

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Die Beeinflussung des akuten und chronischen
Ischämie-Reperfusionsschadens in der Niere durch das
Chemokin-bindende Molekül ACKR2**

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

vorgelegt von
Moritz Lux

aus
Würzburg

Jahr
2025

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Reichel

Prof. Dr. Bernhard Heindl

PD Dr. Sebastian Pratschke

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2025

Meinen Eltern

Teilergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden bereits als Abstract, Poster und Originalartikel veröffentlicht:

1. Lux M, Blaut A, Eltrich N, Bideak A, Muller MB, Hoppe JM, Gröne HJ, Locati M, Vielhauer V. The Atypical Chemokine Receptor 2 Limits Progressive Fibrosis after Acute Ischemic Kidney Injury. Am J Pathol. 2019;189(2):231-47.
2. Lux M, Bideak A, Eltrich N, Locati M, Vielhauer V. Der atypische Chemokinrezeptor 2 vermindert renale Fibrose nach akutem ischämischen Nierenschaden. Abstract-USB-Stick, Kongress für Nephrologie 2017. 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Mannheim 14.09.-17.09.2017. Postervortrag P20. (Posterpreis)
3. Lux M, Bideak A, Blaut A, Eltrich N, Vielhauer V. The atypical chemokine receptor 2 limits fibrotic remodelling after ischemia-reperfusion injury of the kidney. J Am Soc Nephrol. 2017; 28 (Abstract Suppl): Kidney Week 2017, American Society of Nephrology, New Orleans, 31.10-05.11-2017. Poster SA-PO316.
4. Lux M, Hoppe J, Müller M, Eltrich N, Vielhauer V. Beeinflussung des akuten und chronischen Ischämie-Reperfusionsschaden durch das Chemokin-bindende Molekül D6. Doktamed Doktorarbeitstage Medizin, München 24.05.2014. Postervortrag A03. (Posterpreis)
5. Lux M, Hoppe J, Müller M, Eltrich N, Vielhauer V. Beeinflussung des akuten und chronischen Ischämie-Reperfusionsschaden durch das Chemokin-bindende Molekül D6. Symposium „Junge Niere“ 2014, München 9.5.-10.5.2014. Vortrag.
6. Lux M, Hoppe J, Müller M, Eltrich N, Vielhauer V. Beeinflussung des akuten und chronischen Ischämie-Reperfusionsschaden durch das Chemokin-bindende Molekül D6. Abschlussseminar „Föfole“ 2014, München 10.-11.5-2014. Vortrag.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
Zusammenfassung	XII
Summary.....	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Die akute Nierenschädigung.....	1
1.2 Pathophysiologie des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens	4
1.2.1 Die Rolle der Endothelzellen während des Ischämie-Reperfusionsschadens	5
1.2.2 Entzündliche Prozesse während des Ischämie-Reperfusionsschadens	7
1.2.3 Charakteristika des tubulären Schadens in der Niere	10
1.2.4 Reparaturmechanismen des Tubulusepithels	13
1.2.5 Mechanismen der renalen Fibrose nach Ischämie-Reperfusionsschaden	14
1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren.....	18
1.3.1 Eigenschaften von Chemokinen und Chemokinrezeptoren	18
1.3.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren als Ziele von medikamentösen Therapien bei entzündlichen Nierenerkrankungen	22
1.3.3 Die atypischen Chemokinrezeptoren.....	25
1.3.4 Der atypische Chemokinrezeptor ACKR2	26
1.4 Funktionelle Rolle von ACKR2 in Tiermodellen entzündlicher Erkrankungen....	30
1.5 Funktionelle Rolle von ACKR2 bei renalen Erkrankungen	35
1.6 Hypothese	37
2 Materialien und Methoden	38
2.1 Materialien	38
2.1.1 Geräte.....	38
2.1.2 Tierhaltung und Versuchsdurchführung	39
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	40
2.1.4 Chemikalien.....	40
2.1.5 Kommerzielle Kits.....	42
2.1.6 Lösungen und Puffer.....	43

2.1.7 Antikörper und Enzyme.....	45
2.1.8 Software	45
2.1.9 Oligonukleotid-Primer für die Real-Time PCR.....	46
2.2 Tierexperimentelle Methoden	47
2.2.1 Tierhaltung.....	47
2.2.2 Verwendete Tiere	48
2.2.3 Induktion des Ischämie-Reperfusionsschadens	48
2.2.4 Blut- und Organentnahme.....	50
2.3 Durchflusszytometrie.....	52
2.3.1 Herstellung der Zellsuspension aus Nierengewebe	53
2.3.2 Herstellung der Zellsuspension aus Milzgewebe	54
2.3.3 Herstellung der Zellsuspension aus Knochenmark	54
2.3.4 Färben der Zellsuspensionen von Niere, Milz und Knochenmark	55
2.3.5 Fibrozytenfärbung: Intrazelluläre Färbung von Kollagen 1	56
2.3.6 Aufbereitung des Vollbluts zur FACS-Analyse	56
2.3.7 Durchflusszytometrische Analyse.....	57
2.4 Molekularbiologische Methoden	62
2.4.1 RNA-Isolierung	62
2.4.2 cDNA-Synthese.....	63
2.4.3 Quantitative Real Time-PCR.....	64
2.5 Protein- und Chemokinmessungen	66
2.5.1 Herstellung des Proteinlysates aus der Niere	66
2.5.2 Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration der Niere	66
2.5.3 ELISA	66
2.6 Histologie	69
2.6.1 Aufbereitung des Nierengewebes und histologische Färbungen	69
2.6.2 Immunhistochemie.....	70
2.6.3 Histologische Auswertung.....	71
2.7 Statistik.....	72
3 Ergebnisse.....	74
3.1 Renale Expression von ACKR2 in der Maus.....	74
3.2 Die Rolle von ACKR2 im akuten Verlauf nach renalem Ischämie-	
Reperfusionsschaden.....	76
3.2.1 Nierenfunktion und struktureller Schaden	76
3.2.2 Akkumulation von intrarenalen Leukozyten.....	78

3.3 Die Rolle von ACKR2 im subakuten Verlauf nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden	82
3.3.1 Struktureller Schaden	82
3.3.2 Akkumulation von intrarenalen Leukozyten	85
3.3.3 Expression von renalen Chemokinen und inflammatorischen Markern	87
3.4 Die Rolle von ACKR2 im chronischen Verlauf nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden	91
3.4.1 Struktureller Schaden	91
3.4.2 Akkumulation von intrarenalen Leukozyten	94
3.4.3 Expression von renalen Chemokinen, M1-Makrophagen-Markern und Infiltration von inflammatorischen Makrophagen	98
3.4.4 Expression von M2-Makrophagen-Markern und Ausmaß der renalen Fibrose	102
3.4.5 CCL2-Konzentrationen und Leukozytenzahlen im peripheren Blut	109
4 Diskussion	112
4.1 Einfluss von ACKR2 auf den Verlauf des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens	114
4.1.1 Mögliche pathophysiologische Beeinflussung des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens durch ACKR2	114
4.1.2 Erhöhte CCL-Chemokinkonzentrationen bei Ackr2-Defizienz	114
4.1.3 Vermehrte renale Leukozytenakkumulation bei Ackr2-Defizienz	115
4.1.4 Erhöhter struktureller Schaden bei Ackr2-Defizienz	117
4.1.5 Inflammation und Rekrutierung von CD11b+ Ly6Chigh inflammatorischen Makrophagen bei Ackr2-Defizienz	119
4.1.6 Stärkere postischämische Fibrosierung bei Ackr2-Defizienz	120
4.2 Effekte der Ackr2-Defizienz nach renalem Ischämie-Reperfusionsschadens im Vergleich zu weiteren renalen Erkrankungsmodellen	123
4.2.1 Unilaterale Ureterobstruktion	123
4.2.2 Aristolochiasäure-induzierte Nephropathie	124
4.2.3 Immunkomplex-Glomerulonephritis	125
4.2.4 Diabetische Nephropathie	127
4.2.5 Lupus-Nephritis	128
4.3 Limitationen und Ausblick	130
Literaturverzeichnis	132
Danksagung	142
Eidesstattliche Erklärung	143

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ursachen einer regionalen oder generalisierten Verminderung des renalen Blutflusses	4
Abbildung 2: Normales Nephron, kortikomedullärer Sauerstoffpartialdruckgradient und Anatomie der Blutgefäße des äußeren Nierenmarks	6
Abbildung 3: Physiologische Reparaturvorgänge nach Ischämie-Reperfusionsschaden	11
Abbildung 4: Pathologische Reparaturvorgänge nach Ischämie-Reperfusionsschaden	15
Abbildung 5: Mechanismen der Akkumulation von Myofibroblasten in der Niere	17
Abbildung 6: Spezifität der Chemokinrezeptoren für Liganden und Leukozyten	19
Abbildung 7: Extravasation von Leukozyten am Beispiel der neutrophilen Granulozyten	21
Abbildung 8: Unterschiede der strukturellen und funktionellen Eigenschaften von ACKR2 und konventionellen Chemokinrezeptoren	27
Abbildung 9: Veränderungen des Aktinzytoskeletts beeinflussen die membranäre Expression von ACKR2 sowie dessen Fähigkeit Chemokine abzubauen	28
Abbildung 10: Störung der Antigen-Präsentation in ACKR2-defizienten Mäusen	33
Abbildung 11: Gating der renalen CD45+ Leukozyten und CD3+ T-Lymphozyten	58
Abbildung 12: Gating der renalen Ly6G+ neutrophilen Granulozyten	58
Abbildung 13: Gating der renalen CD11c+ dendritischen Zellen und F4/80+ Makrophagen	59
Abbildung 14: Gating der CD45+ CD11b+ Ly6C ^{high} inflammatorischen mononukleären Phagozyten	60
Abbildung 15: Gating der CD45+ CD11b+ Collagen1+ Fibrozyten	61
Abbildung 16: Bestimmung der Anzahl an <i>AccuCheck Counting Beads</i>	61
Abbildung 17: Expression von ACKR2-mRNA in der Niere der Maus	74
Abbildung 18: Lokalisation von Acker2-mRNA auf lymphatischen Endothelzellen des Tubulointerstitiums der Mausniere	75
Abbildung 19: Nierenfunktionsparameter 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	76
Abbildung 20: Tubulärer Schaden 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	77
Abbildung 21: Renale Schadensmarker und renale Chemokinkonzentrationen 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden	78
Abbildung 22: Renale Leukozyteninfiltration 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden	80
Abbildung 23: Immunhistologischer Nachweis von intrarenalen Leukozyten 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden	81
Abbildung 24: Tubulointerstitieller Schaden 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	83
Abbildung 25: Tubulärer Schadensmarker KIM-1 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	84

Abbildung 26: mRNA-Expression der tubulären Schadensmarker Kim-1, Ngal und Timp2 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	84
Abbildung 27: Renale Leukozyteninfiltration 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	86
Abbildung 28: Immunhistologischer Nachweis von intrarenalen Leukozyten 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	87
Abbildung 29: Renale Chemokinkonzentrationen 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	88
Abbildung 30: Renale mRNA-Expression von proinflammatorischen Chemokinen und Ackr2 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	89
Abbildung 31: Renale mRNA-Expression von M1- und M2-Makrophagen-Markern 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	90
Abbildung 32: Tubulointerstitieller Schaden 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	92
Abbildung 33: Tubulärer Schadensmarker KIM-1 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	93
Abbildung 34: mRNA-Expression der tubulären Schadensmarker Kim-1, Ngal und Timp2 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	94
Abbildung 35: Renale Leukozyteninfiltration 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	95
Abbildung 36: Immunhistologischer Nachweis von intrarenalen Leukozyten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	97
Abbildung 37: Renale Chemokinkonzentrationen 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	98
Abbildung 38: Renale mRNA-Expression von proinflammatorischen Chemokinen, M1-Makrophagen-Markern und Ackr2 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	100
Abbildung 39: Akkumulation von CD11b+Ly6C^{high} inflammatorischen mononukleären Phagozyten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	101
Abbildung 40: Renale mRNA-Expression von M2-Makrophagen-Markern 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	103
Abbildung 41: mRNA-Expression von profibrotischen Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen und 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	104
Abbildung 42: Expression von Fibroblasten-Markern 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	104
Abbildung 43: Histologischer Nachweis der interstitiellen Matrixdeposition und Akkumulation von Myofibroblasten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	105

Abbildung 44: mRNA-Expression von profibrotischen Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ..	106
Abbildung 45: Histologischer Nachweis der Akkumulation von Myofibroblasten 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden.....	107
Abbildung 46: Renale Akkumulation von Fibrozyten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	108
Abbildung 47: Chemokinkonzentration von CCL2 im Serum 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	109
Abbildung 48: Leukozytenzahlen in Blut, Milz und Knochenmark 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung nach KDIGO	1
Tabelle 2: Klinische Entwicklung von Pharmaka mit Chemokinen als Ziel	23
Tabelle 3: Klinische Entwicklung von Pharmaka mit Chemokinrezeptoren als Ziel	23
Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotid-Primer	46
Tabelle 5: Verwendete Tiere	48
Tabelle 6: Ablauf der operativen Tierversuche	49
Tabelle 7: Narkoselösung und Antagonisierung perioperativ	49
Tabelle 8: Narkoselösung für Organentnahme	51
Tabelle 9: Antikörperfärbungen für die Durchflusszytometrie	56
Tabelle 10: Definition der Leukozytensubpopulationen	57
Tabelle 11: cDNA-Synthese Mastermix	63
Tabelle 12: PCR Mix	65
Tabelle 13: Lightcycler Einstellung zur Durchführung der Real Time-PCR.....	65
Tabelle 14: Verwendete ELISA-Kits.....	67
Tabelle 15: Reagenzverdünnungslösung und Waschpuffer	68

Abkürzungsverzeichnis

ACKR2	Atypical chemokine receptor 2
APC	Antigen-präsentierende-Zelle
APES	3-Aminopropyltriethoxy-silan
BSA	Bovines Serum Albumin
BUN	<i>Blood Urea Nitrogen</i> – Blutharnstoff
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalitis
dsDNA	Doppelstrand-Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraaceticacid
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GF	Gesichtsfeld (am Mikroskop)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung
i.p	Intraperitoneale (Injektion)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden
LEC	Lymphatische Endothelzelle
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	Monocyte-chemoattractant-Protein 1

mRNA	Messenger-RNA
n.s.	Nicht signifikant
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT-PCR	Real-Time PCR
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor

Zusammenfassung

Nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden in der Niere erlaubt ein Rückgang der Entzündungsreaktion eine Regeneration und Heilung des Tubulusepithels. Wenn die Entzündungsreaktion aber persistiert oder gar voranschreitet, kommt es zu einem andauernden entzündlichen Schaden, der durch infiltrierende Leukozyten vermittelt wird. Hierdurch gehen Nephrone unter und es entsteht eine Fibrose des Nierengewebes, was typische Charakteristika einer chronischen Nierenerkrankung sind.

Der atypische Chemokinrezeptor 2 (ACKR2) ist in der Lage, entzündliche CCL Chemokine zu binden, zu internalisieren und schließlich abzubauen. Hierdurch ist ACKR2 in der Lage, lokale Chemokinkonzentrationen zu reduzieren und die Chemokin-vermittelte Akkumulation von Leukozyten zu vermindern.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass ACKR2 im Mausmodell nach Ischämie-Reperfusionsschaden die Leukozyteninfiltration, die Entzündung in der Niere und den fibrotischen Umbau des Nierengewebes vermindert und somit nach einer akuten Nierenschädigung das Voranschreiten zu einer chronischen Nierenerkrankung verhindert.

Nach Ischämie-Reperfusionsschaden zeigte sich eine ab Tag 1 bis Woche 5 anhaltend erhöhte renale mRNA-Expression von *Ackr2* im Tubulointerstitium. In *Ackr2*-defizienten Mäusen lag 1 und 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden ein ähnlicher Schaden des Tubulusepithels wie in Wildtyp-Tieren vor. Die Anzahl der mononukleären Phagozyten war jedoch in den postischämischen ACKR2-defizienten Nieren erhöht. Im chronischen Modell 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden war nicht nur der tubuläre Schaden in *Ackr2*-defizienten Nieren deutlich verstärkt, sondern auch die Anzahl renaler mononukleärer Phagozyten, T-Zellen und Ly6C^{high} inflammatorischer Makrophagen. Zudem zeigten sich in *Ackr2*-defizienten Nieren eine erhöhte mRNA-Expression von Entzündungsmarkern. Des Weiteren führte *Ackr2*-Defizienz zu einer verstärkten Ausbildung einer renalen Fibrose. So waren in den fibrotischen Nieren bei *Ackr2*-Defizienz eine vermehrte Expression von extrazellulären Matrixmolekülen, eine erhöhte Akkumulation von α -SMA-positiven Myofibroblasten und vermehrt aus dem Knochenmark stammende Fibrozyten nachweisbar.

Diese Daten zeigen, dass ACKR2 eine andauernde renale Entzündungsreaktion, den Verlust an Tubuli und den fibrotischen Umbau der Niere nach Ischämie-Reperfusionsschaden begrenzt. Dadurch kann ACKR2 das Voranschreiten einer akuten Nierenschädigung zu einer chronischen Nierenerkrankung verhindern.

Summary

Following renal ischemia-reperfusion injury (IRI), resolution of inflammation allows tubular regeneration, whereas ongoing inflammatory injury mediated by infiltrating leukocytes leads to nephron loss and renal fibrosis, typical hallmarks of chronic kidney disease.

The atypical chemokine receptor 2 (ACKR2) is a chemokine decoy receptor that binds and scavenges inflammatory CC chemokines and reduces local leukocyte accumulation. We hypothesized that ACKR2 limits leukocyte infiltration, inflammation, and fibrotic tissue remodeling after renal IRI, thus preventing progression to chronic kidney disease.

Following IRI renal mRNA expression of *Ackr2* was induced from day 1 until week 5 in the tubulointerstitial compartment. In *Ackr2*-deficient mice with early IRI 1 or 5 days after transient renal pedicle clamping, tubular injury was similar to wild-type, although accumulation of mononuclear phagocytes increased in postischemic *Ackr2*^{-/-} kidneys. Regarding long-term outcomes, *Ackr2*^{-/-} kidneys displayed more tubular injury 5 weeks after IRI, which was associated with persistently increased renal infiltrates of mononuclear phagocytes, T cells, Ly6C^{high} inflammatory macrophages, and inflammation. Moreover, *Ackr2* deficiency caused substantially aggravated renal fibrosis in *Ackr2*^{-/-} kidneys 5 weeks after IRI, shown by increased expression of matrix molecules, renal accumulation of α -smooth muscle actin-positive myofibroblasts, and bone marrow-derived fibrocytes.

These results demonstrate that ACKR2 is important in limiting persistent inflammation, tubular loss, and renal fibrosis after ischemic acute kidney injury and, thus, can prevent progression to chronic renal disease.

1 Einleitung

1.1 Die akute Nierenschädigung

Der Begriff *Akute Nierenschädigung* (*Acute Kidney Injury – AKI*) wurde 2007 erstmals von der Organisation *Acute Kidney Injury Network (AKIN)* definiert als eine plötzlich (innerhalb von 48 Stunden) auftretende Verschlechterung der Nierenfunktion, charakterisiert durch einen absoluten Anstieg des Kreatinins im Serum größer / gleich 0,3 mg/dl, einen prozentualen Anstieg des Kreatinins im Serum von größer / gleich 50% oder einer Reduktion des Urinausflusses (dokumentierte Oligurie von weniger als 0,5 ml/kg/h für mehr als 6 Stunden) (1).

Die *AKIN*-Klassifikation einer akuten Nierenschädigung modifizierte die 2002 definierten *RIFLE* Kriterien für ein akutes Nierenversagen und der Begriff *Akutes Nierenversagen* wurde ersetzt durch *Akute Nierenschädigung* (1, 2).

Diese beiden Definitionen, *AKIN* und *RIFLE* wurden schließlich 2012 von der Organisation *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* zusammengefasst (3). Die *KDIGO* Klassifikation zeigte sich hinsichtlich des diagnostischen und prädiktiven Wertes den *AKIN*-Kriterien als überlegen (4). Die Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der akuten Nierenschädigung nach KDIGO

KDIGO	Kreatinin-Erhöhung im Serum	Diurese-Kriterium
1	Kreatinin-Erhöhung $\geq 0,3$ mg/dl in 48h oder Kreatinin-Erhöhung von $1,5 \times$ Baseline in 7 Tagen	Diurese $< 0,5$ ml/kg/h für ≥ 6 h
2	Kreatinin-Erhöhung von $2 - 2,9 \times$ Baseline	Diurese $< 0,5$ ml/kg/h für ≥ 12 h
3	Kreatinin-Erhöhung von $3 \times$ Baseline oder Kreatinin $\geq 4,0$ mg/dl oder Start Dialyse	Diurese $< 0,3$ ml/kg/h für ≥ 24 h oder Anurie ≥ 12 h

Alle drei Klassifikationen basieren auf Erhöhungen des Serum Kreatinin-Wertes sowie auf einer Reduktion der Urinproduktion.

Die *AKIN* und *KDIGO* Klassifikationen lenken den Fokus jedoch mehr auf die frühe Phase der akuten Nierenschädigung als auf das spätere Nierenversagen mit Verlust der Nierenfunktion.

So wurden die zwei letzten Stadien der *RIFLE*-Kriterien *Loss* und *End-stage kidney disease* weggelassen und ein Baseline-Kreatinin-Wert ist in der *AKIN* und der *KDIGO* Klassifikation nicht mehr zwingend notwendig, um eine akute Nierenschädigung zu diagnostizieren. Dies erleichtert die Diagnosestellung und soll einen frühen Therapiebeginn ermöglichen (3).

Weltweit betrug im Zeitraum 2004-2012 die Inzidenz einer akuten Nierenschädigung während eines stationären Aufenthalts 21,6%, sowie die damit assoziierte Mortalität 23,9%. Die Mortalität korrelierte invers mit dem Durchschnittseinkommen der Bevölkerung sowie den Ausgaben für das Gesundheitssystem (5). Bei Intensivpatienten lag die Inzidenz einer akuten Nierenschädigung zwischen 2009 und 2010 bei 57,3% weltweit. 26,9% der Patienten mit einer akuten Nierenschädigung verstarben während des stationären Aufenthaltes. Ein höheres AKI-Stadium war dabei assoziiert mit einer höheren Mortalität. Eine Dialyse erhielten 23,5% der Patienten mit einer akuten Nierenschädigung (6).

Risikofaktoren für die Entwicklung einer akuten Nierenschädigung sind höheres Alter, Intensivaufenthalt, Sepsis, Herzinsuffizienz, chronische Nierenerkrankungen sowie eine Proteinurie (7-9). Des Weiteren spielen Nephrotoxine und insbesondere deren Kombinationen wie Kontrastmittel, Diuretika, ACE-Inhibitoren, NSAIDs sowie einige Antibiotika und Virustatika eine wichtige Rolle, da sie in vielen Fällen vermeidbar oder absetzbar sind (10).

Bis vor wenigen Jahren herrschte die allgemeine Lehrmeinung, dass sich die Nierenfunktion nach einer akuten Nierenschädigung weitgehend erholt, falls ein Patient die auslösende Grunderkrankung sowie die akute Nierenschädigung selbst überlebt.

In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass viele Patienten mit einer akuten Nierenschädigung nicht zu einer normalen Nierenfunktion oder der Ausgangsnierenfunktion zurückkehren, was die oben beschriebene Änderungen in den Klassifikationen für eine akute Nierenschädigung notwendig machte. So konnte gezeigt werden, dass abhängig vom Schweregrad einer akuten Nierenschädigung die Mortalität zwei Jahre nach Entlassung im Vergleich zu Patienten ohne akuter Nierenschädigung erhöht ist (11). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Patienten auf der Intensivstation mit einer dialysepflichtigen akuten Nierenschädigung bis zu fünf Jahre nach Intensivaufenthalt signifikant öfter eine terminale Niereninsuffizienz (*end-stage kidney disease*) entwickelten (12). Besonders eindrucksvoll ist die Tatsache, dass Intensivpatienten auch mit nur einer milden akuten Nierenschädigung (*AKI Stadium 1*) selbst zehn Jahre nach Intensivaufenthalt eine signifikant höhere Mortalität im Vergleich zu Intensivpatienten ohne AKI aufwiesen (13).

Diese Daten heben die zunehmende Bedeutung der akuten Nierenschädigung auch für die Langzeitprognose hervor. Sie belegen, dass selbst eine einmalige, passager-akute Nierenschädigung im chronischen Verlauf weitreichende Konsequenzen für den Patienten

hinsichtlich Mortalität, Morbidität und Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung hat. Aus diesem Grunde ist eine genauere Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge, welche den chronischen Verlauf nach akuter Nierenschädigung beeinflussen, relevant.

1.2 Pathophysiologie des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens

Der Ischämie-Reperfusionsschaden in der Niere (*Ischemia Reperfusion Injury – IRI*) ist eine häufige Ursache für eine akute Nierenschädigung (AKI) (14). Der Ischämie-Reperfusionsschaden resultiert aus einer generalisierten oder lokalen Verminderung des Sauerstoff- und Nährstofftransportes zu den Nierenzellen. Es entsteht ein Missverhältnis aus Sauerstoffangebot und –nachfrage, sowie eine Ansammlung von Abfallprodukten des Stoffwechsels (15). Folglich werden die Tubulusepithelzellen geschädigt und sterben durch Apoptose oder Nekrose ab, wenn die Schädigung stark genug ist. Dieser Vorgang wird als *akute Tubulusnekrose (ATN)* bezeichnet. Diese führt konsekutiv zu einer eingeschränkten Nierenfunktion und Störung des Wasser- und Elektrolythaushaltes mit einer verminderten Ausscheidung von Abfallprodukten des Stoffwechsels. Einen Überblick über mögliche Ursachen des Ischämie-Reperfusionsschaden gibt *Abbildung 1*.

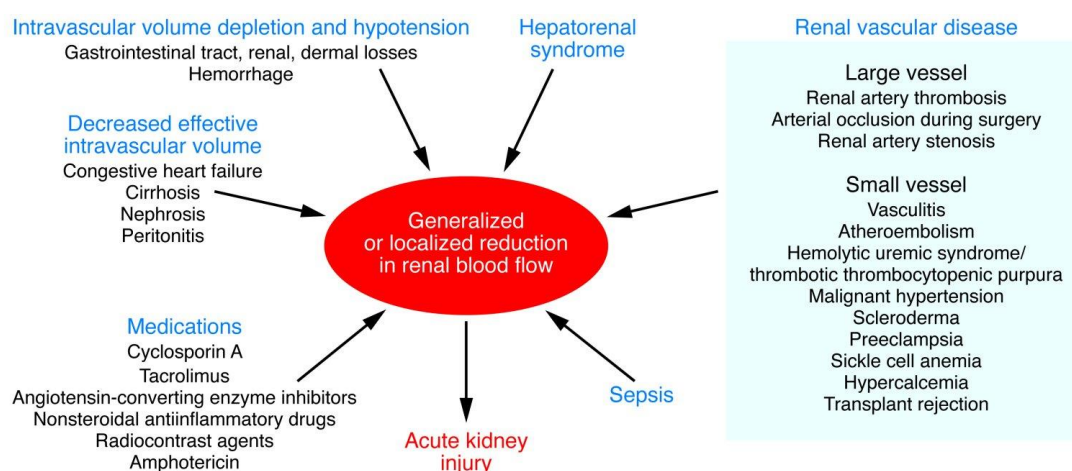


Abbildung 1: Ursachen einer regionalen oder generalisierten Verminderung des renalen Blutflusses

Sowohl Medikamente als auch verschiedene pathophysiologische Ursachen können zu einer Verminderung des renalen Blutflusses beitragen. Hierdurch entsteht durch eine lokalisierte oder regionale Ischämie der Nierenzellen eine akute Nierenschädigung. Diese Abbildung stellt einen Auszug der möglichen Ursachen für eine renale Ischämie dar und zeigt ebenso, dass sie eine häufige Folge von vielen die Niere betreffenden Krankheitsbildern bzw. -syndromen ist (16).

Im Anschluss an die Ischämiephase folgt die Reperusionsphase. Die rasche Rückkehr zur Normoxie führt dabei zu einem sprunghaften Anstieg von *Reactive Oxygen Species* (ROS) sowie zu erheblichen Reduktion von protektiven Antioxidantien. Durch die Reperfusion kommt es zur Infiltration von Leukozyten, welche zahlreiche Zytokine und Chemokine sezernieren.

Die Folge ist eine massive Entzündungsreaktion. Der oxidative Schaden durch ROS sowie die massive Entzündungsreaktion verursachen in der Folge eine anhaltende Schädigung der Nierenzellen mit der potentiellen Entwicklung einer chronischen Nierenschädigung (16).

1.2.1 Die Rolle der Endothelzellen während des Ischämie-Reperfusionsschadens

Das Endothel und die glatten Muskelzellen der Mikrozirkulation spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens. Obwohl die globale Nierendurchblutung während einer akuten Nierenschädigung meist reduziert ist, kann sie alleine nicht für den Rückgang der glomerulären Filtrationsrate verantwortlich gemacht werden (17). Wichtiger sind die regionalen Veränderungen der Nierendurchblutung, so ist die Durchblutung des äußeren Nierenmarks überproportional während des Ischämie-Reperfusionsschadens reduziert (18).

Endothelzellen beeinflussen den Tonus der Gefäßmuskulatur und die Leukozytenfunktion. So ist nach Verletzung des Endothels die Vasokonstriktion der kleinen Arteriolen ausgeprägter nach Stimulierung durch Endothelin-1, Angiotensin II, Thromboxan A₂, Prostaglandine, Leukotriene, Adenosin oder Aktivierung des Sympathikus (19, 20). Umgekehrt ist die Vasodilatation geringer nach Stimulierung durch Acetylcholin, Bradykinin oder Stickstoffmonoxid (NO). Verantwortlich hierfür ist unter anderem eine reduzierte Produktion von NO und weiteren vasodilatierenden Substanzen durch die geschädigten Endothelzellen (21, 22). Diese Effekte werden verstärkt durch vasoaktive Zytokine wie *Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)*, *Interleukin-1 β (IL-1 β)* und weitere Interleukine, welche als Folge der Leukozytenaktivierung durch die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen exprimiert werden (23). Durch die Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen wird zudem die Blutgerinnung aktiviert, was zu einem Verschluss vor allem der kleinen Blutgefäße führen kann.

Die verstärkte Vasokonstriktion verursacht zusammen mit dem Verschluss der kleinen Blutgefäße eine Störung der Mikrozirkulation mit regionaler Ischämie vor allem im äußeren Nierenmark. Der Grund für die Anfälligkeit des äußeren Nierenmarks für ischämische Ereignisse liegt darin, dass die im äußeren Nierenmark liegende Pars recta des proximalen Tubulus und die dicke aufsteigenden Schleife des distalen Tubulus bereits unter physiologischen Bedingungen hypoxisch sind (24). Dies wird hervorgerufen durch die Austauschvorgänge von Sauerstoff zwischen den ab- und aufsteigenden Teilen des Nephrons (siehe *Abbildung 2*), sowie dem hohen Sauerstoffbedarf der proximalen Tubuluszellen durch ihre hohe Stoffwechselaktivität im Rahmen von Rückresorptionsprozessen von Substanzen

aus dem Primärharn (25). Die Pars recta des proximalen Tubulus ist davon besonders betroffen, da diese Tubuluszellen nicht zur anaeroben Glykolyse fähig sind (26).

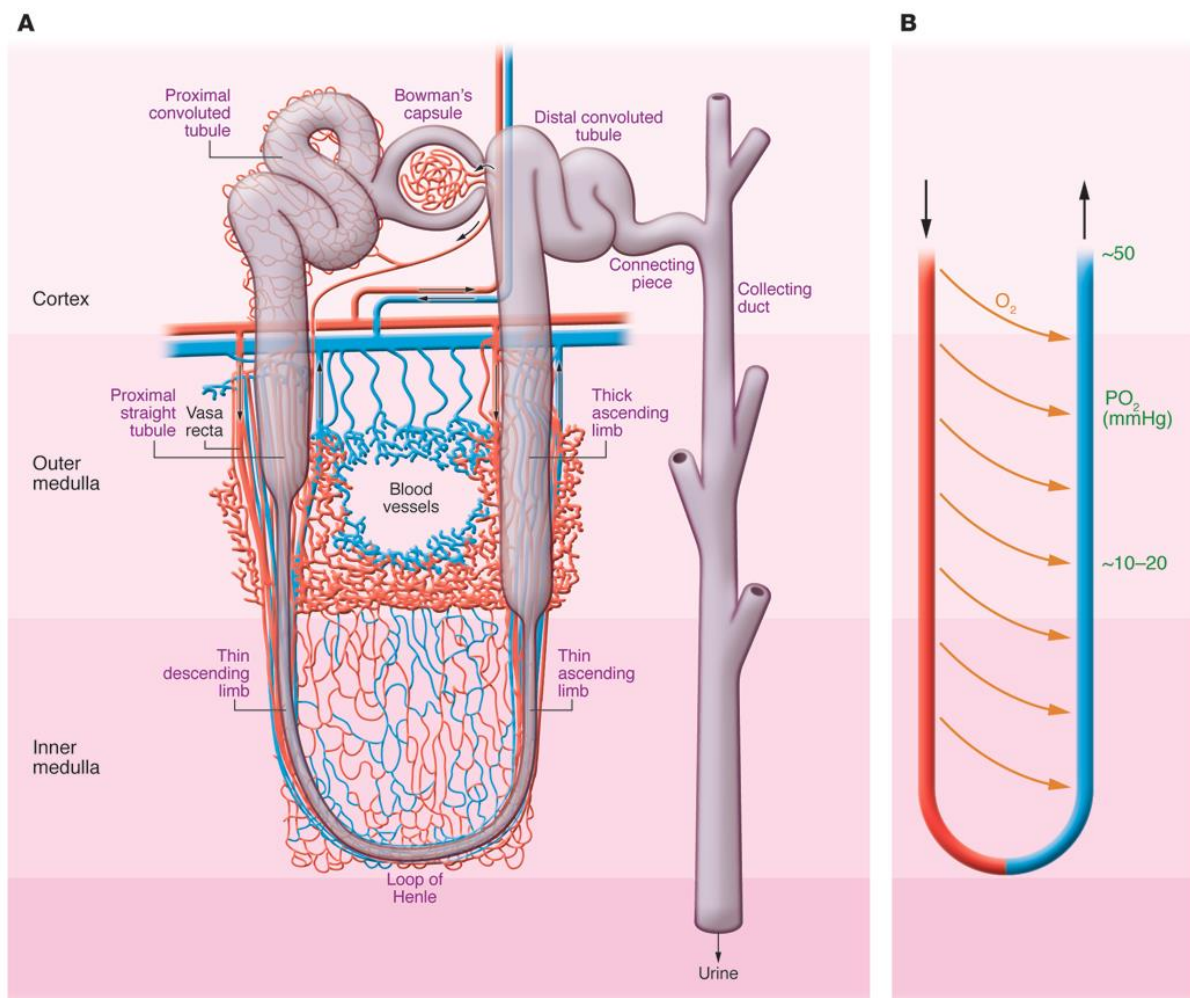


Abbildung 2: Normales Nephron, kortikomedullärer Sauerstoffpartialdruckgradient und Anatomie der Blutgefäße des äußeren Nierenmarks

A Anatomie und Regionen des Nephrons. Die Kapillaren des Blutgefäßsystems sind in Rot, das venöse System ist in Blau dargestellt. **B** Die vasa recta mit dem gegenläufigen Austausch von Sauerstoff, der einen Gradienten von abnehmendem Sauerstoffpartialdruck hervorruft. PO_2 , Partialdruck von Sauerstoff (16).

Im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens tritt während der Reperusionsphase eine verstärkte Interaktion von Leukozyten mit Endothelzellen auf. Hervorgerufen wird dies durch eine verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen wie *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) durch geschädigte Endothelzellen und einer verstärkten Expression von entsprechenden Rezeptoren auf Leukozyten (27). Die Folgen sind Aktivierung von Leukozyten, Obstruktion von Kapillaren und postkapillären Venolen, weitere Aktivierung und

Transmigration von Leukozyten, sowie Bildung von Zytokinen. Durch diese Mechanismen entsteht eine massive lokale Entzündungsreaktion (23).

Des Weiteren führt eine Schädigung des Endothels zu einem Verlust der Glyocalyx, einer Störung des Aktin-Zytoskelletts, einer Veränderung der endothelialen Zellkontakte sowie einem Zusammenbruch der perivaskulären Matrix. Folglich kommt es zu einer verstärkten Permeabilität der kleinen Gefäße mit Verlust von Flüssigkeit ins Interstitium, welche ein bestehendes Ödem weiter verstärkt (28, 29).

Die Anzahl der kleinen Gefäße im äußeren Nierenmark verringert sich durch Hemmung von angiogenen Faktoren wie *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* und der Aktivierung von Hemmern der Angiogenese (30). Die reduzierte Anzahl an Gefäßen ruft eine chronische Hypoxie hervor, welche möglicherweise zu weiterem tubulärem Schaden und zu einer Fibrose des Tubulointerstitiums führt. Es kommt zu einem Circulus vitiosus, weil die entstehende Fibrose die Mikrozirkulation weiter beeinträchtigt, das Sauerstoffangebot an die Tubulusepithelzellen weiter vermindert und damit die Schädigung der Tubulusepithelzellen verstärkt. Zusätzlich kann es zu einer Störung von Reparaturmechanismen des Tubulusepithels kommen, was wiederum zu einer verstärkten Fibrose führt. Der Blutfluss in den verbleibenden Gefäßen kann ebenfalls beeinträchtigt werden durch eine Schwellung der geschädigten Endothelzellen (28).

1.2.2 Entzündliche Prozesse während des Ischämie-Reperfusionsschadens

Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem beeinflussen wesentlich die Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens. Das angeborene Immunsystem ist für die frühe entzündliche Antwort nach Zellschädigung zuständig und besteht aus neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritischen Zellen, natürlichen Killer-Zellen sowie natürlichen Killer-T-Zellen. Nach wenigen Stunden trägt zusätzlich das adaptive Immunsystem, welches durch spezifische Antigene aktiviert wird, zum Entzündungsgeschehen bei und bleibt über mehrere Tage nach Schädigung aktiv. Die adaptive Immunantwort wird durch aktivierte, Antigen-präsentierende dendritische Zellen induziert, führt zu einer Stimulation und Proliferation von T-Lymphozyten und vermittelt Interaktionen zwischen B- und T-Lymphozyten sowie die Aktivierung von Makrophagen (16). Hierbei wird zwischen einer Th1- und einer Th2-Immunantwort unterschieden.

Bei der Th1-Immunantwort oder auch zelluläre Immunantwort führt die Präsentation von Antigenen durch dendritische Zellen an naive CD4⁺ T-Lymphozyten (Th0) zu einer Differenzierung zu CD4⁺ T-Lymphozyten vom Th1-Phänotyp. Diese sezernieren IL-2 und

Interferon- γ (*IFN- γ*) und aktivieren hierdurch Makrophagen. Die Th2-Immunantwort oder auch humorale Immunantwort ist definiert durch die Differenzierung von CD4⁺ T-Lymphozyten Th0 zu CD4⁺ T-Lymphozyten vom Th2-Phänotyp nach Präsentation des Antigens durch dendritische Zellen. Die CD4⁺ T-Lymphozyten vom Th2-Phänotyp sezernieren IL-4 und *Transforming growth factor β* (*TGF- β*). IL-4 führt zu einer Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen, welche daraufhin Immunglobuline sezernieren. Die durch eine Th1-Immunantwort sezernierten Zytokine IL-2 und IFN- γ hemmen eine Th2-Immunantwort und die durch eine Th2-Immunantwort sezernierten Zytokine IL-4 und TGF- β hemmen wiederum die Th1-Immunantwort (31-33).

Makrophagen sind mononukleäre Zellen, die sich aus im Blut zirkulierende Monozyten differenzieren. Hierbei werden Makrophagen vom M1- und vom M2-Phänotyp unterschieden. Der M1-Phänotyp entsteht unter inflammatorischen Bedingungen nach Stimulation durch Endotoxine wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α . M1-Makrophagen werden von CD4⁺ T-Lymphozyten vom Th1-Phänotyp aktiviert. M1-Makrophagen produzieren große Mengen an ROS und proinflammatorischen Zytokine wie IL-1 β und TNF- α . Hierdurch wirken Makrophagen vom M1-Phänotyp zytotoxisch und proinflammatorisch. Makrophagen vom M2-Phänotyp können sich aus Monozyten differenzieren, wenn sie IL-4, IL-10, IL-13, Immunkomplexen oder glucokortikoiden Hormonen ausgesetzt sind. M2-Makrophagen werden von CD4⁺ T-Lymphozyten vom Th2-Phänotyp aktiviert. M2-Makrophagen stellen eine heterogene Zellgruppe dar, von denen angenommen wird, dass sie überwiegend Reparaturmechanismen im Gewebe vermitteln. Durch die Phagozytose von Zelldebris und Sezernieren von Wachstumsfaktoren spielen sie eine wichtige Rolle in der Wundheilung. Makrophagen vom M2-Phänotyp sezernieren antiinflammatorische Zytokine und können hierdurch Entzündungen begrenzen (31-33).

Das Tubulusepithel wird nicht nur durch die entzündlichen Vorgänge in der Niere geschädigt, sondern trägt selber zu dem Ausmaß der intrarenalen Entzündung bei. Geschädigtes Tubulusepithel produziert eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-1, IL-6, IL-8 sowie eine Reihe von proinflammatorischen Chemokinen wie CCL2 und CCL5 (vgl. auch Kapitel 1.3). Weiterhin exprimieren Tubulusepithelzellen *Toll-like Rezeptoren* (*TLRs*), Komplement-Moleküle und –Rezeptoren, sowie weitere kostimulierende Moleküle, welche die Aktivität der T-Lymphozyten regulieren (23).

TLRs gehören zu den *Pattern Recognition-Rezeptoren*, die exogene mikrobielle Stoffe (sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns*, *PAMPs*) erkennen, sowie endogene Stoffe, die von körpereigenen Zellen nach Zellschädigung freigesetzt werden (sogenannte *Danger-associated molecular patterns*, *DAMPs*) (34, 35). Während des Ischämie-

Reperfusionsschadens werden vermehrt TLRs von Zellen des Tubulusepithels exprimiert. Die TLRs modulieren das Ausmaß der renalen Entzündung, indem sie die Tubulusepithelzellen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen veranlassen, welche die Infiltration von Leukozyten in die Niere vermitteln (36).

Zusätzlich zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine ist das Tubulusepithel in der Lage MHC II-Moleküle und kostimulierende Moleküle zu exprimieren (37). Dadurch können Tubuluszellen Antigene den T-Lymphozyten präsentieren. Die Folge ist eine weitere proinflammatorische Antwort unter Beteiligung des adaptiven Immunsystems (38).

Neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen und T-Lymphozyten sind wichtige leukozytäre Effektorzellen während des Ischämie-Reperfusionsschadens. Neutrophile Granulozyten können an aktivierte Endothelzellen binden und infiltrieren die Niere bereits nach 30 Minuten während der Reperfusion (27). Sie infiltrieren vorrangig das äußere Nierenmark und produzieren vor Ort Proteasen, Myeloperoxidasen, *Reactive Oxygen Species* (ROS) und proinflammatorische Zytokine (39). Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Permeabilität der Blutgefäße, einer Störung der Integrität von Tubulusepithel- und Endothelzellen und letzten Endes zu einer Verschlimmerung des renalen Schadens (40). Die Produktion von IL-17 durch neutrophile Granulozyten reguliert die IFN- γ vermittelte Migration von weiteren neutrophilen Granulozyten in die Niere nach Ischämie-Reperfusionsschaden (31).

Im Blut der Maus existieren zwei Arten von Monozyten, die anhand der Expression ihrer Oberflächenmoleküle voneinander unterschieden werden können: CD11b⁺ CCR2^{low} GR-1⁻ Ly6C^{low} CX3CR^{high} Monozyten und CD11b⁺ CCR2^{high} GR-1^{int} Ly6C^{high} CX3CR^{low} Monozyten. Erstere infiltrieren zügig in unverletztes Gewebe nach Exfiltration aus dem Knochenmark und differenzieren sich in residente Makrophagen und dendritische Zellen. Im Gegensatz dazu infiltrieren letztere, CCR2⁺ Ly6C^{high} Monozyten, in entzündetes Nierengewebe und differenzieren sich in Makrophagen und dendritische Zellen. Die Migration der Monozyten und ihre Differenzierung in inflammatorische Makrophagen (M1-Phänotyp) oder dendritische Zellen hängt von den vorherrschenden pathologischen Bedingungen ab (41).

Die Infiltration der Makrophagen in die Nieren beginnt bereits nach einer Stunde und ist abhängig von den Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 (vgl. auch Kapitel 3.1).

In der Maus führte eine Deletion der Makrophagen durch Verabreichung von liposomalem Clodronat vor Initiierung des Ischämie-Reperfusionsschadens zu einer Verminderung der akuten Nierenschädigung. Ein Transfer von Makrophagen in dieselben Tiere führte wieder zu

einer ausgeprägten Nierenschädigung (42). Diese Befunde untermauern die Bedeutung der Makrophagen in der Pathophysiologie des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens.

Makrophagen sind zudem wichtig für die Regeneration und Wiederherstellung des Gewebes. Drei bis fünf Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden infiltrieren M2-Makrophagen das Nierengewebe und unterstützen Reparaturprozesse des Tubulusepithels (43).

Unter homöostatischen Bedingungen suchen dendritische Zellen und Makrophagen das Nierengewebe konstant nach Antigenen ab. Nach einer Schädigung des Tubulusepithels werden die dendritischen Zellen aktiviert, welche naive T-Lymphozyten stimulieren und proinflammatorische Zytokine produzieren. Dadurch werden die T-Lymphozyten aktiviert. Dendritische Zellen stellen somit das Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Im späteren Verlauf spielen dendritische Zellen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regeneration des Tubulusepithels (44).

T-Lymphozyten infiltrieren die Niere sowohl in der Frühphase als auch im späteren Verlauf nach Ischämie-Reperfusionsschaden. Wie schon für Makrophagen und dendritische Zellen beschrieben, können auch T-Lymphozyten den entzündlichen Zellschaden verschlimmern, aber auch eine Reparatur und Erholung des Tubulusepithels vermitteln (45).

1.2.3 Charakteristika des tubulären Schadens in der Niere

Das Tubulusepithel ist nach Ischämie-Reperfusionsschaden im Bereich des S3 Segments des proximalen Tubulus am stärksten geschädigt (46). Durch den Tubulusschaden treten Casts und Tubuluszellen im Urin auf. Casts (oder Zylinder) sind von der Basalmembran abgestoßene Epithelzellen, die sich zusammen mit Proteinen wie Tamm-Horsfall-Protein oder Fibronectin im Tubuluslumen formieren. Der Mechanismus der Verletzung und anschließender Reparatur des Tubulusepithels ist schematisch in *Abbildung 3* skizziert.

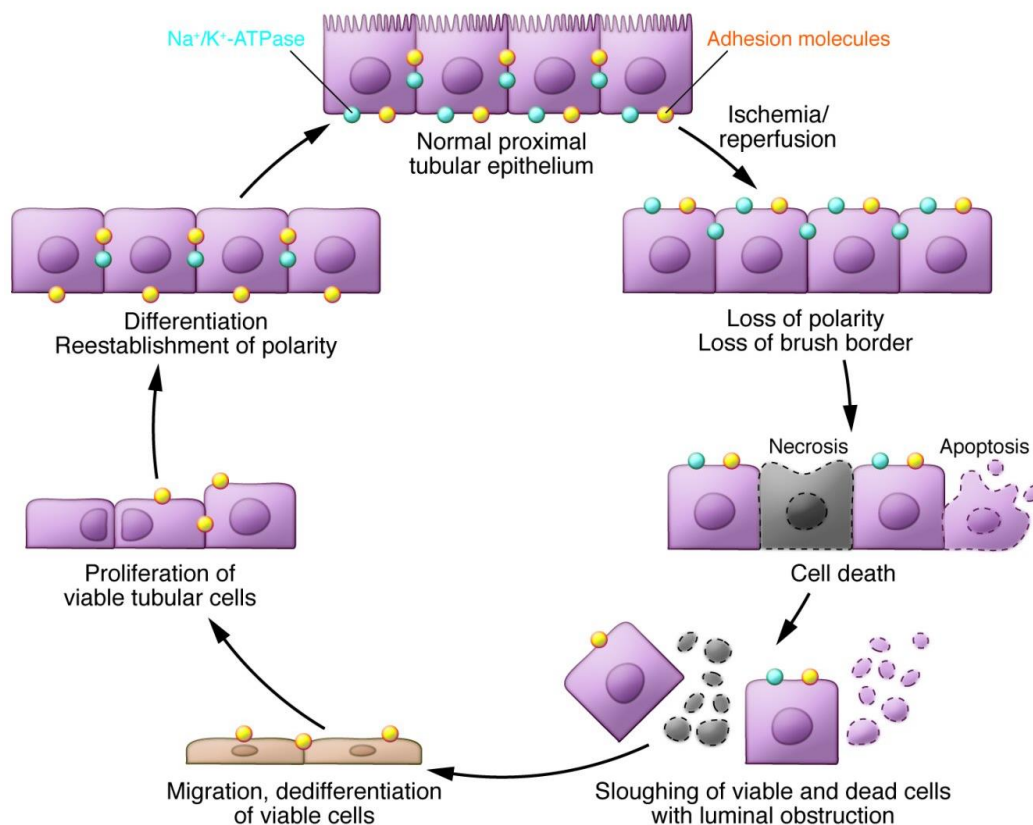


Abbildung 3: Physiologische Reparaturvorgänge nach Ischämie-Reperfusionsschaden

Nach Ischämie-Reperfusionsschaden verliert die Tubulusepithelzelle ihre Polarität, der Bürstensaum wird abgestoßen und Membranproteine delokalisieren auf der Zellmembran. Mit zunehmender Ischämiezeit und -intensität kommt es zum Zelltod durch Apoptose oder Nekrose. Ein Teil des Zelldebris gelangt ins Lumen des Tubulus. Nach Wiederherstellung der Perfusion migrieren in der Regenerationsphase lebende Epithelzellen und besetzen freigewordene Stellen auf der Basalmembran. Nach anschließender Proliferation und Differenzierung wird die physiologische Polarität der Tubulusepithelzelle wiederhergestellt (16).

Nach Ischämie kommt es zu einem raschen Verlust der Integrität des Zytoskeletts und der Zell-Polarität (47). Der Verlust der Zell-Polarität wird hervorgerufen durch ein Abstoßen des Bürstensaums vom proximalen Tubulusepithel und durch Delokalisation von Membranproteinen, wie zum Beispiel Na⁺K⁺-ATPase und β -Integrine, von der basolateralen auf die apikale Seite der Zellmembran (48-50). Durch Verlust des Bürstensaumes und der normalerweise auf der luminalen Seite exprimierten Na⁺K⁺-ATPase sinkt die Resorptionsleistung des proximalen Tubulusepithels. Dadurch wird weniger Na⁺ im proximalen Tubulus resorbiert und die Zellen der Macula Densa des distalen Tubulus werden einer erhöhten Na⁺-Konzentration ausgesetzt. Durch die darauffolgende Aktivierung des tubuloglomerulären Feedback-Mechanismus kommt es zu einer Vasokonstriktion des glomerulären Vas afferens mit konsekutiv verschlechterter Durchblutung des Glomerulus und

dadurch verminderter glomerulärer Filtrationsrate mit entsprechender Verschlechterung der Nierenfunktion (51-53).

Des Weiteren kommt es zu einer Zytokin-induzierten Unterbrechung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (23, 54). Zusätzlich kommt es zu Veränderungen der Lokalisation des Aktin-Zytoskeletts von der apikalen zur lateralen Seite der Zellmembran (55). Dies führt zu einer weiteren Destabilisierung des Tubulusepithels, da durch das Aktin-Zytoskelett Zell-Zell-Kontakte wie *tight junctions* reguliert werden (56).

Nach starker Schädigung des Tubulusepithels werden sowohl lebende als auch durch Nekrose oder Apoptose abgestorbene Epithelzellen von der Basalmembran abgetrennt. Die Basalmembran ist danach die einzige Barriere zwischen dem Filtrat und dem peritubulären Interstitium. Durch den konsequenten Anstieg der Permeabilität kommt es zu einem Übertritt des glomerulären Filtrats vom Tubuluslumen in das Interstitium mit nachfolgendem Ödem. Die von der Basalmembran abgestoßenen Epithelzellen bilden zusammen mit Proteinen wie Tamm-Horsfall-Protein oder Fibronectin im Tubuluslumen Zylinder, die das Tubuluslumen verstopfen können. Folglich kommt es zu einer Steigerung des intratubulären Drucks und somit verstärktem Übertritt des glomerulären Filtrats in das Interstitium mit einer verstärkten Ödembildung. Die Zylinder können im Urin durch Mikroskopie detektiert werden und weisen auf eine akute tubuläre Nierenschädigung hin (16, 57).

