MyD88-unabhängige Pfade gibt [54, 68].

Unsere hier gezeigten Daten, nämlich dass SIGIRR/TIR8 in den residenten myeloischen Zellen hemmend auf die DAMP-assoziierte TLR-Signalkaskade wirkt, untermauern die Tatsache, dass die postischämische (und damit proinflammatorische) Signaltransduktion in den renalen Parenchymzellen dominiert. Hinzu kommt, dass im Vorfeld dieser Arbeit belegt werden konnte, dass SIGIRR/TIR8 ein spezifischer Hemmer der TLR-Signaltransduktionskaskade in den residenten myeloischen Zellen ist, nicht hingegen bei den Tubulusepithelzellen. Das erklärt sich mit einer unterschiedlichen posttranslationalen Modifikation von SIGIRR/TIR8 im Tubulusepithel. Diese hat den Effekt, dass das Molekül im Tubulusepithel nicht hemmend wirksam sein kann [124].

Auch in anderen Organen wie dem Herz, der Lunge, dem Gehirn und der Leber ist die Aktivität der TLRs von großer Bedeutung und daher maßgeblich am Ischämie-/Reperfusionsschaden beteiligt [58, 62-65]. So sind im Rahmen der kardialen Ischämie und Reperfusion auch Hinweise vorhanden, die ebenfalls den Vorteil einer TLR2- und TLR4-Defizienz aufzeigen. Dabei führt die Interaktion des kardialen Endothels mit den Kardiomyozyten und Leukozyten auch zur Freisetzung von DAMP aus den Kardiomyozyten, was die sterile Entzündung unterhält und verstärkt. TLR2- und TLR4-Defizienz stellen dabei in Studien am Mausmodell eine Option dar, den Gewebeschaden möglichst gering zu halten, was sich vorteilhaft auf die postischämische kardiale Situation auswirkte, also Herzfunktion, Infarktgröße und Outcome [164, 165]. Es stellte sich in einem *ex vivo* Modell heraus, dass der TLR2-Knock out bezüglich der Infarktgröße kaum einen Unterschied zum Wildtyp hatte, jedoch eine signifikant bessere kardiale Situation nach Infarkt. Der TLR2-Knock out wies eine bessere Kontraktilität und deutlich reduzierte TNF α - und IL-1 β -Levels auf im Vergleich zum Wildtyp [166, 167].

Betrachtet man die Rolle der Toll-like Rezeptoren bei Organtransplantationen, so finden sich auch hier viele Anhaltspunkte für die Rolle dieser Rezeptoren und der angeborenen Immunität im Allgemeinen auf das Überleben und die Organfunktion des Transplantates. Die verzögerte Funktion von Nierentransplantaten (*engl. delayed graft function, DGF*) ist eine Art des postischämischen ANV, das häufig nach Transplantationen eintritt und eine Konsequenz des I/R-Schadens ist. So ist beispielsweise mit einem erhöhten Auftreten der DGF v.a. bei Transplantationen zu rechnen, bei denen der Spender keine ausreichende Kreislauffunktion zu einem Zeitpunkt vor der Organentnahme hatte (sog. *non heart beating donors*). Bei diesen Allotransplantationen sind die Spenderorgane sowohl einer warmen wie auch einer kalten Ischämiezeit ausgesetzt. *Krüger et al.* beobachteten in diesen Spendernieren, dass die Expression von TLR4 im Vergleich zu den Spendernieren, die allein einer kalten Ischämie ausgesetzt waren, signifikant höher war. Gleichzeitig wurden dazu korrelierende erhöhte Konzentrationen potentieller endogener TLR-Liganden (DAMPs) gefunden, in diesem Fall der TLR4-Ligand HMGB1. Bei Spendernieren mit einer

Loss-of-function-Mutation des TLR4-Gens hingegen wurden erniedrigte Zytokinkonzentrationen gefunden. Auch die Rate der spontanen Transplantatfunktion nach Wiederherstellung der Reperfusion war hier höher. Ähnliche Beobachtungen, die den Vorteil einer Loss-of-function-Mutation der TLR-Gene im Rahmen des IR-Schadens untermauern, wurden auch für andere transplantierte Gewebe festgestellt [68, 164, 168].

Unsere Daten zeigen deutlich, wie wichtig eine Hemmung des Immunsignaling für die intrarenale Homöostase ist. Vor allem, wenn das angeborene Immunsystem im Rahmen des postischämischen akuten Nierenversagens und der Nierentransplantation mehr Schaden anrichtet als Nutzen. SIGIRR/TIR8 ist da ein potenter Inhibitor der TLR-Signaltransduktionskaskade, der spezifisch die TLR-Aktivität in den intrinsischen dendritischen Zellen der Niere hemmen kann. Ohne entsprechende Kontrolle der immunologischen Kettenreaktion, die bei Bindung endogener molekularer Liganden gestartet wird, muss mit ausgedehnten und intensivierten Gebeschäden gerechnet werden, die letztlich für die desolante Nierenfunktion nach Reperfusion verantwortlich ist.

Eine weitere Beobachtung bezüglich der immunmodulierenden Funktion von SIGIRR/TIR8 machten *Noris et al.*, als sie im Mausmodell herausfanden, dass eine Loss-of-function-Mutation des SIGIRR/TIR8-Gens zu einer akuten Organabstoßung nach einer Nierentransplantation führen kann [169]. Dabei wurde der günstige Effekt der spontanen Allograftakzeptanz bei gänzlichem MHC-Mismatch ausgenutzt, der als solches auch bei der Allotransplantation von Homografts beim Menschen bekannt ist [170]. Dies hatte den großen Vorteil für *Noris et al.*, dass eine interferierende pharmakologische Immunsuppression bei den Versuchstieren nicht notwendig war. Sie beobachteten, dass es in DBA/2-Mäuse transplantierte SIGIRR/TIR8^{-/-}-Nieren zu einem stärkeren postischämischen Reperfusionsschaden mit gesteigerter entzündlicher Reaktion kam, als wenn das Allotransplantat keinen SIGIRR/TIR8-knock out hatte. Dabei war, ähnlich unseren Ergebnissen, die mRNA-Expression der proentzündlichen Mediatoren MCP-1, MIP2 und IL-6 an den Zeitpunkten 3 und 6-7 Tage nach Transplantation bei den SIGIRR/TIR8^{-/-}-Nieren erhöht. Desweiteren stellten *Noris et al.* fest, dass die lokale SIGIRR/TIR8-Defizienz zu einer Zunahme der Zellzahl residenter dendritischer Zellen und ihres Reifegrades führte. Auch sie benutzten unter anderem als (Reife-) Marker für dendritische Zellen das Antigen CD11b, desweiteren CD11c sowie MHC-II. Es kam auch zu einer verstärkten spezifischen Immunantwort gegen Spenderantigene, wenn das transplantierte Organ SIGIRR/TIR8-defizient war. Gemessen wurde das an der Menge IFN γ -sezernierenden Splenozyten, der Zahl infiltrierender alloreaktiver Empfänger-T-Zellen in das transplantierte Gewebe, sowie dem Verhältnis von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) und Effektorzellen (T_{eff}). Dieses war zu Gunsten der Effektorzellen verschoben, wenn das Transplantat einen SIGIRR/TIR8-Knock out hatte. Unter anderem sorgte der SIGIRR/TIR8-Knock out für eine gehemmte Entstehung

regulatorischer T-Zellen. Letztlich war eine SIGIRR/TIR8-Defizienz des Allografts mit einer stark erhöhten Inzidenz der spontanen Organabstoßung innerhalb 7 – 10 Tage nach Transplantation korreliert [169]. SIGIRR/TIR8, wie die Studie von *Noris et al.* zeigt, ist also ein sehr potenter Inhibitor des Immunsystems, nicht nur was die Intensität und das Ausmaß einer primären Immunantwort angeht, sondern auch im Fall einer spezifischen Immunantwort. Desweiteren scheint SIGIRR/TIR8 auch bei der Toleranz-induzierenden Funktion dendritischer Zellen einen wichtigen Beitrag zu leisten.

Selbstverständlich ist SIGIRR/TIR8, dessen intrazelluläre Domäne die TLR-Signaltransduktionskaskade wirksam hemmt, keinesfalls die einzige immuninhibierende Instanz in renalen dendritischen Zellen beziehungsweise Immunzellen im Allgemeinen. Viel wahrscheinlicher ist, dass SIGIRR/TIR8 zusammen mit einer Fülle weiterer Kontrollmöglichkeiten und Hemmern im Einklang wirkt. Die Vorgänge innerhalb eines ischämischen und dann reperfundierten Organs sind weitaus komplexer und vielfältiger.

