

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

Vorstand: Prof. Dr. Martin Reincke

**Die TLR4-induzierte Produktion von IL-22 durch renale
mononukleäre Phagozyten fördert die Nierenregeneration nach
einer ischämischen Nierenschädigung**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Ingo Hartter, MSc

aus

Oberwart (Österreich)

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: PD Dr. Stephan Lederer
Prof. Dr. Bärbel Lange-Sperandio
Prof. Dr. Wolfgang Neuhofer

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	1
1.1 Der akute Nierenschaden	1
1.2 Epidemiologie und Ätiologie der akuten Nierenschädigung	1
1.2.1 Pathophysiologie des ischämischen akuten Nierenschadens	3
1.2.2 Die renale Regeneration nach einem akuten Nierenschaden	9
1.3 Die Rolle des Immunsystems während des akuten Nierenschadens	9
1.3.1 Das angeborene Immunsystem	10
Die Charakterisierung von Toll-like Rezeptoren	12
Die TLR und ihre Rolle beim akuten ischämischen Nierenschaden	15
TLR und Regeneration	17
Die Charakterisierung von renalen mononukleären Phagozyten	18
Die Rolle von rMoPh beim akuten ischämischen Nierenschaden	20
1.4 Interleukin-22	23
1.4.1 Die Entdeckung, Struktur und der codierende Genlocus von IL-22	23
1.4.2 Der IL-22-Rezeptorkomplex und seine Signaltransduktion	23
1.4.3 Die Herkunft / Bildungsstätten von IL-22 im Organismus	24
1.4.4 Effekte von IL-22	25
1.5 Ziel der Untersuchung	27
2 Material und Methoden	28
2.1 Material	28
2.1.1 Geräte	28
2.1.2 Materialien	28
2.1.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen	29
2.1.4 TLR-Liganden, Zytokine und Stimulanzen	30
2.1.5 Antikörper	30
2.1.6 Reagenziensätze	31
2.2 Methoden	31
2.2.1 Tierversuche	31
Versuchstierhaltung	31
Versuchstiere	32
Induktion einer renalen Ischämie und Reperfusion	32
Injektion von Clodronat und IL-22	33

Injektion von TLR4-Antikörper	33
Injektion von rekombinantem IL-22	33
Bestimmung des Blut-Harnstoff-Stickstoff	33
2.2.2 Zellkultur	34
Isolation und Kultur primärer muriner Tubulusepithelzellen	34
Charakterisierung der murinen primären Tubulusepithelzellen.....	34
Isolation und Kultur dendritischer Zellen aus dem murinen Knochenmark	35
2.2.3 In-vitro Wundheilungsassay (Scratch-Assay).....	35
2.2.4 Proliferationsassay	35
2.2.5 Immunhistochemie und histopathologische Auswertung	36
Gewebe- und Immunhistochemie.....	36
Histopathologische Auswertung	36
ELISA.....	37
2.2.6 RNA-Analyse	37
Isolierung von RNA aus dem Gewebe	38
cDNA Synthese	38
RT-PCR (Light Cycler 480).....	39
2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)	39
2.2.8 Statistische Auswertung	40
2.2.9 Arbeitsaufteilung	40
3 Ergebnisse	41
3.1 Die Blockierung von endogenem IL-22 verhindert die epitheliale Regeneration bei einem akuten Nierenschaden.....	41
3.2 Interstitielle mononukleäre Phagozyten sind die Hauptquelle von renalem IL-22	45
3.3 Nekrotische Tubuluszellen bedingen eine Ausschüttung von IL-22 durch Freisetzung von TLR4-Liganden	51
3.4 Durch TLR4-Aktivierung ausgeschüttetes IL-22 fördert die Tubulusregeneration nach einem postischämischen akuten Nierenschaden.....	53
4 Diskussion.....	58
4.1 IL-22 als Regulator und pro-regeneratorischer Faktor während des akuten Nierenschadens	58
4.2 Renale mononukleäre Phagozyten produzieren IL-22 während des akuten Nierenschadens	60
4.3 Die Rolle von TLR 4 bei der Regeneration nach einem akuten Nierenschaden.....	61
4.4 Limitationen der Arbeit.....	63
Literaturverzeichnis	64
Danksagung	74
Affidavit	75
Publikationsliste	76

Zusammenfassung

Eine Entzündung geht mit einer Leukozytenaktivierung in Gewebsverletzungen einher, die zu Schäden und wesentlichen Umstrukturierungen des betroffenen Gewebes führt. Toll-like Rezeptoren sind unter Anderem essentielle Mediatoren von Inflammation und Nekroptose im renalen Tubulussystem bei einer akuten ischämischen Nierenschädigung. Besonders renale mononukleäre Phagozyten sind für die Entzündungsprozesse nach einem akuten Nierenschaden verantwortlich. Gleichzeitig wurde jedoch gezeigt, dass von Leukozyten produzierte Wachstumsfaktoren wichtig für die Wundheilung und Reparaturmechanismen sind. Ein Beispiel dafür sind M2 Makrophagen, die in der postentzündlichen Phase die Entzündung durch Sekretion von IL-10 und anderen anti-entzündlichen Mediatoren stoppen. Die Rolle von Leukozyten und im Besonderen jener von renalen mononukleären Phagozyten während der Regenerationsphase der Niere ist noch weitgehend ungeklärt. Unsere Hypothese lautet, dass die TLR-abhängige Aktivierung der intrarenalen mononukleären Phagozyten (CD11b⁺ rMoPh/ CD103⁺ rMoPh) neben bekanntermaßen Inflammation und Gewebsschädigung auch Interleukine induzieren, welche die Fähigkeit haben, um die Regeneration der Niere nach einem akuten Nierenschaden zu fördern.

In Vorarbeit zu dieser Arbeit nutzten wir die Isolation von primären tubulären Epithelzellen (TECs) als einen in-vitro Assay, um das Potenzial, das Tubuluszellüberleben sowie auch das regenerative Auswachsen von überlebenden TECs im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu verbessern, von 25 Interleukinen zu testen. Hierbei zeigte nur IL-22 eine überaus signifikante Verbesserung der Regeneration von Tubuluszellen¹. Die pharmakologische Blockade des JAK/STAT und ERK1/2 Signalweges im IL-22 Signalweg hebt das regenerative Potenzial von IL-22 auf. Um die Rolle des IL-22 während eines akuten ischämischen Nierenschadens zu testen, induzierten wir einen über Ischämie-Reperfusion verursachten Schaden durch operative, unilaterale Abklemmung des Nierenstammes von C57BL/6 Mäusen. Alle Analysen unserer in vivo Experimente wurden am Tag fünf durchgeführt, da unser besonderes Augenmerk auf der Regenerationsphase der Niere liegt. Immunhistologische Färbungen für IL-22 zeigten eine signifikant höhere Expression des Interleukins im Interstitium der Niere während der postischämischen Phase im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass die hauptsächlichen Produzenten des IL-22 CD11b⁺CD103⁺, CD11b⁺CD103⁻ und CD11b⁺CD11c⁺ Zellen sind. Sie gehören zu der Gruppe der renalen mononukleären Phagozyten (rMoPh). Die Depletion dieser rMoPh durch Injektion von Clodronat am Tag 2-4 führte zu einer signifikanten Abnahme von IL-22 in der postischämischen Niere, gemessen durch immunhistologische Färbungen, mRNA Analyse und Durchflusszytometrie, welche weniger IL-22⁺ rMoPh aufzeigte. Diese Verminderung von IL-22 führte zu einer Verschlimmerung des tubulären Schadens und einer signifikant verringerten Regeneration. Dies wird durch einem signifikant höheren Nekrose-Index (PAS-Färbung), signifikant weniger distalen (THP-Färbung) und proximalen Tubuli (Lectin-Färbung), sowie signifikant weniger PCNA⁺THP⁺ Zellen, welches die Regeneration der Tubuli veranschaulicht, aufgezeigt. Die Substitution von IL-22 durch die Injektion von rekombinanten mIL-22 (20 µg) am Tag 3 in der Clodronat-Gruppe kompensierte diesen Schaden und erhöhte die Regeneration signifikant gegenüber der Clodronat-Gruppe.

Da rMoPh durch zahlreiche endogene Liganden nach massiver Zellnekrose aktiviert werden, stimulierten wir Knochenmark-abstammende dendritische Zellen (BMDCs) mit TLR-Liganden, ROS, Ahr-Liganden und Überständen von nekrotischen TECs (NS) in vitro. Die Überstände von nekrotischen TECs (NS), Ahr-Liganden und ROS induzierten eine IL-22 Ausschüttung in Knochenmark-abstammenden dendritischen Zellen (BMDCs). Eine TLR4-Blockade reduzierte die NS-induzierte Produktion signifikant, wobei nur die Stimulation von TLR4, jedoch nicht die von TLR2/9, zu einer Produktion signifikanter Mengen an IL-22 durch BMDCs führte. Um seine funktionelle und physiologische Rolle zu untersuchen, wurden den Mäusen mit anti-IL-22-Antikörper, TLR4-Antikörper oder einem Kontroll-IgG-Antikörper vom Tag 2-4 postischämisch retroorbital injiziert und die Nieren wurden am Tag 5 analysiert. Die IL-22 Blockade, sowie auch die TLR-4 Blockade, verstärkte den tubulären Schaden, auffallend durch mehr nekrotische Tubuli (PAS-Färbung), reduzierte lebende distale Tubuli (THP und Lectin-Färbung) und erhöhte Expression der Schadens- und Entzündungsmarker wie π GTP, Kim-1, TGF- β , MCP-1 und TNF- α . Die TLR-4 Blockade verringerte die intrarenalen Populationen von CD11b⁺CD103⁻IL-22⁺, CD11b⁺CD103⁺IL-22⁺ und CD11c⁺IL-22⁺ Zellen, sowie auch die IL-22 Expression in den ischämischen Nieren signifikant.

Aus unseren Ergebnissen schließen wir, dass nekrotische Tubuli endogene Agonisten des TLR4 der intrarenalen CD11b⁺/CD103⁺ oder CD11b⁺/CD103⁻ mononukleären Phagozyten ausschütten, um deren Produktion von IL-22 anzuregen. IL-22 wiederum trägt zum Überleben von TECs und der tubulären Regeneration – mutmaßlich durch renale Progenitorzellen - über den STAT3/ERK Signaltransduktionsweg. IL-22 ist daher ein wichtiger Mediator der Nierenregeneration während des akuten Nierenschadens. Die Rolle der intrarenalen mononukleären Phagozyten ist hierbei nicht überflüssig, da eine direkte TLR-Stimulation der überlebenden TECs das Überleben oder die Reparaturmechanismen nicht beeinflusst. Diese Daten zeigen erstmalig die Rolle von renalen mononukleären Phagozyten, IL-22 und TLR in der Nierenregeneration.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Vorgänge im tubulären System bei einem akuten Nierenschaden	6
Abbildung 2: Ablauf der Schädigung des tubulären Systems bei einer akuten Nierenschädigung	8
Abbildung 3: Darstellung der Signaltransduktion der Toll-like-Rezeptoren.....	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung der DAMP-assoziierten Aktivierung des Immunsystems	16
Abbildung 5 Darstellung des Rezeptorkomplexes und der Signaltransduktion durch das Interleukin-22	24
Abbildung 6: IL-22-Ausschüttung nach renalem unilateralem und bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden.....	41
Abbildung 7: Ein Ischämie-Reperfusionsschaden bewirkt eine intrarenale IL-22-Expression	42
Abbildung 8: Die IL-22-Inhibition verhindert die Tubulus-Reparatur in der post-ischämischen Niere ..	43
Abbildung 9: Die Inhibierung von IL-22 reduziert die Anzahl der regenerierenden PCNA ⁺ THP ⁺ Zellen	44
Abbildung 10: Die mRNA der tubulären Schadensmarker Kim-1, π GST, α GST und FABP waren durch die IL-22-Blockade erhöht	44
Abbildung 11: IL-22-KO-Mäuse haben nach bilateralem, renalem Ischämie-Reperfusionsschaden eine verringerte tubuläre Regeneration.....	45
Abbildung 12: FACS-Analyse	46
Abbildung 13: FACS-Analyse	47
Abbildung 14: Immunhistochemische Färbungen auf IL-22 zeigten, dass die Depletion der Phagozyten durch Clodronat eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Reduktion von IL-22 bedingt	47
Abbildung 15: Die Depletion der IL-22-produzierenden Zellen inhibiert die Tubulusregeneration und aggraviert den Tubulusschaden nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden.....	49
Abbildung 16: Die mRNA-Expression der Schadensmarker α GST, π GST sowie FABP war durch die Depletion der renalen mononukleären Phagozyten durch Clodronat signifikant erhöht.....	50
Abbildung 17: Die Nierenfunktion - gemessen an der quantitativen Harnstoffkonzentration im Plasma - wurde am Tag 1 und Tag 5 nach bilateraler Ischämie gemessen	50
Abbildung 18: BMDCs schütten auf (B) AhR-Liganden, H ₂ O ₂ und (A) nekrotischem Überstand <i>in vitro</i> IL-22 aus.....	51
Abbildung 19: BMDCs schütten <i>in vitro</i> IL-22 auf Stimulation des TLR4 durch LPS aus, während die Stimulation anderer TLRs wohl die Ausschüttung von IL-6, jedoch nicht von IL-22 bedingen	51
Abbildung 20: Die IL-22-Ausschüttung durch Stimulation von BMDCs <i>in vitro</i> durch nekrotischen Überstand (NS) kann dosisabhängig durch einen TLR4-Antikörper vollständig unterdrückt werden...	52
Abbildung 21: Die Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine von BMDCs <i>in vitro</i> durch Stimulation mit nekrotischem Überstand.....	52
Abbildung 22: Die TLR4-bedingte IL-22-Ausschüttung fördert die Tubulusregeneration	54
Abbildung 23: Die mRNA der tubulären Schadensmarker π GST und Kim-1 waren durch die Behandlung mit einem TLR4-Antikörper in der postschämischen Niere signifikant höher als in der Kontrollgruppe	55
Abbildung 24: Eine späte Blockade des TLR4 vom Tag 2-5 nach dem bilateralen renalen Ischämie-Reperfusionsschaden ergibt eine schlechtere Regeneration der Nierenfunktion am Endpunkt, gemessen an der Plasma-Harnstoff-Konzentration	55
Abbildung 25: Immunologische Testung der Reinheit isolierter primärer Tubulusepithelzellen	56
Abbildung 26: Die direkte Stimulation von TECs mit TLR-Liganden bedingen <i>in vitro</i> keine signifikanten Proliferationsunterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: KDIGO-Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung	1
Tabelle 2: Formen und Ursachen der akuten Nierenschädigung mit Beispielen	3
Tabelle 3: Wichtige Transkriptionsmarker und Oberflächenantigene der unterschiedlichen Zellen im renalen mononukleären Phagozytensystem	19
Tabelle 4: Ablauf einer entzündlichen, postischämischen Reaktion mit Makrophagen-Phänotyp.....	22
Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer.....	39
Tabelle 6: Clodronat-induzierte Depletion der IL-22-produzierenden Zellen in der post-ischämischen Niere.	47

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCL	B-cell lymphoma (Protein)
BSA	Bovines Serum Albumin
BUN	blood-urea-nitrogen
CCL	CC-chemokine ligand
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CSF	colony stimulating factor
CTGF	connective tissue growth factor
CXCL	CXC-chemokine ligand
DAMP	danger-associated-molecular-patterns
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular-signal-related kinase 1
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FBS	Fetales bovines Serum
Foxc2	Forkhead box protein C2
ICAM-1	intracellular adhesion molecule 1
TGF- β 1	transforming growth factor beta 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-22BP	IL-22 bindendes Protein
IRAK	IL-1R-associated kinases
IRF3	Interferon-regulatory-factor 3
Igf1	Insulin-like growth factor 1
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
JAK	Janus Kinase
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid

MACS	magnetic bead separation
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MD2	Lymphozytenantigen 96
MMP	Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
mTOR	mammalian target of rapamycin
MyD88	differentiation primary-response protein 88
NCAM	Neurales Zelladhäsionsmolekül
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain-like
NTP	Nukleosidtriphosphate
PAMP	pathogen associated molecular patterns
PAS	Periodic acid-Schiff reaction
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PRR	pathogen recognition receptors
RLH	retinoic-acid-inducible protein-like helicases
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAB	TAK1-bindendes Protein
TAK1	transforming-growth factor-beta-activated kinase
Taq	Thermus aquaticus
TEC	Tubulusepithelzelle
THP	tamm-horsfall-protein
TIR	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
TIRAP	TIR-domain adaptor protein
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TRAF 6	tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6
TRIF	TIR-domain-containing adaptor protein inducing Interferon-beta
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TYK	Tyrosinkinase

1 Einleitung

1.1 Der akute Nierenschaden

Die akute Nierenschädigung ist eines der häufigsten nephrologischen Krankheitsbilder. Das Hauptsymptom bei einer akuten Nierenschädigung ist eine abnehmende Urinausscheidung, auch Oligurie genannt (Urinproduktion < 500 ml/24 h), bis hin zur Anurie (Urinproduktion < 100 ml/24 h)². Dadurch kommt es zu einer fehlenden Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen und von Wasser, was ohne Behandlung konsequent zu den Hauptkomplikationen Überwässerung bzw. Hypervolämie, Elektrolytentgleisungen, Urämie und Infektionen (z.B.: Urosepsis) führt. Problematisch bei der Diagnostik der akuten Nierenschädigung ist zudem, dass das Krankheitsbild und dessen Progredienz selten mit Schmerzen einhergeht³.

Lange Zeit gab es keine zufriedenstellende, bzw. zu zahlreiche und unterschiedliche Definitionen des akuten Nierenschadens. Seit 2012 gibt es zur Definition und Klassifizierung des akuten Nierenschadens eine Stadieneinteilung der KDIGO (Verband „Kidney Disease – Improving Global Outcomes“). Davor wurde die akute Nierenschädigung durch RIFLE und AKIN klassifiziert. Die Klassifizierung beinhaltet zur Einstufung der verschiedenen Stadien der akuten Nierenschädigung die beiden Parameter Serumkreatinin und Urinausscheidung (siehe Tabelle 1). Ist eines der beiden Kriterien erfüllt, ist die Klassifizierung des Schweregrads möglich⁴.

Tabelle 1: KDIGO-Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung

Stadium	Serumkreatinin	Urin-Ausscheidung
1	1,5- bis 1,9-facher Kreatininanstieg innerhalb von 7 Tagen oder Kreatininanstieg \geq 0,3 mg/dl innerhalb von 48 Stunden	< 0,5 ml/kg KG/h über mehr als 6 Stunden
2	2- bis 2,9-facher Kreatininanstieg	< 0,5 ml/kg KG/h über mehr als 12 h
3	\geq 3-facher Kreatininanstieg oder Serumkreatinin \geq 4mg/dl mit einem akuten Anstieg \geq 0,5 mg/dl	< 0,3 ml/kg KG/h über mehr als 24 h oder fehlende Urinausscheidung (Anurie) für mindestens 12 h

1.2 Epidemiologie und Ätiologie der akuten Nierenschädigung

Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen der Epidemiologie, Inzidenz und Prävalenz der akuten Nierenschädigung. Eine groß angelegte Studie aus den USA geht von einer Inzidenz von 1811 - 2880 pro 100000 Einwohnern aus^{5,6}. Es wird angenommen,

dass je nach Studie 2-5 % der hospitalisierten Patienten einen akuten Nierenschaden entwickeln⁷. Eine Studie zeigte, dass ca. 57% der schwer erkrankten Patienten auf einer Intensivstation eine akute Nierenschädigung erleiden⁸. Eine akute Nierenschädigung ist zudem ein erheblicher Risikofaktor hinsichtlich der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, eines Myokardinfarkts und Schlaganfalls⁹. Dies bedingt auch die erhebliche Mortalität von 23% bei entlassenen Patienten nach einer akuten Nierenschädigung¹⁰ und somit eine ca. verdoppelte Mortalitätsrate im Vergleich zu Patienten ohne akute Nierenschädigung¹¹. Das Risiko nach einer akuten Nierenschädigung ein papilläres Nierenzellkarzinom zu entwickeln ist ebenfalls erhöht¹². Diese Zahlen verdeutlichen, dass ein besseres Verständnis über dieses Krankheitsbild und die Entwicklung von neuen Therapien sowohl für die eine bessere Patientenversorgung, als auch in ökonomischer Hinsicht wesentlich sind.

Hinsichtlich der Ätiologie unterteilt man den akuten Nierenschaden in drei Gruppen - das prärenale, intrarenale und postrenale Nierenschädigung. Die häufigsten Ursachen der drei Gruppen werden in Tabelle 2 aufgezählt. Die Zuordnung ist essentiell für eine suffiziente Therapie und Prognose.

Die prärenale akute Nierenschädigung ist durch eine transiente Minderperfusion aufgrund verschiedenster Ursachen bedingt. Bei temporären bzw. Perfusionsminderungen ist die Niereninsuffizienz in der Regel ohne Folgeschäden rückläufig. Bei langfristigen bzw. schweren Perfusionsminderungen kommt es aufgrund der Ischämie zu einer akuten Tubulusnekrose als Form der intrarenalen Nierenschädigung. Es ist auch zusammen mit der akuten ischämischen Tubulusnekrose zu ungefähr 75% ursächlich für eine akute Nierenschädigung¹³. Hierbei besteht zwischen der prärenalen Nierenschädigung und der konsekutiven intrarenalen Nierenschädigung im Rahmen einer akuten Tubulusnekrose aufgrund der Ischämie ein enger Zusammenhang. Es kommt zu einer systemischen Minderperfusion durch Blutdruckabfall oder zu einem selektiven Abfall der Nierendurchblutung. Durch die Minderperfusion der Niere kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems und einer vermehrten Produktion und Ausschüttung von Vasopressin (ADH). Die Folge ist eine Vasokonstriktion im Gefäßsystem, einschließlich dem zuführenden Gefäßsystem der Niere. Dadurch kommt es zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate und zu einer hypoxischen Schädigung des tubulären Systems, welche zu einer akuten Tubulusnekrose führt³.

Die intrarenale akute Nierenschädigung wird durch verschiedenste pathologische Vorgänge innerhalb der Niere ausgelöst. Dazu gehören, zum Beispiel, die nephrotoxische Wirkung mehrerer Medikamente und Substanzen, eine Ischämie sowie Erkrankungen des Nierenparenchyms und der Glomeruli.

Bei einer postrenalen akuten Nierenschädigung kommt es durch Obstruktion der harnableitenden Wege zu einem Rückstau mit darauffolgender Schädigung des Nephrons. Häufige Ursachen sind z.B. Karzinome der Blase und Prostata oder eine benigne Prostatahyperplasie³.

Tabelle 2: Formen und Ursachen der akuten Nierenschädigung mit Beispielen

Prärenale Nierenschädigung	<ul style="list-style-type: none"> • Absoluter Volumenmangel (z.B. hämorrhagischer Schock, Exsikkose) • Relativer Volumenmangel (z.B. kardiogener Schock, dekompensierte Leberzirrhose) • Nierenarterienstenose • Häodynamisch bedingt/Selektive Ischämien (z.B. durch nicht-steroidale Antiphlogistika, ACE-Hemmer bei Nierenarterienstenose)
Intrarenale Nierenschädigung	<ul style="list-style-type: none"> • Vaskulär (z.B. Vaskulitis) • Akute Glomerulonephritis • Akute interstitielle Nephritis • Akute Tubulusnekrose <ul style="list-style-type: none"> ○ Ischämie (hervorgehend aus prärenalener Nierenschädigung) ○ Nephrotoxisch <ul style="list-style-type: none"> ▪ Exogen (z.B. Cisplatin, Gentamicin, Röntgenkontrastmittel) ▪ Endogen (z.B. Myoglobin, Hämoglobin, Leichtkettenproteine, Oxalat- und Harnsäurekristalle)
Postrenale Nierenschädigung	Obstruktionen im Bereich der Ureter, des Blasenhalses oder der Urethra durch z.B. Karzinome, Steine, Koagel, Prostatahyperplasie, Phimose, Schwangerschaft, iatrogen

Hinsichtlich der Ätiologie der akuten Nierenschädigung ist die prärenale Nierenschädigung zu ca. 60%, die intrarenale Nierenschädigung zu ca. 35% und die postrenale Nierenschädigung zu ca. 5% als Ursache anzusehen¹⁴.

Da die Untersuchungen dieser Arbeit die Pathomechanismen der intrarenalen akuten Nierenschädigung in Form der akuten ischämischen Nierenschädigung, wie es z.B. während eines akuten Schocks oder bei Nierentransplantationen vorkommt, näher beschreiben, wird im Folgenden auf dieses näher eingegangen.

1.2.1 Pathophysiologie des ischämischen akuten Nierenschadens

Eine renale Ischämie mit anschließender Reperfusion in Form einer prärenal akuten Nierenschädigung und konsequenter akuter Tubulusnekrose als Form der intrarenalen Nierenschädigung ist, wie zuvor beschrieben, eine der häufigeren Ursachen für eine akute Nierenschädigung. Im Falle eines ischämischen Nierenschadens konnte festgestellt werden, dass diese Form der Nierenschädigung durch ein Missverhältnis zwischen Angebot und Bedarf des Sauerstoffs bzw. der Nährstoffe zu Lasten des Angebots im Nierengewebe entsteht. Dadurch kumulieren unter anderem auch vermehrt Abfallprodukte, welche aufgrund der Ischämie nicht abtransportiert werden können¹⁵. Dies führt zu Apoptose und Nekrose der tubulären Epithelzellen (= akute tubuläre Nekrose, ATN) und in Folge zu einem rapiden Verlust der Nierenfunktion mit Störungen des Wasser- und Elektrolythaushalts sowie einer verringerten Exkretion von Abfallprodukten¹⁶. Im Folgenden werden die vielfältigen Pathomechanismen des ischämischen Nierenschadens genauer beschrieben.

Eine besondere Rolle beim ischämischen akuten Nierenschaden nimmt das komplexe System der Mikrozirkulation mit seinen Gefäßen ein. Ihre Aufgabe ist es die Niere und im Besonderen die Tubuli mit Nährstoffen bzw. Sauerstoff zu versorgen und die rückresorbierten Moleküle wieder in den Organismus zu transportieren. Die Hauptfunktion der Niere, nämlich als Einheit für die Filtration des Plasmas sowie die Produktion von Urin, bedingt zudem, dass bei einem Organgewicht von 0,5% des Körpergesamtwichts 20% des kardialen Outputs die Niere durchfließen¹⁵. Trotz des hohen Blutdurchflusses sind die O₂-Partialdrücke in der Niere gering. Im Kortex herrscht ein durchschnittlicher Sauerstoffpartialdruck von 70 mmHg, während in der Medulla bei einem Sauerstoffpartialdruck von 20 mmHg schon bei physiologischen Bedingungen Zustände nahe der Hypoxie herrschen¹⁷. Die Diskrepanz zwischen hoher Blutversorgung und geringem Sauerstoffpartialdruck in der Medulla ist der speziellen Architektur des renalen Gefäßsystems geschuldet. Im Kortex herrscht ein großer Blutdurchfluss, der für die glomeruläre Filtration notwendig ist. Im Gegensatz dazu benötigt die Aufrechterhaltung der osmotischen corticomedullären Gradienten im tubulären System einen langsamen Blutdurchfluss durch die Vasa recta. Hierfür ist die Mikrozirkulation mit beinahe allen von den efferenten Arteriolen der juxtamedullären Glomeruli entspringenden, herabsteigenden *vasa recta* seriell organisiert. Diese Tatsache verbunden mit den arteriovenösen Shunts zwischen den absteigenden und aufsteigenden Vasa recta beeinträchtigt das Sauerstoffangebot in der Medulla¹⁸. Das Paradoxe an der Tatsache, dass die medullären Regionen schon unter physiologischen Bedingungen am Rande einer Hypoxie stehen, ist, dass besonders diese Regionen des tubulären Systems einen im Vergleich zu anderen Abschnitten sehr hohen Energieverbrauch aufweisen wie das S3 Segment des proximalen Tubulus und der medulläre aufsteigende Schenkel der Henle'schen Schleife¹⁹. Daher sind diese Anteile des tubulären Systems bei einem akuten ischämischen Nierenschaden zuerst und auch am stärksten betroffen. Der aus der Wasser- und Elektrolytreabsorption resultierende hohe Energieumsatz macht es nämlich zusätzlich anfällig auf eine Dysbalance der O₂-Versorgung²⁰. Unter normalen Bedingungen werden 80% des renalen Sauerstoffverbrauchs dafür verbraucht, die Na⁺-K⁺-ATPase im proximalen Tubulus anzutreiben. Hier werden ungefähr zwei Drittel des Natriumchlorids reabsorbiert²¹. Im Tiermodell zeigt sich daher auch, dass besonders das S3 Segment des proximalen Tubulus bei einer Hypoxie signifikant stärker vom Schaden betroffen ist als die anderen Tubulussegmente¹⁹.

Ein Abfall des totalen renalen Blutdurchflusses auf ungefähr 50% wird als eine wichtige Ursache des akuten Nierenschadens angesehen²². Dieser Abfall alleine jedoch kann die Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) während eines akuten Nierenschadens nicht erklären²³. Wichtiger scheinen die regionalen Unterschiede der Durchblutung während eines akuten Nierenschadens zu sein, die durch das Endothel vermittelt werden²⁴. Die Endothelzellen spielen eine maßgebliche Rolle bei der vaskulären Konstriktion bzw. Dilatation, sowie der Leukozytenfunktion, zwei wesentliche Bestandteile des Pathomechanismus bei einem akuten Nierenschaden²⁵. Während eines akuten Nierenschadens werden das Endothel geschädigt und verschiedene Mediatoren ausgeschüttet, die zu einer starken Vasokonstriktion der Arteriolen in der postischämischen Niere führen. Die in diesem Fall wichtigsten Mediatoren sind Endothelin-1, Angiotensin II, Thromboxan A₂, Prostaglandin H₂, die Leukotriene C₄ und D₄, sowie Adenosin. Dieser vasokonstriktive Effekt wird durch die bei einem akuten Nierenschaden vorherrschende Sympathikusaktivierung nochmals verstärkt²⁶⁻²⁹. Erschwerend kommt hinzu, dass das

Endothel auf die eigentlich vasodilatierend wirkenden Mediatoren Azetylcholin, Bradykinin und NO schwächer reagiert, deren Produktion im geschädigten Endothel während eines akuten Nierenschadens ohnehin vermindert ist³⁰. Die Produktion vasoaktiver Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-32 sowie Endothelin sind Ausdruck einer vermehrten Leukozytenaktivität und charakteristisch für einen ischämischen Nierenschaden und verstärken den verengenden Effekt in den Arteriolen. Diese Vasokonstriktion durch endotheliale und Leukozyten-spezifische Mediatoren zusammen mit der Aktivierung der Koagulation verursacht eine rapide Verschlechterung mit einhergehender Ischämie, insbesondere in der Medulla²⁴. Die Aktivierung der *Macula densa* durch die höhere Natriumkonzentration im distalen Tubulus aufgrund der geringeren Rückresorption im geschädigten proximalen Tubulus, führt zu einer funktionellen, prä-glomerulären Vasokonstriktion der Arteriolen, um die Kräfte, welche auf die Glomeruli wirken, zu mildern. Gleichzeitig führt dies jedoch zu einer weiteren Zuspitzung der hypoxischen Zustände in der Medulla der Niere. Durch dieses sogenannte tubuloglomeruläre Feedback wird dieser Effekt noch unterstützt³¹. Durch den Verlust der Glykokalix auf dem geschädigten Endothel, der Unterbrechung des Aktin-Zytoskeletts und den Zusammenbruch der perivaskulären Matrix kommt es zu einer vermehrten Durchlässigkeit der Gefäße und zu einem konsequenten Verlust von Flüssigkeit an das umgebende Interstitium³². Darüber hinaus spielt das Endothel noch eine wichtige Rolle hinsichtlich der Leukozytenadhäsion während eines ischämischen Nierenschadens. Durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 auf geschädigten Endothelzellen, kommt es zu einer Aktivierung der Leukozyten und infolge zu einer Obstruktion der Kapillaren, sowie Transmigration von Leukozyten, einhergehend mit der Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen³³. Bei dieser entzündlichen Antwort auf eine Tubulusnekrose spielen dendritische Zellen und Makrophagen eine Schlüsselrolle, welche noch später in dieser Arbeit behandelt wird.

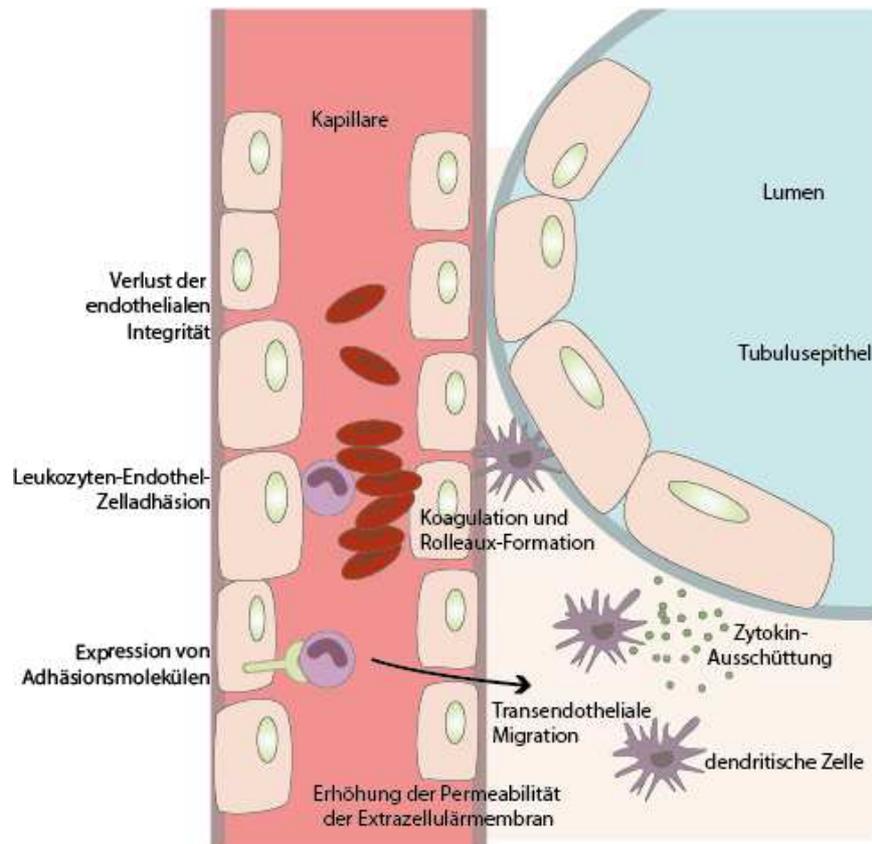


Abbildung 1: Darstellung der Vorgänge im tubulären System bei einem akuten Nierenschaden. a) Durch ischämische Schädigung kommt es zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Gefäßendothelzellen. Die Folge ist eine Adhäsion und Migration von Leukozyten in das Nierenparenchym, welche mit Stimulation durch dendritische Zellen eine Inflammation bedingen. Durch die Ausschüttung von Zyto- und Chemokinen und dem Zusammenbruch der perivaskulären Matrix wird die Migration der Leukozyten und die Inflammation noch verstärkt. b) zeigt einen histologischen Schnitt mit typischer Rouleaux-Formation der Erythrozyten und den Zusammenbruch der perivaskulären Matrix nach einem ischämischen Nierenschaden. Aus Sharfuddin & Molitoris³⁴

Eine länger andauernde Ischämie führt zu einer Reihe von metabolischen Veränderungen in der Tubulusepithelzelle. Eine der wichtigsten dieser Veränderungen ist das während einer Ischämie schwindende Depot an ATP und somit an Energie in der Zelle. Es ist unter anderem für den Antrieb der Na^+K^+ -ATPase essentiell. Der Mangel an Sauerstoff führt zu einer raschen Umwandlung von ATP zu ADP und AMP. Umso länger die Ischämie andauert, desto mehr AMP sammelt sich an und wird anschließend weiter zu Adenin-Nukleotiden und Hypoxanthin metabolisiert¹⁹. Sowohl das Fehlen des ATP als zellulärer Energielieferant, als auch die Bildung von Hypoxanthin haben schwerwiegende Folgen für die Zelle während einer Ischämie. Die ATP-Depletion führt zu einer beeinträchtigten Absonderung des Kalziums in das endoplasmatische Retikulum und zu einer geringeren Verdrängung des zytosolischen Kalziums in den extrazellulären Raum. Dies hat zur Folge, dass die intrazelluläre Kalziumkonzentration während eines ischämisch-akuten Nierenschadens stetig steigt. Das intrazelluläre Kalzium aktiviert verschiedene Proteasen und Phospholipasen. Dies wiederum geht mit einer Schädigung des Zytoskellets einher. Das aus AMP entstandene Hypoxanthin wiederum sammelt sich während der Ischämie an und wird während der Reperfusion zu Xanthin oxidiert. Neben Xanthin entstehen Hydrogenperoxid und Superoxid. Aus Hydrogenperoxid wird in der Gegenwart von Eisenionen das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($\text{OH}\cdot$) synthetisiert. Die tubuläre NO Synthase wird durch

die Ischämie aktiviert und das somit generierte NO interagiert mit dem Superoxid und es entsteht Peroxinitrat. Beide Sauerstoffradikale verursachen einen verheerenden tubulären Zellschaden durch die Oxidation von Proteinen, Peroxidation von Lipiden, DNA-Schaden und die Einleitung der Apoptose^{19,35}.