Die akute tubuläre Nierenschädigung führt zu einer vermehrten Expression von *Kidney Injury Molecule 1* (KIM-1) und *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin* (NGAL) im proximalen beziehungsweise distalen Tubulus (58, 59). Beide können mittels ELISA im Urin von sowohl Menschen als auch Tieren detektiert werden und stellen nützliche, nicht-invasive Biomarker des Tubulsschadens während einer akuten Nierenschädigung dar (60, 61). KIM-1 und NGAL sind derzeit jedoch nicht Bestandteil der Routinediagnostik bei Verdacht auf eine akute Nierenschädigung.

KIM-1 ist ein Phosphatidylserine-Rezeptor, der apoptotische Zellen erkennen kann und sie in Lysosomen von proximalen Tubulusepithelzellen transportiert. Außerdem ist KIM-1 an der Phagozytose von nekrotischen Zellen durch proximale Tubulusepithelzellen beteiligt. Durch die Befreiung des Nierengewebes von apoptotischen und nekrotischen Zellen spielt KIM-1 eine wichtige Rolle in der Begrenzung des entzündlichen Schadens nach einer akuten Nierenschädigung. Die Ektodomäne von KIM-1, die in das Tubuluslumen hineinragt, wird nach Schädigung des Tubulusepithels abgetrennt und kann folglich im Urin nachgewiesen werden. KIM-1 ist dadurch besonders für die frühe Diagnose einer akuten Nierenschädigung geeignet (62, 63).

NGAL wird von distalen Tubulusepithelzellen und vielen weiteren Organen produziert, im Glomerulus frei filtriert, und vom proximalen Tubulusepithel reabsorbiert. NGAL gehört zu den Eisen-transportierenden Proteinen, da es Komplexe mit Eisen-bindenden Siderophoren und Eisen bildet (64). Eisen selbst wird ein protektiver Effekt auf die proximalen Tubulusepithelzellen nach akuter Nierenschädigung zugeschrieben. So konnte in Mausmodellen nach Ischämie-Reperfusionsschaden gezeigt werden, dass Eisen in proximalen Tubuluszellen die Apoptose verhindert und stattdessen deren Proliferation vermittelt. Der zugrundeliegende Mechanismus ist wahrscheinlich eine durch Eisen-Bindung vermittelte Verhinderung der überschießenden Produktion von schädigenden Sauerstoff-Radikalen (65).

1.2.4 Reparaturmechanismen des Tubulusepithels

Im Gegensatz zum Herz oder Gehirn ist die Niere prinzipiell in der Lage, sich nach einer ischämischen Schädigung zu erholen. Anders als früher gedacht, ist diese Regeneration jedoch in der Realität weitaus weniger zutreffend. Es wurde gezeigt, dass eine akute Nierenschädigung mit erhöhtem Risiko für die Progression zu einer chronischen Nierenerkrankung vor allem bei vorerkrankten Patienten einhergeht und mit einem schnelleren Eintritt eines kompletten Nierenversagens assoziiert ist (66).

Unter normalen Bedingungen teilen sich proximale Tubuluszellen langsam (67). Die Proliferation der Tubulusepithelzellen wiegt den geringen Verlust durch Zelltod oder Abstoßung der Zellen von der Basalmembran in den Urin in der Regel auf. Nach einer ischämischen Schädigung nimmt die Proliferation der proximalen Tubulusepithelzellen jedoch dramatisch zu, um den erhöhten Zellverlust durch Nekrose oder Apoptose zu kompensieren. Verantwortlich für die Proliferation der Tubulusepithelzellen sind in die Nieren infiltrierende Zellen aus dem Knochenmark, die parakrine Funktionen ausüben und möglicherweise die intrarenale Entzündung reduzieren (68, 69).

Der Mechanismus der Regeneration von Tubulusepithelzellen ist komplex. Interessanterweise dedifferenzieren die Tubuluszellen zuerst, migrieren anschließend entlang der Basalmembran zu Lücken des Tubulusepithels, und proliferieren erst danach. Anschließend differenzieren sich die Tubuluszellen wieder, und stellen somit die Integrität und damit die Funktion des Nephrons wieder her. Bis zu einem gewissen Grad ähneln die Prozesse der Regeneration der Niere jenen in der embryonalen Organogenese. Über die Faktoren, welche die Dedifferenzierung der Tubuluszellen vermitteln, ist bislang wenig bekannt (16).

Neuere experimentelle Daten zeigen, dass nach Ischämie-Reperfusionsschaden nur ein kleinerer Teil der tubulären Regeneration durch Proliferation pluripotenter tubulärer

Stammzellen erfolgt. Der Großteil erfolgt durch kompensatorische Hypertrophie nicht-geschädigter Tubuluszellen, die polyploid werden. Polyploide Zellen sind definiert als Zellen, welche mindestens zwei komplette Sets an Chromosomen haben. Polyploide Zellen weisen eine erhöhte funktionelle Kapazität auf und sind widerstandsfähiger in Stresssituationen. Nach Ischämie-Reperfusionsschaden konnte gezeigt werden, dass die Polyploidisierung von Tubuluszellen ein kompensatorischer Mechanismus ist, der zu einer verbesserten Nierenfunktion und einer erhöhten Überlebensrate durch die Vermeidung eines Nierenversagens führt. Andererseits führt dies jedoch auch zu einem seneszenten Zellphänotyp und zu einem gesteigerten fibrotischen Umbau nach Ischämie-Reperfusionsschaden. Zusammengefasst ist die Polyploidisierung nach Ischämie-Reperfusionsschaden in der Phase der akuten Nierenschädigung ein protektiver Faktor, kann aber auch den Übergang von der akuten Nierenschädigung in eine chronische Nierenerkrankung beschleunigen (70, 71).

1.2.5 Mechanismen der renalen Fibrose nach Ischämie-Reperfusionsschaden

Die Reparaturmechanismen des Tubulusepithels nach einer akuten Nierenschädigung werden häufig gestört. Dann kommt es zur Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung mit fibrotischem Umbau der Niere und wesentlichen klinischen und pathophysiologischen Konsequenzen (72). Faktoren, die nach Ischämie-Reperfusionsschaden zu einer unvollständigen Reparatur des Tubulusepithels mit nachfolgender Fibrose beitragen beinhalten vor allem eine im Tubulointerstitium persistierende Entzündung, die mit einer vermehrten Akkumulation von Myofibroblasten im Interstitium sowie einer überschießenden Ablagerung von extrazellulären Matrixmolekülen einhergeht (16).

Für die nach Ischämie entstehende Fibrose können verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht werden (siehe *Abbildung 4*). Besonders wichtig erscheinen hierbei die Entwicklung einer chronischen Hypoxie durch Rarefizierung der kleinen, peritubulären Blutgefäße, sowie das Persistieren der intrarenalen Entzündung durch beispielsweise chronische Aktivierung von Makrophagen (28, 73, 74).

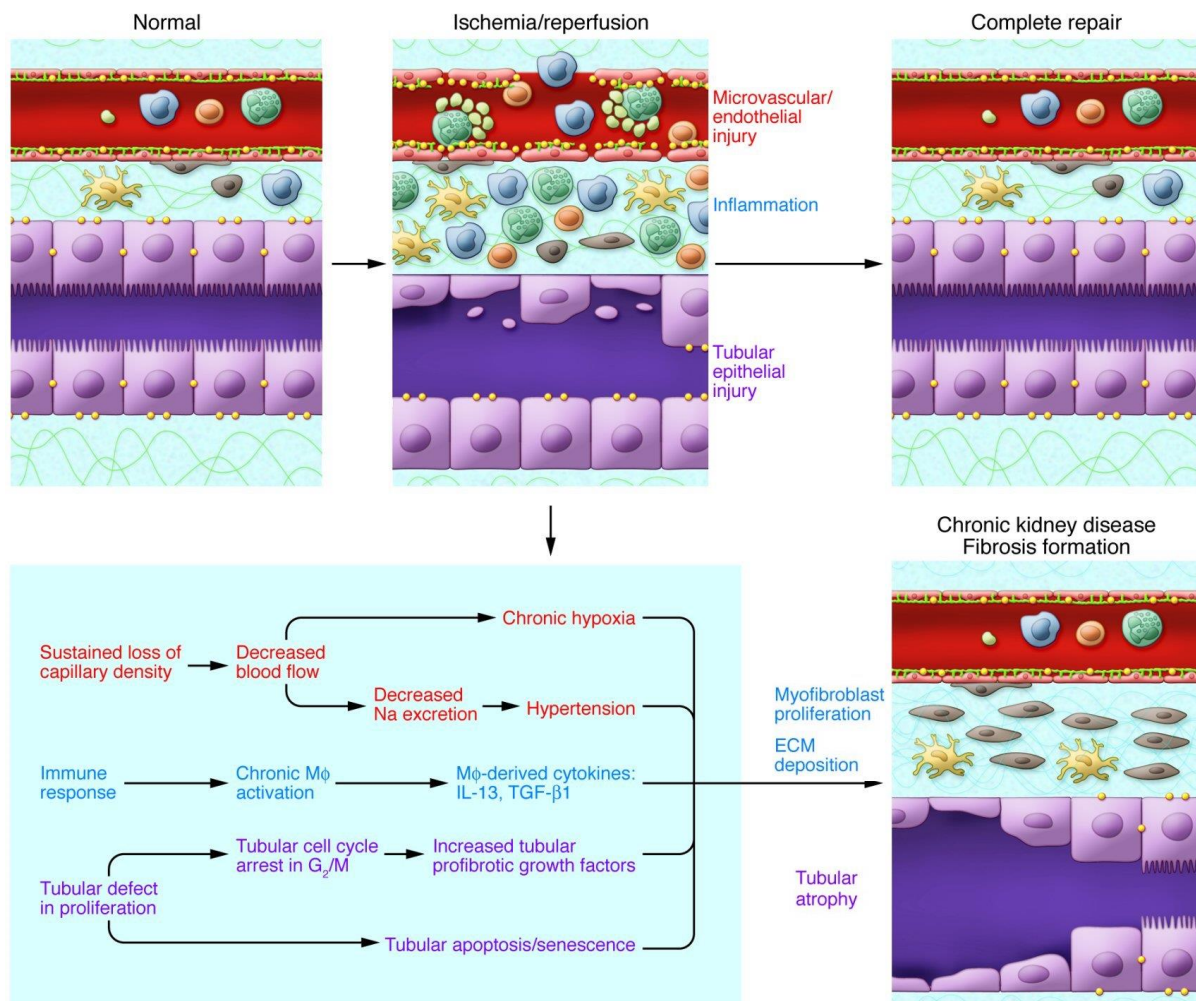


Abbildung 4: Pathologische Reparaturvorgänge nach Ischämie-Reperfusionsschaden

Reparaturvorgänge nach Ischämie-Reperfusionsschaden können in einer inkompletten Reparatur und in fibrotische Läsionen münden, welche zu einer progressiven Dysfunktion der Niere führen. Auslösende Faktoren sind unter anderem eine langanhaltende Hypoxie und Hypertension, welche durch einen chronischen Verlust der peritubulären Mikrozirkulation hervorgerufen werden. Eine anhaltende Produktion der profibrotischen Zytokine Interleukin (IL)-13, Arginase und Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 durch chronisch aktivierte Makrophagen (M ϕ) trägt zu der postischämischen Fibrose bei. Die Tubulusepithelzellen spielen in der Entwicklung der Fibrose ebenfalls eine tragende Rolle durch fundamentale Änderungen ihrer Proliferation-Prozesse, wie zum Beispiel der Arrest des Zellzyklus in der G₂/M-Phase. Hierdurch werden von den Tubulusepithelzellen vermehrt profibrotische Wachstumsfaktoren wie TGF- β 1 und CTGF sezerniert. Endstrecke der genannten Faktoren ist die Proliferation von Myofibroblasten, die Ablagerung von extrazellulärer Matrix (ECM) und eine Atrophie des Tubulusepithels als Ausdruck der stimulierten Fibrogenese. Hierdurch wird der Übergang in eine chronische Nierenschädigung beschleunigt (16).

Gemeinsamer Endpunkt aller Fibrose-auslösenden Mechanismen ist die Akkumulation von Myofibroblasten. Myofibroblasten sind kontraktile Zellen, welche α -Smooth Muscle Actin (α -SMA) und Myosinbündel exprimieren und exzessiv extrazelluläre Matrixmoleküle wie Kollagen, Laminin, Fibronectin und profibrotische Wachstumsfaktoren produzieren und ablagern. Sie spielen unter physiologischen Bedingungen eine entscheidende Rolle in der kontrollierten Wundheilung des Organismus, indem sie die Granulation und Kontraktion von Wunden und weitere Reparaturmechanismen vermitteln. Unter pathologischen Bedingungen akkumulieren Myofibroblasten jedoch übermäßig und es kommt zu einem Überschießen der eigentlich benefiziellen Reparaturmechanismen, was zu Fibrosierung und Verlust von Organparenchym und Funktion führen kann (75, 76).

Die vermehrte Akkumulation von Myofibroblasten in der Niere kann auf verschiedenen Wegen entstehen. Zum einen können in der Niere residente Fibroblasten nach entzündlicher Stimulierung zu Myofibroblasten differenzieren. Fibroblasten sind metabolisch aktiv und stützen unter physiologischen Bedingungen die extrazelluläre Matrix und damit Form und Funktion der Niere. Stimuli, die zur Differenzierung zu Myofibroblasten führen, sind Exposition gegenüber bestimmten Zytokinen wie IL-1, TNF- α , TGF- β 1, IL-13, Wachstumsfaktoren wie *Platelet-Derived Growth-Factor* (PDGF), sowie mechanische Einflüsse wie Hyaluron-Fragmente, mechanischer Stress (Druck im Gewebe) oder Steifheit des Organs. Zum anderen können aus dem Knochenmark stammende CD11b⁺ CD34⁺ Col1⁺ Fibrozyten aus dem Blut in die Niere infiltrieren und zu Myofibroblasten differenzieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Fibrozyten-Infiltration unter anderem von der Chemokin-Chemokinrezeptor-Achse CCL2-CCR2 abhängig ist. Schließlich könnten Myofibroblasten auch aus Vorläuferzellen von regenerierenden Tubulusepithel- und Endothelzellen im Rahmen einer *Epithelial-Mesenchymal Transition* (EMT) beziehungsweise *Endothelial-Mesenchymal Transition* (EndMT) entstehen (75, 76).

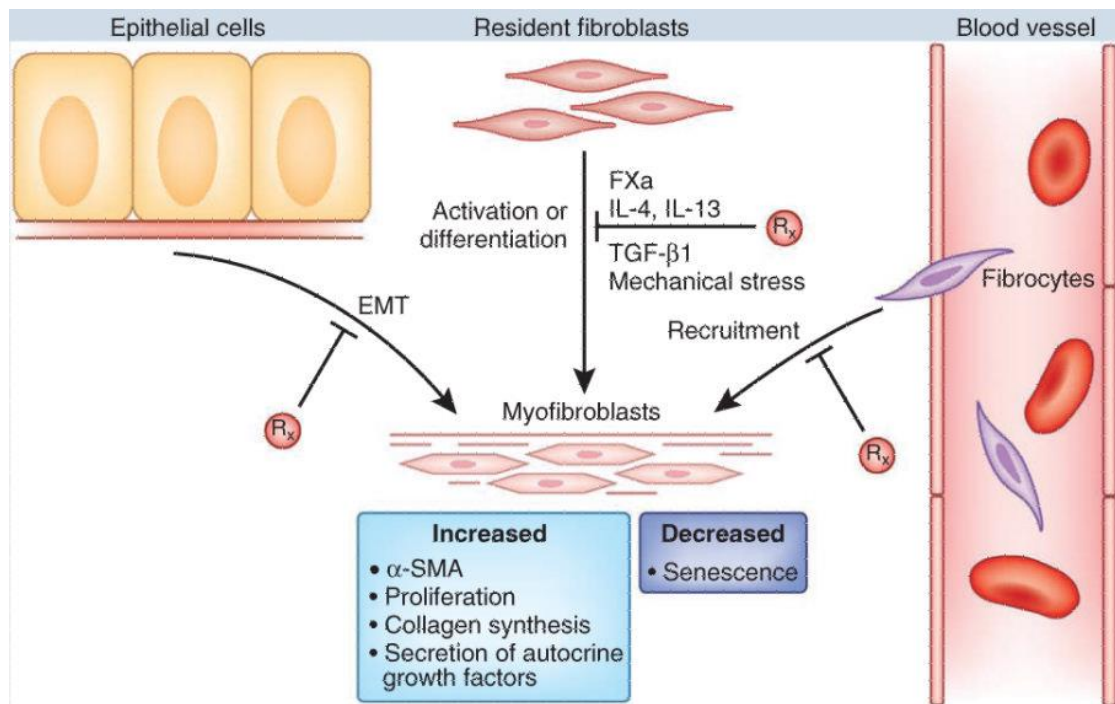


Abbildung 5: Mechanismen der Akkumulation von Myofibroblasten in der Niere

Von links nach rechts: 1. Entstehung von Myofibroblasten aus Vorläuferzellen von regenerierenden Tubulusepithelzellen durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT). 2. Aktivierung und Differenzierung von residenten Fibroblasten zu Myofibroblasten unter dem Einfluss von Interleukinen, Transforming Growth Factor (TGF)- β 1 und mechanischem Stress. 3. Infiltration und Differenzierung von aus dem Knochenmark stammenden, im Blut zirkulierenden Fibrozyten zu Myofibroblasten. Die Infiltration von Fibrozyten ist zudem abhängig von dem proinflammatorischen Chemokin CCL2. Myofibroblasten exprimieren α -Smooth Muscle Actin (SMA), proliferieren am Ort der entstehenden Fibrose und sezernieren profibrotische Wachstumsfaktoren sowie extrazelluläre Matrixmoleküle wie Kollagen. FXa, aktivierter Faktor X; IL-4, Interleukin-4; IL-13, Interleukin-13; Rx, Potentielle pharmakologische Angriffspunkte zur Reduktion der Fibrose (76).

1.3 Chemokine und ihre Rezeptoren

1.3.1 Eigenschaften von Chemokinen und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, welche die Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten unter physiologischen und pathologischen Bedingungen koordinieren. Seit ihrer ersten Beschreibung im Jahre 1977 wurden über 40 Chemokine und 20 Chemokinrezeptoren charakterisiert (77-79).

Chemokine bestehen aus einzelnen Polypeptiden mit einer Länge von 70-100 Aminosäuren. Aufgrund der Anzahl und Position der in der Polypeptidkette vorkommenden Cysteinreste können vier Subgruppen definiert werden. Bei der größten der Chemokin-Subgruppen, den *CC-Chemokinen*, liegen die ersten zwei von insgesamt vier der Cysteinreste direkt nebeneinander. Das Hauptziel dieser Subgruppe stellen die Monozyten dar. Bei den *CXC-Chemokinen* sind die ersten zwei von insgesamt vier Cysteinresten getrennt von einer einzelnen Aminosäure. Diese Subgruppe aktiviert hauptsächlich neutrophile Granulozyten und Lymphozyten. Die *C-Chemokine* stellen eine weitere, wesentlich kleinere Subgruppe dar. *C-Chemokine* besitzen insgesamt nur zwei Cysteinreste und sind selektiv wirksam auf T-Lymphozyten. Bei der Subgruppe der *CX3C-Chemokine*, die aktuell nur aus einem Chemokin besteht, werden die ersten zwei Cysteinreste durch drei Aminosäuren getrennt. *CC-Chemokine* werden angegeben als *CC-Liganden (CCL)*, gefolgt von einer fortlaufenden Nummer. Korrespondierend dazu werden *CXC-Chemokine* als *CXCL*, *C-Chemokine* als *XCL* und *CX3C-Chemokine* als *CX3CL* bezeichnet.

Chemokinrezeptoren können unterschiedliche Chemokine innerhalb einer Subgruppe binden. Ihr Name beinhaltet folglich die Chemokin-Subgruppe, mit der sie interagieren, gefolgt von einer fortlaufenden Nummer (*CCR1-10*, *CXCR1-6*, *XCXR1* und *CX3CR1*). Einen Überblick über die verschiedenen Chemokine und die Rezeptoren, an die sie binden, gibt *Abbildung 6*. Chemokinrezeptoren sind klassische membranständig exprimierte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit 7 transmembranären Domänen, die hauptsächlich auf Leukozyten aber auch auf anderen nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert werden. Nach Bindung eines Chemokines wird das G-Protein in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit gespalten. Die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivieren daraufhin Effektormoleküle, welche eine intrazelluläre Signalkaskade über *Second Messenger* in Gang setzen (77-80).

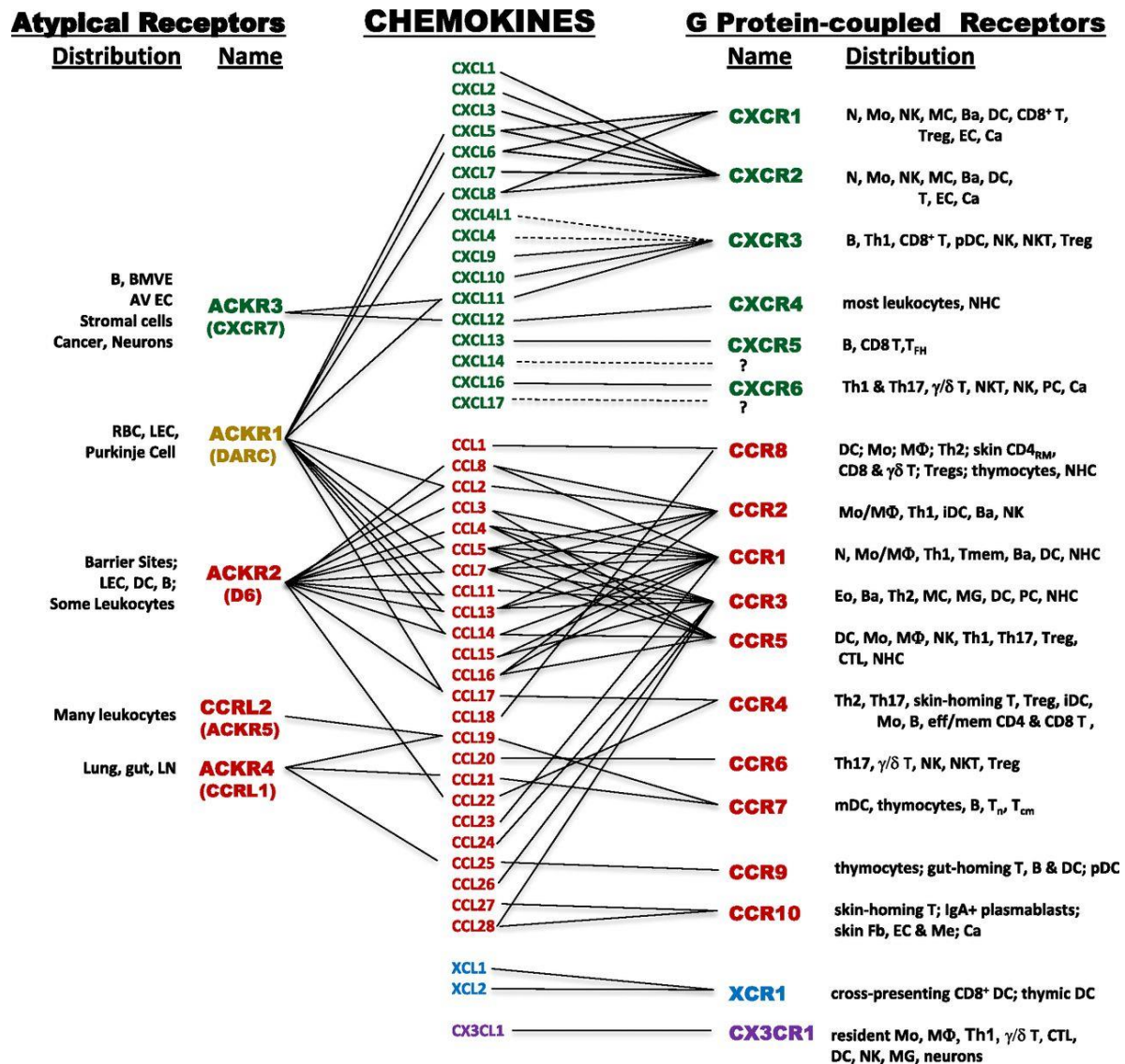


Abbildung 6: Spezifität der Chemokinrezeptoren für Liganden und Leukozyten

B, B-Lymphozyt; RBC, Erythrozyt; LEC, lymphatische Endothelzelle; DC, dendritische Zelle; LN, Lymphknoten; ACKR, atypischer Chemokinrezeptor; DARC, Duffy Antigen Rezeptor for Chemokines; CCL, Chemokin (C-C Motiv)-Ligand; CCR, Chemokin (C-C Motiv)-Rezeptor; CXCL, Chemokin (C-X-C Motiv)-Ligand; CXCR, Chemokin (C-X-C Motiv)-Rezeptor; XCL, Chemokin (X-C Motiv)-Ligand; XCR, Chemokin (X-C Motiv)-Rezeptor; CX3CL, Chemokin (C-X3-C Motiv)-Ligand; CX3CR, Chemokin (C-X3-C Motiv)-Rezeptor; Ba, basophil; Ca, Tumor; CD4_{RM}, residente CD4⁺ Gedächtnis-T-Zelle; EC, Endothelzelle; Eo, eosinophil; Fb, Fibroblast; iDC, unreife dendritische Zelle; MC, Mastzelle; Me, Melanozyt; MG, Mikrogliazelle; Mo, Monozyt; MΦ, Makrophage; N, neutrophiler Granulozyt; NHC, Nicht-hämatopoetische Stammzelle; NK, natürliche Killerzelle; NKT, natürliche Killer-T-Zelle; PC, Plasmazelle; pDC, plasmazytoide dendritische Zelle; T_{cm}, zentrale CD4⁺ Gedächtnis-T-Zelle; Th1, Typ 1 T-Helferzelle; T_n, naive T-Zelle; eff/mem, effector/memory; thym, Thymozyt (79).

Daraufhin werden einerseits durch *Inside-Out-Signalling* Integrine auf der Zelloberfläche aktiviert und andererseits eine Polarisierung des aus Actomyosin bestehenden Zytoskeletts

ausgelöst. Diese zellulären Veränderungen sind wesentlich für die Extravasation von Leukozyten vom Blut in periphere Gewebe sowie deren anschließende Migration. Der Mechanismus der Extravasation und Migration soll im Folgenden kurz skizziert werden: Zunächst binden die Leukozyten mit Zuckerketten an vom Gefäßendothel exprimierte Selektine. Diese Bindung ist jedoch reversibel und kann die Leukozyten nicht am Gefäßendothel verankern, wegen der durch die Fließgeschwindigkeit des Blutes verursachten Scherkräfte. Durch das ständige Neuverknüpfen und Lösen der schwachen Bindung fangen die Leukozyten an auf dem Gefäßendothel zu rollen. Durch Interaktion von auf Leukozyten konstitutiv exprimierten Integrinen mit vom Gefäßendothel exprimierten Adhäsionsmolekülen wird das Rollen gestoppt und die Extravasation von Leukozyten zwischen den Endothelzellen hindurch ermöglicht. Voraussetzung für diese Adhäsion ist eine durch Chemokine induzierte Konformationsänderung der Integrine, welche die hochaffine Bindung an endotheliale Adhäsionsmoleküle ermöglicht. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Chemokine an Proteoglykanen gebunden und damit gegen den Blutstrom immobilisiert sind. Einen Überblick über die Mechanismen, welche zur Extravasation der Leukozyten führt, gibt *Abbildung 7*. Die anschließende Migration im Interstitium der Gewebe wird durch Chemokingradienten vermittelt. Wenn die Chemokine in ungebundener, freilöslicher Form vorliegen, nennt man diesen Vorgang *Chemotaxis*, falls die Chemokine jedoch an extrazellulären Matrixmolekülen oder an Heparansulfatresten von Zellmembranen gebunden sind, spricht man von *Haptotaxis*. Die *Haptotaxis* kann sowohl abhängig als auch unabhängig von Adhäsionsmolekülen wie zum Beispiel Integrinen ablaufen. Chemokine veranlassen somit eine an ihrem Gradienten ausgerichtete Bewegung von Leukozyten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Die Bewegung der Leukozyten selber nennt man *Lokomotion* und läuft *amöboid* ab. Die zelluläre Grundlage der *Lokomotion* stellt die oben beschriebene Polarisierung des aus Actomyosin bestehenden Zytoskeletts dar, welche durch Chemokine ausgelöst wird und zu Formveränderungen der Zelle führt. Zusammengefasst können Leukozyten erst durch Chemokine fest an Endothelzellen binden, rasch ihre Zellform verändern und entlang von Chemokingradienten mithilfe unterschiedlicher Mechanismen wandern. Chemokine ermöglichen es den Leukozyten somit aus der Blutbahn ins Interstitium zu emmigrieren, sich rasch an verschiedene Mikroumgebungen anzupassen, sowie effektiv und mit hoher Geschwindigkeit zum Ort des Entzündungsfokuses vorzudringen (81-85).

In Abhängigkeit ihrer Funktion können homöostatische und inflammatorische Chemokine voneinander unterschieden werden. Homöostatische (bzw. konstitutive) Chemokine werden kontinuierlich exprimiert und vermitteln unter physiologischen Bedingungen die Zirkulation der Leukozyten zwischen den einzelnen Organen. Ein Beispiel hierfür ist das *leukozytäre Homing*. Hierunter versteht man die Infiltration von Leukozyten in die Lymphknoten, die Wanderung

der Leukozyten innerhalb der Lymphknoten, sowie die anschließende Exfiltration. Dieser Prozess wird vermittelt von den Chemokinen CCL19 und CCL21, die beide auf lymphatischen Endothelzellen des Lymphknotens exprimiert werden, sowie den an diese Chemokine bindenden Rezeptor CCR7, der von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Homöostatische Chemokine können auf diese Art und Weise die Organisation von sekundären lymphatischen Organen regulieren (86-88).

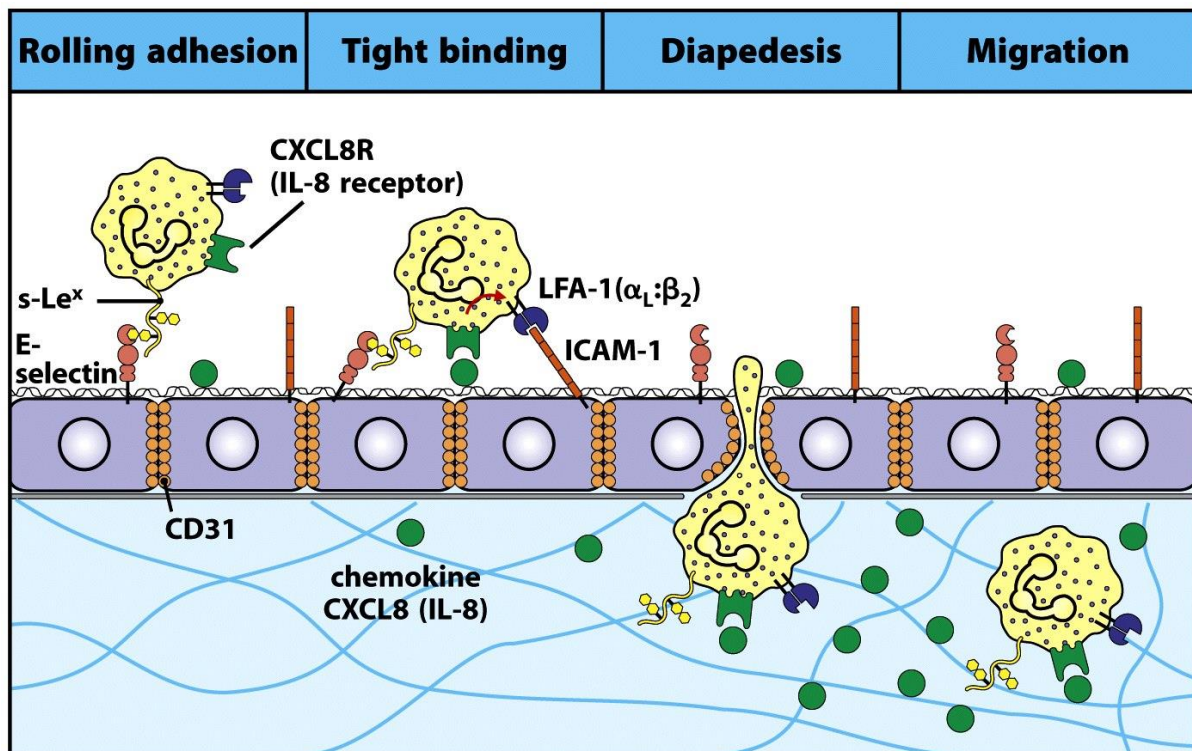


Figure 2-49 part 2 of 3 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 7: Extravasation von Leukozyten am Beispiel der neutrophilen Granulozyten

Als erstes erfolgt die reversible Bindung zwischen dem von Endothelzellen exprimiertem Selektin E-Selektin und dem von neutrophilen Granulozyten exprimiertem Liganden s-Le^x. Diese Bindung kann die Zellen gegen die Scherkräfte des Blutes nicht verankern und die neutrophilen Granulozyten rollen entlang des Endothels. Chemokine wie CXCL8 lösen die Aktivierung von Integrinen wie LFA-1 aus und inflammatorische Zytokine führen zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 auf dem Endothel. Die starke Bindung von ICAM-1 an die Integrine stoppt das Rollen der neutrophilen Granulozyten und vermittelt die Diapedese zwischen den Endothelzellen hindurch. Die Basalmembran der Endothelzellen wird mithilfe von matrix-Metalloproteasen penetriert. Schließlich wandern die neutrophilen Granulozyten entlang eines Konzentrations-Gradienten von Chemokinen zum Ort der Infektion (32).

Im Gegensatz dazu werden inflammatorische (bzw. induzierbare) Chemokine nur nach Gewebeschädigung sowie unter entzündlichen oder infektiösen Rahmenbedingungen exprimiert. Inflammatorische Chemokine vermitteln die Rekrutierung und Infiltration von

Leukozyten in entzündetes oder geschädigtes Gewebe. Sie werden von Gewebezellen und infiltrierenden Leukozyten als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus gebildet. Zu den inflammatorischen Mediatoren, die eine Chemokinproduktion stimulieren zählen die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, $\text{IFN}\gamma$, aber auch PAMPs und durch Gewebeschaden freigesetzte DAMPs (89-96).

Im Vergleich zu den hämoostatischen Chemokinen besteht bei den inflammatorischen Chemokinen und ihren Chemokinrezeptoren eine Funktionsredundanz. Das bedeutet, dass inflammatorische Chemokine einer Subgruppe an mehrere verschiedene inflammatorische Chemokinrezeptoren derselben Subgruppe binden können. Umgekehrt kann ein inflammatorischer Chemokinrezeptor verschiedene inflammatorische Chemokine derselben Subgruppe binden. Infolge dessen ist die Erforschung der genauen Funktion von einzelnen Chemokinen und Chemokinrezeptoren erschwert, da ein Knock-out von einzelnen Chemokinen oder Chemokinrezeptoren zu unvollständigen beziehungsweise sich überlappenden Phänotypen führt (87, 97).

1.3.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren als Ziele von medikamentösen Therapien bei entzündlichen Nierenerkrankungen

Wie im vorherigen Absatz beschrieben spielen Chemokine und ihre Rezeptoren eine wichtige Rolle als Modulator des Immunsystems. Auch in vielen entzündlichen Nierenerkrankungen korreliert die lokale, intrarenale Konzentration von Chemokinen mit dem lokalen Ausmaß der renalen Schädigung.

Folglich stellen Chemokine und Chemokinrezeptoren potentiell attraktive Ziele für eine anti-inflammatorische, medikamentöse Therapie bei entzündlichen Nierenerkrankungen dar. Solche medikamentöse Therapien könnten sich als effektiver und nebenwirkungsärmer als die bisherige immunsuppressive Standardtherapie erweisen. Die bisherige Standardtherapie bei entzündlichen Nierenerkrankungen besteht meist aus Glukokortikoiden und/oder Zytostatika. Beide Medikamentengruppen wirken unspezifisch auf den gesamten Organismus. Glukokortikoide wirken katabol, diabetogen und osteoporotisch; sie verursachen zudem Wundheilungsstörungen, Glaukom, Katarakt und Magenulcera. Außerdem begünstigen Glukokortikoide Infektionen, erhöhen den Blutdruck und können Psychosen verursachen. Zytostatika hingegen haben als unerwünschte Nebenwirkungen Knochenmarksuppression, Kardiomyopathie, Niereninsuffizienz, Lungenfibrose sowie Polyneuropathie. Zudem erhöhen sie das Risiko einer sekundären malignen Entartung (98-100).

Es wäre denkbar, dass durch eine Hemmung der durch Chemokine vermittelten Infiltration von Leukozyten in das Nierengewebe der lokale Schaden reduziert und somit der Verlauf bei entzündlichen Nierenerkrankungen verbessert werden könnte.

Zahlreiche klinische Studien mit Pharmaka, die Chemokine und Chemokinrezeptoren als Zielstrukturen aufweisen, wurden zurückliegend publiziert oder werden aktuell durchgeführt (siehe Tabelle 2 und 3). Nur wenige Studien untersuchten allerdings ihren Einsatz bei entzündlichen Nierenerkrankungen: *CCX140* (Antikörper gegen CCR2), *BMS-741672* (Antikörper gegen CCR2) sowie *NOX-E36* (Spiegelmer, das an CCL2 bindet), alle zur Therapie der diabetischen Nephropathie. Aktuell sind zwei Chemokinrezeptor-blockierende Pharmaka zugelassen: *Maraviroc*, ein CCR5-Antagonist zur Therapie der HIV-Erkrankung, und *Plerixafor*, ein CXCR4-Antagonist zur Mobilisierung von Stammzellen zur Transplantation bei Multiplem Myelom und Non-Hodgkin Lymphom (79, 101).

Tabelle 2: Klinische Entwicklung von Pharmaka mit Chemokinen als Ziel

Modifiziert nach (79)

Chemokin	Firma	Wirkstoff	Indikation	Klinische Phase	Status
CCL2	Millennium	ABN-912	RA	II	Kein Effekt
CCL2	Centocor	CNTO 888	Krebs	I	Laufend
CCL2	Noxxon	NOX-E36	Diabetische Nephropathie	II	Laufend
CXCL8	Abgenix	ABX-IL8	Psoriasis	II	Kein Effekt
CXCL8	Anogen	ABCream	Psoriasis	II	Zugelassen (China)
CXCL10	Medarex	MDX-1100	Collitis ulcerosa, RA	II	Laufend
CXCL12	Noxxon	NOX-A12	Multiples Myelom, CLL	II	Laufend

Tabelle 3: Klinische Entwicklung von Pharmaka mit Chemokinrezeptoren als Ziel

Modifiziert nach (79)

Rezeptor	Firma	Wirkstoff	Indikation	Klinische Phase	Status
CCR1	Schering AG	BX 471	MS, Psoriasis, Endometriose	II	Kein Effekt
CCR1	Millenium	MLN 3701	MS, Multiples Myelom	II	Nicht mehr gemeldet
CCR1	Millenium	MLN 3897	RA, Multiples Myelom	II	Kein Effekt
CCR1	Pfizer	CP-481,715	RA	II	Kein Effekt
CCR1	AstraZeneca	AZD4818	COPD	II	Kein Effekt
CCR1	ChemoCentryx/GSK	CCX354	RA	II	Laufend
CCR1	Merck	C-4462	RA	II	Kein Effekt
CCR1	Merck	C-6448	MS	II	Kein Effekt
CCR2	Millennium	MLN 1202a	RA, Atherosklerose, MS	II	Kein Effekt
CCR2	Incyte	INCB8696	MS, Lupus	I	Nicht mehr gemeldet
CCR2	Incyte	INCB3284	RA, Typ II Diabetes	II	Nicht mehr gemeldet

CCR2	ChemoCentryx	CCX915	MS	II	Beendet
CCR2	ChemoCentryx	CCX140	Diabetische nephropathie	II	Laufend
CCR2	Merck	MK-0812	RA, MS	II	Kein Effekt
CCR2	Pfizer	PF-4136309	Schmerzen	II	Nicht mehr gemeldet
CCR2	BMS	BMS-741672	Diabetische neuropathie	II	Laufend
CCR2	Johnson & Johnson	JNJ-17166864	Allergische rhinitis	II	Kein Effekt
CCR3	Pharmaxis	ASM8b	Asthma	II	Laufend
CCR3	GlaxoSmithKline	GSK766994	Asthma	II	Kein Effekt
CCR3	Dupont	DPC168	Asthma	I	Entwicklung gestoppt
CCR3	BMS	BMS-639623	Asthma	I	Laufend
CCR3	Novartis	QAP-642	Allergische rhinitis	I	Entwicklung gestoppt
CCR3	AstraZeneca	AZD3778	Allergische rhinitis	II	Nicht mehr gemeldet
CCR4	Amgen	KW-0761a	Onkologie	II	Laufend
CCR4	GSK	GSK2239633	Asthma	I	Laufend
CCR5	Pfizer	UK-427,857 (Maraviroc)	HIV-Erkrankung		Registriertes Medikament
CCR5	Schering-Plough	SCH-C	RA	II	Kein Effekt
CCR5	Schering-Plough	SCH-D	HIV-Erkrankung	II	Entwicklung gestoppt
CCR5	GlaxoSmithKline	GW2239633	HIV-Erkrankung	III	Entwicklung gestoppt
CCR5	Incyte	INCB9471	HIV-Erkrankung	II	Entwicklung gestoppt
CCR5	Progenics	Pro 140a	HIV-Erkrankung	II	Laufend
CCR5	Tobira	TAK652 (cenicoviroc)	HIV-Erkrankung	II	Laufend
CCR5	AstraZeneca	AZD5672	RA	II	Kein Effekt
CCR5	Novartis	NIBR-6465	HIV-Erkrankung	I	Laufend
CCR5	Sangamo	SB-728c	HIV-Erkrankung	II	Laufend
CCR5	HGS	HGS004a	HIV-Erkrankung	I	Laufend
CCR9	ChemoCentryx/GSK	CCX282/vercimon	Morbus Crohn	III	Beendet
CXCR1/2	Schering-Plough	SCH 527123	COPD	II	Laufend
CXCR1/2	Dompé	Reparixin	Pancreas-Insel-Transplantation	III	Laufend
CXCR2	GlaxoSmithKline	SB-656933	COPD, Zystische Fibrose	I	Laufend
CXCR2	GlaxoSmithKline	GSK-1325756B	COPD	I	Laufend
CXCR2	AstraZeneca	AZD-5069	Bronchiektasien	II	Laufend
CXCR3	Amgen	AMG487	Psoriasis	II	Kein Effekt
CXCR4	Genzyme/ Sanofi-Aventis	Plerixafor	Stammzellmobilisierung zur Transplantation (MM, Non-Hodgkins lymphoma)		Registriertes Medikament
CXCR4	TaiGen	Burixafor	Stammzelltransplantation	II	Laufend
CXCR4	Polyphor	POL6326	Stammzelltransplantation	II	Laufend
CXCR4	Medarex	MDX-1338a	Multiples Myelom	I	Laufend
CXCR4	Biokine	BKT140d	Stammzelltransplantation	I	Laufend

1.3.3 Die atypischen Chemokinrezeptoren

Die bisher vorgestellten Chemokinrezeptoren vermitteln alle ihre Wirkung durch Kopplung an G-Proteine mit nachfolgender Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Voraussetzung für die Kopplung von Chemokinrezeptoren an G-Proteine ist eine Aminosäuresequenz (DRYLAIV-Abfolge) innerhalb der zweiten intrazellulären Schleife des Rezeptors. Es gibt jedoch eine weitere Subgruppe von Chemokinrezeptoren, die nicht an G-Proteine binden und bei denen folglich die klassische intrazelluläre Aktivierung ausbleibt. Diese Rezeptoren werden *atypische Chemokinrezeptoren* (ACKR) genannt. Atypische Chemokinrezeptoren besitzen ebenfalls wie konventionelle Chemokinrezeptoren sieben transmembranäre Domänen. Die Ursache für ihr Unvermögen, an G-Proteine zu binden, liegt an einer Änderung der DRYLAIV-Aminosäuresequenz. Zudem werden atypische Chemokinrezeptoren vermehrt auf nicht-leukozytären Zellen exprimiert. Die Funktion der atypischen Chemokinrezeptoren liegt in der Beeinflussung lokaler Chemokinkonzentrationen und –gradienten (79, 102-105).

Im Folgenden wird ein Überblick über die wichtigsten atypischen Chemokinrezeptoren gegeben. Der Rezeptor *ACKR2*, der Gegenstand dieser Dissertation ist, wird ausführlich im nächsten Kapitel beschrieben.

ACKR1:

ACKR1, vormals *DARC (Duffy Antigen Receptor for Chemokines)* genannt, wird auf Erythrozyten, auf Endothelzellen der Blutgefäße sowie in den Sinusoiden der Milz und den hochendothelialen Venolen des Lymphknotens exprimiert. *ACKR1* bindet an die Chemokine CCL2, CCL5, CCL7, CCL11, CCL13, CCL14, CCL17, CXCL5, CXCL6, CXCL8 sowie CXCL11 (alleproinflammatorische Chemokine) und ist damit der einzige Chemokinrezeptor, der in größerem Ausmaß mit mehreren Chemokin-Subgruppen interagieren kann. *ACKR1* hat die Funktion eines Transzytose-Rezeptors auf den Endothelzellen der Blutgefäße. Gewebeseitig gebundene Chemokine können intrazellulär auf die luminale Seite der Endothelzelle transportiert und hier den Leukozyten präsentieren werden. *ACKR1* spielt somit eine wichtige Rolle in der Interaktion von Endothelzellen mit Leukozyten sowie der Infiltration von Leukozyten in Gewebe. Auf Erythrozyten exprimierter *ACKR1* spielt zudem eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Homöostase von Chemokinen (79, 106, 107).

ACKR3:

ACKR3, vormals *CXCR7* genannt, wird auf hämatopoetischen und mesenchymalen Zellen sowie in neuronalem Gewebe exprimiert und bindet an die Chemokine CXCL11 und CXCL12.

ACKR3 spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung sämtlicher Herzklappen sowie in der Pathogenese verschiedener Tumore (79, 108, 109).

ACKR4:

ACKR4, vormals CCRL1 genannt, wird in Herz-, Lungen- und Darmgewebe exprimiert und bindet an die Chemokine CCL19, CCL21 und CCL25. ACKR4 kann die an ihn bindenden Chemokine in das Zellinnere internalisieren und anschließend in Lysosomen degradieren. ACKR4 ist somit ein wichtiger Regulator für die lokale Bioverfügbarkeit homöostatischer Chemokine (79).

1.3.4 Der atypische Chemokinrezeptor ACKR2

Der atypische Chemokinrezeptor ACKR2 (vormals D6 oder CCBP2 genannt) wurde 1997 zeitgleich von den Arbeitsgruppen um Graham und Steiner entdeckt (110-112). ACKR2 bindet an fast alle inflammatorische CCL-Chemokine (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7, CCL8, CCL11, CCL12, CCL13, CCL14, CCL17, CCL22, CCL23, CCL24) und an CXCL10 (113, 114).

ACKR2 ist strukturell den konventionellen, G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren mit ihren sieben transmembranären Domänen sehr ähnlich (115). Jedoch fehlt auch ACKR2 die Fähigkeit, an G-Proteine zu koppeln. Die klassische intrazelluläre Signaltransduktion wie bei konventionellen Chemokinrezeptoren bleibt demnach aus. Die Ursache hierfür liegt an einer Änderung der sich in der zweiten intrazellulären Schleife befindlichen Aminosäuresequenz DRYLAIV zu DKYLEIV (116, 117). Aufgrund dieser strukturellen und funktionellen Eigenschaften wird ACKR2 zu den atypischen Chemokinrezeptoren gezählt (siehe

Abbildung 8) (79).

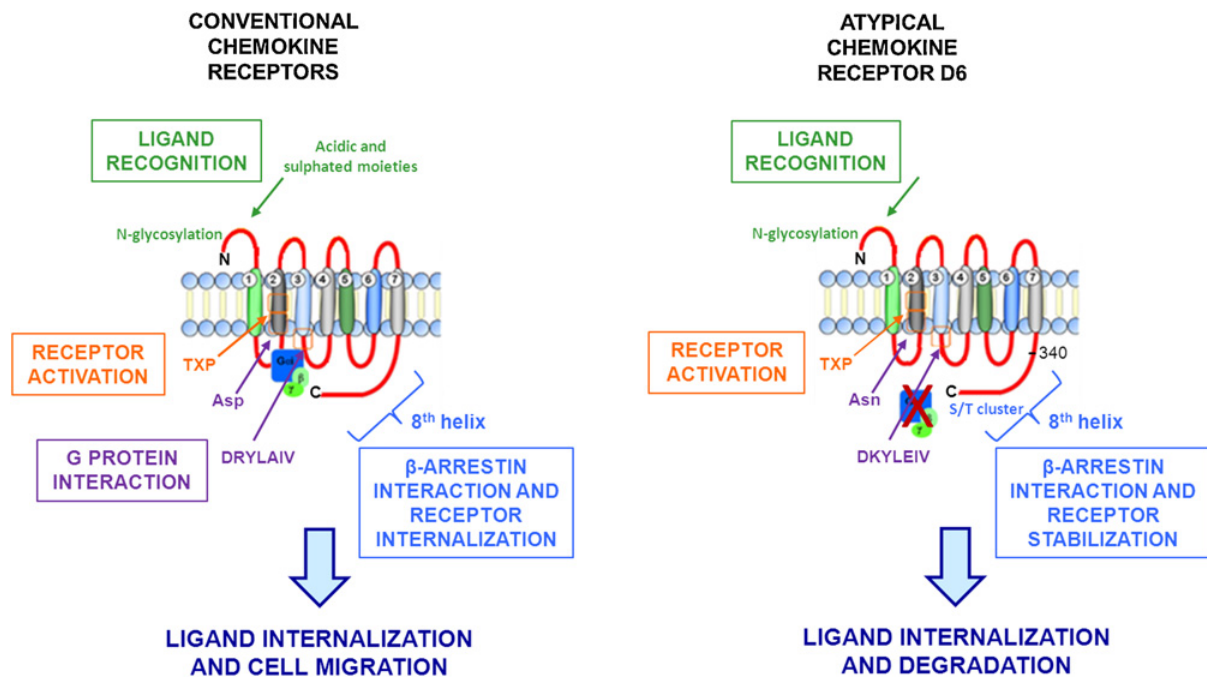


Abbildung 8: Unterschiede der strukturellen und funktionellen Eigenschaften von ACKR2 und konventionellen Chemokinrezeptoren

Die sieben transmembranären Domänen sind bei ACKR2 größtenteils konserviert; 30-35% der Aminosäuresequenz stimmen mit der von konventionellen Chemokinrezeptoren überein. Die N-terminale Domäne beider Rezeptoren weisen saure und sulfatierte Einheiten sowie eine N-Glykosylierung auf. Dies ist wichtig für die Erkennung der Liganden. Beide Rezeptorarten enthalten in ihrer zweiten transmembranären Domäne ein TxP-Motiv, welches relevant ist für die Rezeptor-Aktivierung. Die für die Aktivierung des G-Proteins wichtige Asparaginsäure (Asp) und DRYLAIV-Aminosäuresequenz in der dritten transmembranären Domäne fehlen bei ACKR2. Die C-terminale Domäne des konventionellen Chemokinrezeptor ist beteiligt an der Phosphorylierung, Internalisierung und Desensibilisierung des Rezeptors sowie Interaktion mit β -Arrestin. Die C-terminale Domäne von ACKR2 ist jedoch erforderlich, um die Degradierung des Rezeptors zu verhindern und um so ein Rezirkulieren des Rezeptors und einen raschen Abbau von Chemokin-Konzentrationen zu ermöglichen. D6, atypischer Chemokinrezeptor D6, neue Bezeichnung ACKR2; Asn, Asparagin (102).

Unter Ruhebedingungen befindet sich ein Großteil der ACKR2 Rezeptoren in intrazellulären Vesikeln und nur 3-5% der ACKR2-Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche exprimiert (118, 119). ACKR2 wird konstitutiv durch Clathrin-vermittelte Endozytose Dynamin-abhängig internalisiert und durch Rab5-positive Vesikel zu frühen Endosomen transportiert (119, 120). Die in den frühen Endosomen lokalisierten ACKR2-Rezeptoren werden anschließend entweder schnell durch Rab4-positive Vesikel oder langsam durch Rab11-positive Vesikel zur Zelloberfläche zurückgebracht (siehe Abbildung 9) (121).