Ein weiterer Faktor, der die TLR-Signaltransduktion bei Ischämie/Reperfusion in intrarenalen dendritischen Zellen zu unterdrücken Vermag ist daher beispielsweise der Interferon regulierende Faktor 4 (IRF4). IRF4 ist im Unterschied zu SIGIRR/TIR8, das ständig exprimiert wird und bei entsprechendem Ischämieereiz verstärkt exprimiert wird, ein induzierbares Inhibitor-Protein. Genauer gesagt handelt es sich bei IRF4 um einen Transkriptionsfaktor, der Teil der IRF-Transkriptionsfaktorfamilie ist. Anders aber als die anderen Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorenfamilie ist IRF4 nicht der Regulation durch Interferone unterworfen. Und außerdem ist IRF4, im Gegensatz zu SIGIRR/TIR8, lediglich in Immunzellen exprimiert [171]. IRF4 ist charakterisiert durch eine regulatorische Funktion vor allem der erworbenen Immunität, wie beispielsweise bei der Reifung der B-Zellen und der T-Lymphozyten. Auch wirkt es bei der Funktion der regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) bei der Unterdrückung der T_H2 -Antwort, bei der Induktion von T_H17 T-Zellen und noch andere [172-176]. Aber auch bei der Regulation einer Immunantwort des angeborenen Immunsystems hat IRF4, ähnlich SIGIRR/TIR8, eine hemmende Funktion. Die Signaltransduktionskaskade der für den Ischämie- und Reperfusionsschaden verantwortlichen Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 ist durch IRF4 ebenfalls blockierbar. IRF4 kann an das Adaptorprotein MyD88 binden, analog zur intrazellulären Domäne von SIGIRR/TIR8, und so die Signaltransduktionskaskade, durch blockierte Interaktion mit anderen Adaptormolekülen, unterbinden [177].

Der Vergleich der hemmenden Funktion von SIGIRR/TIR8 mit der Transkriptionsfaktors IRF4 bietet sich aber auch aus folgendem Grund an: Wir konnten in der vorliegenden Studie zeigen, dass SIGIRR/TIR8 in den intrarenalen dendritischen Zellen bei Ischämie/Reperfusion verstärkt exprimiert,

also induziert wird. Aus vorangegangenen Erkenntnissen von *Lech et al.* weiß man, dass SIGIRR/TIR8 spezifisch in myeloischen CD45/CD11c doppelpositiven Zellen wirksam ist [124]. *Watanabe et al.* konnten wiederum demonstrieren, dass IRF4 spezifisch in dendritischen Zellen induziert wird. Sie beobachteten, dass in dendritische Zellen der intestinalen Darmwand bei Mäusen, IRF4 induziert werden kann. Dazu wurden die Antigen-präsentierenden Zellen im Rahmen einer Studie zur chronischen Colitis, wie bei M. Crohn, mit bakteriellen Proteinen stimuliert. Die Induktion von IRF4 führte zu einer Reduktion der Mediatorenfreisetzung durch besagte dendritische Zellen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass IRF4 im Rahmen dieser experimentellen Colitis einen Schutzmechanismus darstellt, der in der Lage ist die Entzündung, beziehungsweise die (pro-)inflammatorische Aktivität der intestinalen dendritischen Zellen, wirksam zu unterdrücken [178].

Lassen et al. untersuchten nun den Effekt der hemmenden IRF4-Aktivität im Rahmen von renaler Ischämie/Reperfusion [179]. Analog zu den hier dargestellten Daten fanden sie, dass auch IRF4 bei Ischämie/Reperfusion in intrarenalen CD11c⁺/CD45⁺-Zellen induziert wird. Die aus C57BL/6-Mäusen isolierten Tubulusepithelzellen und dendritischen Zellen wurden dazu, neben der Ischämie, einem oxidativen Stress ausgesetzt, der durch die Gabe des Purins Hypoxanthin als ROS-Donor und von Hypoxanthinoxidase simuliert wurde. Es zeigte sich dabei, dass die IRF4-Induktion bei den renalen dendritischen Zellen stattfand, nicht aber bei den Tubulusepithelzellen. Im Versuch mit IRF-Knock out-Mäusen zeigte sich, dass diese nach operativer Induktion einer bilateralen Ischämie eine deutlich aggravierten postischämische akute Nierenschädigung entwickelten. Diese wurde, ähnlich unseren Versuchen, anhand der Serumkreatinin-Konzentration untersucht. Dabei erhöhte sich die Kreatininkonzentration im Schnitt am ersten postoperativen Tag in den IRF4^{-/-}-Mäusen von 0,4 mg/dl ± 0,1 mg/dl auf 2,9 mg/dl ± 0,1 mg/dl, was gut vergleichbar mit unseren SIGIRR/TIR8-defizienten Mäusen ist. Auch aus diesen Daten wurde geschlossen, dass eine Loss-of-function-Mutation des IRF4-Gens ein ischämische ANV verschlechtern kann. Auch was das Ausmaß des histopathologischen IR-Schadens betrifft, konnten Lassen et al. demonstrieren, dass zu den Zeitpunkten 1, 5 und 10 Tagen nach Ischämie/Reperfusion die Gruppe der IRF4-Knock outs signifikant benachteiligt war. Desweiteren wurde gezeigt, dass eine IRF4-Defizienz bei isolierten CD11c-positiven Zellen im *in vitro*-Versuch mit erhöhten Konzentrationen der proentzündlichen Mediatoren TNF α , IL-6, CCL2/MCP-1 und CXCL2/MIP2 einherging. Das wurde durch Analyse der mRNA-Synthese der genannten Mediatoren noch zusätzlich bestätigt. Folglich wirkte sich die erhöhte Mediatorenausschüttung auch auf die postischämische Infiltration mit neutrophilen Granulozyten aus. Diese war zu den Zeitpunkten 1 und 5 Tage nach Ischämie/Reperfusion signifikant höher als bei der Wildtypkontrolle. Diese Beobachtung deckt sich mit unseren Daten.

Auch wir konnten hier zeigen, dass eine SIGIRR/TIR8-Defizienz mit erhöhten Konzentrationen von IL-6, CCL2/MCP-1, CXCL2/MIP2 und folglich verstärktem Einwandern neutrophiler Granulozyten einhergeht. Der hemmende Effekt von SIGIRR/TIR8 blieb aber deutlich auf CD11b-positive dendritische Zellen beschränkt. Interessanterweise zeigen Lassen et al. im Gegensatz zu den Daten dieser Arbeit, dass die Zahl infiltrierender F4/80-positiver Zellen (Makrophagen) nicht von IRF4 abhängt. So führte eine IRF4-Defizienz nicht wie erwartet zu einer erhöhten Anzahl infiltrierender F4/80-positiver Zellen. Allerdings wurde beobachtet, dass eine homozygote IRF4-Defizienz mit deutlich erhöhten TNF α -Spiegeln assoziiert ist. Bekanntermaßen sind renale dendritische Zellen die Hauptquelle für die postischämische TNF α -Sekretion [40, 101].

Wir konnten zeigen, dass die Clodronat-vermittelte Depletion renaler Antigen-präsentierender Zellen einen protektiven Effekt auf das postischämische ANV hat. Analog dazu wurde auch hier der Effekt von Clodronat untersucht. Dabei zeigen Lassen et al., dass nach Injektion von Clodronat in IRF4-defiziente Mäuse die intrarenale Induktion der mRNA der Gene von TNF α , MCP-1 und MIP2 nach Ischämie/Reperfusion ausblieb. Auch zeigten sie, dass dadurch die postischämische akute Nierenschädigung, gemessen am Serumkreatinin, deutlich milder ausfällt. Es kam daher die Frage auf, welche Rolle TNF α bei der deutlich schlechteren renalen Situation nach Ischämie/Reperfusion bei den IRF4-defizienten Mäusen spielt. Dazu wurde unmittelbar nach Freigabe der Reperfusion, der lösliche TNF α -Rezeptor Etanercept, sowohl in IRF4-defiziente Mäuse, als auch Wildtypmäuse injiziert. Etanercept hob dabei den Nachteil der homozygoten IRF4-Defizienz auf. 24 Stunden nach Ischämie/Reperfusion waren die Serumkreatinin-Konzentrationen bei Wildtyp- und IRF4^{-/-}-Mäusen gleich hoch. Auch die mRNA-Expression der Mediatoren TNF α , IL-6, MIP2 und MCP-1 war ähnlich niedrig wie bei den Wildtyp-Mäusen. Dadurch ist gezeigt, dass die ungehemmte TNF α -Induktion nach Ischämie/Reperfusion der Hauptmechanismus ist, über den sich eine homozygote IRF4-Defizienz auf das postischämische ANV auswirkt.

Trotz der in sich konsistenten Daten der hier präsentierten Studie, muss gesagt sein, dass noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssen, um ein ganzheitliches Verständnis der Rolle der dendritischen Zellen beim I/R-Schaden zu erlangen. Die große Bedeutung der dendritischen Zellen als Bindeglied der angeborenen und erworbenen Immunität, vor allem bei mikrobiellen Infektionen, ist ja hinreichend bekannt [80, 81]. Dabei ist die Erkenntnis relativ neu, dass körpereigene Antigene die dendritischen Zellen und das Immunsystem im Allgemeinen stimulieren können. Im Sinne einer sterilen Entzündung wirkt sich dabei die Aktivierung des Immunsystems potentiell eher nachteilig auf das Gewebe aus [70, 73, 76]. In dieser Arbeit zeigen wir nicht nur, dass primäre CD11b⁺ Zellen einen Großteil der chemotaktischen Gewebshormone bei I/R produzieren, sondern zeigen gleichzeitig, dass bei einer Loss-of-function-Mutation eines TLR-

Signalkaskadenhemmers, die Produktion von Zyto- und Chemokinen stark zunimmt. Die Folge davon ist eine erhöhte Infiltration des Gewebes durch Leukozyten, sowie eine signifikant gesteigerte transendotheliale Migration. Wir interpretieren dieses Phänomen als ebenfalls erhöhte Aktivierung des Endothels bei Ischämie/Reperfusion. Daraus resultiert unserer Meinung nach auch der größere Gewebeschaden nach IR.