Die zuvor beschriebenen Umstände und Mechanismen haben einen großen Einfluss auf die Struktur des Tubulus mit schweren Folgen für die Aufrechterhaltung des tubulären Systems und somit auch der GFR. Einerseits kommt es zu wesentlichen Veränderungen im Bereich des apikalen Zytoskeletts der tubulären Zellen. Die zelluläre ATP-Depletion führt zu einem schnellen Zusammenfall und Aufbruch des apikalen Aktin-Zytosekeletts und zu einer Umverlagerung des Aktins und der Mikrovilli vom apikalen Pol der Zelle. Der Bürstensaum wird in das Lumen abgestoßen, formiert sich und führt zu Obstruktionen im Lumen des Tubulus³⁶. Dies führt auch zu dem Verlust der tight junctions und adherens junctions, welche die Tubuluszellen unter physiologischen Umständen zusammenhält und erst eine Organisation im Tubulus möglich macht³⁷. Zusammen verursachen die zuvor genannten Vorgänge den Verlust der Barriere und können den transtubulären Backleak von glomerulärem Filtrat in das Interstitium, welcher auch aufgrund der Obstruktion verursacht wird, weiter verstärken³⁸. Neben dem apikalen ist auch das basolaterale Zytoskelett von der Ischämie betroffen. Eine große Rolle spielt dabei der frühe Verlust der Na⁺-K⁺-ATPase und der beta-Integrine. Der Mangel der Na⁺-K⁺-ATPase führt zu erheblichen Störungen in der Natrium-Reabsorption im proximalen Tubulus und damit einer wichtigen physiologischen Funktion des tubulären Systems. Diese Tatsache erklärt den Anstieg der fraktionierten Natrium-Exkretion, einem wichtigen diagnostischen Parameter einer intrinsischen akuten Niereninsuffizienz. Integrine befinden sich am basalen Ende an der Tubuluszelle und haben die wichtige Aufgabe die Zell-Substratum Verbindung aufrecht zu halten. Durch den Verlust der beta-Integrine kommt es zu einem konsequenten Ablösen der überlebenschfähigen Zellen von der Basalmembran. Dies löst zusammen mit den zuvor genannten Mechanismen eine Obstruktion des tubulären Lumen einen weiteren Stimulus für die zelluläre Apoptose aus¹⁹.

Eine der wichtigsten Pathomechanismen der Tubulusschädigung bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden stellt die Nekrose dar. Die Nekrose stellt im Vergleich zu der Apoptose eine explosive, chaotische Form des Zelltodes dar. Während früher Nekrose als einheitliche Form des Zelltodes angesehen wurde, wird heute die Nekrose als eine doch durchaus regulierte Form des Zelluntergangs angesehen und auch je nach Pathomechanismus eingeteilt. Die unterschiedlichen Typen eines regulierten Zelltodes mit nekrotischem Phänotyp wären die Nekroptose, Pyroptose, Ferroptose, MPT-gesteuerte regulierte Nekrose (MTP, engl. *Mitochondrial permeability transition*) und Parthanatos³⁹. Als essentiell für die Tubulusschädigung im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens erscheint insbesondere die Nekroptose, aber auch die Ferroptose, die MPT-gesteuerte regulierte Nekrose, sowie die Pyroptose. Die Nekroptose ist definiert durch die Abhängigkeit von der RIPK-3 (engl. *Receptor-interacting protein kinase 3*), welche die Phosphorylierung der Pseudokinase MLKL (engl. *mixed lineage kinase domain-like*) bedingt. Die MLKL wiederum bedingt die Ruptur der Zellmembran durch die Bildung eines Zelltod-induzierenden Komplexes⁴⁰. Die wesentliche Bedeutung von Nekroptose wird auch durch eine Studie deutlich, die zeigte, dass das Fehlen von RIPK-3 eine protektive Wirkung bei einer renalen Ischämie-Reperfusion hinsichtlich der Zellnekrose und des Tubulusschadens hat^{41,42}. Die RIPK wird wiederum wird insbesondere durch die pro-entzündlichen

Zytokine TNF- α , IFN- γ direkt über ihre Rezeptoren und Signaltransduktionswege, aber auch durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren in direkter und indirekter Weise aktiviert⁴³. Hier wird eine direkte Beziehung zwischen einer entzündlichen Reaktion im Rahmen einer Ischämie-Reperfusion der Niere und dem nekrotischen Zelluntergang im Tubulussystem durch einen fatalen Zyklus zwischen Nekrose mit Freisetzung von DAMP aus der nekrotischen Zelle, sowie einer Entzündungsreaktion mit Produktion von pro-entzündlichen Mediatoren durch Immunzellen deutlich. Dieses Konzept eines autonomen, sich aufschaukelnden Zyklus unterschiedlicher Arten von regulierter Nekrose zwischen Immunsystem und Nekrose wird durch die Nekroinflammation beschrieben und ist ein wichtiges Konzept im Zusammenhang mit einer akuten ischämischen Nierenschädigung⁴⁴. Ein genaueres Verständnis über die Pathomechanismen der Nekroinflammation in der ischämischen Niere ist daher essentiell, um mögliche Therapien zu entwickeln.

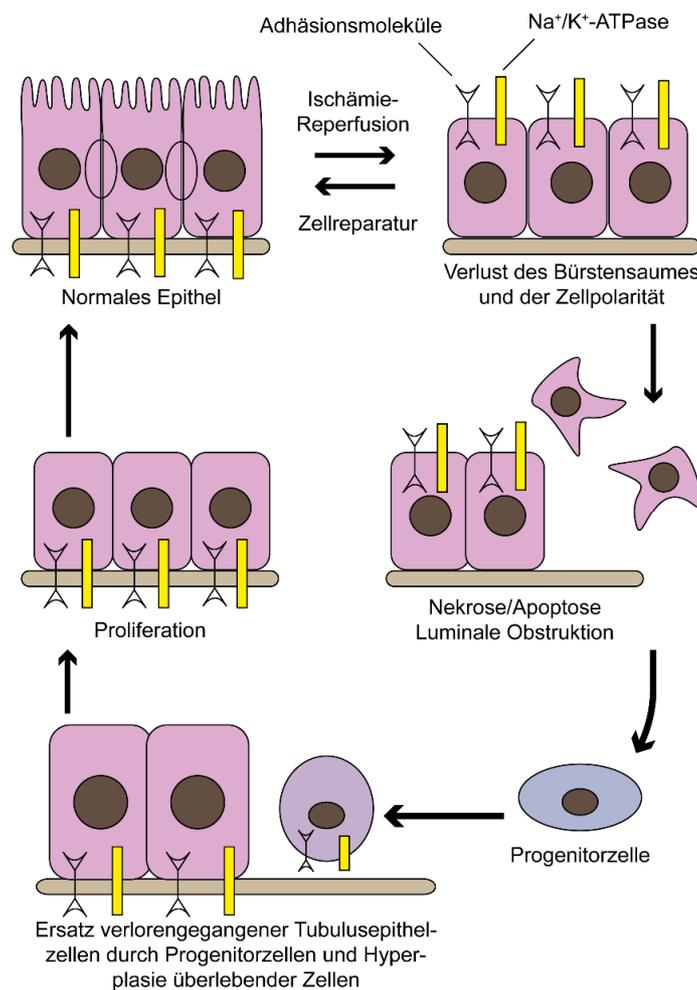


Abbildung 2: Ablauf der Schädigung des tubulären Systems bei einer akuten Nierenschädigung. Bei einer Hypoxie mit einhergehendem akuten Nierenschaden erfolgt die Schädigung des tubulären Systems in mehreren Schritten. Zuerst verlieren die Tubulusepithelzellen ihre Polarität sowie die zytoskeletale Integrität. Zudem verlieren die Tubulusepithelzellen im proximalen Tubulus den Bürstensaum im Lumen. Anschließend kommt es aufgrund des Polaritätsverlustes zu einer Mislokation von Adhäsionsmolekülen und anderen Membranproteinen wie die Na⁺-K⁺-ATPase und beta-Integrinen, was konsequenterweise zu einer Unterbrechung der Zelladhäsion führt. Die Hypoxie führt einige Tubulusepithelzellen in die Nekrose, während auch die noch überlebendefähigen Zellen aufgrund des Verlustes ihrer Adhäsionsfähigkeit sich von der Basalmembran ablösen, was zu einer verstärkten Permeabilität zwischen Tubuluslumen und peritubuläres Interstitium führt. Es kommt zu einer unkontrollierten Aufnahme des glomerulären Filtrats in das renale Interstitium. Überlebende Progenitorzellen ersetzen verlorengegangene Tubulusepithelzellen durch Proliferation. Verschonte Tubulusepithelzellen in noch weitgehend intakten Nephronen hypertrophieren zur Kompensation.

1.2.2 Die renale Regeneration nach einem akuten Nierenschaden

Nach einem ischämischen Nierenschaden mit konsekutiver Tubulusnekrose beginnt nach Inhibierung der Nekroinflammation durch anti-entzündliche Mediatoren und Ausbleiben der Noxe die Regenerationsphase. Verlorene Tubuluszellen können durch unreife Tubuluszellen – sogenannte Progenitorzellen – durch Teilung ersetzt werden. CD133⁺/CD24⁺/PAX2⁺ Stammzellen kommen in der Bowman'schen Kapsel und im proximalen Tubulus vor und treiben nach einer Schädigung die Regeneration voran⁴⁵. Moleküle wie Vimentin oder neural cell adhesion molecule (NCAM), welche normalerweise nur während der renalen Entwicklung vorkommen, werden auch nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden exprimiert²⁴. Diese renalen Pax2-positiven Progenitorzellen sind gegenüber schädigenden Einflüssen resistenter als normale Tubuluszellen können einen Tubulus in einem geschädigten Nephron nach einem ischämischen Nierenschaden durch Proliferation regenerieren. Ein zweiter Mechanismus zum Ersatz verlorener Nephrone ist Hypertrophie der verbleibenden Tubuluszellen in verschonten Nephronen durch Endoreplikation⁴⁶. Die Anwesenheit von tubulären Progenitorzellen und deren essentielle Rolle bei der Nierenregeneration konnte auch von anderen Arbeitsgruppen aufgezeigt werden⁴⁷. Die Regenerationsfähigkeit der Niere ist also maßgeblich vom Überleben dieser Progenitorzellen während eines Nierenschadens abhängig. Von Interesse ist daher, wie diese Progenitorzellen hinsichtlich ihrer Regenerationsfähigkeit stimuliert werden können. Auffällig ist auch, dass diese renalen, adulten Stammzellen eine hohe Expression des Toll-like-Rezeptors (TLR) 2 aufweisen und daher vermutet wird, dass Gefahrensignale zu einer Aktivierung der Nierenregeneration führen können⁴⁵.

Ist der Schaden im Tubulussystem zu groß und wenig bis keine Progenitorzellen mehr vorhanden, so setzt nach einer akuten Nierenschädigung die Fibrosierung des Gewebes ein. Häufig folgt diese ungeordnete und der Funktionalität schadende Weise der „Regeneration“ einem akuten Nierenschaden - mit weitreichenden klinischen Folgen⁴⁸. Besonders der Verlust des peritubulären Kapillarsystems nach einer schweren Hypoxie⁴⁹, sowie eine überschießende Immunantwort nach einem akuten Nierenschaden⁵⁰ werden als wesentliche Gründe einer solchen Fibrosierung angesehen. Die Herkunft der Myofibroblasten während einer Fibrosierung des Nierengewebes wird noch kontrovers diskutiert. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Myofibroblasten hauptsächlich von perivaskulären und einwandernden Fibroblasten abstammen. Die Ausschüttung von verschiedenen profibrotischen Zytokinen wie der Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) oder der connective tissue growth factor (CTGF) bewirkt eine Aktivierung weiterer residenten Fibroblasten, welche eine verstärkte Fibrosierung vorantreiben⁵¹.

1.3 Die Rolle des Immunsystems während des akuten Nierenschadens

Schon seit langem wurde beobachtet, dass toxische und hypoxische Noxen in der Niere keine ausreichende Erklärung für das Ausmaß und die Dauer eines akuten Nierenschadens sind. Das Immunsystem und seine Mechanismen zur Abwehr von Krankheitserregern wie zum Beispiel Bakterien, Viren und Parasiten spielt als Aggressor bei sogenannten nicht-entzündlichen Erkrankungen eine

entscheidende Rolle. Eine damit einhergehende Bildung von pro-entzündlichen Mediatoren wie Zytokinen und Chemokinen, sowie der darauffolgenden Rekrutierung von Leukozyten in die postischämische Niere verursachen einen großen Teil des Gesamtschadens. Man spricht aufgrund des Fehlens eines infektiösen Erregers auch von einer sterilen Entzündung^{52,53}. Im Folgenden wird daher das Immunsystem im Allgemeinen sowie hinsichtlich seiner Funktion und Wirkung bei einem akuten Nierenschaden näher beschrieben und erläutert.

Der menschliche Organismus ist tagtäglich einer potentiellen Infektion durch verschiedenste Krankheitserreger wie Bakterien, Viren oder Pilzen ausgesetzt. Umso wichtiger ist es, diese Mikroben über mehrere Verteidigungslinien daran zu hindern, eine manifeste Infektion mit konsequenter Ausschüttung von Toxinen und einem Konkurrenzkampf um die zur Verfügung stehenden Nährstoffe auszulösen. In Vertebraten übernimmt diese überlebenswichtige Aufgabe das Immunsystem.

Klassischerweise ist das Immunsystem in zwei Untersysteme unterteilt - in das angeborene und das adaptive Immunsystem. 99% aller Lebewesen besitzen ausschließlich ein angeborenes Immunsystem. Seine Aufgabe ist es schnell und effektiv eindringende Mikroorganismen zu erkennen und zu bekämpfen. Das angeborene Immunsystem ist die erste Antwort auf einen Erreger. Da es jedoch wenig flexibel ist und daher auch nicht "lernfähig", benötigt es bei ein und demselben Erreger die gleiche Kaskade an Ereignissen und Ressourcen, wie bei der ersten Infektion. Stunden bis Tage nach der ersten Immunantwort schaltet sich das adaptive Immunsystem ein. Es besitzt die entscheidende Eigenschaft, Mikroorganismen bei einem erneuten Eindringen sofort zu erkennen und durch Antikörper zu neutralisieren. Zusammen bilden sie ein suffizientes Immunsystem, das mit den meisten Gefahren aus der Umwelt zurechtkommen⁵⁴.

1.3.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist schon bei Neugeborenen ohne vorherigen Antigenkontakt aktiv und kann in den Organismus eindringende Pathogene erkennen und bekämpfen. Die Gene, welche für das angeborene Immunsystem codieren, werden von Geburt an nicht mehr zu neuen genetischen Varianten arrangiert. Da pathogene Mikroorganismen die natürliche Barriere zwischen Umwelt und Organismus in der Regel nicht überwinden können, ist dieser physikalischen und chemische Schutzschild, auch äußere Barriere genannt, von essentieller Bedeutung⁵⁵. Zu diesem Teil des angeborenen Immunsystems gehören auch die Haut und Schleimhaut als wichtigste physikalische Barrieren. Bei Unterbrechung der Hautbarriere können Mikroorganismen diese leicht überwinden und Infektionen verursachen. Weitere Barrieremechanismen sind unter anderem der "Säuremantel" der Haut, Lysozym in Tränenflüssigkeit, Speichel, Nasenschleim und auf der Haut, Muzine auf Schleimhäuten, das saure Sekret der Magenschleimhaut, die physiologische mikrobielle Flora, antimikrobielle Peptide wie Alpha-Defensine im Darm oder Beta-Defensine auf der Haut, sowie die Antikörper der IgG in der Tränenflüssigkeit und anderen Sekreten⁵⁵. Sie behindern Mikroorganismen entscheidend bei dem Versuch in den Organismus zu gelangen, wobei das Lysozym eine besondere Rolle zukommt. Es ist eine Muraminidase, die Murein (Peptidoglykane in der Zellwand von Bakterien) spaltet und somit Gram-positive Bakterien tötet, ohne dabei die körpereigenen Zellen zu beeinträchtigen, welche keine Murein aufweisen. Aufgrund seiner Eigenschaft zwischen "Freund" und

"Feind" zu unterscheiden, ist das Lysozym ein exzellentes Beispiel für ein Schlüsselprotein des angeborenen Immunsystems⁵⁵.

In dem Fall, dass die äußere Barriere versagt und diese von Mikroorganismen überwunden wird, kommt ein weiterer wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems zum Einsatz, das Komplementsystem. Das Komplementsystem bildet durch eine Kaskade einen Komplex, der die Lyse von Bakterien zur Folge hat, wobei die Aktivierung des Komplementsystems durch einen klassischen, einen alternativen oder durch den Lektin-vermittelten Weg erfolgen kann. Zudem binden Komplementfaktoren wie C1q oder C3b selektiv an die Pathogenoberfläche⁵⁵. Diese Faktoren werden durch Zellen mit Komplementrezeptoren, insbesondere durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten, erkannt und die damit markierten Zellen in Folge phagozytiert. Diese Erleichterung der Phagozytose nennt man Opsonierung. Durch chemotaktische Faktoren des Komplementsystems wie der lösliche Faktor C5a zusammen mit bakteriellen chemotaktischen Peptiden wie das formylierte Tripeptid fMLP werden weitere Neutrophile an den Ort der Inflammation gelockt und rekrutiert^{54,55}. Die Chemotaxis und die Opsonisierung durch das Komplementsystem macht eine erfolgreiche und schnelle Phagozytose möglich⁵⁵.

Wie oben beschrieben, gehören Makrophagen und neutrophile Granulozyten zu dem zellulären Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Makrophagen sind vor Ort die ersten Zellen, die mit den ins Gewebe eingedrungenen Mikroorganismen in Kontakt kommen. Sie organisieren und koordinieren viele der darauffolgenden Abwehrvorgänge und nehmen eine wichtige Rolle zur Induktion einer spezifischen Immunantwort als antigenrepräsentierenden Zellen einschließlich MHC-II-Expression ein. Sie spielen daher für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems neben den residenten dendritischen Zellen eine initiale und entscheidende Rolle⁵⁵. Residente Gewebemakrophagen werden bei Antigenkontakt aktiviert und schütten verschiedenste Entzündungsmediatoren wie z.B. IL-1 oder TNF-alpha aus. Dies führt zu weiterer Zytokinproduktion und Überexpression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, E-Selektin und P-Selektin seitens der Endothelzellen. Die durch Zytokine und Chemokine angelockten neutrophilen Granulozyten können dadurch besser mit dem Endothel interagieren und zum Ort des Geschehens ins Gewebe migrieren. Darüber hinaus ist ihre Funktion als Phagozyten auch in späteren Phasen der Inflammation von Bedeutung⁵⁵.

Nach der Antwort der Makrophagen auf die Mikroorganismen migrieren neutrophile Granulozyten, auch Neutrophile genannt, in das Gewebe. Neutrophile sind physiologischerweise im Blut oder in der Lunge zur Rekrutierung vorhanden, jedoch nicht im Gewebe wie die Makrophagen. Sie sind effektiver beim Phagozytieren und Abtöten von Bakterien und anderen Erregern. Dies beruht unter anderem auf der Tatsache, dass sie Superoxid-Anionen und andere Sauerstoffradikale bilden. Nach der Phagozytose bildet sich das sogenannte Phagolysosom, welches eine Fusion zwischen dem Phagosom, welches z.B. das phagozytierte Bakterium beinhaltet, und dem Lysosom. Verschiedene Proteasen und Sauerstoffradikale im Phagolysosom wirken bakterizid und fungizid⁵⁶. Im Anschluss produzieren auch neutrophile Granulozyten pro-entzündliche Mediatoren wie IL-8 und Leukotrien B₄, welche stark chemotaktisch auf weitere neutrophile Granulozyten wirken. Der wesentlichen Unterschiede zwischen Neutrophilen und Makrophagen sind, dass Makrophagen Antigenrepräsentierende Zellen sind während neutrophile Granulozyten Mikroorganismen effektiver eliminieren und dass Neutrophile im Gegensatz zu Makrophagen wenige Stunden nach Aktivierung und Migration

durch entzündliche Reize in den programmierten Zelltod, der Apoptose, übergehen⁵⁵. Zwei weitere Zelltypen des angeborenen Immunsystems sind die NK-Zellen, welche hauptsächlich der Abwehr von Viren zugeschrieben sind, sowie auch die residenten dendritischen Zellen, die wie Makrophagen zu den Antigen-präsentierenden Zellen gehören und die primäre Immunantwort koordinieren⁵².

Bei der zellulären Immunantwort ist besonders wichtig, dass pathologische Mikroorganismen überhaupt einmal erkannt und von körpereigenen Zellen diskriminiert werden. Dies geschieht am einfachsten, wenn Pathogene an der Oberfläche von Mikroorganismen als eine Art Marker benutzt. Diese Marker können zum Beispiel Lipide, Polysaccharide, Nukleinsäuren, gewisse Proteine oder andere Bestandteile von Mikroorganismen sein und werden auch pathogen associated molecular patterns (PAMP) genannt. Diese PAMPs wiederum werden von Mustererkennungsrezeptoren (PRR, engl. pattern recognition receptors) erkannt. Die PRR sind ein überaus wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und wird daher nicht nur in beinahe allen Immunzellen, sondern auch in verschiedensten Zellarten, welche nicht dem Immunsystem angehören, wie Epithelzellen oder Fibroblasten in unterschiedlichem Umfang exprimiert⁵⁴. Nach einer Erkennung von Mikroorganismen im Körper via PRR kann somit rasch eine Immunantwort generiert werden. PRRs haben neben ihrer Detektionsfunktion weitere Charakteristika. Sie werden konstitutiv in jeder Zellzyklusphase exprimiert, sind in der Keimbahn codiert und sind unabhängig von jeglichem immunologischen Gedächtnis. Zu den PRR gehören im Wesentlichen die Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl. Toll-like receptors, TLR), die NOD-ähnlichen Rezeptoren (engl. nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLR) und RIG-ähnliche Rezeptoren (engl. retinoic-acid-inducible protein-like helicases, RLH). Sie erkennen jeweils unterschiedliche Bestandteile von Mikroorganismen und sind essentiell für die Organisation der primären Immunantwort⁵⁷. Die Tatsache, dass die allgemeinen Mechanismen, welche der Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem zu Grunde liegen, in Pflanzen, Vertebraten bis hin zur Fruchtfliege weitgehend identisch sind, unterstreicht die Bedeutung von PRR.

Die Charakterisierung von Toll-like Rezeptoren

Wie schon zuvor beschrieben, sind TLR ein essentieller Bestandteil zur Detektion von Pathogenen. Ihren Namen haben die Toll-like Rezeptoren ihrer Ähnlichkeit zum Toll-Protein zu verdanken. Nach der Entdeckung der TLR in den 90er Jahren wurden sie zum Gegenstand intensiver Forschung, da bis dato ein recht vereinfachtes Bild vom angeborenen Immunsystem propagiert⁵⁸.

Bisher konnten 10 verschiedene TLR im menschlichen und 13 TLR im murinen Organismus identifiziert werden. Beim Menschen werden ausschließlich die TLR1-10 exprimiert. Während die Maus trotz der Expression drei weiterer TLRs nur 12 funktionale TLR besitzt, da TLR 10 aufgrund einer retroviralen Insertion keine Funktionalität aufweist. Durch gezielte Ausschaltung von einzelnen TLR in Mäusen konnte jedem TLR eine spezifische Funktion hinsichtlich der Erkennung von PAMPs zugeordnet werden. Im Allgemeinen können die TLR durch ihre Lokalisation auf der Zelle in zwei Gruppen eingeteilt werden. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 befinden sich auf der Zelloberfläche und erkennen hauptsächlich Lipide, Lipoproteine und Proteine als Membranbestandteile von Mikroorganismen (siehe Tabelle). Die zweite Gruppe besteht aus den TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9. Sie befinden sich in intrazellulären Vesikeln bzw. im endoplasmatischen Retikulum, Endosomen, Lysosomen und Endolysosomen und erkennen hauptsächlich mikrobielle Nukleinsäuren⁵⁸.

TLR sind Typ-I Transmembranproteine. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus einer Leucin-reichen Ektodomäne, während der zytoplasmatische Teil aus einer Toll/IL-1R (TIR) Domäne aufgebaut ist, die die Signaltransduktion ermöglicht. Die TIR Domäne ist bei TLR und beim IL-1R homolog aufgebaut, sodass die TLR auch zur großen Familie der Interleukin-1 Rezeptoren gehören⁵⁸. Durch die Bindung eines Liganden an einen TLR wird eine Signalkaskade im Inneren der Zelle ausgelöst. Es kommt zu einer Dimerisierung von TIR, welches durch die TIRAP (engl. toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein) detektiert wird. TIRAP wiederum vermittelt die Oligomerisierung mehrerer zytoplasmatischer Proteine. Diese Proteinbündel werden auch SMOC (engl. supramolecular organizing center) genannt⁵⁹. Unter diesen SMOC ist auch das Myddosom, welches die wichtigste Rolle in der Signaltransduktionskaskade der TLR spielt. Der Kern dieses Myddosoms beinhaltet mehrere Kopien des Schlüsselproteins MyD88 (engl. myeloid differentiation primary-response protein 88) und IRAK (engl. IL-1R-associated kinases)⁶⁰. Die Dichte der IRAK innerhalb des Myddosoms bedingt eine Autophosphorylierung und damit eine Rekrutierung von TRAF6 (engl. tumor-necrosis factor-receptor-associated factor 6). TRAF6 wiederum aktiviert die TAK1 (engl. transforming-growth factor-beta-activated kinase 1). Dies führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der NFκB-Familie und damit auch zur Translokation von NFκB in den Zellkern und konsequenterweise zur Expression von entzündlichen Zytokinen, aber auch zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Aktivator Protein 1 (AP-1) welches unter anderem pro-apoptotische Gene aktiviert^{59,61} (siehe Abbildung 3). Des Weiteren vermittelt TRAF6 die Rekrutierung von TBK1, welches die Glykolyse und somit den insgesamten Metabolismus in der Zelle erheblich steigert. Die Zelle wird somit für eine gesteigerte Proteinsynthese im Rahmen einer Entzündungsreaktion vorbereitet⁶¹. Zusammengefasst beinhaltet der sogenannte MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg folgende drei wesentliche Schritte: 1.) Die Dimerisierung der TLR-Rezeptoren nach Ligandenbindung, 2.) Den Zusammenschluss mehrerer essentieller Proteine bzw. Enzyme (v.a. MyD88) zu einem Myddosom und 3.) die Aktivierung mehrerer Kinasen durch das Myddosom, welche Transkriptionsfaktoren aktivieren und den Zellmetabolismus steigern⁵⁹.

Nach Erforschung der Signaltransduktion von TLR per MyD88 wurde in MyD88-defizienten Mäusen dennoch auf Stimulation mit LPS hin eine späte Aktivierung von NFκB beobachtet, was vermuten ließ, dass neben dem MyD88-abhängigen Weg auch eine MyD88-unabhängiger Weg existiert⁶². Bei Stimulation von TLR2, TLR5, TLR7 und TLR9 hingegen blieb die Produktion von IL-6 oder TNF-alpha, komplett aus^{63,64}. Der TLR4 sticht insofern heraus, da er als einziger TLR beide Signaltransduktionswege aktivieren kann. Einerseits aktiviert er mit seinem Adaptorprotein TIRAP den MyD88-abhängigen Weg, wie zuvor beschrieben. Andererseits kann er mittels Dimerisierung von TRAM (engl. für TRIF-related adaptor molecule) die Proteine TRIF (engl. für TIR-domain-containing adaptor protein inducing Interferon-beta), TRAF3 und TRAF6. Dieser Signaltransduktionsweg kann nur nach Endozytose an der endosomalen Membran erfolgen. TRAF6 bedingt wie auch im MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg beschrieben eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1. Außerdem führt die Interaktion von TRAM mit TRIF zu einer TRAF3-abhängigen Aktivierung der TBK1⁵⁹. Einerseits führt dies auch zu einer Steigerung der Glykolyse ähnlich dem MyD88-abhängigen Weg⁶⁵. Besonders jedoch für die TBK1 in diesem speziellen Signaltransduktionsweg ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 (engl. für Interferon-regulatory-factor 3), welcher die Transkription und

Produktion von Typ-1 Interferonen bedingt. Anders als im MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg wird dies durch eine Phosphorylierung des TRIF durch TBK1 bewirkt, welches dann mit dem IRF3 interagiert. Dies ist einzigartig für den TLR4^{59,66}. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieses Weges ist die Rolle in der Nekroptose und Apoptose nach TLR4-Aktivierung, da TRIF via RHIM (engl. receptor interacting protein homotypic interaction motif) mit RIPK1 interagiert, welche wiederum direkt die RIPK3 aktiviert und damit die Nekroptose ermöglicht. Während andere TLR über den Transkriptionsfaktor NFκB und darauffolgender Ausschüttung von TNF-α Nekroptose ermöglichen, kann der TLR4 dies über TRIF direkt durch Aktivierung von RIPK1/RIPK3⁶⁷. Dies unterstreicht die wichtige Rolle von TLR4 in der Nekroinflammation im Rahmen eines ischämischen Nierenschadens. Neben dem TLR4 aktiviert auch der TLR3 mit seinem Adaptormolekül TRIF (engl. für TIR-domain-containing adaptor protein inducing Interferon-beta) den MyD88-unabhängigen Weg⁶⁸. Dies führt jedoch ausschließlich zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 und es kommt zur Ausschüttung von Typ-1 Interferonen, nicht jedoch von entzündlichen Zytokinen über NFκB wie bei der Aktivierung von TLR4.

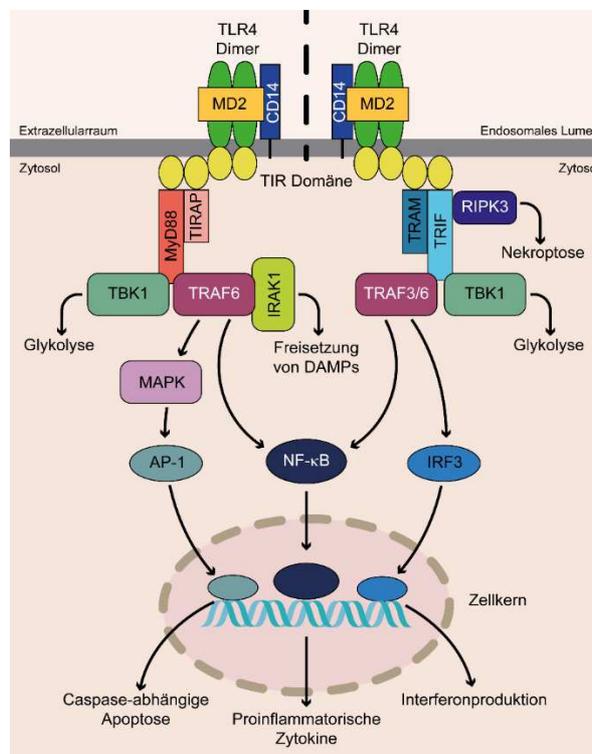


Abbildung 3: Darstellung der Signaltransduktion der Toll-like-Rezeptoren am Beispiel des TLR4. Der MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg erfolgt Bildung eines Myddosoms mit TRAF6, welches über IKK bzw. MAPK den Transkriptionsfaktor NFκB und AP-1 aktiviert. IRAK1 begünstigt zudem direkt die Freisetzung von DAMPs. Der MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg wird von den TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7 und TLR9 beschriftet. Der TLR3 aktiviert die MyD88-unabhängige Signaltransduktionskaskade über Aktivierung von TRIF und dem Transkriptionsfaktor IRF3. TBK1 führt bei beiden Wegen zu einer gesteigerten Glykolyse und damit zu einem gesteigerten Metabolismus. Der TLR4 Rezeptor kann sowohl die MyD88-abhängigen, als auch MyD88-unabhängigen (über das Adaptormolekül TRAM) Signaltransduktionskaskaden nach Endozytose auslösen. Im Gegensatz zum TLR3 kann hier jedoch neben IRF3 über TRAF3/6 auch NFκB aktiviert werden und über RIPK3 eine Nekroptose auslösen. Nach *Fitzgerald*⁵⁹

TLR4

Der TLR4 ist einer der ersten und auch wichtigsten TLR die entdeckt wurden. Sein prominentester Ligand ist das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS), welches ein Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien ist. Ein Synonym für LPS ist Endotoxin. Es gilt als ein potentes immuno-

stimulatorisches Agens Gram-negativer Bakterien^{57,58}. Poltorak et al. gaben den ersten Hinweis darauf, dass der TLR4 zur LPS-Erkennung notwendig ist⁶⁹. Um das LPS detektieren zu können, benötigt der TLR4 MD2, einen löslichen Faktor, der sich mit dem extrazellulären Teil des Rezeptors verbindet und den TLR4-MD2 Komplex bildet⁷⁰. Dieser Rezeptorkomplex ist die Hauptkomponente, welche LPS binden und erkennen kann. Der TLR4 in MD2^{-/-} Mäuse ist alleine nicht in der Lage LPS zu erkennen, was durch die Resistenz gegenüber einem LPS-induzierten Schock demonstriert wurde. Dieselben MD2-defizienten Mäusen jedoch sind gegenüber einer Infektion mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* anfälliger, was auf eine unzureichende Immunantwort ohne funktionalen TLR4-Rezeptorkomplex schließen lässt⁷¹. Der TLR4 ist also nicht in der Lage, seinen Liganden LPS direkt zu binden, im Gegensatz zu dem TLR2/ TLR1 Rezeptorkomplex⁷² oder dem TLR3^{73,74}. Neben MD2 sind auch CD14 und das LPS-bindende Protein (LBP) in der Erkennung von LPS involviert. Das LBP ist ein akutes Phase Protein, das LPS bindet und einen Komplex mit diesem formt. CD14 bindet das LBP, welches LPS an sich gebunden hat, und befördert es zum TLR4/ MD2 Komplex, welcher dadurch leichter aktiviert wird^{58,75}. MD2 und CD14 sind zudem wichtige Faktoren für die Endozytose von TLR4 und damit auch der Aktivierung des MyD88-unabhängigen Signaltransduktionsweges an der endosomalen Membran⁷⁶. Neben LPS kann der TLR4 noch eine Reihe weiterer PAMP erkennen und ist bei vielen pathologischen Mechanismen im Organismus von Bedeutung.