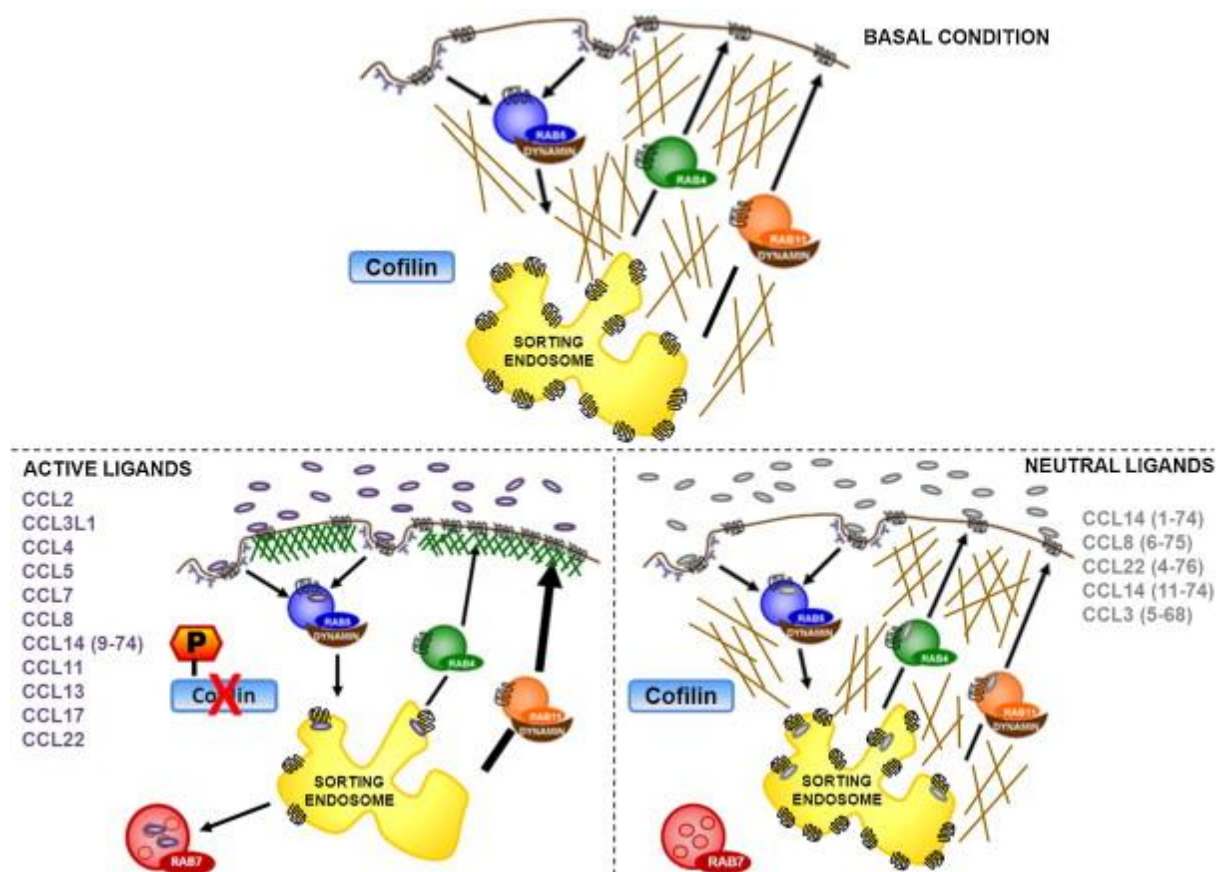


Abbildung 9: Veränderungen des Aktinzytoskeletts beeinflussen die membranäre Expression von ACKR2 sowie dessen Fähigkeit Chemokine abzubauen

Unter Ruhebedingungen wird ACKR2 Rab5- sowie Dynamin-abhängig internalisiert und rezirkuliert abhängig von Rab4/11 zurück an die Zelloberfläche. Aktiviertes Cofilin hält die Organisation des Aktinzytoskeletts durch Stressfasern (braun dargestellt) aufrecht. Hierdurch wird das konstante Internalisieren und Rezirkulieren von ACKR2 unterstützt. Die Stimulation von ACKR2 durch aktive Liganden (lila dargestellt) induziert die Phosphorylierung und somit Inaktivierung von Cofilin. Dadurch polymerisiert das Aktin an der Zelloberfläche zu kortikalem Aktin (grün dargestellt), welches die membranäre Expression von ACKR2 und dessen Effizienz in der Internalisierung sowie Degradation von Chemokinen stark erhöht. Die Stimulation von ACKR2 durch neutrale Liganden (grau dargestellt) ändert jedoch weder den Phosphorylierungsstatus noch die Organisation des Aktinzytoskeletts und hat somit keinen Einfluss auf die Verteilung des Rezeptors und seiner Fähigkeit Chemokine zu degradieren. CCL, Chemokin (C-C Motiv)-Ligand; RAB, Ras-related in brain (102).

Im Gegensatz zu den klassischen Chemokinrezeptoren führt eine Bindung inflammatorischer Chemokine durch ACKR2 zu einer vermehrten Expression von ACKR2 an der Zelloberfläche durch Mobilisierung des intrazellulären Pools von ACKR2-Rezeptoren. Dies wird vermittelt durch die Rab11-positive Vesikel im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus (121).

Nachdem die Chemokine an ACKR2 gebunden internalisiert wurden und sich in den Endosomen befinden, dissoziieren Chemokine und ACKR2 Rezeptoren voneinander. Die Chemokine werden über Rab7-positive Vesikel zu Lysosomen transportiert und anschließend degradiert. Die freien ACKR2-Rezeptoren rezirkulieren zurück zur Zelloberfläche (119, 122). Das konstitutive Rezirkulieren sowie die durch Chemokinbindung gesteigerte Oberflächenexpression sind die wesentlichen Mechanismen, die es ACKR2 erlauben Chemokingradienten rasch abzubauen (123). Diese Funktion von ACKR2 wird als *Chemokine Scavenging* bezeichnet.

ACKR2 wird hauptsächlich auf lymphatischem Endothel exprimiert (124). Daneben konnte eine Expression auf Synzytiotrophoblasten der Plazenta, dendritischen Zellen, innate-like B-Zellen, T-Zellen, Alveolarmakrophagen sowie auf Keratinozyten der Haut gezeigt werden (125-131). Auffällig ist, dass ACKR2 in hohem Ausmaß vor allem von Barrierengewebe wie Lunge, Darm, Haut und Plazenta exprimiert wird (110, 111).

Die *Ackr2*^{-/-} Mauslinie wurden in der Arbeitsgruppe von Professor Gerard Graham, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow generiert und in einen C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt (132). Unter homöostatischen Bedingungen weisen *Ackr2*-defiziente Mäuse eine erhöhte Anzahl an inflammatorischen, Ly6C^{high}-positiven Monozyten im Blut und in der Milz auf. Im Knochenmark zeigt sich eine geringe, aber signifikante Verminderung an inflammatorischen Monozyten. Diese Befunde deuten auf eine vermehrte Mobilisation inflammatorischer Monozyten aus dem Knochenmark in das Blut und in die Milz *Ackr2*-defizienter Tieren hin (133). Des Weiteren zeigen die inflammatorischen, Ly6C^{high}-positiven Monozyten von *Ackr2*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen weniger reifen Phänotyp, da die Expression von CD11b, CD115 und F4/80 in *Ackr2*-defizienten Tieren vermindert ist. Die Ursache hierfür liegt nicht in einem intrinsischen Defekt von leukozytär exprimiertem ACKR2, sondern in dem Fehlen von ACKR2 in nicht-hämatopoetischen Zellen (133). Außerdem weisen *Ackr2*-defiziente Mäuse eine erhöhte Konzentration von CCL-Chemokinen im Blut auf, vor allem von CCL2 und CCL11 (133, 134). Somit spielt ACKR2 eine Schlüsselrolle als Regulator von systemischen Chemokinkonzentrationen und in der Verteilung von Leukozyten unter homöostatischen Bedingungen.

1.4 Funktionelle Rolle von ACKR2 in Tiermodellen entzündlicher Erkrankungen

Ackr2-defiziente Mäuse entwickeln in vielen Tiermodellen eine überschießende Immunantwort, welche von erhöhten CCL-Chemokinkonzentrationen in lokalem Gewebe und in den Lymphknoten ausgelöst wird. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die Rolle von ACKR2 unter inflammatorischen Bedingungen in den bisher veröffentlichten Tiermodellen gegeben werden.

In der Haut entwickelten Ackr2-defiziente Tiere nach topischer Behandlung mit dem Phorbol-ester TPA Psoriasis-ähnliche Läsionen, welche mit einer gestörten Rekrutierung von T-Lymphozyten und Mastzellen, einer massiven Proliferation von Keratinozyten, sowie einer Neovaskularisation einhergingen (132). Nach subkutaner Injektion von komplettem Freud'schen Adjuvans (CFA) zeigten sich in Ackr2-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermehrt Granulom-ähnliche Läsionen mit Nekrosen und eine ausgeprägtere Neovaskularisation. Interessanterweise zeigten sich diese Unterschiede nur nach kürzeren Zeitpunkten (7 Tage), nicht aber nach längeren Zeitpunkten (21 Tage) (135). Zusammengefasst zeigte sich in beiden Tiermodellen eine ausgeprägtere Entzündungsreaktion und eine vermehrte lokale Chemokinkonzentration durch ineffiziente Kontrolle des Chemokin-Systems in der Abwesenheit von ACKR2.

ACKR2 ist in der Plazenta an der Schnittstelle zwischen Mutter und Fetus exprimiert (in extravillösen Trophoblasten und auf der apikalen Seite von Syncytiotrophoblasten). Ackr2-defiziente Tiere wurden daher in zwei Tiermodellen mit entzündungsinduziertem Verlust des Fetus untersucht. Im ersten Modell wurden trächtige Tiere mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelt, im zweiten Modell wurden in die trächtigen Mäuse Antiphospholipid-Autoantikörper injiziert. In beiden Tiermodellen hatten die Ackr2-defizienten Tiere eine erhöhte Rate an Aborten mit vermehrt proinflammatorischen CCL-Chemokinen und größeren Leukozyten-Infiltraten in der Plazenta (134). ACKR2 reguliert folglich die Verteilung und Bioverfügbarkeit von Chemokinen in der Decidua und hat somit einen Einfluss auf die Rate von entzündungsvermittelten Aborten.

In einem Modell mit CCl₄-induziertem akuten Leberversagen war in Ackr2-defizienten Mäusen das Ausmaß der Leberschädigung größer. Außerdem führte die Ackr2-Defizienz zu vermehrt intrahepatischen inflammatorischen Chemokinen sowie zu einer ausgeprägteren Infiltration von Leukozyten (vor allem T-Lymphozyten und Natürliche-Killer-Zellen) in die Leber (136).

Ein weiteres Tiermodell, indem Ackr2-defiziente Mäuse untersucht worden sind, ist das mit Ovalbumin (OVA) induzierte allergische Asthma. Hierbei zeigten sich im Lungengewebe von

Ackr2-defizienten Tieren nach Allergen-Exposition eine vermehrte Infiltration von eosinophilen Granulozyten, T-Lymphozyten und dendritischen Zellen. Nicht-exponierte Mäuse zeigten eine verringerte Reaktivität der Atemwege. Dies zeigte sich ebenfalls 1 Tag nach Gabe von Ovalbumin, während nach prolongierter, 7-tägiger Exposition mit Ovalbumin kein Unterschied zwischen den Genotypen bezüglich der Reaktivität der Atemwege bestand. In diesem 7-tägigen Verlauf führte die Ackr2-Defizienz zu einem Anstieg der Atemwegs-Reaktivität, welche in den Wildtyp-Tieren nicht beobachtet werden konnte. Möglicherweise führte die stärkere Entzündungsreaktion bei Ackr2-defizienten Mäusen somit zu einer Angleichung der Atemwegs-Reaktivität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bei vorbestehender geringerer Atemwegs-Reaktivität. Die Ursache der verringerten Atemwegs-Reaktivität in nicht-exponierten Mäusen bei Ackr-2-Defizienz blieb jedoch unklar (137). Des Weiteren zeigten Ackr2-defiziente Mäuse nach intranasaler Applikation von *Mycobacterium tuberculosis* eine überschießende lokale und systemische Entzündungsantwort, die zu einem raschen Versterben der Ackr2-defizienten Tiere führte. Hierbei zeigten sich größere Infiltrate von mononukleären Phagozyten in der Lunge sowie vermehrt proinflammatorischen CCL-Chemokinen im Serum sowie in der bronchoalveolären Lavage (BAL) (138).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ACKR2 in infarziertem Myokardgewebe der Maus vermehrt exprimiert wird. Die Ackr2-Defizienz korrelierte hierbei nach Induktion einer Myokardischämie mit einer vermehrten Infiltration von Granulozyten und inflammatorischen Monozyten, einer erhöhten Anfälligkeit für eine kardiale Ruptur sowie einem verstärkten kardialen Remodelling. Es zeigte sich ausgeprägterer kardialer Organschaden, mit größerem Infarktareal, einer niedrigeren Ejektionsfraktion sowie erhöhten enddiastolischen Füllungsvolumina bei Ackr2-defizienten Mäusen (139).

Die Datenlage bezüglich der Dextran sulfate sodium (DSS)-induzierten Colitis im Mausmodell ist widersprüchlich. DSS schädigt das Darmepithel chemisch und führt so zu einer sterilen Entzündung. Nach Beimischung von 3% DSS in das Trinkwasser der Tiere konnten Vetrano et al. zeigen, dass Ackr2-Defizienz zu einer vermehrten Aktivität der Colitis, einem erhöhten Gewichtsverlust der Tiere, sowie einer vermehrten Infiltration von Leukozyten und Chemokinen in die Darmmukosa führt (140). Bordon et al. zeigten jedoch im selben Tiermodell, dass Ackr2-Defizienz zu einer verminderten Aktivität der Colitis und zu einem weniger ausgeprägten Gewichtsverlust, jedoch ebenfalls zu einem vermehrten lokalen Chemokinkonzentration führt. Bordon et al. machten für diesen unerwarteten Phänotyp die vermehrte Sekretion von IL-17A durch $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in der Lamina propria des Kolons von Ackr2-defizienten Mäusen verantwortlich. Die Anzahl der $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in der Lamina propria des Kolons war bei Ackr2-Defizienz erhöht. IL-17A spielt eine entscheidende Rolle in der Abwehr bakterieller Infektionen. IL-17A induziert die Expression von Aktivatoren

neurophiler Granulozyten, antimikrobieller Peptide sowie Chemokin-Liganden des Chemokin-Rezeptors CXCR2. CXCR2 spielt wiederum eine wichtige Rolle in der Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Die Akkumulation an neutrophilen Granulozyten unterschied sich zwischen den Genotypen nicht. Die Autoren konnten jedoch eine erhöhte Anzahl an für CXCL2 kodierende mRNA nachweisen. CXCL2 ist ein Ligand von CXCR2. Somit schlussfolgerten die Autoren, dass die erhöhte Konzentration an IL-17A zu einer lokal verstärkten antimikrobiellen Aktivität durch vermehrte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten führen könnte (141). Zu beachten ist hierbei jedoch, dass *Bordon et al.* nur 2% DSS dem Trinkwasser beimengten und im Gegensatz zu *Vetrano et al.* keine Endoskopie zur Erhebung der Aktivität der Colitis verwendeten. Trotz der widersprüchlichen Daten konnten beide Gruppen zeigen, dass ACKR2 während der DSS-induzierten Colitis vermehrt im Kolon exprimiert wird.

Ackr2-defiziente Mäuse wurden somit bereits in einer Vielzahl von Krankheitsmodellen untersucht. In den meisten entzündlichen Tiermodellen zeigte ACKR2, wie oben beschrieben, einen protektiven Effekt auf die Krankheitsverläufe durch Abschwächung der Entzündungsantwort und der angeborenen Immunabwehr. Interessanterweise konnte in drei verschiedenen Tiermodellen jedoch auch gezeigt werden, dass ACKR2 die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort fördert.

So waren Ackr2-defiziente Mäuse vor der Entwicklung einer experimentellen Autoimmun-Enzephalitis, die durch subkutane Immunisierung mit oligodendroglialem Glykoprotein (MOG)-Peptid 35-55 in CFA induziert wurde teilweise geschützt. Dies war assoziiert mit einem reduzierten Priming der autoimmunen T-Lymphozyten durch geringere Interferon- γ -Produktion sowie einer Retention von CD11c-positiven dendritischen Zellen in der Haut. Im Rückenmark zeigte sich nachfolgend eine weniger ausgeprägte Entzündungsreaktion, weniger Demyelinisierung sowie eine Abschwächung der Autoimmun-Enzephalitis-Attacken in Ackr2-defizienten Mäusen (142). Lee et al. sehen dafür folgende Ursache (*Abbildung 10*): Ackr2-Defizienz führt in der Umgebung von lymphatischen Endothelzellen zu einem verringerten Abbau von proinflammatorischen CC-Chemokinen. Die lokal vermehrten proinflammatorischen Chemokine überladen die lymphatischen Endothelzellen. Entsprechend binden inflammatorische Leukozyten massenweise an die auf den lymphatischen Endothelzellen vermehrt präsentierten inflammatorischen Chemokine und verlegen damit die lymphatischen Gefäße und den Lymphabfluss. Zudem wird die effektive Präsentation der von Endothelzellen exprimierten homöostatischen Chemokine CCL19 und CCL21 an CCR7-exprimierende aktivierte dendritischen Zellen und ihre hierdurch gesteuerte Migration in regionales lymphatisches Gewebe verhindert. Hieraus resultiert insgesamt ein reduzierter Efflux aktivierter Antigen-präsentierender dendritischer Zellen in lokales

Lymphgewebe, was die dortige Aktivierung autoimmuner T-Lymphozyten abschwächt und eine geringere adaptive (Auto-) Immunantwort zur Folge hat (143).

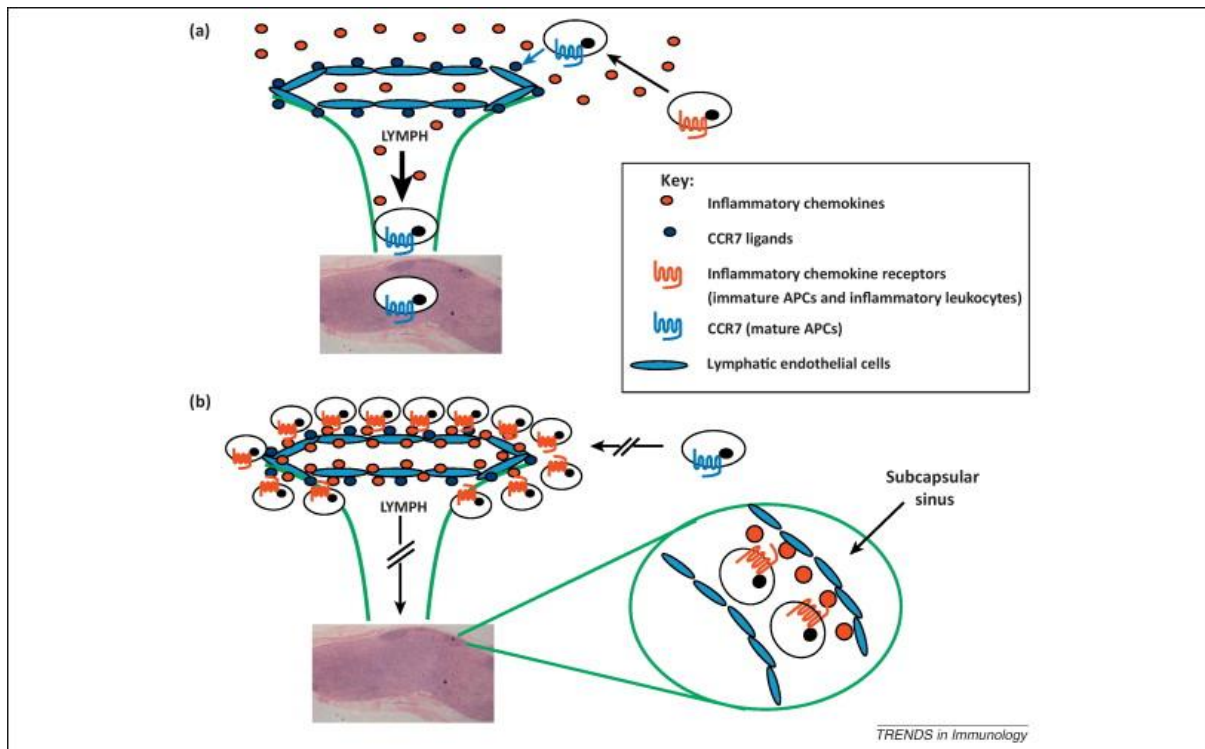


Abbildung 10: Störung der Antigen-Präsentation in ACKR2-defizienten Mäusen

(a) Im Rahmen der Heranreife von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) kommt es unter anderem zu einer deutlich vermehrten Expression des Chemokin Rezeptors CCR 7. Die Liganden von CCR7 sind auf lymphatischen Endothelzellen lokalisiert und werden dort den APCs präsentiert. Hierdurch wird die Emigration von den APCs aus entzündetem Gewebe in die Lymphknoten und eine dort stattfindende Präsentation von Antigenen zur Aktivierung von T-Lymphozyten sichergestellt. **(b)** Bei Ackr2-defizienten Mäusen ist der Prozess der Antigen-Präsentation gestört. Die lymphatischen Endothelzellen können keine inflammatorischen CC-Chemokine abbauen und werden dadurch von diesen Chemokinen überladen. Eine pathologisch vermehrte lokale Akkumulation von inflammatorischen Leukozyten ist die Folge. Gleichzeitig können die homöostatischen Chemokine CCL19 und CCL21 durch das lymphatische Endothel weniger effektiv präsentiert werden und eine CCR7-vermittelte Migration der APCs auslösen. Hierdurch wird insgesamt die Emigration von APCs aus entzündetem Gewebe in regionales Lymphgewebe gestört und die dortige Antigen-Präsentation verhindert. Im subkapsulären Sinus der Lymphknoten sind die inflammatorischen Chemokine auf der Oberfläche von lymphatischen Endothelzellen immobilisiert. Dies trägt zu einer Blockade des Lymph-Abflusses im subkapsulären Sinus bei (143).

In einem weiteren Modell waren Ackr2-defiziente Mäuse vor einer Graft-versus-Host-Reaktion nach Knochenmarktransplantation geschützt. Hierbei war bei Ackr2-defizienten Mäusen die Anzahl der Ly6C^{high}-positiven Monozyten im Blut und in den sekundären lymphatischen

Organen erhöht und im Knochenmark vermindert. Die Autoren konnten zeigen, dass die Akkumulation von Ly6C^{high}-positiven Monozyten in den sekundären lymphatischen Organen abhängig von dem Chemokinrezeptor CCR2 ist. Diese Ly6C^{high}-positiven Monozyten gelten allgemein als proinflammatorisch, da sie unter inflammatorischen Bedingungen große Mengen an TNF- α und IL-1 β sezernieren. Diese Monozyten gehören jedoch auch zu der heterogenen Population an aus dem Knochenmark stammenden Zellen mit immunregulatorischen Funktionen welche *myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs) genannt werden. Diese Subgruppe ist zudem positiv für CD11b und Gr1. Gr1-Antikörper binden sowohl an Ly6C (Monozyten) und Ly6G (neutrophile Granulozyten). MDSCs wird eine immunsuppressive Funktion zugeschrieben und können somit eine adaptive Immunabwehr abschwächen. Passend dazu konnten die Autoren zeigen, dass bei Akr2-Defizienz die Ly6C^{high}-positiven Monozyten eine vermehrte CCL2-abhängige Expression der immunsuppressiven Gene *Cyclooxygenase-2* (COX-2) und *Arginase 1* (Arg1) aufweisen. Zusammengefasst führt in dem Modell der Graft-versus-Host-Reaktion nach Knochenmarktransplantation die Akr2-Defizienz zu einer vermehrten Infiltration von unreifen, Ly6C^{high}-positiven Monozyten in sekundäre lymphatische Organe. Die Monozyten weisen unter diesen Bedingungen eine immunsuppressive Aktivität auf und schützen vor der Entwicklung einer Graft-versus-Host-Reaktion (133).

1.5 Funktionelle Rolle von ACKR2 bei renalen Erkrankungen

Die funktionelle Rolle von ACKR2 wurde bisher in wenigen Tiermodellen renaler Erkrankungen untersucht.

Ackr2-defiziente Mäuse zeigten im Modell der autologen nephrotoxischen Serumnephritis, dem Modell einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis, einen deutlich verschlechterten Verlauf (144). Albuminurie, Harnstoffkonzentration und histologischer Nierenschaden waren in den Ackr2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp erhöht. In Korrelation dazu waren vermehrt CD4⁺ T-Lymphozyten und mononukleäre Phagozyten im renalen Tubulointerstitium nachweisbar, nicht jedoch in den Glomeruli. Dies korrelierte mit einem erhöhten Gehalt inflammatorischer CC-Chemokine wie CCL2 und CCL5 in nephritischen Nieren Ackr2-defizienter Mäuse. Die Expression von weiteren inflammatorischen Mediatoren und das Ausmaß der interstitiellen Nierenfibrose waren ebenfalls erhöht. Auch *in vitro* führte eine Ackr2-Defizienz zur vermehrten Bildung von CCL2 in TNF-stimulierten tubulointerstitiellem Gewebe, nicht aber in den Glomeruli. Diese Ergebnisse weisen auf einen entzündungsbegrenzenden Effekt von ACKR2 im renalen Interstitium hin und korrelieren mit der bekannten ACKR2-Expression in lymphatischen Endothelzellen, die in der Niere im Tubulointerstitium, nicht jedoch in Glomeruli vorhanden sind. Tatsächlich konnten die Autoren im untersuchten Tiermodell die renale Ackr2-mRNA-Expression in lymphatischen Endothelzellen des Tubulointerstitiums lokalisieren (144). Neben der vermehrten renalen Entzündung und Schädigung führte Ackr2-Defizienz im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis auch zu einer reduzierten Aktivierung dendritischer Zellen und Verringerung aktivierter T-Lymphozyten in regionalen renalen Lymphknoten. Ähnlich wie in dem oben beschriebenen Modell der experimentellen Autoimmun-Enzephalitis konnte somit auch in diesem Modell eine abgeschwächte adaptive Immunantwort in Ackr2-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Dies konnte jedoch einen verstärkten renalen Schaden in Ackr2-defizienten Mäusen mit Immunkomplex-Glomerulonephritis nicht verhindern, da gleichzeitig die Konzentration proinflammatorischer Chemokine, die Anzahl proinflammatorischer Leukozyten und das Ausmaß der Fibrose im Tubulointerstitium nephritischer Nieren deutlich erhöht waren (144).

Auswirkungen einer Ackr2-Defizienz wurden auch im OVE26-Mausmodell der diabetischen Nephropathie untersucht. Die Glukose-Spiegel im Blut unterschieden sich zwischen Ackr2-defizienten und Wildtyp-OVE26-Mäusen nicht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen im Immunkomplex-Glomerulonephritis-Modell waren hier Albuminurie, renale, Leukozyten-infiltration und das Ausmaß der renalen Fibrose in Ackr2-defizienten Tieren vermindert (145).

Gründe für diese überraschenden proinflammatorischen Effekte von ACKR2 im untersuchten diabetischen Nephropathiemodell bleiben unklar, da die Autoren zugrundeliegenden Mechanismen nicht weiter untersucht haben. So wurden intrarenale Chemokinkonzentrationen oder die möglicherweise vermehrte renale Akkumulation entzündungshemmender Leukozytenpopulationen nicht analysiert (145).

1.6 Hypothese

Die Rolle von ACKR2 in der Pathophysiologie des lokalen und systemischen Entzündungsgeschehen wird seit 20 Jahren intensiv erforscht. Zahlreiche tierexperimentelle Arbeiten zeigten in unterschiedlichen Krankheitsmodellen einen protektiven Effekt von ACKR2 im Rahmen der Entzündungsreaktion *in vivo*. In einigen Modellen autoimmuner Erkrankungen, die auf eine effektive adaptive Immunantwort angewiesen sind, zeigten Acker2-defiziente Tiere jedoch einen milderen Verlauf.

Die Funktion von ACKR2 bei entzündlicher Nierenschädigung kann bisher nicht einheitlich beurteilt werden. Während Acker2-Defizienz zu einer Verschlechterung der Entzündungsreaktion und des Krankheitsverlaufs bei der nephrotoxischen Serumnephritis führte, zeigten Acker2-defiziente Tiere in einem Modell der diabetischen Nephropathie einen milderen Verlauf. Bisher existierten allerdings keine Untersuchungen zur Rolle von ACKR2 in weiteren klinisch relevanten renalen Krankheitsmodellen mit entzündlich-bedingter Schädigung wie dem renalen Ischämie-Reperfusionsschaden.

Die vorliegende Arbeit untersucht daher die Fragestellung, welche Rolle ACKR2 bei der Entstehung und im Verlauf des Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere *in vivo* spielt und welche Mechanismen den Effekten von ACKR2 im Rahmen der renalen Entzündung zugrundeliegen.

Der Arbeit liegt die Hypothese zu Grunde, dass in Mäusen mit fehlender ACKR2-Aktivität durch verminderten Abbau lokalgebildeter proinflammatorischer Chemokine

1. nach akutem Ischämie-Reperfusionsschaden eine Zunahme der renalen Leukozyteninfiltration und eine verstärkte funktionelle und strukturelle Nierenschädigung auftritt;
2. die chronische postischämische Nierenschädigung nach Ischämie-Reperfusionsschaden durch vermehrte Leukozyteninfiltration beschleunigt und verstärkt eintritt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der Acker2-Defizienz auf Nierenfunktion, Leukozyteninfiltration und renaler Gewebeschädigung nach Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere untersucht. Eine Hemmung der Funktion von ACKR2 war mangels verfügbarer ACKR2-Antagonisten nicht möglich, daher wurden die Versuche an Acker2-defizienten Knockout-Mäusen durchgeführt, welche uns freundlicherweise von Prof. Mantovani aus Mailand zur Verfügung gestellt worden sind.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Durchflusszytometrie:

FACSCalibur Becton Dickinson, San Jose, CA, USA

ELISA Reader:

Tecan, GENios Plus Tecan, Crailsheim

ELISA Washer:

Microplate-Washer Elx 50 Biotek, Bad Friedrichshall

Homogenisator:

Ultra Turra T25 basic IKA GmbH, Staufen

Mikroskope:

Leica DC 300F L Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DM RBE Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DM RBE Leica Microsystems, Wetzlar
Zeiss Axioplan 2 Carl-Zeiss AG, Oberkochen
Olympus BX50 Olympus Mikroskope, Hamburg

Real-time-PCR:

Lightcycler 480 Roche, Basel, CH

TaqMan Sequence Detection:

ABI prism 7700 sequence detector PE Biosystems, Weiterstadt

Spektrophotometrie:

Nanodrop 1000 Thermo, Wilmington, MA, USA

Zellinkubator:

Typ B5060 EC-CO2 Heraeus Sepatech, München

Zentrifugen:

Eppendorf centrifuge 5415C Eppendorf, Hamburg
Heraeus Megafuge 1.0 R Heraeus Sepatech, Osterode
Heraeus Minifuge T Heraeus Sepatech, Osterode

Autoklav:

Autoklav 23 Melag Medizintechnik, Berlin

Sonstige Geräte:

Kryostat RM2155	Leica Microsystems, Bernsheim
Kryostat CM3000	Leica Microsystems, Bernsheim
Mikrotom HM 340E	Microm, Heidelberg
MediMACS Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim
Steril Card Hood Class II, Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, USA
Sonifier B-12	Branson Sonic power, Danbury, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, CH
Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen
Waage Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Bernsheim

2.1.2 Tierhaltung und Versuchsdurchführung

Atipamezol	CP-Pharma, Burgdorf
Buprenorphin	Bayer Vital, Leverkusen
Dexpanthenol	Bayer Vital, Leverkusen
Fentanyl	Janssen-Cilag Neuss
Flumazenil	Hexal, Holzkirchen
Einmalskalpelle, Form 11	B.Braun, Melsungen
Makrolone Typ 2 Käfige	Tecniplast, Hamburg
Mersilene 4-0, Naht	Ethicon, Belgien
Midazolam	Ratiopharm, Ulm
Medetomedin	Zetis GmbH, Kaiserslautern
Naloxon	Ratiopharm, Ulm
Thermosonde Homeothermic Blancet Control Unit	Panlab Bioresearch, Barcelona, Spanien
Tierfutter	Ssniff Spezialdiäten, Soest
Wärmelampe Infrared R95 E 100W 230V	Philips Deutschland, Hamburg
Yasargil Aneurysma Clip mini, 5mm	Medicon, Tuttlingen
Yasargil Clip Applikator	Medicon, Tuttlingen

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

24-well-Platten	Nunc, Wiesbaden
6-well-Platten	Costar Corning, Schiphol-Rijk, NL
96-well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Einbettkassetten	neoLab Migge, Heidelberg
Einmal-Küvetten 1,5 ml Plastibrand®	Brand, Gießen
Eppendorfgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcons 15 ml und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Multikanalpipette Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Navel BD Microlance 20G; 26G; 30G	BD Biosciences, Heidelberg
Pipetten Pipetman P 1-20/200/1000µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen 1-1000µl Typ Gilson	Pese, Aindling-Arnhofen
Pipettenspitzen epTIPS Standard	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plastikfilter 70µm	BD Biosciences, Heidelberg
Skalpelle Feather No. 20	Feather Safety Razor Co, Japan
Zellkulturschalen 10cm	TPP, Transadingen, Schweiz
Zellkulturschaber 24cm	TPP, Transadingen, Schweiz

2.1.4 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
AccuCheck Counting Beads	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Albustix Teststreifen	Bayer, Leverkusen
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Antigen Unmasking Solution	Vector Lab, Burlingame, CA, USA
Avidin-Biotin Complex	Sigma, Deisenhofen
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten
Bouin Fixierlösung	Morphisto, Offenbach
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serum-Albumin	Roche, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Cytofix/Cytoperm Plus	BD Biosciences, Heidelberg
2,2,2-Tribromethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DAB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
DNase Typ III	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DPBS	Merck, Darmstadt
DTT (100 mM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
EDTA	Calbiochem, San Diego, CA, USA
EDTA-Dikalium 0,2 M	neoLab, Heidelberg
Einbettmedium	Jung, Leica Microsystems, Nussloch
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
First strand Buffer 5x	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hexanukleotide	Roche, Mannheim
HCl	Merck, Darmstadt
Hematoxin Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase A	Roche, Mannheim
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen
Lichtgrün 0,2 % (Goldner III)	Morphisto, Offenbach
Linear Acrylamid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Lysing-Solution (für FACS)	BD Biosciences, Heidelberg
Magnesiumchlorid (25 mM)	Fermentas Scientific, Waltham, MA, USA
Beta-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Sigma, Deisenhofen
Methylgrün	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid-Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen
Natriumhydrogen-Carbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt

Di-Natrium-Carbonat	Merck, Darmstadt
Di-Natriumhydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
Normal Mouse Serum	Jackson, West Grove, PA, USA
Normal Rat Serum	Jackson, West Grove, PA, USA
PBS	Pan Biotech, Aidenbach
PRC-Puffer	Minerva BioLabs, Berlin
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Phosphatase	Merck, Darmstadt
Phosphorolybdansäure Orange G	Morphisto, Offenbach
Perjod-Säure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RIPA-Puffer	Merck, Darmstadt
RNAlater AM7020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNasin (40 U/µl)	Promega, Mannheim
RNA loading buffer	Sigma, Deisenhofen
RNase free Spray	Gene Choice, Frederick, MD, USA
RPML-Medium	Merck, Darmstadt
Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin	Morphisto, Offenbach
Schiffs Reagenz	Merck, Darmstadt
Shandon Formal-Fixx Konzentrat	Thermo, Cheshire, UK
Standard Taq Reaction Buffer	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green	Sigma, Deisenhofen
Taq-Polymerase	Kisker Biotech, Steinfurt
Taq Puffer 10x	Fermentas, St-Leon-Rot
TRIS	Roth, Karlsruhe
Trypan-Blau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20 Detergenz	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt
Xylene	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.5 Kommerzielle Kits

Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Lab, Burlingame, CA, USA
Bradford-Reagenz	Bio-Rad Lab, Feldkirchen

DNase Set	Qiagen, Hilden
PureLink RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
VectaMount	Vector Lab, Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite ABC	Vector Lab, Burlingame, CA, USA

2.1.6 Lösungen und Puffer

10x HBSS Puffer (ohne Ca und ohne Mg):

- 4 g KCl
- 0,6 g KH_2PO_4
- 80 g NaCl
- 0,62 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

in 1000 ml ddH₂O, pH 7,4 (mit 0,1 N HCl)

10x HBSS Puffer (mit Ca und Mg):

- 4 g KCl
- 0,6 g KH_2PO_4
- 80 g NaCl
- 0,62 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 3,5 g NaHCO_3
- 1,4 g CaCl_2
- 1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- 1 g $\text{Mg SO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- 10 g D-Glucose

in 1000 ml ddH₂O, pH 7,4 (mit 0,1 N HCl)

Paris Puffer:

- 20 mM Tris-HCl
- 125 mM NaCl
- 10 mM KCl
- 10 mM Na-Azetat
- 5 mM D-Glucose
- in 1000 ml ddH₂O, pH 7,4 (mit 0,1 N HCl)

FACS Puffer

- 500 ml 1x PBS
- 0,2% BSA
- 0,1% Na-Azid

Kollagenase / DNase-Lösung in HBSS Puffer (ohne Ca und ohne Mg)

- 10 mg Kollagenase Typ I
- 1mg DNase Typ III
- in 10 ml HBSS (ohne Ca und ohne Mg)

Kollagenase-Lösung in HBSS Puffer (ohne Ca und ohne Mg)

- 10 mg Kollagenase Typ I
- in 10 ml HBSS (ohne Ca und ohne Mg)

2mM EDTA / HBSS-Lösung

- 100 µl 0,2 EDTA-Stammlösung
- 10 ml HBSS (ohne Ca und ohne Mg)

2.1.7 Antikörper und Enzyme

Durchflusszytometrie:

Ratte anti-Maus CD45 (Klon 30-F11), PE- oder APC-konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD11b (Klon M1/70), FITC- oder PE-Cy5-konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Hamster anti-Maus CD11c (Klon HL3), FITC-konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte anti-Maus Ly-6G (Klon 1A8), FITC-konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte anti-Maus Ly-6C (Klon AL-21), PE-konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Hamster anti-Maus CD3e (Klon 145-2C11), Alexa488-konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD4 (Klon RM4-5), APC-konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD8 (Klon 53-6.7), PE-Cy5-konjugiert	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte anti-Maus F4/80 (Klon CL:A3-1), APC-konjugiert	AbD Serotec, Düsseldorf
Ratte anti-Maus CCR2 (Klon #475301), FITC-konjugiert	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Maus Kollagen 1 (polyklonales Kaninchenserum), Biotin-konjugiert	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA
Ratte IgG _{2b} , FITC-konjugiert (anti-CCR2-Isotyp-Kontrolle)	BD Biosciences, Heidelberg
Ratte IgG _{2b} , APC-konjugiert (anti-F4/80-Isotyp-Kontrolle)	AbD Serotec, Düsseldorf

Immunhistochemie:

Ratte anti-Mensch CD3 (Klon CD3-12) 1:100	AbD Serotec, Oxford, UK
Ratte anti-Maus Ly6B.2 (Klon 7/4) 1:50	AbD Serotec, Oxford, UK
Ratte anti-Maus F4/80 (Klon Cl:A3-1) 1:100	AbD Serotec, Oxford, UK
Maus anti-Maus α SMA (Klon 1A4)	DAKO Agilent, Santa Clara, CA, USA

2.1.8 Software

LightCycler 480 Software, 1.2.9.11	Roche, Mannheim
CellQuest, 3.3	BD Biosciences, Heidelberg

Endnote X9

QWin

Microsoft Office 2019

Image J

InStat, 3.05

Thomson Reuters, NY, USA

Leica Microsystems, Bensheim

Microsoft, Redmond, WA, USA

Open Source

GraphPad Software, San Diego, CA, USA

2.1.9 Oligonukleotid-Primer für die Real-Time PCR

Alle Primer wurden kommerziell von der Firma Metabion, Martinsried erworben.

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotid-Primer

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
ACKR2	5'-CTTCTTTTACTCCCGCATCG-3'	5'-TATGGGAACACAGCATGAA-3'
CCL2	5'-CCTGCTGTTACAGTTGCC-3'	5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'
CCL5	5'-CCACTTCTTCTCTGGGTTGG-3'	5'-GTGCCACGTCAAGGAGTAT-3'
CCL22	5'-TCTGGACCTCAAAATCCTGC-3'	5'-TGGAGTAGCTTCTTCACCCA-3'
CXCL-10	5'-GGCTGGTCACCTTTCAGAAG-3'	5'-ATGGATGGACAGCAGAGAGC-3'
TNF	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3'	5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'
IL-6	5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3'	5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3'
IL-10	5'-ATCGATTTCTCCCCTGTGAA-3'	5'-TGTCAAATTCATTCATGGCCT-3'
IL-12 β	5'-GATTCAGACTCCAGGGGACA-3'	5'-GGAGACACCAGCAAAACGAT-3'
IFN- γ	5'-ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT-3'	5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'

iNOS1	5'-TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG-3'	5'-TGAAGAAAACCCCTTGTGCT-3'
CTGF	5'-AGCTGACCTGGAGGAAAACA-3'	5'-CCGCAGAACTTAGCCCTGTA-3'
MRC1	5'-ATATATAACAAGAA TGGTGGGCAGT-3'	5'-TCCATCCAAATGAATTTCTTATCC-3'
MSR-1	5'-CCTCCGTT CAGGAGAAGTTG-3'	5'-TTTCCCAATTCAAAGCTGA-3'
Arg1	5'-AGAGATTATCGGAGCGCCTT-3'	5'-TTTTTCCAGCAGACCAGCTT-3'
Fizz-1	5'-CCCTTCTCATCTGCATCTCC-3'	5'-CTGGATTGGCAAGAAGTTCC-3'
Fibronectin	5'-GGAGTGGCACTGTCAACCTC-3'	5'-ACTGGATGGGGTGGGAAT-3'
Laminin	5'-CATGTGCTGCCTAAGGATGA-3'	5'-TCAGCTTG TAGGAGATGCCA-3'
Collagen 1 α 1	5'-ACATGTT CAGCTTTGTGGACC-3'	5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3'
Collagen 4 α 1	5'-GTCTGGCTTCTGCTGCTCTT-3'	5'-CACATTTTCCACAGCCAGAG-3'
α SMA	5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3'	5'-GTT CAGTGGTGCCTCTGTCA-3'
FSP1	5'-CAGCACTTCCTCTCTCTTGG-3'	5'-TTTGTGGAAGGTGGACACAA-3'

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Tierhaltung

Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgten in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik IV in der Schillerstraße 42. Die Tierhaltung erfolgte unter SPF-Bedingungen (*specific-pathogen-free*), die durch regelmäßige mikrobiologische Untersuchungen kontrolliert wurden. Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal 5 in Macrolone Typ II L Käfigen mit Filterdeckel gehalten. Der Tierstall unterlag einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Mäuse wurden mit Wasser und Standardfutter der Firma ssniff® ad libidum versorgt. Die Käfige, Futter, Wasser, Stroh sowie die Watte für den Nestbau wurden vorher autoklaviert. Die

Raumtemperatur des Tierstalles betrug konstant 22°C und die Luftfeuchtigkeit konstant 60%. Im Alter von 21 Tagen wurden die Jungtiere nach Geschlechtern getrennt abgesetzt und durch Lochmarkierungen am Ohr markiert.

Bei allen tierexperimentellen Versuchen wurden die Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes eingehalten. Alle Versuche waren vorher von der Regierung von Oberbayern vorab genehmigt worden.

2.2.2 Verwendete Tiere

Bei den Versuchen wurden Wildtyp- und Ackr2-defiziente Mäuse im genetischen C57BL/6J-Hintergrund verwendet.

Die Ackr2^{-/-} Mauslinie wurde ursprünglich in der Arbeitsgruppe von Professor Gerard Graham, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow generiert und in einen C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt (132). Die eigene Arbeitsgruppe erhielt Zuchtpaare von Ackr2-defizienten Mäusen via Embryotransfer von Prof. Massimo Locati, Abteilung für Medizinische Biotechnologie und Translationale Medizin, Università degli Studi di Milano, Mailand. Die C57BL/6J Wildtyp-Tiere erhielt die eigene Arbeitsgruppe von Charles River aus Sulzfeld (siehe Tabelle 5). Nach Erhalt der Zuchtpaare wurden beide Tierlinien in der eigenen Tierhaltung gezüchtet.

Tabelle 5: Verwendete Tiere

Mausstamm	Züchter
C57BL/6J Wildtyp	Bar Harbor, Maine, USA
Ackr2 ^{-/-} (Ackr2 ^{tm1Gjg} C57BL/6, Hintergrund)	Prof. Massimo Locati, Mailand, Italien

2.2.3 Induktion des Ischämie-Reperfusionsschadens

Die Operationen wurden an 7-10 Wochen alten weiblichen C57BL/6J Wildtyp- und Ackr2-Knockout-Mäusen durchgeführt. Die Gruppengröße betrug pro Versuch n = 5. Die beiden verschiedenen Genotypen wurden alternierend operiert. Um den akuten Verlauf nach Ischämie-Reperfusionsschaden zu evaluieren, wurde die Operation bilateral durchgeführt. Für den subakuten und chronischen Verlauf wurde nur unilateral operiert. Bei unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden wurde stets die linke Niere operiert. Die jeweiligen

Ischämiezeiten und Endpunkte im akuten, subakuten und chronischen Modellverlauf sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Tabelle 6: Ablauf der operativen Tierversuche

Modellverlauf:	Operation:	Ischämiezeit:	Endpunkt:
akut	bilateral	30 min	24 Stunden
subakut	unilateral	45 min	5 Tage
chronisch	unilateral	45 min	5 Wochen

Zu Beginn wurden die Tiere narkotisiert mit einer intraperitonealen, gewichtsadaptierten Injektion nach Tabelle 7. Unmittelbar nach Narkoseeinleitung wurden die Mäuse auf ein auf 39°C vorgeheiztes Wärmepad gelegt, um eine Hypothermie zu vermeiden. Zusätzlich wurde eine Wärmelampe 45 cm über dem Wärmepad installiert. Die Körpertemperatur wurde mit einer rektalen Thermosonde kontinuierlich gemessen. Hiermit konnte die Körpertemperatur der Mäuse stabil auf 35-37°C gehalten werden. Auf die Augen der Tiere wurde Bepanthen-Salbe aufgetragen, um sie vor Austrocknung zu schützen.

Tabelle 7: Narkoselösung und Antagonisierung perioperativ

Narkose:	Antagonisierung:
• Fentanyl: 0,05 mg / kg Körpergewicht	• Naloxon: 1,2 mg / kg Körpergewicht
• Midazolam: 5 mg / kg Körpergewicht	• Flumazenil: 0,5 mg / kg Körpergewicht
• Medetomidin: 0,5 mg / kg Körpergewicht	• Atipamezol: 2,5 mg / kg Körpergewicht

Um die Narkosetiefe zu testen, wurde mit einer Pinzette kurz am rechten Vorfuß der Maus ein Schmerzreiz gesetzt. Falls eine Bewegung auslösbar war, wurde noch ein Viertel der ursprünglichen Narkoseeinleitungsdosis intraperitoneal als Bolus gegeben und 10-15 Minuten gewartet. Wenn keine Bewegung durch den Schmerzreiz auslösbar war, wurde mit der Operation begonnen.

Nach Desinfektion der Haut erfolgte eine ca. 5-8 mm lange Hautinzision über den Flanken. Anschließend erfolgte eine Inzision des Peritoneums mit darauffolgender stumpfer Präparation. Die Niere wurde vorsichtig mobilisiert unter Schonung der Nierenkapsel. Danach

wurden die Nierengefäße mit einer Gefäßklemme ligiert. Der Clip wurde dabei am Hilum der Niere platziert. Eine erfolgreiche Ligation war durch eine rasch entstehende, vom Hilum der Niere ausgehende Abblassung erkennbar. Bei der Durchführung des akuten Modells wurde anschließend die rechte Seite ebenfalls operiert. Während der Ischämiezeit wurden die Nieren in der Bauchhöhle gehalten und die Hautinzisionen mit NaCl-getränkten Kompressen abgedeckt, um die Mäuse vor Flüssigkeits- und Wärmeverlusten durch Evaporation zu schützen.

Nach Ablauf der Ischämiezeit wurden die Klemmen wieder entfernt. Eine anschließende rasche Normalisierung der Nierenfarbe war das Zeichen einer adäquaten Reperfusion. Die Inzisionen von Peritoneum und Haut wurden getrennt voneinander mit jeweils 2-3 Stichen mit Mersilene 4-0, Polyester verschlossen.

Nach der letzten Naht wurde die Narkose-Antagonisierung (siehe Tabelle 7) gewichtsadaptiert subkutan verabreicht. Die Versuchstiere wurden postoperativ nach Wiedererlangung des Bewusstseins noch für 2 Stunden unter einer weiteren 100W Wärmelampe belassen. Noch vor Wiedererlangen des Bewusstseins erhielten die Versuchstiere eine gewichtsadaptierte postoperative Schmerztherapie durch eine subkutane Injektion von 0,05 mg / kg KG Buprenorphin. Die postoperative Schmerztherapie wurde für 3 Tage fortgesetzt durch Repetition der Ausgangsdosis alle 12 Stunden.

2.2.4 Blut- und Organentnahme

Nach 24 Stunden, 5 Tagen beziehungsweise 5 Wochen wurden die Tierversuche beendet. Zur Blut- und Organentnahme wurden die Versuchstiere tief narkotisiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion gewichtsadaptiert nach Tabelle 8. In tiefer Narkose erfolgte die Blutentnahme über den retroorbitalen Venenplexus. Die Punktion erfolgte im lateralen Augenwinkel mittels einer heparinisierten Blutkapillare. Das Blut wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Das so gewonnene Vollblut wurde nach Gerinnung für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 1500 G zentrifugiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Serum wurde zur Harnstoff- und Kreatininmessung an *SynLab.vet GmbH & Co. KG, Labor Augsburg* geschickt. Das verbleibende Serum wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 8: Narkoselösung für Organentnahme

Fentanyl: 0,2 mg / kg Körpergewicht
Midazolam: 10 mg / kg Körpergewicht
Medetomidin: 0,5 mg / kg Körpergewicht

Anschließend erfolgte zur Organentnahme eine mediane Laparotomie und Thorakotomie mit Sternotomie. Das Zwerchfell wurde abgetragen und die Vena cava inferior durchtrennt. Darauffolgend wurde das Versuchstier mit auf 37°C vorgewärmter PBS-Lösung perfundiert. Hierfür erfolgte eine Punktion des linken Ventrikels des Herzens mit anschließender Perfusion bei einem konstanten Druck von 120 mmHg. Im Verlauf der Perfusion nahmen die Nieren sowie die Leber einen helleren Farbton an. Die Nieren und Milz wurden entnommen und die Nierenkapsel wurde entfernt.

Die Milz wurde in eine Petrischale mit 4°C kaltem PBS überführt. Die Nieren wurden in mehrere Teile mit einem Skalpell geschnitten. Ein Teil wurde für Proteinanalysen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C aufbewahrt. Ein weiteres Teil wurde in RNAlater bei -20°C gelagert. Ein 1 mm breites Stück aus der Mitte der Niere wurde in Histologie-Kassetten in 10%-Formalin überführt. Das restliche Nierenstück wurde zur FACS-Analyse mit einem separaten Skalpell in kleine, ca. 0,5 mm große Stücke geschnitten und in eine Petrischale mit 4°C kaltem PBS überführt. Abschließend wurde das Femur auf beiden Seiten entnommen und in 4°C kaltem RPMI-Medium gelagert.

2.3 Durchflusszytometrie

Die Analyse der verschiedenen Zellpopulationen von Niere, Milz, Knochenmark und Blut anhand ihrer Oberflächenmoleküle erfolgte mithilfe der Durchflusszytometrie. Hierfür wurde das Gerät FACSCalibur (Becton Dickinson) mit 4 Kanälen verwendet. Die Analyse der gesammelten Daten erfolgte mit der CellQuest-Software (Becton Dickinson). Als Fluorochrome wurden verwendet: Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), Alexa Fluor 488 (Alexa488), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cyanin (PE-Cy5) und Allophycocyanin (APC).

Prinzip:

Die Durchflusszytometrie bzw. FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) gehört zu den Methoden der Zellanalyse, bei der einzelne Zellen durch ihre Zellgröße, Zellstruktur und Expression spezifischer Antigene unterschieden werden können. Zellen, die bezüglich dieser untersuchten Merkmale gleich sind, werden als Populationen zusammengefasst.