Wie bereits erwähnt hat IRF4 in CD45/CD11c doppelpositiven dendritischen Zellen der Niere ebenfalls einen limitierenden Einfluss auf den IR-Schaden. Die IRF4-Defizienz war dabei ebenfalls mit einem signifikant verminderten postischämischen Leukozyteninfiltrat assoziiert, was in dieser Arbeit als günstiger bzw. protektiver Effekt auf die akute Nierenschädigung nach IR angesehen wurde [179]. Dennoch muss das postischämische Einwandern von aktivierten Makrophagen nicht unbedingt einen rein nachteiligen Effekt auf die akute Nierenschädigung bedeuten.

In einer Studie von *Lee et al.* konnte beobachtet werden, dass die infiltrierenden Makrophagen nach IR auch positive bzw. protektive Auswirkung auf den interstitiellen IR-Schaden haben können [180]. Dabei steht die Reparatur und Regenerierung des geschädigten renalen Gewebes nach Ischämie/Reperfusion im Vordergrund dieser Beobachtung. Es konnte gezeigt werden, dass die reine Anwesenheit dieser Zellen nach Ischämie/Reperfusion nicht so entscheidend für den tubulointerstitiellen Schaden ist, sondern eher der Effektorphänotyp der infiltrierenden Makrophagen. Nach initialer Verschlechterung und aktiver Beteiligung der infiltrierenden Makrophagen am Gewebeschaden, kommt es überraschender Weise zu einer günstigen Verhaltensänderung bzw. Veränderung des Expressionsverhaltens dieser Zellen [180].

Anfänglich handelt es sich um die klassischen Makrophagen des M1-Phänotyps. Diese werden als $F4/80^+CD11c^-MR^-$ - Makrophagen bezeichnet und stehen für den konventionellen Phänotyp, der sich bei mikrobiellen Infektionen findet und aktiv bei der Erregerabwehr mitwirkt. Unter weiterer Stimulation durch IL-4, IL-13 und andere, kommt es zu einem Phänotypwechsel der Makrophagen. Dieser Prozess wird als alternative Makrophagenaktivierung bezeichnet. Diese Makrophagen charakterisieren sich dann durch ihre jeweiligen Oberflächenmarker mit $F4/80^+CD11c^-MR^+$ und werden M2-Makrophagen genannt. Ihnen wird eine immunmodulierende- und limitierende Funktion zugeschrieben, sowie aktive Beteiligung an der Geweberegeneration [181, 182]. *Lee et al.* untersuchten dabei die Rolle der M2-Makrophagen nach renaler Ischämie/Reperfusion. Auch sie zeigten, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, dass die anfängliche Schädigung des postischämischen Nierengewebes durch infiltrierende Makrophagen mit bedingt ist. Auch sie führten eine Depletion von phagozytierenden Immunzellen mittels Clodronat durch und konnten einen günstigen Effekt auf den IR-Schaden beweisen, da es zu einer Depletion der Makrophagen bzw. anderer phagozytose-fähiger Immunzellen kam. Allerdings konnten sie beobachten, dass ab

Tag 6 nach IR die interstitiellen Makrophagen signifikant weniger iNOS exprimierten (ein Marker der klassischen M1-Makrophagen), während die Anzahl der Makrophagen annähernd gleich blieb. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde dies für den SIGIRR-WT so gesehen. Also wurde das Expressionsprofil des Oberflächenmarkers F4/80 und des Mannoserezeptors MR bei isolierten Makrophagen am Tag 1 und Tag 7 nach IR analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Makrophagen zum Zeitpunkt Tag 7 einen Wechsel der Oberflächenmarker von $F4/80^+CD11c^-MR^-$ nach $F4/80^+CD11c^-MR^+$ durchgemacht hatten, also ein Wechsel des Phänotyps von M1 nach M2 [180].

Um die Rolle der M2-Makrophagen auf den Prozess der Tubulusepithelproliferation- und Regeneration näher zu betrachten, wurden primäre Tubulusepithelzellen mit M2-Makrophagen kokultiviert. Die primären Tubulusepithelien wurden, analog der in vitro-Experimente in dieser Arbeit, einer Hypoxie/Ischämie in vitro zugeführt und dann mit den alternativ aktivierten M2-Makrophagen zusammengeführt. Dabei wurde beobachtet, dass die Zellteilungsrate der Tubulusepithelzellen, die zusammen mit M2-Makrophagen kokultiviert wurden, deutlicher höher war, als die der Kontrollgruppe (Kokultivation mit M1-Makrophagen, Beobachtungszeitraum 24, 48 und 72 Stunden nach Hypoxie in vitro) [180].

Die Studie von *Lee et al.* verdeutlicht auch die Komplexität des Themas Ischämie/Reperfusion, da auch die Regeneration des Nierengewebes, vor allem des Tubulusepithels als zusätzlicher Parameter bzw. Beobachtungsendpunkt einbezogen werden sollte. Auch wird durch *Lee et al.* gezeigt, dass die rekrutierten Makrophagen, die bei Beginn der Reperfusion das ischämische Gewebe infiltrieren, nicht nur als Verantwortliche für den IR-Schaden zu sehen sind. Ganz im Gegenteil tragen diese offenbar auch zur Regeneration des renalen Gewebes bei [180]. Wir haben in der vorliegenden Arbeit unser Hauptaugenmerk auf die akute Phase des IR-Schadens gelenkt, weil es uns hierbei wichtig war zu zeigen, dass das Immunsystem auch im Rahmen des IR-Schadens über Regulationsmechanismen verfügt, die wichtig für eine Schadensbegrenzung sind. Daher wäre eine weitere Betrachtung der postischämischen Tubulusregeneration im Vergleich zwischen SIGIRR/TIR8-WT und der homozygoten SIGIRR/TIR8-Defizienz von großem Interesse. Auch sollte unserer Meinung nach eine weitere Untersuchung längerer Zeiträume, beispielsweise > 10 Tage nach IR, gemacht werden. Dabei wäre auf die Expression von IL-4 und IL-13 zu achten, die ja bekanntlich am Wandel von M1- zu M2-Makrophagen beteiligt sind [180]. Interessant wäre dabei zu untersuchen, ob SIGIRR hierbei ebenfalls einen günstigen Effekt auf die Expression dieser Interleukine in den residenten Immunzellen hat.

Für diese Arbeit wurde eine eigene Methode der in vitro-Hypoxie bzw. in vitro-Ischämie/Reperfusion etabliert. Dabei konnte beobachtet werden, dass Hypoxie alleine nicht ausreicht, um die $CD11b^+$ -Zellen wesentlich zu aktivieren. Erst die Kombination der Hypoxie mit

mangelnden Metaboliten im Kulturmedium (starving) bei gleichzeitiger Stimulation mit einem klassischen TLR4-Liganden (hier LPS) zeigte eine höchstmögliche Aktivierung der Immunzellen *in vitro*. Diese Beobachtung teilen wir mit *Jantsch et al.*, der ebenfalls LPS als zusätzlichen Stimulus neben der Hypoxie für die Studien herangezogen hat [99]. Wir interpretieren diese Beobachtung ganz nach *Matzinger et al.* und haben *in vitro* reproduzieren können, dass eine zusätzliche Stimulation in Form von PAMP, aber auch durch DAMP im Rahmen der Ischämie zu einer überschießenden Zyto- und Chemokinproduktion führt [70, 71]. Es sind nach neueren Erkenntnissen vor allem die dendritischen Zellen innerhalb der Niere, die den größten Teil zur Aktivierung der Entzündungsreaktion nach IR beisteuern. Dabei ist TNF α ein wichtiges Zytokin, da es mit am meisten exprimiert wird, wenn es zur Ischämie der Niere kommt. Daher brachte in der Studie von *Lassen et al.* eine Therapie der Versuchstiere mit Etanercept, einem löslichen TNF α -Rezeptor nach IR einen deutlichen Vorteil [40, 61, 101, 162, 179, 183].

Auch müssten ähnliche Experimente *in vivo*, als auch *in vitro* mit differenzierter, bzw. unterschiedlicher Methodik durchgeführt werden. So wurde in dieser Studie im Tierversuch lediglich eine unilaterale Ischämie induziert. Der Autor hat hier sein Augenmerk primär auf intrarenale Strukturschäden (histopathologischer Schaden), die postischämische Leukozyteninfiltration (Neutrophile Granulozyten und Makrophagen), sowie das mRNA-Expressionsverhalten proinflammatorischer Zyto- und Chemokine (IL-6, CXCL2/MIP2 und CCL2/MCP-1) gelegt. Um das hier dargestellte besser zu veranschaulichen, sollte auch die Funktion des ischämischen Organs postoperativ gemessen werden. Ähnlich dem klinischen Alltag, wo man die renale Funktion seitengetrent ermittelt kann, wäre die seitengetrente Funktionsprüfung der postischämischen Niere ein weiterer zu untersuchender Parameter. Dennoch weisen die hier gezeigten Daten in die gleiche Richtung. Es konnte in einem zweiten *in vivo*-Versuch mit bilateraler Ischämieinduktion die renale Retention anhand des Serumkreatinins gemessen werden. Und dabei ist nachweislich ein signifikant höheres Serumkreatinin bei der Versuchsgruppe des SIGIRR-knock outs auffällig gewesen. Wir haben in Analogie zum klinischen Alltag die erhöhte renale Retention als Marker für die akute Nierenschädigung durch Ischämie/Reperfusion herangezogen.