Die TLR und ihre Rolle beim akuten ischämischen Nierenschaden

Der akute ischämische Nierenschaden gehört zur Gruppe jener Erkrankungen, die keine infektiöse Genese aufweisen. Es konnte jedoch schon vor Entdeckung der TLR gezeigt werden, dass nicht-infektiöse ischämische Schädigungen unterschiedlicher Organe zu einem mehr oder minder großen Teil auf einer entzündlichen Reaktion des Immunsystems zurückzuführen sind. Eine Depletion von neutrophilen Granulozyten bei einer rein ischämischen Schädigung führte im Herzen⁷⁷, in der Lunge⁷⁸ oder im Skelettmuskel⁷⁹ zu einem signifikant geringeren Schaden. Ähnliche Experimente zeigten, dass eine Depletion von neutrophilen Granulozyten die Wundheilung beschleunigen kann⁸⁰. Schon früh wurde zudem festgestellt, dass dendritische Zellen, die mit toten Zellen *in vitro* stimuliert wurden, zu immunostimulatorischen Zellen reifen und somit aktiviert wurden⁸¹. Das bedeutet, dass das Immunsystem bei einer sogenannten "sterilen" Entzündung, also einer entzündlichen Antwort des Immunsystems auf einen nicht-infektiösen Zellschaden bzw. Zelltod, eine wesentliche Rolle spielt.

Wenn eine Zelle in die Nekrose übergeht, so kommt es zu einem Anschwellen der Zelle mit konsequentem Verlust der Membranintegrität und zu einer Ausschüttung von Substanzen aus dem Zellinneren in den extrazellulären Raum. Diese Substanzen signalisieren dem angeborenen Immunsystem eine Gefahr. Sie werden auch in Anlehnung zu den PAMP engl. danger-associated molecular patterns (DAMP) genannt. Diese Aktivierung des Immunsystems geschieht jedoch nicht nach einer Apoptose, da die verpackten Überreste der Zelle von Makrophagen beseitigt werden, ohne dass DAMPs freigesetzt werden oder eine Aktivierung stattfindet. Erst wenn die Zellbestandteile nach Apoptose nicht rechtzeitig entfernt werden, kommt es auch hier zum Verlust der Membranintegrität, was auch sekundäre Nekrose genannt wird, und zur Ausschüttung von DAMP (siehe Abbildung 4). Den Unterschied hinsichtlich der Aktivierung des Immunsystems hängt hauptsächlich davon ab, ob der Zelltod "geregelt" abläuft wie bei der Apoptose oder unphysiologisch-chaotisch wie bei der Nekrose, die

dem Immunsystem eine Gefahr signalisiert. Bei einer Freisetzung von DAMPs spielen die dendritischen Zellen als Initiator eine maßgebliche Rolle. Die TLR der residenten dendritischen Zellen werden durch Bindung von DAMPs aktiviert und infolge dessen kommt es zu einer Stimulation von T-Zellen durch Antigenpräsentation im Lymphknoten (siehe Abbildung 4)⁸². Matzinger stellte als Erste 1994 die sogenannte "Danger-Hypothese" auf, die postuliert, dass das Immunsystem auch in Abwesenheit von PAMP auf einen unphysiologischen Zelltod reagiert⁸³.

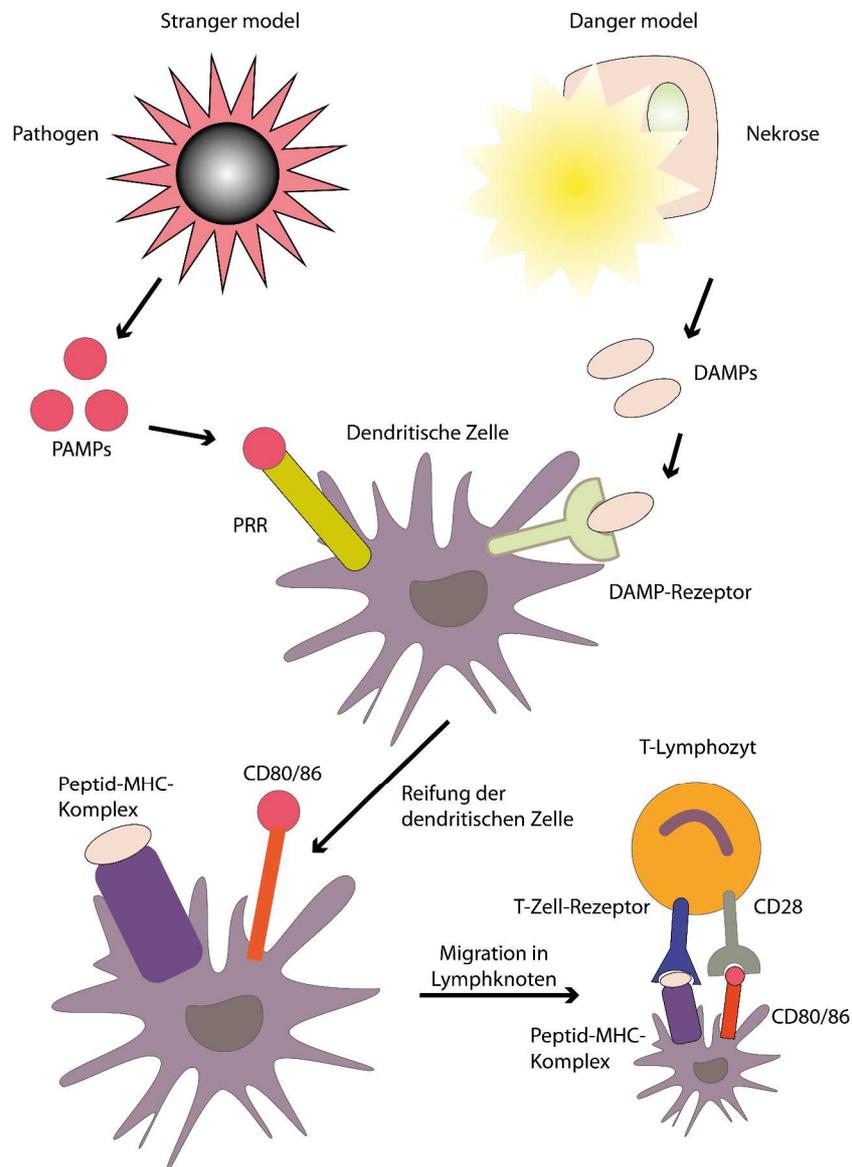


Abbildung 4: Schematische Darstellung der DAMP-assoziierten Aktivierung des Immunsystems. Sowohl durch PAMPs von Pathogenen, als auch von DAMPs nekrotischer Zellen, werden auf Rezeptoren dendritischer Zellen erkannt. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung, Differenzierung der dendritischen Zelle und zu einer Migration in den Lymphknoten, wo sie durch den das Antigen präsentierenden MHC-II-Komplex sowie den kostimulatorischen Oberflächenmolekülen CD80 und CD86 naive T-Zellen aktivieren und so eine Immunreaktion auslösen. Aus Kono⁸².

Die DAMP werden von Rezeptoren auf Leukozyten sowie auch Epithelzellen erkannt und pro-entzündliche Mediatoren werden ausgeschüttet. Die Folge sind eine vermehrte Durchlässigkeit von Gefäßen, sowie die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekül am Gefäßendothel, mit einhergehendem Ödem und Einwanderung weiterer Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in

das betroffene Gewebe. Auch lösliche Antikörper gehen in das Gewebe über und versuchen zusammen mit den Immunzellen die potenzielle, aber nicht vorhandene mikrobielle Gefahr zu bekämpfen. Dies resultiert in einer massiven Inflammation⁸².

Die unterschiedlichen DAMPs werden von verschiedenen Rezeptoren erkannt. Hierfür sind die TLR von besonderer Bedeutung. Wie oben beschrieben finden sich TLR auf einer Vielfalt von Zellen wie dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen, B- und T-Zellen, aber auch bei Endothel- und Epithelzellen wie z.B. TEC. Die TLR, insbesondere der TLR2 und der TLR4, spielen aufgrund der Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei einem akuten ischämischen Nierenschaden eine große Rolle. Kim et al. haben als Erste gezeigt, dass die TLR2 und TLR4 auf Gen- und Proteinebene nach einer Ischämie und anschließender Reperfusion, einem Modell für den ischämischen akuten Nierenschaden, in der Rattenniere eine signifikant höhere Expression hatten⁸⁴. Auch die mRNA Expression von TLR2 und TLR4 auf TECs nach einem ischämischen Nierenschaden ist signifikant höher⁸⁵. TLR2-defiziente Mäuse hatten nach einem Ischämie/ Reperfusions-Schaden der Niere geringere Mengen an pro-entzündlichen Zytokinen und Chemokinen, sowie eine Reduktion der Leukozyteninfiltration und eine signifikant geringere Nierenschädigung als Wildtyp(WT)-Mäuse⁸⁶. Auch TLR4-defiziente Mäuse hatten zum Vergleich von Wildtyp-Mäusen nach einem ischämischen Nierenschaden eine reduzierte Menge an Zytokinen, Chemokinen und infiltrierten Granulozyten⁸⁷. Der Einfluss von TLR4 und MyD88 wurde durch Wu et al. untersucht. Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass sowohl TLR4^{-/-}, als auch MyD88^{-/-} Mäuse weitgehend von einer Nierenschädigung mit einhergehender Nierinsuffizienz verschont blieben⁸⁸. Diese Versuchsreihe unterstreicht zusätzlich die Bedeutung von TLR4 und seinem MyD88-abhängigen Signaltransduktionsweg beim ischämischen akuten Nierenschaden. Zudem wurde die wichtige pro-entzündliche Rolle von HMGB1, einem DAMP, der bei einer Zellschädigung ausgeschüttet wird und einer von vielen endogenen Liganden des TLR4 ist, bei einem ischämischen Nierenschaden untersucht^{89,90}. Ein weiteres Beispiel für einen Liganden des TLR4 während eines ischämischen akuten Nierenschadens sind Histone, welche durch Nekrose aus Tubuluszellen freigesetzt werden und als DAMP agieren.

Zusammenfassend sind TLRs, insbesondere der TLR2 und TLR4, wichtige Mediatoren der schädigenden Immunantwort bei einem ischämischen akuten Nierenschaden, indem sie freie DAMPs erkennen und dadurch Initiatoren einer Inflammation sind.

TLR und Regeneration

Auch wenn TLRs in der wissenschaftlichen Literatur hauptsächlich eine pro-entzündliche Rolle zugeschrieben wird, gibt es auch Hinweise, dass sie einen wichtigen Faktor für Geweberegeneration darstellen.

Das Regenerationspotenzial von Hepatozyten zum Beispiel profitiert nach einem Leberschaden mit massivem Zellverlust von der TLR-Aktivierung. Es konnte in vielfachen Studien gezeigt werden, dass der TLR/MyD88 abhängige Signaltransduktionsweg essentiell für die frühe Regenerationsphase nach partieller Hepatektomie ist^{91,92}. Der Hauptmechanismus zur Hepatozytenregeneration ist die Aktivierung von NF- κ B in nicht-parenchymatösen Zellen und die konsequente Produktion und Sezernierung von IL-6 und TNF- α . Dadurch werden Hepatozyten zur Expression von immediate early genes angeregt, welche die Zellreplikation wiederum beeinflussen⁹¹. Auch im Darm scheint der MyD88-

Signaltransduktionsweg eine protektive und proregeneratorische Rolle innezuhaben. Araki et al.⁹³ zeigten, dass MyD88^{-/-} Mäuse von einer Dextrannatriumsulfat-induzierten Darmschädigung stärker betroffen sind und eine höhere Lethalität wie auch höhere histologische Schaden-Scores aufwiesen. Der protektive Effekt beruht dabei auf einen höheren Influx von Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen⁹³.

Anscheinend hat das angeborene Immunsystem und die TLR/MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg einen protektiven und proregeneratorischen Effekt in einigen Geweben. Ein solcher Zusammenhang konnte bis jetzt noch nicht für die renale Regeneration hergestellt werden.

Die Charakterisierung von renalen mononukleären Phagozyten

Zur Gruppe der mononukleären Phagozyten in nicht-lymphatischen Organen wie der Niere gehören verschiedene Untergruppen von Makrophagen (M ϕ) und dendritischen Zellen (DC). Makrophagen sind im Gewebe ansässige, phagozytierende Zellen, welche in großem Ausmaß an der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität durch Beseitigung des apoptotischen Materials, sowie durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren beteiligt sind. Sie dienen bei Infektionen als Phagozyten und Produzenten toxischer Metaboliten und pro-entzündlicher Zytokine und sind somit ein wichtiger Bestandteil der frühen Immunantwort. Dendritische Zellen haben als wichtiges Mitglied der APZ klassischerweise zur Aufgabe, Antigene über ihren MHC-II zu präsentieren und die Immunantwort zu regulieren. Sie sammeln hierfür Bestandteile von Infektionserregern und migrieren daraufhin in Lymphknoten, um die Antigene naiven T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren⁹⁴. Anfänglich dachte man, dass man eine klare Grenze zwischen den zwei Zelltypen des mononukleären-phagozytären Systems ziehen kann. Es stellte sich aber mit voranschreitendem Erkenntnisstand heraus, dass insbesondere bei entzündlichen Bedingungen diese klare Unterscheidung zwischen Makrophagen und dendritischen Zellen hinsichtlich Funktion und Heterogenität ihrer Phenotypen durchbrochen wird⁹⁵⁻⁹⁸.

Während lange Zeit eine hämatopoetische Abstammung aller Mitglieder der mononukleären Phagozyten als gesichert galt, zeichnete sich in den letzten Jahren ab, dass ein wesentlicher Teil der M ϕ in mehreren Organen und Geweben embryonalen Ursprungs sind. Diese M ϕ siedeln sich während der embryonalen Entwicklung in den verschiedenen Organen an und werden auch dort wieder von eigenständigen Vorläuferzellen unabhängig vom Knochenmark ersetzt. Auch in der Niere werden die embryonalen Stammzellen während der Entwicklung von Monozyten-abstammenden M ϕ ersetzt und im Verlauf von anderen hämatopoetischen Stammzellen (s.u.)⁹⁹⁻¹⁰¹. Ein charakteristisches Antigen für M ϕ ist das F4/80 und das Integrin CD11b. Die Tatsache, dass CD11b (welches ursprünglich als spezifisches Oberflächenantigen der M ϕ angenommen wurde) auch auf DCs exprimiert werden und CD11c (früher als universaler Marker von DC angesehen) auch auf M ϕ exprimiert werden, zeigt unter anderem die Schwierigkeit einer genauen Differenzierung anhand von Oberflächenantigenen zwischen den beiden Zellenreihen innerhalb des mononukleären Phagozytensystems der Niere⁹⁸.

Im Gegensatz zu den M ϕ wurde bei den DC bisher keine eindeutige embryonale Abstammung entdeckt. DC stammen aus einer gemeinsamen hämatopoetischen dendritischen Progenitorzelle (CDP, engl. *common dendritic progenitor cell*) und unterteilen sich in zwei Hauptgruppen, klassische DC (cDC, engl. *classical dendritic cell*) und plasmazytoide DC (pCD, engl. *plasmacytoid dendritic cell*). cDC können wiederum in cDC1 und cDC2 unterteilt werden. cDC1 sind hauptsächlich verantwortlich für die

Aktivierung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und sind gekennzeichnet durch die Oberflächenantigene CD103 und XCR1. cDC2 wiederum aktivieren hauptsächlich CD4⁺ T-Helferzellen und exprimieren CD11b und CX3CR1. In der Niere sind unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich CD11b⁺ und CD11c⁺ mononukleäre Phagozyten ansässig, was den gewebständigen Mø und cDC2 entspricht⁹⁸.

Um die mononukleären Phagozyten weiter zu differenzieren ist man in den letzten Jahren dazu übergegangen mit Hilfe von spezifischen Transkriptionsmarkern die zelluläre Ontogenese zur Charakterisierung zusätzlich zu der bisher bekannten Klassifikationsmethode der Oberflächenantigene heranzuziehen. Dies hilft auch die Abstammung der Zellen herauszufinden. Hierbei zeigte sich, dass der MAFB (engl. MAF BZIP transcription factor B) spezifisch für Mø ist¹⁰², während der ZBTB46 (engl. zinc finger and BTB domain containing 46) als ein spezifischer Marker für die Vorläuferzellen (CDP) der cDC identifiziert wurde¹⁰³. Diese transkriptionelle Analyse ermöglichte die Erkenntnis, dass sich Mø und DC in ihrer Expression von CD64 und F4/80 unterscheiden^{104,105}. Hiermit kann man mit dem aktuellen Wissensstand die DC und die Mø anhand ihrer Oberflächenantigene genauer differenzieren. DC kennzeichnen sich neben den o.g. teils gemeinsamen Oberflächenantigenen durch die Kombination CD45⁺ CD26⁺ CD11c⁺ MHC-II⁺ F4/80neg/low CD64⁻ aus, während die Kombination CD11c⁺ MHC-II⁺ F4/80⁺ CD64⁺ spezifisch für die Mø erscheint¹⁰⁶. Letztens konnte jedoch interessanterweise mittels Abstammungsverfolgung des Proteins Clec9A (welches vermutlich nicht in Monzyten/ Mø Vorläuferzellen exprimiert wird) festgestellt werden, dass einige CD64⁺ und F4/80⁺ renale mononukleäre Phagozyten (eigentlich passend zu Mø) von CDP, welche bisher als Vorläuferzelle der cDC angesehen wurde, stammen. Hinzu kommt, dass in der Niere neben den klassischen DC auch CD64⁺ CD11b^{hi} DC nachgewiesen werden konnten^{99,107}. Dies zeigt nochmals eindrücklich, dass trotz des Versuchs der Differenzierung der DC und Mø durch verschiedene Oberflächenantigene das renale mononukleäre Phagozytensystem eine größere Heterogenität hinsichtlich der Abstammung als auch der Differenzierung und physiologischen Funktion hat. Hier kann in Zukunft das sogenannte „lineage tracing“ mittels Identifizierung von Transkriptionsmarkern weitere Einblicke in dieses komplexe System ermöglichen.

Tabelle 3: Wichtige Transkriptionsmarker und Oberflächenantigene der unterschiedlichen Zellen im renalen mononukleären Phagozytensystem

	Clec9	ZBTB46	MAFB	CD11b	CD11c	CD103	CD64	MHCII	F4/80
A									
cDC1	+	+	-	-	+	+	-	+	-
cDC2	+	+	-	+	+	-	-	+	-
CD64⁺F4/80⁺ DC	+	-	+	-	∅	∅	+	+	+
CD64⁺CD11b⁺	+	-	+	+	∅	∅	+	+	-
DC									
Mø	-	-	+	+	+	-	+	+	+

Transkriptionsmarker: Clex9A, ZBTB46, MAFB; Oberflächenantigene: CD11b, CD11c, CD103, CD64, MHCII, F4/80, +: positiv oder hi, -: negativ oder low, ∅: nicht bekannt

Unter physiologischen Bedingungen sind die renalen mononukleären Phagozyten empfänglich für PAMPs, DAMPs, Immunoglobuline, Bestandteile des Komplementsystems, Adenosin, Zytokine und sogar für Schwankungen des Sauerstoffpartialdrucks^{50,108–110}. Sie können daher auch als "immunologische Wächter" der Niere gesehen werden. Zudem kommt ihnen eine wichtige Rolle bei der

Entwicklung von Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen zu. In dieser Hinsicht sind insbesondere CD11c⁺ Zellen beteiligt, indem sie körpereigene Antigene, z.B. aus dem tubulären Filtrat, sammeln, diese anschließend den T-Lymphozyten in renalen Lymphknoten präsentieren. So machen sie eine Toleranz durch Mechanismen wie der Kreuz-Toleranz überhaupt erst möglich^{111,112}. Es gibt zudem Hinweise darauf, dass renale mononukleäre Phagozyten eine wichtige Rolle bei der raschen Resolution von kleinen Schädigungen oder einer sehr frühen überschießenden Immunreaktion spielen⁹⁴.

Die Rolle von rMoPh beim akuten ischämischen Nierenschaden

In dem Fall, dass in der Niere durch Freisetzung von DAMPs aus nekrotischen Tubuluszellen, eine entzündliche Immunantwort ausgelöst wird, sind die renalen mononukleären Phagozyten maßgeblich beteiligt. Als Initiatoren der Entzündungsreaktion setzen sie eine komplexe Kaskade in Gang. In dieser Hinsicht sind insbesondere für die Antigenerkennung und die Initialisierung der Immunantwort die in der Niere ansässigen F4/80⁺ MHCII⁺ dendritische Zellen. Auf die Erkennung von PAMPs oder DAMPs mit konsekutiver Aktivierung des angeborenen Immunsystems folgt eine Produktion von pro-entzündlichen Zytokinen wie TNF- α , IL-6 und IL-1, sowie von Chemokinen wie CCL2, CCL5, CXCL10 und CXCL2 und die Antigenpräsentation der dendritischen Zellen. Dadurch werden Ly6C⁺ Monozyten und andere Leukozyten wie T-Zellen, B-Zellen und auch NK-Zellen an den Ort der Entzündung rekrutiert, welche wiederum eine weitere Quelle pro-entzündlicher Mediatoren darstellen und damit zur Aufrechterhaltung der Entzündung beitragen⁹⁴. Hierbei sollten besonders die Makrophagen hervorgehoben werden, die sich je nach Aktivierung während der verschiedenen Stadien in verschiedene Subtypen differenzieren können. Durch Freisetzung von DAMPs während eines akuten Nierenschadens (wie z.B. HMGB1 oder Histone) werden auf Makrophagen TLRs aktiviert. Dies führt zu einer Differenzierung zu klassisch aktivierten M1 Makrophagen, welche in der frühen Phase der Inflammation große Mengen an pro-entzündlichen Zytokinen und reaktiven Sauerstoffradikalen produzieren und Th1 und Th17-vermittelte Immunantworten fördern¹¹³. Sie sind daher wichtige Mediatorzellen bei der sterilen Inflammation bei einem akuten Nierenschaden. Die Inhibierung der Aktivierung von M1 Makrophagen führt zu einer geringeren Pathologie in verschiedensten Modellen der Nierenerkrankungen^{114–116}.

Nach der initialen Phase der entzündlichen Antwort folgt eine Phase der Entzündungsresolution und Regeneration des tubulären Systems. Die neutrophilen Granulozyten gehen nach Einwanderung ins Gewebe und Phagozytose in die Apoptose oder Nekrose über. Die Rolle der Makrophagen vor Ort ist unter anderem, die Überreste der Neutrophilen zu phagozytieren und "aufzuräumen". Die Phagozytose apoptotischer Zellen, insbesondere neutrophiler Granulozyten, wird als ein essentieller Auslöser dafür angesehen, dass sich pro-entzündliche M1 Makrophagen zu anti-entzündliche Makrophagen differenzieren. Diese anti-entzündlichen Makrophagen werden auch M2 Makrophagen genannt und lassen sich in die Subtypen M2a, M2b und M2c unterteilen. Sie verhindern durch die Phagozytose von Zellresten, dass das Immunsystem einem überschießenden Stimulus ausgesetzt ist. Ein Schlüsselmolekül und essentielles Opsonin für die Phagozytose ist hierfür Pentraxin-2 (PTX-2). M2 Makrophagen produzieren zudem anti-entzündlichen Mediatoren wie IL-4, IL-13, IL-10 und TGF- β . Sie bewirken die Differenzierung weiterer Makrophagen hin zum M2 Subtyp und haben zugleich weitere anti-entzündliche Eigenschaften¹¹⁷. Obwohl die Unterteilung der Makrophagen während einer

entzündlichen Reaktion plausibel erscheint, muss man bedenken, dass dieses Konzept in vitro entwickelt wurde und daher die Extreme der funktionellen Stadien der Makrophagen während einer Entzündung darstellen¹¹⁸. Es erscheint daher etwas zu einfach hinsichtlich der komplexen immunologischen Vorgänge in der Niere, dient jedoch als ein suffizientes Modell für deren Verständnis.

Obwohl überlebende Tubulusepithelzellen nach einem akuten Nierenschaden den Zellzyklus nur ein paar Stunden nach der Schädigung begehen, kann eine effektive tubuläre Regeneration nicht unter den Bedingungen der vorherrschenden sterilen Inflammation bei einem akuten Nierenschaden realisiert werden²⁴. Es muss zunächst zu einem Abklingen der Entzündungsvorgänge und zu einem Überwiegen von anti-entzündlichen und proregenerativen Faktoren kommen^{119,120}. Diese werden von TECs, tubulären Progenitorzellen oder Stammzellen aus dem Knochenmark gebildet (siehe Tubulusregeneration)²⁴. Wie zuvor beschrieben haben rMoPh eine wichtige Rolle während der Inflammation bei einem akuten Nierenschaden und es vermehren sich die Hinweise, dass rMoPh und insbesondere M2 Makrophagen in den späten Stadien der Tubulusregeneration von Bedeutung sind. Lee et al konnte eindrucksvoll zeigen, dass eine Depletion von rMoPh und somit auch der zu diesem Zeitpunkt dominanten M2 Makrophagen während der späten anti-entzündlichen und proregenerativen Phase 3-5 Tage nach einem ischämischen Nierenschaden zu einer signifikant höheren Nierenpathologie und auch zu einer signifikant niedrigeren Proliferations- und Regenerationsrate führte. Die Depletion in der entzündlichen Phase am 1. und 2. postischämischen Tag hingegen verringerte den Nierenschaden aufgrund der gleichzeitigen Depletion der vorherrschenden pro-entzündlichen M1 Makrophagen¹¹⁹. Obwohl ein Zusammenhang zwischen rMoPh, im Speziellen dendritische Zellen, und Nierenregeneration hergestellt werden konnte, sind deren Beitrag zu den epithelialen Reparaturmechanismen hinsichtlich der von ihnen produzierten Mediatoren im Gegensatz zu den pro-entzündlichen weitgehend unverstanden¹²¹. Dem CSF-1 (engl. colony stimulating factor-1), der bei einem akuten Nierenschaden von M2 Makrophagen ausgeschüttet wird, konnte ein proregenerativer Effekt auf TECs nachgewiesen werden. Die Hauptquelle von CSF-1 jedoch bleiben durch schädigenden Einfluss aktivierte tubuläre Zellen, was die M2 Makrophagen als Quelle wiederum relativiert¹²⁰.

Die Rolle von M2 Makrophagen auf fibrotische Reparaturvorgänge nach einem akuten Nierenschaden ist besser erforscht. M2 Makrophagen schütten z.B. das Zytokin TGF-beta in großen Mengen aus, das sowohl anti-entzündliche, als auch starke profibrotische Eigenschaften aufweist¹²². Andere profibrotische Faktoren, die von M2 Makrophagen ausgeschüttet werden sind unter anderem CTGF, CCL17, CCL22, Igf1, sowie Arginase, welche direkt die Fibrosierung des geschädigten Gewebes vorantreibt¹¹⁷.

RMoPh sind wichtige Mediatoren von Aktivierung und Resolution der entzündlichen Antwort nach einem akuten Nierenschaden. Hierbei ist der zeitliche Ablauf einer entzündlichen Reaktion nach einem ischämischen Nierenschaden von essentieller Bedeutung (siehe Tabelle 3). Hinsichtlich der Resolution, Regeneration und Chronifizierung von Nierenschäden spielt die heterogene Gruppe der M2 Makrophagen eine wichtige Rolle. Einerseits sind M2c Makrophagen einige Tage nach dem ischämischen Nierenschaden für die Verhinderung einer überschießenden pro-entzündlichen Immunantwort und die Ermöglichung einer Wundheilung durch Ausschüttung anti-entzündlicher Mediatoren und Wachstumsfaktoren verantwortlich. Andererseits vermitteln M2a Makrophagen die renale Fibrosierung mit einhergehendem Funktionsverlust bei einem länger anhaltenden oder bei einem

Zustand nach massivem Schaden, welcher nicht allein durch epitheliale Reparaturmechanismen beseitigt werden kann¹²³.

Tabelle 4: Ablauf einer entzündlichen, postischämischen Reaktion mit Makrophagen-Phänotyp

Zeitpunkt	Gefahr	Stimuli (u.a.)	Makrophagen-Phänotyp	Mediatoren (u.a.)	Effekte
Minuten	Blutung	Ischämie vasoaktive Moleküle Pro- entzündliche Chemokine			Hämostase
Stunden	Sepsis	Zellnekrose DAMP/PAMP TNF- α , CSF	Pro-entzündlich M1	IL-1 IL-6 CCL2 CCL5 CXCL10 CXCL2 TNF- α	Pathogen- beseitigung
Tage	Chronifizierung	Apoptose IL-10, IL-4 Pentraxin	Anti- entzündlich M2c	IL-10 IL-22 Wachstums- faktoren	Unterdrückung der überschießenden Immunantwort; Beginn der Regeneration durch Progenitorzellen
Wochen	Gewebsdefekt	Mangelnde Epithel- Regeneration Wachstums- faktoren Pro- fibrotische Zytokine	Pro-fibrotisch M2a	CTGF CCL17 CCL22 Igf1 Arginase TGF	Fibrosierung des Organs mit einhergehendem Funktionsverlust; Regeneration
Monate	Fibrose	Ischämie beendete entzündliche Reaktion	Fibrolytisch	MMPI	

TNF- α : Tumornekrosefaktor α , CSF: colony stimulating factor, IL: Interleukin, M: Makrophagen, CCL: CC-Chemokin-Ligand, CXCL: C-X-C motif chemokine ligand, CTGF: connective tissue growth factor, Igf1: Insulin-like growth factor 1, TGF: transforming growth factor, MMPI: matrix metalloproteinase inhibitor

1.4 Interleukin-22

Interleukine (IL) sind Botenstoffe und Mediatoren, die eine Kommunikation zwischen Leukozyten, aber auch nicht-immunologischen Zellen wie Epithelzellen ermöglichen und eine entscheidende Rolle bei der Koordination der Immunantwort spielen. Es gibt zahlreiche ILs mit jeweils spezifischen Funktionen innerhalb des Immunsystems und des Organismus. Unter ihnen existiert das IL-22 (IL-22), welches in dieser Arbeit eine der Hauptrollen einnimmt und daher im Folgenden näher beschrieben wird

1.4.1 Die Entdeckung, Struktur und der codierende Genlokus von IL-22

Im Jahre 2000 wurde im Rahmen einer Genexpressionsstudie in IL-9-stimulierten murinen BW5147 T-Lymphom-Zellen ein α -helikales Protein entdeckt. Aufgrund seiner Ähnlichkeit hinsichtlich der Struktur zu dem damals schon bekannten IL-10 wurde es zunächst "IL-10-related T cell-derived inducible factor" genannt. Erst später erhielt es den Namen IL-22. IL-22 gehört somit zu der Gruppe der IL-10-Familie zusammen mit IL-10, IL-19, IL-20, IL-24, IL-26, IL-28 α und β und IL29¹²⁴.

Die für humanes IL-22 kodierenden Gene liegen alle auf dem längeren Arm des Chromosoms 12. Die Proteinstruktur von IL-22 besteht aus sechs α -Helices, die in einer antiparallelen Konformation arrangiert sind¹²⁴.

1.4.2 Der IL-22-Rezeptorkomplex und seine Signaltransduktion

Der IL-22-Rezeptor besteht aus zwei Komponenten, nämlich aus dem IL-22-Rezeptor-1 (IL-22R1) und dem IL-10-Rezeptor-2 (IL-10R2), der auch ein Bestandteil der Rezeptorkomplexe von IL-10, IL-26, IL-28A, IL-28B und IL-29 ist. IL-22 bindet zuerst an den Rezeptor mit der höheren Affinität, den IL-22R1, der daraufhin eine Konformationsänderung durchläuft und somit an den IL-10R2 binden und einen stabilen Komplex mit ebendiesem formen kann. Die zytoplasmatischen Anteile von IL-22R1 und IL-10R2 sind mit den Kinasen JAK1 (Janus Kinase 1) und TYK2 (Tyrosinkinase 2) verbunden. Durch eine Phosphorylation dieser beiden Kinasen werden wiederum vier spezifische Tyrosinreste an der zytoplasmatischen Domäne des IL-22R1 phosphoryliert, welche dann als Bindungsstellen für STAT-Moleküle (engl. *signal transducer and activator of transcription*) werden. Dies ermöglicht die Dimerisierung der STAT Moleküle mit konsekutiver Translokation in den Zellkern, wo sie die Expression ihrer Zielgene regulieren¹²⁵. Bei der Signaltransduktion von IL-22 spielen insbesondere STAT3, in kleinerem Ausmaß und zellspezifisch auch STAT1 und STAT5 eine Rolle. Zusätzlich zu dem JAK-STAT-abhängigen Signaltransduktionsweg existiert außerdem ein Weg über MAPK (mitogen-aktivierte Proteinkinasen, engl. *mitogen-activated protein kinases*), welche die ERK1 (extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1), ERK2, JUN N-terminale Kinase und p38 MAPK phosphoryliert. Weitere Signaltransduktionswege führen über die Aktivierung der PI3K (Phosphoinositid 3-Kinase), von AKT und mTOR (engl. *mammalian target of rapamycin*)^{125,126}.