Voraussetzung für die Untersuchung ist, dass die Zellen einzeln gelöst als Zellsuspension vorliegen. Damit mithilfe des FACS-Geräts die Zellen einzeln anhand ihrer Oberflächenbeschaffenheit untersucht werden können, werden die Zellen, während sie durch das FACS-Gerät fließen, durch hydrodynamische Fokussierung und einer laminären Strömung perlchnurartig aufgereiht und in eine Messzelle geleitet. Dort treffen auf die Zellen mehrere Laser. Im Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) kann die Zellgröße und im Seitwärtsstreulicht (Sideward Scatter, SSC) die Zellgranularität bestimmt werden. Außerdem können die Zellen anhand der Expression von Oberflächenmolekülen und auch intrazellulären Molekülen charakterisiert werden. Hierfür werden die Zellen mit Antikörper markiert, die gegen Epitope auf der Zelloberfläche oder im Zellinneren gerichtet sind. Diese Antikörper sind an Fluoreszenzfarbstoffe, sogenannte Fluorochrome gebunden. Die Fluorochrome werden dann mit einem Laserstrahl mit bestimmter Wellenlänge angeregt und emittieren daraufhin Licht mit einem spezifischen Wellenlängenspektrum, welches durch das FACS-Gerät mit verschiedenen Kanälen detektiert werden kann.

Bei der gleichzeitigen Verwendung von mehreren Antikörpern mit unterschiedlichen Fluorochromen entstehen Probleme bei der simultanen Messung der verschiedenen Emissionsspektren. Diese Emissionsspektren überlappen sich teilweise und somit werden die Lichtemissionen von einem Fluorochrom von mehreren Kanälen gleichzeitig detektiert. Es entstehen dadurch falsch positive Signale, die durch rechnerische Kompensation korrigiert werden können. Hierbei wird der Emissionsanteil, der von einem Fluorochrom in anderen Kanälen detektiert wird in diesen subtrahiert. Die Kompensation wird durch ungefärbte und

Isotyp-Kontrollen für das jeweilige Fluorochrom erleichtert. Bei Letzteren ist das Fluorochrom an einen Antikörper gekoppelt, der nicht spezifisch an die Zielzellen bindet und daher nur zu einem unspezifischen Hintergrundsignal führt. Isotyp-Kontrollen erlauben daher auch die bessere Abgrenzung positiver Zellpopulationen, wenn ihr Fluoreszenz-Signal nicht eindeutig von negativen Zellen ohne Expression des untersuchten Antigens separiert ist.

2.3.1 Herstellung der Zellsuspension aus Nierengewebe

Zur Analyse der verschiedenen Zellpopulationen in der Niere mittels Durchflusszytometrie musste zunächst aus den entnommenen Nieren von Wildtyp- und Akr2-defizienten Tieren eine Zellsuspension hergestellt werden.

Nach Organentnahme wurden hierfür die Nieren in 3 ml auf Eis vorgekühltem Paris-Puffer überführt und in einer Petrischale mit einem Skalpell in ca. 0,5 mm kleine Stücke zerkleinert. Die Nierenstücke wurden anschließend mitsamt des Paris-Puffers mit einer 5-ml-Spritze aspiriert und in ein Falcon-Röhrchen gegeben. Die Petrischale wurde anschließend noch zweimal mit 4-ml-Paris-Puffer gespült. Die Spüllösung wurde ebenfalls in das Falcon-Röhrchen übertragen.

Es folgte ein Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4 °C mit 250 G. Nach Abgießen des Überstandes und Resuspension des Pellets mit 10 ml eisgekühltem HBSS (mit Calcium und Magnesium) wurde erneut für 5 Minuten bei 4°C mit 250 G zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen. Das Pellet wurde mit 5 ml auf 37°C vorgewärmter Kollagenase-Lösung resuspendiert und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde für 5 Minuten bei 4°C mit 250 G zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit Zugaben von 10 ml HBSS (mit Calcium und Magnesium) und erneutes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C mit 250 G. Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 5 ml auf 37°C vorgewärmter 2 mM EDTA-Lösung in HBSS (ohne Calcium und Magnesium) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 20 Minuten.

Nach Ablauf der 20 Minuten wurde für 5 Minuten bei 4°C mit 30 G zentrifugiert. Der Überstand wurde nicht verworfen, sondern in neuen Falcon-Röhrchen auf Eis gelagert. Das verbliebene Pellet wurde mit 5 ml auf 37°C vorgewärmter Kollagenase-Lösung resuspendiert. Es folgte eine erneute Inkubation für 20 Minuten bei 37°C.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Pellet-Suspension mit einer 10-ml-Spritze aufgezogen und durch eine 19G-Kanüle in eine Petrischale ausgespritzt. Nach mehreren Wiederholungen wurde auf eine 26G-Kanüle gewechselt. Das Ausspritzen wurde solange

wiederholt, bis keine Partikel mehr sichtbar waren. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem vorher auf Eis gelagerten Überstand vereinigt. Die Suspension wurde danach für 5 Minuten bei 4°C mit 250 G zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes und Resuspension des Pellets mit 10 ml eisgekühltem HBSS (ohne Calcium und Magnesium) erfolgte ein weiteres Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C mit 250 G.

Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und durch einen 70 µm Cell Strainer in ein neues Falcon-Röhrchen gefiltert. Die Falcon-Röhrchen wurden auf 10 ml mit DPBS aufgefüllt. Anschließend wurde für 5 Minute bei 4°C mit 250 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 200 bis 500 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.3.2 Herstellung der Zellsuspension aus Milzgewebe

Zur Analyse der verschiedenen Zellpopulationen in der Milz mittels Durchflusszytometrie wurde zunächst aus den entnommenen Milzen von Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren eine Zellsuspension hergestellt.

Die Milz wurde nach Organentnahme durch einen 70 µm Cell Strainer in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit dem Kolben einer 5-ml-Spritze gedrückt. Der Cell Strainer wurde anschließend mit 10 ml eisgekühltem PBS nachgespült. Nach Zentrifugieren für 10 Minuten bei 4°C mit 250 G und Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 5 ml eisgekühltem TAC-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad. Hierdurch wurden die Erythrozyten lysiert.

Durch Hinzufügen von 20 ml eisgekühltem MACS-Puffer wurde die Lyse gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut durch einen 70 µm Cell Strainer filtriert. Es folgte ein weiterer Waschschrift und Zentrifugieren für 5 min bei 4°C mit 250 G, Abgießen des Überstandes und Resuspension mit 10 ml MACS-Puffer. Nach Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C mit 250 G wurde das Zellpellet mit 500 bis 1000 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.3.3 Herstellung der Zellsuspension aus Knochenmark

Zur Analyse der verschiedenen Zellpopulationen im Knochenmark mittels Durchflusszytometrie wurde zunächst aus dem entnommenen Femur von Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren eine Zellsuspension der Knochenmarkzellen gewonnen.

Das entnommene Femur wurde zunächst in RPMI-Medium eingelegt. Das dem Femur umliegende Gewebe wurde vollständig abgelöst. Anschließend wurde das Femur in neues RPMI-Medium überführt und an beiden Enden mit einer Schere eröffnet. Mit 5 ml RPMI-

Medium in einer Spritze mit einer aufgesetzten 26G-Kanüle wurde das Knochenmark aus dem Femur in eine Petrischale gespült. Dieser Schritt wurde 3 bis 5 mal wiederholt. Das RPMI-Medium wurde zusammen mit den Knochenmarkzellen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und für 5 Minuten bei 4°C mit 300 G zentrifugiert und der Überstand abgegossen.

Nach Resuspension des Pellets mit 5 ml 0,15 M Ammoniumchloridlösung erfolgte zur Erythrozytenlyse eine Inkubation für 5 Minuten bei 4°C. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 10 ml eisgekühltem PBS gestoppt. Nach Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C 300 G und Abgießen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml eisgekühltem PBS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch einen 70 µm Cell Strainer gefiltert und der Cell Strainer mit 10 ml eisgekühltem PBS gewaschen. Nach Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C mit 300 G wurde das Pellet mit 500 bis 1000 µl FACS-Puffer resuspendiert.

2.3.4 Färben der Zellsuspensionen von Niere, Milz und Knochenmark

Um die hergestellten Zellsuspensionen von Niere, Milz und Knochenmark für die FACS-Analyse zu färben, wurde pro Färbung ein Ansatz von 100 µl in ein Polystyren-FACS-Röhrchen pipettiert. Es wurden jeweils 5 µl Maus- und Rattenserum hinzugegeben, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren. Anschließend wurden Antikörpermixe zur Identifizierung spezifischer Leukozytenpopulationen (siehe Tabelle 9) mit 1,4 µl je Antikörper hinzugegeben. Zudem wurden für einzelne Färbungen Isotyp-Kontrollen angefertigt, um die spektralen Überlappungen der einzelnen Fluorochrome zu kompensieren und die positive Zellpopulationen klar abgrenzen zu können. Bei den Zellsuspensionen von Milz und Knochenmark wurden zusätzlich 100 µl AccuCeck Counting Beads (BD Biosciences) hinzugefügt, um später die absolute Anzahl an Leukozyten bestimmen zu können. Nach lichtgeschützter Inkubation der Zellsuspensionen für 45 Minuten auf Eis erfolgten zwei Waschschrte mit 2 ml FACS-Puffer und im Anschluss die durchflusszytometrische Messung.

Tabelle 9: Antikörperfärbungen für die Durchflusszytometrie

Färbung für:	Verwendete Antikörper:
Neutrophile Granulozyten	CD45-PE, Ly6G-FITC
Dendritische Zellen / Makrophagen	CD45-PE, CD11c-FITC, F4/80-APC
Inflammatorische Phagozyten	CD45-APC, CD11b-PE-Cy5, Ly6C-PE, CCR2-FITC
T-Zellen	CD45-PE, CD3e-Alexa488, CD4-APC, CD8-PE-Cy5
Fibrozyten	CD45-PE, CD11b-FITC, Kollagen 1 (biotinyliert + Streptavidin-APC)
Isotyp-CCR2	CD45-APC, CD11b-PE-Cy5, Ly6C-PE, FITC-Isotyp
Isotyp-F4/80	CD45-PE, CD11c-FITC, APC-Isotyp
Isotyp-CD11c	CD45-PE, F4/80-APC, FITC-Isotyp

2.3.5 Fibrozytenfärbung: Intrazelluläre Färbung von Kollagen 1

Die Fibrozytenfärbung erfolgte zunächst analog der oben beschriebenen Färbung der Einzelzellsuspension von Nierenzellen. Nach Hinzugabe der Antikörpermix gegen die Obeflächenantigene CD45 und CD11b (siehe Tabelle 10) wurden die Zellsuspensionen mit 300 µl Cytofix/Cytoperm versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 4°C für 20 Minuten. Hierdurch wurde die Zellmembran permeabilisiert und die Zellen anschließend fixiert. Nach zwei Waschschritten mit FACS-Puffer wurden biotinylierten polyklonale Kollagen 1-Antikörper für die intrazelluläre Färbung hinzugegeben. Zudem erfolgte die Färbung mit biotinyliertem polyklonalem Kaninchenserum zur Kontrolle der unspezifischen Hintergrundfärbung. Nach einem weiteren Waschschriff erfolgte die Inkubation mit APC-konjugiertem Streptavidin.

2.3.6 Aufbereitung des Vollbluts zur FACS-Analyse

Zur Analyse der verschiedenen leukozytären Zellpopulationen im Blut der Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren mittels Durchflusszytometrie erfolgten Färbungen des Vollbluts.

Direkt nach Entnahme des Blutes aus dem retroorbitalen Venenplexus der Versuchstiere wurden je Färbung 100 µl Vollblut mit 5 µl 5M EDTA in Polystyren-FACS-Röhrchen vermischt. Damit wurde die Gerinnung inhibiert. Zur späteren Quantifizierung der Leukozytenzahl erfolgte die Zugabe von 100 µl AccuCheck Counting Beads (Life Technologies). Anschließend wurden 5 µl Maus- und 5 µl Rattenserum hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hierdurch werden unspezifische Bindungsstellen an der Zelloberfläche blockiert.

Danach wurden die Antikörpermixe mit 1,4 µl je Antikörper hinzugefügt. Es folgte eine lichtgeschützte Inkubation von 45 Minuten bei 4°C.

Anschließend wurden zur Erythrozytenlyse und Fixierung 2 ml der 1:10 mit Wasser verdünnter Lysing-Solution (BD Biosciences) hinzugegeben und für 10 Minuten inkubiert. Danach wurde 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und für 4 Minuten bei 4°C mit 250 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Nach erneuter Zugabe von 2 ml FACS-Puffer wurde dieser Waschschritt noch zweimal wiederholt und abschließend das Zellpellet in ca. 300 µl verbliebenen FACS-Puffer resuspendiert.

2.3.7 Durchflusszytometrische Analyse

Die verwendeten Antikörper-Kombinationen zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der einzelnen Leukozytensubpopulationen sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Gating-Strategie ist exemplarisch für renale Leukozytenpopulationen in *Abbildung 11* bis *Abbildung 15* illustriert. Bei der Durchflusszytometrie des Nierengewebes wurden die Leukozyten als Anteil aller renaler Zellen in Prozent angegeben. Die Gesamtzahl renaler Zellen wurde als Gesamtzahl der Events nach Ausschluss von Zelldedritus und toten Zellen durch Setzen eines entsprechend hohen FSC-Grenzwerts ermittelt.

Tabelle 10: Definition der Leukozytensubpopulationen

Zellen	Oberflächenmarker
Leukozyten	CD45+
Neutrophile Granulozyten	CD45+, Ly6G+, F4/80-
Dendritische Zellen	CD45+, CD11c+
F4/80+ dendritische Zellen	CD45+, CD11c+, F4/80+
F4/80- dendritische Zellen	CD45+, CD11c+, F4/80-
Makrophagen	CD45+, CD11c-, F4/80+
Inflammatorische mononukleäre Phagozyten	CD45+, CD11b+, Ly6C ^{high}
CCR2+ inflammatorische mononukleäre Phagozyten	CD45+, CD11b+, Ly6C ^{high} , CCR2+
T-Lymphozyten	CD45+, CD3+
CD4+ T-Lymphozyten	CD45+, CD3+, CD4+, CD8-
CD8+ T-Lymphozyten	CD45+, CD3+, CD4-, CD8+
Fibrozyten	CD45+, CD11b+, Col1+

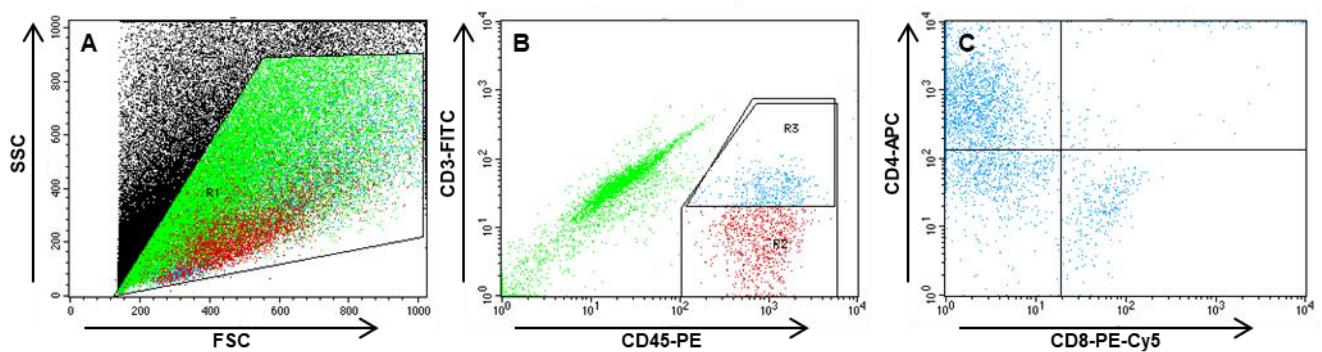


Abbildung 11: Gating der renalen CD45+ Leukozyten und CD3+ T-Lymphozyten

A: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung einer Nierengewebeprobe. Durch Gating Ausschluss unspezifischer Events anhand deren Eigenschaften im Forward Scatter (FSC) und Sideward Scatter (SSC). **B:** Gating der CD45+ Gesamtleukozyten (blaue und rote Population) und der CD45+ CD3+ T-Lymphozyten (blaue Population). **C:** Weitere Differenzierung der CD45+ CD3+ T-Lymphozyten in CD45+ CD3+ CD4+ CD8- T-Lymphozyten (oben links) und CD 45+ CD3+ CD8+ CD4- T-Lymphozyten (unten rechts).

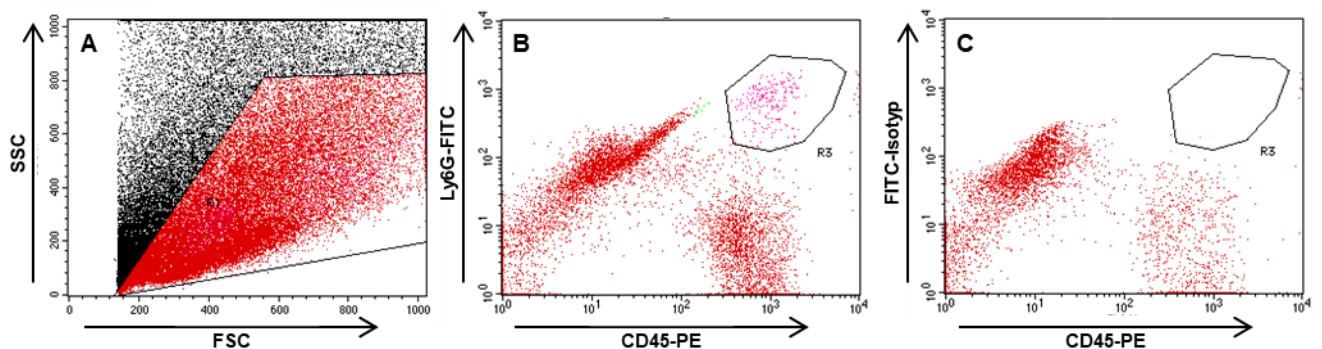


Abbildung 12: Gating der renalen Ly6G+ neutrophilen Granulozyten

A: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung einer Nierengewebeprobe. Durch Gating Ausschluss unspezifischer Events anhand deren Eigenschaften im Forward Scatter (FSC) und Sideward Scatter (SSC). **B:** Gating der CD45+ Ly6G+ neutrophilen Granulozyten (pinke Population). **C:** Isotypkontrolle für Ly6G-FITC ohne Nachweis einer CD45+ FITC+ Population.

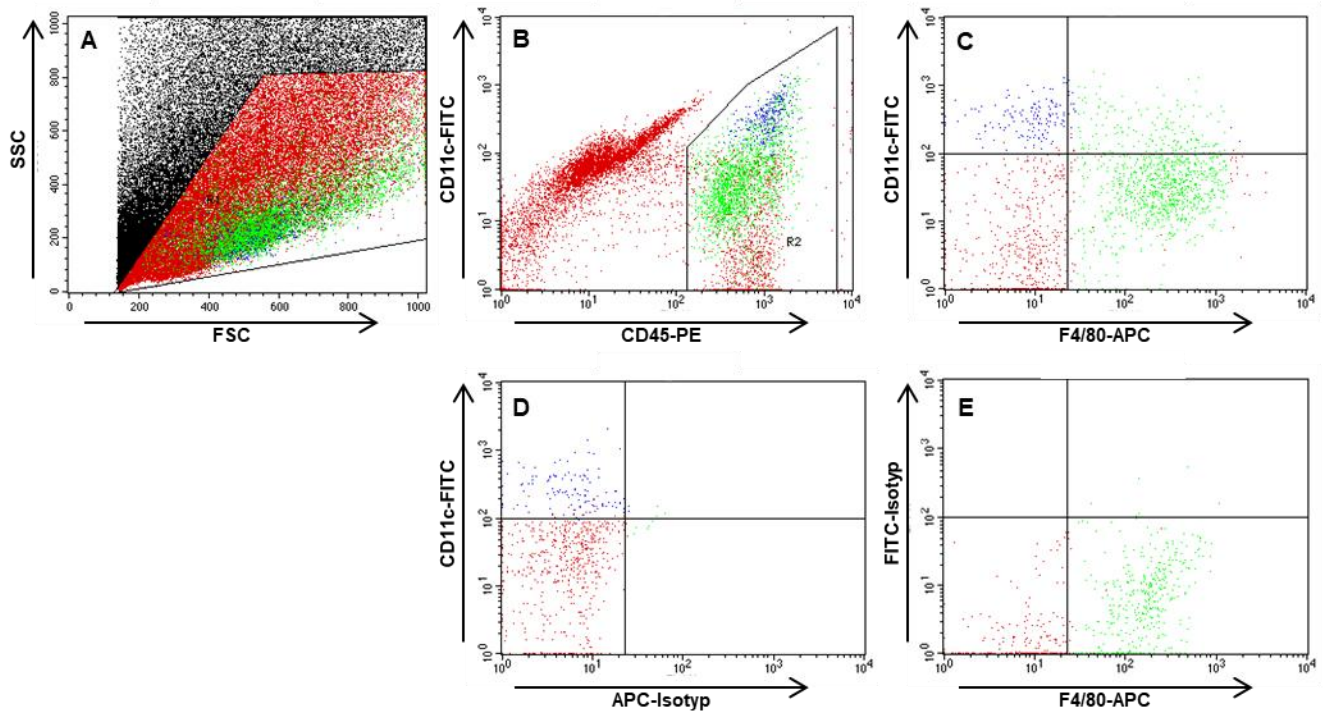


Abbildung 13: Gating der renalen CD11c⁺ dendritischen Zellen und F4/80⁺ Makrophagen

A: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung einer Nierengewebeprobe. Durch Gating Ausschluss unspezifischer Events anhand deren Eigenschaften im Forward Scatter (FSC) und Sideward Scatter (SSC). **B:** Gating der CD45⁺ Gesamtleukozyten (Population R2 rechts). **C:** Weitere Differenzierung der CD45⁺ Leukozyten in CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁻ Zellen (oben links), CD45⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ Zellen (oben rechts) und CD 45⁺ F4/80⁺ CD11c⁻ Zellen (unten rechts). **D:** Isotypkontrolle für F4/80-APC ohne Nachweis einer CD45⁺ APC⁺ Population. **E:** Isotypkontrolle für CD11c-FITC ohne Nachweis einer CD45⁺ FITC⁺ Population.

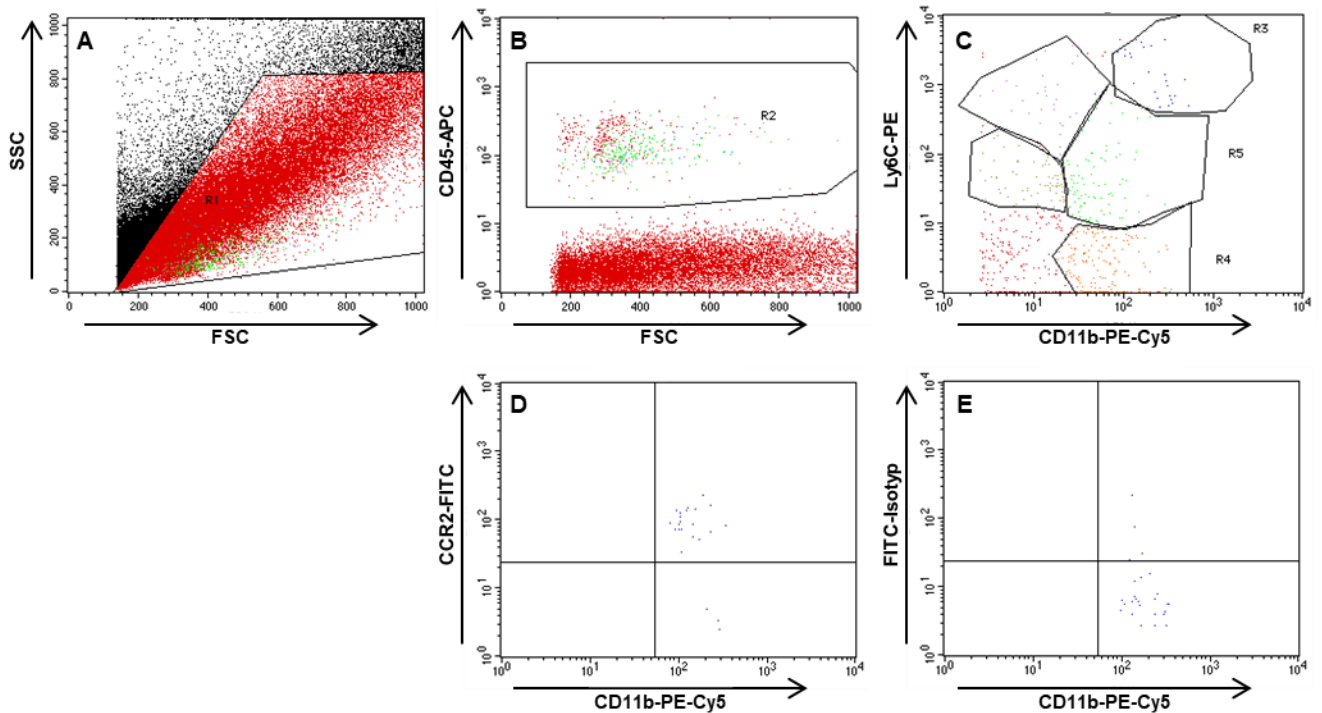


Abbildung 14: Gating der CD45+ CD11b+ Ly6C^{high} inflammatorischen mononukleären Phagozyten

A: Darstellung der durchflusszytometrischen Messungen einer Nierengewebeprobe. Durch Gating Ausschluss unspezifischer Events anhand deren Eigenschaften im Forward Scatter (FSC) und Sideward Scatter (SSC). **B:** Anschließend Gating der CD45+ Leukozyten (Population R2). **C:** Weitere Differenzierung der CD45+ Leukozyten in CD11b+ Ly6C^{high} inflammatorische mononukleäre Phagozyten (blaue Population R3). **D:** Differenzierung der inflammatorischen mononukleären Phagozyten in CD45+ CD11b+ Ly6C^{high} CCR2+ (oben rechts) und CD45+ CD11b+ Ly6C^{high} CCR2- (unten rechts) Phagozyten. **E:** Isotypkontrolle für CCR2-FITC ohne relevante CD45+ CD11b+ Ly6C^{high} FITC+ Population.

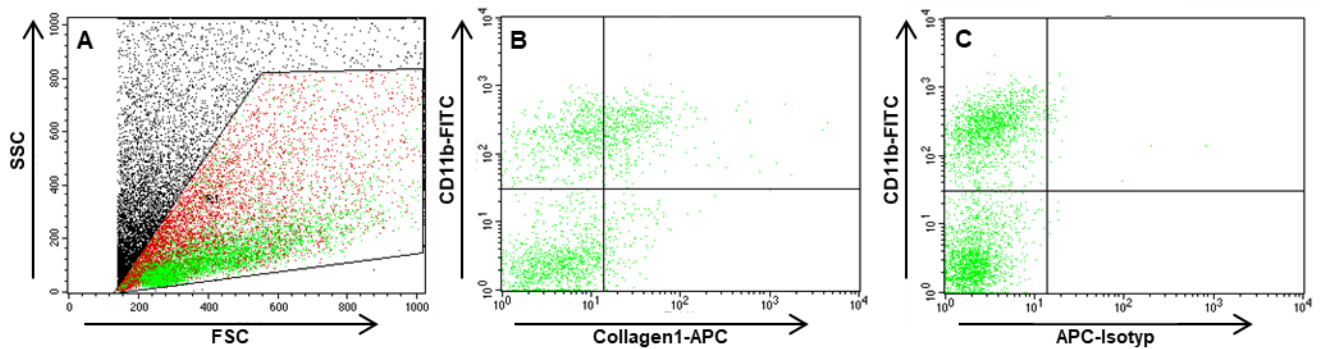


Abbildung 15: Gating der CD45+ CD11b+ Collagen1+ Fibrozyten

A: Darstellung der durchflusszytometrischen Messung einer Nierengewebeprobe. Durch Gating Ausschluss unspezifischer Events anhand deren Eigenschaften im Forward Scatter (FSC) und Sideward Scatter (SSC). Anschließend Gating der CD45+ Leukozyten (nicht dargestellt, analog zu den vorherigen Abbildungen). **B:** Weitere Differenzierung der CD45+ Leukozyten in CD45+ CD11b+ Collagen1+ Fibrozyten (oben rechts). **C:** Isotypkontrolle für Collagen1-APC ohne Nachweis einer CD45+ APC+ Population.

Die Auswertungen der durchflusszytometrischen Messungen des Blutes, der Milz und des Knochenmarkes erfolgte analog der Messungen im Nierengewebe. Um hierbei die absolute Zellzahl zu ermitteln, erfolgte zusätzlich die Messung der Anzahl an *AccuCheck Counting Beads*, deren Konzentration 1019 *Beads/μl* war (exemplarisch dargestellt in *Abbildung 16*). Die absolute Zellzahl/μl Blut oder Probe konnte anschließend mit der Formel *Absolute Zellzahl* = (Events/Anzahl *AccuCheck Counting Beads*) x 1019 bestimmt werden.

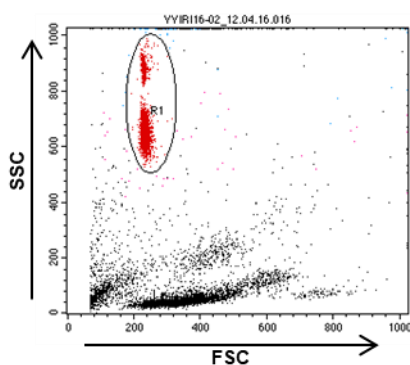


Abbildung 16: Bestimmung der Anzahl an AccuCheck Counting Beads

Exemplarische Darstellung einer Blutprobe nach Hinzufügen von *AccuCheck Counting Beads* im Forward Scatter und Sideward Scatter in der Durchflusszytometrie. Die *AccuCheck Counting Beads* (rote Population) können anhand ihrer Eigenschaften im Sideward Scatter eindeutig von den restlichen Zellen des Blutes differenziert werden.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde das Purelink RNA Mini Kit von Ambion nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA ist im Gegensatz zu DNA sehr instabil. Deher war es das Ziel, die RNase-Aktivität schnell zu eliminieren. Es wurde an einem RNase-freien Arbeitsplatz gearbeitet.

Zunächst wurden die Nierenstückchen mit einem sterilen Skalpell mechanisch zerkleinert und jeweils in 1ml Lysepuffer (aus Purelink RNA Mini Kit), versehen mit 1% 2-Mercaptoethanol, gegeben. Anschließend wurde das Gewebe mit dem Homogenisator 45 Sekunden lang auf Stufe 5 homogenisiert. Es erfolgte ein Zentrifugieren bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit 12000 G. Der Überstand wurde mit 0,5 ml 70% Ethanol vermischt und anschließend in einer Spin Cartridge für 15 Sekunden bei Raumtemperatur mit 12000 G zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses und Zugabe von 0,7ml Waschpuffer (aus Purelink RNA Mini Kit) erfolgte ein erneutes Zentrifugieren. Dieser Schritt wurde mit 0,5 ml Waschpuffer und 70% Ethanol noch zweimal wiederholt. Zum Trocknen der Membran innerhalb der Spin Cartridge erfolgte ein erneutes Zentrifugieren. Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die Spin Cartridge in ein neues Sammelröhrchen eingesetzt. Es wurden 100 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und eine Minute inkubiert. Es folgte ein letztes Zentrifugieren für 2 Minuten bei Raumtemperatur mit 12000 G. Die gewonnene Gesamt-RNA wurde entweder bei -80°C gelagert oder für weitere Auswertungen in cDNA umgeschrieben.

Um die RNA-Konzentration zu bestimmen, wurde mit einem Spektrometer (NanoDrop, Peqlab) die optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm (DNA) und $\lambda=280$ nm (Protein) gemessen. Der Quotient der optischen Dichten dieser zwei Wellenlängen (OD von $\lambda=260$ nm / OD von $\lambda=280$ nm) gibt Auskunft über den Reinheitsgrad des RNA-Lysats. Werte zwischen 1,8 und 2,0 sind verwertbar. Werte darunter zeigen eine Protein-Kontamination an, Werte darüber eine DNA-Kontamination.

Eine RNA-Konzentration von 40 ng/ml entspricht einer optischen Dichte von 1 bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Somit ergibt sich für die Berechnung der RNA-Konzentration:

$$\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = E_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40$$

2.4.2 cDNA-Synthese

Die RNA-Lysate wurden anschließend in komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) revers umgeschrieben, da nur DNA in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden kann.

Alle Proben wurden mit RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass in einem Volumen von 13,2 µl genau 1 µl RNA enthalten war. Diese Standardisierung war notwendig, um anschließend für jede Probe die gleiche Menge RNA in cDNA zu transkribieren. Hierfür wurde jede Probe im Doppelansatz mit dem Mastermix (siehe Tabelle 11) gemischt. Im ersten Ansatz (RT+) wurde die reverse Transkriptase (Superscript) verwendet. In dem zweiten, als Kontrolle dienender Ansatz (RT-), wurde stattdessen RNase-freies-Wasser verwendet. Eine fälschliche Amplifizierung möglicherweise die Proben kontaminierender genomischer DNA konnte so ausgeschlossen werden.

Tabelle 11: cDNA-Synthese Mastermix

cDNA-Synthese Mastermix:
• 4 µl 5x Puffer
• 0,4 µl 25mM dNTP
• 1 µl 0,1M DTT
• 0,5 µl 40 U/µl RNAsin
• 0,25 µl Acrylamid 15 µg/ml
• 0,215 µl Hexanukleotide
• 0,43 Superscript bzw. im RT-Ansatz ddH ₂ O

Um die cDNA-Synthese-Reaktion zu starten, wurden die Proben 90 Minuten lang im Thermomixer bei einer Temperatur von 42°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Proben anschließend 5 Minuten lang auf eine Temperatur von 85°C erhitzt. Die synthetisierte cDNA wurde entweder bei einer Temperatur von -20°C eingefroren oder direkt für die quantitative RealTime-PCR verwendet.

2.4.3 Quantitative Real Time-PCR

Prinzip:

Die quantitative Real Time-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für DNA. Der Unterschied zur konventionellen PCR besteht darin, dass die Amplifikationsreaktion unter fortlaufender Überwachung durch photometrische Messung von Fluoreszenzfarbstoffen stattfindet. Hierfür wird beispielsweise *SYBR® Green* eingesetzt. *SYBR® Green* ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die doppelsträngige DNA einlagern kann. Mit jedem Amplifikationszyklus steigt die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Menge der DNA an. Dadurch kann auf die ursprünglich eingesetzte Menge an DNA rückgeschlossen werden.

Für jede Probe wird ein sogenannter Cycle-Threshold-Wert (CT-Wert) aufgezeichnet. Dieser Wert ist wichtig für die genaue Quantifizierung und entspricht der Zyklusanzahl, bei der die gemessene Fluoreszenz einen Schwellenwert überschreitet. Wichtig ist zudem, dass der CT-Wert sich deutlich vom Hintergrundsignal unterscheidet. Bei steigender Substratmenge am Anfang sind somit weniger Zyklen nötig, um den CT-Wert zu erreichen.

Nach dem letzten Zyklus erfolgte die Analyse der Schmelzkurve, um Messungen unspezifischer PCR-Fragmente auszuschließen und somit die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen. Bei zunehmender Erhitzung der doppelsträngigen DNA dissoziiert diese in zwei Einzelstränge. Dies wird als Aufschmelzen bezeichnet. Hierdurch verändert sich die Absorptionsintensität, welche temperaturabhängig als sigmoidale Schmelzkurve dargestellt werden kann. Am Wendepunkt der sigmoidalen Schmelzkurve liegen gleiche Anteile an cDNA und Einzelstrang-DNA vor. Dieser Wendepunkt wird als Schmelzpunkt bezeichnet und ist unter anderem abhängig von dem DNA-Gehalt an Guanin-Cytosin-Paaren und Adenin-Thymin-Paaren. Der Schmelzpunkt ist für die amplifizierte cDNA spezifisch.

Für die genaue Quantifizierung gibt es verschiedene Rechenmodelle. In der vorliegenden Arbeit wurde die relative Quantifizierung verwendet, bei der das Verhältnis der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz ermittelt wird. Für die Referenzsequenz dient das Housekeeping-Gen 18S rRNA, welches in allen Proben gleichermaßen exprimiert wird.

Durchführung:

Die cDNA Proben (RT+) wurden zusammen mit ihren Negativkontrollen (RT-) mit RNase freiem Wasser 1 zu 10 verdünnt. Je 2 µl pro Probe wurden anschließend mit 18 µl PCR Mix (siehe Tabelle 12) versetzt. Der Probenmix wurde im Doppelansatz zusammen mit einer Negativkontrolle, bei der im PCR-Mix die Taq-Polymerase weggelassen worden war, auf eine 96-Well Platte pipettiert. Anschließend wurde die 96-Well Platte mit einer Folie abgedichtet

und zentrifugiert. Abschließend wurde die PCR nach Protokoll (siehe Tabelle 13 mit einem Lightcycler 480 von Roche durchgeführt.

Zur Auswertung diente die Lightcycler Software Version 1.2.9.11. Bei einem positiven Signal in der RT- Negativkontrolle oder dem Taq-Polymerase-freien Ansatz wurde die Real Time-PCR wiederholt oder die Probe wurde wegen Kontamination verworfen.

Tabelle 12: PCR Mix

PCR Mix:
• 10 µl Mastermix mit SYBR Green
• 0,6 µl der linken und rechten Primer-Sequenz
• 0,16 µl Taq-Polymerase
• 6,64 µl RNase freies Wasser

Tabelle 13: Lightcycler Einstellung zur Durchführung der Real Time-PCR

Schritt	Zeitspanne	Temperatur	
Erste Denaturierung der DNA	5 min	95 °C	
Denaturierung der DNA	15 s	95 °C	40x Wiederholung
Annealing der Primer	45 s	60 °C	
Extension	30 s	72 °C	
Schmelzkurve	5 s	95 °C	
	10 min	schrittweise Steigerung von 65 °C bis 95°C	

2.5 Protein- und Chemokinmessungen

2.5.1 Herstellung des Proteinlysates aus der Niere

Um aus der Niere ein Proteinlysate herzustellen, wurden die bei -80°C eingefrorenen Nierenstücke jeweils in ein Eppendorfgefäß auf Eis mit 400 µl RIPA-Puffer, 20 µl Proteinase-Inhibitor und 5 µl Phosphatase-Inhibitor überführt. Anschließend wurden die Nierenstücke mit dem Homogenisator auf Stufe 4 homogenisiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Gewebe 3 x 3 Sekunden einem Sonicator auf Stufe 4 ausgesetzt. Die Proben wurden anschließend für 2 Stunden im Kühlraum bei 4°C auf einem sich langsam drehenden Rotator inkubiert. Es folgte ein Zentrifugieren bei 4°C für 4 Minuten mit 15000 G. Der Überstand mit gelöstem Protein wurde bei -80°C gelagert.

2.5.2 Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration der Niere

Die Gesamtprotein-Konzentration in den Nierenproben wurde mithilfe eines Bradford-Assays bestimmt. Hierfür wurde das Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories) verwendet. Die Standardreihe, bestehend aus bovinen Serum-Albumin (BSA), wurde in bekannter Konzentration im Doppelansatz in die Vertiefungen der 96-Well Platte pipettiert. Die Proben wurden 1:10 mit Wasser verdünnt. Danach wurden die Proben ebenfalls im Doppelansatz auf die Platte aufgetragen. Anschließend wurde das Protein Assay Dye Reagent Concentrate 1:5 mit Wasser verdünnt und 200 µl davon in jedes Well pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 5 Minuten. Danach wurde die Absorption von jedem Well bei 590 nm mit einem ELISA-Reader gemessen.

Aus der Absorption der Standardreihe mit BSA wurde die Standardkurve für die Proteinkonzentration ermittelt. Mit Hilfe der Standardkurve konnte die gemessene Absorption jeder Probe in die tatsächlich vorliegende Gesamtprotein-Konzentration der Probe umgerechnet werden.

2.5.3 ELISA

Prinzip:

Der Begriff ELISA steht für Enzyme-Linked-Immunesorbent Assay und bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht und quantitative Aussagen über die Konzentration eines Antigens ermöglicht.

In dieser Arbeit wurde der direkte Sandwich ELISA benutzt. Der erste Antikörper (Capture Antibody) bindet mit seinem Fc-Teil an das Polystyrol einer 96-Well Mikrotiterplatte. Das zu

untersuchende Antigen bindet mit einem Epitop spezifisch an den *Capture Antibody* und wird auf der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nachfolgend wird ein zweiter Antikörper (*Detection antibody*) zugegeben, der an ein weiteres Epitop des Zielantigens bindet. An den *Capture Antibody* ist entweder Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) oder Biotin gekoppelt. Falls der *Capture Antibody* an Biotin gekoppelt ist, muss zusätzlich HRP-konjugiertes Streptavidin zugegeben werden, das an Biotin bindet. Die HRP oxidiert das hinzugegebene Farbsubstrat Tetramethylbenzidin (*TMB*). Dadurch färbt sich TMB blau. Durch Zugabe von Schwefelsäure und den dadurch fallenden pH wird die Reaktion gestoppt und die Lösung färbt sich gelb mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm. Durch vorheriges Auftragen einer Standardreihe bekannter Konzentration kann aus der gemessenen Absorption auf die Konzentration des vorliegenden Antigens in der Probe geschlossen werden.

Mit Hilfe der ELISA-Messmethode wurde die Konzentration verschiedener Proteine wie zum Beispiel Chemokine in Zellkulturüberständen und Proteinlysaten aus der Niere bestimmt. Die Protein-Konzentration aus Proteinlysaten der Niere wurde im Verhältnis zu dem in der Niere enthaltenen Gesamtprotein angegeben.

Durchführung:

Für die ELISA-Messungen von Chemokinen und Kidney Injury Molecule (KIM)-1 als tubulären Schadensmarker wurden kommerzielle Kits verwendet (Tabelle 14).

Tabelle 14: Verwendete ELISA-Kits

CCL2 / MCP-1	R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
CCL5 / RANTES	R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
CXCL10 / IP 10	R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
KIM-1 / HACVR	R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden

Zunächst wurden der *Capture Antibody* auf die Arbeitskonzentration mit PBS nach Herstellerangaben verdünnt und der Waschpuffer sowie die Reagenzverdünnungslösung hergestellt. 100 µl des verdünnten *Capture Antibody* wurden in jedes Well der 96-Well Platte aufgetragen. Die Platte wurde lichtgeschützt abgedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer (siehe Tabelle 15) gewaschen und anschließend durch Ausklopfen auf Papiertüchern getrocknet. Danach wurde jede Vertiefung der Platte mit 200 µl Reagenzverdünnungslösung (siehe Tabelle 15) versetzt

und für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Die Platte wurde daraufhin wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Standardreihe mit dem jeweiligen Antigen in bekannter Konzentration und die Verdünnungen der Proben wurden mit Reagenzverdünnungslösung erstellt. Anschließend wurde die Standardreihe und die Proben mit je 100 µl im Doppelansatz auf die Platte aufgetragen. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Platte wurde der *Detection Antibody* mit 100 µl pro Well im Doppelansatz aufgetragen. Wieder wurde die Platte dreimal gewaschen.

Beim CCL2 / MCP-1 ELISA-Kit konnte direkt 100 µl TMB in jedes Well pipettiert werden, da ein HRP-gekoppelter *Detection Antibody* verwendet wurde. Bei den ELISA-Kits für die weiteren Zielmoleküle erfolgte vor der Zugabe von TMB noch die Zugabe von 100 µl Streptavidin-HRP-Lösung (zuvor verdünnt mit Reagenzverdünnungslösung nach Herstellerangaben) in jedes Well. Danach erfolgte eine Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur mit anschließendem dreimaligem Waschen der Platte.

Nach Zugabe von TMB wurde die Platte für weitere 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde 2 molare Schwefelsäure mit 50 µl in jedes Well pipettiert, und die Farbreaktion zu beenden. Anschließend wurde die Absorption von jedem Well bei 590 nm mit einem ELISA-Reader gemessen.

Aus den Absorptionswerten der Standardreihe mit bekannten Konzentrationen des Zielproteins wurde die Standardkurve ermittelt. Mit Hilfe der Standardkurve konnte aus der gemessenen Absorption jeder Probe die tatsächlich vorliegende Protein-Konzentration in der Probe berechnet werden.

Tabelle 15: Reagenzverdünnungslösung und Waschpuffer

Reagenzverdünnungslösung :	• 5 g BSA • 500 ml PBS
Waschpuffer:	• 500 µl TWEEN 20 • 1 l PBS

2.6 Histologie

2.6.1 Aufbereitung des Nierengewebes und histologische Färbungen

Das Nierengewebe wurde direkt nach Entnahme in Histologiekassetten für 24 Stunden in 10%-Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Mit einem Mikrotom wurden anschließend 2 µm dicke Schnitte angefertigt. Danach wurden die Schnitte auf einen mit Ammoniumpersulfat (APES) vorbehandelten Objektträger aufgetragen und in einem Trockenschrank 12 Stunden lang bei einer Temperatur von 37°C getrocknet.

Vor jedem Färben wurde das Paraffin mit Xylol (3x 5 Minuten) und einer absteigenden Alkoholreihe (3x 3 Minuten 100%, 2x 3 Minuten 95%, 1x 3 Minuten 70% Ethanol) ausgewaschen. Danach wurde mit PBS (2x 5 Minuten) gewaschen.

Für die Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurden die entparaffinierten Nierenschnitte 5 Minuten lang in Hämalun verbracht und anschließend zum Bläuen in Wasser überführt. Danach wurden die Schnitte in 2% Eosin-Lösung 5 Minuten lang gefärbt. Anschließend erfolgte die Dehydratation durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol. Abschließend wurden die Schnitte mit Deckplättchen abgedeckt.

Für die Periodic Acid Schiff (PAS)-Färbung wurden die Schnitte zunächst 5 Minuten lang in Perjodsäure (4 g Perjodsäure in 200 ml destilliertes Wasser) inkubiert und anschließend für 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung für 20 Minuten in fuchsin-schwefeliger Säure (Schiff'sches Reagenz) mit anschließendem Waschen. Die Gegenfärbung erfolgte 2 Minuten lang in Hämatoxylin. Letztlich wurden die Schnitte kurz in 90% Alkohol getaucht und nach dem Trocknen mit einem Deckplättchen abgedeckt.

Für die Masson-Trichrom-Färbung wurden die Schnitte in Bouin-Lösung bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Nierenschnitte in Wasser gewaschen und in Weigert Eisenhämatoxylin-Lösung 15 Minuten lang gefärbt. Es erfolgte ein erneuter Waschschriff mit destilliertem Wasser für 15 Sekunden und mit fließendem Wasser für 10 Minuten. Danach erfolgte eine Färbung mit Säurefuchsin-Ponceau-Azophloxin für 4 Minuten. Danach wurden die Schnitte mit einigen Tropfen 1% Essigsäure versehen. Anschließend erfolgte eine Färbung mit Phosphormolybdänsäure Orange G für 30 Minuten und eine erneute Ansäuerung mit einigen Tropfen 1% Essigsäure. Die Nierenschnitte wurden daraufhin für 9 Minuten mit Lichtgrün-Goldner III gefärbt und wieder angesäuert mit 1% Essigsäure. Abschließend wurden die Schnitte gewaschen und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (3x

3 Minuten 70%, 2x 3 Minuten 95%, 1x 3 Minuten 100%) und Xylol (3x 5 Minuten) dehydriert. Nach dem Trocknen wurden die Nierenschnitte mit einem Deckplättchen abgedeckt.

2.6.2 Immunhistochemie

Für die Färbungen der Immunhistochemie wurde das Avidin/Biotin Blocking Kit mit folgendem Funktionsprinzip verwendet: Nach der Bindung des Primär-Antikörpers an das zu untersuchende Antigen folgt die Bindung an einen Sekundär-Antikörper, der an Biotin gekoppelt ist. Anschließend bildet das an Peroxidase gekoppelte Avidin mit dem Biotin einen hochaffinen Komplex. Die Peroxidase katalysiert das Farbsubstrat und führt so zu einem Farbumschlag, der in der Mikroskopie sichtbar wird.

Für die immunhistologischen Färbungen wurden die entparaffinierten Nierenschnitte 20 Minuten lang in 20 ml H₂O₂-Methanol-Mix (30% H₂O₂ 1:10 in Methanol) im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgten 2 Waschschriffe mit PBS für 5 Minuten. Danach wurden die Schnitte in Antigen-Demaskierungslösung überführt und für 10 Minuten in der Mikrowelle gekocht. Alle 2,5 Minuten wurde der Flüssigkeitsgehalt kontrolliert und bei Bedarf auf das ursprüngliche Niveau aufgefüllt. Anschließend wurden die Nierenschnitte abgekühlt und mit PBS gewaschen. Schließlich wurden sie für 15 Minuten in einem Tropfen Avidin inkubiert, mit einer anschließenden 15 Minuten dauernden Inkubation in Biotin, um im Gewebe vorhandene unspezifische Bindungssellen zu blockieren

Danach erfolgte die Inkubation je nach Primär-Antikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer. Es wurden die folgenden Primär-Antikörper und Antikörperkonzentrationen verwendet: Für den Nachweis von T-Lymphozyten Ratte anti-Mensch CD3 (kreuzreagierend mit Maus-CD3, Klon CD3-12,1:100; für den Nachweis von Makrophagen Ratte anti-Maus F4/80, Klon Cl:A3-1, 1:100; für den Nachweis von neutrophilen Granulozyten Ratte anti-Maus Ly-6B.2, Klon 7/4, 1:50; und für Myofibroblasten Maus anti-Maus α SMA, Klon 1A4, 1:300. Nach einem Waschschriff wurden die Schnitte anschließend 30 Minuten lang mit biotinylierten Sekundär-Antikörpern (Verdünnung: 1:300) inkubiert. Die Anfärbung proximaler Tubuluszellen erfolgte mit biotinyliertem-Tetragonolobus-Lektin, 1:100. Danach wurden die Schnitte bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer für 30 Minuten mit ABC-Substrat-Lösung inkubiert. Abschließend wurden die Nierenschnitte mit Methylgrün gegengefärbt. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte jeweils für 2x 5 Minuten in PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte noch einmal mit 96% Alkohol gewaschen, getrocknet und mit VectaMount fixiert.

2.6.3 Histologische Auswertung

Sämtliche histologische Auswertungen erfolgten verblindet.

Um das Ausmaß des tubulären Schadens zu bestimmen, wurde der tubuläre Schadens-Score in der PAS-Färbung ermittelt. Dabei wurde unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung die kortikomedulläre Übergangsregion der gesamten Niere betrachtet und folgende Faktoren semiquantitativ mit einer Punktzahl von 0 bis 3 ausgewertet: Denudation, Zellabflachung, Vorhandensein tubulärer Zylinder und tubuläre Atrophie. Die Summe der Punkte aller Faktoren ergab den tubulären Schadens-Score.

Um das Ausmaß der interstitiellen Fibrose zu bestimmen, wurde der interstitielle Volumen-Index in der PAS-Färbung ermittelt. Hierfür wurden zunächst pro Niere 10 Gesichtsfelder mit 100-facher Vergrößerung digital fotografiert. Anschließend wurde über jedes Bild ein Netz bestehend aus 10 x 10 Punkten gelegt. Der Anteil der Punkte, die über dem Interstitium lagen ergaben den interstitiellen Volumen-Index.

Für die CD3- und Neutrophilen-Auswertung wurden pro Niere 10 Gesichtsfelder aus der kortikomedullären Übergangsregion in einer 400-fachen Vergrößerung ausgewertet und hierbei die CD3- bzw. Neutrophilen gefärbten Zellen pro Gesichtsfeld ausgezählt.

Für die F4/80- und α SMA-Auswertung wurden pro Niere 10 Gesichtsfelder aus der kortikomedullären Übergangsregion in einer 100-fachen Vergrößerung digital fotografiert. Für jedes Bild wurde anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware *Image J* der prozentuale Anteil gefärbter Fläche berechnet.

Für die Lektin-Auswertung wurden die Nieren in 25-facher Vergrößerung mit jeweils 4 Fotos digital abfotografiert. Für jedes Bild wurde anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware *Image J* der prozentuale Anteil gefärbter Fläche bestimmt.

Für die Masson-Trichrom-Auswertung zur Quantifizierung Kollagen-reicher extrazellulärer Matrix wurden pro Niere 10 Gesichtsfelder aus der kortikomedullären Übergangsregion in einer 100-fachen Vergrößerung digital fotografiert. Für jedes Bild wurde anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware *Image J* der prozentuale Grünanteil berechnet. Hierfür wurde zunächst in einer Probeaufnahme der Farbbereich definiert, der das Trichrome-positive Signal am Besten wiedergab.

2.7 Statistik

Die Daten sind als Mittelwert und Standardfehler (Standard Error of the Mean, SEM) dargestellt. Die Ergebnisse der in vitro-Experimente sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen, die Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen Mittelwerte von 5 bis 9 Tieren je Versuchsgruppe. Unterschiede zwischen zwei experimentellen Gruppen wurden mithilfe des Zweistichproben-t-Tests verglichen. p-Werte von $<0,05$ (*), $<0,01$ (**) und $<0,001$ (***) wurden als signifikant angesehen. Die Berechnung und Darstellung erfolgte mit den Statistik-Programmen *Microsoft® Excel 2019* und *GraphPad® Prism 5.0*.