Des Weiteren ist bekannt, dass C57BL/6-Mäuse grundsätzlich zu verstärkter Ausprägung eines I/R-Schadens neigen, im Vergleich zu einem anderen Stamm, nämlich den 129/Sv-Mäusen. In der Literatur findet man dazu eine interessante Studie, die eben diesen Unterschied zwischen C57/BL6-Mäusen und den 129/Sv-Mäusen beweist [184]. *Lu et al.* induzierten eine 45-minütige unilaterale Ischämie in den beiden Versuchsgruppen und beobachteten im Anschluss den IR-Schaden in beiden Versuchsgruppen. Als Parameter dienten dabei die GFR (die Inulin-Clearance), der renale Blutfluss (PAH-Clearance) und ähnlich der vorliegenden Arbeit auch der

histopathologische Schaden, sowie die postischämische Leukozyteninfiltration. Insgesamt zeigten die 129/Sv-Mäuse dabei jeweils signifikant bessere Ergebnisse nach Ischämie/Reperfusion. Das betraf sowohl die postischämische GFR, als auch den renalen Blutfluss. Die 129/Sv-Mäuse wiesen auch einen geringeren interstitiellen Schaden auf, als die C57BL/6-Mäuse. Dies zusammen mit einer signifikant geringeren Invasion durch Leukozyten nach Ischämie/Reperfusion. Es wurde daraus geschlossen, dass C57BL/6-Mäuse deutlich anfälliger für renale Ischämie/Perfusion sind, als andere Stämme [184]. Auch wir definierten den C57BL/6-Stamm als unseren WT. Daraus muss abgeleitet werden, dass eine ähnliche Studie unter Umständen unterschiedliche Beobachtungen hervorbringen könnte, wenn es sich bei den Versuchstieren um unterschiedliche Stämme handelt. Daher sehen wir diesen Aspekt als einen Schwachpunkt der Arbeit, der ein möglicher Confounder in der vorliegenden Studie darstellen könnte.

Es bleibt Folgendes festzuhalten: Wir konnten in der vorliegenden Arbeit erstmalig feststellen, dass SIGIRR/TIR8 einen hemmenden Einfluss auf residente intrarenale CD11b⁺-dendritische Zellen hat. Dabei untersuchten wir das Verhalten dieser Zellen und die Rolle des interdigitierenden Netzwerks residenter dendritischer Zellen der Niere im Rahmen von Ischämie und Reperfusion. Wir beobachteten, dass SIGIRR/TIR8 aktivierende Signaltransduktionskaskaden der residenten Immunzellen bei Ischämie/Reperfusion wirksam unterdrückt, und so einen wichtigen Beitrag zur Unterdrückung überschießender Immunantwort der angeborenen Immunität nach IR leistet. Wir konnten zeigen, dass ein akutes Nierenversagen durch SIGIRR/TIR8 im Mausmodell abgefangen oder gar verhindert werden kann. Eine homozygote SIGIRR/TIR8-Defizienz stellt damit einen signifikanten Nachteil für renale IR dar.

Ob und wie SIGIRR/TIR8 beim Menschen eine ähnliche Bedeutung hat, muss noch erforscht werden. Natürlich stellen die hier gemachten Beobachtungen einen großen Anreiz dar, auf den klinischen Alltag übertragen zu werden. Jedoch fehlen noch viele weitere Untersuchungen und es ist hinreichend bekannt, dass das Tiermodell nur eine Annäherung an den viel komplexeren menschlichen Organismus darstellen kann. Erst nach eindringlicher weiterer Forschung zu den Grundlagen dieses Themas kann diese Eingang in die klinische Forschung finden. Sollten sich in Zukunft aber die nötigen Hinweise verdichten, dass SIGIRR/TIR8 eine ähnliche Rolle bei renaler Ischämie und Reperfusion im Rahmen von Transplantation bei uns Menschen spielt, wie *Noris et al.* im Mausmodell feststellen konnten, so stellen sich natürlich die Frage nach der therapeutischen Konsequenz [169]. Das Hauptaugenmerk liegt dabei natürlich auf der Organ- bzw. Nierentransplantation, einem der kostspieligsten Bereiche der Humanmedizin, ganz abgesehen von dem hohen Maß an menschlichem Leid. Unserer Meinung nach stellt das Immunsystem das Hauptziel therapeutischer und ggf. präventiver Interventionen dar, allerdings eben nicht nur als

immunsuppressive Therapie nach einer Organtransplantation, sondern möglicherweise bereits im Vorfeld der Explantation. Die sterile Entzündung bei IR muss daher noch besser verstanden werden. Dann erst sind konkretere therapeutische Strategien daraus für den Menschen abzuleiten. Dabei sollte weiter erforscht werden, welche Rolle der erworbenen Immunität bei IR zukommt, welche Zusammenhänge sind zwischen endogenen Antigenen (DAMP) und Autoimmunität? Es ist richtig, dass den residenten renalen dendritischen Zellen eine Hauptrolle bei IR zugeschrieben werden muss, aber es sind noch etliche weitere Zellen daran beteiligt, und diese haben zum Teil auch regenerierende und reparierenden Funktion, wie am Beispiel der Makrophagen zu erkennen ist [42, 61, 73, 101, 162, 180, 185].

Daher muss erforscht werden, inwiefern eine SIGIRR/TIR8-Defizienz beim Menschen bei renaler IR mit Risiko, Schadensausmaß, sowie Langzeitüberleben nach Transplantation assoziiert ist, bzw. ob eine SIGIRR/TIR8-Defizienz bei renaler IR von Nachteil ist. Auch stellen die residenten renalen dendritischen Zellen ein sehr attraktives Ziel therapeutischer und präventiver Möglichkeiten dar. Passend dazu haben wir durch Depletion residenter Makrophagen mittels Clodronat einen günstigen und protektiven Effekt für den IR-Schaden feststellen können (vgl. 4.3.). *Lassen et al.* konnten durch Applikation des löslichen TNF α -Rezeptors Etanercept, der bereits zur Therapie von beispielsweise chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Menschen freigegeben ist, einen protektiven Effekt bei IR beobachten. Selbst die Blockade von Rezeptoren der angeborenen Immunität scheint ein weiterer möglicher therapeutischer Ansatz zu sein. Es sei auf die Arbeit von *Liu et al.* verwiesen, die mit Eritroran, einem Antagonisten des TLR4, bei der Ratte einen günstigen, d.h. protektiven Effekt auf den IR-Schaden feststellen konnten [186].

6. Zusammenfassung und Ausblick

Mit den hier gezeigten Daten demonstrieren wir zum ersten Mal, dass SIGIRR/TIR8 aktivierende Signaltransduktionskaskaden bei Ischämie und Reperfusion in residenten intrarenalen Antigen-präsentierenden Zellen unterdrückt. Damit zeigen wir einen neuen Hemmungsmechanismus von proentzündlichen Immunantworten und, wie Immunzellen aktiv bei der Hemmung überschießender Immunantworten beteiligt sind. Die intrarenalen dendritischen Zellen lindern das Ausmaß der ischämischen akuten Nierenschädigung.

Dem Ischämie- und Reperfusionsschaden liegt eine sterile Entzündung zu Grunde, also eine inadäquate Aktivität des Immunsystems. Hauptakteure dieser Immunaktivierung sind die Toll-like Rezeptoren. Es handelt sich dabei um Rezeptoren, die phylogenetisch von großer Bedeutung und Spezies-übergreifend vertreten sind. Die Theorie der DAMP besagt, dass körpereigene, endogene Liganden auch über TLR-spezifische Epitope verfügen. Diese Liganden sind wie PAMP, also Antigene pathogener Organismen und Partikel, in der Lage, TLR zu aktivieren. Der Ursprung dieser endogenen Liganden liegt zum Großteil im Zellinneren und wird hauptsächlich durch Nekrose im Rahmen von Ischämie/Reperfusion freigesetzt.

Im Rahmen des renalen Ischämie- und Reperfusionsschadens spielen vor allem die Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 der Tubulusepithelzellen eine wichtige Rolle. Durch ihre Aktivierung kommt es zur Freisetzung proentzündlicher Mediatoren aus der Familie der Zyto- und Chemokine. Es kommt dann zur Infiltration von Leukozyten, die durch ihre Aktivität zu ausgedehntem Gewebeschaden und Zelluntergang beitragen. Dies wiederum mündet in akutem Nierenversagen, beziehungsweise in akuter Organabstoßung.

Das weit ausgedehnte Netzwerk interdigitierender renaler dendritischer Zellen wurde verdächtigt, wesentlich an der Entstehung des I/R-Schadens beteiligt zu sein. Diese Vermutung wird aber durch andere Erkenntnisse in Frage gestellt. Die proentzündliche Aktivität geht eindeutig von renalen Parenchymzellen aus, wie sich in mehrere Studien zur Rolle der Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 herausstellte.