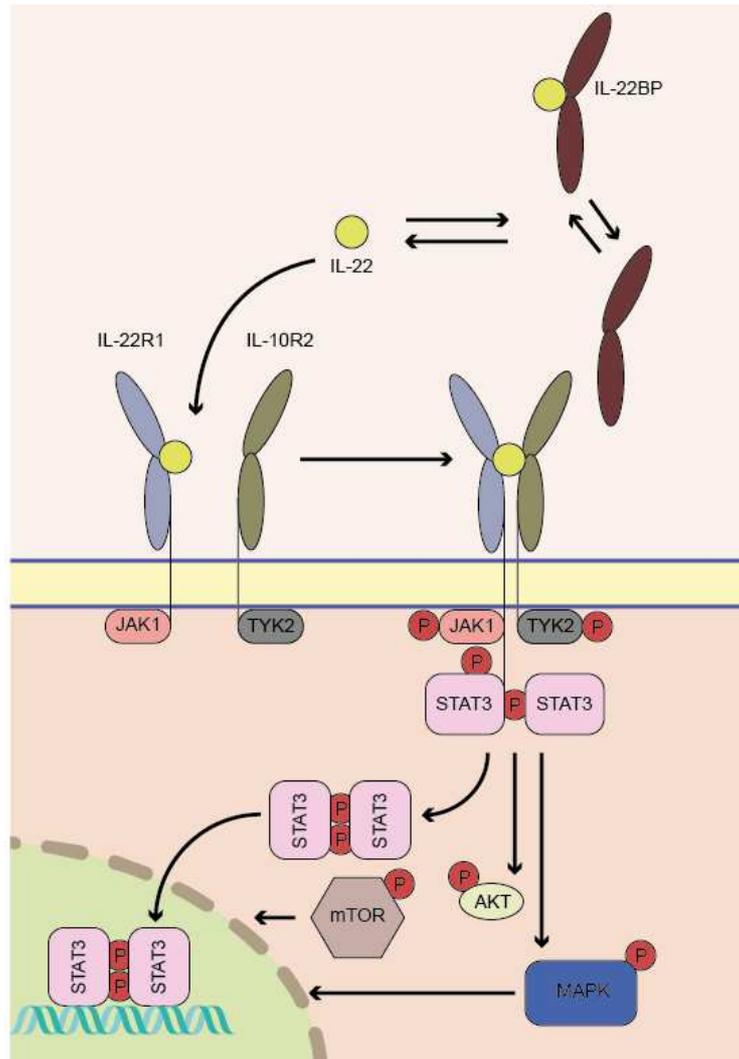


Abbildung 5 Darstellung des Rezeptorkomplexes und der Signaltransduktion durch das Interleukin-22. Der Interleukin Rezeptorkomplex besteht aus der IL-22-Rezeptor 1 Untereinheit und der IL-10-Rezeptor 2 Untereinheit. Wenn das IL-22 von dem IL-22-Rezeptor 1 gebunden wird, kommt es zu einer Bindung der IL-22-Rezeptor 1 Untereinheit mit dem IL-10R2. Dadurch wird die Phosphorylierung der JAK1 und TYK2 ermöglicht und ausgelöst. Die darauffolgende Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch die JAK1 ermöglicht eine Dimerisierung von STAT3 und dessen Translokation in den Zellkern. Über STAT3 erfolgt die Hauptsignaltransduktionskaskade. Es gibt jedoch auch einen Signaltransduktionsweg via MAPK und mTOR. Das IL-22-bindende-Protein wirkt als löslicher Rezeptor als Antagonist des IL-22, indem er es schon vor der Aktivierung des membranständigen Rezeptorkomplexes bindet, aus Sabat¹²⁵

IL-22 hat außerdem einen Einzelketten-"löslichen" Rezeptor namens IL-22 bindendes Protein (IL-22BP). IL-22BP bindet nicht gebundenes IL-22 mit einem Vielfachen der Affinität des IL-22R1 und ist ein natürlicher Inhibitor von IL-22, da von ihm gebundenes IL-22 nicht an den membrangebundenen Rezeptorkomplex binden kann¹²⁴. IL-22BP ist bei vielen Entzündungsvorgängen mit hoher IL-22 Expression runterreguliert, wie zum Beispiel bei einem Modell der murinen Colitis, sodass die Wirkung von IL-22 verstärkt einsetzt¹²⁷.

1.4.3 Die Herkunft / Bildungsstätten von IL-22 im Organismus

T-Zellen und angeborene lymphoide Zellen (engl. innate lymphoid cells, auch ILCs) sind die Hauptproduzenten von IL-22 im menschlichen Organismus. Insbesondere Th1 Lymphozyten sind seit längerem eine bekannte Quelle von IL-22, welches auf eine Stimulation dieser Zellen mit IL-12

produziert und ausgeschüttet wird¹²⁸. Eine weitere Zellgruppe, die IL-22 produzieren, sind Th17 Zellen, die auch gleichzeitig IL-17 produzieren, welches einen synergistischen Effekt mit IL-22 aufweist^{129,130}. Der adäquate Stimulus für die IL-22 Produktion in Th17 Zellen ist das IL-6 und das IL-23, während TGF-beta inhibierend auf die IL-22 Produktion wirkt¹³¹. T-Zellen, die IL-22 ausschütten ohne gleichzeitige Produktion von Interferon-gamma, IL-17 oder IL-4 werden auch als Th22 Zellen bezeichnet und stellen eine weitere Quelle dar¹³². Auch NK-Zellen können auf Stimulation mit IL-23 hin IL-22 produzieren¹³³. Zwei weitere wichtige Quellen von IL-22 sind Lymphoid tissue inducer cells (LTi cells), welche im Dünndarm und in lymphatischem Gewebe wie der Milz lokalisiert sind, sowie gamma delta T-Zellen, die auf eine Stimulation mit IL-23 direkt IL-22 und IL-17 produzieren¹³⁴. Eine Produktion von IL-22 im Menschen durch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen wurde bisher nur in einem entzündlichen Umfeld beobachtet¹³⁵. Eine Expression von IL-22 in der Niere wurde bisher nicht beobachtet.

1.4.4 Effekte von IL-22

IL-22 weist eine Besonderheit auf. Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten oder Lymphozyten exprimieren nämlich gar keinen IL-22R1 und sind folglich keine Zielzellen von IL-22¹³⁶. Nicht-immunologische Zellen wie Epithelzellen, Pankreaszellen, Hepatozyten, Keratinozyten und Fibroblasten hingegen besitzen den IL-22-Rezeptorkomplex¹²⁵. Die Wirkung von IL-22 auf diese Zellen kann auf fünf Hauptgruppen eingeteilt werden.

- IL-22 unterstützt Mechanismen des angeborenen Immunsystems und der Barriereintegrität auf Oberflächen^{135,137–140}
- IL-22 verhindert zelluläre Differenzierung und fördert zelluläre Proliferation^{141–146}
- IL-22 fördert die Produktion spezifischer Zytokine und Chemokine¹⁴²
- IL-22 fördert die zelluläre Mobilität und Migration^{141,145}
- IL-22 fördert die Expression intra- und extrazellulärer Moleküle, welche seine Wirkung verstärken (positives Feedback)^{142,147}

Im Einzelnen konnte in der Haut gezeigt werden, dass IL-22 die Expression von Proteinen, die essentiell für die Differenzierung von Keratinozyten sind, unterdrückt¹²⁵. Dies führt auch schon zu einem ersten Beispiel, dass die proliferative Wirkung von IL-22 auch schädlich sein kann, nämlich bei entzündlichen Hauterkrankungen wie der Psoriasis und der atopischen Dermatitis, wo hohe Konzentrationen von IL-22 gefunden werden¹³⁶.

In Epithelzellen des Kolons zeigt IL-22 hauptsächlich positive Eigenschaften. Es wurde festgestellt, dass Patienten, welche an Morbus Chron oder Colitis ulcerosa erkrankt sind, eine höhere Dichte an IL-22-produzierenden Zellen im GIT aufweisen¹⁴⁸. In experimentellen Studien wurde ein protektiver Effekt auf entzündliche Darmerkrankungen nachgewiesen. Zurückzuführen ist dies auf die IL-22-abhängige vermehrte Produktion von Mukus-assoziierten Proteinen wie Mucin-1 (MUC1)¹³⁹ und antibakteriellen Proteinen¹⁴⁰. Zudem induziert IL-22 die Proliferation der Epithelzellen im Kolon, was zu einem verbesserten Reparaturvorgang der epithelialen Barriere führt. Der positive Einfluss von IL-22 konnte auch durch dieselben Mechanismen auf die Abwehr und die Aufrechterhaltung der epithelialen Barriere bei Infektionen gezeigt werden^{143,144}.

In der Lunge konnte IL-22 eine protektive Rolle bei Asthma zugesprochen werden, indem durch IL-22-Applikation die Infiltration von eosinophilen Granulozyten, die Expression pro-entzündlicher Zytokine und Chemokine, sowie folglich die Bronchokonstriktion signifikant reduziert wurde^{149,150}. IL-22-Applikation unterdrückte zudem die pulmonare Fibrosierung in einem Mausmodell der entzündlichen Lungenfibrose¹⁵¹. Diese Beobachtung kann wahrscheinlich dadurch erklärt werden, dass IL-22 die Expression von degradierenden Enzymen der extrazellulären Matrix (ECM) wie die Metalloproteinase 1 (MMP1) und MMP3 erheblich steigert. Die Auflösung des fibrotischen Materials und die damit erhöhte Migrationsfähigkeit der Epithelzellen führt schlussendlich zu einer gesteigerten Regeneration des Organs¹²⁵. Dieser Effekt könnte auch für Nierenerkrankungen interessant sein, da Fibrose die Nierenfunktion nach einem erheblichen akuten Nierenschaden, wie auch bei chronischen Nierenerkrankungen, als Folge eines insuffizienten epithelialen Reparaturmechanismus einschränkt.

Die wahrscheinlich eindrucksvollsten Effekte von IL-22 sind in der Leber zu beobachten. Ein wichtiger Effekt von IL-22 auf Hepatozyten ist zellprotektiver Natur. IL-22 induziert die Expression verschiedener anti-apoptotischer Proteine, wie BCL-2 oder MCL1, sowie auch eine Reihe von Proteinen, welche zum Eintritt in den Zellzyklus notwendig sind, wie das Retinoblastom-ähnliche Protein 2, Zyklin D1, p21 und Zyklin-abhängige Kinase 4 (CKD4). Es konnte in *in vitro* Experimenten mit Hepatozyten gezeigt werden, dass die IL-22-abhängige Ausschüttung der vorher genannten Moleküle zu einer signifikant erhöhten Zellproliferationsrate führte^{152,153}. Weitere wichtige Zielzellen von IL-22 sind hepatische Stammzellen, wo durch die Wirkung von IL-22 die anti-apoptotischen und pro-proliferativen Moleküle BCL-2, BCL-XL und Zyklin D STAT3-abhängig exprimiert werden und somit entscheidend zu der Leberregeneration beitragen¹⁵⁴.

Der proregenerative Effekt von Interleukinen war auch der Fokus der Arbeit von Jan Hagemann, einem ehemaligen Mitglied der Arbeitsgruppe Anders. Seine *in vitro*-Arbeiten beinhalten einen neu entwickelten Essay, welcher dem Ischämie-Reperfusion-Modell in einer Zellkultur sehr nahekommt. Bei einem Screening zahlreicher Interleukine, welche essentielle Mediatoren der renalen mononukleären Phagozyten darstellen, wurde festgestellt, dass IL-22 herausragende proregenerative Eigenschaften in der primären tubulären Epithelzellkultur besitzt. Dieser regenerative Mechanismus des IL-22 beruht auf den Janus Kinase-STAT3 und Erk 1/2 Signaltransduktionsweg¹.

Auf der anderen Seite gibt es einige Beispiele, neben den oben genannten entzündlichen Hauterkrankungen, für IL-22 als krankheitsfördernder Mediator. Bei der rheumatoiden Arthritis führt der Einfluss von IL-22 zu einer Proliferation von synovialen Fibroblasten und zu einer Produktion des Chemokins CCL2, welches chemotaktisch auf Monozyten wirkt und daher die Inflammation bei der RA unterstützt¹⁵⁵. Des Weiteren geben neuere Studien Hinweise darauf, dass IL-22 das Wachstum bereits existierender Kolonkarzinome¹⁵⁶, sowie unter gewissen Bedingungen auch die Neubildung von Kolonkarzinomen fördern kann¹⁵⁷.

1.5 Ziel der Untersuchung

Da renale mononukleäre Phagozyten alle Phasen des akuten Nierenschadens wesentlich beeinflussen und modulieren, hat sich die Arbeit zum Ziel gesetzt, die Rolle dieser Zellgruppe als Regulator und Initiator der Nierenregeneration nach einem akuten Nierenschaden zu erforschen. Bis zu dem Zeitpunkt dieser Untersuchung gab es keine veröffentlichte Arbeit zu der Wirkung dieses IL in der Niere. Auch der Zusammenhang von IL-22 und dem akuten Nierenschaden ist nicht bekannt. Überhaupt sind Mediatoren der Nierenregeneration ein weites unerforschtes Feld der nephrologischen Grundlagenforschung. Die *in-vitro* Ergebnisse auf das Model des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens in der Maus zu übertragen war notwendig, um die komplexen Einflüsse in einem Organismus zu untersuchen. Daher schließt meine Arbeit an den *in-vitro* Ergebnissen an und untersucht die genaue progenerative Wirkung von IL-22 im Mausmodel, die Herkunft dieses IL und die Rolle von renalen mononukleären Phagozyten *in-vivo* nach einem induzierten akuten Nierenschaden. Die Immunantwort nach einem akuten Nierenschaden wird wesentlich durch die Aktivierung und Expression der TLRs beeinflusst, weshalb diese auch als potenzielle Initiatoren und Modulatoren der Resolution der entzündlichen Antwort und der Tubulusregeneration agieren könnten. In Folge dessen wurden weiterführende Mechanismen der Regeneration und Regulation der IL-22 Ausschüttung untersucht. Diese Arbeit soll wesentliche Aspekte der immunologischen Vorgänge in der Resolutions- und Regenerationsphase eines akuten Nierenschadens erforschen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometer

FACSCalibur Becton Dickinson, San Jose, USA

ELISA-Reader

Tecan, GENios Plus Tecan, Crailsheim, D

ELISA-Wascher

Microplate-Washer Elx50 Biotek, Bad Friedrichshall, D

Spektrophotometer

Beckman DU 530 Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

Floureszenz-Mikroskope

Leica DC 300F Leica Microsystems, Cambridge, UK

Olympus BX61 Ilympus Mikroskope, Hamburg, D

Zentrifugen

Heraeus, Minifuge T VWR International, Darmstadt, D

Heraeus, Sepatech Biofuge A Heraeus Sepatech, München, D

Heraeus, Biofuge primo Kendro Laborprodukte GmbH, Hanau, D

RT-PCR

LightCycler® 480 Real-Time PCR Roche, Basel, CH

Klebefolie Roche, Basel, CH

LightCycler® 480 Multiwell-Platte 96 Roche, Basel, CH

Sonstige Geräte

Kryostat RM2155 Leica Microsystems, Bernsheim, D

Homogenisator ULTRA-TURRAX T25 IK GmbH, Staufen, D

Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg, D

Vortex Genie 2 Bender&Hobein AG, Zürich, CH

Waage BP 110 S Sartorius, Göttingen, D

Waage Mettler PJ 3000 Mettler-Toledo, Greifensee, CH

2.1.2 Materialien

12-Well-Platten Nunc, Wiesbaden, D

24-Well-Platten Nunc, Wiesbaden, D

6-Well-Platten Nunc, Wiesbaden, D

Falcons 15 ml und 50 ml Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

Kanülen	BD Drogheda, IRL
MACS-Preseparationsfilter 30µm	Miltenyi Biotech Inc., Auburn, CA, USA
MACS-Separationssäulen 25 LS	Miltenyi Biotech Inc., Auburn, CA, USA
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Petrischale	TPP, Trasadingen, CH
Chir. Pinzetten	
Chir. Scheren	
Skalpell No. 20	Feather Safety Razor Co., JPN
Cell Strainer 70 µm Nylon	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Mikroaneurysmenklemme	

2.1.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien

Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim, D
Kollagenase A	Roche Diagnostics, Basel, CH
DMEM-Medium	Gibco/Life Technologies, Paisley, UK
Fetales bovines Serum (FBS)	Biochrom, Berlin, D
Penizillin/Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, AUT
Hank´s Balanced Salt Solution	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
RPMI-1640-Medium	Gibco/Life Technologies, Paisley, UK
Dulbecco´s PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
HEPES	Gibco/Life Technologies
EGF	Roche Diagnostics, Basel, CH
Trijodthyronin T3	Roche Diagnostics, Basel, CH
Hydrocortison	Roche Diagnostics, Basel, CH
PGE-1	Roche Diagnostics, Basel, CH
Insulin-Transferrin-Natrium-Selenit	Roche Diagnostics, Basel, CH
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
EDTA	Calbiochem, San Diego, CA, USA
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Formalin	Merck, Darmstadt, D
HCl (5N)	Merck, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
GM-CSF	ImmunoTools, Friesoythe, D
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe, D
10x-Taq-Puffer	Fermentas, St.-Leon-Rot, D
PCR-Optimizer	Biotop-AG, Witten, D
BSA PCR grade	Fermentas, St.-Leon-Rot, D
SYBRgreen	Sigma-Aldrich, München, D
RNAse freies Wasser	Braun, Kronberg, D
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, D

Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt, D
dNTPs	GE Healthcare, München, D
rNasin	Promega, Mannheim, D
5* First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
Diethyl-Pyrocbonat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Hexanucleotide	Roche, Mannheim, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
RNA Sample Loading Buffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D
Puffer	
FACS Lysing Solution	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
MACS-Puffer: 2mM EDTA, 0,5% BSA, pH 7,2	
FACS-Puffer: PBS, 01% Na Azid, 0,2% BSA	

2.1.4 TLR-Liganden, Zytokine und Stimulanzen

Pam3CSK4	Invivogen, Toulouse, FR
Ultrapure Lipopolysaccharide (LPS)	Invivogen, Toulouse, FR
Imiquimod	Invivogen, Toulouse, FR
CpG-ODN 1668	Invivogen, Toulouse, FR
Flagellin	Invivogen, Toulouse, FR
Rekombinantes murines IL-22	Biolegend,
Clodronat-Liposomen	Haarlem, Niederlande
PBS-Liposomen	Haarlem, Niederlande
CLI-095 (TLR4-Inhibitor)	Invivogen, Toulouse, FR
H2O2	Merck, Darmstadt, D
FICZ	Enzo Life Sciences, Lörrach, D
Ammoniumpersulfat	Biorad, München, D
Mounting Medium Vecta Mount	Vector, Burlingame, CA, USA
PAS	Bio-Optica, Mailand, ITA
Lectin	Vector, Burlingame, CA, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, D
THP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
PCNA	Cell Signaling Technology

2.1.5 Antikörper

(Immun-)Histologie

Anti-Maus IL-22 Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA
IL-22-Rezeptor-Antikörper	BIOSS, Woburn, USA
Anti-Maus E-Cadherin Antikörper,	BD Biosciences, Franklin Lakes

Zytokeratin-7-AK RCK105	Abcam, Cambridge, GB
Anti-Schaf-IgG	Vector, Burlingame, CA, USA
Anti-Ratte-IgG	Vector, Burlingame, CA, USA
FACS	
CD11c	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD11b	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD103	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
F4/80	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD45	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
Ly6G	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD3	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
NK1.1	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
7/4	Abd Serotec
IL-22	R&D Systems, Minneapolis, USA
In-vivo	
Anti-TLR4-Antikörper	Biolegend, San Diego, CA, USA
Anti-IL-22-Antikörper	eBiosciences/Thermo Fisher Scientific
Isotyp-Antikörper	eBiosciences/Thermo Fisher Scientific
MACS	
CD11c MicroBeads	Miltenyi Biotech Inc., Auburn, CA, USA
CD11c-Antikörper	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D

2.1.6 Reagenziensätze

ELISA-Kits

Maus IL-6	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D
Maus IL-22	BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D

RNA-Isolation

RNeasy mini kit	Quiagen, Hilden, D
-----------------	--------------------

Zellproliferation

Cell Titer 96 Proliferation Assay	Promega, München, D
-----------------------------------	---------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

Versuchstierhaltung

Die Versuchstiere wurden in Gruppen von fünf bis sechs Mäusen in Käfigen (siehe Material) gehalten. Die Käfige, sowie das Streu, Futter, Enrichment zum Nestbau, Rückzugshäuschen und das Wasser wurden vor Gebrauch autoklaviert und damit sterilisiert. Die Haltung erfolgte bei einem 12-

Stunden Hell-/Dunkelrhythmus sowie bei stabiler Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Bei Arbeiten mit den Mäusen bzw. im Versuchstierstall während den Dunkelphasen wurde langwelliges Licht (>580 nm) verwendet, um den zirkadianen Rhythmus der Tiere nicht zu stören. Zusätzlich waren die Käfigwände aus gefärbtem Polyetherimid, sodass das in die Käfige eindringende Licht abgeschwächt wurde. Jedwede Tierexperimente, welche für diese Arbeit durchgeführt wurden, waren mit den deutschen Tierschutzbestimmungen konform und erhielten die Genehmigung von der Regierung von Oberbayern.

Versuchstiere

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden von der Firma CharlesRiver (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und bei den in-vivo Experimenten als Standard Wildtyp-Maus benutzt.

Die IL-22^{-/-} Mäuse (BALB/c), welche weder IL-22 Rezeptor, noch das Interleukin selbst exprimieren, wurden von Prof. Dr. med. Sebastian Kobold, Mitarbeiter am Zentrum für Integrierte Proteinforschung München und dem Institut für Klinische Pharmakologie (LMU), zur Verfügung gestellt. Als Kontrollgruppe für Experimente mit IL-22^{-/-} Mäusen dienten BALB/c Mäuse.

Induktion einer renalen Ischämie und Reperfusion

Um ein möglichst pathophysiologisch realistisches in-vivo Modell der akuten Nierenschädigung zu generieren, wurde das Ischämie-Reperfuions-Modell für dieses Projekt ausgewählt. Das Labor kann viel Erfahrung mit diesem etablierten Modell aufweisen. Alle Versuchstiere waren bei Induktion der Ischämie mit anschließender Perfusion weiblich und 7 Wochen alt.

Die Narkose vor Beginn der Operation bestand aus 13 ml physiologischer NaCl-Lösung, 10 mg Midazolam, 0,1 mg Fentanyl und 1 mg Medetomidin. Da nach der Operation eine Antagonisierung der Narkose erfolgte, wurde dazu eine Mischung bestehend aus 8,5 ml physiologischer Kochsalzlösung mit Beimengung von 0,5 mg Flumazenil, 1,2 mg Naloxon und 2,5 mg Atipamezol hergestellt. Die Applikation der Narkosemischung erfolgte intraperitoneal, je nach Gewicht 130 bis 200 µl (5 mg/kg KG Midazolam; 0,05 mg/kg KG Fentanyl; 0,5 mg/kg KG Medetomidin). Dadurch konnte eine suffiziente Narkose präoperativ eingeleitet werden. Nach 10 bis 20 Minuten wurde eine ausreichende und mindestens eine Stunde anhaltende Analgesie der Maus erreicht. Um die Körpertemperatur stabil zu halten, wurde die Maus unter einer Wärmelampe während des gesamten Vorganges gewärmt. Die Körpertemperatur wurde regelmäßig mit einer analen Temperatursonde kontrolliert. Zur Prophylaxe einer eventuellen Keratokonjunktivitis sicca mit möglichen Hornhautschäden durch Austrocknung wurde Bepanthen Augensalbe auf die Augen aufgetragen. Ein möglicher Volumenverlust des Tieres während der Operation wurde durch subkutane Injektion von 1 ml physiologischer und steriler NaCl-Lösung 30 Minuten nach Beginn der Narkose verhindert. Nach der Desinfektion der Hautoberfläche und Fixierung des Versuchstieres mittels Klebestreifen, erfolgte unter sterilen Bedingungen eine unilaterale bzw. bilaterale, ca. 1,5 cm breite Inzision an der/den Flanke/n des Tieres. Nach Freilegung der Niere wurde die retroperitoneal gelegene Niere luxiert und der Nierenhilus präpariert. Dieses wurde dann mithilfe einer Mikroaneurysmaklemme abgeklemmt. Dadurch war die Niere vollständig von der arteriellen Blutversorgung abgeschnitten. Diese künstliche Ischämie wurde bei einer unilateralen Operation 45 Minuten und bei einer bilateralen Operation 25 Minuten aufrechterhalten. Nach Ablauf der Zeit wurde die Klemme entfernt, und die Niere wieder vorsichtig reponiert. Nach erfolgter Wundnaht wurde die Narkose antagonisiert.

Injektion von Clodronat und IL-22

Dichlormethylenbisphosphat, auch Clodronat genannt, ist ein Mitglied der Stoffgruppe der Bisphosphonate. In ausreichender Konzentration weist Clodronat eine spezifische Toxizität gegenüber mononukleären Phagozyten, wie zum Beispiel Makrophagen oder dendritische Zellen auf. Daher kann es benutzt werden, um diese Zellgruppe zu depletieren, wodurch die Rolle dieser Zellen in verschiedenen Krankheitsbildern genauer untersucht werden kann. Freies Clodronat ist ein hydrophiles Molekül und kann daher die Phospholipidmembranen von Zellen nicht überwinden, um in das intrazelluläre Kompartiment zu gelangen. Um den toxischen Effekt von Clodronat auf mononukleäre Phagozyten nutzen zu können, muss man daher das Molekül an Liposomen binden, welche leicht von den mononukleären Phagozyten aufgenommen werden können. Nach Verdauung der Liposomen durch lysosomale Phospholipasen wird das ungebundene Clodronat in der Zelle freigesetzt und führt zur Apoptose durch seine toxischen Eigenschaften. Dadurch kann eine selektive Depletion von phagozytierenden Zellen erreicht werden^{119,121,158}.

Die Clodronat-Liposomen (je 200 µl pro Maus und Injektion), bzw. die Liposomen in der Kontrollgruppe, wurden am 1., 2. und 4. postoperativen Tag in die Schwanzvene der C57BL/6 Mäuse injiziert.

Den mit Clodronat-Liposom behandelten Versuchstieren wurde rekombinantes IL-22 (Biolegend) in einer Dosis von 20 µg pro Maus am 3. postoperativen Tag in die Schwanzvene injiziert.

Injektion von TLR4-Antikörper

Um eine Blockade des TLR4 zu verursachen, wurde der TLR4-spezifische Antikörper CLI-095 von Invivogen benutzt. Der Antikörper wurde den C57BL/6 Mäusen in die Schwanzvene appliziert. Je nach Versuchsgruppe wurde der TLR4-Antikörper von einer Dosis von 1 mg/kg KG entweder präoperativ am Tag der künstlichen Ischämie-Reperfusion, oder am 2., 3. und 4. postoperativen Tag in die Schwanzvene injiziert.

Injektion von rekombinatem IL-22

Rekombinantes IL-22 (Biolegend) wurde in einer Dosis von 20 µg pro Maus und Injektion in die Schwanzvene der zuvor mit Clodronat-Liposom behandelten Versuchstiere injiziert. Die Injektion erfolgte am 3. postoperativen Tag.

Bestimmung des Blut-Harnstoff-Stickstoff

Harnstoff ist ein Stoffwechselendprodukt, welches in der Leber während der Proteinverdauung anfällt und in das Serum übergeht. Der Harnstoff wird dann von der Niere ausgeschieden, weshalb die Harnstoffkonzentration als indirekter Marker für die Ausscheidungsleistung der Niere steht.

Blut-Harn-Stickstoff (eng. blood urea nitrogen) - auch abgekürzt BUN - gehört ebenso zu den sogenannten Nierenretentionsparametern, welcher die funktionelle Nieren- bzw. Ausscheidungsfunktion widerspiegelt. Er beschreibt den Stickstoffanteil des Stoffwechselendproduktes Harnstoff im Serum in mmol/l bzw. mg/dl. Der Stickstoffanteil des Harnstoffes kann aus der Harnstoffkonzentration berechnet werden, indem man diese mit 0,467 multipliziert, da jedes Harnstoffmolekül (molare Masse 60,06 g) zwei Stickstoffatome (molare Masse 28,01 g) beinhaltet.

2.2.2 Zellkultur

Isolation und Kultur primärer muriner Tubulusepithelzellen

Zur Isolation von primären murinen Tubulusepithelzellen wurden 6 Wochen alte C57BL/6 Mäuse verwendet. Zunächst wurden die Mäuse mit der unter Punkt 2.2.1.3. erläuterten Narkosemischung analgosediert. Nach ca. 20 Minuten wurde die Suffizienz der Analgosedierung kontrolliert und mit Klebestreifen in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion des gesamten Abdomens und des Thorax wurden ebendiese vollständig eröffnet. Nach Präparation und Freilegung des Thorax wurde die Vena cava inferior im Thoraxbereich kranial des Diaphragmas aufgesucht und mit der Schere durchtrennt. Darauf folgte ein Einstich des linken Ventrikels mit einer Hohnadel und eine vollständige Perfusion der Maus mit Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS). Die Nieren wurden freipräpariert und entnommen. Sie wurden gewogen, mit einem Skalpell in kleine Stücke gehackt und in Kollagenase A (Roche Diagnostics) für 30 Minuten bei 37 °C verdaut. Das Gewebe wurde anschließend durch ein Sieb mit der Poren- bzw. Maschengröße von 70 µm gestampft und in einem mit DPBS gefüllten 50 ml Falcon aufgefangen. Nach dem ersten 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 1500 rpm wurde der Überstand abgegossen und das Zellpellet in 2 ml DPBS resuspendiert. Die Suspension wurde vorsichtig auf eine 31% Percoll Lösung (gelöst in DPBS) pipettiert und bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet enthält nach diesem zweiten Zentrifugationsschritt die reinen Tubulusfragmente und wurde in Folge zwei Mal in DPBS resuspendiert und zentrifugiert (1500 rpm, 5 Minuten). Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Die so gewaschenen Tubulusfragmente wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert und vermehrt. Das Medium bestand aus DMEM w/Glukose (Gibco/Life Technologies) mit 10% fetalem bovinem Serum (FBS, Biochrom, Berlin, Deutschland), 1% Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Österreich), Hank's Balanced Salt Solution (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland), HEPES (Gibco/Life Technologies), EGF, T3, Hydrocortison, PGE-1 und Insulin Transferrin Natrium Selenit Zusatz (alle Roche Diagnostics). Nach Inkubation erfolgte alle 24 Stunden eine Sichtkontrolle auf Konfluenzgrad, Klarheit des Mediums und zellmorphologische Veränderungen. Nachdem ein Konfluenzgrad von ca. 90% erreicht wurde, meistens nach 2 Tagen, wurde die erste Zellpassage durchgeführt. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Durch Zugabe einer Lösung bestehend aus PBS und EDTA (1,5 mM) erfolgte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden nach 10-minütiger Bebrütung bei 37°C. Die losen Zellen wurden in ein Falcon pipettiert und bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM-Kulturmedium resuspendiert und je nach Experiment im angestrebten Verhältnis verdünnt und gleichmäßig auf sterile Zellkulturschalen aufgeteilt. Die Stimulationsexperimente wurden einen Tag nach der ersten Zellpassage für 16 Stunden in FBS-freiem Medium durchgeführt, nachdem die Zellen wieder adhärent waren.

Charakterisierung der murinen primären Tubulusepithelzellen

Die isolierten Tubulusepithelzellen wurden nach der suffizienten Zellvermehrung ebendiese charakterisiert und die Zellkultur auf Reinheit und Abwesenheit anderer Zelltypen kontrolliert. Dies erfolgte durch die immunhistologische Färbung der in Kammerobjektträgern durch Azeton fixierten Zellen. Die Zellen wurden mit primären Antikörpern auf die Oberflächenmarker E-Cadherin (muriner Anti-Maus-Antikörper E-Cadherin, BD Biosciences, Franklin Lakes) und Zytokeratin-7 (RCK105,

muriner Anti-Maus-Antikörper, Abcam, Cambridge, Großbritannien), welche charakteristisch für Epithelzellen sind, angefärbt. Die Färbungen wurden anschließend im LSM 510 Konfokalmikroskop und LSM-Software ausgewertet.

Isolation und Kultur dendritischer Zellen aus dem murinen Knochenmark

Für die in-vitro Stimulationsversuche von dendritischen Zellen erfolgte zunächst die Isolation der Zellen aus dem murinen Knochenmark. Hierfür wurde das Knochenmark mit PBS und einer kleinen Spritze ausgespült und im Anschluss unter Stimulation mit GM-CSF (2 ng/ml) in RPMN-Medium kultiviert. Am 8. Tag wurde das Medium ausgewechselt und die adhärenenten dendritischen Zellen wurden für die Stimulationsversuche verwendet. Die Zellen wurden mit nekrotischem Überstand in unterschiedlichen Konzentrationen (50, 150 und 250 µl), TLR-Agonisten, AhR-Liganden (FICZ; Enzo Life Sciences) und Wasserstoffperoxid für 16 Stunden in FCS-freiem RPMN-Medium stimuliert. Der nekrotische Überstand wurde aus isolierten primären murinen Tubulusepithelzellen gewonnen (siehe oben). Hierfür wurden TECs in Medium wiederholt bei -20 °C eingefroren und wieder aufgetaut (insgesamt 3-malige Wiederholung), sodass durch Zellnekrose die Membranintegrität verloren ging und zytoplasmatische Bestandteile in das Medium (Überstand) übergingen. Dies sollte die Tubuluszellnekrose bei einem Ischämie-Reperfusion-Schaden in-vitro nachempfinden. Nach Stimulation der BMDCs wurde das Medium auf IL-22 und IL-6 mittels ELISA analysiert.

Renale dendritische Zellen hingegen wurden nach Siebung mittels MACS (engl. magnetic bead separation) isoliert. Die Isolation erfolgte in diesem spezifischen Fall mit CD11c MicroBeads (Miltenyi Biotch). Die Reinheitskontrolle der isolierten Zellen erfolgte durch eine durchflusszytometrische Analyse mit einem CD11c Antikörper (BD-Biosciences-Pharmingen).

2.2.3 In-vitro Wundheilungsassay (Scratch-Assay)

Um die Wundheilungsgeschwindigkeit nach Stimulation verschiedener Liganden zu testen, erfolgte in Scratch-Assay. Hierfür erfolgte die Kultivierung von primären TECs in 12-Well-Platten. Sobald die TECs einen durchgehenden Monolayer ausgebildet hatten, wurde mittels einer 1 ml Pipettenspitze ein standardisierter "Kratzer" bzw. Monolayer-Schaden gleicher Breite verursacht. Hiernach wurde direkt vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation (0, 16, 20 und 24 Stunden) mikroskopische Fotos an derselben, markierten Stelle des Epithelschadens in den unterschiedlichen Gruppen angefertigt. Die kleiner werdende Fläche des "Kratzers" wurde digital mittels Adobe Photoshop ausgewertet und in Wundschließung umgerechnet.

2.2.4 Proliferationsassay

Zur Proliferationsmessung primärer TECs nach Stimulation mit TLR-Liganden wurde der Cell Titer 96 Proliferation Assay genutzt. Der Assay beruht auf die Verstoffwechslung bzw. Reduktion des von MTS gebildeten Formazanproduktes in vitalen Zellen, was via kolorimetrische Absorptionmessung Rückschlüsse auf die Menge an Zellen in der 96-Well-Platte zulässt. Eine wässrige Lösung bestehend aus PES (Phenazin Ethosulfat) und MTS (3- (4,5-Dimethyl-2-yl)- 5- (3-Carboxymethoxyphenyl)- 2- (4-sulfophenyl)- 2H- Tetrazolium) wurde zu den Zellen in einer 96 Wells Platte 16 Stunden nach Stimulation

mit den Liganden hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1-4 Stunden wurde die Absorption mittels ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Absorption entspricht direkt proportional der Anzahl der lebenden Zellen und kann mittels Verdünnungsreihe auf die absolute Zellzahl rückgerechnet werden.

2.2.5 Immunhistochemie und histopathologische Auswertung

Gewebe- und Immunhistochemie

Zum Zwecke der lichtmikroskopischen Analyse der Nierenpräparate wurden histochemische und immunhistochemische Methoden angewandt. Die entnommenen Nieren wurden in Histosettes plaziert und mit einer Lösung aus PBS mit 10% Formalin fixiert. Nach Einbettung der Organe in Paraffin wurden die Blöcke in Scheiben von 2µm Dicke mit einem Mykrotom geschnitten. Die Nieren waren in einer Frontalebene zu sehen. Hiernach wurden die Schnitte auf Objektträger gegeben. Die anschließende Rehydrierung und Waschung des Gewebes vom Paraffin erfolgte in einer sequenziellen Behandlung einer absteigenden Alkohollösung (jeweils 3 Minuten in Xylol, 100%-95%-80%-50% Ethanol und abschließend in PBS). Die endogene Peroxidase wird mit 30% H₂O₂ und Methanol für 20 Minuten im Dunkeln geblockt. Anschließend werden die Antigene für die anschließende Färbung nach einem Waschvorgang mit PBS mit einer sogenannten Antigen unmasking Solution demaskiert. Dann folgten die Färbungen zur weiteren mikroskopischen Analyse des Nierengewebes. Der Primärantikörper wurde bei allen Färbungen über Nacht bei 4°C nach Herstellerangaben inkubiert. Als Sekundärantikörper dienten Anti-Schaf-IgG und Anti-Ratte-IgG.