3 Ergebnisse

3.1 Renale Expression von ACKR2 in der Maus

Um die Rolle von ACKR2 nach Ischämie-Reperfusionsschaden in der Niere der Maus zu charakterisieren, wurde die mRNA-Expression von *Ackr2* in gesunden Nieren und in postischämischen Nieren 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden sowie 5 Tage und 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden gemessen. Im Vergleich zu normalen Nieren war die mRNA-Expression von *Ackr2* nach 24 Stunden um das 9,8-, nach 5 Tagen um das 18,1- und nach 5 Wochen um 13,2-fache erhöht. Im Gegensatz dazu war weder in gesunden noch postischämischen *Ackr2*-defizienten Nieren eine Expression von ACKR2 nachweisbar.

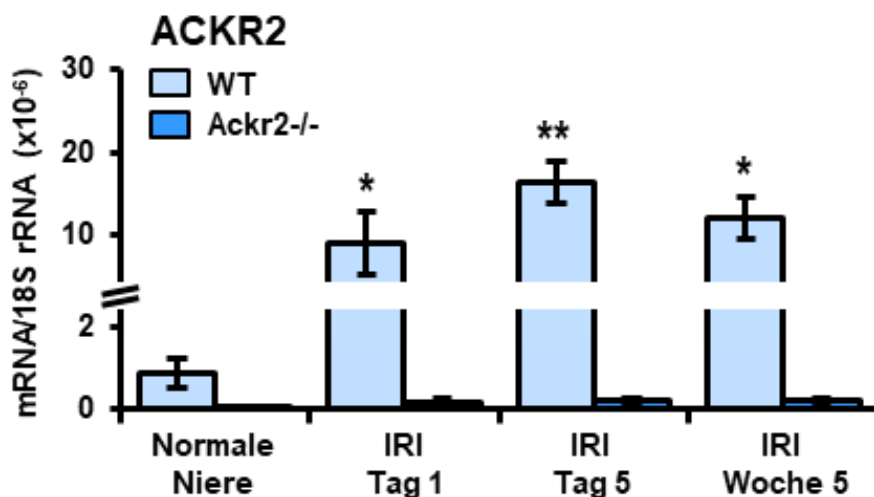


Abbildung 17: Expression von ACKR2-mRNA in der Niere der Maus

1, 3 und 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden ist die mRNA von *Ackr2* in den postischämischen Nieren im Vergleich zu gesunden Kontrollnieren deutlich induziert. In *Ackr2*-defizienten Nieren konnte keine signifikante Expression von *Ackr2*-mRNA nachgewiesen werden. Die PCR-Ergebnisse wurden ins Verhältnis zu 18S rRNA als Housekeeping Gen gesetzt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 10 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01.

Des Weiteren wurde in Kooperation mit Herrn Prof. Hermann-Josef Gröne, Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie, Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg durch eine *In situ*-Hybridisierung *Ackr2*-mRNA in gesunden und postischämischen Nieren lokalisiert.

Wie in *Abbildung 18* erkennbar, zeigte sich die *Ackr2*-mRNA spezifisch auf Endothelzellen des Tubulointerstitiums exprimiert. Diese Endothelzellen konnten zurückliegend bereits als LYVE-1-positive lymphatische Endothelzellen identifiziert werden (144).

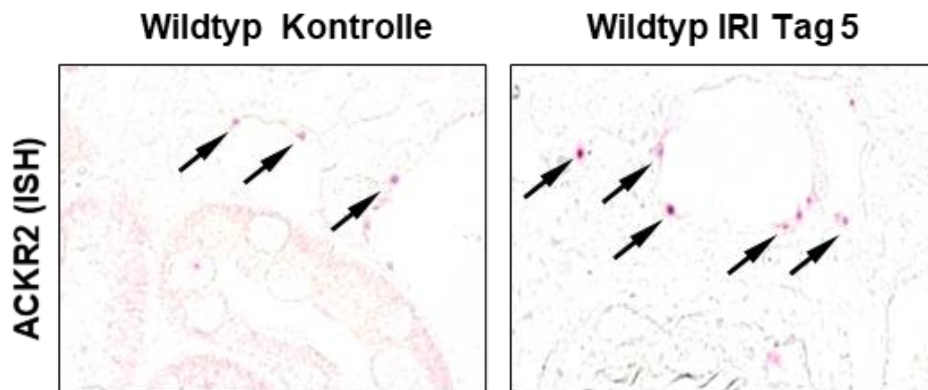


Abbildung 18: Lokalisation von *Ackr2*-mRNA auf lymphatischen Endothelzellen des Tubulointerstitiums der Mausniere

Die *In situ*-Hybridisierung zeigt die renale Expression von *Ackr2*-mRNA-Transkripten (rote Signale hervorgehoben durch Pfeile) auf lymphatischen Endothelzellen im Interstitium von gesunden Wildtyp-Mäusen und etwas deutlicher in postischämischen Nieren 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI). Originalvergrößerung: x400.

Zusammengefasst weisen diese Daten darauf hin, dass auf tubulointerstitiellen lymphatischen Endothelzellen exprimierter ACKR2 Chemokine im tubulointerstitiellen Kompartiment abbauen kann und somit eine funktionelle Rolle bei der Begrenzung der inflammatorischen Reaktion in der Niere nach Ischämie-Reperfusionsschaden spielen könnte.

3.2 Die Rolle von ACKR2 im akuten Verlauf nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden

3.2.1 Nierenfunktion und struktureller Schaden

Zur Untersuchung der Rolle von ACKR2 in der akuten Phase nach Ischämie-Reperfusionsschaden in der Niere wurden bei den Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen die Nierengefäße bilateral für 30 Minuten abgeklemmt. Nach 24 Stunden wurde den Tieren die Nieren entnommen.

Um das Ausmaß der Nierenfunktionseinschränkung 24 Stunden nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden zu bestimmen, wurden die Nierenfunktionsparameter im Serum untersucht. Hierzu wurde die Konzentration von Kreatinin und Harnstoff im Serum gemessen. Sowohl bei Wildtyp- als auch bei Ackr2-defizienten Tieren zeigte sich nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren eine manifeste Niereninsuffizienz mit einem deutlichen Anstieg von Harnstoff und Kreatinin im Serum. Zwischen den Wildtyp und den Ackr2-defizienten Tieren war jedoch kein Unterschied zu verzeichnen (*Abbildung 19*). Eine Ackr2-Defizienz hatte somit keine Auswirkung auf den Funktionsverlust 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden an der Niere.

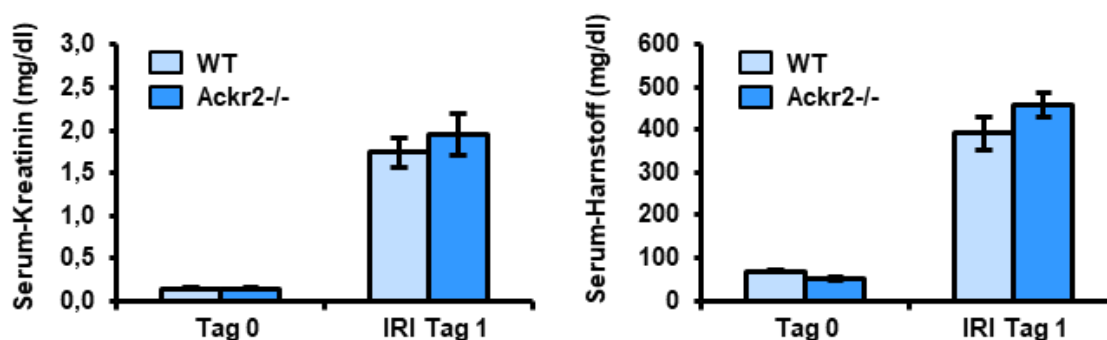


Abbildung 19: Nierenfunktionsparameter 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) sind die Werte von Harnstoff und Kreatinin im Serum deutlich erhöht. Ein Unterschied zwischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten Mäusen zeigt sich sowohl zum Ausgangszeitpunkt als auch nach 24 Stunden nicht. Beide Nierenarterien wurden für 30 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 5$ bis 6 Mäuse je Gruppe.

Um zu untersuchen, inwieweit der Funktionsverlust der Nieren auch mit einem erhöhten strukturellen Schaden des Nierengewebes korreliert wurden 24 Stunden nach bilateralem

Ischämie-Reperfusionsschaden histologische Schnitte der Nieren nach PAS-Färbung ausgewertet. Der Ischämie-Reperfusionsschaden schädigt in der Niere vor allem das Tubulusepithel am Übergang von Nierenkortex und Nierenmark. Um das Ausmaß der tubulären Schädigung in den Nieren zu bestimmen, wurde ein semiquantitativer tubulärer Schadens-Score bestimmt. Hierbei wurde die Atrophie des Tubulusepithels, intratubuläre Zylinder, Denudation und eine Abflachung der Tubuluszellen in der kortikomedullären Übergangsregion erfasst. Sowohl in den Wildtyp- als auch in den Ackr2-defizienten Tieren konnte ein deutlicher Schaden in den Tubuli der Nieren nachgewiesen werden. Hierbei unterschieden sich die beiden Genotypen jedoch nicht (*Abbildung 20*).

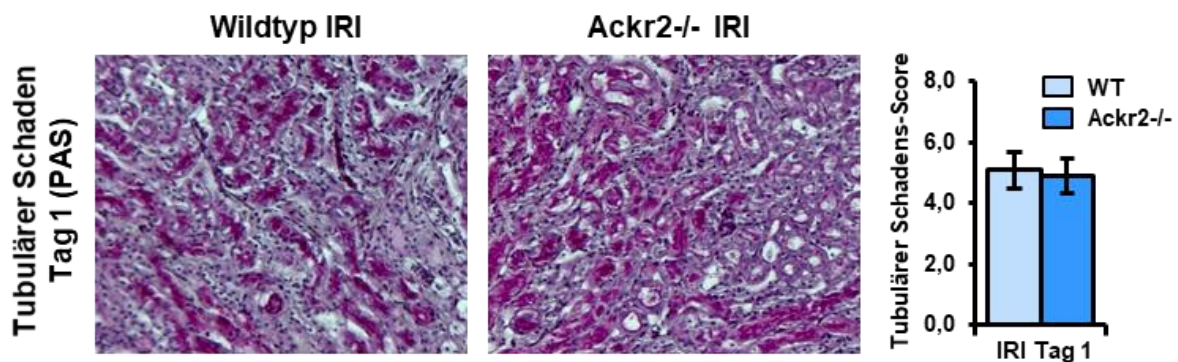


Abbildung 20: Tubulärer Schaden 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden.

24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist der tubuläre Schaden bei Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten Nieren vergleichbar. Der tubuläre Schaden wurde semiquantitativ in PAS (Periodic Acid-Schiff)-gefärbten Nierenschnitten wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. Beide Nierenarterien wurden für 30 Minuten abgeklemmt. Abgebildet sind repräsentative histologische Schnitte. Originalvergrößerung: x200. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 6 Mäuse je Gruppe

Zur weiteren Untersuchung des strukturellen Schadens nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden wurde die renale Protein- und mRNA-Expression des tubulären Schadenmarkers KIM-1 bestimmt. Analog zur Histologie ergab sich zwischen den postischämischen Nieren der Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen hierbei kein Unterschied (*Abbildung 21A*).

24 Stunden nach bilateralem renalem Ischämie-Reperfusionsschaden korreliert somit der renale Funktionsverlust mit dem Ausmaß des strukturellen Schadens des Nierengewebes. Eine Ackr2-Defizienz beeinflusst zu diesem Zeitpunkt die Ausprägung der akuten Nierenschädigung nicht.

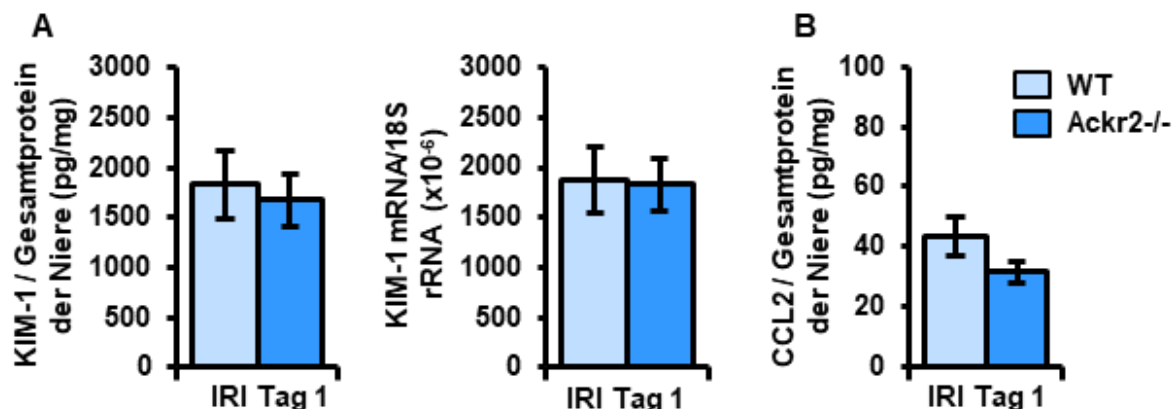


Abbildung 21: Renale Schadensmarker und renale Chemokinkonzentrationen 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden

A: 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist die Expression des tubulären Schadensmarker KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1) in Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten Nierenvergleichbar. Hierfür wurde sowohl die renale Proteinkonzentration als auch die mRNA-Expression von KIM-1 gemessen. **B:** Ebenso zeigt sich in der renalen Proteinkonzentration des Chemokines CCL2 (C-C Motiv Ligand 2) zwischen den beiden Genotypen kein Unterschied. Beide Nierenarterien wurden für 30 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 6 Mäuse je Gruppe.

Wie zuvor beschrieben ist ACKR2 ein Scavenger Receptor, der in der Lage ist, eine Vielzahl von proinflammatorischen CCL-Chemokinen zu internalisieren und sie anschließend intrazellulär abzubauen. Entsprechend der Arbeitshypothese könnte somit eine Ackr2-Defizienz über einen verminderten Abbau von proinflammatorischen CCL-Chemokinen zu einer verstärkten renalen Entzündungsreaktion mit erhöhter Leukozyteninfiltration zu einem erhöhten funktionellen und strukturellen Schaden der Niere führen. Daher wurde als nächstes die renale Protein-Konzentration des proinflammatorischen Chemokins CCL2 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden bestimmt. Zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen zeigte sich hierbei kein Unterschied in der renalen Konzentration von CCL2 (Abbildung 21B).

3.2.2 Akkumulation von intrarenalen Leukozyten

Um die Akkumulation von Leukozyten in der Niere zu bestimmen, wurde 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden das Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration

zunächst durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden aus dem entnommenen Nierengewebe Einzellzellsupensionen erstellt und mit verschiedenen Oberflächenmarken für Leukozyten gefärbt.. Sowohl in den Wildtyp- als auch in den Acker2-defizienten Mäusen konnte in den postischämischen Nieren 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden im Vergleich zu gesunden Kontrollnieren ein deutlicher Anstieg der Gesamtleukozyten und deren Subpopulationen verzeichnet werden, mit Ausnahme der CD3+ T-Lymphozyten. Bei den gesunden Kontrollnieren gab es keinerlei Unterschied zwischen Wildtyp- und Acker2-defizienten Tieren bezüglich der renalen Leukozytenzahl. In den postischämischen Nieren der Acker2-defizienten Tieren zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp-Tieren jedoch ein signifikanter Anstieg in der Subpopulation der CD11+ F4/80+ mononukleären Phagozyten. Die Anzahl der CD45+ Gesamtleukozyten, der CD3+ T-Lymphozyten und der Ly6G+ neutrophilen Granulozyten unterschied sich zwischen den Wildtyp- und Acker2-defizienten postischämischen Nieren jedoch nicht (*Abbildung 22*).

Um die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zu bestätigen wurden immunhistologische Schnitte angefertigt und mit Antikörpern für neutrophile Granulozyten, F4/80+ Phagozyten und CD3+ T-Lymphozyten gefärbt. Hierbei zeigte sich analog zur Durchflusszytometrie kein Unterschied in der Akkumulation von CD3+ T-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in den postischämischen Nieren von Wildtyp- und Acker2-defizienten Tieren 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden. In den postischämischen Nieren der Acker2-defizienten Mäuse konnte im Vergleich zum Wildtyp ein Trend zu einer vermehrten tubulointerstitiellen Infiltration von F4/80+ Phagozyten verzeichnet werden, dieser war jedoch statistisch nicht signifikant (*Abbildung 23*).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass Acker2-Defizienz das Ausmaß der akuten Nierenfunktionseinschränkung und den initialen strukturellen renalen Schaden 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden nicht beeinflusst. Zu diesem frühen Zeitpunkt führt Acker2-Defizienz jedoch bereits zu einer vermehrten renalen Akkumulation von einigen Subpopulationen mononukleärer Phagozyten. Dies könnte auf systemische Effekte von ACKR2 zurückzuführen sein, da die Konzentration von proinflammatorischen Chemokinen wie CCL2 in Acker2-defizienten postischämischen Nieren zu diesem Zeitpunkt nicht erhöht war.

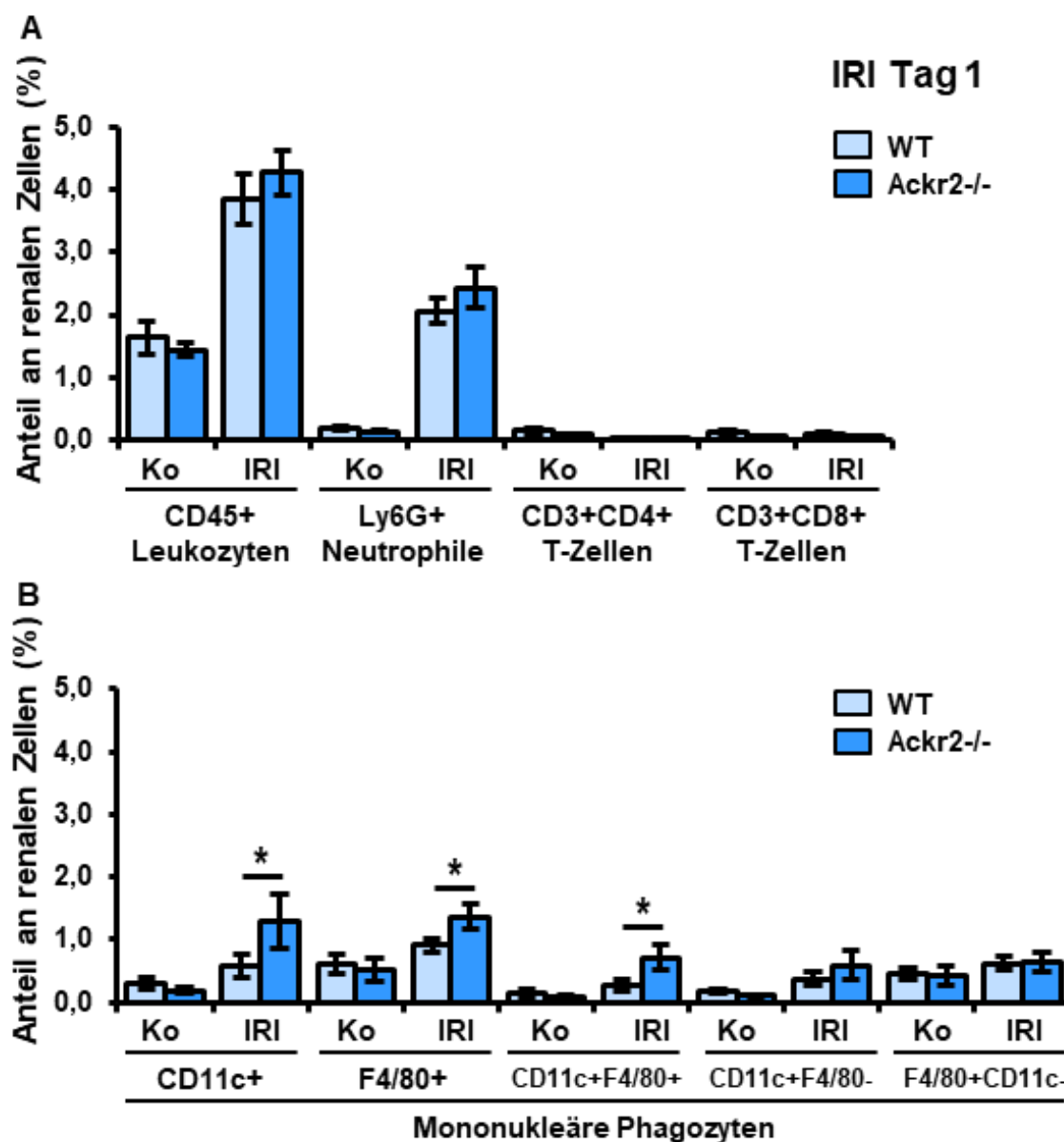


Abbildung 22: Renale Leukozyteninfiltration 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden

A: 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist die Akkumulation der CD45⁺ Gesamtleukozyten und der Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollnieren (Ko) deutlich erhöht. Eine vermehrte Akkumulation von CD3⁺ T-Lymphozyten kann nicht nachgewiesen werden. Ein Unterschied zwischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten Nieren besteht nicht. **B:** 24 Stunden nach bilateralem IRI ist die Akkumulation der mononukleären Phagozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollnieren erhöht. In den postischämischen Nieren Ackr2-defizienter Mäusen kann dabei eine vermehrte Akkumulation von F4/80⁺ CD11c⁺ mononukleären Phagozyten im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. Die Akkumulation von intrarenalen Leukozyten wurde durch die Durchflusszytometrie von renalen Einzelzellsuspensionen bestimmt. Beide Nierenarterien wurden für 30 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM, n = 5 bis 6 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05.

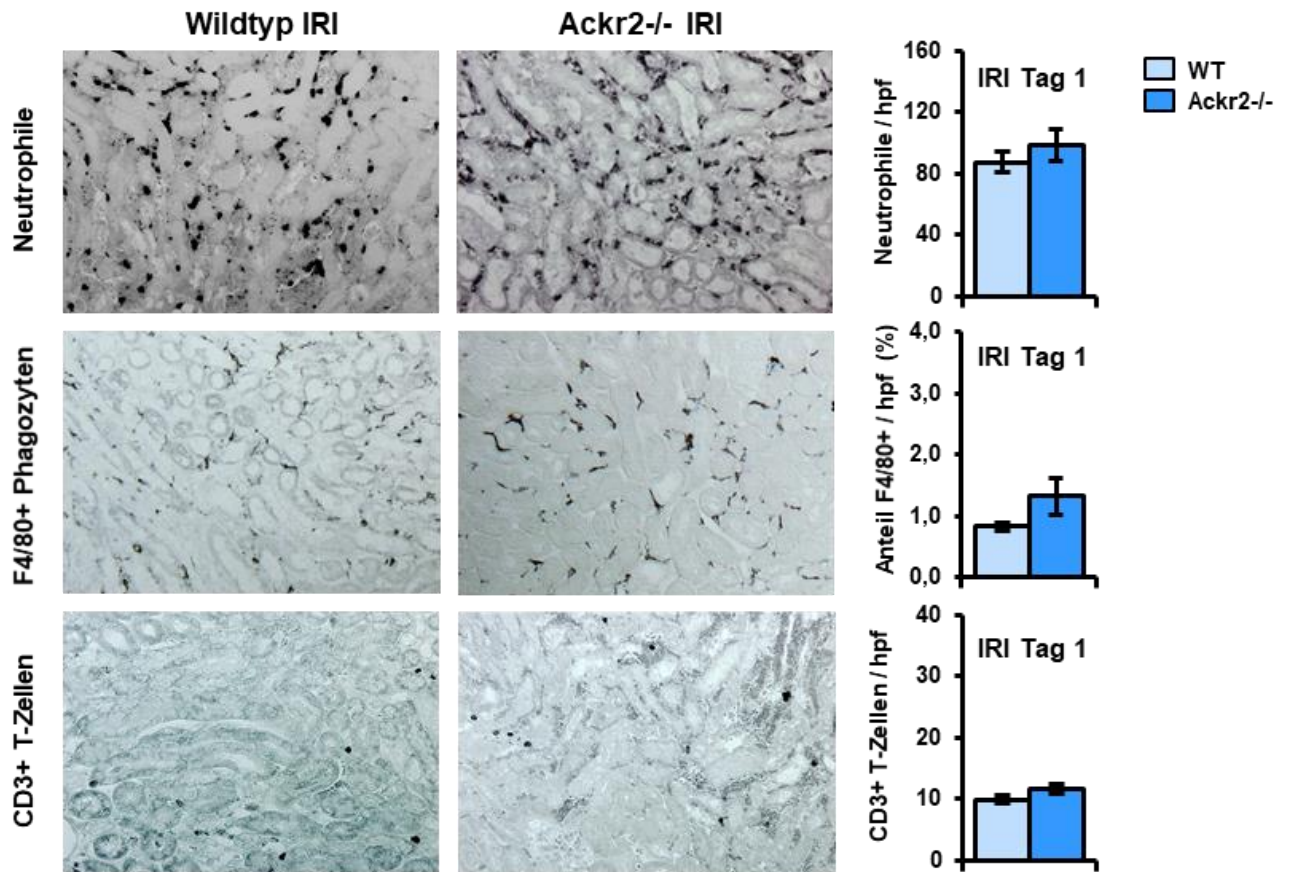


Abbildung 23: Immunhistologischer Nachweis von intrarenalen Leukozyten 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden

24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) zeigt sich zwischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten Mäusen kein Unterschied in der renalen Akkumulation von Ly-6B.2⁺ neutrophilen Granulozyten, F4/80⁺ interstitiellen mononukleären Phagozyten sowie CD3⁺ T-Zellen in der immunhistologischen Untersuchung der Niere. Die Quantifizierung der intrarenalen Leukozytenakkumulation erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Abgebildet sind repräsentative immunhistologische Schnitte. Originalvergrößerung: x200 für neutrophile Granulozyten und F4/80⁺ Phagozyten, x400 für CD3⁺ T-Zellen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 6 Mäuse je Gruppe.

3.3 Die Rolle von ACKR2 im subakuten Verlauf nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden

3.3.1 Struktureller Schaden

Eine vermehrte Akkumulation von Leukozyten in postischämischen Nieren Ackr2-defizienter Tiere könnte in der frühen Erholungsphase nach Ischämie-Reperfusionsschaden zu einem vermehrten renalen Schaden führen. Daher wurde als nächstes untersucht, ob Ackr2-Defizienz 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden den strukturellen Nierenschaden verstärkt. Hierfür wurde bei Wildtyp und Ackr2-defizienten Tieren für 45 Minuten die Nierengefäße einseitig abgeklemmt und nach 5 Tagen den Tieren die Nieren entnommen. Ein 5-tägiger Beobachtungszeitraum nach beidseitiger Induktion des Ischämie-Reperfusionsschadens ist aufgrund des hierdurch induzierten Nierenversagens und der eintretenden Urämiekomplikationen nicht möglich, so dass zur Untersuchung des subakuten Verlaufs das einseitige Ischämie-Reperusionsmodell gewählt wurde. Durch Kompensation des Nierenfunktionsverlusts durch die gesunde kontralaterale Niere ist in diesem Modell allerdings über Messung der Nierenretentionsparameter keine genaue Aussage über die Einschränkung der Nierenfunktion durch die geschädigte postischämische Niere möglich.

Das Ausmaß des strukturellen Schadens 5 Tagen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden wurde histologisch bestimmt. In der PAS-Färbung wurde hierfür der tubuläre Schadens-Score bestimmt. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu den gesunden kotralateralen Nieren ein deutlicher tubulärer Schaden in Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren, der sich zwischen den beiden Genotypen jedoch nicht unterschied (*Abbildung 24*). Um eine Vergrößerung des interstitiellen Volumens als Anzeichen einer möglicherweise beginnenden Fibrosierung des Nierengewebes zu erfassen, wurde in der PAS-Färbung der interstitielle Volumen-Index bestimmt. Bezüglich der Größe des interstitiellen Volumens zeigte sich hier ebenfalls kein Unterschied zwischen postischämischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Nieren 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden (*Abbildung 24*).

Zur Quantifizierung eines möglichen Verlusts an Tubuli wurden histologische Schnitte mit Lektin-Färbung angefertigt. Diese Lektin-Färbung färbt selektiv das proximale Tubulusepithel der Nieren. Eine Verminderung des Lektin-positiven Anteils am gesamten Nierengewebe entspricht somit dem Verlust an proximalen Tubuli. Hierbei konnte jedoch weder zwischen postischämischen und kontralateralen, nichtischämischen Nieren noch zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Nieren ein Unterschied gesehen werden (*Abbildung 24*).

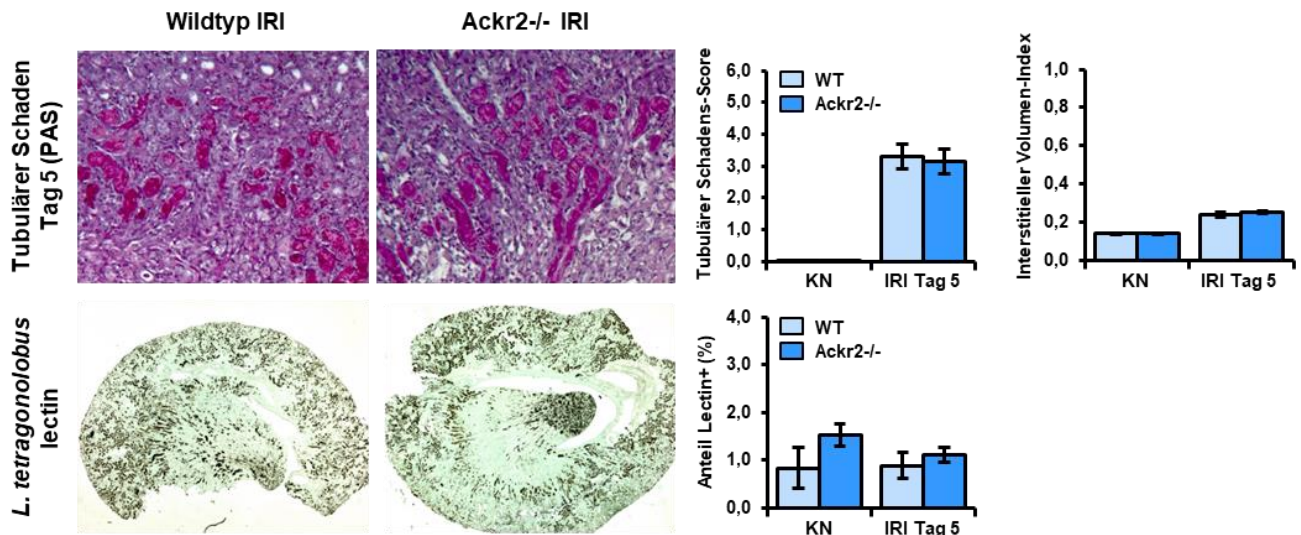


Abbildung 24: Tubulointerstitieller Schaden 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist der tubuläre Schaden, das interstitielle renale Volumen und die proximale Tubulusepithelzahl bei Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten postischämischen Nieren vergleichbar. In den als Kontrolle dienenden kontralateralen Nieren (KN) ist kein tubulärer Schaden nachweisbar. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren kommt es 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden zu keinem relevanten Verlust an Tubuli. Der tubuläre Schaden sowie das interstitielle Volumen wurden semiquantitativ in der Periodic Acid-Schiff (PAS)-Färbung, der Verlust an Tubuli durch Quantifizierung des selektiv mit Lotus tetragonolobus-Lektin angefärbten proximalen Tubulusepithels wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Abgebildet sind repräsentative histologische Schnitte. Originalvergrößerung: x100 für die PAS-Färbung, x25 für die Lotus tetragonolobus-Lektin-Färbung. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 8 Mäuse je Gruppe.

Zur weiteren Untersuchung des strukturellen Schadens wurde auf Proteinebene der tubuläre Schadensmarker KIM-1 (und auf mRNA-Ebene neben Kim-1 die Expression der renalen Schadensmarker Ng2 und *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2* (Timp2) () bestimmt. Interessanterweise war die Protein-Konzentration des tubulären Schadensmarkers KIM-1 in postischämischen Nieren der Ackr2-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht (Abbildung 25). Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich eine vermehrte Expression der Schadensmarker Kim-1, Ng2 und Timp2 in den Nieren von Ackr2-defizienten Tieren 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden (Abbildung 26). Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren lag in den postischämischen Nieren in beiden Gruppen eine deutlich erhöhte Expression der Schadensmarker auf Protein- und mRNA- und Ebene vor.

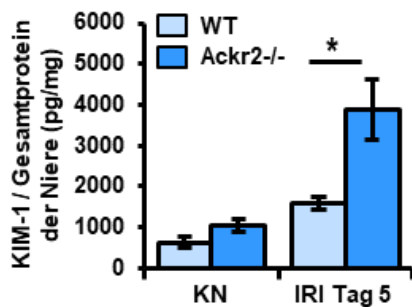


Abbildung 25: Tubulärer Schadensmarker KIM-1 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist die Proteinkonzentration des tubulären Schadensmarker KIM-1 (Kidney Injury Molecule-1) in postischämischen Ackr2-defizienten Nieren im Vergleich zum Wildtyp (WT) signifikant erhöht. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich in den postischämischen Nieren ein deutlicher Anstieg. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 5$ bis 8 Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$.

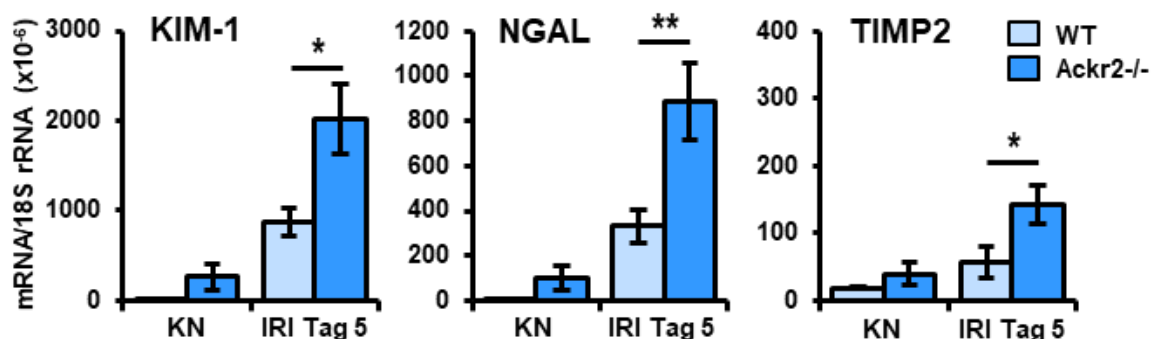


Abbildung 26: mRNA-Expression der tubulären Schadensmarker Kim-1, Ngai und Timp2 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist die mRNA-Expression der tubulären Schadensmarker Kim-1 (Kidney Injury Molecule-1), Ngai (Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin) und Timp2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2) in postischämischen Ackr2-defizienten Nieren im Vergleich zum Wildtyp (WT) erhöht. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich in den postischämischen Nieren ein deutlicher Anstieg. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 5$ bis 8 Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

An Tag 5 nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist die Expression tubulärer Schadensmarker in Ackr2-defizienten postischämischen Nieren im Vergleich zum Wildtyp somit deutlich erhöht. Im Gegensatz dazu zeigten sich histologisch keine Unterschiede im Ausmaß des tubulären Schadens, der Fibrosierung und in der Zahl proximaler Tubuli zwischen den beiden Genotypen. Insgesamt weisen diese Daten jedoch auf einen beginnenden stärkeren subakuten Tubulusschaden in postischämischen Nieren Ackr2-defizienter Mäuse fünf Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden hin.

3.3.2 Akkumulation von intrarenalen Leukozyten

Um das Ausmaß der Leukozyteninfiltration an Tag 5 nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden zu quantifizieren, wurde das Nierengewebe durchflusszytometrisch analysiert. Bei den kontralateralen, nichtischämischen Nieren ergab sich bei sämtlichen Leukozytenpopulationen kein Unterschied zwischen Wildtyp und Ackr2-defizienten Tieren. In den Ackr2-defizienten ischämischen Nieren konnten jedoch signifikant mehr neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Auch sämtliche mononukleäre Phagozytenpopulationen mit Ausnahme von klassischen CD11c⁺ F4/80⁻ dendritischen Zellen waren bei Ackr2-Defizienz vermehrt nachweisbar. Am eindrucklichsten zeigte sich dies bei den F4/80⁺ mononukleären Phagozyten. Bezüglich der CD3⁺ T-Lymphozyten ergab sich keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Ackr2-defizienten Tieren (*Abbildung 27*).

Ergänzend zur Durchflusszytometrie wurde die renale Leukozytenakkumulation 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden immunhistologisch untersucht. Auch hier zeigten sich vermehrt neutrophile Granulozyten und F4/80⁺ Phagozyten in den ischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Diese Zellen konnten in der Immunhistologie in der kortikomedullären Übergangsregion lokalisiert werden, welche wie zuvor beschrieben der Ort des ausgeprägtesten ischämischen Tubulusschadens ist. Wie auch in der Durchflusszytometrie war in der Immunhistologie kein Unterschied bei der Zahl akkumulierender CD3⁺ T-Lymphozyten zwischen Wildtyp und Ackr2-defizienten Tieren nachweisbar (*Abbildung 28*).

Zusammengefasst weisen diese Daten auf eine vermehrte renale Akkumulation von Granulozyten und mononukleären Phagozyten in Ackr2-defizienten Mäusen 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden hin, die mit einem stärkeren Anstieg tubulärer Schadensmarker als Hinweis auf eine ausgeprägtere renale Schädigung als im Wildtyp einherging.

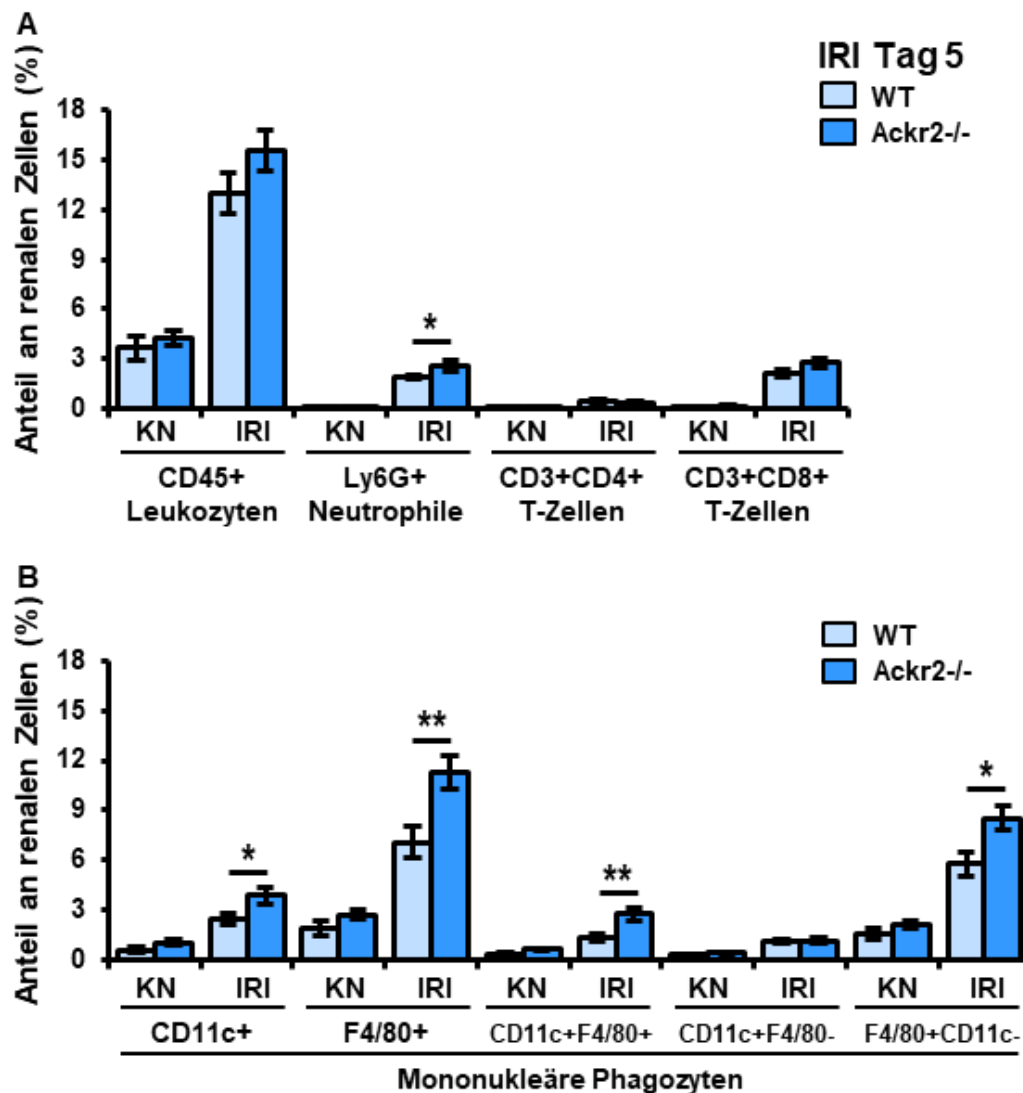


Abbildung 27: Renale Leukozyteninfiltration 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

A: 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist die Akkumulation der Ly6G⁺ neutrophilen Granulozyten in ischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) deutlich erhöht. Eine vermehrte Akkumulation der CD45⁺ Gesamtleukozyten und CD3⁺ T-Lymphozyten kann bei Ackr2-Defizienz nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich in den postischämischen Nieren ein deutlicher Anstieg der Leukozytenzahlen. **B:** 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist die Akkumulation der CD11c⁺ und F4/80⁺ mononukleären Phagozyten in ischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Lediglich eine vermehrte Akkumulation von CD11c⁺ F4/80⁻ dendritischen Zellen kann bei Ackr2-Defizienz nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren zeigt sich in den postischämischen Nieren ein deutlicher Anstieg der Leukozytenzahlen. Die Akkumulation von intrarenalen Leukozyten wurde durch die Durchflusszytometrie von renalen Einzelzellsuspensionen bestimmt. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 8 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01.

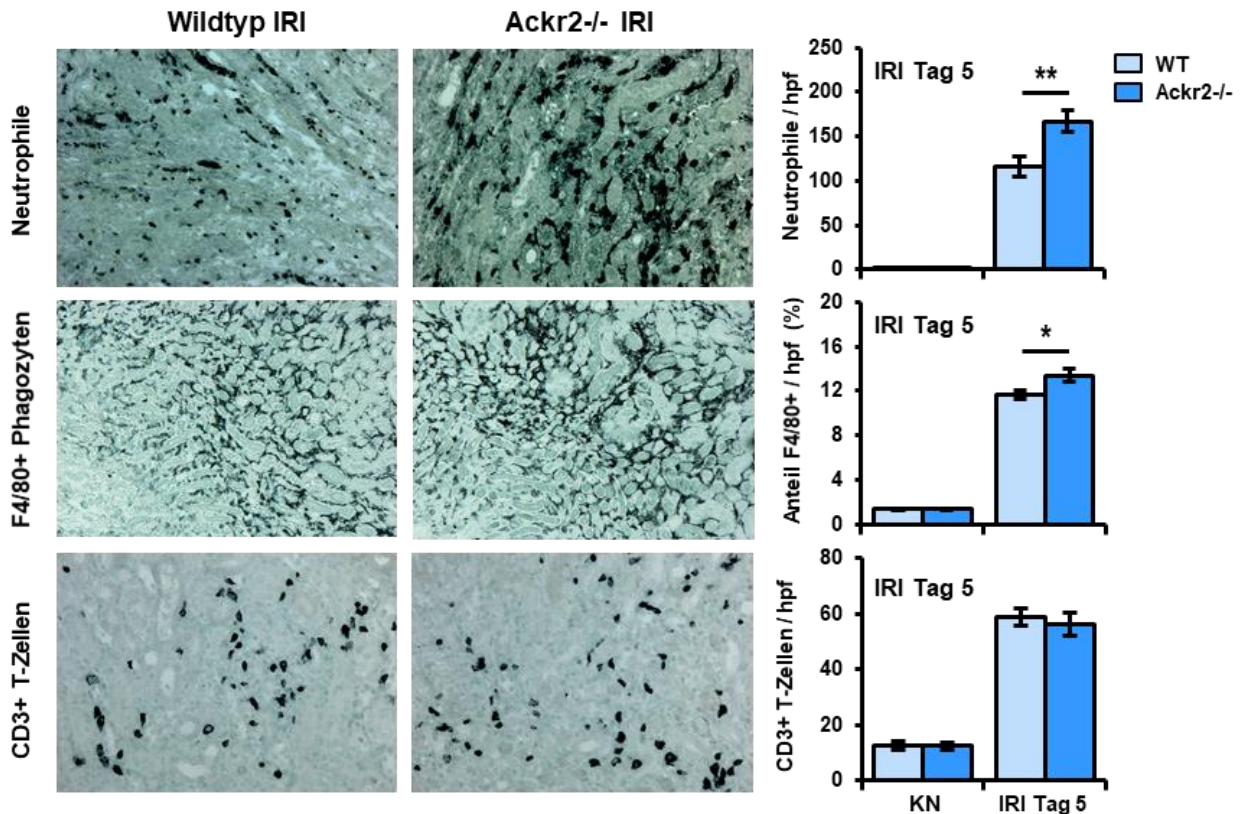


Abbildung 28: Immunhistologischer Nachweis von intrarenalen Leukozyten 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) zeigt sich in den postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp eine vermehrte Akkumulation von Ly-6B.2+ neutrophilen Granulozyten und F4/80+ interstitiellen mononukleären Phagozyten in der Immunhistologie der Nieren. Bezüglich der intrarenalen CD3+ T-Zellen besteht kein Unterschied zwischen den Genotypen. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich in den postischämischen Nieren eine deutlich vermehrte Akkumulation der Leukozyten. Die Quantifizierung der intrarenalen Leukozytenakkumulation erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Abgebildet sind repräsentative immunhistologische Schnitte. Originalvergrößerung: x200 für neutrophile Granulozyten und F4/80+ Phagozyten, x400 für CD3+ T-Zellen. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 8 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01.

3.3.3 Expression von renalen Chemokinen und inflammatorischen Markern

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration an proinflammatorischen Chemokinen in den postischämischen Nieren wurden entsprechende ELISA-Messungen durchgeführt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden zeigte sich an Tag 5 nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ein signifikant

vermehrter renaler Gehalt der proinflammatorischen Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 in postischämischen Nieren der Ackr2-defizienten Tiere im Vergleich zum Wildtyp (*Abbildung 29*).

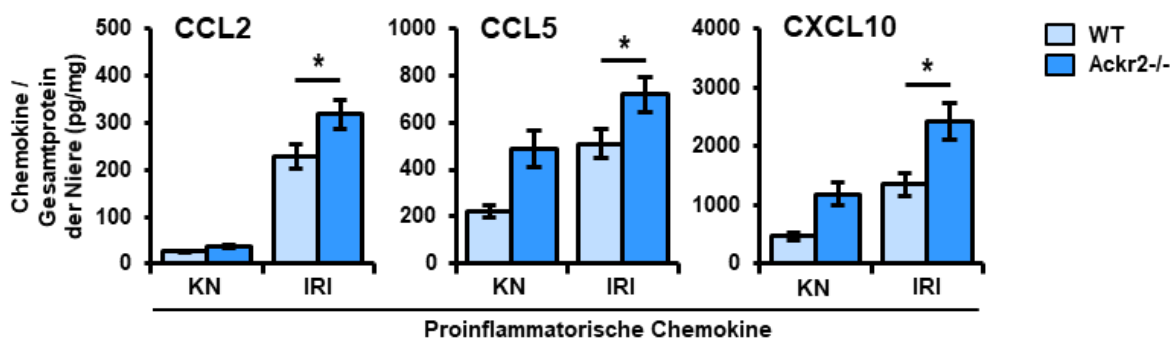


Abbildung 29: Renale Chemokinkonzentrationen 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) zeigen sich in den postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) signifikant erhöhte Proteinkonzentrationen der intrarenalen Chemokine CCL2 (C-C motif ligand 2), CCL5 (C-C motif ligand 5) und CXCL10 (C-X-C motif ligand 10). Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) kann in den postischämischen Nieren (IRI) eine vermehrte Expression der proinflammatorischen Chemokine nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentrationen der Chemokine wurden mittels ELISA bestimmt. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$ Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$.

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression der Chemokine in der Niere durch quantitative PCR bestimmt. In den postischämischen, Ackr2-defizienten Nieren wurde ein vermehrter mRNA-Gehalt der proinflammatorischen Chemokine Ccl2, Ccl5, Ccl22 und Cxcl10 im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Weder in gesunden Kontrollnieren gleichaltriger unbehandelter Mäuse noch in den kontralateralen nichtischämischen Nieren zeigte sich ein Unterschied in der mRNA Expression von Ccl2, Ccl5, Ccl22 und Cxcl10 zwischen beiden Genotypen, bei insgesamt geringerem Expressionsniveau im Vergleich zu den postischämischen Nieren (*Abbildung 30A*). Die vermehrte mRNA-Expression von Chemokinen in Ackr2-defizienten postischämischen Nieren weist damit auf eine verstärkte renale Entzündungsreaktion 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden hin.

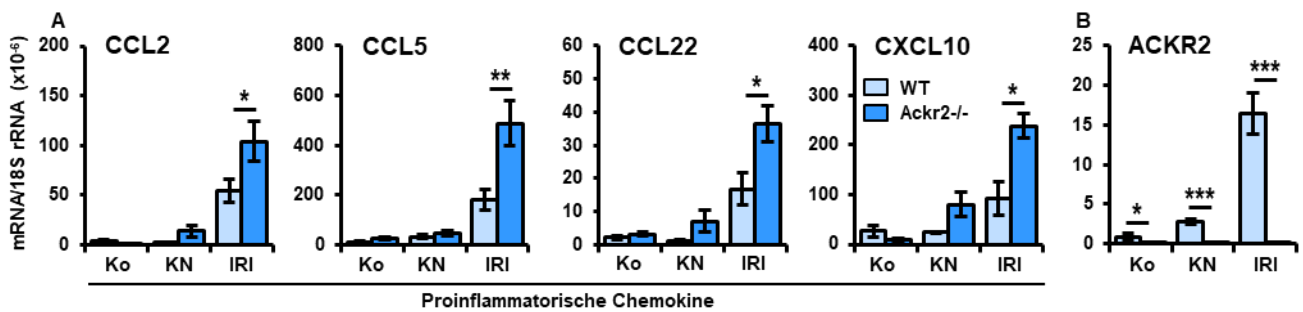


Abbildung 30: Renale mRNA-Expression von proinflammatorischen Chemokinen und Ackr2 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

A: 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist die mRNA-Expression der Chemokine Ccl2 (C-C motif ligand 2), Ccl5 (C-C motif ligand 5) und Cxcl10 (C-X-C motif ligand 10) in den postischämischen Nieren (IRI) bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) signifikant stärker induziert. In den Nieren gesunder gleichaltriger Kontrolltiere (Ko) und den nichtischämischen kontralateralen Nieren (KN) liegt eine niedrige mRNA-Expression der Chemokine ohne signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen vor. **B:** In WT-Tieren ist die Expression der Ackr2-mRNA im Vergleich zu den Nieren der Kontrolltiere und den nichtischämischen kontralateralen Nieren deutlich erhöht. Bei Ackr2-defizienten Tieren kann keine Ackr2-mRNA nachgewiesen werden. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 8 (KN und IRI) bzw. n = 5 (Ko) Mäuse je Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Zum Nachweis einer möglichen Induktion der Ackr2 mRNA-Expression in Wildtyp-Tieren nach Ischämie-Reperfusionsschaden und zur Kontrolle des Genotyps der Ackr-defizienten Tiere erfolgte der quantitative Nachweis mittels Real Time-PCR. In den Knockout-Tieren mit Ackr2-Defizienz konnte erwartungsgemäß keine Expression nachgewiesen werden. Beim Wildtyp war nach Ischämie-Reperfusionsschaden im Vergleich zu gesunden Kontrollnieren und kontralateralen, nichtischämischen Nieren die Expression von Ackr2 deutlich induziert (Abbildung 30B).

Zur weiteren Charakterisierung der renalen Entzündungsreaktion wurde die mRNA-Expression von M1- und M2-Makrophagen-Markern durch quantitative PCR untersucht (Abbildung 31). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Expression der inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Ackr2-defizienten Tiere nicht nur in ischämischen Nieren, sondern auch in gesunden Kontrollnieren und kontralateralen, nichtischämischen Nieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht war. Bei den übrigen untersuchten M1- und M2-Makrophagen-Expressionsmarkern zeigte sich in den gesunden Kontrollnieren und kontralateralen Nieren kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen. Im Gegensatz dazu war in postischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Tieren eine signifikant vermehrte Expression des M1-Makrophagen-Markers Inf- γ und des M2-Makrophagen-Markers

Arginase1 (Arg1) nachweisbar. Beim Macrophage Scavenger-Rezeptor 1 (Msr-1) zeigte sich ein nichtsignifikanter Trend zu einer vermehrten Expression bei Ackr2-Defizienz.