Wir sind daher davon ausgegangen, dass die Aktivierung jener residenten dendritischen Zellen ausbleibt, beziehungsweise stark unterdrückt wird. Dabei untersuchte wir die Rolle von SIGIRR/TIR8, einem Mitglied der Familie der TLR/IL-1 Rezeptoren. Die intrazelluläre TIR-Domäne hat eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren. Auf Grund einer unterschiedlichen posttranslationalen Modifikation von SIGIRR/TIR8, hat dieses in Tubulusepithelzellen keinen hemmenden Effekt auf die TLR-Aktivität. Anders hingegen in den renalen residenten dendritischen Zellen.

Wir konnten in einer *in vivo*-Studie den ungünstigen Effekt einer SIGIRR/TIR8-Defizienz analysieren. Dazu wurde in den Versuchstieren eine Nierenschämie induziert mit anschließender Reperfusion. Dabei kam es bei SIGIRR/TIR8-Defizienz zu erhöhten Serumkreatininspiegeln nach I/R. Histopathologisch zeigte sich bei SIGIRR/TIR8-Defizienz ein erhöhter postischämischer Gewebeschaden.

Wir untersuchten auch den Grad der proentzündlichen Aktivierung, in dem wir eine quantitative Analyse der mRNA der proentzündlichen Mediatoren CXCL2/MIP2, IL-6 und CCL2/MCP-1 durchführten. Es zeigte sich bei den SIGIRR/TIR8-Knock outs, dass Ischämie und Reperfusion bei ihnen zu einer stärkeren Induktion dieser Gene führt. Im Umkehrschluss ist SIGIRR/TIR8 also notwendig, um eine Aktivierung der Gene proentzündlicher Mediatoren zu hemmen.

Es kam bei den SIGIRR/TIR8-Knock outs auch zu einer verstärkten Leukozyteninfiltration (neutrophile Granulozyten, Makrophagen). Dabei war der Gewebeschaden proportional zu der Anzahl der infiltrierenden Leukozyten.

Wir vermuteten einen Zusammenhang von erhöhter Anzahl infiltrierender Leukozyten mit erhöhter Endothelaktivierung und Diapedese. Bei der *in vivo*-Mikroskopie am M. cremaster konnte gezeigt werden, dass eine SIGIRR/TIR8-Defizienz mit einer gesteigerten Diapedese, sowie einer erhöhten Anzahl am Endothel entlang rollender Leukozyten einhergeht. Für die Versuche *in vitro* wurde zunächst eine Methode zur Simulation der *in vitro*-Ischämie und Reperfusion etabliert. Die Versuche *in vitro* ergaben, dass die Freisetzung von Zyto- und Chemokinen bei den renalen CD11b⁺-Zellen dominiert, wobei eine SIGIRR/TIR8-Defizienz wieder mit einer stärkeren Induktion dieser Mediatoren einherging.

Durch Knochenmarktransplantation von SIGIRR/TIR8^{-/-}-Knochenmark in Wildtyp-Mäuse konnte der postischämische Phänotyp der SIGIRR/TIR8-defizienten Tiere in diesen chimären SIGIRR/TIR8^{+/+/-/-}-Mäusen reproduziert werden. Alternativ wurde SIGIRR/TIR8-defizienten Mäusen Clodronat injiziert (führt zur Depletion der dendritischen Zellen). Die akute ischämische Nierenschädigung konnte dadurch eingeschränkt und gelindert werden.

Wir schließen daraus, dass SIGIRR/TIR8 ein spezifischer Hemmer residenter Immunzellen in der Niere ist, dessen Einfluss wichtig für das Ausmaß des postischämischen ANV, beziehungsweise der postischämischen akuten Nierenschädigung ist. Unsere Daten demonstrieren, dass SIGIRR/TIR8 die frühe Aktivierung der residenten Antigen-präsentierenden Zellen wirksam unterdrückt und so ein ANV verhindern beziehungsweise lindern kann.

Welche Konsequenzen oder gar therapeutischen Möglichkeiten ergeben sich aus dieser Erkenntnis für den Menschen? Die Fülle der Herz- und Kreislauferkrankungen, bei denen ischämische Prozesse im Vordergrund stehen, sind von großer gesundheitsökonomischer Bedeutung. Auch der Bereich

der Organtransplantation zählt zu den kostspieligsten Bereichen der Medizin. Von dem menschlichen Leid ganz zu schweigen.

SIGIRR/TIR8 stellt hier einen wirksamen Inhibitor der TLR-Aktivität in Immunzellen dar. In gemeinsamer Betrachtung mit anderen Inhibitoren der angeborenen Immunität (z.B. IRF4, das ebenfalls in Immunzellen wirkt [124, 177]), wird folgendes klar: Da jeder Ischämie- und Reperfusionsschaden auf einer sterilen Entzündung beruht, ist die (Selbst-) Kontrolle der Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Kürzlich zeigten *Noris et al.*, dass SIGIRR/TIR8 inhibierend auf das Immunsystem auch im Rahmen der renalen Transplantation wirkt und sogar die akute Organabstoßung zu verhindern vermag [169].

Im Rahmen einer Infektion wäre der Organismus ohne das Immunsystem nicht in der Lage, diese erfolgreich abzuwehren und zu überleben. Das Immunsystem stellt einen großen Selektionsvorteil in der Evolution dar. Eine unzureichende oder gar fehlende Kontrolle hat verheerende Folgen für Gewebe und Organismus [52, 76, 155]. Es muss noch viel in die Untersuchung der genauen Vorgänge bei der sterilen Entzündung beziehungsweise bei I/R investiert werden. Erst ein möglichst vollständiges Wissen kann helfen, therapeutische Strategien zu entwickeln. Welche Rolle kommt der adaptiven Immunität im Rahmen des IR-Schadens zu? Welche sind die Zusammenhänge von DAMP-Signaling und Autoimmunität? Welche Rolle spielen SIGIRR/TIR8 bei humanen Zellen? Es ist richtig, dass residenten renalen dendritischen Zellen eine Hauptrolle bei I/R zugeschrieben werden kann, aber es sind noch weitere Zellen daran beteiligt [42, 61, 73, 101, 162, 185]. Es ist wichtig zu untersuchen, ob und wie Genpolymorphismen des SIGIRR/TIR8-Gens bei Menschen mit Risiko, Schadensausmaß und Langzeitüberleben zusammenhängen. Die residenten dendritischen Zellen sind dabei ein attraktives Ziel für zukünftige Forschung und Therapien.

Wir konnten zeigen, dass die medikamentöse Depletion residenter Makrophagen von Vorteil für das postischämische ANV war. *Lassen et al.* zeigten einen protektiven Effekt von Etanercept, einem löslichen TNF α -Rezeptor, der beim Menschen bereits zur Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen freigegeben ist [179]. Natürlich sollte auch über die Blockade von Toll-like Rezeptoren als Therapiemöglichkeit nachgedacht werden. *Liu et al.* zeigten einen günstigen Effekt der TLR4-Blockade mit Eritoran bei der Ratte [186].

Literaturverzeichnis

1. Kellum, J.A., et al., *Developing a consensus classification system for acute renal failure*. *Curr Opin Crit Care*, 2002. **8**(6): p. 509-14.
2. Kellum, J.A., *Acute kidney injury*. *Crit Care Med*, 2008. **36**(4 Suppl): p. S141-5.
3. Abuelo, J.G., *Normotensive ischemic acute renal failure*. *N Engl J Med*, 2007. **357**(8): p. 797-805.
4. *American Society of Nephrology Renal Research Report*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(7): p. 1886-903.
5. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury*. *Crit Care*, 2007. **11**(2): p. R31.
6. Braunwald, K., *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Vol. II. 2005. S. 1644 ff.
7. Herold, G. and Mitarbeiter, *INNERE MEDIZIN*2009. S. 566 ff.
8. Srisawat, N., E.E. Hoste, and J.A. Kellum, *Modern classification of acute kidney injury*. *Blood Purif*, 2010. **29**(3): p. 300-7.
9. Bellomo, R., et al., *Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group*. *Crit Care*, 2004. **8**(4): p. R204-12.
10. Waikar, S.S., et al., *Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(4): p. 1143-50.
11. *USRDS, Hospitalizations for acute kidney injury, with or without dialysis, A.D.R. 2009*, Editor 2009, USRDS.
12. Thadhani, R., M. Pascual, and J.V. Bonventre, *Acute renal failure*. *N Engl J Med*, 1996. **334**(22): p. 1448-60.
13. Uchino, S., et al., *Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study*. *JAMA*, 2005. **294**(7): p. 813-8.
14. Liano, F. and J. Pascual, *Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study*. *Madrid Acute Renal Failure Study Group*. *Kidney Int*, 1996. **50**(3): p. 811-8.
15. Brivet, F.G., et al., *Acute renal failure in intensive care units--causes, outcome, and prognostic factors of hospital mortality; a prospective, multicenter study*. *French Study Group on Acute Renal Failure*. *Crit Care Med*, 1996. **24**(2): p. 192-8.
16. Cameron, J.S., *Acute renal failure--the continuing challenge*. *Q J Med*, 1986. **59**(228): p. 337-43.
17. Chertow, G.M., et al., *Prognostic stratification in critically ill patients with acute renal failure requiring dialysis*. *Arch Intern Med*, 1995. **155**(14): p. 1505-11.
18. Hakim, R.M., R.L. Wingard, and R.A. Parker, *Effect of the dialysis membrane in the treatment of patients with acute renal failure*. *N Engl J Med*, 1994. **331**(20): p. 1338-42.
19. Maher, E.R., et al., *Prognosis of critically-ill patients with acute renal failure: APACHE II score and other predictive factors*. *Q J Med*, 1989. **72**(269): p. 857-66.
20. Schifffl, H., et al., *Biocompatible membranes in acute renal failure: prospective case-controlled study*. *Lancet*, 1994. **344**(8922): p. 570-2.
21. Liano, F., et al., *Easy and early prognosis in acute tubular necrosis: a forward analysis of 228 cases*. *Nephron*, 1989. **51**(3): p. 307-13.
22. Pascual, J., et al., *Incidence and prognosis of acute renal failure in older patients*. *J Am Geriatr Soc*, 1990. **38**(1): p. 25-30.
23. Hoste, E.A. and M. Schurgers, *Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem?* *Crit Care Med*, 2008. **36**(4 Suppl): p. S146-51.