Histopathologische Auswertung

Zur Analyse und Quantifizierung des durch Ischämie und Reperfusion verursachten Schadens wurden die Präparate wie zuvor beschrieben unterschiedlich gefärbt. Hierfür wurden die verschiedenen Versuchsgruppen (Behandlungs- und Kontrollgruppen) miteinander verglichen. Pro Präparat und individuelles Versuchstier erfolgte die Auswertung von zehn sich nicht überlappenden Gesichtsfeldern in einer 100-fachen Vergrößerung. Die Auswertung selbst wurde bei allen Färbungen von zwei verblindeten Untersuchern durchgeführt. In der PAS-Färbung erfolgte die Einteilung der Gesichtsfelder in Schadenskategorien, während die THP- und Lectinfärbungen auf die Gesamtfärbefläche und somit der verbliebenen Tubuli ausgewertet wurden. Hinsichtlich der Schadenskategorien in der PAS-Färbung gibt es eine Punktzahl von 0-5, welche hier genauer erläutert wird. Eine Punktzahl von 0 bedeutet, dass annähernd vollständige Gewebeintegrität vorliegt. Als Kriterien zur Einteilung wurde insbesondere auf Zeichen des nekrotischen bzw. apoptotischen Zelluntergangs, Integritätsverlust des Bürstensaumes, interstitielle Ödeme bzw. Schwellung, ein Kontinuitätsabbruch der Basalmembran als Anzeichen für eine Schädigung der Basalmembranscheide, sowie auf einen Abriss bzw. Dislokation von Tubulusepithelzellen in das Lumen mit einhergehender Bildung von sogenannten "casts", also intraluminale gipsartige Zylinder geachtet. Die Einteilung in die verschiedenen Schweregrade erfolgte gemäß des prozentualen Anteils des geschädigten Gewebes im gesamten Gesichtsfeld (0, keine Schädigung; 1, <10%; 2, 11%–25%; 3, 26%–45%; 4, 46%–75%; 5, >76%)

ELISA

ELISA steht für die englische Abkürzung Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay und ist eine immunologische Methode zur Quantifizierung von spezifischen Proteinen in einer Lösung auf Basis einer enzymatischen Farbreaktion. Hierfür kommen Antikörper zum Einsatz, welche an das zu bestimmende Protein spezifisch binden. Ein Enzym, welches an dem Antikörper gebunden ist, katalysiert eine Farbumschlagsreaktion, welche dann je nach Konzentrationsgrad stärker oder schwächer ausfällt und gemessen werden kann. Wenn zwei Antikörper zum Einsatz kommen, welche an unterschiedliche Epitope des Proteins binden, handelt es sich um einen sogenannten "Sandwich"-ELISA, welcher auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Der erste Antikörper benetzt die Oberfläche einer 96-well-Microtiterplatte. Die Proben wurden im Anschluss in die Wells pipettiert, sodass die Bindung der Proteine in Proportion zu der Konzentration der spezifischen Probe erfolgte. Der zweite Antikörper bindet an das Protein, welches bereits an den ersten Antikörper gebunden ist, nur an einem anderen Epitop, sodass der Komplex insgesamt einem "Sandwich" ähnelt. Der zweite Antikörper ist mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt, welcher unter Zugabe eines Chromogens, bestehend aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid, einen Farbumschlag bedingt, welcher photometrisch gemessen und analysiert werden kann. Die gemessene Absorption ist proportional zur Konzentration des Proteins in der Lösung und wird mit den Absorptionswerten von bekannten Konzentrationen verglichen, sodass auf die Konzentration in der Probe mathematisch rückgefolgert werden kann.

In dieser Arbeit kamen ELISAs zur Detektion von Interleukin 6 und Interleukin 22 zum Einsatz. Die Abläufe der beiden ELISA sind gleich und werden im Folgenden beschrieben:

In beiden Fällen erfolgte die Messung der Interleukine aus Mediumüberständen oder lysiertem Gewebe. Am Vortag der Konzentrationsbestimmung erfolgte das sogenannte "coating", also Benetzung der 96-well-Platte mit dem ersten Antikörper (monoklonaler Anti-Maus-IL-6- und IL-22-Antikörper) mittels jeweils 100 µl der Antikörper-Lösung, welche im Anschluss bei 4°C über Nacht inkubiert wurde. Nach einem 3-maligen Waschvorgang mit 300 µl Waschpuffer pro Well am Folgetag, erfolgte die 2-stündige Inkubation der Wells mit Reaktionsverdünner (PBS mit 10% FCS, 200 µl/well), was wiederum unspezifische Bindungen und Reaktionen verhindern soll. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte das Auftragen der Konzentrationsreihe sowie der Proben, welche in Reaktionsverdünner gelöst waren (100 µl). Nach einer erneuten 2-stündigen Inkubationszeit wurde nach einem erneuten Waschvorgang der zweite sogenannte Detection-Antikörper zusammen mit einem Reaktionsenzymkonjugat aus Meerrettichperoxidase und Streptavidin aufgetragen (100 µl). Nach Zugabe des Substrates aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid (Verhältnis 1:1, 100 µl) erfolgte eine halbstündige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Farbreaktion mit Schwefelsäure (50 µl/well) gestoppt und die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA-Lesegerät durchgeführt.

2.2.6 RNA-Analyse

Um die Aktivität einer Zelle auf Genexpressionsebene und damit das Genexpressionsprofil nachweisen zu können, kann eine sogenannte RT-PCR angewandt werden (*engl. real-time-polymerase-chain-reaction*). Ähnlich wie beim ELISA kann somit die Expression bestimmter Gene,

welche für Genprodukte kodieren, bestimmt werden. Hierdurch können Rückschlüsse auf Expressionsverhalten nach einem Ischämie-Reperfusion-Schaden der Niere bzw. in den verschiedenen Gruppen und Organen gezogen werden und somit die Auswirkung verschiedener Ausgangssituationen analysiert werden.

Isolierung von RNA aus dem Gewebe

Kleine Nierenstücke wurden nach Entnahme bei -80°C gesondert gelagert bzw. bei Möglichkeit sofort weiterverarbeitet. Die Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Qiaen RNeasy Mini Kit II, welches auch alle folgenden aufgeführten Reagenzien enthielt. Hierbei wurde das Nierenstück (max. 30 mg) in einem 2 ml Tube zusammen mit 1 ml Qiazol Lyse-Reagenz gegeben. Das Gewebestück in der Lösung wurde im Anschluss mittels eines Dispergiergerätes ULTRA-TURAXX T25 (Stufe 2) homogenisiert und auf Eis gelagert. Das Lysat wurde in ein neues Röhrchen übertragen. Hiernach erfolgte der erste Zentrifugationszyklus, sodass sich ein Pellet mit Zelldetritus und ein klarer Überstand, welcher unter anderem die RNA enthält, bildete. Der klare Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 2 ml Tube übertragen. 350 μl dieser Lösung wurde mit 350 μl 70% Ethanol vermischt und auf eine RNeasy Mini Säule auf einem 2 ml Tube pipettiert und bei $8000 \times g$ für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis der gesamte Überstand durch die Membran zentrifugiert wurde. Zur Entfernung der cDNA in der Membran erfolgte eine Verdauung der cDNA mittels DNase Digestion Kit durch Gabe der DNase-Lösung auf die Membran. Hiernach erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 700 μl RW1-Puffer auf der Säule, wobei die durchzentrifugierte Flüssigkeit wieder verworfen wurde. Nach Wechsel auf neue 2 ml Tubes wurde 500 μl RPE-Puffer auf der Säule/Membran zentrifugiert und verworfen. Im letzten Schritt wurden 40 μl RNase-freies Wasser auf die Membran mit der RNA pipettiert und in ein neues Röhrchen zentrifugiert, wodurch die RNA eluiert wurde. Materialien oder Lösungen, welche nicht im Hersteller-Kit enthalten waren und somit RNase enthalten könnten, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) vorbehandelt, sodass die RNase inhibiert wurde.

Um Qualität und Quantität der isolierten RNA zu testen, wurde eine photometrische Analyse durchgeführt. 2 μl der RNA-Lösung wurden 50-fach in DEPC behandeltem Wasser verdünnt und das Verhältnis der optischen Dichte bei 260/280 nm photometrisch bestimmt (NanoDrop). Hiermit konnte mittels Multiplikation von Extinktion und Verdünnungsfaktor die RNA-Konzentration in der Probe in $\mu\text{g/ml}$ errechnet werden. Hinsichtlich der Güte und des Kontaminationsgrades wurde die RNA-Probe ab einer Ratio (260 nm/ 280 nm) von 1,6 als rein angesehen und somit frei von cDNA und anderen Kontaminationen.

cDNA Synthese

Die RNA-Proben wurden je nach im Photometer gemessener Konzentration auf 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Der Mastermix zur cDNA-Synthese bestand aus 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 [15 $\mu\text{g/ml}$] 1 μl Superscript bzw. ddH₂O als Kontrolle. 15 μl dieses Mastermix wurden mit 20 μl der verdünnten RNA-Proben in DEPC-behandelte Tubes vermischt und in ständiger Bewegung bei 42°C im Thermomixer inkubiert. Die in cDNA transkribierte RNA wurde im Anschluss bis zur Analyse mittels RT-PCR bei -20°C gelagert.

RT-PCR (Light Cycler 480)

Der 2x-Mastermix für die RT-PCR bestand aus 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 1,21 ml RNase-freiem Wasser. Der PCR-Mix enthielt pro 20 µl 2x-SYBRGreen-Mastermix mit 0,16 µl Taq-Polymerase und 8,4 µl RNase-freiem Wasser und den jeweiligen Primern (300 nM *Forward primer*, 0,6 µl und 300 nM *Reverse Primer*, 0,6 µl), sowie 0,2 µl der cDNA. Diese 20 µl des PCR-Mixes wurden in eine 96-Well-Multiplatte pipettiert. RNase-freies Wasser diente als Negativkontrolle. Als Referenzgen wurde das Haushaltsgen 18s RNA gemessen. Nach Versiegelung der Platte mit einer transparenten Folie (MicroAmp® Optical Adhesive Film) und Zentrifugation zur Elimination von kleinsten Luftbläschen erfolgte die RT-PCR. Nach 40 Amplifikationszyklen und intermittierender Fluoreszenzmessung zur Quantifizierung der vorhandenen zu analysierenden cDNA erfolgte die Erstellung einer sogenannten Schmelzkurve, wodurch die Prüfung der Primer-Schmelzeigenschaften erfolgte. Bei guter Primerqualität wurde hierbei nur ein Peak gemessen. Die Daten der RT-PCR wurden mittels der vergleichenden C_T-Methode analysiert und ausgewertet. Die Primer wurden von der Firma Metabion International AG (Martinsried, D) bezogen.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Primer

	Right Primer (5' - 3')	Left Primer (3' - 5')
18S	AGGGCCTCACTAAACCATCC	GCAATTATTCCCCATGAACG
π-GST	ACACCGCCCTCGAACTGGGAA	CGCAGCACTGAATCCGCACC
α-GST	CTTCAAACCTCCACCCCTGCTGC	CAATGGCCGGGAAGCCCGTG
IL-22	GCTCAGCTCCTGTCACATCA	TCGCCTTGATCTCTCCAATC
L-FABP	AGGCAATAGGTCTGCCGAGGAC	CCAGTTCGCACTCCTCCCCCA
AhR	CTCCTTCTTGCAAATCCTGC	GGCCAAGAGCTTCTTTGATG
KIM-1	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT	TCAGCTCGGGAATGCACAA
CCL2	ATTGGGATCATCTTGCTGGT	CCTGCTGTTACAGTTGCC
IL-10	TGTCAAATTCATTCATGGCCT	ATCGATTTCTCCCCTGTGAA
IL-12a	GCTTCTCCACAGGAGGTTT	CTAGACAAGGGCATGCTGGT
CCL5	GTGCCACGTCAAGGAGTAT	CCACTTCTTCTCTGGGTTGG
IL-6	ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC	TGATGCACTTGACAGAAAACA
TNF-α	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAACT

2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Differenzierung der verschiedenen immunologischen Zellen mit unterschiedlichen Oberflächenantigenen und IL-22 Ausschüttung wurde die sogenannten FACS (fluorescence activated cell sorter)-Analyse angewendet. Die FACS-Analyse wurde mittels eines FACSCalibur Gerätes sowie passender CellQuest Software durchgeführt.

Im Allgemeinen beruht das Prinzip der Durchflusszytometrie auf den Unterschieden von Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächeneigenschaften, Struktur, Größe und intrazellulärer Zusammensetzung,

welche von dem Gerät ausgemacht werden können. In einem laminaren Flüssigkeitsstrom werden die Zellen an einem Laser vorbeigeführt und die jeweiligen Antikörper, welche an ihnen haften, detektiert. Die Antikörper sind an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, welche durch den Laserstrahl unterschiedlicher Wellenlängen angeregt wird und somit Licht emittieren, welches von Sensoren detektiert wird. Zudem lässt sich neben der Detektion der einzelnen Zelle auch über das Vorwärtstrelcht (forward scatter) die Größe der Zelle sowie über das Seitwärtslicht (sideward catter) die Granularität der Zelle bestimmen. Bei der Messung mehrerer Antikörper kann es zu einer Überlappung der Wellenlänge der Lichtemissionen kommen, sodass eine Kompensation notwendig wird. Zur Kompensation verwendet man einfach markierte Zellen als Kontrollgruppe, sodass der in andere Kanäle hineinstreuende Anteil der Zellen substrahiert werden kann.

Die Zellsuspension aus den zu analysierenden Nieren wurde ähnlich wie zuvor bei den ersten Schritten der Isolation der TECs beschrieben gewonnen. Der Vorgang beinhaltet einen Kollagenverdau, Hämolyse, die Passage durch einen Präseparationsfilter und zwei Waschschrirte mit Lagerung auf Eis. Hiernach wurden die Zellen nach Herstellerangaben für 60 Minuten je Antikörper im Dunkeln inkubiert und hiernach erneut mit PBS gewaschen. Für die intrazelluläre Färbung mit IL-22-Antikörper wurden die Zellen in Paraformaldehyd fixiert und mittels eines Permeabilisationspuffers (PBS, 0,5% BSA, 0,5% Sapoin) permeabilisiert, sodass der Antikörper in das Zytoplasma eindringen und das IL-22 binden konnte. Falls Sekundäantikörper zur Detektion notwendig waren, wurde dieser nach Herstellerangaben ebenfalls inkubiert. Die Quantifizierung der Zellen zur Verdünnung der einzelnen Gruppen erfolgte mittels Counting Beads (Invitrogen).

2.2.8 Statistische Auswertung

Vor der weiteren Analyse der Daten erfolgte ein Test auf eine Normalverteilung der Daten mittels Saphiro-Wilk-Test. Die Vergleiche normalverteilter Datensätze zwischen den verschiedenen Gruppen erfolgte mittels einfaktorieller Varianzanalyse ANOVA oder t-Test. Alternativ wurde bei nicht-normalverteilten Daten ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die *post hoc* Bonferroni Korrektur wurde für mehrfache Vergleiche angewandt. Die Daten werden als Mittelwert mit dem SEM dargestellt. Die SEM (*engl. standard error of the mean*) gebildet aus dem Quotienten der Varianz s und der Quadratwurzel der Beobachtungen n - wird als Fehlerkorrektur in Abbildungen und Graphen bzw. Tabellen angegeben. Ein Ergebnis wurde ab $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen, sodass dann die Nullhypothese verworfen werden konnte. Dies wird in den Abbildungen und Tabellen dementsprechend mit dem Symbol * gekennzeichnet und dargestellt.

2.2.9 Arbeitsaufteilung

Die oben beschriebenen Methoden wurden von den drei Erstautoren der Publikation maßgeblich durchgeführt. Zur genaueren Arbeitsaufteilung wurden insbesondere neben der Planung des Projektes der Großteil der *in vitro* Essays von mir geplant und durchgeführt, sowie die Aufbereitungen und Auswertungen der Experimente aus den Gewebeproben der Versuchstiere. Die Tierversuche sowie die FACS-Analyse wurden von Onkar P. Kulkarni sowie Shrikant R. Mulay durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Die Blockierung von endogenem IL-22 verhindert die epitheliale Regeneration bei einem akuten Nierenschaden

Um die Rolle von IL-22 auf epitheliale Reparaturmechanismen *in-vivo* genauer zu untersuchen, wurde die IL-22 Expression im Blutplasma durch einen ELISA und in der Niere durch eine RT-PCR am Tag 1, 5 und 10 nach einem unilateralen, 45-minütigem Abklemmen des Nierenhilus gemessen. Die Menge an IL-22-Protein im Plasma war am Tag 5 und 10 nach dem ischämischen Nierenschaden im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (Abbildung 6A). Die Konzentration an IL-22 mRNA in der betroffenen Niere war bereits am 1. Tag nach dem unilateralen ischämischen Nierenschaden signifikant gestiegen (Abbildung 6B)¹.

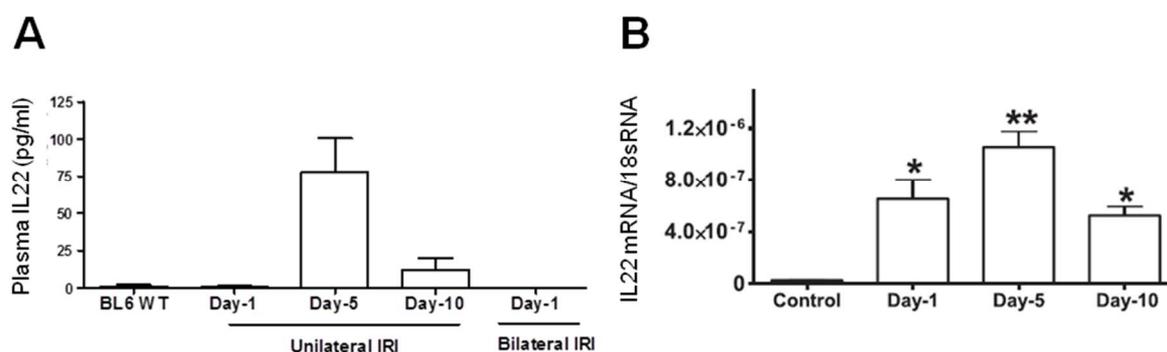


Abbildung 6: IL-22-Ausschüttung nach renalem unilateralem und bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden. (A) Das IL-22 im Plasma zeigte einen signifikanten Anstieg nach unilateralem Nierenschaden, wobei das Maximum an Plasma-IL-22-Spiegel am Tag 5 nach der Ischämie-Reperfusion festgestellt werden konnte. Bei bilateralem Nierenschaden kam es zu keinerlei Ausschüttung von IL-22. (B) Die IL-22-mRNA-Analyse nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden zeigte ebenfalls einen Anstieg der IL-22-mRNA-Expression mit einem Maximum an IL-22-RNA am Tag 5 nach Ischämie-Reperfusion. Die Plasma-IL-22-Konzentrationen sind in (A) dargestellt und wurden mittels ELISA gemessen. Die mRNA wurde mittels RT-PCR quantifiziert (B). Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ vs. *sham*-Gruppe. Modifiziert nach¹

Es wurde zudem eine IL-22 Färbung der operativ ischämischen Niere sowie der kontralateralen Kontrollnieren am Tag 1, 5 und 10 nach dem künstlich verursachten ischämischen Nierenschaden angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass IL-22 ausschließlich im Niereninterstitium am 1. und 5. Tag nach Behandlung vorhanden war. In der kontralateralen, nicht-ischämischen Niere konnte dies nicht nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde auch eine signifikant erhöhte IL-22 Konzentration in der Milz mittels IL-22 Färbung gemessen. Wie oben bereits beschrieben konnte die Existenz des Liganden IL-22 ausschließlich im Interstitium der Niere nachgewiesen werden, während eine Färbung der Niere auf den IL-22 R1 zeigte, dass dieser exklusiv auf TECs exprimiert wird (Abbildung 7)¹.

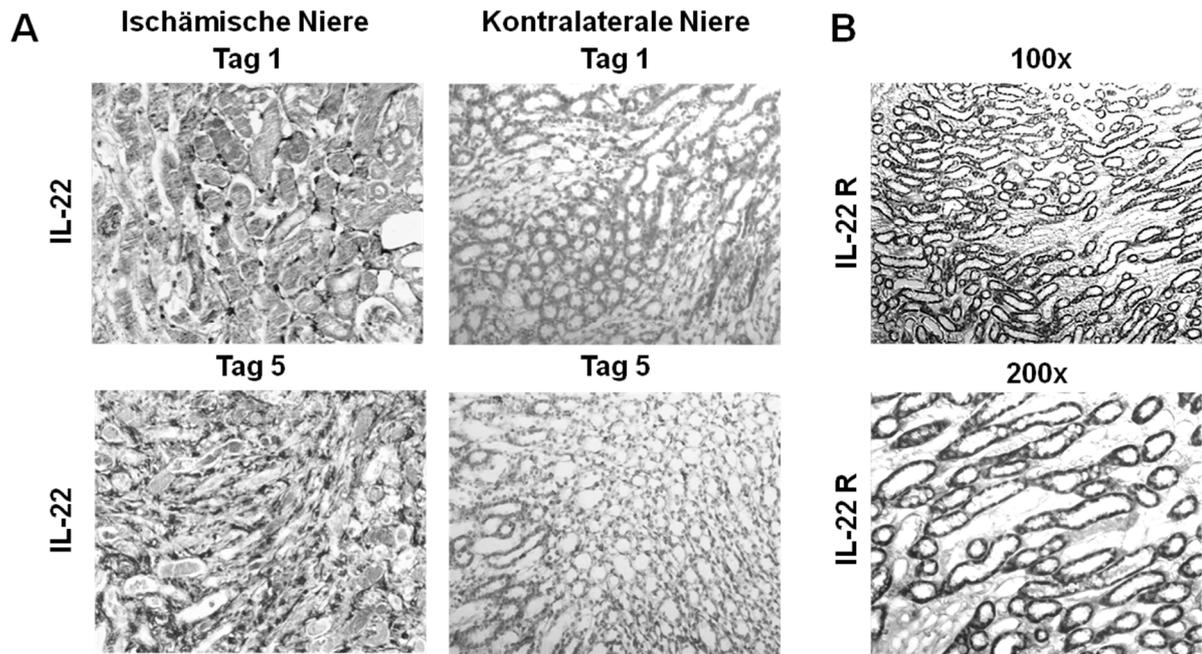


Abbildung 7: Ein Ischämie-Reperfusionsschaden bewirkt eine intrarenale IL-22-Expression. (A) Die von dem Schaden betroffene Niere zeigt in der IL-22-Färbung eine - mit zunehmender Quantität im Verlauf - Ausschüttung von IL-22, während die kontralaterale gesunde Niere keine wesentliche IL-22-Ausschüttung zeigt. (B) Der IL-22-Rezeptor zeigt sich in der immunohistochemischen Färbung auf den Tubulusepithelzellen der Niere. Dargestellt werden repräsentative Abbildungen mit Färbungen auf IL-22 und den IL-22-Rezeptor. Modifiziert nach¹

Um der Fragestellung nachzugehen, inwiefern TECs in einer ischämischen Niere durch IL-22 beeinflusst werden, wurde bei einer Gruppe von C5/BL6-WT-Mäusen ein unilateraler, ischämischer Nierenschaden gesetzt. Hierfür wurde durch 45-minütiges Abklemmen des Nierenhilus ein ischämischer Schaden verursacht. Da dies konsequent zu einer Tubulusnekrose führt eignet sich dieses *in-vivo* Modell für die Untersuchung eines akuten Nierenschadens. Durch Antagonisierung von IL-22 mittels entsprechender rekombinanter Antikörper vom 2. bis zum 5. und somit letzten postoperativen Tag konnte die Rolle dieses IL während eines akuten Nierenschadens näher untersucht werden. Der gewählte Zeitpunkt entspricht den in der Literatur angegebenen Phasen einer akuten Nierenschädigung, da in dem genutzten *in-vivo* Modell die entzündliche, schädigende Phase 48 Stunden andauert und ab dem 2. postoperativen Tag in die regenerierende Phase übergeht, welche mit Ausschüttung einer Reihe von anti-entzündlichen und proregenerativen Mediatoren - unter anderem IL-22 - einhergeht und bis zum 5. postoperativen Tag andauert. Um den Nierenschaden in den verschiedenen Gruppen zu quantifizieren, wurden renale Schnitte mit PAS-Färbung sowie auf THP und Lectin gefärbt. Wie in Abbildung 8 zu sehen ist, verursacht eine Blockade von IL-22 durch Injektion von anti-IL-22-Antikörpern eine signifikant niedrigere Regenerationsrate des tubulären Systems in der Niere. Dies ist eindrucksvoll an der geringeren Anzahl von Lectin⁺ proximalen und THP⁺ distalen Tubuli, sowie an dem höheren Nekroseindex bei der PAS-Färbung zu erkennen (Abbildung 8)¹.

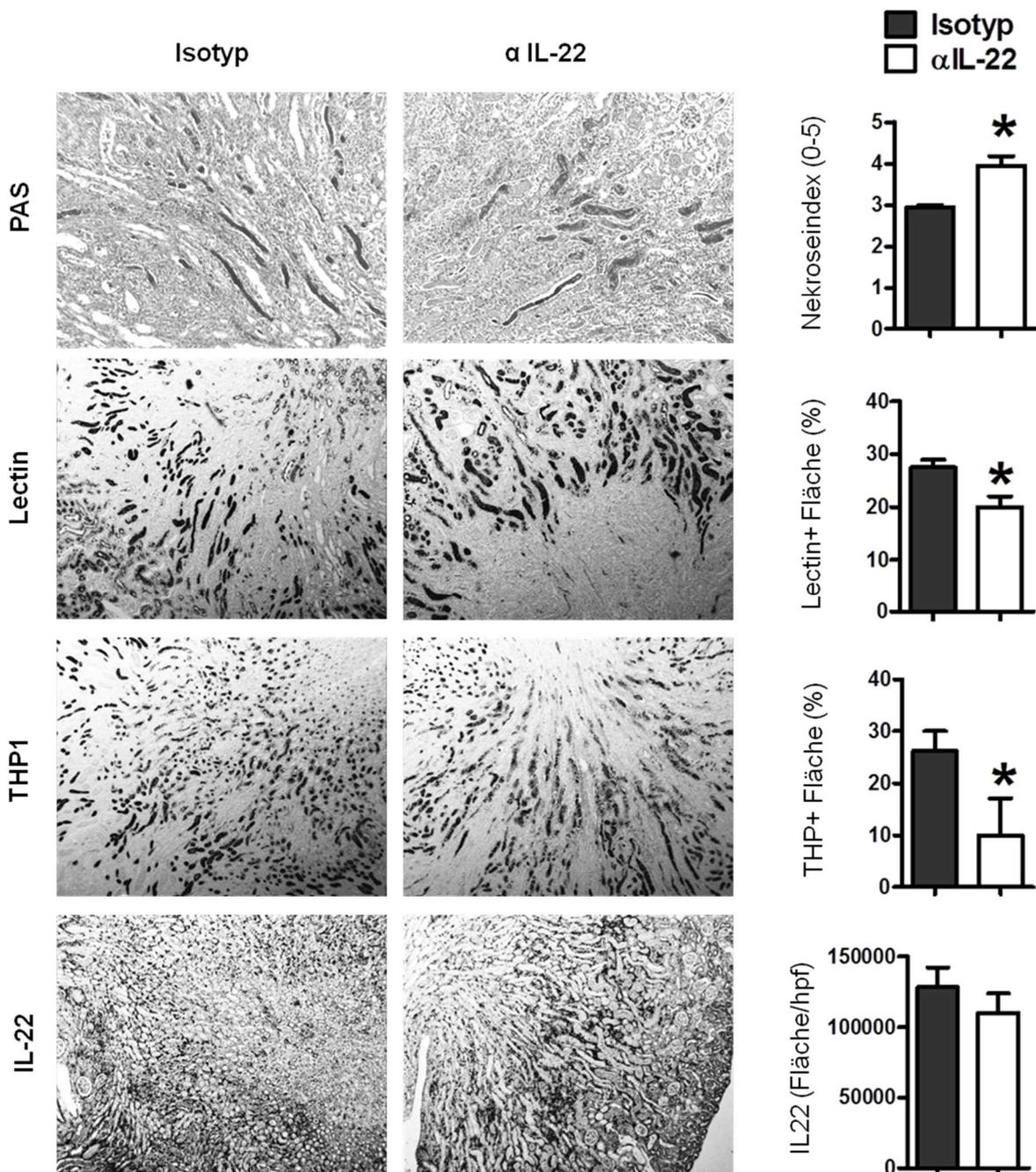


Abbildung 8: Die IL-22-Inhibition verhindert die Tubulus-Reparatur in der post-ischämischen Niere. Die Abbildung zeigt eine PAS-Färbung sowie immunohistochemische Färbungen auf Lectin (distale Tubuli), THP (proximale Tubuli) und IL-22. Durch IL-22-Inhibierung kommt es zu einem erhöhten Nekroseindex, sowie zu signifikant weniger nachweisbarer distaler und insbesondere proximaler Tubuli. Dies zeigt eindrücklich einen erhöhten Schaden in der post-ischämischen Niere unter IL-22-Blockade. Die IL-22-Ausschüttung selbst bleibt nach Behandlung mit IL-22-Antikörper unbeeinflusst. Originale Vergrößerung x100. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen sowie die gefärbte Fläche aus 10 Gesichtsfeldern pro Organ je Gruppe und Färbung. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. *Isotyp-AK*-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Um die Regeneration näher zu untersuchen, wurde eine Doppelfärbung auf PCNA- (*engl. proliferating cell nuclear antigen*) und THP-positive distale Tubuli durchgeführt. Dies dient der Quantifizierung der Proliferationsrate der Tubuli. Hierbei zeigte sich eine signifikant niedrigere Proliferationsrate in der mit anti-IL-22-Antikörpern behandelte Gruppe (Abbildung 9). Eine zusätzliche Färbung auf IL-22 wies keinerlei signifikante Unterschiede hinsichtlich der IL-22 Expression im renalen

Interstitium auf Abbildung 9. So konnte sichergestellt werden, dass der applizierte anti-IL-22-Antikörper die IL-22 Produktion in der Niere nicht beeinflusste¹.

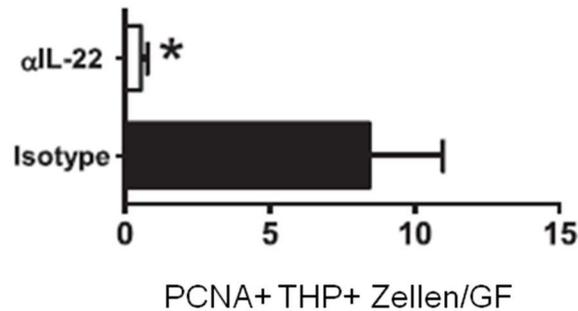


Abbildung 9: Die Inhibierung von IL-22 reduziert die Anzahl der regenerierenden PCNA⁺THP⁺ Zellen. Dargestellt ist die gefärbte Fläche aus 10 Gesichtsfeldern pro Organ je Gruppe und Färbung. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. *Isotyp-AK*-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Die beobachtete geringere Regeneration bei Inhibition der IL-22-abhängigen Tubulusregeneration geht Hand in Hand mit den Daten der mRNA Expression verschiedener Tubulusnekrose- und Schadensmarkern. Es wurde die quantitative mRNA Expression von Kim-1, π GST, α GST und FABP zwischen der Gruppe, welche mit anti-IL-22-Antikörper behandelt wurde, und der Kontrollgruppe, welcher Isotyp-AK zu denselben Zeitpunkten injiziert wurde, verglichen. Es zeigte sich, dass alle zuvor genannten Tubulusschadensmarker in der IL-22-AK Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (Abbildung 10)¹.

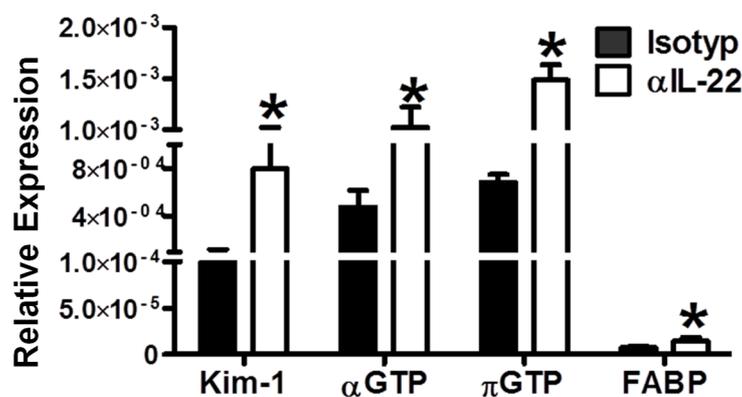


Abbildung 10: Die mRNA der tubulären Schadensmarker Kim-1, π GST, α GST und FABP waren durch die IL-22-Blockade erhöht. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. *Isotyp-AK*-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Die bisher angeführten Daten bieten ein eindrucksvolles Bild über die pro-regeneratorischen Eigenschaften von IL-22 auf die Niere und im Speziellen auf das tubuläre System. Für die gesamtheitliche Betrachtung muss zusätzlich die Rolle von IL-22 auf die renale Funktion untersucht werden. Deshalb wurde in IL-22-defizienten Mäusen ein bilateraler ischämischer Schaden gesetzt. Neben einem akuten Nierenschaden kommt es konsekutiv zu einer vorübergehenden Urämie im Organismus mit vermehrter Ansammlung harnpflichtiger Substanzen im Blutplasma der Mäuse, welche als Marker für die Nierenfunktion herangezogen werden können. Bei einem einseitigen ischämischen

Schaden übernimmt die nicht betroffene, kontralaterale Niere alle notwendigen Funktionen wie zum Beispiel die Ausscheidung, renale Stoffwechselprozesse und die Produktion verschiedener Hormone. Nachdem ein bilateraler ischämischer Nierenschaden durch 45-minütige Abklemmung des Nierenhilus gesetzt wurde, wurde die Serum-Harnstoff-Konzentration (*engl. blood urea nitrogen, Abk. BUN*) im Blutplasma am Tag 0, 1 und 5 gemessen und die IL-22-KO-Mäuse mit den WT-Mäusen verglichen. Die IL-22-defizienten Mäuse hatten am 5. Tag nach der OP eine signifikant höhere BUN-Konzentration als die WT-Mäuse, während am 1. Tag keinerlei signifikanter Unterschied der beiden Gruppen festgestellt werden konnte (Abbildung 11). Dies deutet darauf hin, dass IL-22 nicht zu der Phase der ischämischen, entzündlichen Phase der Nierenschädigung beiträgt, sehr wohl aber zur regenerativen Phase bis zum Tag 5, was die geringere BUN-Konzentration, hinweisend auf eine bessere Nierenfunktion, aufzeigt¹.