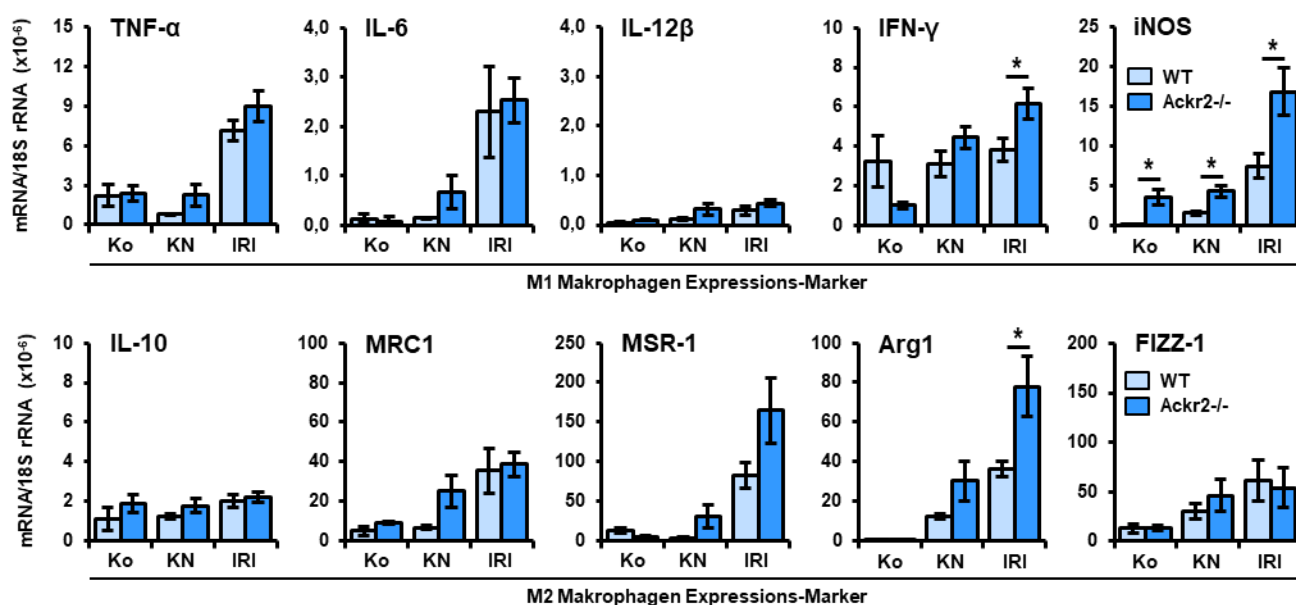


Abbildung 31: Renale mRNA-Expression von M1- und M2-Makrophagen-Markern 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

In den gesunden Kontrollnieren (Ko) und kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich im Vergleich zum Wildttyp (WT) bei Ackr2-Defizienz eine vermehrte Expression der iNOS (Inducible Nitric Oxide Synthase), bei den übrigen M1- und M2-Makrophagen -Marker besteht kein Unterschied zwischen den Genotypen. 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum WT jedoch die mRNA-Expression von iNOS, IFN-γ (Interferon-γ) und Arg1 (Arginase 1) signifikant erhöht. TNF-α (Tumornekrosefaktor-α), IL-6 (Interleukin 6), MRC1 (Mannose-Rezeptor 1), MSR-1 (Macrophage Scavenger Receptor-1), FIZZ-1 (Resistin-like molecule alpha 1) werden in den postischämischen Nieren beider Genotypen dagegen vergleichbar exprimiert. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM, n = 8 (KN und IRI) bzw. n = 5 (Ko) Mäuse je Gruppe, * p < 0,05.

Zusammengefasst führte eine Ackr2-Defizienz in der Erholungsphase 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden zu einer persistierend erhöhten Infiltration von renalen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in die postischämischen Nieren. Begleitend war die renale Konzentration proinflammatorischer Chemokine in postischämischen Ackr2-defizienten Nieren erhöht. Dies war assoziiert mit einer vermehrten mRNA-Expression von tubulären Schadensmarkern, renalen Chemokinen und einigen inflammatorischen Zytokinen. Die vermehrte Akkumulation von Leukozyten und die stärkere Entzündungsreaktion in den Nieren vermittelte zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keinen histologisch fassbaren stärkeren Schaden oder Verlust des Tubulusepithels.

3.4 Die Rolle von ACKR2 im chronischen Verlauf nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden

3.4.1 Struktureller Schaden

Ob sich im chronischen Verlauf nach Ischämie-Reperfusionsschaden die Niere regeneriert oder ob die akute Nierenschädigung zu einer chronischen Nierenerkrankung voranschreitet hängt von zahlreichen Faktoren ab. Eine anhaltende Entzündung könnte die Progression hzur chronischen Nierenschädigung fördern. Möglicherweise kommt daher dem atypischen Chemokinrezeptor ACKR2 in dieser Regenerationsphase eine entscheidende Bedeutung zu. Um dies zu untersuchen wurden Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen erneut für 45 Minuten die Nierengefäße einseitig abgeklemmt. Um den chronischen Verlauf und die Regenerationsphase nach Ischämie-Reperfusionsschaden zu studieren, wurde diesmal den Tieren erst nach 5 Wochen die Nieren entnommen.

Zur Analyse des strukturellen Schadens wurden wiederum Schnitte in PAS-Färbung angefertigt und der tubuläre Schadens-Score erhoben. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren zeigte sich abermals ein vermehrter tubulärer Schaden in den ischämischen Nieren beider Genotypen. Zudem konnte erstmals in den ischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Tieren ein deutlich verstärkter tubulärer Schaden im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (*Abbildung 32*). 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden ist die mögliche Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung mit Fibrosierung des Nierengewebes von entscheidender Bedeutung. Eine Vermehrung des interstitiellen Volumens könnte hierbei ein erster Anhaltspunkt für eine sich entwickelnde Nierenfibrose sein. Um dies zu untersuchen wurde erneut der interstitielle Volumen-Index in der PAS-Färbung ermittelt. Zwischen den kontralateralen, nichtischämischen Nieren von Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren bestand kein Unterschied im Ausmaß des interstitiellen Volumens, des Weiteren waren deren Werte auf einem ähnlichen Niveau wie das der kontralateralen Nieren an Tag 5 nach Ischämie-Reperfusionsschaden. Im Gegensatz zu den Daten an Tag 5 nach Ischämie-Reperfusionsschaden war das interstitielle Volumen nach Woche 5 in postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermehrt (*Abbildung 32*).

Um einen möglichen Verlust an Tubuli als Maß der Atrophie 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden zu quantifizieren, wurden Lektin-Färbungen der histologischen Schnitte angefertigt. Anschließend wurde das Verhältnis der mit Lektin angefärbten proximalen Tubuli im Vergleich zur gesamten Niere bestimmt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen nach Tag 5 zeigten die ischämischen Nieren von beiden Genotypen nach Woche 5 einen deutlichen

Verlust an proximalen Tubuli. Dieser Verlust des proximalen Tubulusepithels in den ischämischen Nieren war jedoch bei Ackr2-Defizienz deutlich ausgeprägter (Abbildung 32).

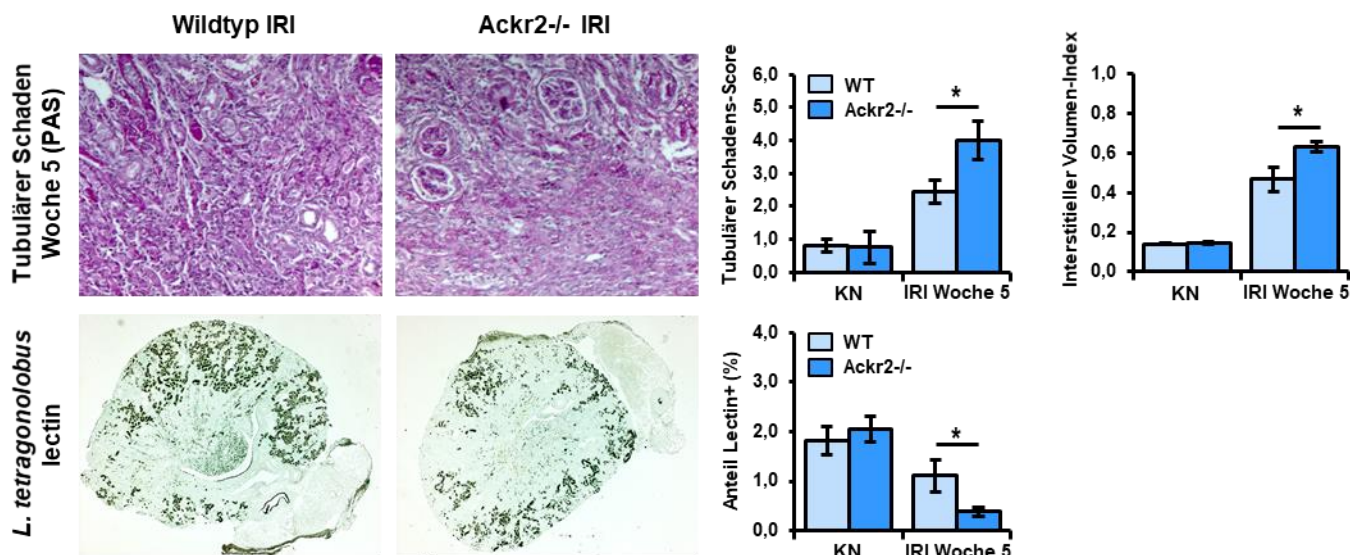


Abbildung 32: Tubulointerstitieller Schaden 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist der tubuläre Schaden, das interstitielle renale Volumen und der Verlust an proximalem Tubulusepithel bei Ackr2-defizienten postischämischen Nieren (IRI) signifikant stärker als beim Wildtyp (WT). In den als Kontrolle dienenden kontralateralen Nieren (KN) ist kein nennenswerter tubulärer Schaden feststellbar. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren kommt es in den postischämischen Nieren unabhängig vom Genotyp zu einem deutlich erhöhten interstitiellen Volumen. Der tubuläre Schaden sowie das interstitielle Volumen wurden semiquantitativ in der Periodic Acid-Schiff (PAS)-Färbung ermittelt, der Verlust an Tubuli durch Quantifizierung des selektiv mit Lotus tetragonolobus-Lektin angefärbten proximalen Tubulusepithels wie im Methodenteil beschrieben. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Abgebildet sind repräsentative histologische Schnitte. Originalvergrößerung: x100 für die PAS-Färbung, x25 für die Lotus tetragonolobus-Lektin-Färbung. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$ Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$.

Zusammengefasst zeigte sich in der Histologie von postischämischen, Ackr2-defizienten Nieren an Woche 5 erstmals ein signifikant größerer tubulärer Schaden, ein größeres Volumen des Interstitiums sowie einen vermehrten Verlust an proximalen Tubuli im Vergleich zum Wildtyp.

Um den persistierenden strukturellen Schaden im chronischen Verlauf nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden näher zu untersuchen und die Ergebnisse der Histologie zu

überprüfen wurde die Expression der tubulären Schadensmarker KIM-1, NGAL und TIMP2 auf Protein- bzw. mRNA-Ebene bestimmt. Hierbei zeigte sich in den kontralateralen, nichtischämischen Nieren kein Unterschied im Expressionsniveau zwischen den Genotypen. Wie zuvor nach Tag 5 konnte nach 5 Wochen ebenfalls eine signifikant erhöhte Expression von KIM-1 auf Proteinebene in postischämischen Nieren von *Ackr2*-defizienten Tieren nachgewiesen werden (*Abbildung 33*). In der quantitativen PCR zeigte sich zudem erneut eine vermehrte mRNA-Expression der tubulären Schadenmarker Kim-1, Ngai und Timp2 bei *Ackr2*-Defizienz (*Abbildung 34*).

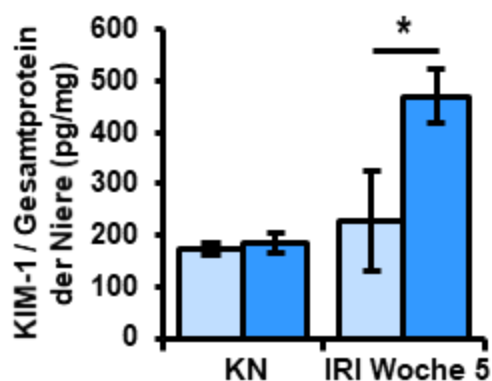


Abbildung 33: Tubulärer Schadensmarker KIM-1 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist die Proteinkonzentration des tubulären Schadensmarker Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in postischämischen *Ackr2*-defizienten Nieren (IRI) im Vergleich zum Wildtyp (WT) signifikant erhöht. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich in den postischämischen Nieren nur bei *Ackr2*-Defizienz ein deutlicher Anstieg. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$ Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$.

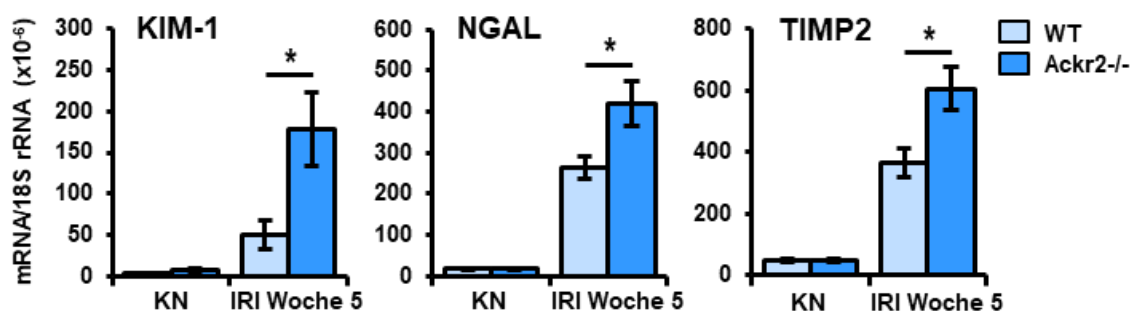


Abbildung 34: mRNA-Expression der tubulären Schadensmarker Kim-1, Ng2 und Timp2 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist die mRNA-Expression der tubulären Schadensmarker Kidney Injury Molecule-1 (Kim-1), Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin (Ng2) und Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 (Timp2) in postischämischen Ackr2-defizienten Nieren im Vergleich zum Wildtyp (WT) erhöht. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich in den postischämischen Nieren ein deutlicher Anstieg. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 8$ Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass im chronischen Verlauf 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp ein verstärkter renaler Schaden persistiert.

3.4.2 Akkumulation von intrarenalen Leukozyten

Das Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden wurde zunächst durchflusszytometrisch analysiert. Wie bei den vorherigen Ergebnissen zeigte sich bei den kontralateralen, nichtischämischen Nieren zwischen den Genotypen kein Unterschied in der Akkumulation der verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen. Anders als nach 24 Stunden oder 5 Tagen lag im chronischen Verlauf nach Ischämie-Reperfusionsschaden allerdings eine signifikant erhöhte Akkumulation der CD45⁺ Gesamtleukozyten in den postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz vor. Erwartungsgemäß waren zu diesem späten Zeitpunkt Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten nur noch in sehr geringer Anzahl vertreten, ein Unterschied zwischen den Genotypen fand sich hierbei nicht. Erstmals konnte in der Subgruppe der CD4⁺ T-Lymphozyten eine verstärkte renale Infiltration in den Ackr2-defizienten Tieren nachgewiesen werden. Bei den CD8⁺ T-Lymphozyten zeigte sich dieser Unterschied nicht (Abbildung 35A).

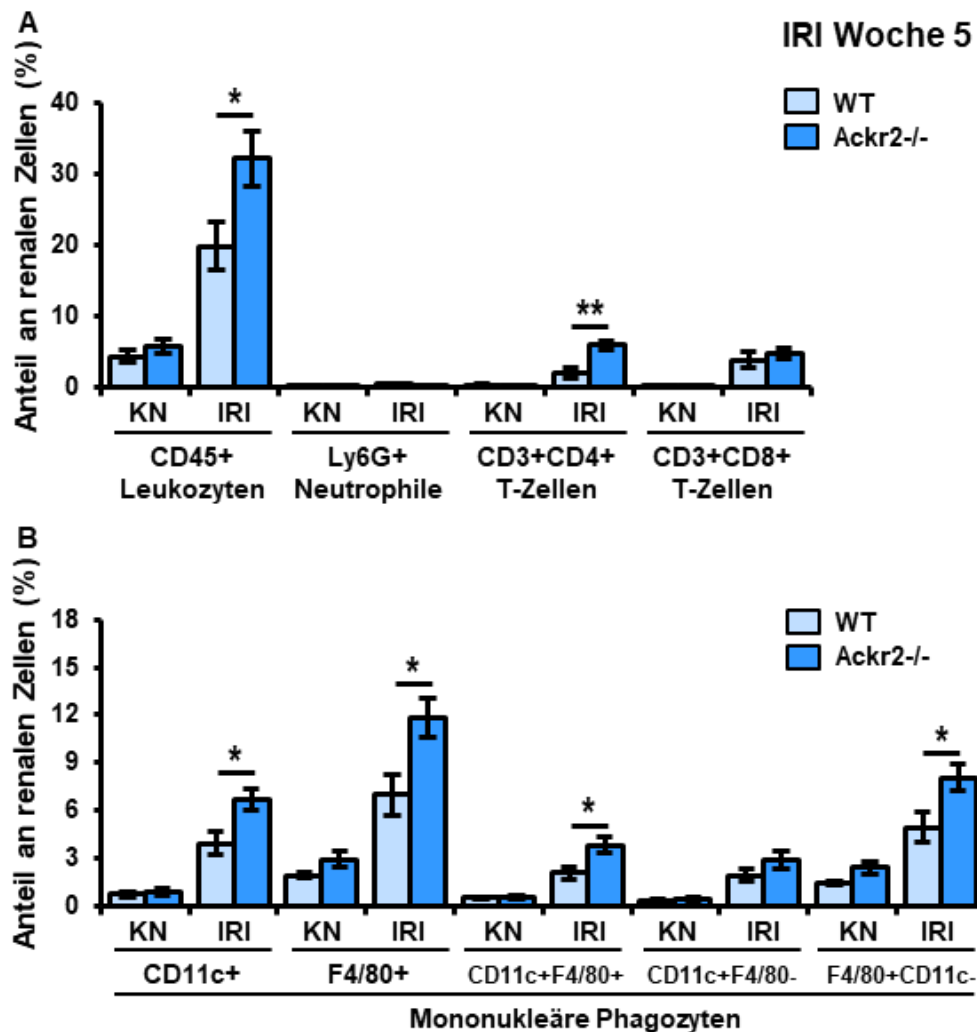


Abbildung 35: Renale Leukozyteninfiltration 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

A: 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist die Akkumulation von den CD45+ Gesamtleukozyten und CD3+, CD4+ T-Lymphozyten in postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) deutlich erhöht. Eine vermehrte Akkumulation der CD3+, CD8+ T-Lymphozyten kann bei Ackr2-Defizienz nicht nachgewiesen werden. Ly6G+ neutrophile Granulozyten können in den postischämischen Nieren kaum nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich in den postischämischen Nieren ein deutlicher Anstieg der Leukozytenzahlen. **B:** 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist die Akkumulation der F4/80+CD11c+ mononukleären Phagozyten in postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum WT deutlich erhöht. Eine vermehrte Akkumulation von CD11c+F4/80-dendritischen Zellen kann bei Ackr2-Defizienz jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren zeigt sich in den postischämischen Nieren ein deutlicher Anstieg der Phagozytenzahlen. Die Akkumulation von intrarenalen Leukozyten wurde durch Durchflusszytometrie von renalen Einzelzellsuspensionen bestimmt. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 8 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01.

In der Subgruppe der mononukleären Phagozyten war eine deutliche Infiltration an Leukozyten in den postischämischen Nieren nachweisbar. Hierbei fanden sich in den Ackr2-defizienten Nieren signifikant mehr CD11c+, F4/80+ und CD11c+F4/80+ doppeltpositive mononukleäre Phagozyten. Die Ackr2-Defizienz war ebenso mit einem signifikanten Anstieg an klassischen F4/80+CD11c- Makrophagen assoziiert. Wie auch bei den vorherigen Ergebnissen fand sich kein Unterschied in der renalen Akkumulation von CD11c+F4/80-dendritischen Zellen zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren (*Abbildung 35B*).

Um die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zu bestätigen und die infiltrierenden Leukozyten zu lokalisieren, wurden immunhistologische Schnitte angefertigt. In den kontralateralen Nieren war kein Unterschied der renalen Leukozytenakkumulation in Wildtyp- und Ackr2-defizienten Nieren feststellbar. Analog zu den Ergebnissen der Durchflusszytometrie war die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in den postischämischen Nieren in beiden Genotypen vergleichbar groß. Ebenso konnte in der Immunhistologie eine signifikant vermehrte Akkumulation an F4/80+ Phagozyten und CD3+ T-Lymphozyten bei Ackr2-Defizienz nachgewiesen werden. Wie zuvor beschrieben konzentrierte sich die Akkumulation der Leukozyten überwiegend auf das Tubulointerstitium des kortikomedullären Überganges (*Abbildung 36*).

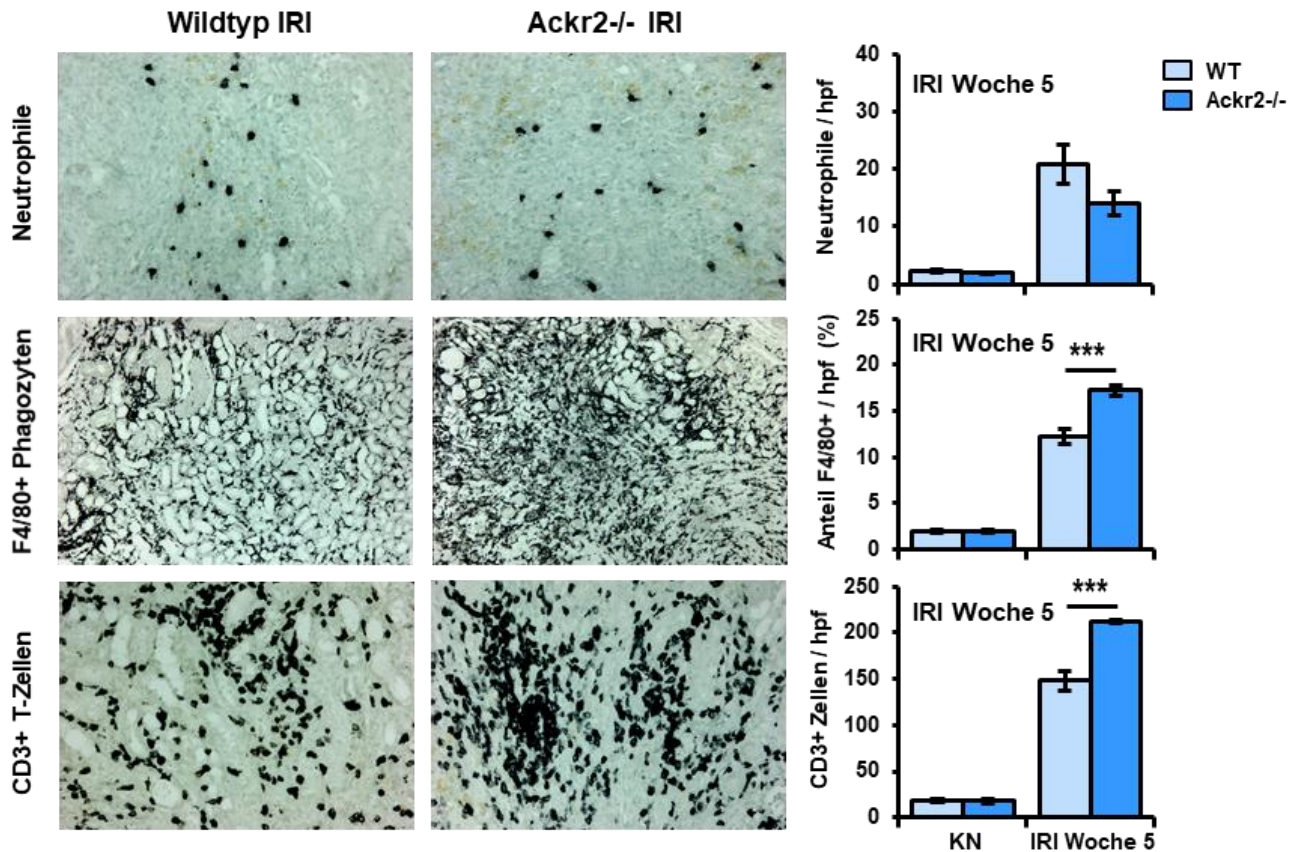


Abbildung 36: Immunhistologischer Nachweis von intrarenalen Leukozyten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden zeigt sich in den postischämischen Nieren (IRI) bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) eine vermehrte Akkumulation von F4/80+ interstitiellen mononukleären Phagozyten und CD3+ T-Zellen in der Immunhistologie. Bezüglich der intrarenalen Akkumulation von Ly-6B.2+ neutrophilen Granulozyten besteht kein Unterschied zwischen den Genotypen. Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) zeigt sich in den postischämischen Nieren eine deutlich vermehrte Akkumulation der Leukozyten. Die Quantifizierung der intrarenalen Leukozytenakkumulation erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Abgebildet sind repräsentative immunhistologische Schnitte. Originalvergrößerung: x200 für F4/80+ Phagozyten, x400 für neutrophile Granulozyten und CD3+ T-Zellen. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM, n = 8 Mäuse je Gruppe, *** p < 0,001.

Im chronischen Verlauf 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden führte eine Ackr2-Defizienz somit im Vergleich zum Wildtyp zu einer stärkeren persistierenden Akkumulation von mononukleären Phagozyten in der postischämischen Niere. Zudem war Ackr2-Defizienz zu diesem Zeitpunkt mit einem stärkeren tubulären Schaden und einer vermehrten Atrophie des Tubulussystems assoziiert.

3.4.3 Expression von renalen Chemokinen, M1-Makrophagen-Markern und Infiltration von inflammatorischen Makrophagen

Die Konzentration proinflammatorischer Chemokine in den Nieren wurden mittels ELISA-Messungen bestimmt. In den kontralateralen Kontrollnieren war zwischen den Genotypen kein Unterschied nachweisbar. In den postischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Tieren zeigte sich 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden im Vergleich zum Wildtyp eine anhaltend erhöhte Konzentration der proinflammatorischen Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 (*Abbildung 37*). Gemeinsam mit den Ergebnissen der ELISA-Messungen 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist dies mit einem verminderten Abbau gebildeter Chemokinen in Ackr2-defizienten Nieren vereinbar. Zusätzlich könnten die verstärkt akkumulierenden Leukozyten in den Nieren von Ackr2-defizienten Tieren vermehrt proinflammatorische Chemokine synthetisieren und so zu der deutlich gesteigerten intrarenalen Konzentration an Chemokinen beitragen.

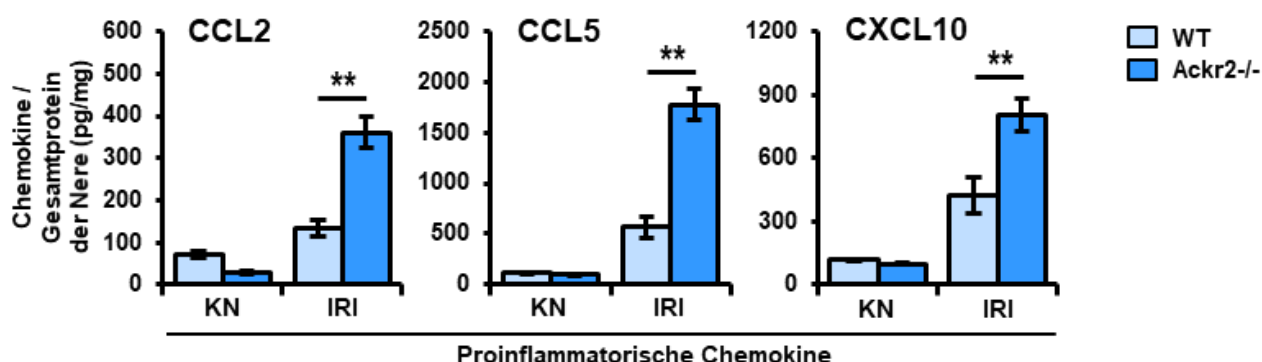


Abbildung 37: Renale Chemokinkonzentrationen 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden zeigen sich in den postischämischen Nieren (IRI) bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) signifikant erhöhte renale Proteinkonzentrationen der Chemokine CCL2 (C-C Motiv Ligand 2), CCL5 (C-C Motiv Ligand 5) und CXCL10 (C-X-C Motiv Ligand 10). Im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) kann in den postischämischen Nieren eine vermehrte Expression der proinflammatorischen Chemokine nachgewiesen werden. Die Proteinkonzentrationen der Chemokine wurden mittels ELISA bestimmt. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 9 Mäuse je Gruppe, ** p < 0,01.

Eine durch die persistierend erhöhte Akkumulation von Leukozyten hervorgerufene andauernde Entzündung im Nierengewebe verhindert möglicherweise die Regeneration des Tubulusepithels in Ackr2-defizienten Mäusen nach Ischämie-Reperfusionsschaden. Daher

wurde als nächstes untersucht, ob der bereits nachgewiesene größere tubuläre Schaden mit einer gesteigerten Expression von inflammatorischen Mediatoren in postischämischen Ackr2-defizienten Nieren 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden korreliert. Hierfür wurde die renale Expression verschiedener Chemokine und Zytokine mittels quantitativer PCR gemessen.

Zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren konnte in den kontralateralen, nichtischämischen Nieren kein Unterschied in der Expression der gemessenen Chemokine und Zytokine nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression der iNos war in den kontralateralen Nieren bei Ackr2-Defizienz tendenziell vermehrt, im Gegensatz zu den Ergebnissen 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden war dieser Unterschied jedoch statistisch nicht signifikant. In den postischämischen Nieren führte eine Ackr2-Defizienz jedoch zu einer erhöhten renalen mRNA-Expression der proinflammatorischen Chemokine Ccl2, Ccl5, Ccl22 und Cxcl10 (*Abbildung 38A*). Von diesen Chemokinen ist bekannt, dass sie unter anderem von aktivierten proinflammatorischen Makrophagen exprimiert werden (146).

Des Weiteren war die Expression von Tnf- α in postischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Mäusen signifikant erhöht. Ifn- γ zeigte eine Tendenz zu einer vermehrten Expression bei Ackr2-Defizienz, diese war jedoch statistisch nicht signifikant. Auch iNos war bei Ackr2-Defizienz in den postischämischen Nieren signifikant vermehrt exprimiert. Bezüglich Interleukin 6 (Il-6) und interleukin 12 β (Il-12 β) zeigte sich kein Expressionsunterschied in den postischämischen Nieren beider Genotypen (*Abbildung 38A*). Die untersuchten Zytokine werden als M1-Makrophagen-Marker von aktivierten klassischen proinflammatorischen Phagozyten exprimiert.

Wie an Tag 5 nach Ischämie-Reperfusionsschaden wurde auch an Woche 5 der Rezeptor Ackr2 in den Ackr2-defizienten Tieren nicht exprimiert, während in den Wildtyp-Tieren eine deutliche Induktion der Ackr2 mRNA-Expression vorlag (*Abbildung 38B*).

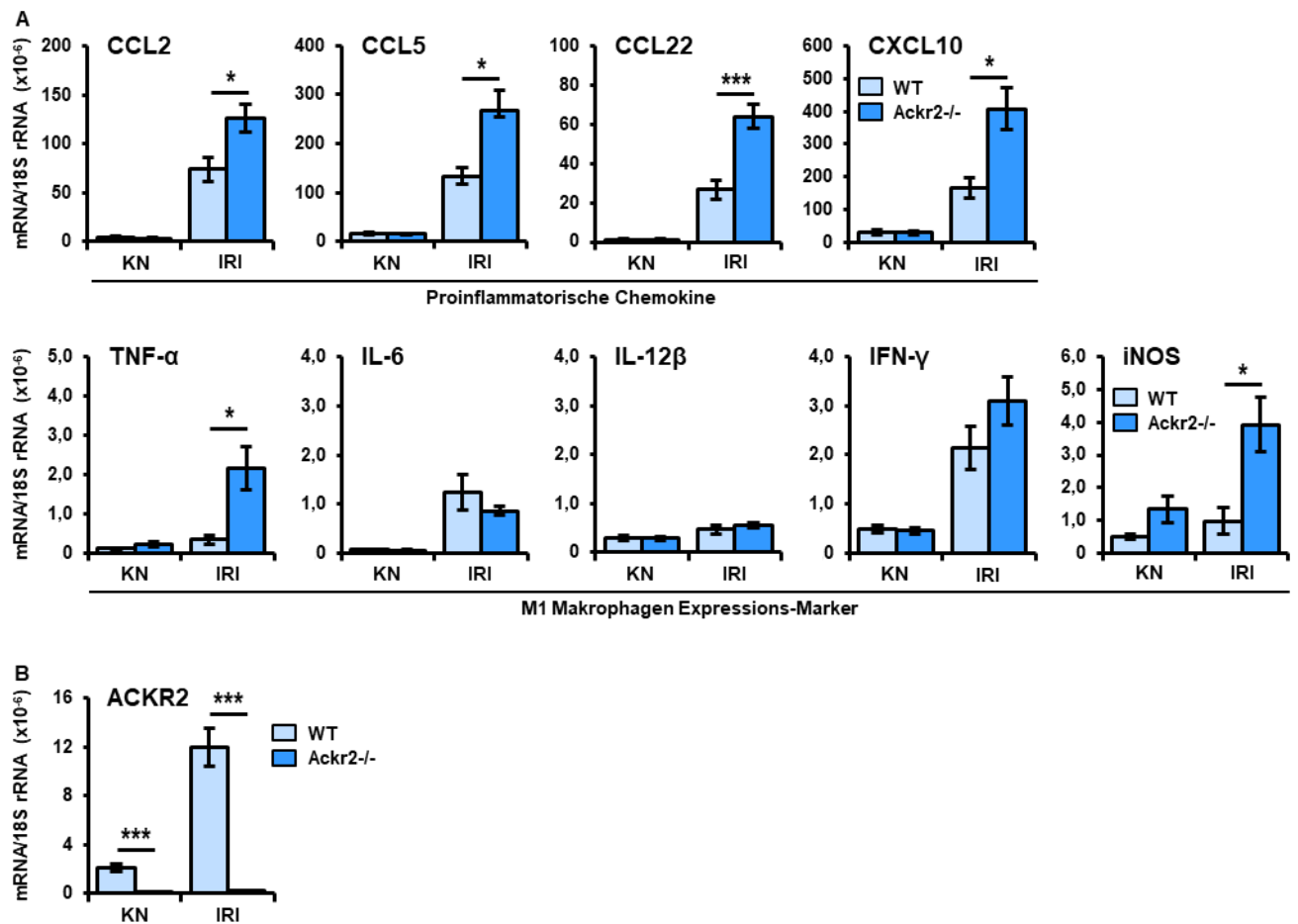


Abbildung 38: Renale mRNA-Expression von proinflammatorischen Chemokinen, M1-Makrophagen-Markern und Ackr2 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

A: Die mRNA-Expression der Chemokine Ccl2 (C-C Motiv Ligand 2), Ccl5 (C-C Motiv Ligand 5), Ccl22 (C-C Motiv Ligand 22) und Cxcl10 (C-X-C Motiv Ligand 10) ist in den postischämischen Nieren (IRI) bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) stärker induziert. In den postischämischen Nieren ist bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp auch die Expression von Tnf- α (Tumornekrosefaktor- α) und iNos (Inducible Nitric Oxide Synthase) signifikant erhöht. Bei den übrigen M1-Makrophagen-Markern besteht kein Expressionsunterschied zwischen den Genotypen. In den kontralateralen Nieren (KN) besteht in der mRNA-Expression der Chemokine und M1-Makrophagen-Markern kein wesentlicher Unterschied zwischen den Genotypen bei insgesamt niedrigem Expressionsniveau. **B:** 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist in Wildtyp-Tieren die Expression der Ackr2-mRNA in den postischämischen Nieren im Vergleich zu den kontralateralen Nieren deutlich erhöht. Bei Ackr2-defizienten Tieren kann keine Ackr2-mRNA-Expression nachgewiesen werden. IL (Interleukin), IFN- γ (Interferon- γ). Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 9 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05, *** p < 0,001.

Im Folgenden wurde untersucht, ob bei *Ackr2*-Defizienz entsprechend der erhöhten renalen Expression einzelner M1-Makrophagen-Marker inflammatorische Phagozyten in der postischämischen Niere vermehrt akkumulieren. Hierfür wurden durchflusszytometrisch renale $CD11b+Ly6C^{high}$ inflammatorische Makrophagen quantifiziert und ihre CCR2-Expression analysiert. In den kontralateralen Nieren zeigte sich bei Fehlen einer renalen Schädigung erwartungsgemäß kein Unterschied ihrer geringen Zahl zwischen Wildtyp- und *Ackr2*-defizienten Tieren. Korrelierend zu den vorherigen Ergebnissen der quantitativen PCR war dagegen in den postischämischen Nieren bei *Ackr2*-Defizienz eine signifikant stärkere Akkumulation $CD11b+Ly6C^{high}$ inflammatorischer Makrophagen nachweisbar. Von diesen Phagozyten exprimierten zudem die meisten den Chemokin-Rezeptor CCR2 (*Abbildung 39*), welcher ein wichtiger Rezeptor für das proinflammatorische Chemokin CCL2 ist, das unter anderem vermehrt in postischämischen Nieren der *Ackr2*-defizienten Tiere vorlag.

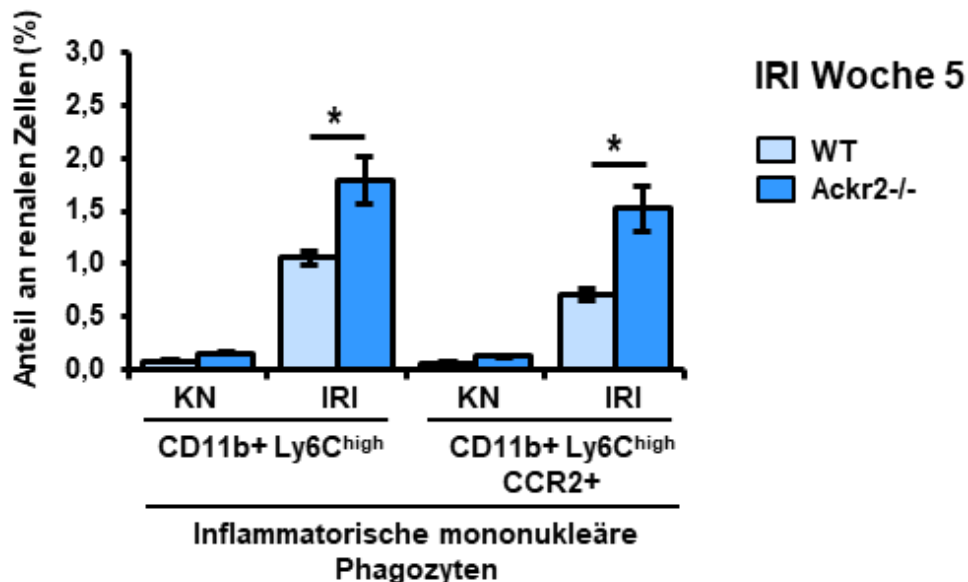


Abbildung 39: Akkumulation von $CD11b+Ly6C^{high}$ inflammatorischen mononukleären Phagozyten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden zeigt sich in den postischämischen Nieren (IRI) bei *Ackr2*-Defizienz eine vermehrte Akkumulation von $CD11b+Ly6C^{high}$ inflammatorischen Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp (WT). Zudem exprimiert der größte Anteil dieser Zellen den CCL2 (C-C motif ligand 2) Rezeptor CCR2. In den kontralateralen Nieren (KN) lassen sich keine Unterschiede in der niedrigen Zahl inflammatorischer Makrophagen zwischen den Genotypen nachweisen. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 9 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05.

Insgesamt legen diese Daten den Schluss nahe, dass 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden Ackr2-Defizienz bei Fehlen des in Wildtyp-Tieren vermehrt exprimierten Ackr2 zu persistierend erhöhten renalen Konzentrationen proinflammatorischer Chemokine wie CCL2 führt. Dies kann die Akkumulation von mononukleären Leukozyten in postischämische Ackr2-defiziente Nieren verstärken. Zu diesen mononukleären Leukozyten gehören auch CCR2+ inflammatorische Makrophagen, die eine permanent gesteigerte Entzündung in der postischämischen Niere unterhalten und damit zu einem vermehrten tubulären Schaden in den Ackr2-defizienten Mäusen führen.

3.4.4 Expression von M2-Makrophagen-Markern und Ausmaß der renalen Fibrose

Die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung nach akuter Nierenschädigung ist durch einen fibrotischen Umbau des interstitiellen Nierengewebes charakterisiert. Dabei kommt es zu einem Verlust an Nephronen, der begleitet wird durch eine exzessive Akkumulation von extrazellulärer Matrix und fibrogener Zellen (76, 147). Eine anhaltend gesteigerte Entzündung im Tubulointerstitium der postischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Mäusen verstärkt möglicherweise diesen fibrotischen Umbau. Dieser ist im Besonderen assoziiert mit der Akkumulation von alternativ aktivierten Makrophagen des M2-Phänotyps, welche zur Ablagerung von extrazellulären Matrix-Molekülen und dem fibrotischen Remodelling des Gewebes beitragen (146).

Daher wurde die Expression von verschiedenen M2-Makrophagen-Markern in den postischämischen Nieren 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden durch quantitativer PCR gemessen. Hierbei war zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen in den kontralateralen Nieren kein Unterschied in der insgesamt niedrigen Expression nachweisbar. Bei Il-10 und Fizz-1 (Resistin-like Molecule alpha 1) zeigte sich in den postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz eine nichtsignifikante Tendenz zu einer verstärkten Expression. In Ackr2-defizienten postischämischen Nieren konnte jedoch im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich vermehrte renale Expression der M2-Makrophagen-Marker Mannose-Rezeptor 1 (Mrc1), Macrophage Scavenger Receptor 1 (Msrl) und Arginase1 (Arg1) nachgewiesen werden (*Abbildung 40*).

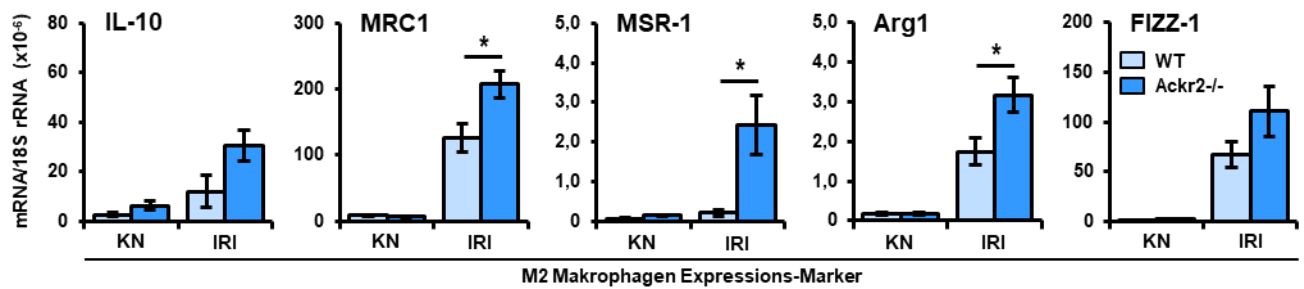


Abbildung 40: Renale mRNA-Expression von M2-Makrophagen-Markern 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) die Expression von Mrc1 (Mannose Rezeptor 1), Msr-1 (Macrophage Scavenger Receptor-1) und Arg1 (Arginase 1) signifikant erhöht. Bei der Expression von Il-10 (Interleukin-10) und Fizz-1 (Resistin-like Molecule alpha1) besteht kein Unterschied in den postischämischen Nieren zwischen den Genotypen. In den kontralateralen Nieren (KN) lassen sich keine Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen nachweisen. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklammert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 5$ bis 9 Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$.

Als nächstes wurde die renale mRNA-Expression verschiedener Fibrose-Marker, extrazellulärer Matrix-Moleküle und Fibroblasten-Marker durch quantitative PCR untersucht. In den kontralateralen Nieren konnte bei allen untersuchten Fibrose- und Fibroblasten-Markern bei niedrigem Expressionsniveau kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren nachgewiesen werden. In den postischämischen Ackr2-defizienten Nieren zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp dagegen eine signifikant vermehrte Expression des profibrotische Wachstumsfaktors Connective Tissue Growth Factor (Ctgf). Auch konnte bei den extrazellulären Matrixmolekülen Fibronectin, Prokollagen 1 und Prokollagen 4 eine signifikant vermehrte Expression in den postischämischen Nieren der Ackr2-defizienten Tiere nachgewiesen werden. Zudem lag eine nichtsignifikante Tendenz zu einer vermehrten Expression des extrazellulären Matrixmoleküls Laminin vor (*Abbildung 41*). Des Weiteren konnte in den postischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant vermehrte mRNA-Expression der Fibroblasten-Marker α -Smooth Muscle Actin (α Sma) und Fibroblast-specific Protein 1 (Fsp1) gezeigt werden (*Abbildung 42*).

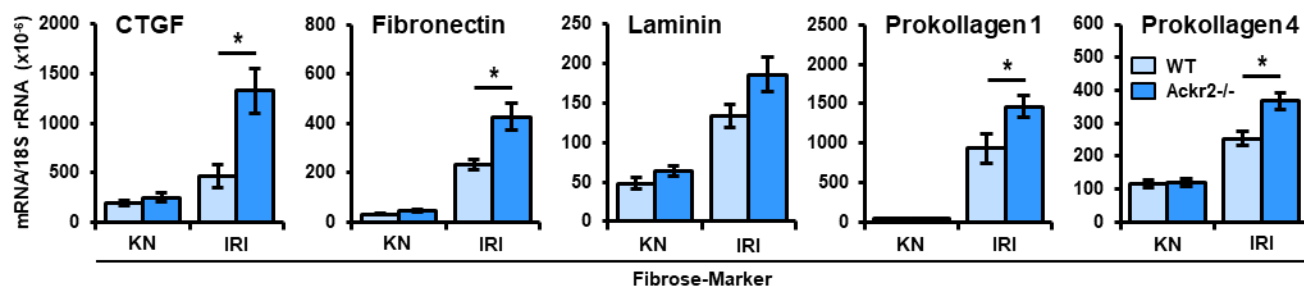


Abbildung 41: mRNA-Expression von profibrotischen Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen und 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) die Expression von Ctgf (Connective Tissue Growth Factor), Fibronectin, Prokollagen 1 und Prokollagen 4 signifikant erhöht. Bei der Expression von Laminin besteht kein signifikanter Unterschied in den postischämischen Nieren zwischen den Genotypen. In den kontralateralen Nieren (KN) lassen sich keine Unterschiede in der Expression der Fibrosemarker zwischen den Genotypen nachweisen. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 5$ bis 9 Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$.

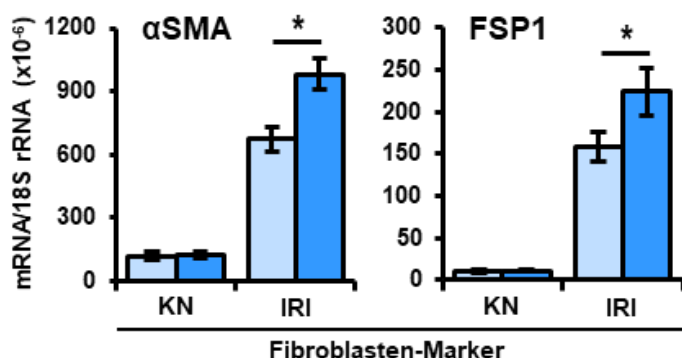


Abbildung 42: Expression von Fibroblasten-Markern 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) die Expression von α Sma (α -Smooth Muscle actin) und Fsp1 (Fibroblast-specific Protein 1) signifikant erhöht. In den kontralateralen Nieren (KN) lassen sich keine Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen nachweisen. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 5$ bis 9 Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$.

Um die Fibrose der Nieren 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden histologisch nachzuweisen wurden histologische Schnitte mit Masson-Trichrome und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen α SMA gefärbt. Die Masson-Trichrome-Färbung

färbt hierbei die Kollagen-reiche fibrotische extrazelluläre Matrix an. Somit ist eine Quantifizierung des Ausmaßes der interstitiellen Fibrose möglich. Die Immunhistologie ermöglicht die Quantifizierung von α SMA+ Myofibroblasten.

Sowohl in der Masson-Trichrome-Färbung als auch in der Immunhistologie konnte kein Unterschied in der nur mild ausgeprägten Fibrose der kontralateralen Nieren von Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren nachgewiesen werden. In der Masson-Trichrome-Färbung zeigte sich in den postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz dagegen eine signifikant verstärkte Ablagerung von extrazellulärer Matrix. Ebenso konnte übereinstimmend mit den Ergebnissen der quantitativen PCR eine vermehrte Akkumulation von α SMA+ Myofibroblasten in den postischämischen Ackr2-defizienten Nieren im Vergleich zum Wildtyp 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden nachgewiesen werden (Abbildung 43).

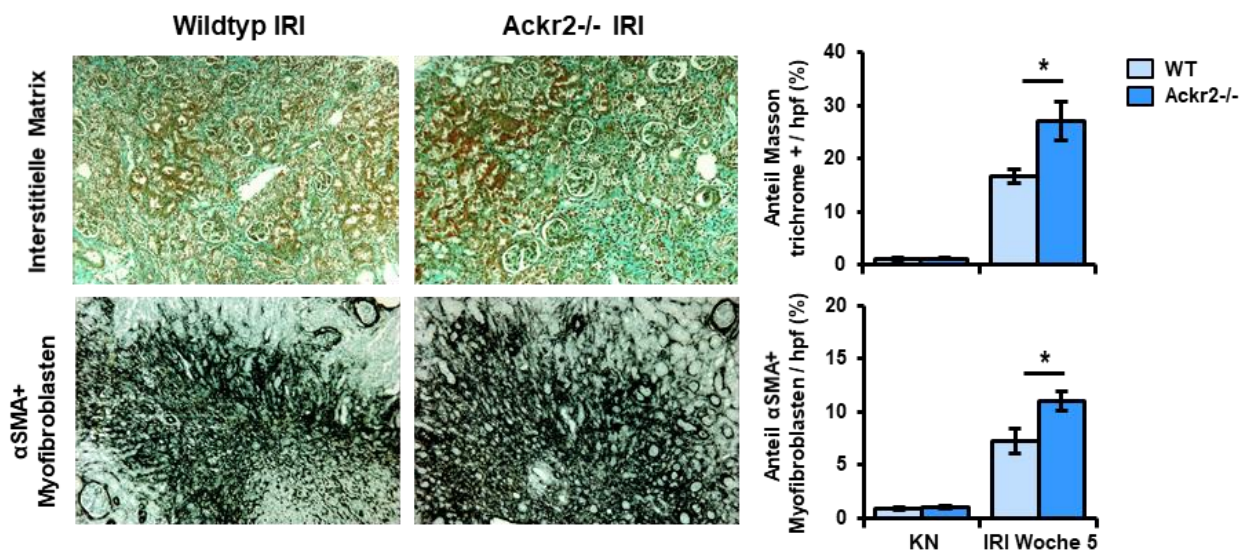


Abbildung 43: Histologischer Nachweis der interstitiellen Matrixdeposition und Akkumulation von Myofibroblasten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) zeigt sich bei Ackr2-Defizienz in der Masson-Trichrome-Färbung eine vermehrte Ablagerung von interstitieller Matrix im Vergleich zum Wildtyp (WT). Zudem weisen die postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz vermehrt α SMA (α -Smooth Muscle Actin)+ Myofibroblasten in der Immunhistologie auf. In den kontralateralen Nieren (KN) kann in der Masson-Trichrome-Färbung in beiden Genotypen keine vermehrte Ablagerung von interstitieller Matrix und nur wenige α SMA+ Myofibroblasten ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen nachgewiesen werden. Originalvergrößerung: x200. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 9 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05.

In der frühen Erholungsphase 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden hatten die postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp bereits eine vermehrte Infiltration von Leukozyten, insbesondere der Makrophagen aufgewiesen. Ebenso hatte sich in den Ackr2-defizienten postischämischen Nieren nach 5 Tagen eine gesteigerte Entzündungsreaktion gezeigt, und auch der M2-Makrophagen-Marker Arginin1 wurde vermehrt exprimiert. Daher wurde als nächstes untersucht, ob Ackr2-Defizienz auch schon im subakuten Verlauf 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden eine beginnende Fibrose verstärkt. Hierfür wurden Fibrose-Marker mittels quantitative PCR gemessen und die Zahl α SMA+ Myofibroblasten in der Immunhistologie quantifiziert.