24. Bagshaw, S.M., *Short- and long-term survival after acute kidney injury*. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. **23**(7): p. 2126-8.
25. Harris, K.P., et al., *Acute renal failure associated with haematological malignancies: a review of 10 years experience*. *Eur J Haematol*, 1991. **47**(2): p. 119-22.
26. Rao, T.K. and E.A. Friedman, *Outcome of severe acute renal failure in patients with acquired immunodeficiency syndrome*. *Am J Kidney Dis*, 1995. **25**(3): p. 390-8.
27. Norman, R.W., et al., *Acute renal failure secondary to bilateral ureteric obstruction: review of 50 cases*. *Can Med Assoc J*, 1982. **127**(7): p. 601-4.
28. Devarajan, P., *Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2006. **17**(6): p. 1503-20.
29. Evans, R.G., et al., *Intrarenal oxygenation: unique challenges and the biophysical basis of homeostasis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(5): p. F1259-70.
30. Le Dorze, M., et al., *The role of the microcirculation in acute kidney injury*. *Curr Opin Crit Care*, 2009. **15**(6): p. 503-8.
31. Johannes, T., E.G. Mik, and C. Ince, *Dual-wavelength phosphorimetry for determination of cortical and subcortical microvascular oxygenation in rat kidney*. *J Appl Physiol*, 2006. **100**(4): p. 1301-10.
32. Brezis, M., Y. Agmon, and F.H. Epstein, *Determinants of intrarenal oxygenation. I. Effects of diuretics*. *Am J Physiol*, 1994. **267**(6 Pt 2): p. F1059-62.
33. Rosenberger, C., et al., *Cellular responses to hypoxia after renal segmental infarction*. *Kidney Int*, 2003. **64**(3): p. 874-86.
34. Bonventre, J.V. and J.M. Weinberg, *Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(8): p. 2199-210.
35. Schrier, R.W., et al., *Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(1): p. 5-14.
36. Fogo, A. *Atlas of Renal Pathology No. 1*. 2003 [cited 2010 06.09.2010]; Available from: http://www2.us.elsevierhealth.com/ajkd/atlas/atn/files/atlas_atn.htm.
37. Wangsiripaisan, A., et al., *Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions*. *Kidney Int*, 2001. **59**(3): p. 932-40.
38. Witzgall, R., et al., *Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells*. *J Clin Invest*, 1994. **93**(5): p. 2175-88.
39. Bonventre, J.V. and A. Zuk, *Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?* *Kidney Int*, 2004. **66**(2): p. 480-5.
40. Nelson, P.J., *Renal ischemia-reperfusion injury: renal dendritic cells loudly sound the alarm*. *Kidney Int*, 2007. **71**(7): p. 604-5.
41. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. *Nat Rev Immunol*, 2008. **8**(4): p. 279-89.
42. Ioannou, A., J. Dalle Lucca, and G.C. Tsokos, *Immunopathogenesis of ischemia/reperfusion-associated tissue damage*. *Clin Immunol*, 2011. **141**(1): p. 3-14.
43. Deetjen, P., E.-J. Speckmann, and J. Hescheler, *Physiologie*. 4. Auflage ed2005: ELSEVIER Urban & Fischer.
44. Löffler, G. and P. Petrides, *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage ed2003: Springer Verlag.
45. Amura, C.R., et al., *Complement activation and toll-like receptor-2 signaling contribute to cytokine production after renal ischemia/reperfusion*. *Mol Immunol*, 2012. **52**(3-4): p. 249-57.
46. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
47. Wolfs, T.G., et al., *In vivo expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation*. *J Immunol*, 2002. **168**(3): p. 1286-93.

48. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that cooperate in innate immunity*. Trends Immunol, 2006. **27**(8): p. 352-7.
49. Granucci, F., M. Foti, and P. Ricciardi-Castagnoli, *Dendritic cell biology*. Adv Immunol, 2005. **88**: p. 193-233.
50. Anderson, K.V., G. Jurgens, and C. Nusslein-Volhard, *Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product*. Cell, 1985. **42**(3): p. 779-89.
51. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996. **86**(6): p. 973-83.
52. Kawai, T. and S. Akira, *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2010. **11**(5): p. 373-84.
53. Anders, H.J., *Innate pathogen recognition in the kidney: toll-like receptors, NOD-like receptors, and RIG-like helicases*. Kidney Int, 2007. **72**(9): p. 1051-6.
54. Shigeoka, A.A., et al., *TLR2 is constitutively expressed within the kidney and participates in ischemic renal injury through both MyD88-dependent and -independent pathways*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6252-8.
55. Raymond, T., et al., *Toll-like receptors, Notch ligands, and cytokines drive the chronicity of lung inflammation*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(8): p. 635-41.
56. Wu, C., et al., *Innate immune modulation of keratinocytes by antikeratin 16 antibodies*. Exp Dermatol, 2008. **17**(8): p. 645-52.
57. Frantz, S., R.A. Kelly, and T. Bourcier, *Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5197-203.
58. Tang, S.C., et al., *Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(34): p. 13798-803.
59. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 24-32.
60. Patole, P.S., et al., *Toll-like receptor-4: renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis*. Kidney Int, 2005. **68**(6): p. 2582-7.
61. Kinsey, G.R., L. Li, and M.D. Okusa, *Inflammation in acute kidney injury*. Nephron Exp Nephrol, 2008. **109**(4): p. e102-7.
62. Zhai, Y., et al., *Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7115-9.
63. Oyama, J., et al., *Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice*. Circulation, 2004. **109**(6): p. 784-9.
64. Shishido, T., et al., *Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction*. Circulation, 2003. **108**(23): p. 2905-10.
65. Shimamoto, A., et al., *Toll-like receptor 4 mediates lung ischemia-reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 2006. **82**(6): p. 2017-23.
66. Leemans, J.C., et al., *Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney*. J Clin Invest, 2005. **115**(10): p. 2894-903.
67. Wu, H., et al., *TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury*. J Clin Invest, 2007. **117**(10): p. 2847-59.
68. Arumugam, T.V., et al., *Toll-like receptors in ischemia-reperfusion injury*. Shock, 2009. **32**(1): p. 4-16.
69. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
70. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
71. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger, *Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells*. Nat Med, 1999. **5**(11): p. 1249-55.
72. Shi, Y. and K.L. Rock, *Cell death releases endogenous adjuvants that selectively enhance immune surveillance of particulate antigens*. Eur J Immunol, 2002. **32**(1): p. 155-62.

73. Nace, G., et al., *Dendritic cells and damage-associated molecular patterns: endogenous danger signals linking innate and adaptive immunity*. J Innate Immun, 2012. **4**(1): p. 6-15.
74. Shi, Y., W. Zheng, and K.L. Rock, *Cell injury releases endogenous adjuvants that stimulate cytotoxic T cell responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14590-5.
75. Majno, G., M. La Gattuta, and T.E. Thompson, *Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver*. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med, 1960. **333**: p. 421-65.
76. Rock, K.L. and H. Kono, *The inflammatory response to cell death*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 99-126.
77. Ueno, H., et al., *Dendritic cell subsets in health and disease*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 118-42.
78. Velazquez, P., M.L. Dustin, and P.J. Nelson, *Renal dendritic cells: an update*. Nephron Exp Nephrol, 2009. **111**(3): p. e67-71.
79. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
80. Lipscomb, M.F. and B.J. Masten, *Dendritic cells: immune regulators in health and disease*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 97-130.
81. Pulendran, B., K. Palucka, and J. Banchereau, *Sensing pathogens and tuning immune responses*. Science, 2001. **293**(5528): p. 253-6.
82. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
83. Kurts, C., *Dendritic cells: not just another cell type in the kidney, but a complex immune sentinel network*. Kidney Int, 2006. **70**(3): p. 412-4.
84. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
85. Sallusto, F., et al., *Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1617-25.
86. John, R. and P.J. Nelson, *Dendritic cells in the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(10): p. 2628-35.
87. Kruger, T., et al., *Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(3): p. 613-21.
88. Dong, X., et al., *Antigen presentation by dendritic cells in renal lymph nodes is linked to systemic and local injury to the kidney*. Kidney Int, 2005. **68**(3): p. 1096-108.
89. Soos, T.J., et al., *CX3CR1+ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney*. Kidney Int, 2006. **70**(3): p. 591-6.
90. Hume, D.A., *The mononuclear phagocyte system*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(1): p. 49-53.
91. Lemley, K.V. and W. Kriz, *Anatomy of the renal interstitium*. Kidney Int, 1991. **39**(3): p. 370-81.
92. Kaissling, B., et al., *Morphology of interstitial cells in the healthy kidney*. Anat Embryol (Berl), 1996. **193**(4): p. 303-18.
93. Kaissling, B. and M. Le Hir, *Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats*. Kidney Int, 1994. **45**(3): p. 709-20.
94. Maltzman, J.S. and V.H. Haase, *Low oxygen stimulates the immune system*. Kidney Int, 2008. **73**(7): p. 797-9.
95. Rama, I., et al., *Hypoxia stimulus: An adaptive immune response during dendritic cell maturation*. Kidney Int, 2008. **73**(7): p. 816-25.
96. Paul, S.A., J.W. Simons, and N.J. Mabweesh, *HIF at the crossroads between ischemia and carcinogenesis*. J Cell Physiol, 2004. **200**(1): p. 20-30.
97. Marx, J., *Cell biology. How cells endure low oxygen*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1454-6.
98. Haase, V.H., *Hypoxia-inducible factors in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **291**(2): p. F271-81.