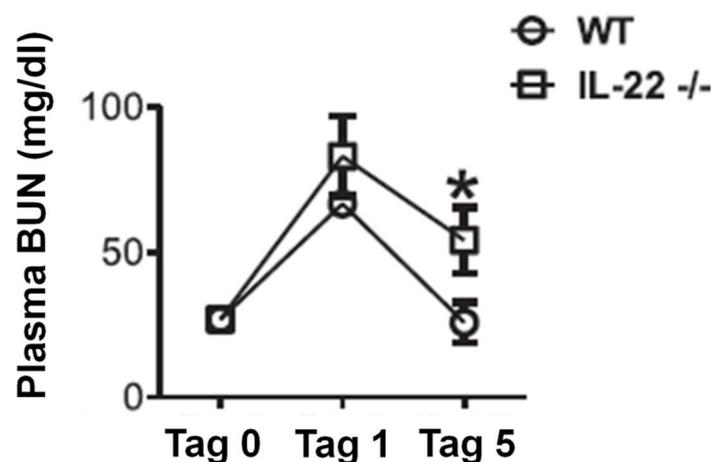


Abbildung 11: IL-22-KO-Mäuse haben nach bilateralem, renalem Ischämie-Reperfusionsschaden eine verringerte tubuläre Regeneration. Die Plasma-Harnstoff-Konzentration in den IL-22-Mäusen waren am 5. Tag nach dem Ischämie-Reperfusionsschaden signifikant höher als in WT-Mäusen. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. WT-Mäuse. Modifiziert nach¹

3.2 Interstitielle mononukleäre Phagozyten sind die Hauptquelle von renalem IL-22

Um IL-22-produzierende Zellen in der Mausniere zu finden wurden Zellen aus der Niere des Ischämie-Modells mittels Durchflusszytometrie am 5. Tag nach der OP gemessen. Es zeigte sich, dass IL-22 selektiv von CD45-positiven Leukozyten, jedoch keineswegs von CD45-negativen nicht-immunogenen Nierenzellen produziert werden. Genauere Analysen der Leukozytenoberflächenmarker wurden anschließend durchgeführt mit besonderem Augenmerk auf die Oberflächenmarker der mononukleären Phagozyten CD11b, CD11c, F4/80 und CD103. Hierbei zeigte sich, dass alle CD11b⁺, CD11b⁺CD103⁺, CD103⁺, CD11c⁺ und F4/80⁺ mononukleären Phagozyten den mit Abstand größten Anteil an IL-22 in der ischämisch-geschädigten Niere produzierten. CD3⁺ Lymphozyten, sonst in der Milz hauptsächliche Produzenten von IL-22 stellten nur eine sehr kleine IL-22 produzierende Population in der Niere dar (Abbildung 12)¹.

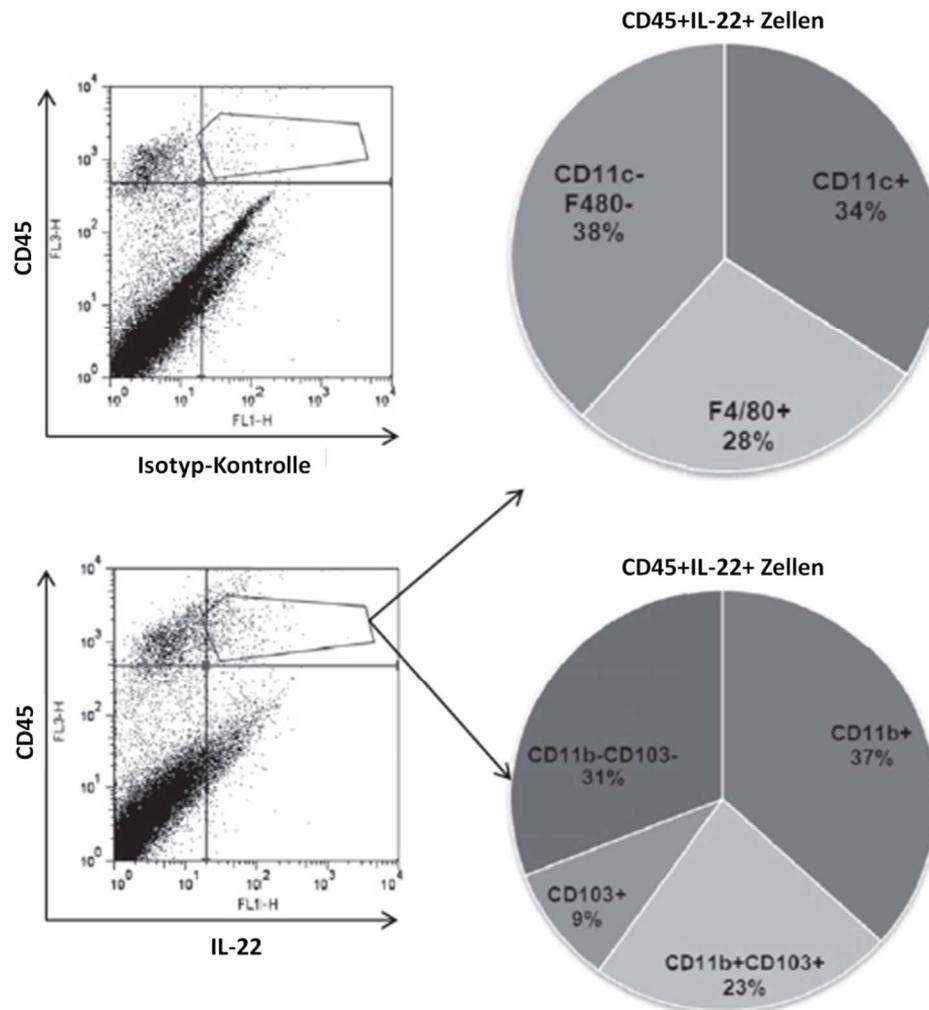


Abbildung 12: FACS-Analyse: Ein ischämischer Nierenschaden stößt die intrarenale Expression von IL-22, wobei die renalen mononukleären Phagozyten (CD11b⁺, CD103⁺, CD11c⁺ und F4/80⁺) die Hauptquelle von IL-22 nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden sind. Modifiziert nach¹

Da die Effektorzellen der IL-22 vermittelten Regeneration der ischämischen Niere identifiziert werden konnten, wurde deren Einfluss näher charakterisiert, indem die renalen mononukleären Phagozyten durch Liposom-Clodronat-Injektionen an dem 2. und 4. postoperativen Tag, also genau in der regenerativen Phase, in welcher die Produktion von IL-22 zu einer gesteigerten Nierenregeneration führen sollte, depletiert wurden. Durchflusszytometrische Daten offenbarten, dass Liposom-Clodronat-Injektionen die mononukleären Phagozyten, die mit Abstand größte renale IL-22 Quelle, im Vergleich zur Liposom-injizierten Kontrollgruppe weitgehend depletierten, während die kleine, auch IL-22 produzierende Gruppe von CD3⁺ Lymphozyten, NK-Zellen und Neutrophilen unbeeinflusst blieben (Abbildung 13 und Tabelle 6)¹.

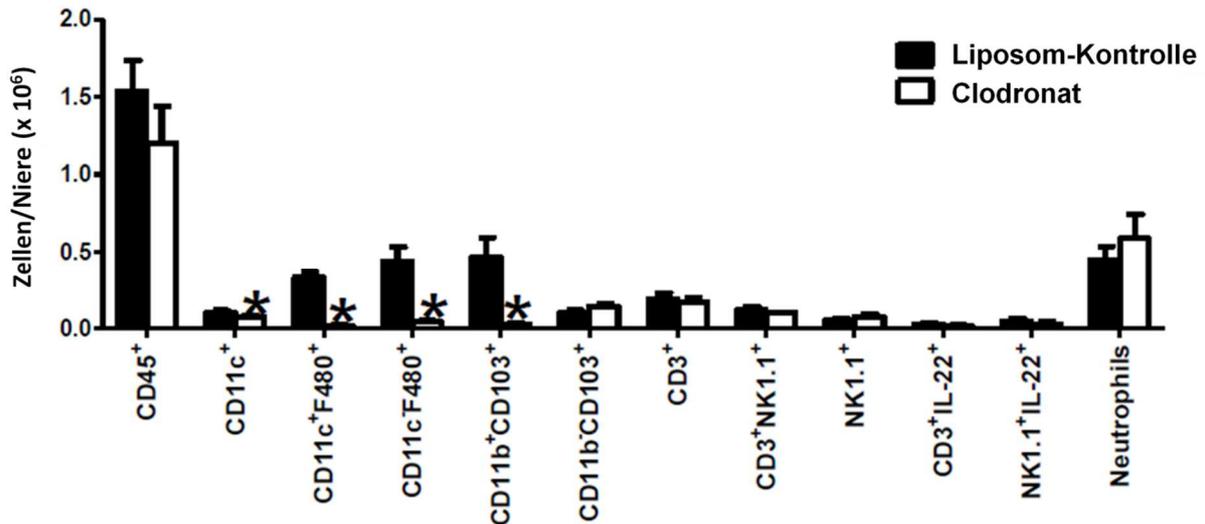


Abbildung 13: FACS-Analyse: Die Clodronat-Liposom-Behandlung bedingt eine spezifische und signifikante Depletion der mononukleären Phagozyten in der Niere, wodurch die spezifische Funktion der renalen Phagozyten durch Clodronat-induzierte Depletion in der postischämischen Niere untersucht werden konnte. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. *Liposomen*-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Tabelle 6: Clodronat-induzierte Depletion der IL-22-produzierenden Zellen in der post-ischämischen Niere.

Renale mononukleäre Phagozyten	Kontroll-Gruppe	Clodronat-Gruppe
CD11b ⁺ IL22 ⁺	0,13±0,06	0,03±0,01*
CD11b ⁺ CD103 ⁺ IL22 ⁺	0,08±0,04	0,02±0,01*
CD11b ⁻ CD103 ⁺ IL22 ⁺	0,03±0,02	0,01±0,004*
CD11c ⁺ IL22 ⁺	0,10±0,04	0,01±0,01*
CD11c ⁺ F4/80 ⁺ IL22 ⁺	0,03±0,01	0,03±0,01*
CD11c ⁺ F4/80 ⁺ IL22 ⁺	0,09±0,04	0,01±0,01*

Die Zahlen zeigen die Zellzahl/Niere ($\times 10^6$) an. Die Standardabweichung ist mit \pm SEM bei 5 Mäusen/Gruppe dargestellt. * $P < 0,05$ versus Kontroll-Gruppe. Modifiziert nach¹

Einen weiteren deutlichen Hinweis auf die Depletion der IL-22 produzierenden Zellen gibt eine Färbung auf IL-22, da im Interstitium der Niere bei der mit Clodronat-Liposomen behandelten Gruppe signifikant weniger IL-22 zu sehen ist (Abbildung 14)¹.

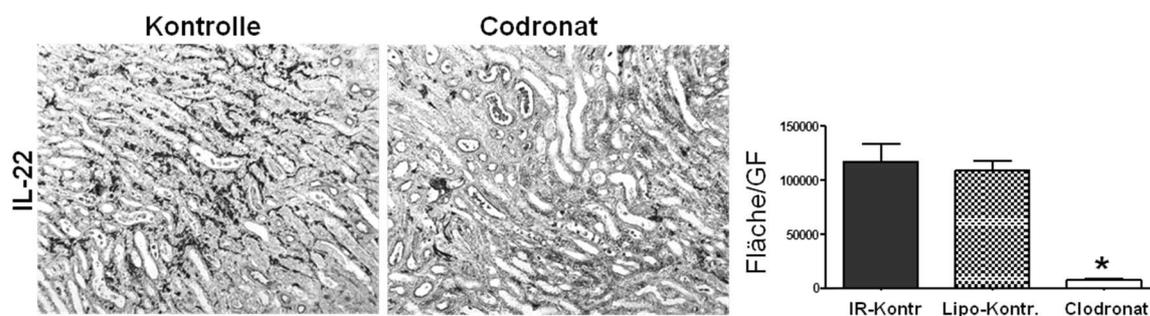


Abbildung 14: Immunhistochemische Färbungen auf IL-22 zeigten, dass die Depletion der Phagozyten durch Clodronat eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Reduktion von IL-22 bedingt. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen sowie die gefärbte Fläche aus 10 Gesichtsfeldern pro Organ je Gruppe und Färbung. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. *Liposomen*-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Anschließend wurden wie schon zuvor Färbungen auf Lectin⁺ proximale und THP⁺ distale Tubuli, sowie der Nekroseindex, auf den Unterschied des tubulären Schadens hin zwischen der Clodronat-Gruppe und der Kontrollgruppe ausgewertet. In allen Färbungen sieht man, dass in der Clodronat-Gruppe der tubuläre Schaden in allen Färbungen signifikant höher war. Eine PCNA THP-Doppelfärbung, welche im Fluoreszenzmikroskop untersucht wurde, wies zudem eine deutlich niedrigere Proliferationsrate in der Clodronat-Gruppe auf (Abbildung 15). Alle Färbungen wurden am 5. postoperativen Tag angefertigt. Hinsichtlich der renalen mRNA Expression wurde eine Untersuchung auf die tubulären Schadensmarker KIM-1, aGST, pGST sowie FABP durchgeführt. Auch hier waren alle vier Schadensmarker in der Clodronat-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht¹.

Zusammengefasst kann die größte Quelle von renalem IL-22 den mononukleären Phagozyten zugeschrieben werden. Eine Depletion dieser Zellen führt daher zu einer signifikant abgeschwächten Regeneration in der ischämischen Niere.

Es wurde analysiert, ob dieser beobachtete Effekt der Depletion von renalen mononukleären Phagozyten auf das nicht produzierte IL-22 zurückzuführen ist, oder ob die Beobachtungen durch das Fehlen der mononukleären Phagozyten selbst verursacht werden. Dies könnte nämlich zu einer groben Verzerrung der Ergebnisse führen. Um sich dieser Problematik zu nähern, wurden die mit Clodronat behandelten Mäusen vom 3. - 5. postoperativen Tag mit rekombinantem IL-22 i.p. substituiert. Das durch die Depletion der mononukleären Phagozyten fehlende IL-22 konnte somit ersetzt werden. Die Nieren wurden am 5. postoperativen Tag durch die schon zuvor beschriebenen immunhistochemischen Färbungen (PAS, THP, Lectin), sowie auch wieder durch mRNA-Quantifizierung der tubulären Schadensmarkern KIM-1, aGST, pGST sowie FABP untersucht. Am 5. postoperativen Tag zeigte sich, dass in der Clodronat-therapierten Gruppe der Tubulusschaden niedriger ausfällt. Dies ist an dem geringeren Nekroseindex sowie den verringerten THP-positiven Tubuli zu sehen. Die Lectin-positiven Tubuli blieben hingegen in dieser Gruppe unverändert. Eine IL-22-Substitution während der Clodronat-Therapie konnte diesen Effekt rückgängig machen. Die Regeneration der Zellen wurde durch die Clodronat-induzierte Depletion der renalen mononukleären Phagozyten verhindert, was an der geringeren Anzahl der PCNA-THP-doppelpositiven Tubuluszellen zu sehen ist. Auch hier konnte dieser Effekt durch Substitution von IL-22 rückgängig gemacht werden (Abbildung 15)¹.

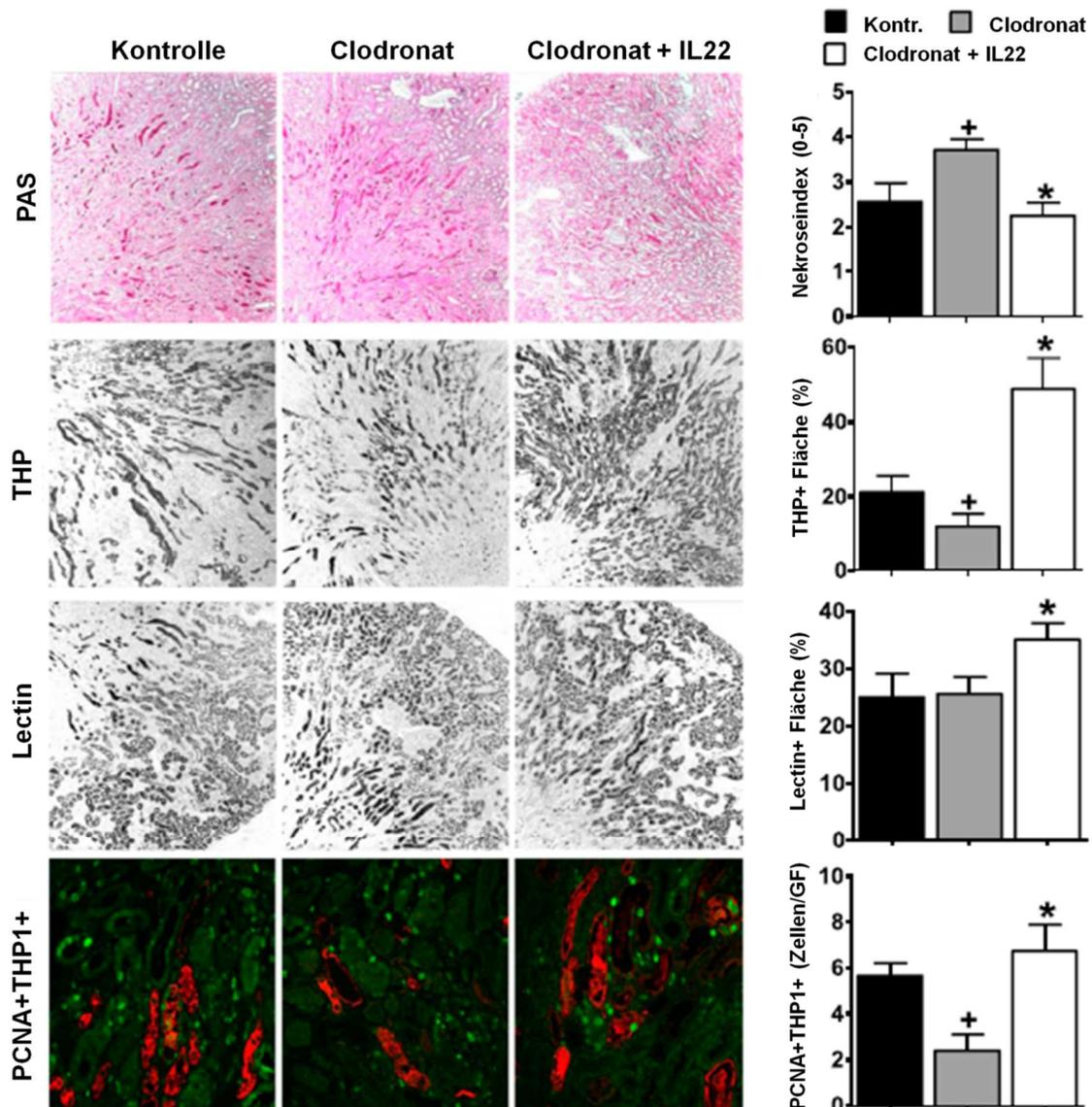


Abbildung 15: Die Depletion der IL-22-produzierenden Zellen inhibiert die Tubulusregeneration und aggraviert den Tubulusschaden nach einem Ischämie-Reperfusion-Schaden. Dies sieht man in den immunohistochemischen Färbungen auf THP, Lectin und PCNA, sowie an dem Nekrose-Index in der PAS-Färbung. Eine Depletion der renalen mononukleären Phagozyten durch Clodronat am Tag 5 nach einem Ischämie-Reperfusion-Schaden bedingt eine geringere Anzahl an THP-positiven proximalen Tubuli sowie einen erhöhten Nekroseindex. Ebenso zeigt sich eine verringerte Regeneration des Tubulusepithels, zu sehen an den verringerten PCNA-THP-doppeltpositiven Zellen. Eine Substitution von IL-22 macht diese Effekte trotz Depletion der mononukleären Phagozyten rückgängig, wodurch der Haupteffekt der verringerten Regeneration dem IL-22 angerechnet werden kann. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen sowie die gefärbte Fläche aus 10 Gesichtsfeldern pro Organ je Gruppe und Färbung. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. + = $p < 0,05$ Clodronat-behandelte Gruppe vs. *sham*-Gruppe, * = $p < 0,05$ mit Clodronat und darauf folgend mit IL-22 behandelte Gruppe vs. Clodronat-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Auch die RT-PCR-Expressionsdaten zeigten eine signifikante quantitative Minderung der mRNA der tubulären Schadensmarker α GST, π GST sowie FABP. Dieses Level ist annähernd mit dem der Ischämie-Reperfusion-Kontrollgruppe ohne Clodronatbehandlung zu vergleichen (Abbildung 16)¹.

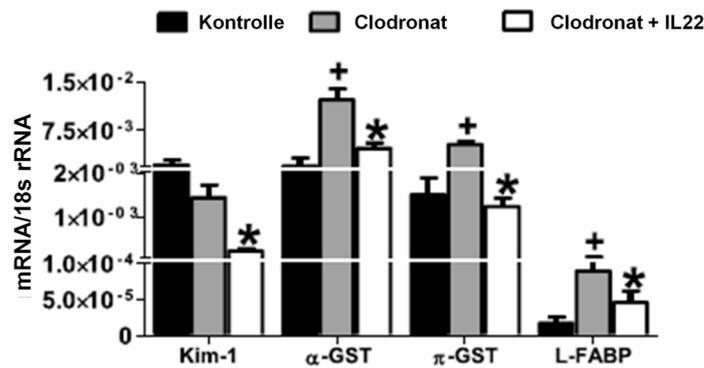


Abbildung 16: Die mRNA-Expression der Schadensmarker α GST, π GST sowie FABP war durch die Depletion der renalen mononukleären Phagozyten durch Clodronat signifikant erhöht. Wenn IL-22 nach Clodronat-induzierter Depletion substituiert wird, kommt es zu einer signifikanten Reduktion aller tubulärer Schadensmarker im Vergleich zur nur mit Clodronat behandelten Gruppe. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. + = $p < 0,05$ Clodronat-behandelte Gruppe vs. *sham*-Gruppe, * = $p < 0,05$ mit Clodronat und darauf folgend mit IL-22 behandelte Gruppe vs. Clodronat-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Die Nierenfunktion nach bilateralem renalen Ischämie-Reperfusion-Schaden wurde mittels der Plasma-Harnstoffkonzentration gemessen. Hierbei zeigte sich, dass nach einem initialen Anstieg der Harnstoffkonzentration es in der Kontrollgruppe sowie der Gruppe, in welcher neben einer Clodronat-Behandlung auch eine IL-22-Substitution erfolgte, zu einer signifikant stärkeren Normalisierung der Harnstoffkonzentration als in der Clodronat-Gruppe (Abbildung 17)¹.

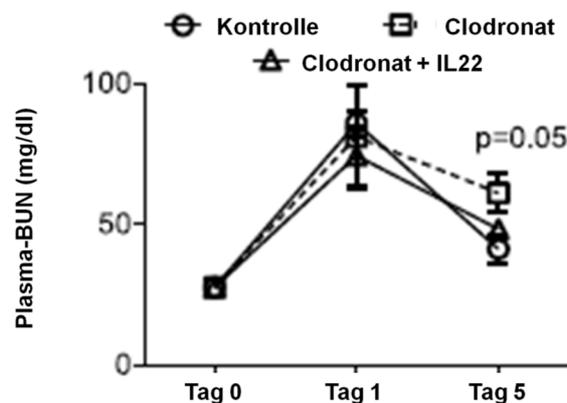


Abbildung 17: Die Nierenfunktion - gemessen an der quantitativen Harnstoffkonzentration im Plasma - wurde am Tag 1 und Tag 5 nach bilateraler Ischämie gemessen. Am Tag 5 zeigte sich während der Regenerationsphase in der Gruppe, welche neben Behandlung mit Clodronat-Liposomen auch eine IL-22-Substitution erhielt eine signifikant geringere Harnstoffkonzentration im Plasma als in der Clodronat-Gruppe. Die Harnstoffkonzentration war zudem annähernd zu den Werten der Kontrollgruppe. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. Modifiziert nach¹

Die Beobachtungen weisen darauf hin, dass der reno-protective, pro-regenerative Effekt der mononukleären Phagozyten wesentlich auf Basis der renalen IL-22-Produktion beruht.

Die bisher dargestellten Daten zeigen, dass renale mononukleäre Phagozyten per IL-22 Produktion an der Nierenregeneration nach einem ischämischen Schaden wesentlich mitwirken. Wie schon in der Einleitung beschrieben, beinhaltet ein akuter Nierenschaden eine tubuläre Nekrose, welche PRR auf Immunzellen aktivieren, indem sie endogene Gefahrensignalstoffe freigeben, welche DAMPs genannt werden. Um spezifischen Rezeptoren, welche für die IL-22 Produktion in mononukleären

Phagozyten auslösend sind, auffindig zu machen, wurden aus dem murinen Knochenmark isolierte dendritische Zellen mit nekrotischem Überstand von TECs stimuliert. Zusätzlich zu der Stimulation mit dem nekrotischen Überstand wurden die dendritischen Zellen mit den bekannten IL-22-Induktoren Aryl Hydrocarbon Rezeptor Agonist 6-Formylindolo[3,2- β]carbazol (FICZ) und Hydroxylperoxid stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurde die IL-22 Konzentration mittels ELISA gemessen. Hierbei zeigte die mit dem nekrotischen Überstand stimulierte Gruppe eine signifikant höhere Menge an IL-22 im Vergleich zu der Kontrolle (Abbildung 18)¹.

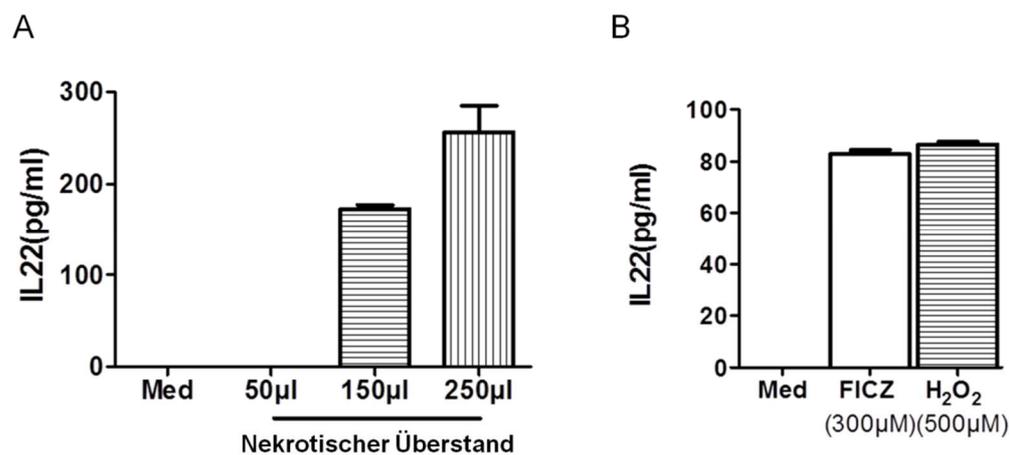


Abbildung 18: BMDCs schütten auf (B) AhR-Liganden, H₂O₂ und (A) nekrotischem Überstand *in vitro* IL-22 aus. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus Quadruplikaten je Gruppe. Modifiziert nach¹

3.3 Nekrotische Tubuluszellen bedingen eine Ausschüttung von IL-22 durch Freisetzung von TLR4-Liganden

Da TLRs eine wesentliche Rolle bezüglich der DAMPs assoziierten Immunzellstimulierung zukommt, wurden die BMDCs mit den gängigen synthetischen TLR-Liganden Pam3Cys (TLR2), LPS (TLR4), poly-IC RNA (TLR3), Imiquimod (TLR7) und CpG-DNA (TLR9) stimuliert. All diese Liganden führten zu einer signifikant vermehrten Ausschüttung von IL-6 im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise konnte jedoch ausschließlich durch Stimulation von dem TLR4 durch LPS eine Produktion von IL-22 festgestellt werden, während die Stimulation anderer TLRs nicht zu einer signifikanten IL-22-Ausschüttung führten (Abbildung 19)¹.

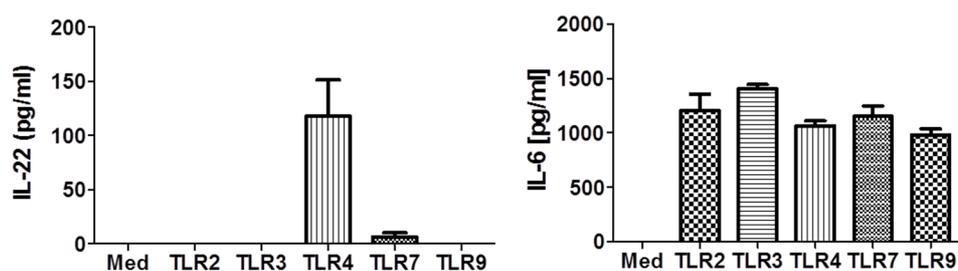


Abbildung 19: BMDCs schütten *in vitro* IL-22 auf Stimulation des TLR4 durch LPS aus, während die Stimulation anderer TLRs wohl die Ausschüttung von IL-6, jedoch nicht von IL-22 bedingen. Der Stimulus zur IL-22-Ausschüttung scheint somit

spezifisch mit dem TLR4 zusammenzuhängen. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus Quadruplikaten je Gruppe. Modifiziert nach¹

Um die Rolle von TLR4 hinsichtlich der IL-22 Produktion durch dendritische Zellen *in vitro* weiter zu bestimmen, wurde der TLR4 der dendritischen Zellen per Zugabe eines neutralisierenden TLR4-Antikörpers blockiert. Daraufhin wurden die Zellen mit nekrotischen Überstand, welcher, wie schon zuvor beschrieben, verschiedene DAMPs enthält, welche auch bei einem akuten Nierenschaden *in vivo* freigesetzt werden, stimuliert. In der Abbildung 20 ist zu erkennen, dass die IL-22 Produktion durch Stimulation von BMDCs mit nekrotischem Überstand in einer dosisabhängigen Weise mittels des TLR4-Antikörpers reduziert und ab einer Konzentration von 1 ng/ml sogar ganz unterbunden wurde (Abbildung 20)¹.

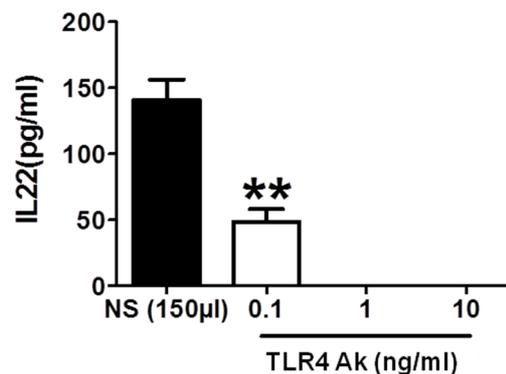


Abbildung 20: Die IL-22-Ausschüttung durch Stimulation von BMDCs *in vitro* durch nekrotischen Überstand (NS) kann dosisabhängig durch einen TLR4-Antikörper vollständig unterdrückt werden. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus Quadruplikaten je Gruppe. ** = $p < 0,01$ vs. Kontroll-Gruppe. Modifiziert nach¹

mRNA-Analysen zeigten zudem, dass durch Stimulation mit nekrotischem Überstand neben IL-22 auch IL-6, CCL2, IL-10 und IL-12a in im Vergleich zur Kontrollgruppe in signifikanter Weise vermehrt exprimiert werden (Abbildung 21)¹.

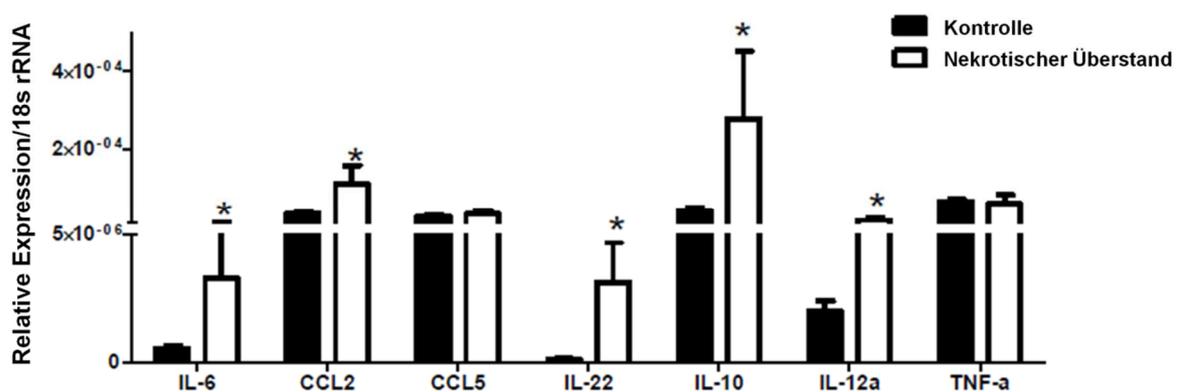


Abbildung 21: Die Ausschüttung unterschiedlicher Zytokine von BMDCs *in vitro* durch Stimulation mit nekrotischem Überstand. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel +/- SEM aus Quadruplikaten je Gruppe. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus Quadruplikaten je Gruppe. ** = $p < 0,01$ vs. Kontroll-Gruppe. Modifiziert nach¹

3.4 Durch TLR4-Aktivierung ausgeschüttetes IL-22 fördert die Tubulusregeneration nach einem postischämischen akuten Nierenschaden

In der Literatur kommt dem TLR4 eine wesentliche Rolle hinsichtlich der Aktivierung der angeborenen Immunität, sowie auch der Immunpathologie und somit beim entzündlichen Tubulusschaden während der frühen Phase eines akuten Nierenschadens zu (siehe Einleitung). Um eine maßgebliche Beteiligung von TLR4 an der Regeneration nach einem akuten Nierenschaden *in vivo* zu untersuchen, wurde eine Antikörper-vermittelte Ausschaltung des TLR4 genutzt. Dieser wurde 48h nach dem durch Nierenhilusabklemmung verursachten ischämischen Nierenschaden injiziert. Hierdurch blieb die entzündliche Phase hinsichtlich der TLR4-Aktivierung unbeeinflusst und den TLR4 wurde erst in der regenerativen Phase gehemmt, sodass die TLR4-vermittelte IL-22 Produktion unterbunden wurde. Die Experimente wurden wie auch schon zuvor am 5. postischämischen Tag durchgeführt.

Die TLR4 Blockade unterbrach partiell die Ausschüttung von IL-22 in Niereninterstitium, was durch eine Färbung auf IL-22 in signifikanter Weise gezeigt werden konnte. Der Nekroseindex war ebenfalls signifikant erhöht, einhergehend mit einer signifikant geringeren Menge an distalen THP⁺, sowie proximalen Lectin⁺ Tubuli (Abbildung 22)¹.