Kontralaterale Nieren wiesen ein niedriges Expressionsniveau der untersuchten Fibrosemarker ohne signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf. Der profibrotische Wachstumsfaktor Ctgf wurde bei Ackr2-Defizienz in postischämischen Nieren tendenziell, jedoch nicht signifikant vermehrt exprimiert. Die mRNA-Expression der extrazellulären Matrixmoleküle Fibronectin, Laminin, Prokollagen 1 und Prokollagen 5 war in den postischämischen Nieren beider Genotypen jedoch auf einem vergleichbaren Niveau (*Abbildung 44*). Des Weiteren zeigte sich immunhistologisch in den postischämischen Nieren von Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen kein Unterschied in der gegenüber den kontralateralen Nieren gesteigerten Akkumulation von α SMA+ Myofibroblasten (*Abbildung 45*) ebenfalls.

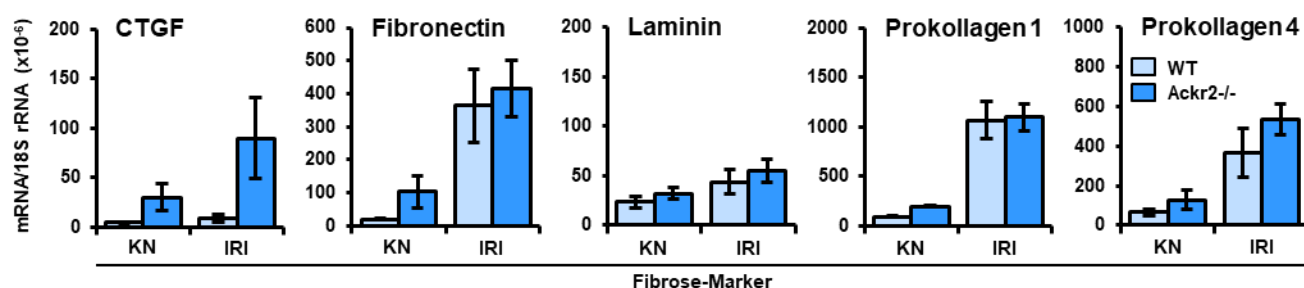


Abbildung 44: mRNA-Expression von profibrotischen Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden ist in den postischämischen Nieren (IRI) Ctgf bei Ackr2-Defizienz tendenziell verstärkt exprimiert, bei den extrazellulären Matrixmolekülen Fibronectin, Laminin, Prokollagen 1 und Prokollagen 4 ergeben sich keine renalen Expressionsunterschiede zwischen den Genotypen. Mit Ausnahme von Laminin weisen die postischämischen Nieren im Vergleich zu den kontralateralen Nieren (KN) eine vermehrte Expression von profibrotischen Wachstumsfaktoren und extrazellulären Matrixmolekülen auf. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 4 bis 8 Mäuse je Gruppe.

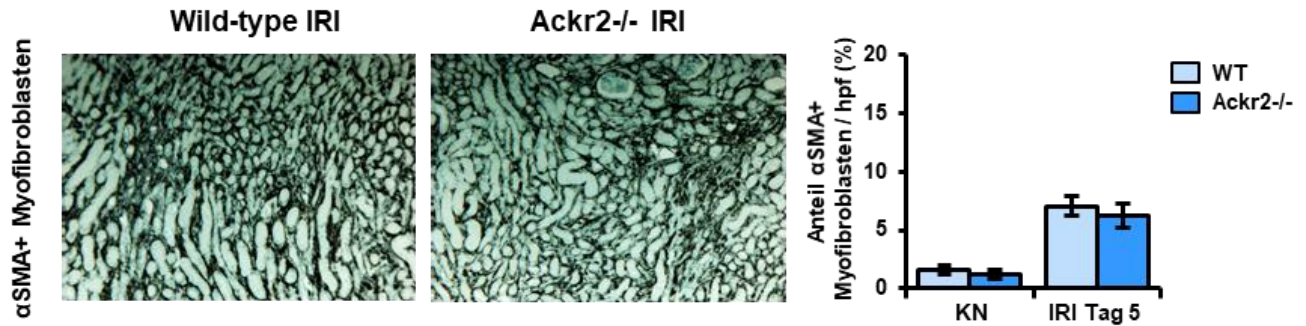


Abbildung 45: Histologischer Nachweis der Akkumulation von Myofibroblasten 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) zeigen sich keine Unterschiede in der gegenüber kontralateralen Nieren (KN) gesteigerten Akkumulation von α SMA (α -Smooth Muscle Actin)+ Myofibroblasten.. Originalvergrößerung: x200. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 bis 8 Mäuse je Gruppe.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen im chronischen Verlauf nach 5 Wochen ergab sich 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden somit trotz bereits vermehrter Leukozyteninfiltration und gesteigerter Entzündungsreaktion in der postischämischen Niere kein Anhalt für einen vermehrten fibrotischen Umbau in Ackr-defizienten Nieren. Diese Daten korrelieren gut zu dem vorherigen Ergebnis eines bei Ackr2-Defizienz deutlich vermehrten interstitiellen Volumens 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden war, nicht jedoch im subakuten Verlauf nach 5 Tagen.

Aus dem Knochenmark stammenden Fibrozyten wurde eine wichtige Rolle in der Entstehung einer renalen Fibrose zugeschrieben (148, 149). Fibrozyten exprimieren den proinflammatorischen Chemokin-Rezeptor CCR2 (149). Folglich könnte eine erhöhte Konzentration des Chemokinliganden CCL2 im tubulointerstitiellen Gewebe von Ackr2-defizienten Tieren die Migration von Fibrozyten in die postischämische Niere unterstützen.

Um dies zu untersuchen, wurden in renale Einzelzellsuspensionen 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden Fibrozyten durch Färbung für CD45, CD11b und intrazelluläres Kollagen 1 durchflusszytometrisch quantifiziert. Bereits in den kontralateralen Nieren zeigte sich hierbei bei insgesamt allerdings sehr niedriger Fibrozytenzahl ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen, mit vermehrter Fibrozytenzahl in den Ackr2-defizienten Nieren. In den postischämischen Nieren beider Genotypen lag eine deutlich gesteigerte Fibrozytenzahl vor. In Ackr2-defizienten Tieren war im Vergleich zum Wildtyp zudem eine signifikant größere Population an CD45+ CD11b+ Kollagen 1+ Fibrozyten nachweisbar (Abbildung 46).

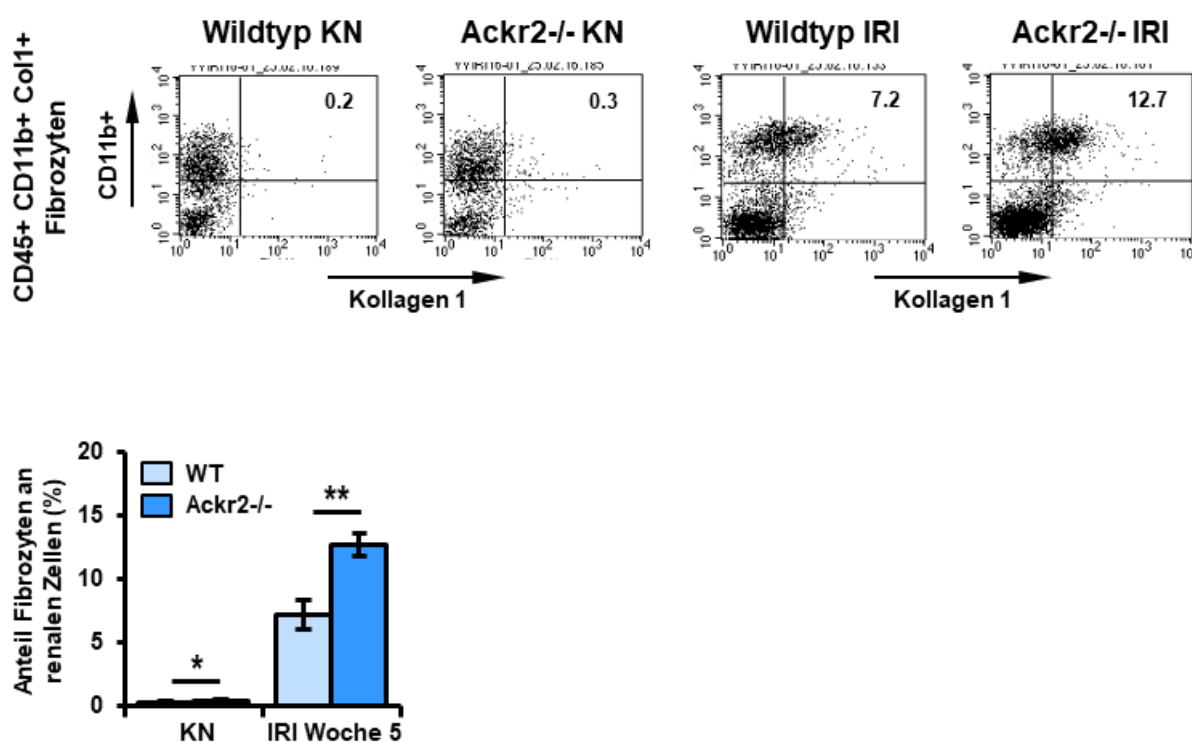


Abbildung 46: Renale Akkumulation von Fibrozyten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden sind in der Durchflusszytometrie in postischämischen Nieren (IRI) bei Ackr2-Defizienz im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermehrt CD45+CD11+Kollagen 1+ Fibrozyten nachweisbar. Auch nichtischämische kontralaterale Nieren (KN) weisen in Ackr2-defizienten Mäusen bei insgesamt niedriger Fibrozytenzahl vermehrte Fibrozyten auf. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Abgebildet sind repräsentative Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach Gating auf CD45+ renale Zellen. Der prozentuale Anteil der Fibrozyten an den Gesamtnierenzellen ist oberen rechten Quadranten angegeben. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 5$ bis 9 Mäuse je Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Zusammengefasst konnte somit gezeigt werden, dass 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden eine Ackr2-Defizienz zu einem größeren tubulären Schaden mit einer anhaltend erhöhten Akkumulation von intrarenalen Leukozyten führt. Des Weiteren war bei Ackr2-Defizienz in den postischämischen Nieren eine verstärkte Entzündungsreaktion nachweisbar. Zusätzlich lag in Ackr2-defizienten postischämischen Nieren eine deutlich vermehrte Fibrose des Nierengewebes vor, was charakteristisch ist für die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung nach akuter Nierenschädigung ist.

3.4.5 CCL2-Konzentrationen und Leukozytenzahlen im peripheren Blut

Um mögliche systemische Effekte der Acker2-Defizienz zu untersuchen, wurde die Konzentration des proinflammatorischen Chemokins CCL2 im Serum 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden gemessen. Hierbei zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von CCL2 im Blut der Acker2-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 47).

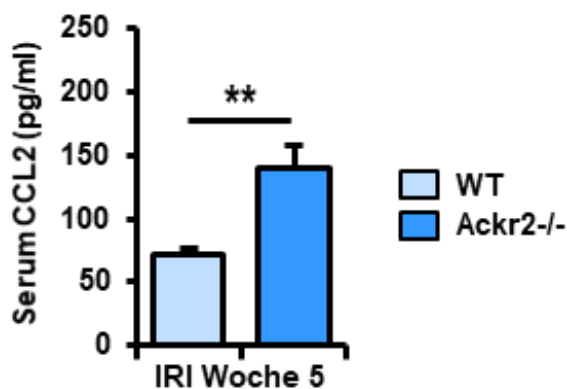


Abbildung 47: Chemokinkonzentration von CCL2 im Serum 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI) ist die Konzentration von CCL2 (C-C motif ligand 2) im Serum bei Acker2-defizienten Tieren signifikant erhöht. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 9$ Mäuse je Gruppe, ** $p < 0,01$.

Des Weiteren wurde die Anzahl der Leukozyten und deren Subpopulationen im Blut, Milz und Knochenmark 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden durchflusszytometrisch bestimmt. Die Differenzierung der einzelnen Zellen erfolgte aufgrund ihrer Eigenschaften im Forward-Scatter und Side-Scatter, sowie durch Anfärbung spezifischer Oberflächenmarker.

Im Blut zeigte sich bei Acker2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp eine tendenzielle, nichtsignifikant vermehrte Leukozytenzahl. Die neutrophilen Granulozyten, dendritische Zellen und F4/80+ Monozyten waren bei Acker2-Defizienz signifikant erhöht. Insbesondere waren auch signifikant vermehrt inflammatorische CD11b+Ly6C^{high} Monozyten im Blut der

Ackr2-defizienten Tiere nachweisbar. Ein Großteil dieser inflammatorischen Monozyten war zudem positiv für den Chemokinrezeptor CCR2 (*Abbildung 48A*). In der Milz konnte kein Unterschied bezüglich der Leukozytenzahl und deren Subpopulationen zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren nachgewiesen werden (*Abbildung 48B*). Im Knochenmark lag bei Ackr2-Defizienz ein nichtsignifikanter Trend zu einer niedrigeren Gesamtleukozytenzahl, neutrophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und F4/80+ Monozyten vor. Die inflammatorischen CD11b+Ly6C^{high} Monozyten, die wiederum größtenteils CCR2 exprimierten, waren im Knochenmark von Ackr2-defizienten Tieren dagegen signifikant vermindert (*Abbildung 48C*).

Diese Ergebnisse sind mit einer bei Ackr2-Defizienz verstärkten Mobilisierung von Leukozyten, insbesondere CCR2+ Monozyten aus dem Knochenmark in das periphere Blut vereinbar. Möglicherweise wird dies durch die systemisch erhöhte Konzentration des entsprechenden Chemokinliganden CCL2 im Blut vermittelt (31, 150, 151). Folglich könnte die erhöhte Anzahl an im Blut zirkulierenden inflammatorischen Monozyten und anderer Leukozytenpopulationen zu ihrer gesteigerten renalen Akkumulation und zur verstärkten Entzündungsreaktion in den Ackr2-defizienten postischämischen Nieren beitragen.

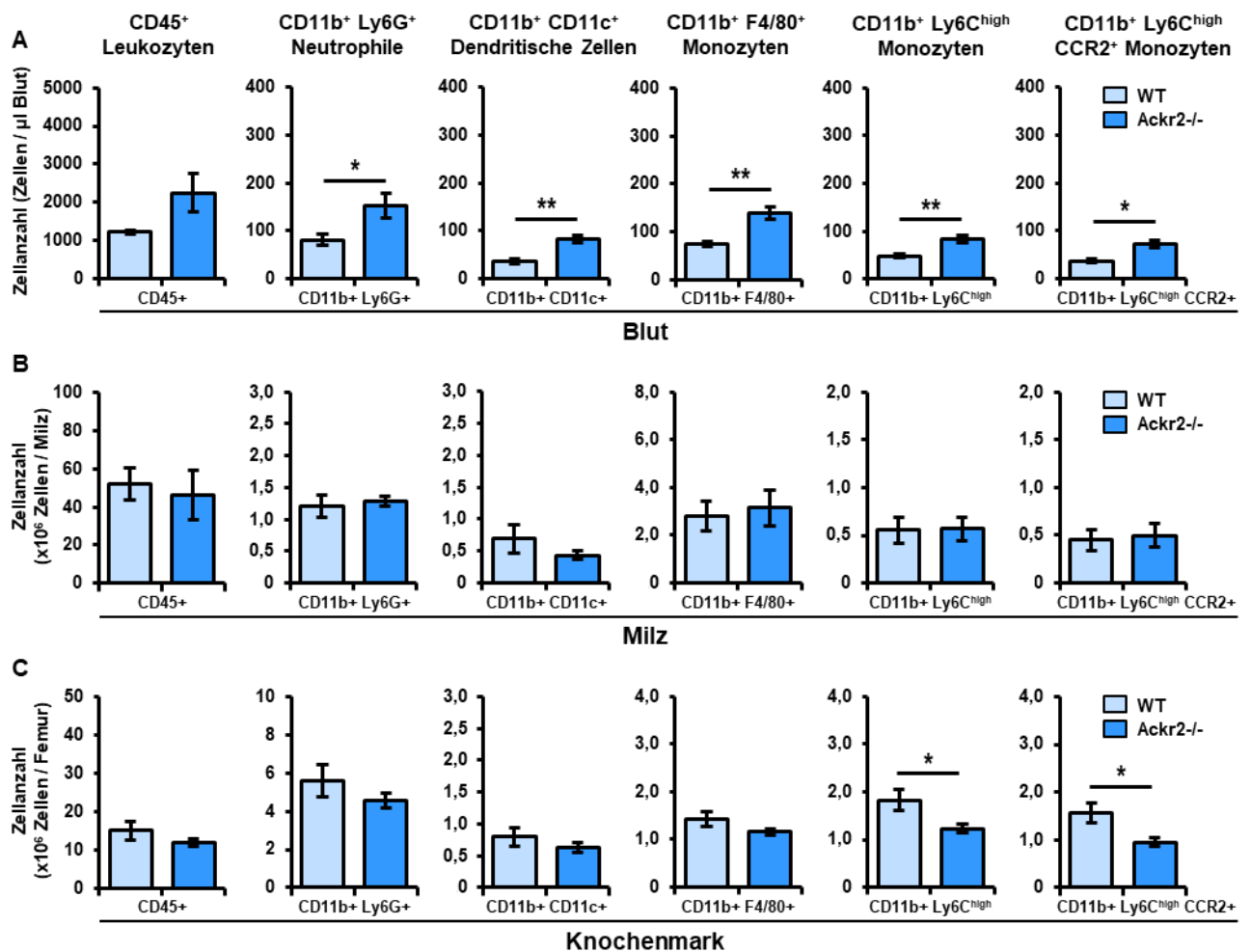


Abbildung 48: Leukozytenzahlen in Blut, Milz und Knochenmark 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden

A: 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden sind im Blut bei Ackr2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp (WT) vermehrt CD11b+Ly6G⁺ neutrophile Granulozyten, CD11b+CD11c⁺ dendritische Zellen, CD11b+F4/80⁺ Monozyten sowie CD11b+Ly6C^{high} inflammatorische Monozyten durchflusszytometrisch nachweisbar. Ein Großteil der CD11b+Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten sind zudem positiv für den Chemokinrezeptor CCR2 (C-C motif receptor 2). **B:** In der Milz zeigt sich kein Unterschied in den Leukozytenzahlen zwischen den beiden Genotypen. **C:** Im Knochenmark sind bei Ackr2-Defizienz weniger CD11b+Ly6C^{high} inflammatorische Monozyten als im Wildtyp nachweisbar, diese Zellen sind ebenso überwiegend positiv für CCR2. Die Nierenarterie wurde einseitig für 45 Minuten abgeklemmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 5 Mäuse je Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01.

4 Diskussion

Die akute Nierenschädigung ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung (152). Beim Voranschreiten einer akuten zu einer chronischen Nierenschädigung kommt es zu einem Verlust des Tubulusepithels, der durch unzureichende Reparaturvorgänge und einem fibrotischen Umbau des Nierengewebes hervorgerufen wird. Neben dem Ausmaß des initialen Schadens beeinflussen die darauffolgende Immunantwort und die lokale Entzündungsreaktion entscheidend den Verlauf nach einer akuten Nierenschädigung (153).

Der Ischämie-Reperfusionsschaden ist eine wichtige Ursache der akuten Nierenschädigung beim Menschen. Hierbei vermitteln die durch das hypoxisch geschädigte Tubulusepithel exprimierten DAMPS sowie proinflammatorische Zytokine und Chemokine die Infiltration von Leukozyten in die geschädigte Niere. Diese unterhalten eine Entzündungsreaktion und verursachen eine weitere Schädigung des Tubulusepithels (16, 153, 154).

Falls die Entzündung in der Niere nicht rasch begrenzt wird, führt sie zur Aktivierung und Akkumulation von fibrogenen Zellen wie Phagozyten, Fibroblasten und Myofibroblasten im renalen Tubulointerstitium (16, 76, 147). Die überschießende Produktion von extrazellulärer Matrix durch diese Zellen verursacht schließlich den fibrotischen Umbau des Nierengewebes. Durch die extrazelluläre Matrixakkumulation werden nicht nur irreversibel geschädigte Nephrone ersetzt, sondern auch der Schaden an den verbleibenden Nephronen durch Kompromittierung des kapillären Blutflusses und der Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen verstärkt.

Um eine anhaltende tubuläre Schädigung und fortschreitende Fibrosierung der Niere zu verhindern, ist somit die Begrenzung der renalen Entzündung nach Ischämie-Reperfusionsschaden entscheidend. Dadurch kann ein Voranschreiten einer akuten Nierenschädigung zu einer chronischen Nierenerkrankung mit irreversiblen Funktionsverlust verhindert werden (153).

ACKR2, vormals D6 genannt, ist ein Chemokin-„Scavenger“, welcher zur Unterfamilie der atypischen Chemokinrezeptoren gehört. ACKR2 kann proinflammatorische Chemokine insbesondere der CC-Subgruppe binden, internalisieren und anschließend intrazellulär abbauen (155). Durch den Abbau von proinflammatorischen Chemokinen im Gewebe spielt ACKR2 nicht nur eine Schlüsselrolle in der Begrenzung einer lokalen Leukozytenakkumulation und Entzündung, sondern auch in der Rückbildung von systemischen inflammatorischen Prozessen sowie in der Regulation von adaptiven Immunantworten (155, 156). ACKR2 wird von vielen parenchymatösen Organen (Haut, Darm,

Lunge, Plazenta) exprimiert, hierbei hauptsächlich auf lymphatischen Endothelzellen (110, 111, 124).

In Tierversuchen mit Acker2-defizienten Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass ACKR2 die Immunantwort und den Parenchymschaden in einigen Krankheitsmodellen wie Myokardinfarkt, Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*, toxischer Leberschädigung sowie Hautentzündungen begrenzt (135, 136, 138, 139).

Des Weiteren führt eine Acker2-Defizienz an lymphatischen Kapillaren zu einer lokalen Anreicherung von inflammatorischen Chemokinen, die eine überschießende peri- und intralymphatische Akkumulation von inflammatorischen Leukozyten nach sich zieht. Hierdurch wird der Lymphfluss reduziert und der Eintritt aktivierter dendritischen Zellen in die Lymphgefäße und ihre Migration in regionale Lymphknoten erschwert (157, 158). Die verminderte Lymphdrainage von inflammatorischen Leukozyten, Chemokinen und Zytokinen könnte somit zur überschießenden Entzündungsreaktion in Acker2-defizienten Geweben beitragen. Zudem erklärt die verminderte Migration Antigen-präsentierender dendritischer Zellen in regionale Lymphknoten das in einigen Krankheitsmodellen beobachtete reduziertes Priming von T-Zellen mit nachfolgend verminderter systemischer (Auto-) Immunreaktivität (133, 142).

Durch die Begrenzung der Entzündungsreaktion könnte ACKR2 die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung nach akuter Nierenschädigung verhindern. Die Arbeitshypothese der vorliegenden Untersuchungen war somit, dass ACKR2 durch vermehrten Abbau proinflammatorischer Chemokine die renale Entzündung und den fibrotischen Umbau der Niere nach akutem Ischämie-Reperfusionsschaden begrenzt. Hierfür wurden Wildtyp- und Acker2-defiziente Mäuse einem renalen Ischämie-Reperfusionsschaden unterzogen und anschließend der Verlauf untersucht. Im Folgenden werden die gewonnenen Ergebnisse in Zusammenschau mit dem aktuellen Wissensstand diskutiert.

4.1 Einfluss von ACKR2 auf den Verlauf des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens

4.1.1 Mögliche pathophysiologische Beeinflussung des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens durch ACKR2

In Wildtyp-Mäusen wurde nach Ischämie-Reperfusionsschaden in den postischämischen Nieren im Vergleich zu gesunden Kontrollnieren *Ackr2*-mRNA signifikant vermehrt exprimiert. Zudem konnte mittels *In situ*-Hybridisierung die renale mRNA-Expression von *Ackr2* auf Endothelzellen des Tubulointerstitiums lokalisiert werden, die in vorangegangenen Arbeiten durch Kofärbung als LYVE-1-positive lymphatische Endothelzellen identifiziert worden waren. Zurückliegende *in vitro*-Untersuchungen haben auch gezeigt, dass aus *Ackr2*-defizienten Mäusen isolierte tubulointerstitielle Zellen nach inflammatorischer Stimulation mit TNF- α im Vergleich zu Wildtyp-Zellen vermehrt das proinflammatorische Chemokin CCL2 bilden. Nach Stimulation isolierter Glomeruli zeigte sich dagegen keine unterschiedliche CCL2-Produktion (144).

Diese Daten sind mit der selektiven Expression von ACKR2 auf lymphatischen Endothelzellen des Tubulointerstitiums, andererseits durch die verminderte Fähigkeit von *Ackr2*-defizientem Gewebe lokal Chemokine abzubauen (124) vereinbar. Von TNF- α ist bekannt, dass es wesentlich zur Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens beiträgt (159-161). Des Weiteren ist bekannt, dass das Tubulointerstitium im Vergleich zu den Glomeruli besonders anfällig für den initialen hypoxisch-ischämischen Zellschaden nach Ischämie-Reperfusionsschaden ist (46). Durch seine Lokalisation und Funktion könnte ACKR2 damit besonders geeignet sein, die tubulointerstitielle Entzündung und Schädigung nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden zu begrenzen und ein Fortschreiten zur chronischen Nierenerkrankung zu verhindern.

4.1.2 Erhöhte CCL-Chemokinkonzentrationen bei *Ackr2*-Defizienz

In vivo war die Konzentration der proinflammatorischen Chemokine CCL2, CCL5 und CXCL10 in den postischämischen Nieren von *Ackr2*-defizienten Tieren 5 Tage und 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden erhöht. 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden zeigte sich dies jedoch noch nicht. Diese Ergebnisse sprechen für eine wichtige Rolle von ACKR2 beim Abbau von proinflammatorischen Chemokinen bei länger anhaltender entzündlicher renaler Gewebeschädigung. Eine entsprechende Funktion von ACKR2 konnte zurückliegend auch in anderen Organen und Krankheitsmodellen nachgewiesen werden. So

waren in Ackr2-defizienten Tieren nach akutem Herzinfarkt und entzündlichen Haut- und Atemwegserkrankungen die Konzentration von CCL-Chemokinen in den entsprechenden Organen ebenfalls stark erhöht (132, 137, 139).

Zurückliegend waren die proinflammatorischen CC-Chemokine als Liganden für ACKR2 identifiziert worden. Erst vor kurzem wurde beschrieben, dass ACKR2 auch das CXCL-Chemokin CXCL10 binden und seine extrazelluläre Verfügbarkeit reduzieren kann (113, 114). Hiermit vereinbar konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nur eine erhöhte renale Konzentration der CC-Chemokine CCL2 und CCL5, sondern auch von CXCL10 in Ackr2-defizienten postischämischen Nieren 5 Tage und 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden nachgewiesen werden. Interessanterweise konnten Bideak et al. im Immunkomplex-Glomerulonephritis-Modell der autologen nephrotoxischen Serumnephritis ebenfalls erhöhte renale Konzentrationen der CCL-Chemokine CCL2 und CCL5, aber auch von CXCL10 bei Ackr2-Defizienz nachweisen (144).

Lokale Chemokinkonzentrationen könnten in den Ackr2-defizienten postischämischen Nieren zusätzlich auch indirekt erhöht sein, durch die bei fehlendem ACKR2-vermittelten Chemokinabbau generell gesteigerten Entzündungsreaktion mit vermehrt Chemokin-abhängig infiltrierenden Leukozyten, die ihrerseits verstärkt Zytokine und Chemokine sezernieren (98-100). Allerdings zeigen die vorangegangenen *in vitro*-Untersuchungen der Arbeitsgruppe an isoliertem tubulointerstitiellem Gewebe, dass unabhängig von einer lokalen Chemokinproduktion durch vermehrt akkumulierende Leukozyten *in vivo* in TNF- α stimuliertem Tubulointerstitium bei Ackr2-Defizienz eine erhöhte Chemokinkonzentration im Überstand vorlag, vereinbar mit einem verminderten ACKR2-vermittelten Chemokinabbau (144). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass ACKR2 im Tubulointerstitium effektiv lokale Chemokinkonzentrationen im subakuten und chronischem Verlauf nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden regulieren und begrenzen kann.

4.1.3 Vermehrte renale Leukozytenakkumulation bei Ackr2-Defizienz

Des Weiteren waren in Ackr2-defizienten Mäusen nach Ischämie-Reperfusionsschaden vermehrt mononukleare Phagozyten in den postischämischen Nieren durchflusszytometrisch nachweisbar. Die verstärkte Akkumulation mononukleärer Phagozyten war am ausgeprägtesten 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden, wenn gleich einige Subpopulationen der mononukleären Phagozyten bereits 24h nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden erhöht nachzuweisen war. Andere Autoren fanden ebenfalls eine erhöhte Zahl an mononukleären Phagozyten nach Herzinfarkt, entzündlichen Haut- und

Atemwegserkrankungen sowie nach Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* im Gewebe Ackr2-defizienter Mäuse im Vergleich zum Wildtyp (132, 137-139).

Zudem waren 5 Wochen nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden die CD4⁺ T-Lymphozyten erhöht. Zumindest von CD4⁺ Th2-Helferzellen ist bekannt, dass sie stark den Chemokinrezeptor CCR4 exprimieren und somit von den Chemokinen CCL17 und CCL22 rekrutiert werden (162, 163). *In vitro* konnte bereits nachgewiesen werden, dass ACKR2 die Chemokine CCL17 und CCL22 abbauen kann (113). Zudem war Ccl22 war auf mRNA-Ebene 5 Tage und 5 Wochen nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden in den Ackr2-defizienten postischämischen Nieren vermehrt induziert. Die vorliegenden Befunde können des Weiteren durch den Chemokinrezeptor CCR5 erklärt werden, der sowohl Makrophagen als auch CD4⁺ Th1-Helferzellen rekrutieren und aktivieren kann und zudem eine Rolle in der Migration von dendritischen Zellen spielt (164, 165). Liganden von CCR5 sind unter anderem die Chemokine CCL2 und CCL5 (138), welche beide 5 Tage und 5 Wochen nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden in den postischämischen Nieren der Ackr2-defizienten Tieren in höherer Konzentration vorlagen.

Interessanterweise waren im subakuten Modell 5 Tage nach unilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden auch die neutrophilen Granulozyten in den Ackr2-defizienten postischämischen Nieren signifikant vermehrt, obwohl CCL-Chemokine in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten normalerweise keine dominierende Rolle spielen (79). Zudem konnte in einem entzündlichen Modell der Haut nach Injektion von Phorbol ester kein wesentlicher Unterschied in der Infiltration von neutrophilen Granulozyten zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (132). Die vermehrte renale Akkumulation neutrophiler Granulozyten könnte einerseits indirekt durch die verstärkte renale Entzündungsreaktion bei Ackr2-Defizienz verursacht sein. Eine weitere mögliche Erklärung für diesen Befunde ist, dass über die gesteigerte Entzündungsreaktion NF- κ B-vermittelt die Expression des Chemokinrezeptors CCR2 auf neutrophilen Granulozyten induziert werden kann und somit neutrophile Granulozyten unter anderem durch das Chemokin CCL2 rekrutiert werden. Dies konnte in einem Sepsis-Tiermodell bereits nachgewiesen werden (166).

In der Immunhistologie bestätigten sich die Ergebnisse der Durchflusszytometrie. Die Immunhistologie zeigte des Weiteren, dass sich die gesteigerte Akkumulation der intrarenalen Leukozyten hauptsächlich auf die kortikomedulläre Übergangsregion konzentrierte, die nach Ischämie-Reperfusion geschehen besonders geschädigt wird. Dies konnte vor allem für die mononukleären Phagozyten bereits nachgewiesen werden (167, 168).

Zusammengefasst zeigte sich somit übereinstimmend mit vorangegangenen Untersuchungen in anderen Krankheitsmodellen (132, 137, 139), dass das Unvermögen von Ackr2-defizienten

Mäusen, lokale Chemokingradienten nach Ischämie-Reperfusionsschaden abzubauen zu einer vermehrten Akkumulation von Leukozyten in den postischämischen Nieren führt.

4.1.4 Erhöhter struktureller Schaden bei Ackr2-Defizienz

Obwohl bereits 24 Stunden nach bilateralem Ischämie-Reperfusionsschaden einige Subpopulationen der mononukleären Phagozyten in Ackr2-defizienten postischämischen Nieren erhöht waren, hatte dies keinen akuten Einfluss auf die Nierenfunktion, gemessen anhand der Retentionsparameter. Beide Genotypen wiesen eine vergleichbare Ausprägung der Niereninsuffizienz auf.

Um das Ausmaß des tubulären Schadens zu bestimmen, wurde histologisch in der PAS-Färbung die Atrophie des Tubulusepithels, die Zahl intraluminaler Zylinder, Denudation der Tubuli und eine Abflachung der Tubuluszellen untersucht und semiquantitativ ausgewertet. Hierbei war der tubuläre Schaden 24 Stunden und 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren vergleichbar. Im chronischen Verlauf 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden wiesen die postischämischen Ackr2-defizienten Nieren jedoch einen deutlich erhöhten tubulären Schaden auf. Entsprechend konnte 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren ein vergleichbarer Rückgang an mit Lotus tetragonolobus Lektin-angefärbten proximalen Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden. Nach 5 Wochen wiesen die postischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp jedoch einen signifikant stärkeren Verlust an proximalen Tubulusepithelzellen auf.

Analog zur Infiltration der Leukozyten konzentrierte sich der tubuläre Schaden vor allem auf die kortikomedulläre Übergangsregion. Dies passt zu der Erkenntnis, dass die Schädigung nach Ischämie-Reperfusionsschaden am ausgeprägtesten das S3-Segment des proximalen Tubulus betrifft, das in der kortikomedullären Übergangsregion liegt (46). Ursächlich hierfür ist einerseits der verhältnismäßig erhöhte Sauerstoffbedarf des proximalen Tubulus durch die dort vermehrt exprimierte Na⁺K⁺-ATPase (25), andererseits die Unfähigkeit der Pars recta des proximalen Tubulus zur anaeroben Glykolyse (26). Zudem sind die Pars recta des proximalen Tubulus und die dicke aufsteigende Schleife des distalen Tubulus im äußeren Nierenmark bereits unter physiologischen Bedingungen durch Sauerstoffdiffusion über die im Gegenstromprinzip durchflossenen peritubulären Kapillaren grenzwertig hypoxisch (24).

Die Expression der renalen Schadensmarker KIM-1, NGAL und TIMP2 korrelierten weitgehend mit den Ergebnissen der Histologie. So konnte 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden keine unterschiedliche Expression zwischen den Genotypen

festgestellt werden, während sich nach 5 Wochen ein deutlicher Anstieg der renalen Schadensmarker in Ackr2-defizientem postischämischem Nierengewebe nachweisbar war. 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden lag im Gegensatz zur vergleichbaren histologischen Schädigung jedoch bereits ein Expressionsanstieg der renalen Schadensmarker bei Ackr2-Defizienz vor. Sie scheinen daher sensitiver als die histologische Auswertung einen verstärkten tubulären Schaden der Ackr2-defizienten Tiere im subakuten Verlauf nach Ischämie-Reperfusionsschaden anzuzeigen. Ihre Erhöhung korrelierte mit der gesteigerten Infiltration von mononukleären Phagozyten und Granulozyten am Tag 5 nach ischämischer Nierenschädigung.

Dagegen ist 24 Stunden nach Ischämie-Reperfusionsschaden offensichtlich die vermehrte Akkumulation nur weniger mononukleärer Phagozyten-Subpopulationen bei Ackr2-Defizienz nicht ausreichend, um einen vermehrten funktionellen und strukturellen Schaden in den postischämischen Nieren auszulösen. Dies ist wenig überraschend, da über die Hälfte der nachweisbaren Leukozyten nach 24 Stunden neutrophile Granulozyten waren, die als frühe Effektorzellen die tubuläre Schädigung vermitteln, jedoch bei Ackr2-Defizienz zu diesem Zeitpunkt nicht vermehrt in den postischämischen Nieren akkumulierten. Die von ACKR2 degradierten CCL-Chemokine scheinen somit in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zumindest in der Frühphase nach ischämischer Schädigung eine untergeordnete Rolle zu spielen (79, 132).

Übereinstimmend mit der verstärkten strukturellen Schädigung in Ackr2-defizienten postischämischen Nieren 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden konnte bereits in einer Vielzahl anderer Krankheitsmodelle ein vermehrter Organschaden bei Ackr2-Defizienz demonstriert werden, der mit erhöhten Chemokin- und Leukozytenkonzentrationen in den betreffenden Organen einherging. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Ackr2-defiziente Mäuse nach Herzinfarkt ein größeres Infarktareal, eine verminderte Ejektionsfraktion des linken Ventrikels und letztendlich geringere Überlebensraten aufwiesen (139). Ebenso konnten nach Infektion mit *Mykobacterium tuberculosis* vermehrt diffuse Leberzellnekrosen und eine stärkere Transaminasenerhöhung nachgewiesen werden (138). Ackr2-defiziente Tiere entwickelten nach Injektion von Phorbolester in die Haut im Gegensatz zum Wildtyp deutliche Psoriasis-ähnliche Hautläsionen (132). Auch traten in Ackr2-defizienten Tieren nach subkutaner Injektion von komplettem Freund'schem Adjuvans (CFA) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren vermehrt Granulom-ähnliche Läsionen mit Nekrosen und eine ausgeprägtere Neovaskularisation auf (135).

Zusammengefasst führt Ackr2-Defizienz nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden in den postischämischen Nieren nicht nur zu erhöhten lokalen Chemokinkonzentrationen und einer vermehrten Akkumulation von überwiegend mononukleären Phagozyten, sondern ist auch mit

einem stärkeren strukturellen Schaden in der kortikomedullären Übergangsregion im subakuten und vor allem chronischen Verlauf assoziiert.

4.1.5 Inflammation und Rekrutierung von CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischen Makrophagen bei Ackr2-Defizienz

Die vermehrten Leukozyteninfiltrate und der verstärkte tubuläre Schaden in den Nieren von Ackr2-defizienten Tieren gingen 5 Tage, aber insbesondere 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden mit einer verstärkten intrarenalen Entzündungsreaktion einher. So waren in den postischämischen Nieren die Expression der proinflammatorischen Chemokine Ccl2, Ccl5, Ccl22 und Cxcl10 auf mRNA-Ebene bei Ackr2-Defizienz erhöht. Von diesen Chemokinen ist bekannt, dass sie von aktivierten proinflammatorischen Makrophagen exprimiert werden (146). Des Weiteren war die mRNA-Expression von M1-Makrophagen-Markern wie Tnf- α und iNos 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden bei Ackr2-Defizienz erhöht. Diese werden von aktivierten proinflammatorischen mononukleären Phagozyten exprimiert. Die anhaltende, deutlich verstärkte Entzündungsreaktion und die vermehrten Leukozyteninfiltrate verhindern bei Ackr2-Defizienz somit möglicherweise eine suffiziente Regeneration des Tubulusepithels der postischämischen Nieren im chronischen Verlauf.

Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass die Infiltration von CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischen Makrophagen in die postischämischen Nieren von CCL2 vermittelt wird und von der Interaktion zwischen CCL2 und dem Chemokinrezeptor CCR2 abhängig ist (31). Tatsächlich war 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden die Anzahl an CCR2 exprimierenden CD11b⁺ Ly6C^{high} Makrophagen in den Nieren von Ackr2-defizienten Mäusen signifikant erhöht.

Somit führen die bei Ackr2-Defizienz erhöhten CCL2-Konzentrationen im Tubulointerstitium der postischämischen Nieren in der Regenerationsphase des Ischämie-Reperfusionsschadens möglicherweise zu einer vermehrten Rekrutierung von proinflammatorischen Makrophagen. Diese Rekrutierung von proinflammatorischen Makrophagen ist wahrscheinlich von der Interaktion von CCL2 mit CCR2 abhängig und trägt zu einer anhaltenden inflammatorischen Nierenschädigung nach Ischämie-Reperfusionsschaden bei.

Zusätzlich führte Ackr2-Defizienz auch zu einer erhöhten systemischen Entzündungsreaktion. So waren die Konzentrationen von CCL2 sowie die Anzahl an neutrophilen Granulozyten und Monozyten im Blut von Ackr2-defizienten Mäusen nach Ischämie-Reperfusionsschaden erhöht. Die Anzahl zirkulierender CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten im

peripheren Blut war ebenfalls erhöht. Korrespondierend hierzu waren im Knochenmark von Ackr2-defizienten Mäusen die Anzahl an inflammatorischen Monozyten nach Ischämie-Reperfusionsschaden erniedrigt. Der Großteil dieser CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten im Blut und im Knochenmark war zudem für CCR2 positiv.

Dies weist auf eine CCR2-abhängige Emigration von Monozyten aus dem Knochenmark hin, welche durch systemisch erhöhte CCL2-Konzentrationen im Blut der Ackr2-defizienten Mäusen vermittelt werden könnte (31, 150, 151). Erhöhte Konzentrationen von CCL2 im Serum von Ackr2-defizienten Mäusen wurden bereits beschrieben (133, 134). Ebenso konnten Savino et al. analog zu den hier erhobenen Daten zeigen, dass Ackr2-defiziente Mäuse vermehrt Ly6C^{high} Monozyten im Blut aufweisen, während sie im Knochenmark vermindert sind. Zudem konnten hierbei die Autoren durch Experimente mit CCR2-defizienten Knochenmark-Chimären nachweisen, dass diese vermehrte Mobilisation von Ly6C^{high} Monozyten CCR2-abhängig erfolgt (133).

Somit könnte die vermehrte CCL2/CCR2-abhängige Mobilisation von inflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark und ihre gesteigerte Zahl im peripheren Blut der Ackr2-defizienten Tiere zu ihrer vermehrten renalen Akkumulation und der daraus resultierenden persistierenden intrarenalen Entzündung nach Ischämie-Reperfusionsschaden beitragen.

4.1.6 Stärkere postischämische Fibrosierung bei Ackr2-Defizienz

Im chronischen Verlauf nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden ist ein Rückgang der renalen Entzündung notwendig, um die anhaltende immunvermittelte Schädigung aufzuhalten und die Regeneration des geschädigten Tubulusepithels zu ermöglichen (154, 169, 170). Die Ackr2-Defizienz verursacht jedoch eine anhaltende Entzündung nach Ischämie-Reperfusionsschaden, welche für die progressive Schädigung des Tubulusepithels der postischämischen Nieren verantwortlich ist. Die Ackr2-Defizienz fördert somit den Übergang von einer akuten Nierenschädigung in eine chronische Nierenerkrankung. Die bis Woche 5 anhaltend gesteigerte mRNA-Expression von Ackr2 in den postischämischen Wildtyp-Nieren weist umgekehrt auf einen möglichen entzündungsbegrenzenden, nephroprotektiven Effekt von ACKR2 hin.

Die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung nach akuter Nierenschädigung ist histologisch durch einen Verlust an Tubuli sowie einer zunehmenden Fibrosierung des Interstitiums gekennzeichnet (76, 147). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ackr2-Defizienz 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden nicht nur zu einer vermehrten Infiltration von inflammatorischen mononukleären Phagozyten und einem vermehrten Schaden der Tubuli führt, sondern auch ein gesteigertes fibrotisches Remodelling

in den postischämischen Nieren vermittelt. So zeigte sich in den postischämischen Nieren bei Ackr2-Defizienz ein erheblicher Verlust an proximalen Tubuli und eine deutliche Vergrößerung des Volumens des Interstitiums als histopathologisches Korrelat einer vermehrten tubulointerstitiellen Fibrosierung im Vergleich zum Wildtyp. Ebenso konnten in der Immunhistochemie vermehrt α SMA⁺ Myofibroblasten im Tubulointerstitium von Ackr2-defizienten Mäusen 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden nachgewiesen werden. 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden zeigten sich diese Veränderungen nicht.

5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden waren in den postischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Tieren nicht nur die mRNA-Expression von M1-, sondern auch von M2-Makrophagen-Markern erhöht. So zeigte sich bei Ackr2-Defizienz signifikant mehr Mrc1, Msr-1 und Arginase 1 exprimiert. Renale Phagozyten mit einem M2-Phenotyp vermitteln einerseits Reparaturvorgänge des Gewebes, andererseits vermitteln sie die Ablagerung von extrazellulärer Matrix im Tubulointerstitium und tragen so zu fibrotischen Umbauvorgängen des Gewebes bei (146, 171). Passend dazu zeigte sich eine erhöhte mRNA-Expression des profibrotischen Wachstumsfaktors Ctgf und der extrazellulären Matrixmoleküle Fibronectin, Prokollagen 1 und Prokollagen 4 in den postischämischen Nieren Ackr2-defizienter Tiere. Ebenso waren auf mRNA-Ebene die Fibroblasten-Marker α Sma und Fsp1 in Ackr2-defizienten postischämischen Nieren vermehrt exprimiert. Die bei Ackr2-Defizienz verstärkte Akkumulation α SMA-positiver Myofibroblasten 5 Wochen nach ischämischer Schädigung zeigte sich auch immunhistologisch.

Dagegen war im subakuten Modell 5 Tage nach Ischämie-Reperfusionsschaden die mRNA-Expression der untersuchten Fibrosemarker mit Ausnahme einer tendenziell gesteigerten Expression von Ctgf sowie die Zahl α SMA-positiver Myofibroblasten in den postischämischen Nieren von Ackr2-defizienten Tieren und Wildtyp vergleichbar. Dies weist darauf hin, dass nur eine anhaltend gesteigerte Leukozytenakkumulation und Entzündung über längere Zeit zu einer gesteigerten renalen Fibrose bei Ackr2-Defizienz führt.

Zusätzlich tragen aus dem Knochenmark stammende fibrogene Zellen, wie zum Beispiel CD 45⁺ CD11b⁺ Kollagen1 Fibrozyten zu fibrotischen Umbauvorgängen nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden bei (172, 173). Fibrozyten exprimieren den Chemokininrezeptor CCR2 (149). Im Modell der unilateralen Ureterobstruktion konnte bereits nachgewiesen werden, dass CCR2 sowohl die Infiltration von Fibrozyten in die Niere, als auch eine gesteigerte Fibrosierung der Niere vermittelt (149, 174-176). Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass im Tiermodell einer IL-10-induzierten Lungenfibrose eine aktivierte CCL2/CCR2-Achse zu einer M2-Aktivierung der Phagozyten und zu einer Fibrozyten-Rekrutierung führt (177). Ein verminderter Abbau des CCR2 Ligandens CCL2 in Ackr2-defizienten postischämischen Nieren könnte somit zu einer vermehrten renalen Akkumulation

von Fibrozyten und einer gesteigerten Fibrosierung nach Ischämie-Reperfusionsschaden beitragen. Tatsächlich war die durchflusszytometrisch bestimmte Zahl der akkumulierenden Fibrozyten in den postischämischen Nieren von Akr2-defizienten Mäusen 5 Wochen nach Ischämie-Reperfusionsschaden erhöht.

Die Akr2-Defizienz führt somit nicht nur über eine verstärkte und persistierende Entzündungsreaktion in der Niere zur einer gesteigerten renale Fibrose, sondern trägt möglicherweise durch eine vermehrte CCL2-abhängige Rekrutierung von Fibrozyten in die postischämischen Nieren auch direkt zu fibrotischen Umbauvorgängen und damit zur Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden bei.

4.2 Effekte der Acker2-Defizienz nach renalem Ischämie-Reperfusionsschadens im Vergleich zu weiteren renalen Erkrankungsmodellen

4.2.1 Unilaterale Ureterobstruktion

Eine mögliche nephroprotektive Wirkung von ACKR2 wurde auch im Modell der obstruktiven Nephropathie nach unilateraler Ureterobstruktion untersucht. Hierfür wurde den Mäusen einseitig der Ureter ligiert. Die unilaterale Ureterobstruktion stellt ein klassisches Modell zur Untersuchung einer sich entwickelnden chronischen tubulointerstitiellen Fibrose dar, wie sie für chronische Nierenerkrankungen charakteristisch ist (178).

7 und 14 Tage nach unilateraler Ureterobstruktion fand sich in Wildtyp- und Acker2-defizienten Mäusen ein vergleichbares Ausmaß der tubulären Dilatation und des Tubuluszellschadens, sowie eine ähnlich hohe Expansion des interstitiellen Volumens. Bis auf wenige Subpopulationen konnte auch bei der Akkumulation intrarenaler Leukozyten in der Durchflusszytometrie und in der Immunhistologie kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Die mRNA-Expression des tubulären Schadensmarkers Kim-1 und der proinflammatorischen Chemokine CCL2 und CCL5 unterschied sich nicht zwischen Wildtyp- und Acker2-defizienten Mäusen. Ebenso war auch die renale Akkumulation CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten in obstruierte Nieren beider Genotypen vergleichbar. Die renale Expression von Fibrose-Markern, der Akkumulation von α SMA⁺ Myofibroblasten und Fibrozyten war ebenfalls in beiden Genotypen gleich hoch. Trotz einer fehlenden Beeinflussung der renalen Entzündung und Fibrose im Verlauf der obstruktiven Nephropathie waren interessanterweise die systemische Chemokinkonzentration von CCL2 im Serum und die Anzahl an im Blut zirkulierenden CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten bei Acker2-Defizienz erhöht (179). Im Gegensatz zu der voranschreitenden Fibrose nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden hatte ACKR2 somit keinen Einfluss auf die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung nach unilateraler Ureterobstruktion, trotz ähnlicher systemischer Effekten (179).

Diese Ergebnisse sind überraschend, da von dem Modell der unilateralen Ureterobstruktion bekannt ist, dass im Tubulointerstitium der geschädigten Nieren deutlich CCL2 exprimiert wird und es folglich analog zum Ischämie-Reperfusionsschaden zur Infiltration von CCR2-positiven mononukleären Leukozyten und Fibrozyten kommt (149, 174-176). Ein fehlender ACKR2-vermittelter Abbau von proinflammatorischen Chemokinen sollte folglich ähnlich wie nach Ischämie-Reperfusionsschaden zu einer vermehrten renalen Entzündung, einer vermehrten

Infiltration von Leukozyten und Fibrozyten und letztendlich zu einem gesteigerten fibrotischen Umbau des Tubulointerstitiums in der obstruierten Niere führen. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen eines nephroprotektiven ACKR2-Effekts könnte sein, dass in diesem Modell der Ureter permanent ligiert ist. Die Folge ist ein andauernder, progredienter tubulärer Schaden durch den postrenalen mechanischen Reiz. Dies führt zum Fehlen einer Regenerationsphase wie in dem Modell des Ischämie-Reperfusionsschadens, in der ACKR2 die andauernde Entzündung begrenzen kann und somit eine Regeneration des Nierengewebes erlaubt.

4.2.2 Aristolochiasäure-induzierte Nephropathie

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde die funktionelle Rolle von ACKR2 in einem weiteren Modell mit primär tubulointerstitieller Nierenschädigung untersucht, der Aristolochiasäure-induzierten Nephropathie. Der Aristolochiasäure-induzierte Nierenschaden wird durch eine akute toxische Schädigung des Tubulusepithels verursacht. Ähnlich wie nach dem Ischämie-Reperfusionsschaden folgt auch hier im Anschluss an die akute Nierenschädigung eine Regenerationsphase. Falls es durch eine persistierende Entzündung des Nierengewebes zu einer Kompromittierung der tubulären Reparaturmechanismen kommt, kann sich eine ausgeprägte chronische Nierenerkrankung entwickeln (179).

Das Ausmaß der funktionellen Nierenschadens, gemessen an den renalen Retentionsparametern Serumkreatinin und Harnstoff war bis Tag 8 des Modells zwischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen vergleichbar. Im chronischen Verlauf bis Tag 14 war jedoch im Vergleich zum Wildtyp ein deutlicher Anstieg der Retentionsparameter bei Ackr2-Defizienz zu verzeichnen. Ebenso war histologisch der tubuläre Schaden bei Ackr2-defizienten Mäusen verstärkt und die Expression der tubulären Schadensmarker erhöht. Außerdem zeigte sich wie schon im chronischen Verlauf nach Ischämie-Reperfusionsschaden eine vermehrte Infiltration von Leukozyten, insbesondere von Makrophagen in die Ackr2-defizienten Nieren. Entsprechend waren nicht nur die renale mRNA-Expression der M1-Makrophagen-Marker und der proinflammatorischen Chemokine erhöht, sondern auch die Expression von M2-Makrophagen-Markern. Passend dazu fanden sich auch Anzeichen eines verstärkten fibrotischen Gewebeumbaus in Ackr2-defizienten Nieren 14 Tage nach Induktion der Aristolochiasäure-induzierten Nephropathie. So war die Expression renaler Fibrosemarker und der extrazellulären Matrixmolekülen erhöht, histologisch zeigte sich eine vermehrte Ausdehnung der interstitiellen Matrix und eine vermehrte Akkumulation renaler α SMA⁺ Myofibroblasten (179).

Zusammenfassend war der Phänotyp der Aristolochiasäure-induzierten Nephropathie im chronischen Verlauf dem Phänotyp nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden sehr ähnlich. Ackr2-Defizienz führte in beiden Modellen zu einem stärkeren tubulären Schaden, der mit gesteigerter renaler Leukozyteninfiltration, Entzündungsaktivität und tubulointerstitieller Fibrose einherging. Diese Daten unterstützen die These, dass ACKR2 nach akuter tubulärer Nierenschädigung in der Regenerationsphase eine wichtige Rolle bei der Begrenzung der renalen Entzündung und des fibrotischen Gewebeumbaus spielt. Damit verhindert ACKR2 die Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung nach einer akuten Nierenschädigung unterschiedlicher Genese.