99. Jantsch, J., et al., *Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4697-705.
100. Schlichting, C.L., W.D. Schareck, and M. Weis, *Renal ischemia-reperfusion injury: new implications of dendritic cell-endothelial cell interactions*. Transplant Proc, 2006. **38**(3): p. 670-3.
101. Dong, X., et al., *Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury*. Kidney Int, 2007. **71**(7): p. 619-28.
102. Cunningham, P.N., et al., *Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure*. J Immunol, 2004. **172**(4): p. 2629-35.
103. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
104. Palssson-McDermott, E.M., et al., *TAG, a splice variant of the adaptor TRAM, negatively regulates the adaptor MyD88-independent TLR4 pathway*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 579-86.
105. Carty, M., et al., *The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling*. Nat Immunol, 2006. **7**(10): p. 1074-81.
106. Shi, M., et al., *TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 369-77.
107. Tanaka, T., M.J. Grusby, and T. Kaisho, *PDLIM2-mediated termination of transcription factor NF-kappaB activation by intranuclear sequestration and degradation of the p65 subunit*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 584-91.
108. Taganov, K.D., et al., *NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(33): p. 12481-6.
109. Sheedy, F.J., et al., *Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 141-7.
110. Kawagoe, T., et al., *TANK is a negative regulator of Toll-like receptor signaling and is critical for the prevention of autoimmune nephritis*. Nat Immunol, 2009. **10**(9): p. 965-72.
111. Matsushita, K., et al., *Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1185-90.
112. Qin, J., et al., *SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor- and toll-like receptor 4-mediated signaling through different mechanisms*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 25233-41.
113. Mitcham, J.L., et al., *T1/ST2 signaling establishes it as a member of an expanding interleukin-1 receptor family*. J Biol Chem, 1996. **271**(10): p. 5777-83.
114. Dinarello, C.A., *Interleukin-1*. Cytokine Growth Factor Rev, 1997. **8**(4): p. 253-65.
115. Neumann, D., et al., *The membrane form of the type II IL-1 receptor accounts for inhibitory function*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3350-7.
116. Wald, D., et al., *SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling*. Nat Immunol, 2003. **4**(9): p. 920-7.
117. O'Neill, L.A., *SIGIRR puts the brakes on Toll-like receptors*. Nat Immunol, 2003. **4**(9): p. 823-4.
118. Sims, J.E., S.L. Painter, and I.R. Gow, *Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors*. Cytokine, 1995. **7**(6): p. 483-90.
119. Thomassen, E., B.R. Renshaw, and J.E. Sims, *Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the IL-1R superfamily*. Cytokine, 1999. **11**(6): p. 389-99.
120. Polentarutti, N., et al., *Unique pattern of expression and inhibition of IL-1 signaling by the IL-1 receptor family member TIR8/SIGIRR*. Eur Cytokine Netw, 2003. **14**(4): p. 211-8.
121. Garlanda, C., et al., *Intestinal inflammation in mice deficient in Tir8, an inhibitory member of the IL-1 receptor family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3522-6.
122. Barclay, A.N., *Membrane proteins with immunoglobulin-like domains--a master superfamily of interaction molecules*. Semin Immunol, 2003. **15**(4): p. 215-23.

123. Li, X. and J. Qin, *Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling*. J Mol Med, 2005. **83**(4): p. 258-66.
124. Lech, M., et al., *Different roles of TIR8/Sigirr on toll-like receptor signaling in intrarenal antigen-presenting cells and tubular epithelial cells*. Kidney Int, 2007. **72**(2): p. 182-92.
125. Drexler, S.K., et al., *SIGIRR/TIR-8 is an inhibitor of Toll-like receptor signaling in primary human cells and regulates inflammation in models of rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(8): p. 2249-61.
126. Watson, M.B., et al., *SIGIRR modulates the inflammatory response in the brain*. Brain Behav Immun, 2010. **24**(6): p. 985-95.
127. Veliz Rodriguez, T., et al., *Role of Toll interleukin-1 receptor (IL-1R) 8, a negative regulator of IL-1R/Toll-like receptor signaling, in resistance to acute Pseudomonas aeruginosa lung infection*. Infect Immun, 2012. **80**(1): p. 100-9.
128. Garlanda, C., et al., *Damping excessive inflammation and tissue damage in Mycobacterium tuberculosis infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling*. J Immunol, 2007. **179**(5): p. 3119-25.
129. Van Rooijen, N. and A. Sanders, *Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications*. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 83-93.
130. van Rooijen, N., A. Sanders, and T.K. van den Berg, *Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine*. J Immunol Methods, 1996. **193**(1): p. 93-9.
131. Teteris, S.A., K. Hochheiser, and C. Kurts, *Isolation of functional dendritic cells from murine kidneys for immunological characterization*. Nephrology (Carlton), 2012. **17**(4): p. 364-71.
132. Lech, M.M., *The function and regulation of single immunoglobulin IL-1-related receptor (SIGIRR) in kidney disease*, 2007. p. 41.
133. Russ, A.L., K.M. Haberstroh, and A.E. Rundell, *Experimental strategies to improve in vitro models of renal ischemia*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(2): p. 143-59.
134. Leonard, M.O., et al., *The role of HIF-1 alpha in transcriptional regulation of the proximal tubular epithelial cell response to hypoxia*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 40296-304.
135. Khan, S., et al., *Hypoxia induces renal tubular epithelial cell apoptosis in chronic renal disease*. Lab Invest, 1999. **79**(9): p. 1089-99.
136. Gstraunthaler, G., T. Seppi, and W. Pfaller, *Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. Are renal cells in tissue culture hypoxic?* Cell Physiol Biochem, 1999. **9**(3): p. 150-72.
137. de Souza Durao, M., Jr., et al., *The role of growth factors on renal tubular cells submitted to hypoxia and deprived of glucose*. Ren Fail, 2003. **25**(3): p. 341-53.
138. Tracey, W.R., et al., *Cardioprotective effects of ingliforib, a novel glycogen phosphorylase inhibitor*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **286**(3): p. H1177-84.
139. Ueda, N. and S.V. Shah, *Tubular cell damage in acute renal failure-apoptosis, necrosis, or both*. Nephrol Dial Transplant, 2000. **15**(3): p. 318-23.
140. Engvall, E., K. Jonsson, and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes*. Biochim Biophys Acta, 1971. **251**(3): p. 427-34.
141. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
142. Koschack, J., *Standardabweichung und Standardfehler: der kleine, aber feine Unterschied Standard Deviation and Standard Error: the Small But Important Difference*. Z Allg Med, 2008(84): p. 258 – 260.
143. Jang, H.R., et al., *The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney*. J Mol Med, 2009. **87**(9): p. 859-64.
144. Jang, H.R. and H. Rabb, *The innate immune response in ischemic acute kidney injury*. Clin Immunol, 2009. **130**(1): p. 41-50.