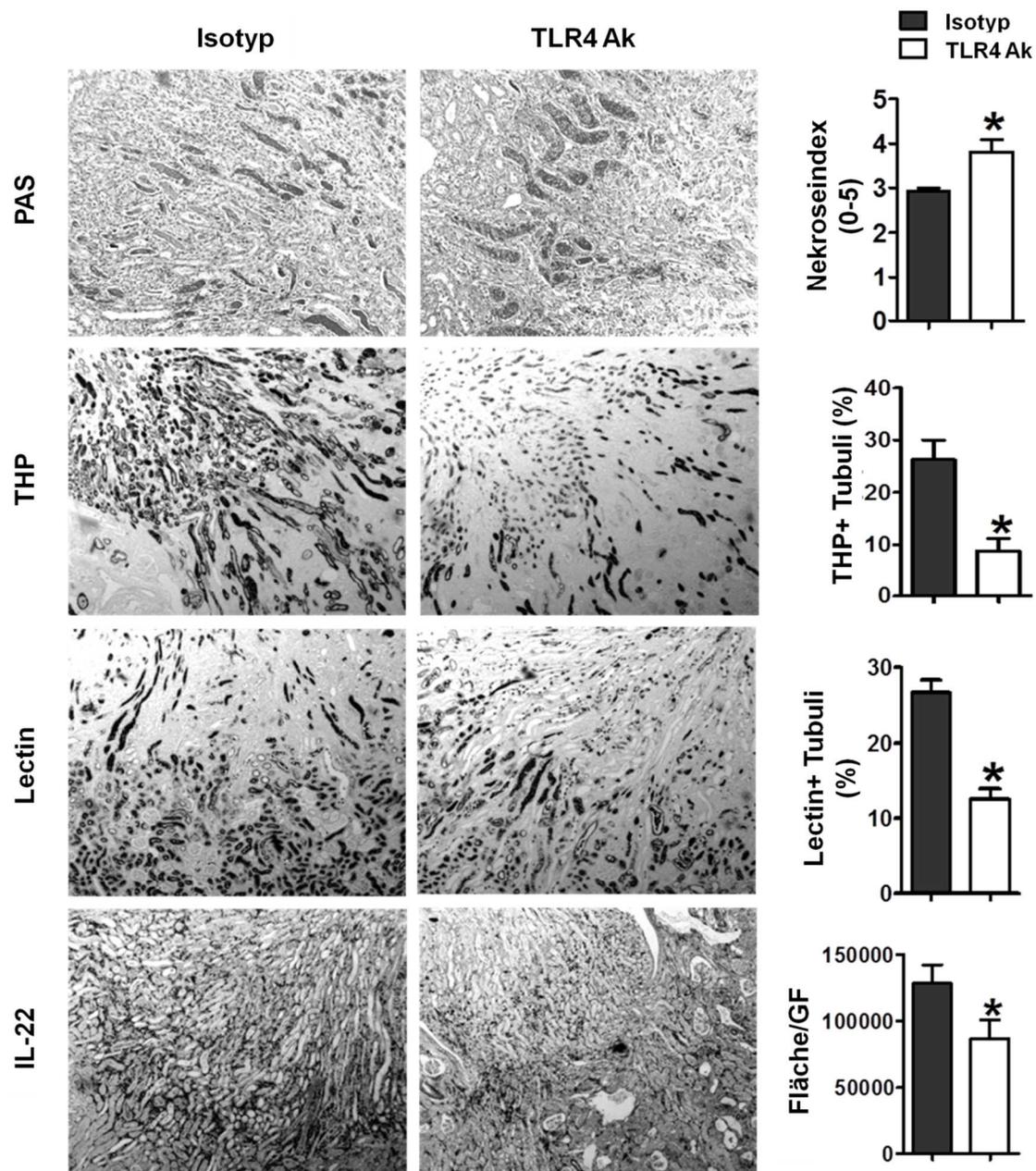


Abbildung 22: Die TLR4-bedingte IL-22-Ausschüttung fördert die Tubulusregeneration. Ein TLR4 antagonistischer Antikörper wurde an den Tagen 2, 3, und 4 nach dem renalen Ischämie-Reperfusion-Schaden in die Versuchstiere injiziert. Am Tag 5 erfolgte die immunohistochemische Färbung der Nieren. In der PAS-Färbung zeigte sich durch TLR4-Antagonisierung ein höherer Nekroseindex, während ebenfalls die THP-positiven proximalen und Lectin-positiven distalen Tubuli verringert waren. Zudem zeigte eine immunohistochemische Färbung auf IL-22 eine signifikante Reduktion des im Niereninterstitium gebildeten IL-22 in der mit TLR-4-Antikörper behandelten Gruppe im Vergleich zu der mit Isotyp-Antikörper behandelten Gruppe. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen sowie die gefärbte Fläche aus 10 Gesichtsfeldern pro Organ je Gruppe und Färbung. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. *Isotyp-AK*-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Anschließend wurde eine Untersuchung der mRNA-Quantität der zuvor schon beschriebenen tubulären Schadensmarkern KIM1, aGTP, pGTP und FABP per RT-PCR durchgeführt. Dies zeigte eine signifikante Erhöhung der beiden Schadensmarkern KIM1 und pGTP, sowie eine Tendenz zu höheren Werten von aGTP und FABP, wenn auch nicht mit ausreichender Signifikanz (Abbildung 23)¹.

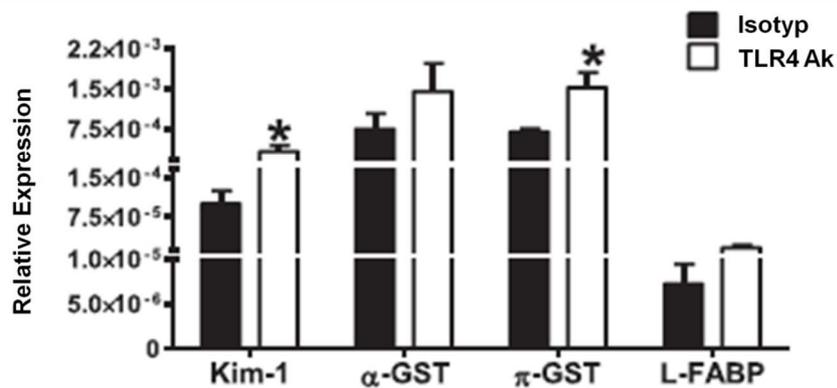


Abbildung 23: Die mRNA der tubulären Schadensmarker π GST und Kim-1 waren durch die Behandlung mit einem TLR4-Antikörper in der postischämischen Niere signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die Level von α GST und FABP waren wohl erhöht, jedoch in nicht signifikanter Weise. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel + SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. *Isotyp*-AK-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Die TLR4-Blockade durch Injektion des Antikörpers CLI-095 von Beginn der Regenerationsphase, also vom 2. bis zum 5. postoperativen Tag, führte bei einem bilateralen ischämischen Nierenschaden zu höheren Plasma-Harnstoff-Konzentrationen am Tag 5 (Abbildung 24). Dies gibt einen Hinweis auf eine Behinderung der Nierenregeneration durch die Blockade von TLR4. Im Gegensatz hierzu verhindert die TLR4-Blockade durch den Antikörper von Beginn der Ischämie an einen Nierenschaden in signifikanter Weise, zu sehen an der signifikant niedrigeren Plasma-Harnstoff-Konzentration am Tag 1 im Vergleich zur Kontrolle¹.

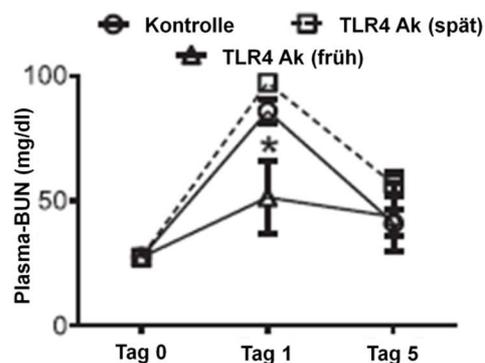


Abbildung 24: Eine späte Blockade des TLR4 vom Tag 2-5 nach dem bilateralen renalen Ischämie-Reperfusionsschaden ergibt eine schlechtere Regeneration der Nierenfunktion am Endpunkt, gemessen an der Plasma-Harnstoff-Konzentration. Eine frühe Blockade des TLR4 hingegen schützt die Niere vor einem Tubulusschaden direkt nach der Ischämie bzw. in der frühen Phase der Inflammation. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel \pm SEM aus 6 Mäusen je Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. *Isotyp*-AK-behandelte Gruppe. Modifiziert nach¹

Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass TLR4 im Anfangsstadium des akuten Nierenschadens maßgeblich an der Entzündung und somit in einem gewissen Ausmaß auch an dem Schaden selbst beteiligt ist, aber zugleich während der Regenerationsphase eine wichtige Rolle hinsichtlich der IL-22-vermittelten Regeneration spielt¹.

Um einen direkten Effekt von TLR4 bzw. anderer TLR auf die TEC-Regeneration auszuschließen bzw. zu testen, erfolgte eine in-vitro Stimulation von primären murinen Tubulusepithelzellen. Zunächst wurden TECs aus Nieren von C5/BL6-WT-Mäusen isoliert und mittels Fluoreszenzmikroskopie auf deren Reinheit untersucht. Hierzu wurden die Zellen nach der Isolation auf die für TECs spezifischen Oberflächenmarkern E-Cadherin und Zytokeratin 7 immunhistologisch untersucht. Des Weiteren wurden die Zellen auch auf Vimentin immunhistologisch im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dieser Oberflächenmarker wird lediglich auf Fibroblasten, nicht jedoch auf TECs exprimiert. In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass die Kontamination von Fibroblasten minimal ist und dass die isolierten Zellen auch TECs sind.

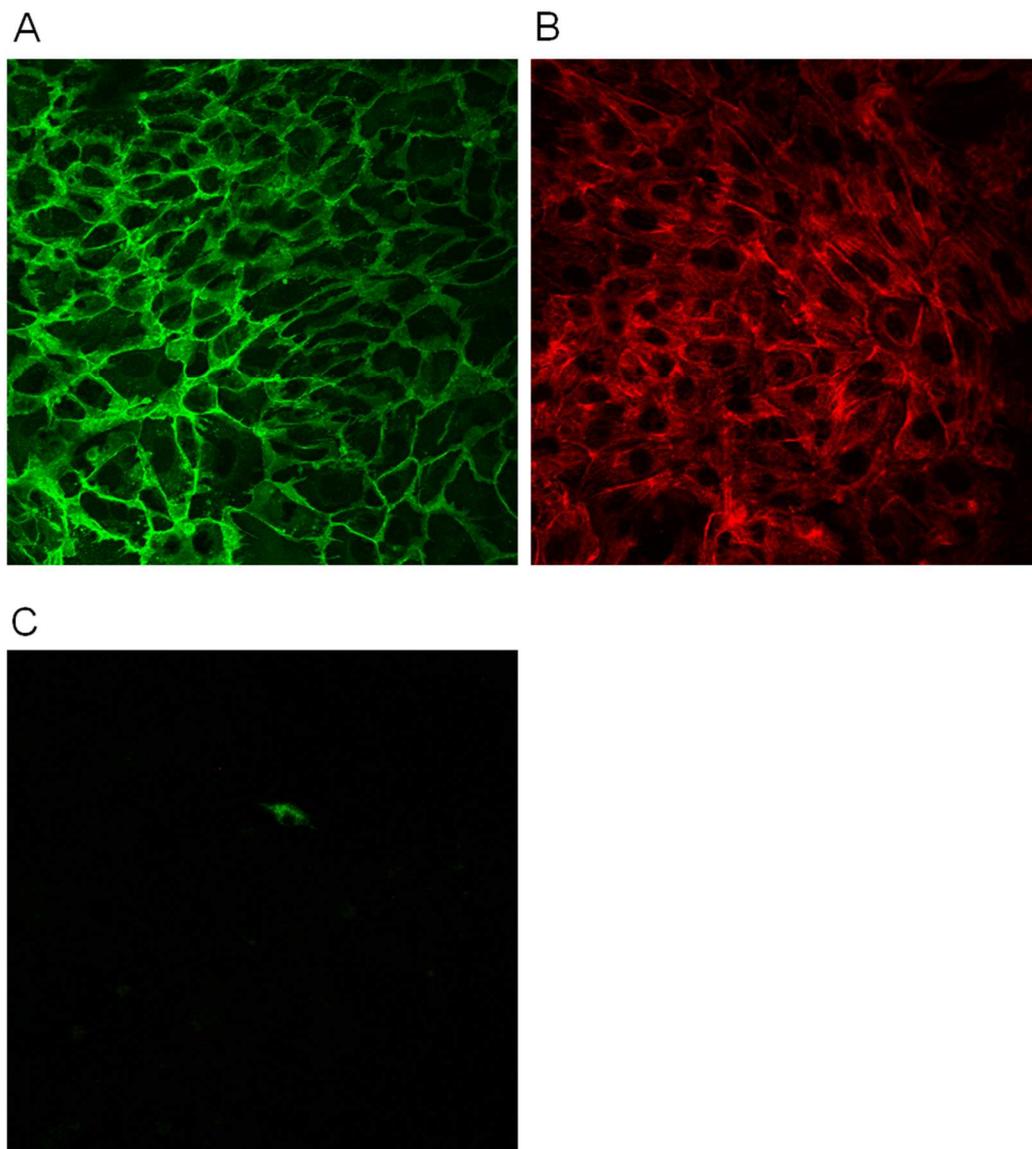


Abbildung 25: Immunologische Testung der Reinheit isolierter primärer Tubulusepithelzellen. (A) Immunhistochemische Färbung auf E-Cadherin. (B) Immunhistochemische Färbung auf Zytokeratin 7. (C) Immunhistochemische Färbung auf Vimentin. Während die Oberflächenproteine E-Cadherin und Zytokeratin 7 - spezifisch für Tubulusepithelzellen - stark und ubiquitär angefärbt sind, ist Vimentin (Fibroblasten) nur sehr vereinzelt gefärbt.

Im Anschluss wurden die TECs mit den Liganden der auf TECs exprimierten TLRs stimuliert (Pam3Cys (TLR2), LPS (TLR4), Flagellin (TLR5), Imiquimod (TLR7) und CpG-DNA (TLR9)). Als Positivkontrolle diente ein Medium mit 10% FCS, was nachweislich das Zellwachstum anregt. In Abbildung 26 ist zu sehen, dass weder im Proliferationsessay, noch im *in-vitro* Wundheilungsmodell (Scratch-Essay) eine signifikant erhöhte Regeneration bzw. Proliferation durch die Stimulation der verschiedenen TLRs bedingt wird¹.

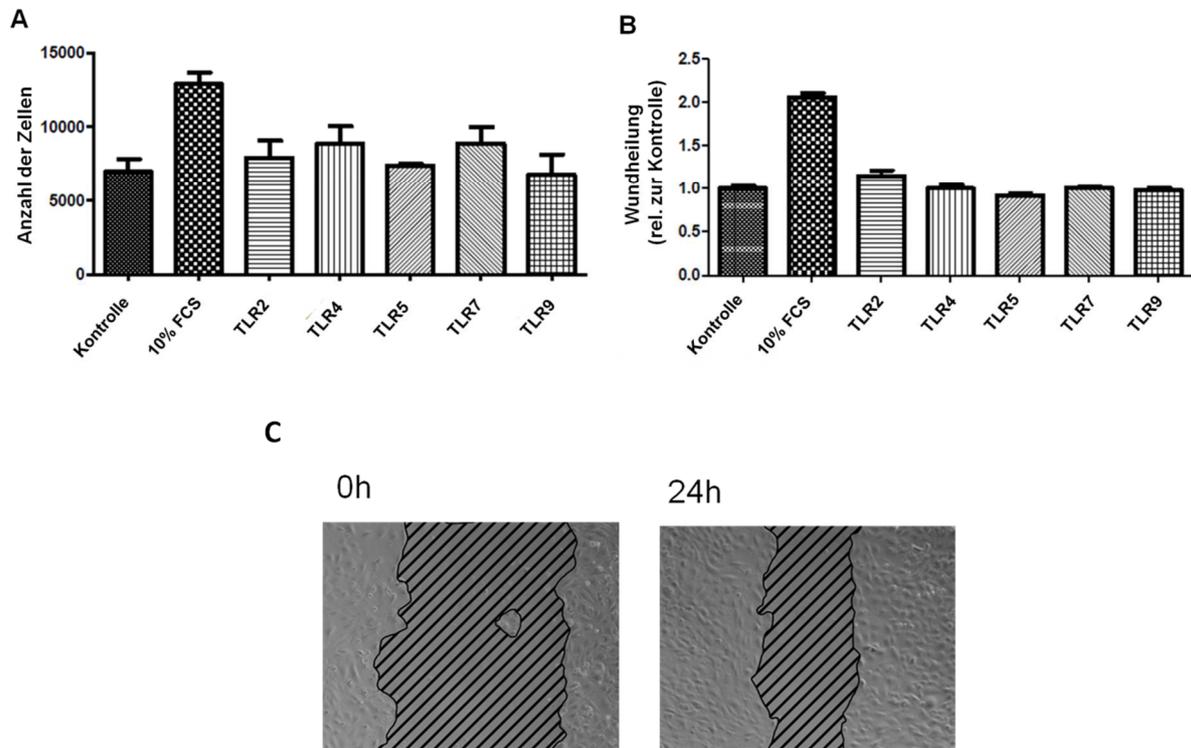


Abbildung 26: Die direkte Stimulation von TECs mit TLR-Liganden bedingen *in vitro* keine signifikanten Proliferationsunterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe. (A) Proliferationsessay. (B) Scratch-Essay. Dargestellt sind repräsentative Abbildungen des Scratch-Essay Wundfläche aus 4 Gesichtsfeldern bei n = 4 je Gruppe. Die Daten repräsentieren das arithmetische Mittel \pm SEM. (C) Beispiel eines Scratch-Essays. Man vergleicht die Wundfläche nach Schadenssetzung und nach einem bestimmten Zeitpunkt (in dem Fall nach 24 Stunden). Modifiziert nach¹

4 Diskussion

4.1 IL-22 als Regulator und pro-regeneratorischer Faktor während des akuten Nierenschadens

Die Hypothese dieser Arbeit war, dass manche Interleukine eine aktive Rolle bei der tubulären Regeneration während der Erholungsphase nach einem akuten Nierenschaden spielen könnten. Die In-vitro-Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass IL-22 die Regeneration der TECs stimuliert. Dieser Mechanismus wird über die Aktivierung und Phosphorylierung des STAT3-Signaltransduktionsweges induziert¹. Erstmals wurde zudem der positive Einfluss von IL-22 auf die Tubulusregeneration nach einem akuten ischämischen Nierenschaden beschrieben. 24 Stunden nach einem ischämischen Schaden konnte eine Hochregulation der IL-22-mRNA gemessen werden. Zu einer Sezernierung und somit zur Aktivierung der IL-22 vermittelten Wirkungen kommt es erst mit einer Latenz von 5 Tagen nach dem ischämischen Nierenschaden. Dies spiegelt das Gleichgewicht zwischen der frühen und späten Phase der Inflammation wider. Während die frühe Phase durch die Dominanz der pro-entzündlichen Zytokine und Phagozytose der nekrotischen Zellen charakterisiert wird, wird die späte Phase durch die Resolution und Hemmung der Immunantwort, sowie die Regeneration nach einem akuten Gewebeschaden dominiert¹²³. IL-22 scheint insbesondere in der letzten Phase der Immunantwort eine wesentliche Rolle zu spielen, weshalb es auch in den Versuchen als Vertreter der anti-entzündlichen Interleukine erst mit einer gewissen Latenz während des akuten Nierenschadens sezerniert wird. Eine frühe Blockade des IL-22 bedingt deshalb auch eine überschießende Immunantwort und in Folge eine verminderte Epithelregeneration, wie die Blockade des IL-22 in dieser Arbeit eindrücklich zeigt. Die Histologie legt nahe, dass die Tubuli der postischämischen Niere bei IL-22-Blockade sowohl mehr Schaden, als auch eine verminderte Regenerationsrate mit weniger proliferierenden Tubulusepithelzellen aufweisen. Auch die Erholung der Nierenfunktion insgesamt - wie an den Plasma-Harnstoffkonzentrationen veranschaulicht - geschieht ohne die IL-22-Kaskade in signifikant geringerem Maße in IL-22 -/- Mäusen als mit IL-22 als pro-regeneratorischen Mediator. Die Reversibilität der negativen Effekte einer IL-22 Blockade durch Substitution von IL-22 in den späten Phasen des akuten ischämischen Nierenschadens weist zudem auf die pro-regenerativen Eigenschaften des Interleukins auch nach stattgehabtem Zelltod hin. Insofern kann vermutet werden, dass IL-22 direkt Progenitorzellen in dem Tubulussystem stimulieren, wobei in dem Zusammenhang weitere Forschungsarbeiten angestrebt werden müssen. Die hier gezeigten Daten werden insbesondere durch eine weitere Publikation bestätigt. Die Arbeit konzentrierte sich neben der pro-regeneratorischen Eigenschaften von IL-22 nach einem Nierenschaden auch auf die Signaltransduktionskaskaden, auf welcher dessen pro-regeneratorischen Wirkungen basieren. Insbesondere STAT3, wie schon zuvor besprochen, als auch die Aktivierung von AKT bedingen eine vermehrte Aktivierung von anti-apoptischen Genen wie Bcl-2 sowie eine Hemmung pro-apoptischer

Gene wie Bad¹⁵⁹. Es konnte somit die pro-regeneratorische Rolle von IL-22 in der Niere nach einem akuten ischämischen Nierenschaden gezeigt werden und reiht sich in die Beobachtungen bereits zuvor entdeckter anti-entzündlicher und pro-regenerativer Wirkungen dieses Interleukins in anderen Organen ein¹²⁵. Im Gastrointestinaltrakt konnte z.B. eindrücklich gezeigt werden, dass IL-22 nicht nur anti-entzündliche, sondern auch pro-regeneratorische Eigenschaften hat. Hierbei wurde festgestellt, dass IL-22 und der STAT3-Signaltransduktionsweg in den intestinalen Epithelzellen des Dickdarms während eines Zellschadens die Apoptose, sowie die Signaltransduktionswege, welche essentiell für Wundheilung sind, ausschlaggebend sind, sodass es zu einer gesteigerten Regeneration und Wiederherstellung der Integrität des Gewebes kommt. CD11c⁺ dendritische Zellen spielen hierbei in der Darmmukosa als Produzenten des IL-22 eine wesentliche Rolle¹⁶⁰. Es kann also eine duale Rolle von IL-22 hinsichtlich der Verhinderung einer chronischen Nierenschädigung auf dem Boden einer akuten Nierenschädigung ausgemacht werden - die Verhinderung von Zelltod sowie die Unterstützung der Regeneration.

Die meisten Interleukine haben pro-entzündliche Eigenschaften. Deshalb werden in der Medizin Interleukin-Blokaden eingesetzt. Die immunsuppressive Wirkung bewirkt bei Autoimmunerkrankungen eine Milderung des Krankheitsbildes (z.B. Tocilizumab als IL-6-Antikörper zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis)¹⁶¹. Interleukin 22 sticht hierbei als konträres Interleukin der Immunmodulation heraus. Das Interleukin aus der IL-10-Familie hat insbesondere im Zusammenspiel mit dem Immunsystem und den Epithelzellen. Insbesondere die pro-regeneratorischen und protektiven Eigenschaften auf Epithelzellen und Mukosa bei einer akuten Immunantwort sind bekannt^{125,162}.

In Hinblick auf Nierenerkrankungen scheint IL-22 nicht nur auf das Tubulussystem einen positiven Einfluss zu haben. Es konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expression des IL-22-Rezeptors die Ausprägung einer IgA-Nephropathie, einer Erkrankung, welche hauptsächlich glomeruläre Mesangialzellen betrifft, hemmt¹⁶³, auch wenn bisher keine Expression des IL-22-Rezeptors auf den Zelltypen der Glomeruli gefunden wurde. Mutmaßlich könnten daher indirekte Faktoren den Einfluss von IL-22 auf die Ausprägung glomerulärer Erkrankungen erklären, was jedoch genauer erforscht werden muss. Zudem muss geklärt werden, inwiefern renale Progenitorzellen IL-22-Rezeptoren exprimieren und durch welche Mechanismen sie ggf. stimuliert werden. Da ebenfalls gezeigt werden konnte, dass das Komplementsystem durch IL-22 reguliert wird¹⁶³, könnte es ebenfalls Komplement-assoziierte Nierenerkrankungen und Glomerulonephritiden (z.B. Hepatitis-C-Virus assoziierte kryoglobulinämische Glomerulonephritis) beeinflussen. Dies wäre ebenfalls ein interessanter Gegenstand zukünftiger Forschungsarbeiten.

Insgesamt betrachtet käme IL-22 mit der Eigenschaft, die Regeneration von Epithelzellen zu fördern und die Integrität der Epithelien während eines Schadensprozesses zu erhalten als Mittel zur Therapie der akuten Nierenschädigung in Frage. Insbesondere bei der akuten Nierenschädigung führt die fehlende Wiederherstellung der Tubuli zu einer progredienten Fibrose des Organs und konsequenterweise zu einer chronischen Nierenschädigung. Die gesteigerte Regeneration der Tubulusepithelzellen durch artifizielle Stimulation mit IL-22 stellt somit eine vielversprechende kausale Therapie der akuten Nierenschädigung dar. Diese Vermutung wird durch mehrere wissenschaftliche Arbeiten und Anwendungen rund um IL-22 gestützt. Im Mausmodell konnte z.B. gezeigt werden, dass IL-22 bei einem metabolischen Syndrom die β -Zellen des Pankreas vor oxidativem Stress schützt.

Zudem führt IL-22 zu einer höheren Insulin-Ausschüttung und unterstützt die Insulin-Sensitivität in der Peripherie^{164,165}. Auch bei der akuten Pankreatitis erscheint eine Therapie mit IL-22 sinnvoll und wird derzeit in klinischen Studien evaluiert. Jedoch sollten die anderen Effekte und Nebenwirkungen von IL-22 nicht außer Acht gelassen werden. Eine chronische Substitution von IL-22 könnte ein Tumorrisiko in verschiedenen Organen mit sich ziehen^{166,167}. Wie auch schon in der Einleitung beschrieben, bedingt der pro-proliferative Effekt von IL-22 eine Aggravation verschiedener Autoimmunerkrankungen¹⁶⁸. Bei Psoriasis und atopischer Dermatitis werden deshalb auch IL-22-Antikörper in klinischen Studien evaluiert¹²⁵. Die Eigenschaften von IL-22 müssen daher noch weiter erforscht und die vielversprechenden pro-regeneratorischen Eigenschaften mit den mutagenen und pro-entzündlichen hinsichtlich der therapeutischen Zwecke abgewogen werden.

Es konnte IL-22 ein wachstumshemmender Effekt bei renalen Zellkarzinom-Zellen nachgewiesen werden¹⁶⁹, jedoch steht es gleichzeitig im Verdacht, dass es die Tumorgenese fördern könnte (s.o.). Es ist daher noch weitere Forschung vonnöten, um ein Risikoprofil von IL-22 als therapeutisches Interleukin zu erstellen und dessen Risiko-Nutzen-Abwägung genauer einschätzen zu können.

Die Arbeit zeigt eindrücklich das Zusammenspiel zwischen Gewebeschaden, Immunantwort und Gewebsregeneration. Insbesondere die Rolle von IL-22 als proregenerativer Faktor in der Niere konnte hier erstmals identifiziert werden.

4.2 Renale mononukleäre Phagozyten produzieren IL-22 während des akuten Nierenschadens

Die immunhistologischen Färbungen von IL-22 und des Rezeptors in der postischämischen Niere zeigt die Sekretion des Interleukins ausschließlich im Interstitium des Nierengewebes, während der IL-22-Rezeptorkomplex ausschließlich auf den Tubulusepithelzellen exprimiert wurde. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Tubulusepithelzellen Zielzellen von IL-22 sind und bis dahin nicht genauer identifizierte Immunzellen die Effektorzellen der Regeneration. Interessanterweise zeigte sich in durchflusszytometrischen Analysen, dass renale mononukleäre Phagozyten einen Großteil des renalen IL-22 produzieren. Lange Zeit galten insbesondere innate like lymphocytes¹²⁸, Th17- und Th22-Helferzellen, welche insbesondere in Immunorganen wie der Milz ansässig sind, als Hauptproduzenten von IL-22. Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen wurde bei der Produktion und Sezernierung eine eher untergeordnete Rolle beigemessen und wurden eher in Zusammenhang mit IL-22 insbesondere in der mukosalen Immunabwehr und Re-Epithelialisierung gesehen¹⁶⁰. In Immunzellen der Niere jedoch wurde zuvor noch keine Ausschüttung von IL-22 beschrieben. Umso erstaunlicher war das Ergebnis der durchflusszytometrischen Analysen dieser Arbeit, welche die renalen mononukleären Phagozyten als die Hauptproduzenten des IL-22 nach einem akuten ischämischen Nierenschaden identifizierte. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Depletion dieser Zellen in der späten Phase der Immunantwort mit einer verminderten IL-22-Produktion und verminderter Tubulusregeneration einhergeht. Der spezifische, depletorische Effekt von Clodronat auf die mononukleäre Phagozyten konnte durch weitere durchflusszytometrische Analysen bestätigt werden, da andere Zelllinien des

Immunsystems - im Gegensatz zu den renalen mononukleären Phagozyten - von der Clodronatapplikation unbeeinflusst blieben. Die Rolle der renalen mononukleären Phagozyten als "immunologische Wächter und Regulierer" der Niere bei einem akuten Nierenschaden wird in dieser Arbeit mithilfe des Mediators IL-22 um einen neu beobachteten Mechanismus erweitert. Wie in der Literatur mehrfach beschrieben, sind mononukleäre Phagozyten die Hauptregulatoren der verschiedenen Stadien des akuten Nierenschadens. DAMPs, wie z.B. Histone oder HMGB1, welche bei einem akuten ischämischen Nierenschaden von nekrotischen Tubulusepithelzellen freigesetzt werden, aktivieren "ruhende" M0 Makrophagen und dendritische Zellen über die Aktivierung der PRR. Hierdurch werden pro-entzündliche Zytokine ausgeschüttet, welche eine akute Immunantwort verursachen und zu einer weiteren Schädigung des bereits nekrotischen Gewebes führt¹¹³. In der Niere konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung dieser initialen, pro-entzündlichen Immunantwort der renalen mononukleären Phagozyten Schaden verhindern kann^{114,116}. Viel wichtiger in Zusammenhang mit dieser Arbeit jedoch ist die Erforschung der späten Phase der Immunantwort, in der die Dominanz der M2-Makrophagen die anti-entzündliche und pro-regeneratorische Komponente und Phase der akuten Gewebeschädigung überwiegt¹¹⁷. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Depletion der renalen mononukleären Phagozyten in dieser Phase eine abgeschwächte Regeneration nach einem akuten ischämischen Nierenschaden zur Folge hat¹¹⁹. Diese Arbeit scheint einen wichtigen pro-regeneratorischen Mechanismus dieser Phase aufzuzeigen. Über die späte Phase der Immunantwort kommt es zur Sezernierung von IL-22 durch die renalen mononukleären Phagozyten. Dies wiederum bewirkt eine Aktivierung/Phosphorylierung des STAT3- und AKT-Signaltransduktionsweges mit einhergehender verstärkter Aktivierung antiapoptotischer Gene wie Bcl-2 und Hemmung proapoptotischer Gene wie Bad^{1,159}. Die renalen mononukleären Phagozyten könnten somit über IL-22 Voraussetzungen für einen geminderten entzündlichen Schaden und gesteigerte Regenerationsfähigkeit des tubulären Systems nach einem akuten Nierenschaden kreieren.

Auch wenn in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die Effekte von IL-22 zum größten Teil auf den renalen mononukleären Phagozyten beruhen, stellt sich die Frage nach dem wohl vermutlich geringeren Effekt der ebenfalls IL-22 produzierenden Th17- und Th22-Helferzellen während des akuten Nierenschadens.

4.3 Die Rolle von TLR 4 bei der Regeneration nach einem akuten Nierenschaden

TLR sind im Zusammenhang mit einem akuten Nierenschaden eher für ihr pro-entzündliche, schädigende Wirkung bekannt. Ihre Aktivierung auf Immunzellen und insbesondere antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen durch von nekrotischen Zellen ausgeschütteten DAMPs bewirkt über den MyD88-abhängigen und -unabhängigen Signaltransduktionsweg eine Sezernierung von pro-entzündlichen Zytokinen¹⁷⁰. Es gibt zahlreiche Publikationen, in welchen eine Hemmung der TLR selbst - insbesondere des TLR2 und TLR4 - oder

ihrer Signaltransduktionswege des akuten Nierenschadens in der initialen Phase als abmildernd hinsichtlich der Ausprägung des Gewebeschadens beschrieben werden⁸⁰⁻⁹¹. Es konnte in-vitro gezeigt werden, dass aus dem Knochenmark isolierte dendritische Zellen auf oxidativen Stress und den AhR-Liganden FICZ IL-22 produzieren. Die dosisabhängige IL-22-Produktion auf Stimulation mit nekrotischem Überstand und somit zahlreichen, nicht weiter differenzierten DAMPs führte zu der Frage nach dem Mechanismus dieser Beobachtung. TLR gehören zu den wichtigsten PRR bei einem akuten Nierenschaden mit Nekrose und Freisetzung großer Mengen an DAMPs, weshalb sie auch in den Fokus der Arbeit rückten. Eine Stimulation mit verschiedenen Liganden der TLR zeigte, dass BMDCs ausschließlich auf eine Stimulation von TLR4 mit LPS mit der Ausschüttung von IL-22 reagierten, während das pro-entzündliche Zytokin IL-6 auf Stimulation aller TLR sezerniert wurde. Dies bedeutete im Umkehrschluss, dass die Stimulation von TLR4 einer der Schlüsselreize für BMDCs zur Produktion von IL-22 im nekrotischen Umfeld sein muss. Die signifikante und dosisabhängige Reduktion der IL-22-Produktion unter Stimulation der BMDCs mit nekrotischem Überstand und gleichzeitig TLR4-Antikörper bestätigte diese Annahme, dass der Effekt TLR4-spezifisch ist. In-vivo zeigte sich, dass eine Blockade des TLR4 in der späten Phase der Immunreaktion nach einem akuten Nierenschaden zu einer geringeren Regeneration und zu einem verstärkten Schaden führt. In der frühen Phase der Inflammation andererseits führte eine Hemmung des TLR4 zu einem geringeren Schaden, was die Literatur wiederum bestätigt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass der TLR4 in den späten Phasen der Immunreaktion auf einen akuten ischämischen Nierenschaden eine durchaus wichtige Rolle bei der Regeneration des Tubulusepithels innehat. Ein direkter Effekt von TLR auf die Regeneration und Proliferation der TECs konnte in-vitro ausgeschlossen werden, sodass ein Zusammenspiel zwischen TLR4, renale mononukleäre Phagozyten, IL-22 und tubuläre Regeneration beschrieben werden kann.

Diese Arbeit beschreibt eindrücklich diese durchaus neue Rolle von TLR4 im akuten Nierenschaden. In anderen Organen konnte ein pro-regeneratorischer Effekt von TLR bereits gezeigt werden. Die Aktivierung von TLR2 in Keratinozyten durch Makrophagen-aktivierendem-Lipopeptid-2 oder von TLR3 durch poly-I:C RNA führt in der Konsequenz zu einer beschleunigten Wundheilung der Haut^{171,172}. Für endogene TLR2-Liganden konnte bereits gezeigt werden, dass pro-regeneratorische Faktoren und miRNA ausgeschüttet werden und zu einer Differenzierung der tubulären Progenitorzellen führen^{173,174}. Die Beobachtungen in dieser Arbeit hinsichtlich dieser neuen Eigenschaften des TLR4 reiht sich somit in vorhergegangene Publikationen über die pro-regeneratorischen Funktionen der TLR mit ein.