4.2.3 Immunkomplex-Glomerulonephritis

Des Weiteren wurde die Rolle von ACKR2 bereits im Verlauf der chronischen autologen nephrotoxischen Serumnephritis, einem Modell einer Immunkomplex-Glomerulonephritis charakterisiert (180). Hierfür wurde nach subkutaner Immunisierung der Mäuse mit Schaf-Immunglobulinen eine autologe nephrotoxische Nephritis durch einmalige intravenöse Injektion von nephrotoxischem Serum vom Schaf induziert. Die sich in der Folge bildenden glomerulären Immunkomplex-Ablagerungen führen sowohl zu einer humoralen als auch zu einer zellulären Immunantwort gegen glomeruläre Antigene. Hierdurch erfolgt Chemokin-abhängig die renale Infiltration von Leukozyten, die zur Entwicklung der Glomerulonephritis wesentlich beitragen. Neben der glomerulären Entzündung tritt im chronischen Modell auch eine charakteristische sekundäre tubulointerstitielle Entzündung und Fibrose auf (144).

Ähnlich wie im Modell der Aristolochiasäure-induzierten Nephropathie zeigte sich eine stärkere Beeinträchtigung der Nierenfunktion bei Ackr2-Defizienz anhand höherer Retentionsparameter und einer ausgeprägteren Albuminurie. Des Weiteren war histologisch bei Ackr2-Defizienz eine vermehrte Glomerulosklerose, ein höherer Verlust an Podozyten und analog zum Ischämie-Reperfusionsschaden ein stärkerer tubulärer Schaden nachweisbar. Ebenso wiesen Ackr2-defiziente Nieren eine verstärkte Infiltration von CD4⁺ T-Zellen und mononukleären Phagozyten auf. Dies war jedoch nur im Tubulointersitium, nicht im Glomerulus nachweisbar, was gut mit der auch in diesem Modell nachgewiesenen tubulointerstitiellen, aber nicht glomerulären Ackr2-Expression und den bereits erwähnten *in vitro*-Daten korreliert, die eine höhere CCL2-Produktion in TNF α -stimuliertem Ackr2-defizientem tubulointerstitiellem, nicht aber glomerulärem Gewebe demonstrierten (144). Ähnlich zu dem hier untersuchten Modell des Ischämie-Reperfusionsschadens wiesen Ackr2-defiziente Tiere eine verstärkte renale Entzündungsreaktion auf, gemessen anhand einer höheren mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen und proinflammatorischen Chemokinen. Zudem kam es bei Ackr2-Defizienz zu einem verstärkten fibrotischen

Gewebeumbau in den nephritischen Nieren. So waren die Expression extrazellulärer Matrixmolekülen sowie die Anzahl an intersitiellen α SMA+ Myofibroblasten und renalen Fibrozyten in Ackr2-defizienten Tieren erhöht (142). Wie im hier untersuchten subakuten und chronischen Verlauf nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden konnte in Ackr2-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp ein erhöhter renaler Gehalt an proinflammatorischen Chemokinen nachgewiesen werden, vereinbar mit ihrer reduzierten Abbaukapazität bei Ackr2-Defizienz. Entsprechend der tubulointerstitiell lokalisierten Ackr2-Expression führt dies zu einer verstärkten tubulointerstitiellen Leukozyteninfiltration, Entzündung und tubulären Gewebeschädigung, die wiederum den primär glomerulären Schaden der Glomerulonephritis verstärkt, verdeutlicht durch die vermehrte Albuminurie und Glomerulosklerose (142).

Analog zu der vorliegenden Arbeit wiesen Ackr2-defiziente Tiere mit nephrotoxischer Serumnephritis ebenfalls systemisch erhöhte Serumkonzentrationen von CCL2 und eine höhere Zahl Ly6C^{high} inflammatorischen Monozyten im Blut auf. In beiden Krankheitsmodellen könnte somit neben der erhöhten renalen Chemokinkonzentration eine vermehrte Chemokin-vermittelte Mobilisation leukozytärer Effektorzellen aus dem Knochenmark zu ihrer verstärkten renalen Infiltration beitragen.

Interessanterweise war jedoch trotz des erhöhten strukturellen Nierenschadens die regionale T-Zell Antwort in drainierenden renalen Lymphknoten bei Ackr2-Defizienz deutlich abgeschwächt. So zeigte sich in den Lymphknoten bei Ackr2-Defizienz eine verminderte Anzahl an CD69+ T-Lymphozyten und CD80+/CD86+ dendritischen Zellen, trotz vergleichbarer Absolut-Zahlen an T-Lymphozyten und CD11c⁺ dendritischen Zellen (144). Die lokale, adaptive Immunantwort ist somit bei Ackr2-Defizienz abgeschwächt. Passend hierzu wurde in Modellen anderer Autoimmunerkrankungen wie der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis, deren Aktivität abhängig von einer adaptiven zellulären Immunantwort und effektiven Antigenpräsentation ist, ein protektiver Effekt einer Ackr2-Defizienz mit geringerer autoimmuner Aktivierung nachgewiesen (142, 143). Die Autoren führen dies auf eine Verlegung der Lymphgefäße durch eine übermäßige Ansammlung an Leukozyten am lymphatischen Endothel zurück, das bedingt durch das Fehlen der lymphatischen Ackr2-Expression mit proinflammatorischen Chemokinen überladen wird. Hierdurch ist die Migration der aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen in die regionalen Lymphknoten und die nachfolgende T-Zell-Aktivierung eingeschränkt (157), was auch im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis nachgewiesen werden konnte (144). Allerdings konnte diese reduzierte adaptive Immunantwort bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis die überschießende renale Leukozyteninfiltration und Inflammation im Tubulointerstitium mit letztendlich verschlechtertem Verlauf nicht begrenzen (144).

Zusammengefasst zeigen diese Daten der Immunkomplex-Glomerulonephritis, dass ACKR2 hier ähnliche antiinflammatorische und antifibrotische Eigenschaften wie nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden hat, obwohl die Immunkomplex-Glomerulonephritis deutlich abhängiger von der adaptiven Immunantwort ist. Entscheidend hierfür scheint wie nach Ischämie-Reperfusionsschaden die ACKR2-vermittelte renale Chemokin-Clearance mit nachfolgend verminderter Infiltration inflammatorischer Leukozyten und Fibrozyten in das tubulointerstitielle Kompartiment zu sein.

4.2.4 Diabetische Nephropathie

Zheng et al. publizierten zurückliegend Untersuchungen zur funktionellen Rolle von ACKR2 im OVE26-Mausmodell einer diabetischen Nephropathie. Für die Entwicklung der diabetischen Nierenschädigung im Glomerulus und Tubulointersitium sind inflammatorische Prozesse verantwortlich, die durch anhaltend erhöhte Glukosekonzentrationen hervorgerufen werden. So kommt es auch bei der diabetischen Nephropathie zur erhöhten Expression von proinflammatorischen Chemokinen und zur Infiltration von Leukozyten in die Niere. Hierdurch kommt es letztendlich zu einer glomerulären Matrixexpansion und Sklerose, sowie einer tubulointersitiellen Fibrose mit zunehmendem Funktionsverlust der Niere (145).

Die Autoren zeigen, dass eine Acker2-Defizienz in ihrem Modell die Glukosekonzentration im Blut und damit die den renalen Schaden auslösende Hyperglykämie nicht beeinflusste. Acker2-defiziente Mäuse im Alter von 2, 4 und 6 Monaten zeigten jedoch überraschenderweise eine deutlich verminderte Albuminurie als Hinweis auf eine geringere glomeruläre Schädigung. Immunhistologisch war zudem die renale Infiltration von CD45+ Leukozyten in Acker2-defizienten Mäusen reduziert. Außerdem war die mRNA-Expression der proinflammatorischen Chemokine Ccl2 und Ccl5 in den Acker2-defizienten Nieren verringert. Passend hierzu konnte in der Histologie eine deutlich geringere renale Fibrosierung bei Acker2-Defizienz nachgewiesen werden(145). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass eine Acker2-Defizienz bei der Entwicklung des diabetischen Nierenschadens in dem hier untersuchten Tiermodell unerwarteter Weise protektiv ist, während sie in den oben beschriebenen Krankheitsmodellen zu einem verschlechterten Verlauf führte oder ihn wie nach Ureterligatur kaum beeinflusste.

Die Ursachen für diese gegensätzlichen Befunde sind unklar. Möglicherweise liegen sie in der progressiven Natur der diabetischen Nierenschädigung. So führt eine andauernde Schädigung durch die persistierende Hyperglykämie, ähnlich der irreversiblen Ureterligatur im Modell der unilateralen Ureterobstruktion, zu einem andauernden, progredienten renalen Schaden ohne Regenerationsphase, in der die ACKR2-vermittelte Begrenzung der

Entzündungsaktivität eine effizientere Reparatur geschädigten renalen Gewebes erlaubt. Des Weiteren beeinflusst ACKR2 durch lokale Reduktion von Chemokinkonzentrationen die Akkumulation von proinflammatorischen, aber auch regulatorischen, immunsuppressiven Leukozytenpopulationen (133). In einigen Krankheitsmodellen könnte ACKR2 deren Chemokin-vermittelte Akkumulation im geschädigten Gewebe begrenzen, so dass Akr2 Defizienz Entzündungsaktivität und Organschädigung in diesem Fall reduziert. Somit moduliert ACKR2 abhängig von der Erkrankung und dem chronischen Verlauf komplexe Effekte, die nicht immer zwingend antiinflammatorisch sein müssen.

4.2.5 Lupus-Nephritis

In der eigenen Arbeitsgruppe wurde zudem die funktionelle Rolle von ACKR2 bei der Lupus-Nephritis in B6.lpr-Mäusen charakterisiert. In der Pathogenese der Lupus-Nephritis führt die Ablagerung von Immunkomplexen zu einer Aktivierung des Komplementsystems, welche zu einer renalen Schädigung und Auslösung einer Entzündungsreaktion führt. Hierdurch kommt es zur Infiltration von Leukozyten in die Glomeruli und in das Tubulointerstitium, welche die renale Schädigung sowie Entzündung weiter verstärken.

In vitro konnte bei Akr2-Defizienz in isoliertem tubulointerstitiellen Gewebe von B6.lpr-Mäusen nach Stimulation mit TNF α eine erhöhte Konzentration an CCL2 nachgewiesen werden, während in isolierten Glomeruli kein Unterschied festgestellt werden konnte.

Die Expression von Akr2 war in den Nieren und Lungen von B6.lpr-Mäusen, welche einen systemischen Lupus erythematodes entwickelten, erhöht. Im Alter von 28 Wochen waren bei Wildtyp- und Akr2-defizienten Tieren die Retentionsparameter nicht erhöht. Trotzdem konnte bei beiden Genotypen in der Histologie eine diffuse proliferative Glomerulonephritis mit Proliferation von Mesangialzellen und einer glomerulären Hyperzellularität nachgewiesen werden. Der glomeruläre Schaden, abgeleitet anhand histologischer Aktivität- und Chronizitäts-Indices der Nephritis, war in Wildtyp- und Akr2-defizienten B6.lpr-Mäusen jedoch vergleichbar.

Akr2-defiziente B6.lpr-Mäuse wiesen eine erhöhte Infiltration von CD3⁺ T-Zellen sowie B-Zellen auf, während in der Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen kein Unterschied bestand. Zudem war die Infiltration von den T-Zellen bei Akr2-Defizienz überwiegend im Tubulointerstitium nachweisbar. Außerdem konnte eine vermehrte Akkumulation von CD3⁺ T-Zellen in peribronchialen Gewebe bei Akr2-Defizienz nachgewiesen werden.

Trotz der vermehrten Infiltration von Lymphozyten bei Akr2-Defizienz waren die Konzentrationen von proinflammatorischen Chemokinen und die mRNA-Expression von

inflammatorischen Mediatoren in der Niere und in der Lunge bei Wildtyp- und Acker2-Defizienz vergleichbar. Diese Daten lassen kompensatorische Mechanismen, welche *in vivo* eine effektive Clearance von Chemokinen vermitteln, in Acker2-defizienten B6.lpr-Mäusen vermuten.

Die Konzentration an zirkulierenden Lupus-assoziierten Autoantikörpern sowie die glomeruläre Ablagerung von Immunglobulinen war zwischen Wildtyp- und Acker2-defizienten B6.lpr-Mäusen ebenfalls vergleichbar. Somit zeigte sich bei beiden Genotypen eine vergleichbare systemische Autoimmunantwort.

In der Milz konnte bei Acker2-Defizienz eine vermehrte Infiltration und Aktivierung von CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden. In den Lymphknoten war die Infiltration von aktivierten dendritischen Zellen bei Acker2-Defizienz vermindert, die Infiltration von CD4+ T-Zellen war in Wildtyp- und Acker2-defizienten B6.lpr-Mäusen dabei jedoch vergleichbar. Im Plasma von Acker2-defizienten B6.lpr-Mäusen konnten erhöhte Konzentrationen an CCL2 nachgewiesen werden. Diese könnten eine vermehrte Mobilisation von T-Zellen in die Milz und in die Lymphknoten vermitteln (181).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass das untersuchte SLE-Modell in B6.lpr-Mäusen bei ausgeprägter systemischer Autoimmunität durch einen relativ milden Verlauf der Lupus-Nephritis mit geringer entzündlicher Aktivität und renaler Schädigung charakterisiert ist. Unter diesen Bedingungen scheint das Fehlen des ACKR2-vermittelten Chemokinabbaus durch andere Mechanismen kompensiert werden zu können, da es keinen Unterschied im renalen Chemokingehalt zwischen Wildtyp- und Acker2-defizienten B6.lpr-Mäusen gab. Die festgestellte Expansion von T-Zellen und tertiärem lymphatisches Gewebe in Nieren und Lunge der Acker2-defizienten B6.lpr-Mäuse scheint dagegen eher durch systemische Effekte (wie in den anderen Modellen zeigt sich eine erhöhte CCL2-Serumkonzentration) und/oder das Fehlen von leukozytär exprimiertem Arckr2 vermittelt zu sein, ohne dass hierdurch die renale Schädigung zunimmt. Wie in den anderen untersuchten Nephropathiemodellen zeigte sich aber auch eine verminderte Zahl aktivierter dendritischer Zellen in den Lymphnoten der Acker2-defizienten B6.lpr-Mäuse. Bei vergleichbarer Zahl in der Milz ergibt sich jedoch in diesem SLE-Modell kein Anhalt für eine reduzierte adaptive Autoimmunaktivität bei Acker2-Defizienz. Insgesamt scheint somit ACKR2 bei systemischen Autoimmunerkrankungen wie dem SLE zumindest bei geringer entzündlicher Aktivität keine deutliche Organ-protective Funktion zu besitzen.

4.3 Limitationen und Ausblick

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ACKR2 als endogener Regulator die intrarenale Konzentration proinflammatorischer Chemokinen begrenzt und damit den tubulären Schaden, die persistierende Entzündung sowie fibrotische Umbauvorgänge in der Niere nach Ischämie-Reperfusionsschaden verringern kann. Des Weiteren führt die ACKR2-vermittelte Kontrolle der lokalen Entzündungsantwort im subakuten und chronischen Verlauf möglicherweise zu einer rascheren Reparatur und Wiederherstellung der funktionellen Integrität des Tubulusepithels nach renaler Ischämie. Somit verhindert ACKR2 das Risiko, nach einer akuten ischämischen Nierenschädigung eine chronische Nierenerkrankung zu entwickeln.

ACKR2 wird nicht nur auf lymphatischen Endothelzellen, sondern in geringerem Maße auch auf einigen Subpopulationen der Leukozyten exprimiert, wie zum Beispiel B-Lymphozyten in der Marginalzone der Milz, dendritische Zellen, einigen T-Zell-Populationen und einigen spezialisierten Makrophagen (131, 182-184). Somit stellt sich die Frage, ob für den hier beobachteten Phänotyp die Expression von ACKR2 auf lymphatischen Endothelzellen oder auf Leukozyten verantwortlich ist. Um dies zu untersuchen, wäre es sinnvoll Knochenmark-Chimäre einem Ischämie-Reperfusionsschaden zu unterziehen, welche selektiv nur eine leukozytäre oder parenchymatöse Ackr2-Defizienz aufweisen.

Allerdings konnte in einigen Tiermodellen mit Knochenmark-Chimären bereits gezeigt werden, dass leukozytär exprimierter ACKR2 für die Pathogenese der jeweiligen Erkrankung keine entscheidende Rolle spielt (133, 139, 140). Außerdem ist von den CD11b⁺ Ly6C^{high} mononukleären Phagozyten bereits bekannt, dass sie kein ACKR2 exprimieren (133). Somit ist zumindest für diese, für die subakute und chronische Schädigung nach Ischämie-Reperfusionsschaden mitunter entscheidenden leukozytäre Subpopulation naheliegend, dass ihre Infiltration in die Niere nicht von leukozytär exprimiertem ACKR2 beeinflusst wird.

Der atypische Chemokinrezeptor ACKR2 stellt somit ein interessantes pharmakologisches Ziel für neue, innovative Therapiestrategien dar, um der Entwicklung einer chronischen Nierenerkrankung nach akutem Nierenschaden entgegenzuwirken. Eine praktische Anwendung könnte zum Beispiel die Herstellung von Chemokin-neutralisierenden ACKR2-IgG-Fusionsproteinen sein, ähnlich dem Wirkmechanismus des TNF-Inhibitors Etanercept (144). Andererseits könnte durch mRNA-stabilisierende Medikamente eine vermehrte Expression von ACKR2 unter pathophysiologischen Bedingungen induziert werden. Da sich der Großteil von ACKR2-Molekülen in intrazellulären Vesikeln befindet (185) wäre auch eine pharmakologische Beeinflussung des intrazellulären ACKR2-Transports mit verstärktem membranständigem Einbau von ACKR2 nach inflammatorischer Stimulation vorstellbar.

Durch diese Methoden könnte eine verstärkte Degradierung von proinflammatorischen Chemokinen erreicht und eine nachfolgende Entzündungsreaktion und renale Parenchymschädigung deutlich abgeschwächt werden.

Literaturverzeichnis

1. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, Levin A. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31.
2. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, Acute Dialysis Quality Initiative w. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004;8(4):R204-12.
3. Khwaja A. KDIGO Clinical Practice Guidelines for Acute Kidney Injury. *Nephron Clin Pract*. 2012;120(4):179-84.
4. Fujii T, Uchino S, Takinami M, Bellomo R. Validation of the Kidney Disease Improving Global Outcomes criteria for AKI and comparison of three criteria in hospitalized patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(5):848-54.
5. Susantitaphong P, Cruz DN, Cerda J, Abulfaraj M, Alqahtani F, Koulouridis I, Jaber BL, Acute Kidney Injury Advisory Group of the American Society of N. World incidence of AKI: a meta-analysis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(9):1482-93.
6. Hoste EA, Bagshaw SM, Bellomo R, Cely CM, Colman R, Cruz DN, Edipidis K, Forni LG, Gomersall CD, Govil D, Honore PM, Joannes-Boyau O, Joannidis M, Korhonen AM, Lavrentieva A, Mehta RL, Palevsky P, Roessler E, Ronco C, Uchino S, Vazquez JA, Vidal Andrade E, Webb S, Kellum JA. Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med*. 2015;41(8):1411-23.
7. Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, Bogatsch H, Reinhart K, Frei U, Eckardt KU, Loeffler M, John S, German Competence Network S. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock - a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23(3):904-9.
8. Huang TM, Wu VC, Young GH, Lin YF, Shiao CC, Wu PC, Li WY, Yu HY, Hu FC, Lin JW, Chen YS, Lin YH, Wang SS, Hsu RB, Chang FC, Chou NK, Chu TS, Yeh YC, Tsai PR, Huang JW, Lin SL, Chen YM, Ko WJ, Wu KD, National Taiwan University Hospital Study Group of Acute Renal F. Preoperative proteinuria predicts adverse renal outcomes after coronary artery bypass grafting. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(1):156-63.
9. Demirjian S, Schold JD, Navia J, Mastracci TM, Paganini EP, Yared JP, Bashour CA. Predictive models for acute kidney injury following cardiac surgery. *Am J Kidney Dis*. 2012;59(3):382-9.
10. Lapi F, Azoulay L, Yin H, Nessim SJ, Suissa S. Concurrent use of diuretics, angiotensin converting enzyme inhibitors, and angiotensin receptor blockers with non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of acute kidney injury: nested case-control study. *BMJ*. 2013;346:e8525.
11. Fuchs L, Lee J, Novack V, Baumfeld Y, Scott D, Celi L, Mandelbaum T, Howell M, Talmor D. Severity of acute kidney injury and two-year outcomes in critically ill patients. *Chest*. 2013;144(3):866-75.
12. Gammelager H, Christiansen CF, Johansen MB, Tonnesen E, Jespersen B, Sorensen HT. Five-year risk of end-stage renal disease among intensive care patients surviving dialysis-requiring acute kidney injury: a nationwide cohort study. *Crit Care*. 2013;17(4):R145.
13. Linder A, Fjell C, Levin A, Walley KR, Russell JA, Boyd JH. Small acute increases in serum creatinine are associated with decreased long-term survival in the critically ill. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(9):1075-81.
14. Liano F, Pascual J. Epidemiology of acute renal failure: a prospective, multicenter, community-based study. Madrid Acute Renal Failure Study Group. *Kidney Int*. 1996;50(3):811-8.
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):503-8.

16. Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4210-21.
17. Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(8):2199-210.
18. Mason J, Torhorst J, Welsch J. Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure. *Kidney Int.* 1984;26(3):283-93.
19. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(6):539-52.
20. Conger J. Hemodynamic factors in acute renal failure. *Adv Ren Replace Ther.* 1997;4(2 Suppl 1):25-37.
21. Conger JD. Vascular abnormalities in the maintenance of acute renal failure. *Circ Shock.* 1983;11(3):235-44.
22. Kwon O, Hong SM, 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.
23. Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 2004;66(2):480-5.
24. Brezis M, Rosen S. Hypoxia of the renal medulla—its implications for disease. *N Engl J Med.* 1995;332(10):647-55.
25. Beeuwkes R, 3rd, Bonventre JV. Tubular organization and vascular-tubular relations in the dog kidney. *Am J Physiol.* 1975;229(3):695-713.
26. Bagnasco S, Good D, Balaban R, Burg M. Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *Am J Physiol.* 1985;248(4 Pt 2):F522-6.
27. Kelly KJ, Williams WW, Jr., Colvin RB, Meehan SM, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Bonventre JV. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J Clin Invest.* 1996;97(4):1056-63.
28. Basile DP. The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int.* 2007;72(2):151-6.
29. 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):404-14.
30. Basile DP, Fredrich K, Chelladurai B, Leonard EC, Parrish AR. Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(4):F928-36.
31. Li L, Huang L, Sung SS, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE, Jr., Lobo PI, Okusa MD. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 2008;74(12):1526-37.
32. Murphy M, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. Seventh Edition ed. 270 Madison Avenue, New York, NY 10016, US: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC; 2008.
33. Oh DJ, Dursun B, He Z, Lu L, Hoke TS, Ljubanovic D, Faubel S, Edelstein CL. Fractalkine receptor (CX3CR1) inhibition is protective against ischemic acute renal failure in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(1):F264-71.
34. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000;406(6797):782-7.
35. Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Activation of mammalian Toll-like receptors by endogenous agonists. *Crit Rev Immunol.* 2003;23(1-2):15-44.
36. Jang HR, Ko GJ, Wasowska BA, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(9):859-64.

37. Wahl P, Schoop R, Bilic G, Neuweiler J, Le Hir M, Yoshinaga SK, Wuthrich RP. Renal tubular epithelial expression of the costimulatory molecule B7RP-1 (inducible costimulator ligand). *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(6):1517-26.
38. Li H, Nord EP. CD40 ligation stimulates MCP-1 and IL-8 production, TRAF6 recruitment, and MAPK activation in proximal tubule cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;282(6):F1020-33.
39. Jang HR, Rabb H. The innate immune response in ischemic acute kidney injury. *Clin Immunol.* 2009;130(1):41-50.
40. Awad AS, Rouse M, Huang L, Vergis AL, Reutershan J, Cathro HP, Linden J, Okusa MD. Compartmentalization of neutrophils in the kidney and lung following acute ischemic kidney injury. *Kidney Int.* 2009;75(7):689-98.
41. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19(1):71-82.
42. Day YJ, Huang L, Ye H, Linden J, Okusa MD. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(4):F722-31.
43. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(2):317-26.
44. John R, Nelson PJ. Dendritic cells in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(10):2628-35.
45. Linfert D, Chowdhry T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury. *Transplant Rev (Orlando).* 2009;23(1):1-10.
46. Lieberthal W, Nigam SK. Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol.* 1998;275(5 Pt 2):F623-31.
47. Sutton TA, Molitoris BA. Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol.* 1998;18(5):490-7.
48. Gailit J, Colflesh D, Rabiner I, Simone J, Goligorsky MS. Redistribution and dysfunction of integrins in cultured renal epithelial cells exposed to oxidative stress. *Am J Physiol.* 1993;264(1 Pt 2):F149-57.
49. Zuk A, Bonventre JV, Brown D, Matlin KS. Polarity, integrin, and extracellular matrix dynamics in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol.* 1998;275(3 Pt 1):C711-31.
50. Solez K, Morel-Maroger L, Sraer JD. The morphology of "acute tubular necrosis" in man: analysis of 57 renal biopsies and a comparison with the glycerol model. *Medicine (Baltimore).* 1979;58(5):362-76.
51. Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D. *Harrison's Principles of Internal Medicine: Acute renal failure.* 17 ed: McGraw-Hill; 2008.
52. Welsch U. *Lehrbuch Histologie.* 2 ed: Urban & Fischer; 2006. 34-5 p.
53. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. *Robbins Basic Pathology.* 8 ed: SAUNDERS Elsevier; 2007. 564-6 p.
54. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure. *N Engl J Med.* 1996;334(22):1448-60.
55. Molitoris BA, Dahl R, Geerdes A. Cytoskeleton disruption and apical redistribution of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase during ischemia. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 2):F488-95.
56. Bush KT, Keller SH, Nigam SK. Genesis and reversal of the ischemic phenotype in epithelial cells. *J Clin Invest.* 2000;106(5):621-6.
57. Zuk A, Bonventre JV, Matlin KS. Expression of fibronectin splice variants in the postischemic rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001;280(6):F1037-53.
58. Ichimura T, Bonventre JV, Bailly V, Wei H, Hession CA, Cate RL, Sanicola M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem.* 1998;273(7):4135-42.
59. Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C, Ruff SM, Zahedi K, Shao M, Bean J, Mori K, Barasch J, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet.* 2005;365(9466):1231-8.

60. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:463-93.
61. Vaidya VS, Ozer JS, Dieterle F, Collings FB, Ramirez V, Troth S, Muniappa N, Thudium D, Gerhold D, Holder DJ, Bobadilla NA, Marrer E, Perentes E, Cordier A, Vonderscher J, Maurer G, Goering PL, Sistare FD, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol.* 2010;28(5):478-85.
62. Ichimura T, Asseldonk EJ, Humphreys BD, Gunaratnam L, Duffield JS, Bonventre JV. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest.* 2008;118(5):1657-68.
63. Bonventre JV, Yang L. Kidney injury molecule-1. *Curr Opin Crit Care.* 2010;16(6):556-61.
64. Bao G, Clifton M, Hoette TM, Mori K, Deng SX, Qiu A, Viltard M, Williams D, Paragas N, Leete T, Kulkarni R, Li X, Lee B, Kalandadze A, Ratner AJ, Pizarro JC, Schmidt-Ott KM, Landry DW, Raymond KN, Strong RK, Barasch J. Iron traffics in circulation bound to a siderocalin (Ngal)-catechol complex. *Nat Chem Biol.* 2010;6(8):602-9.
65. Mishra J, Mori K, Ma Q, Kelly C, Yang J, Mitsnefes M, Barasch J, Devarajan P. Amelioration of ischemic acute renal injury by neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(12):3073-82.
66. Ishani A, Xue JL, Himmelfarb J, Eggers PW, Kimmel PL, Molitoris BA, Collins AJ. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(1):223-8.
67. Nadasdy T, Laszik Z, Blick KE, Johnson LD, Silva FG. Proliferative activity of intrinsic cell populations in the normal human kidney. *J Am Soc Nephrol.* 1994;4(12):2032-9.
68. Prescott LF. The normal urinary excretion rates of renal tubular cells, leucocytes and red blood cells. *Clin Sci.* 1966;31(3):425-35.
69. Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest.* 2003;112(1):42-9.
70. De Chiara L, Lazzeri E, Romagnani P. Polyploid tubular cells: a shortcut to stress adaptation. *Kidney Int.* 2024;105(4):709-16.
71. De Chiara L, Conte C, Semeraro R, Diaz-Bulnes P, Angelotti ML, Mazzinghi B, Molli A, Antonelli G, Landini S, Melica ME, Peired AJ, Maggi L, Donati M, La Regina G, Allinovi M, Ravaglia F, Guasti D, Bani D, Cirillo L, Becherucci F, Guzzi F, Magi A, Annunziato F, Lasagni L, Anders HJ, Lazzeri E, Romagnani P. Tubular cell polyploidy protects from lethal acute kidney injury but promotes consequent chronic kidney disease. *Nat Commun.* 2022;13(1):5805.
72. 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):961-73.
73. Duffield JS. Macrophages and immunologic inflammation of the kidney. *Semin Nephrol.* 2010;30(3):234-54.
74. Ko GJ, Boo CS, Jo SK, Cho WY, Kim HK. Macrophages contribute to the development of renal fibrosis following ischaemia/reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(3):842-52.
75. Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. *Nature.* 2020;587(7835):555-66.
76. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med.* 2012;18(7):1028-40.
77. Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:540-51.
78. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity.* 2012;36(5):705-16.
79. Bachelier F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, Horuk R, Sparre-Ulrich AH, Locati M, Luster AD, Mantovani A, Matsushima K, Murphy PM, Nibbs R, Nomiyama H, Power CA, Proudfoot AE, Rosenkilde MM, Rot A, Sozzani S, Thelen M, Yoshie O, Zlotnik A.

International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 2014;66(1):1-79.

80. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:891-928.

81. Johnston B, Butcher EC. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol.* 2002;14(2):83-92.

82. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-89.

83. Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, Keller M, Forster R, Critchley DR, Fassler R, Sixt M. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature.* 2008;453(7191):51-5.

84. Schumann K, Lammermann T, Bruckner M, Legler DF, Polleux J, Spatz JP, Schuler G, Forster R, Lutz MB, Sorokin L, Sixt M. Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity.* 2010;32(5):703-13.

85. Weninger W, Biro M, Jain R. Leukocyte migration in the interstitial space of non-lymphoid organs. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(4):232-46.

86. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today.* 1999;20(6):254-7.

87. Sallusto F, Mackay CR. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(6):724-31.

88. Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(5):362-71.

89. Harada A, Sekido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* 1994;56(5):559-64.

90. Karpus WJ, Ransohoff RM. Chemokine regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: temporal and spatial expression patterns govern disease pathogenesis. *J Immunol.* 1998;161(6):2667-71.

91. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot CH, Young SG, Rollins BJ, Charo IF. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest.* 1999;103(6):773-8.

92. Bertini R, Allegretti M, Bizzarri C, Moriconi A, Locati M, Zampella G, Cervellera MN, Di Cioccio V, Cesta MC, Galliera E, Martinez FO, Di Bitondo R, Troiani G, Sabbatini V, D'Anniballe G, Anacardio R, Cutrin JC, Cavalieri B, Mainiero F, Strippoli R, Villa P, Di Girolamo M, Martin F, Gentile M, Santoni A, Corda D, Poli G, Mantovani A, Ghezzi P, Colotta F. Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(32):11791-6.

93. Fulkerson PC, Fischetti CA, McBride ML, Hassman LM, Hogan SP, Rothenberg ME. A central regulatory role for eosinophils and the eotaxin/CCR3 axis in chronic experimental allergic airway inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(44):16418-23.

94. Ma B, Liu W, Homer RJ, Lee PJ, Coyle AJ, Lora JM, Lee CG, Elias JA. Role of CCR5 in the pathogenesis of IL-13-induced inflammation and remodeling. *J Immunol.* 2006;176(8):4968-78.

95. Miller AL, Gerard C, Schaller M, Gruber AD, Humbles AA, Lukacs NW. Deletion of CCR1 attenuates pathophysiologic responses during respiratory syncytial virus infection. *J Immunol.* 2006;176(4):2562-7.

96. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(2):103-11.

97. Schall TJ, Proudfoot AE. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(5):355-63.

98. Vielhauer V, Eis V, Schlondorff D, Anders HJ. Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney Blood Press Res.* 2004;27(4):226-38.
99. Javai B, Quigg RJ. Treatment of glomerulonephritis: will we ever have options other than steroids and cytotoxics? *Kidney Int.* 2005;67(5):1692-703.
100. Vielhauer V, Anders HJ. Chemokines and chemokine receptors as therapeutic targets in chronic kidney disease. *Front Biosci (Schol Ed).* 2009;1:1-12.
101. Pease J, Horuk R. Chemokine receptor antagonists. *J Med Chem.* 2012;55(22):9363-92.
102. Cancellieri C, Caronni N, Vacchini A, Savino B, Borroni EM, Locati M, Bonecchi R. Review: Structure-function and biological properties of the atypical chemokine receptor D6. *Mol Immunol.* 2012.
103. Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Rot A, Thelen M. The biochemistry and biology of the atypical chemokine receptors. *Immunol Lett.* 2012;145(1-2):30-8.
104. Graham GJ. D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur J Immunol.* 2009;39(2):342-51.
105. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(12):907-18.
106. Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, Stone MA, Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;321(2):306-12.
107. Vielhauer V, Allam R, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Draganovici D, Mandelbaum J, Eltrich N, Nelson PJ, Anders HJ, Pruenster M, Rot A, Schlondorff D, Segerer S. Efficient renal recruitment of macrophages and T cells in mice lacking the duffy antigen/receptor for chemokines. *Am J Pathol.* 2009;175(1):119-31.
108. Comerford I, Nibbs RJ, Litchfield W, Bunting M, Harata-Lee Y, Haylock-Jacobs S, Forrow S, Korner H, McColl SR. The atypical chemokine receptor CCX-CKR scavenges homeostatic chemokines in circulation and tissues and suppresses Th17 responses. *Blood.* 2010;116(20):4130-40.
109. Yu S, Crawford D, Tsuchihashi T, Behrens TW, Srivastava D. The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Dev Dyn.* 2011;240(2):384-93.
110. Nibbs RJ, Wylie SM, Pragnell IB, Graham GJ. Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. *J Biol Chem.* 1997;272(19):12495-504.
111. Nibbs RJ, Wylie SM, Yang J, Landau NR, Graham GJ. Cloning and characterization of a novel promiscuous human beta-chemokine receptor D6. *J Biol Chem.* 1997;272(51):32078-83.
112. Bonini JA, Martin SK, Dralyuk F, Roe MW, Philipson LH, Steiner DF. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a novel human CC-chemokine receptor (CCR10) that displays high-affinity binding for MCP-1 and MCP-3. *DNA Cell Biol.* 1997;16(10):1249-56.
113. Bonecchi R, Locati M, Galliera E, Vulcano M, Sironi M, Fra AM, Gobbi M, Vecchi A, Sozzani S, Haribabu B, Van Damme J, Mantovani A. Differential recognition and scavenging of native and truncated macrophage-derived chemokine (macrophage-derived chemokine/CC chemokine ligand 22) by the D6 decoy receptor. *J Immunol.* 2004;172(8):4972-6.
114. Chevigne A, Janji B, Meyrath M, Reynders N, D'Uonno G, Uchanski T, Xiao M, Berchem G, Ollert M, Kwon YJ, Noman MZ, Szpakowska M. CXCL10 Is an Agonist of the CC Family Chemokine Scavenger Receptor ACKR2/D6. *Cancers (Basel).* 2021;13(5).
115. Locati M, Torre YM, Galliera E, Bonecchi R, Bodduluri H, Vago G, Vecchi A, Mantovani A. Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(6):679-86.
116. Nibbs RJ, McLean P, McCulloch C, Riboldi-Tunncliffe A, Blair E, Zhu Y, Isaacs N, Graham GJ. Structure-function dissection of D6, an atypical scavenger receptor. *Methods Enzymol.* 2009;460:245-61.

117. Hansell CA, Hurson CE, Nibbs RJ. DARC and D6: silent partners in chemokine regulation? *Immunol Cell Biol.* 2011;89(2):197-206.
118. Blackburn PE, Simpson CV, Nibbs RJ, O'Hara M, Booth R, Poulos J, Isaacs NW, Graham GJ. Purification and biochemical characterization of the D6 chemokine receptor. *Biochem J.* 2004;379(Pt 2):263-72.
119. Weber M, Blair E, Simpson CV, O'Hara M, Blackburn PE, Rot A, Graham GJ, Nibbs RJ. The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. *Mol Biol Cell.* 2004;15(5):2492-508.
120. Bonecchi R, Savino B, Borroni EM, Mantovani A, Locati M. Chemokine decoy receptors: structure-function and biological properties. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010;341:15-36.
121. Bonecchi R, Borroni EM, Anselmo A, Doni A, Savino B, Mirolo M, Fabbri M, Jala VR, Haribabu B, Mantovani A, Locati M. Regulation of D6 chemokine scavenging activity by ligand- and Rab11-dependent surface up-regulation. *Blood.* 2008;112(3):493-503.
122. Fra AM, Locati M, Otero K, Sironi M, Signorelli P, Massardi ML, Gobbi M, Vecchi A, Sozzani S, Mantovani A. Cutting edge: scavenging of inflammatory CC chemokines by the promiscuous putatively silent chemokine receptor D6. *J Immunol.* 2003;170(5):2279-82.
123. Borroni EM, Buracchi C, Savino B, Pasqualini F, Russo RC, Nebuloni M, Bonecchi R, Mantovani A, Locati M. Role of the chemokine scavenger receptor D6 in balancing inflammation and immune activation. *Methods Enzymol.* 2009;460:231-43.
124. Nibbs RJ, Kriehuber E, Ponath PD, Parent D, Qin S, Campbell JD, Henderson A, Kerjaschki D, Maurer D, Graham GJ, Rot A. The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. *Am J Pathol.* 2001;158(3):867-77.
125. Bazzan E, Saetta M, Turato G, Borroni EM, Cancellieri C, Baraldo S, Savino B, Calabrese F, Ballarin A, Balestro E, Mantovani A, Cosio MG, Bonecchi R, Locati M. Expression of the atypical chemokine receptor D6 in human alveolar macrophages in COPD. *Chest.* 2013;143(1):98-106.
126. Hansell CA, Nibbs RJ. The odd couple: innate-like B cells and the chemokine scavenger D6. *Cell Cycle.* 2011;10(21):3619-20.
127. Hansell CA, Schiering C, Kinstrie R, Ford L, Bordon Y, McInnes IB, Goodyear CS, Nibbs RJ. Universal expression and dual function of the atypical chemokine receptor D6 on innate-like B cells in mice. *Blood.* 2011;117(20):5413-24.
128. Madigan J, Freeman DJ, Menzies F, Forrow S, Nelson SM, Young A, Sharkey A, Moffett A, Graham GJ, Greer IA, Rot A, Nibbs RJ. Chemokine scavenger D6 is expressed by trophoblasts and aids the survival of mouse embryos transferred into allogeneic recipients. *J Immunol.* 2010;184(6):3202-12.
129. McKimmie CS, Fraser AR, Hansell C, Gutierrez L, Philipsen S, Connell L, Rot A, Kurowska-Stolarska M, Carreno P, Pruenster M, Chu CC, Lombardi G, Halsey C, McInnes IB, Liew FY, Nibbs RJ, Graham GJ. Hemopoietic cell expression of the chemokine decoy receptor D6 is dynamic and regulated by GATA1. *J Immunol.* 2008;181(11):8171-81.
130. Singh MD, King V, Baldwin H, Burden D, Thorrat A, Holmes S, McInnes IB, Nicoll R, Shams K, Pallas K, Jamieson T, Lee KM, Carballido JM, Rot A, Graham GJ. Elevated expression of the chemokine-scavenging receptor D6 is associated with impaired lesion development in psoriasis. *Am J Pathol.* 2012;181(4):1158-64.
131. Pacheco MO, Rocha FA, Aloia TPA, Marti LC. Evaluation of Atypical Chemokine Receptor Expression in T Cell Subsets. *Cells.* 2022;11(24).
132. Jamieson T, Cook DN, Nibbs RJ, Rot A, Nixon C, McLean P, Alcamí A, Lira SA, Wiekowski M, Graham GJ. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nat Immunol.* 2005;6(4):403-11.
133. Savino B, Castor MG, Caronni N, Sarukhan A, Anselmo A, Buracchi C, Benvenuti F, Pinho V, Teixeira MM, Mantovani A, Locati M, Bonecchi R. Control of murine Ly6C(high) monocyte traffic and immunosuppressive activities by atypical chemokine receptor D6. *Blood.* 2012;119(22):5250-60.

134. Martinez de la Torre Y, Buracchi C, Borroni EM, Dupor J, Bonecchi R, Nebuloni M, Pasqualini F, Doni A, Lauri E, Agostinis C, Bulla R, Cook DN, Haribabu B, Meroni P, Rukavina D, Vago L, Tedesco F, Vecchi A, Lira SA, Locati M, Mantovani A. Protection against inflammation- and autoantibody-caused fetal loss by the chemokine decoy receptor D6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(7):2319-24.
135. Martinez de la Torre Y, Locati M, Buracchi C, Dupor J, Cook DN, Bonecchi R, Nebuloni M, Rukavina D, Vago L, Vecchi A, Lira SA, Mantovani A. Increased inflammation in mice deficient for the chemokine decoy receptor D6. *Eur J Immunol*. 2005;35(5):1342-6.
136. Berres ML, Trautwein C, Zaldivar MM, Schmitz P, Pauels K, Lira SA, Tacke F, Wasmuth HE. The chemokine scavenging receptor D6 limits acute toxic liver injury in vivo. *Biol Chem*. 2009;390(10):1039-45.
137. Whitehead GS, Wang T, DeGraff LM, Card JW, Lira SA, Graham GJ, Cook DN. The chemokine receptor D6 has opposing effects on allergic inflammation and airway reactivity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(3):243-9.
138. Di Liberto D, Locati M, Caccamo N, Vecchi A, Meraviglia S, Salerno A, Sireci G, Nebuloni M, Caceres N, Cardona PJ, Dieli F, Mantovani A. Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 2008;205(9):2075-84.
139. Cochain C, Auvynet C, Poupel L, Vilar J, Dumeau E, Richart A, Recalde A, Zouggari Y, Yin KY, Bruneval P, Renault G, Marchiol C, Bonnin P, Levy B, Bonecchi R, Locati M, Combadiere C, Silvestre JS. The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(9):2206-13.
140. Vetrano S, Borroni EM, Sarukhan A, Savino B, Bonecchi R, Correale C, Arena V, Fantini M, Roncalli M, Malesci A, Mantovani A, Locati M, Danese S. The lymphatic system controls intestinal inflammation and inflammation-associated Colon Cancer through the chemokine decoy receptor D6. *Gut*. 2010;59(2):197-206.
141. Bordon Y, Hansell CA, Sester DP, Clarke M, Mowat AM, Nibbs RJ. The atypical chemokine receptor D6 contributes to the development of experimental colitis. *J Immunol*. 2009;182(8):5032-40.
142. Liu L, Graham GJ, Damodaran A, Hu T, Lira SA, Sasse M, Canasto-Chibuque C, Cook DN, Ransohoff RM. Cutting edge: the silent chemokine receptor D6 is required for generating T cell responses that mediate experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006;177(1):17-21.
143. Lee KM, Nibbs RJ, Graham GJ. D6: the 'crowd controller' at the immune gateway. *Trends Immunol*. 2013;34(1):7-12.
144. Bideak A, Blaut A, Hoppe JM, Muller MB, Federico G, Eltrich N, Grone HJ, Locati M, Vielhauer V. The atypical chemokine receptor 2 limits renal inflammation and fibrosis in murine progressive immune complex glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2018;93(4):826-41.
145. Zheng S, Coventry S, Cai L, Powell DW, Jala VR, Haribabu B, Epstein PN. Renal Protection by Genetic Deletion of the Atypical Chemokine Receptor ACKR2 in Diabetic OVE Mice. *J Diabetes Res*. 2016;2016:5362506.
146. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
147. Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(10):681-95.
148. Niedermeier M, Reich B, Rodriguez Gomez M, Denzel A, Schmidbauer K, Gobel N, Talke Y, Schweda F, Mack M. CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(42):17892-7.
149. Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, Johannes Hermann F, Gobel N, Bruhl H, Ketelsen I, Talke Y, Mack M. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int*. 2013;84(1):78-89.
150. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7(3):311-7.

151. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest*. 2007;117(4):902-9.
152. Chawla LS, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease: an integrated clinical syndrome. *Kidney Int*. 2012;82(5):516-24.
153. Rabb H, Griffin MD, McKay DB, Swaminathan S, Pickkers P, Rosner MH, Kellum JA, Ronco C, Acute Dialysis Quality Initiative Consensus XWG. Inflammation in AKI: Current Understanding, Key Questions, and Knowledge Gaps. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(2):371-9.
154. Anders HJ, Vielhauer V, Schlondorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*. 2003;63(2):401-15.
155. Graham GJ, Locati M. Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6. *J Pathol*. 2013;229(2):168-75.
156. Bonavita O, Mollica Poeta V, Setten E, Massara M, Bonecchi R. ACKR2: An Atypical Chemokine Receptor Regulating Lymphatic Biology. *Front Immunol*. 2016;7:691.
157. Lee KM, McKimmie CS, Gilchrist DS, Pallas KJ, Nibbs RJ, Garside P, McDonald V, Jenkins C, Ransohoff R, Liu L, Milling S, Cerovic V, Graham GJ. D6 facilitates cellular migration and fluid flow to lymph nodes by suppressing lymphatic congestion. *Blood*. 2011;118(23):6220-9.
158. McKimmie CS, Singh MD, Hewit K, Lopez-Franco O, Le Brocq M, Rose-John S, Lee KM, Baker AH, Wheat R, Blackburn DJ, Nibbs RJ, Graham GJ. An analysis of the function and expression of D6 on lymphatic endothelial cells. *Blood*. 2013;121(18):3768-77.
159. Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Na KR, Shin YT, Lee KW. Pretreatment with the tumor necrosis factor- α blocker etanercept attenuated ischemia-reperfusion renal injury. *Transplant Proc*. 2009;41(9):3590-6.
160. Dong X, Swaminathan S, Bachman LA, Croatt AJ, Nath KA, Griffin MD. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2007;71(7):619-28.
161. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF- α expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1999;277(3):R922-9.
162. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med*. 1998;187(1):129-34.
163. Imai T, Nagira M, Takagi S, Kakizaki M, Nishimura M, Wang J, Gray PW, Matsushima K, Yoshie O. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int Immunol*. 1999;11(1):81-8.
164. Algood HM, Flynn JL. CCR5-deficient mice control *Mycobacterium tuberculosis* infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. *J Immunol*. 2004;173(5):3287-96.
165. Badewa AP, Quinton LJ, Shellito JE, Mason CM. Chemokine receptor 5 and its ligands in the immune response to murine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)*. 2005;85(3):185-95.
166. Souto FO, Alves-Filho JC, Turato WM, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, Cunha FQ. Essential role of CCR2 in neutrophil tissue infiltration and multiple organ dysfunction in sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(2):234-42.
167. Hume DA, Gordon S. Mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Identification of resident macrophages in renal medullary and cortical interstitium and the juxtaglomerular complex. *J Exp Med*. 1983;157(5):1704-9.
168. Soos TJ, Sims TN, Barisoni L, Lin K, Littman DR, Dustin ML, Nelson PJ. CX3CR1⁺ interstitial dendritic cells form a contiguous network throughout the entire kidney. *Kidney Int*. 2006;70(3):591-6.
169. Mulay SR, Thomasova D, Ryu M, Anders HJ. MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice. *Kidney Int*. 2012;81(12):1199-211.

170. Yang L, Besschetnova TY, Brooks CR, Shah JV, Bonventre JV. Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury. *Nat Med*. 2010;16(5):535-43, 1p following 143.
171. Cao Q, Zheng D, Wang YP, Harris DC. Macrophages and dendritic cells for treating kidney disease. *Nephron Exp Nephrol*. 2011;117(3):e47-52.
172. Broekema M, Harmsen MC, van Luyn MJ, Koerts JA, Petersen AH, van Kooten TG, van Goor H, Navis G, Popa ER. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(1):165-75.
173. Jang HS, Kim JI, Han SJ, Park KM. Recruitment and subsequent proliferation of bone marrow-derived cells in the postischemic kidney are important to the progression of fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;306(12):F1451-61.
174. Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Takeya M, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol*. 2004;165(1):237-46.
175. Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Grone HJ, Schlondorff D. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(6):1173-87.
176. Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Kitagawa K, Ishida Y, Kondo T, Hashimoto H, Ishiwata Y, Mukaida N, Tomosugi N, Matsushima K, Egashira K, Yokoyama H. Gene therapy via blockade of monocyte chemoattractant protein-1 for renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(4):940-8.
177. Sun L, Louie MC, Vannella KM, Wilke CA, LeVine AM, Moore BB, Shanley TP. New concepts of IL-10-induced lung fibrosis: fibrocyte recruitment and M2 activation in a CCL2/CCR2 axis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011;300(3):L341-53.
178. Eddy AA, Lopez-Guisa JM, Okamura DM, Yamaguchi I. Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(8):1233-47.
179. Lux M, Blaut A, Eltrich N, Bideak A, Muller MB, Hoppe JM, Grone HJ, Locati M, Vielhauer V. The Atypical Chemokine Receptor 2 Limits Progressive Fibrosis after Acute Ischemic Kidney Injury. *Am J Pathol*. 2019;189(2):231-47.
180. Hoppe JM, Vielhauer V. Induction and analysis of nephrotoxic serum nephritis in mice. *Methods Mol Biol*. 2014;1169:159-74.
181. Xia W, Eltrich N, Vielhauer V. The atypical chemokine receptor 2 reduces T cell expansion and tertiary lymphoid tissue but does not limit autoimmune organ injury in lupus-prone B6lpr mice. *Front Immunol*. 2024;15:1377913.
182. Bradford L, Marshall H, Robertson H, Kirby JA, Graham G, Ali S, O'Boyle G. Cardiac allograft rejection: examination of the expression and function of the decoy chemokine receptor D6. *Transplantation*. 2010;89(11):1411-6.
183. Kin NW, Crawford DM, Liu J, Behrens TW, Kearney JF. DNA microarray gene expression profile of marginal zone versus follicular B cells and idiotype positive marginal zone B cells before and after immunization with *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol*. 2008;180(10):6663-74.
184. McKimmie CS, Graham GJ. Leucocyte expression of the chemokine scavenger D6. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 6):1002-4.
185. Feigerlova E, Battaglia-Hsu SF. Role of post-transcriptional regulation of mRNA stability in renal pathophysiology: focus on chronic kidney disease. *FASEB J*. 2017;31(2):457-68.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mir die Erstellung dieser Arbeit ermöglichen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Volker Vielhauer danke ich besonders für seine herausragende Betreuung. Durch die Diskussionen mit ihm begeisterte und motivierte er mich für die Forschung. Seine exakte Herangehensweise an wissenschaftlichen Fragestellungen hat mich fachlich und menschlich nachhaltig beeinflusst.

Herrn Nuru Eltrich danke ich für die ruhige und geduldige Einarbeitung in die verschiedenen labortechnischen Methoden. Über die gesamte Zeit im Labor half er mir stets bereitwillig bei den verschiedensten technischen Problemen.

Bei meinen Mitdoktoranden John Hoppe, Martin Müller, Andrei Bideak, Anja Wilkening, Johannes Kohn und Alexander Blaut bedanke ich mich für die Unterstützung und die großartige gemeinsame erlebte Zeit im Labor.

Herrn Prof. Anders danke ich für die Mitbenutzung des Labors. Der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Anders danke ich für die Zusammenarbeit., insbesondere danke ich hierbei Herrn PD Dr. rer. biol. hum. Shrikant Mulay und Frau Heni Eka Susanti. Bei Dan Draganovici und Jana Mandelbaum möchte ich mich herzlich bei der technischen Unterstützung bedanken.

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums. Sie standen in allen Phasen der Dissertation an meiner Seite. Melanie Tünsmeier danke ich für die Motivation beim Schreiben der Arbeit.

Der Ludwig-Maximilians-Universität danke ich für das Förderungsprogramm von Forschung und Lehre (FöFoLe) und der finanziellen Unterstützung der Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

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

Die Beeinflussung des akuten und chronischen Ischämie-Reperfusionsschadens in der Niere durch das Chemokin-bindende Molekül ACKR2

selbstständig 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.

Regensburg, den 14.11.2024

Moritz Lux