145. Sheridan, A.M. and J.V. Bonventre, *Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2000. **9**(4): p. 427-34.
146. De Greef, K.E., et al., *Anti-B7-1 blocks mononuclear cell adherence in vasa recta after ischemia*. *Kidney Int*, 2001. **60**(4): p. 1415-27.
147. Kelly, K.J., et al., *Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury*. *J Clin Invest*, 1996. **97**(4): p. 1056-63.
148. Fleming, T.J., M.L. Fleming, and T.R. Malek, *Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family*. *J Immunol*, 1993. **151**(5): p. 2399-408.
149. Bleesing, J.J. and T.A. Fleisher, *Human B cells express a CD45 isoform that is similar to murine B220 and is downregulated with acquisition of the memory B-cell marker CD27*. *Cytometry B Clin Cytom*, 2003. **51**(1): p. 1-8.
150. Akcay, A., Q. Nguyen, and C.L. Edelstein, *Mediators of inflammation in acute kidney injury*. *Mediators Inflamm*, 2009. **2009**: p. 137072.
151. Boros, P. and J.S. Bromberg, *New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(4): p. 652-8.
152. Pulskens, W.P., et al., *Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury*. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3596.
153. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. 2005: Elsevier Urban & Fischer. S. 732 ff.
154. Xiao, H., et al., *The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis*. *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 461-75.
155. Rock, K.L., et al., *The sterile inflammatory response*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 321-42.
156. Anders, H.J., V. Vielhauer, and D. Schlondorff, *Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease*. *Kidney Int*, 2003. **63**(2): p. 401-15.
157. Miura, M., et al., *Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(6): p. 2137-45.
158. Furuichi, K., et al., *Gene therapy expressing amino-terminal truncated monocyte chemoattractant protein-1 prevents renal ischemia-reperfusion injury*. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(4): p. 1066-71.
159. Duffield, J.S., et al., *Resolvin D series and protectin D1 mitigate acute kidney injury*. *J Immunol*, 2006. **177**(9): p. 5902-11.
160. El-Achkar, T.M., et al., *Tamm-Horsfall protein protects the kidney from ischemic injury by decreasing inflammation and altering TLR4 expression*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(2): p. F534-44.
161. Leonard, M.O., et al., *15-Epi-16-(para-fluorophenoxy)-lipoxin A(4)-methyl ester, a synthetic analogue of 15-epi-lipoxin A(4), is protective in experimental ischemic acute renal failure*. *J Am Soc Nephrol*, 2002. **13**(6): p. 1657-62.
162. Rogers, N.M., et al., *Review article: Kidney dendritic cells: their role in homeostasis, inflammation and transplantation*. *Nephrology (Carlton)*, 2009. **14**(7): p. 625-35.
163. Paterson, H.M., et al., *Injury primes the innate immune system for enhanced Toll-like receptor reactivity*. *J Immunol*, 2003. **171**(3): p. 1473-83.
164. Arslan, F., et al., *TLR2 and TLR4 in ischemia reperfusion injury*. *Mediators Inflamm*, 2010. **2010**: p. 704202.
165. Zhao, P., et al., *Deficiency in TLR4 signal transduction ameliorates cardiac injury and cardiomyocyte contractile dysfunction during ischemia*. *J Cell Mol Med*, 2009. **13**(8A): p. 1513-25.
166. Tahara, T., et al., *Toll-like receptor 2 (TLR) -196 to 174del polymorphism in gastro-duodenal diseases in Japanese population*. *Dig Dis Sci*, 2008. **53**(4): p. 919-24.
167. Boyd, J.H., et al., *Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response*. *Cardiovasc Res*, 2006. **72**(3): p. 384-93.

168. Kruger, B., et al., *Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3390-5.
169. Noris, M., et al., *The Toll-IL-1R member Tir8/SIGIRR negatively regulates adaptive immunity against kidney grafts*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4249-60.
170. Kawai, T., et al., *HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression*. N Engl J Med, 2008. **358**(4): p. 353-61.
171. Tamura, T., et al., *The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 535-84.
172. Shaffer, A.L., et al., *IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy?* Clin Cancer Res, 2009. **15**(9): p. 2954-61.
173. Klein, U., et al., *Transcription factor IRF4 controls plasma cell differentiation and class-switch recombination*. Nat Immunol, 2006. **7**(7): p. 773-82.
174. Zheng, Y., et al., *Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses*. Nature, 2009. **458**(7236): p. 351-6.
175. Brustle, A., et al., *The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 958-66.
176. Huber, M., et al., *IRF4 is essential for IL-21-mediated induction, amplification, and stabilization of the Th17 phenotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20846-51.
177. Negishi, H., et al., *Negative regulation of Toll-like-receptor signaling by IRF-4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 15989-94.
178. Watanabe, T., et al., *Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis*. J Clin Invest, 2008. **118**(2): p. 545-59.
179. Lassen, S., et al., *Ischemia reperfusion induces IFN regulatory factor 4 in renal dendritic cells, which suppresses postischemic inflammation and prevents acute renal failure*. J Immunol, 2010. **185**(3): p. 1976-83.
180. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 317-26.
181. Vinuesa, E., et al., *Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/reperfusion injury*. J Pathol, 2008. **214**(1): p. 104-13.
182. Van Genderachter, J.A., et al., *Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion*. Immunobiology, 2006. **211**(6-8): p. 487-501.
183. Loverre, A., et al., *Ischemia-reperfusion injury-induced abnormal dendritic cell traffic in the transplanted kidney with delayed graft function*. Kidney Int, 2007. **72**(8): p. 994-1003.
184. Lu, X., et al., *C57BL/6 and 129/Sv mice: genetic difference to renal ischemia-reperfusion*. J Nephrol, 2012. **25**(5): p. 738-43.
185. Foti, M., et al., *Dendritic cells in pathogen recognition and induction of immune responses: a functional genomics approach*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(5): p. 913-6.
186. Liu, M., et al., *Protective effects of Toll-like receptor 4 inhibitor eritoran on renal ischemia-reperfusion injury*. Transplant Proc, 2010. **42**(5): p. 1539-44.

Abkürzungen

ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i> (Angiotensin konvertierendes Enzym)
ADQI	<i>Acute Dialysis Quality Initiative</i> (Fachgesellschaft)
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i> (erworbenes Immundefektsyndrom)
AKI	<i>acute kidney injury</i> (akute Nierenschädigung)
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ANV	akutes Nierenversagen
APC	<i>antigen presenting cell</i> (s. APZ)
APES	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> (akutes Lungenschädigungssyndrom)
ARF	<i>acute renal failure</i> (s. ANV)
ATN	akute Tubulusnekrose
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BPH	benigne Prostatahyperplasie
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinder-Serumalbumin)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CMV	Cytomegalievirus
COX	Cyclooxygenase
CpG-DNA	synthetische DNA-Oligonukleotide mit CpG-Motiv
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>
DC	<i>dendritic cell</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	<i>disseminated intravascular coagulation</i> (disseminierte intravasalen Koagulopathie)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	allgemeine Schreibweise für Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemielumineszenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	et alii
F4/80	Antigen für interstitielle Makrophagen
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Rinderserum)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GLUT	Glukosetransporter
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (Granulozyten/Makrophagen-Wachstumsfaktor)
HBSS	<i>Hank's balanced Salt Solution</i>
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic Acid</i>
HIF-1 α	<i>hypoxia-inducible factor 1α</i> (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α)
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> (humans Leukozytenantigen)
HMGB1	<i>high mobility group box 1</i>
HMV	Herzminutenvolumen
hpf	<i>high power field</i> (Gesichtsfeld)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSV	Herpes-simplex-Virus

HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i> (interzelluläres Haftungsmolekül-1)
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeat</i> (Leucin-reiche Wiederholungssequenz)
Mac-1	Makrophagen-/Dendritische Zellen-Antigen
MACS	<i>magnetic assisted cell sorting</i>
MCP-1/CCL2	<i>monocyte chemoattractant protein-1/CC-chemokine ligand 2</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (s. HLA)
MIP-2/CXCL2	<i>macrophage inflammatory protein-2/CXC ligand 2</i>
miR-16	Micro-RNA-16
MOV	Multiorganversagen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
mTEC	<i>murine tubular epithelial cells</i> (murine Tubulusepithelzellen)
n.d.	nicht durchgeführt
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
NLR	<i>NOD-like receptor</i> (NOD-ähnlicher Rezeptor)
NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAS	<i>periodic-acid Schiff stain</i> (Perjodsaures Schiff-Reagenz)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PGE-1	Prostaglandin E-1
PGK-1	Phosphoglyceratkinase-1
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PS	Penicillin/Streptomycin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGE	<i>receptor for advanced glycolisation endproducts</i>
RANTES/CCL5	<i>regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted/CC-ligand 5</i>
rDC	<i>renal dendritic cell</i> (renale dendritische Zelle)
RIG	<i>retinoic acid-inducible gene</i>
RKM	Röntgen-Kontrastmittel
RLH	<i>RIG-like helicase</i>
RLOT	<i>reflected light oblique translumination</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Zellkultur-Medium zur Anzucht humaner Leukozyten)
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i> (respiratorischer Synzytial-Virus)
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-PCR</i> (reverse Transkriptase-PCR, s. PCR)
SCreat	Serumkreatinin-Konzentration
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SIGIRR	<i>single immunoglobulin interleukin 1 receptor-related protein</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
T3	Trijodthyronin

Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TEC	<i>tubular epithelial cell</i> (Tubulusepithelzelle)
T _H 1	T-Helfer-Zelle Typ 1
T _H 2	T-Helfer-Zelle Typ 2
TICAM	<i>TIR-containing adaptor molecule</i>
TIR	<i>Toll-interleukin-1 receptor domain</i>
TIR8	<i>Toll-interleukin-1 receptor 8</i>
TIRAP	<i>Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein</i> (s. TICAM)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain containing adaptor protein inducing Interferon β</i>
TTP	thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
UO	<i>urinary output</i> (Diurese)
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (Gefäß-Wachstumsfaktor)
vs.	versus
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
DGF	<i>delayed graft function</i> (verzögerte Transplantat-Funktion)