4.4 Limitationen der Arbeit

Durch die Begrenzung des zeitlichen Rahmens und der Komplexität des untersuchten Vorganges ergaben sich Beschränkungen hinsichtlich der Aussagekraft. Es wäre zunächst zu erwähnen, dass das Tiermodell der akuten Nierenschädigung das humane Krankheitsbild nicht vollständig widerspiegelt. Das Modell der Ischämie und Reperfusion einer Niere kommt der akuten prärenalen Nierenschädigung sehr nahe, zeigt jedoch in Bezug auf die Komplexität und Vielfalt der Ursachen für eben dieses nur ein unvollständiges Bild. Unter natürlichen Bedingungen kommt eine solch drastische Reduktion der Versorgung der Niere wie im Ischämie-Reperfusion-Modell z.B. nur während einer Transplantation oder bei einem Herz-Kreislauf-Stillstand vor. Zudem wurden geschlechtsspezifische Unterschiede ausgeblendet, da ausschließlich weibliche Mäuse als Versuchstiere herangezogen wurden, um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Generell lässt sich zudem das Tiermodell nicht ohne weiteres an dem Menschen anwenden. Hierfür müssten weitere klinische Studien durchgeführt werden. Ein weiterer wichtiger Punkt besteht aus der Auswahl der Zeitpunkte, welche für die verschiedenen Phasen des akuten Nierenschadens untersucht wurden. Eine genauere Differenzierung der Wirkung von IL-22 bzw. der Mechanismen dahinter wäre nur durch eine Untersuchung weiterer Zeitpunkte als der von uns (wohl bedachten) ausgewählten möglich. *In-vitro* Essays können zu einem speziellen Mechanismus wertvolle Einsichten liefern, aber aufgrund der vereinfachten Bedingungen nicht auf die Komplexität eines Organismus übertragen werden. Der Scratch-Essay ist zudem abhängig vom Experimentator und wird durch viele Variablen wie z.B. Dicke des Epithelschadens oder die genaue Zelldichte an der untersuchten Region im Well beeinflusst, welche nicht alle vollständig stabil gehalten werden können.

Literaturverzeichnis

1. Kulkarni OP, Hartter I, Mulay SR, et al. Toll-Like Receptor 4-Induced IL-22 Accelerates Kidney Regeneration. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(5):978-989. doi:10.1681/ASN.2013050528
2. Herold G. *Innere Medizin*. Vol 96.; 2015. doi:10.1024/1661-8157.96.11.411
3. Dietel M, Suttorp N, Zeitz M. *Harrisons Innere Medizin*. ABW Wissenschaftsverlag. 2013;18. Auflage:1046-1056.
4. Thomas ME, Blaine C, Dawnay A, et al. The definition of acute kidney injury and its use in practice. *Kidney Int*. 2015. doi:10.1038/ki.2014.328
5. Ali T, Khan I, Simpson W, et al. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(4):1292-1298. doi:10.1681/ASN.2006070756
6. Waikar SS, Curhan GC, Wald R, McCarthy EP, Chertow GM. Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(4):1143-1150. doi:10.1681/ASN.2005091017
7. Thadhani R, Pascual M, Bonventre J V. Acute renal failure. *N Engl J Med*. 1996;334(22):1448-1460. doi:10.1056/NEJM199605303342207
8. Hoste EAJ, Bagshaw SM, Bellomo R, et al. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*. 2015;41(8):1411-1423. doi:10.1007/s00134-015-3934-7
9. Odutayo A, Wong CX, Farkouh M, et al. AKI and Long-Term Risk for Cardiovascular Events and Mortality. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(1):377-387. doi:10.1681/ASN.2016010105
10. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(9):1482-1493. doi:10.2215/CJN.00710113
11. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term risk of mortality and other adverse outcomes after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;53(6):961-973. doi:10.1053/j.ajkd.2008.11.034
12. Peired AJ, Antonelli G, Angelotti ML, et al. Acute kidney injury promotes development of papillary renal cell adenoma and carcinoma from renal progenitor cells. *Sci Transl Med*. 2020;12(536):eaaw6003. doi:10.1126/scitranslmed.aaw6003
13. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet (London, England)*. 365(9457):417-430. doi:10.1016/S0140-6736(05)17831-3
14. Herold G, Mitarbeiter. *Innere Medizin*. Dr. med. Gerd Herold; 2014.
15. Le Dorze M, Legrand M, Payen D, Ince C. The role of the microcirculation in acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care*. 2009;15(6):503-508. doi:10.1097/MCC.0b013e328332f6cf
16. Mehta RL, Kellum J a, Shah S V, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31. doi:10.1186/cc5713
17. Johannes T, Mik EG, Ince C. Dual-wavelength phosphorimetry for determination of cortical and subcortical microvascular oxygenation in rat kidney. *J Appl Physiol*. 2006;100(4):1301-1310. doi:10.1152/jappphysiol.01315.2005
18. Leong C-L, Anderson WP, O'Connor PM, Evans RG. Evidence that renal arterial-venous oxygen shunting contributes to dynamic regulation of renal oxygenation. *Am J*

- Physiol Renal Physiol.* 2007;292(6):F1726-33. doi:10.1152/ajprenal.00436.2006
19. Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(6):1503-1520. doi:10.1681/ASN.2006010017
 20. Evans RG, Gardiner BS, Smith DW, O'Connor PM. Intrarenal oxygenation: unique challenges and the biophysical basis of homeostasis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;295(5):F1259-70. doi:10.1152/ajprenal.90230.2008
 21. Brezis M, Agmon Y, Epstein FH. Determinants of intrarenal oxygenation. I. Effects of diuretics. *Am J Physiol.* 1994;267(6 Pt 2):F1059-62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7810692>. Accessed August 17, 2014.
 22. Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure. *Lancet.* 365(9457):417-430. doi:10.1016/S0140-6736(05)17831-3
 23. Bonventre J V. Recent Advances in the Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2199-2210. doi:10.1097/01.ASN.0000079785.13922.F6
 24. Bonventre J V, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4210-4221. doi:10.1172/JCI45161
 25. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(6):539-552. doi:10.1016/j.bcp.2009.04.029
 26. Conger J. Hemodynamic factors in acute renal failure. *Adv Ren Replace Ther.* 1997;4(2 Suppl 1):25-37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9113238>. Accessed August 17, 2014.
 27. Brooks DP. Role of endothelin in renal function and dysfunction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23(4):345-348. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8717072>. Accessed August 17, 2014.
 28. Kurata H, Takaoka M, Kubo Y, et al. Protective effect of nitric oxide on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 overproduction. *Eur J Pharmacol.* 2005;517(3):232-239. doi:10.1016/j.ejphar.2005.05.026
 29. da Silveira KD, Pompermayer Bosco KS, Diniz LRL, et al. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis in renal ischaemia/reperfusion injury in rats. *Clin Sci (Lond).* 2010;119(9):385-394. doi:10.1042/CS20090554
 30. Kwon O, Hong S-M, Ramesh G. Diminished NO generation by injured endothelium and loss of macula densa nNOS may contribute to sustained acute kidney injury after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;296(1):F25-33. doi:10.1152/ajprenal.90531.2008
 31. Blantz RC, Deng A, Miracle CM, Thomson SC. Regulation of kidney function and metabolism: a question of supply and demand. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 2007;118:23-43. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1863590&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 17, 2014.
 32. Rabelink TJ, de Boer HC, van Zonneveld AJ. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6(7):404-414. doi:10.1038/nrneph.2010.65
 33. Kelly KJ, Williams WW, Colvin RB, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest.* 1996;97(4):1056-1063. doi:10.1172/JCI118498
 34. Sharfuddin A a, Molitoris B a. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7(4):189-200. doi:10.1038/nrneph.2011.16
 35. Devarajan P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Curr Opin Pediatr.* 2005;17(2):193-199. doi:10.1097/01.mop.0000152620.59425.eb
 36. Molitoris BA. Actin cytoskeleton in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 2004;66(2):871-883. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00818.x

37. Lee DBN, Huang E, Ward HJ. Tight junction biology and kidney dysfunction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006;290(1):F20-34. doi:10.1152/ajprenal.00052.2005
38. Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, et al. Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *J Clin Invest*. 1998;101(10):2054-2064. doi:10.1172/JCI772
39. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ*. 2015;22(1):58-73. doi:10.1038/cdd.2014.137
40. Linkermann A, Green DR. Necroptosis. *N Engl J Med*. 2014;370(5):455-465. doi:10.1056/NEJMra1310050
41. Lau A, Wang S, Jiang J, et al. RIPK3-Mediated Necroptosis Promotes Donor Kidney Inflammatory Injury and Reduces Allograft Survival. *Am J Transplant*. 2013;13(11):2805-2818. doi:10.1111/ajt.12447
42. Linkermann A, Bräsen JH, Darding M, et al. Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. doi:10.1073/pnas.1305538110
43. Kers J, Leemans JC, Linkermann A. An Overview of Pathways of Regulated Necrosis in Acute Kidney Injury. *Semin Nephrol*. 2016;36(3):139-152. doi:10.1016/j.semnephrol.2016.03.002
44. Mulay SR, Linkermann A, Anders H. Necroinflammation in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):27-39. doi:10.1681/ASN.2015040405
45. Sallustio F, De Benedictis L, Castellano G, et al. TLR2 plays a role in the activation of human resident renal stem/progenitor cells. *FASEB J*. 2010;24(2):514-525. doi:10.1096/fj.09-136481
46. Lazzeri E, Angelotti ML, Peired A, et al. Endocycle-related tubular cell hypertrophy and progenitor proliferation recover renal function after acute kidney injury. *Nat Commun*. 2018;9(1):1344. doi:10.1038/s41467-018-03753-4
47. Kang HM, Huang S, Reidy K, Han SH, Chinga F, Susztak K. Sox9-Positive Progenitor Cells Play a Key Role in Renal Tubule Epithelial Regeneration in Mice. *Cell Rep*. 2016;14(4):861-871. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.071
48. Coca SG, Yusuf B, Shlipak MG, Garg AX, Parikh CR. Long-term Risk of Mortality and Other Adverse Outcomes After Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2009;53(6):961-973. doi:10.1053/j.ajkd.2008.11.034
49. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int*. 2007;72(2):151-156. doi:10.1038/sj.ki.5002312
50. Duffield JS. Macrophages and immunologic inflammation of the kidney. *Semin Nephrol*. 2010;30(3):234-254. doi:10.1016/j.semnephrol.2010.03.003
51. Kriz W, Kaissling B, Le Hir M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *J Clin Invest*. 2011;121(2):468-474. doi:10.1172/JCI44595
52. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol*. 2009;130(1):41-50. doi:S1521-6616(08)00777-8 [pii]r10.1016/j.clim.2008.08.016
53. Anders H-J. Toll-like receptors and danger signaling in kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(8):1270-1274. doi:10.1681/ASN.2010030233
54. Paul WE. *Fundamental Immunology*. 7th Editio. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
55. Speckmann E-J, Hescheler J, Köhling R. *Physiologie*. 5. Auflage. München: Elsevier; 2008.
56. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23(2):197-223. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115653
57. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*.

- 2006;124(4):783-801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
58. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-384. doi:10.1038/ni.1863
59. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. *Cell.* 2020;180(6):1044-1066. doi:10.1016/j.cell.2020.02.041
60. Bonham KS, Orzalli MH, Hayashi K, et al. A Promiscuous Lipid-Binding Protein Diversifies the Subcellular Sites of Toll-like Receptor Signal Transduction. *Cell.* 2014;156(4):705-716. doi:10.1016/j.cell.2014.01.019
61. Emmerich CH, Ordureau A, Strickson S, et al. Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(38):15247-15252. doi:10.1073/pnas.1314715110
62. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 1999;11(1):115-122. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10435584>. Accessed August 17, 2014.
63. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21(1):335-376. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141126
64. Adachi O, Kawai T, Takeda K, et al. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity.* 1998;9(1):143-150. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697844>. Accessed August 17, 2014.
65. Tan Y, Kagan JC. Innate Immune Signaling Organelles Display Natural and Programmable Signaling Flexibility. *Cell.* 2019;177(2):384-398.e11. doi:10.1016/j.cell.2019.01.039
66. Liu S, Cai X, Wu J, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science (80-).* 2015;347(6227):aaa2630-aaa2630. doi:10.1126/science.aaa2630
67. Sarhan J, Liu BC, Muendlein HI, et al. Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis. *Cell Death Differ.* 2019. doi:10.1038/s41418-018-0122-7
68. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003;301(5633):640-643. doi:10.1126/science.1087262
69. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-2088. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851930>. Accessed July 21, 2014.
70. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med.* 1999;189(11):1777-1782. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed August 16, 2014.
71. Nagai Y, Akashi S, Nagafuku M, et al. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol.* 2002;3(7):667-672. doi:10.1038/ni809
72. Jin MS, Kim SE, Heo JY, et al. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell.* 2007;130(6):1071-1082. doi:10.1016/j.cell.2007.09.008
73. Bell JK, Askins J, Hall PR, Davies DR, Segal DM. The dsRNA binding site of human Toll-like receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(23):8792-8797. doi:10.1073/pnas.0603245103
74. Liu L, Botos I, Wang Y, et al. Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science.* 2008;320(5874):379-381. doi:10.1126/science.1155406
75. Latz E, Visintin A, Lien E, et al. Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the

- Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem.* 2002;277(49):47834-47843. doi:10.1074/jbc.M207873200
76. Tan Y, Zanoni I, Cullen TW, Goodman AL, Kagan JC. Mechanisms of Toll-like Receptor 4 Endocytosis Reveal a Common Immune-Evasion Strategy Used by Pathogenic and Commensal Bacteria. *Immunity.* 2015. doi:10.1016/j.immuni.2015.10.008
 77. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Lucchesi BR. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* 1983;67(5):1016-1023. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6831665>. Accessed August 17, 2014.
 78. Hall TS, Breda MA, Baumgartner WA, et al. The role of leukocyte depletion in reducing injury to the lung after hypothermic ischemia. *Curr Surg.* 44(2):137-139. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3581893>. Accessed August 17, 2014.
 79. Sadasivan KK, Carden DL, Moore MB, Korthuis RJ. Neutrophil mediated microvascular injury in acute, experimental compartment syndrome. *Clin Orthop Relat Res.* 1997;(339):206-215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9186222>. Accessed August 17, 2014.
 80. Dovi J V, He L-K, DiPietro LA. Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice. *J Leukoc Biol.* 2003;73(4):448-455. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660219>. Accessed August 17, 2014.
 81. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med.* 1999;5(11):1249-1255. doi:10.1038/15200
 82. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(4):279-289. doi:10.1038/nri2215
 83. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045. doi:10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
 84. Kim BS, Lim SW, Li C, et al. Ischemia-reperfusion injury activates innate immunity in rat kidneys. *Transplantation.* 2005;79(10):1370-1377. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15912106>. Accessed August 17, 2014.
 85. Mudaliar H, Pollock C, Komala MG, Chadban S, Wu H, Panchapakesan U. The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305(2):F143-54. doi:10.1152/ajprenal.00398.2012
 86. Leemans JC, Stokman G, Claessen N, et al. Renal-associated TLR2 mediates ischemia/reperfusion injury in the kidney. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2894-2903. doi:10.1172/JCI22832
 87. Pulskens WP, Teske GJ, Butter LM, et al. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury. *PLoS One.* 2008;3(10):e3596. doi:10.1371/journal.pone.0003596
 88. Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 2007;117(10):2847-2859. doi:10.1172/JCI31008
 89. Chen J, Hartono JR, John R, et al. Early interleukin 6 production by leukocytes during ischemic acute kidney injury is regulated by TLR4. *Kidney Int.* 2011;80(5):504-515. doi:10.1038/ki.2011.140
 90. Li J, Gong Q, Zhong S, et al. Neutralization of the extracellular HMGB1 released by ischaemic damaged renal cells protects against renal ischaemia-reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(2):469-478. doi:10.1093/ndt/gfq466
 91. Seki E, Tsutsui H, Iimuro Y, et al. Contribution of Toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88 signaling to murine liver regeneration. *Hepatology.*

- 2005;41(3):443-450. doi:10.1002/hep.20603
92. Iimuro Y, Seki E, Son G, Tsutsui H, Nakanishi K, Fujimoto J. Role of innate immune response in liver regeneration. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007;22 Suppl 1:S57-8. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04651.x
 93. Araki A, Kanai T, Ishikura T, et al. MyD88-deficient mice develop severe intestinal inflammation in dextran sodium sulfate colitis. *J Gastroenterol.* 2005;40(1):16-23. doi:10.1007/s00535-004-1492-9
 94. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J. The renal mononuclear phagocytic system. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(2):194-203. doi:10.1681/ASN.2011070680
 95. Wang Y, Harris DCH. Macrophages in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22:21-27. doi:10.1681/ASN.2010030269
 96. Rodríguez-Iturbe B, Pons H, Herrera-Acosta J, Johnson RJ. Role of immunocompetent cells in nonimmune renal diseases. *Kidney Int.* 2001;59(5):1626-1640. doi:10.1046/j.1523-1755.2001.0590051626.x
 97. Swaminathan S, Griffin MD. First responders: understanding monocyte-lineage traffic in the acutely injured kidney. *Kidney Int.* 2008;74(12):1509-1511. doi:10.1038/ki.2008.555
 98. Viehmann SF, Böhner AMC, Kurts C, Brähler S. The multifaceted role of the renal mononuclear phagocyte system. *Cell Immunol.* 2018;330(April):97-104. doi:10.1016/j.cellimm.2018.04.009
 99. Salei N, Rambichler S, Salvermoser J, et al. The Kidney Contains Ontogenetically Distinct Dendritic Cell and Macrophage Subtypes throughout Development That Differ in Their Inflammatory Properties. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(2):257-278. doi:10.1681/ASN.2019040419
 100. Sheng J, Ruedl C, Karjalainen K. Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells. *Immunity.* 2015;43(2):382-393. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.016
 101. Stamatiades EG, Tremblay M-E, Bohm M, et al. Immune Monitoring of Trans-endothelial Transport by Kidney-Resident Macrophages. *Cell.* 2016;166(4):991-1003. doi:10.1016/j.cell.2016.06.058
 102. Wu X, Briseño CG, Durai V, et al. Mafb lineage tracing to distinguish macrophages from other immune lineages reveals dual identity of Langerhans cells. *J Exp Med.* 2016;213(12):2553-2565. doi:10.1084/jem.20160600
 103. Satpathy AT, KC W, Albring JC, et al. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med.* 2012;209(6):1135-1152. doi:10.1084/jem.20120030
 104. Gautier EL, Shay T, Miller J, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2012;13(11):1118-1128. doi:10.1038/ni.2419
 105. Langlet C, Tamoutounour S, Henri S, et al. CD64 Expression Distinguishes Monocyte-Derived and Conventional Dendritic Cells and Reveals Their Distinct Role during Intramuscular Immunization. *J Immunol.* 2012;188(4):1751-1760. doi:10.4049/jimmunol.1102744
 106. Williams M, Dutertre C-A, Scott CL, et al. Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity.* 2016;45(3):669-684. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.015
 107. Schraml BU, Van Blijswijk J, Zelenay S, et al. Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell.* 2013. doi:10.1016/j.cell.2013.07.014
 108. Teteris S a, Engel DR, Kurts C. Homeostatic and pathogenic role of renal dendritic

- cells. *Kidney Int.* 2011;80(2):139-145. doi:10.1038/ki.2011.129
109. Panzer U, Kurts C. T cell cross-talk with kidney dendritic cells in glomerulonephritis. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(1):19-26. doi:10.1007/s00109-009-0541-5
110. Rees AJ. Monocyte and macrophage biology: an overview. *Semin Nephrol.* 2010;30(3):216-233. doi:10.1016/j.semnephrol.2010.03.002
111. Lukacs-Kornek V, Burgdorf S, Diehl L, Specht S, Kornek M, Kurts C. The kidney-renal lymph node-system contributes to cross-tolerance against innocuous circulating antigen. *J Immunol.* 2008;180(2):706-715. doi:10.4049/jimmunol.180.2.706
112. Macconi D, Chiabrando C, Schiarea S, et al. Proteasomal processing of albumin by renal dendritic cells generates antigenic peptides. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(1):123-130. doi:10.1681/ASN.2007111233
113. Galli SJ, Borregaard N, Wynn T a. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1035-1044. doi:10.1038/ni.2109
114. Kulkarni O, Eulberg D, Selve N, et al. Anti-Ccl2 Spiegelmer permits 75% dose reduction of cyclophosphamide to control diffuse proliferative lupus nephritis and pneumonitis in MRL-Fas(lpr) mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328(2):371-377. doi:10.1124/jpet.108.142711
115. Kulkarni O, Pawar RD, Purschke W, et al. Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(8):2350-2358. doi:10.1681/ASN.2006121348
116. Vielhauer V, Kulkarni O, Reichel C a, Anders H-J. Targeting the recruitment of monocytes and macrophages in renal disease. *Semin Nephrol.* 2010;30(3):318-333. doi:10.1016/j.semnephrol.2010.03.006
117. Lech M, Anders H-J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1832(7):989-997. doi:10.1016/j.bbadis.2012.12.001
118. Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol.* 2016;17(1):34-40. doi:10.1038/ni.3324
119. Lee S, Huen S, Nishio H, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):317-326. doi:10.1681/ASN.2009060615
120. Zhang M-Z, Yao B, Yang S, et al. CSF-1 signaling mediates recovery from acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2012;122(12):4519-4532. doi:10.1172/JCI60363
121. Kim MG, Su Boo C, Sook Ko Y, et al. Depletion of kidney CD11c+ F4/80+ cells impairs the recovery process in ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(9):2908-2921. doi:10.1093/ndt/gfq183
122. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451-483. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132532
123. Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2013;1832(7):989-997. doi:10.1016/j.bbadis.2012.12.001
124. Wolk K, Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R. Biology of interleukin-22. *Semin Immunopathol.* 2010;32(1):17-31. doi:10.1007/s00281-009-0188-x
125. Sabat R, Ouyang W, Wolk K. Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(1):21-38. doi:10.1038/nrd4176
126. Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC. Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase

- pathways in a rat hepatoma cell line: Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem.* 2002;277(37):33676-33682. doi:10.1074/jbc.M204204200
127. Wolk K, Witte E, Hoffmann U, et al. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease. *J Immunol.* 2007;178(9):5973-5981. doi:178/9/5973 [pii]
 128. Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting Edge: Immune Cells as Sources and Targets of the IL-10 Family Members? *J Immunol.* 2002;168(11):5397-5402. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5397
 129. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203(10):2271-2279. doi:10.1084/jem.20061308
 130. Chung Y, Yang X, Chang SH, Ma L, Tian Q, Dong C. Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. *Cell Res.* 2006;16(11):902-907. doi:10.1038/sj.cr.7310106
 131. Rutz S, Noubade R, Eidenschenk C, et al. Transcription factor c-Maf mediates the TGF- β -dependent suppression of IL-22 production in TH17 cells. *Nat Immunol.* 2011;12(12):1238-1245. doi:10.1038/ni.2134
 132. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol.* 2009;10(8):857-863. doi:10.1038/ni.1767
 133. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010;21(5):365-379. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.08.002
 134. Zenewicz L a, Flavell R a. Recent advances in IL-22 biology. *Int Immunol.* 2011;23(3):159-163. doi:10.1093/intimm/dxr001
 135. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med.* 2008;14(3):282-289. doi:10.1038/nm1720
 136. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity.* 2004;21(2):241-254. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.007
 137. Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity.* 2004;21(2):241-254. doi:10.1016/j.immuni.2004.07.007
 138. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 2008;14(3):275-281. doi:10.1038/nm1710
 139. Sugimoto K, Ogawa A, Mizoguchi E, et al. IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis. *J Clin Invest.* 2008;118(2):534-544. doi:10.1172/JCI33194
 140. Zenewicz L a, Yin X, Wang G, et al. IL-22 deficiency alters colonic microbiota to be transmissible and colitogenic. *J Immunol.* 2013;190(10):5306-5312. doi:10.4049/jimmunol.1300016
 141. Wolk K, Witte E, Wallace E, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2006;36(5):1309-1323. doi:10.1002/eji.200535503
 142. Wolk K, Haugen HS, Xu W, et al. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN- γ are not. *J Mol Med.* 2009;87(5):523-536. doi:10.1007/s00109-009-0457-0

143. Schulz SM, Köhler G, Schütze N, et al. Protective immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17. *J Immunol.* 2008;181(11):7891-7901. doi:181/11/7891 [pii]
144. Guo X, Qiu J, Tu T, et al. Induction of innate lymphoid cell-derived interleukin-22 by the transcription factor STAT3 mediates protection against intestinal infection. *Immunity.* 2014;40(1):25-39. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.021. Induction
145. Boniface K, Bernard F-X, Garcia M, Gurney AL, Lecron J-C, Morel F. IL-22 Inhibits Epidermal Differentiation and Induces Proinflammatory Gene Expression and Migration of Human Keratinocytes. *J Immunol.* 2005;174(6):3695-3702. doi:10.4049/jimmunol.174.6.3695
146. Kumar P, Thakar MS, Ouyang W, Malarkannan S. IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection. *Mucosal Immunol.* 2013;6(1):69-82. doi:10.1038/mi.2012.49
147. Wolk K, Witte E, Warszawska K, et al. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: A novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol.* 2009;39(12):3570-3581. doi:10.1002/eji.200939687
148. Andoh A, Zhang Z, Inatomi O, et al. Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology.* 2005;129(3):969-984. doi:10.1053/j.gastro.2005.06.071
149. Besnard A-G, Sabat R, Dumoutier L, et al. Dual Role of IL-22 in allergic airway inflammation and its cross-talk with IL-17A. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(9):1153-1163. doi:10.1164/rccm.201008-1383OC
150. Takahashi K, Hirose K, Kawashima S, et al. IL-22 attenuates IL-25 production by lung epithelial cells and inhibits antigen-induced eosinophilic airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(5):1067-76.e1-6. doi:10.1016/j.jaci.2011.06.018
151. Simonian PL, Wehrmann F, Roark CL, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. $\gamma\delta$ T cells protect against lung fibrosis via IL-22. *J Exp Med.* 2010;207(10):2239-2253. doi:10.1084/jem.20100061
152. Radaeva S, Sun R, Pan HN, Hong F, Gao B. Interleukin 22 (IL-22) Plays a Protective Role in T Cell-mediated Murine Hepatitis: IL-22 Is a Survival Factor for Hepatocytes via STAT3 Activation. *Hepatology.* 2004;39:1332-1342. doi:10.1002/hep.20184
153. Park O, Wang H, Weng H, et al. In vivo consequences of liver-specific interleukin-22 expression in mice: Implications for human liver disease progression. *Hepatology.* 2011;54(1):252-261. doi:10.1002/hep.24339
154. Feng D, Kong X, Weng H, et al. Interleukin-22 promotes proliferation of liver stem/progenitor cells in mice and patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2012;143(1):188-98.e7. doi:10.1053/j.gastro.2012.03.044
155. Ikeuchi H, Kuroiwa T, Hiramatsu N, et al. Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine. *Arthritis Rheum.* 2005;52(4):1037-1046. doi:10.1002/art.20965
156. Jiang R, Tan Z, Deng L, et al. Interleukin-22 promotes human hepatocellular carcinoma by activation of STAT3. *Hepatology.* 2011;54(3):900-909. doi:10.1002/hep.24486
157. Kirchberger S, Royston DJ, Boulard O, et al. Innate lymphoid cells sustain colon cancer through production of interleukin-22 in a mouse model. *J Exp Med.* 2013;210(5):917-931. doi:10.1084/jem.20122308
158. Van Rooijen N, Sanders A, Van Den Berg TK. Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamidine. *J Immunol Methods.* 1996;193:93-99. doi:10.1016/0022-1759(96)00056-7
159. Xu M-J, Feng D, Wang H, Guan Y, Yan X, Gao B. IL-22 Ameliorates Renal Ischemia-

- Reperfusion Injury by Targeting Proximal Tubule Epithelium. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):967-977. doi:10.1681/ASN.2013060611
160. Pickert G, Neufert C, Leppkes M, et al. STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *J Exp Med.* 2009;206(7):1465-1472. doi:10.1084/jem.20082683
161. Cantarini L SYSCCANS. Safety issues and concerns of new immunomodulators in rheumatology. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(3):389-399. doi:10.1517/14740338.2015.993605
162. Sonnenberg GF, Fouser L a, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol.* 2011;12(5):383-390. doi:10.1038/ni.2025
163. Suh J-S, Cho SH, Chung J-H, Moon A, Park Y-K, Cho B-S. A polymorphism of interleukin-22 receptor alpha-1 is associated with the development of childhood IgA nephropathy. *J Interferon Cytokine Res.* 2013;33(10):571-577. doi:10.1089/jir.2012.0097
164. Hasnain SZ, Borg DJ, Harcourt BE, et al. Glycemic control in diabetes is restored by therapeutic manipulation of cytokines that regulate beta cell stress. *Nat Med.* 2014;20(12):1417-1426. doi:10.1038/nm.3705
165. Wang X, Ota N, Manzanillo P, et al. Interleukin-22 alleviates metabolic disorders and restores mucosal immunity in diabetes. *Nature.* 2014. doi:10.1038/nature13564
166. Balzola F, Cullen G, Ho GT, Hoentjen F, Russell RK. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Inflamm Bowel Dis Monit.* 2013;13(3):108-109. doi:10.1038/nature11535
167. Lim C, Savan R. The role of the IL-22/IL-22R1 axis in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014;25(3):257-271. doi:10.1016/j.cytogfr.2014.04.005
168. Nikoopour E, Bellemore SM, Singh B. IL-22, cell regeneration and autoimmunity. *Cytokine.* 2015;74(1):35-42. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.007
169. Zhang F, Shang D, Zhang Y, Tian Y. Interleukin-22 suppresses the growth of A498 renal cell carcinoma cells via regulation of STAT1 pathway. *PLoS One.* 2011;6(5). doi:10.1371/journal.pone.0020382
170. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
171. Dasu MR, Isseroff RR. Toll-like receptors in wound healing: location, accessibility, and timing. *J Invest Dermatol.* 2012;132(8):1955-1958. doi:10.1038/jid.2012.208
172. Huebener P, Schwabe RF. Regulation of wound healing and organ fibrosis by toll-like receptors. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2013;1832(7):1005-1017. doi:10.1016/j.bbadis.2012.11.017
173. Sallustio F, Costantino V, Cox SN, et al. Human renal stem/progenitor cells repair tubular epithelial cell injury through TLR2-driven inhibin-A and microvesicle-shuttled decorin. *Kidney Int.* 2013;83(3):392-403. doi:10.1038/ki.2012.413
174. Sallustio F, De Benedictis L, Castellano G, et al. TLR2 plays a role in the activation of human resident renal stem/progenitor cells. *FASEB J.* 2010;24(2):514-525. doi:10.1096/fj.09-136481

Danksagung

Mein aufrichtiger und auch höchster Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Durch seine wissenschaftliche und auch persönliche Unterstützung sowie mit teils viel Geduld hat er meinen Einstieg in die wissenschaftliche Welt immens erleichtert und auch meine Freude an der Wissenschaft mit seiner eigenen Begeisterung gefördert. Dank seines Engagements wurde ich in das DFG-Graduiertenkolleg 1202 aufgenommen. Zudem war es unter seiner exzellenten Betreuung überhaupt erst möglich, die Arbeit im Rahmen internationaler wissenschaftlicher Kongresse sowie durch eine herausragende Publikation zu veröffentlichen, was für einen jungen Wissenschaftler wie mich eine große Ehre darstellt. Ich danke zudem Prof. Dr. med. Stephan Endres für die herausragende Unterstützung im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs 1202, in welches ich herzlichst aufgenommen wurde und wertvolle Erfahrungen im Rahmen sammeln durfte. Dadurch waren auch ertragreiche und freundschaftliche Kooperationen möglich, welche meine wissenschaftliche Arbeit bereichert haben.

Ein besonderer Dank geht an Dr. hum. biol. Onkar Prakash Kulkarni, mit welchem ich eng an dem Projekt gearbeitet habe. Durch seine tatkräftige und herausragende Unterstützung, Planung und Expertise hat diese Arbeit erst den hohen wissenschaftlichen Wert erreicht. Mit seiner äußerst freundlichen Art half er mir über so manche Probleme hinweg und ich verdanke ihm daher auch neben der exzellenten Zusammenarbeit auch die Freude am Forschen. Ein weiterer Dank geht an Dr. hum. biol. Shrikant Ramesh Mulay und Dr. hum. biol. Mi Ryu für die sehr freundschaftliche und tolle Kooperation bei der wissenschaftlichen Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön an Prof. Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech, welcher mir während meiner Zeit im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand. Über die Arbeit im Labor hinaus habe ich mit ihm einen äußerst guten Freund hinzugewonnen, welcher das Herz auf dem rechten Fleck hat. Ein besonderer Dank geht zudem an Heni Eka Susanti, von der eine äußerst professionelle, angenehme und freundschaftliche Atmosphäre ausging. Allen weiteren unzähligen Personen im Labor sei auch herzlichst gedankt, jedoch würde eine Aufzählung der vielen netten und hilfreichen Personen den Rahmen sprengen.

Vielen herzlichen Dank auch an Charlotte, welche mich neben dem fachlichen Rat auch emotional und mental bei dieser Arbeit extrem unterstützt hat. Sie hat mir auch in schwierigen Zeiten immer Mut gegeben, mich aufgebaut und immer an mich geglaubt.

Zum Schluss möchte ich noch meinen Eltern Ilse und Emmerich für ihre lebenslange Unterstützung und Hingabe danken. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen und hätte meine Ziele im Leben nicht erreicht. Sie gaben mir stets die Sicherheit, Geborgenheit und viel Verständnis für meinen gesamten Lebensweg, egal wohin er mich auch führte (wenn auch oft weit weg von meiner Heimat). Sie, Charlotte und meine gesamte Familie (insbesondere Erna, Pepi, Felix, Oskar, Manuela und Otmar) gaben mir den Mut, die Kraft und die Freude, um all dies zu erreichen. Mein Dank lässt sich hierfür gar nicht in Worte fassen. Außerdem widme ich diese Arbeit meinen verstorbenen Großeltern, deren Herzengüte ich nie vergessen werde und deren Einfluss und Kraft mich immer begleiten werden. Ich liebe euch alle!

Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

—

Harterter, Ingo, geb. 09.06.1989 in Oberwart (Österreich)

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die TLR4-induzierte Produktion von IL-22 durch renale mononukleäre Phagozyten fördert die Nierenregeneration nach einer ischämischen Nierenschädigung

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 29.10.2021

Ingo Harterter

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Publikationsliste

Publikationen dieser Arbeit

Kulkarni OP*, Hartter I*, Mulay SR, et al. Toll-Like Receptor 4-Induced IL-22 Accelerates Kidney Regeneration. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):978-89 (* geteilte erste Autorenschaft)

Vorträge dieser Arbeit

1. Ingo Hartter, *TLR4-MyD88 signalling drives acute kidney injury repair by activating intrarenal dendritic cells to secrete IL-22*, Kidney Week 2012: American Society of Nephrology 45th Annual Meeting, San Diego, USA
2. Ingo Hartter, *Der TLR4/MyD88 Weg ermöglicht Reparaturmechanismen während des akuten Nierenschadens, indem er die intrarenalen mononukleären Phagozyten zur Produktion von IL-22 antreibt*, 119. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin e.V. 2013 im Rahmen des „Young Investigator Award“, Wiesbaden

Posterpräsentation dieser Arbeit

Ingo Hartter, O. P. Kulkarni, S. R. Mulay, J. H. Hagemann, M. P. Darisipudi, S. Kumar, D. Thomasova, M. Ryu, H.-J. Anders, *Der TLR4/MyD88 Weg ermöglicht Reparaturmechanismen während des akuten Nierenschadens, indem er die intrarenalen mononukleären Phagozyten zur Produktion von IL-22 antreibt*, Posterpräsentation beim Kongress für Nephrologie 2013, 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin

Förderung der Arbeit

Die Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 1202: „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert

Rechtliche Grundlagen der Tierversuche

Die Tierversuche in Zusammenhang mit dieser Arbeit waren durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt worden. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der durchgeführten Tierversuche geachtet, die Zahl der Versuchstiere sowie deren Leiden auf ein Minimum zu reduzieren.