

Aus der Klinik für Nephrologie
der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. L. C. Rump

**Untersuchung der Rolle von Leukemia Inhibitory Factor in der Therapie
der renalen Inflammation und Fibrose im unilateralen
Ureterobstruktionsmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Fabian Henning Siegbert Srugies
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ivo Quack

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Markus Giessing

Zusammenfassung

Die tubulointerstitielle Fibrose ist ein häufiges morphologisches Korrelat einer chronischen Nierenerkrankung (*Chronic Kidney Disease* (CKD)). Chronische Inflammation ist der entscheidende Stimulus für den progredienten fibrotischen Umbau der Niere. Für diese inflammatorischen Prozesse sowie für die renale Immunantwort spielen CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Rolle. Leukemia inhibitory factor (LIF), ein Mitglied der Interleukin 6 Familie, und Interleukin 6 (IL-6) regulieren die Balance zwischen der TH17 und regulatorischen T-Zellimmunantwort. Während LIF die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead-box-P3* (Foxp3) und somit die Entstehung von regulatorischen T-Zellen (Tregs) induziert, führt IL-6 über die Induktion des Transkriptionsfaktors *RAR-related orphan receptor gamma* (ROR γ t) zur Entwicklung von TH-17 Zellen. Eine Dysregulation oder Überproduktion von TH17-Zellen verursacht eine renale Inflammation. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von LIF auf die renale Inflammation und tubulointerstitielle Fibrose im unilateralen Ureterobstruktionsmodell (UUO) untersucht. Für die Experimente wurden sechs bis acht Wochen alte C57BL/6 Mäuse täglich mit LIF oder Phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline* (PBS)) intraperitoneal behandelt. Die Behandlung begann zwei Tage vor der UUO-OP. Zehn Tage nach der UUO-OP wurden die Nieren, die Milz und die paraaortalen Lymphknoten entnommen. Die Ergebnisse der qPCR Daten aus den obstruierten Nieren zeigten, dass die Inflammations- bzw. Fibrosemarker NF κ B, RANTES, Collagen1a1 und TGF- β in der Behandlungsgruppe (UUO+LIF) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (UUO) signifikant erniedrigt waren. Für IL-17a, IL-1b, IL-6, MCP1, PAI1, PDGFR1 und TNF α war kein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Die Untersuchung der paraaortalen Lymphknoten zeigte eine signifikante Reduktion der Expression von MCP1, NF κ B, RANTES und TNF α in der Behandlungsgruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Expression von IL-1b und IL-6 war ebenfalls erniedrigt, erreichte jedoch nicht das definierte Signifikanzniveau. Im Verlauf des UUO-Schädigungsmodells kommt es zu einer Akkumulation von CD3⁺T-Zellen und F4/80⁺Makrophagen. LIF führte zur einer signifikanten Reduktion der renalen CD3⁺- und F4/80⁺ Zellinfiltration. Zudem reduzierte die LIF Behandlung signifikant das Ausmaß der tubulointerstitiellen Fibrose. Sowohl in der Sirius Red Morphometrie als auch für die Collagen1a1 Western Blot Analyse ergaben sich für die Behandlungsgruppe signifikant niedrigere Fibrosegrade, verglichen mit der Kontrollgruppe. Die LIF Behandlung führte darüber hinaus zu einem signifikanten Anstieg von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und zu einer Abschwächung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, RANTES oder G-CSF im Plasma der Versuchstiere. Die LIF Behandlung stellt somit eine zukünftige Therapieoption dar, weil sie zu einer signifikanten Abschwächung von tubulointerstitieller Fibrose im UUO-Modell führt.

Abstract

Tubulointerstitial fibrosis is common cause of chronic kidney disease which is often sustained by chronic inflammation. CD4⁺ T-cells play an important role in immune response in kidney disease. Leukemia inhibitory factor (LIF), a member of the Interleukin 6 family, and Interleukin 6 (IL-6) play a crucial role in regulating the balance between TH17- and regulatory T-cells (Treg): LIF augments expression of forkhead-box-P3 (Foxp3) leading to Treg, IL-6 induces RAR-related orphan receptor gamma (ROR γ) driving TH17 lineage development. Dysregulation or overproduction of TH17 cells result in sustained inflammation. Here, we investigate how LIF influences renal inflammation and tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureter obstruction (UUO). 6-8-week old male C57BL/6 mice were treated intraperitoneally daily either with LIF or PBS starting 2 days prior to UUO. 10 days after UUO, kidneys, spleen and paraaortal lymphnodes were extracted. qPCR from tissue lysates of obstructed kidneys (OB) revealed that NF κ B and RANTES as well as collagen1 and TGF- β were significantly downregulated in LIF treated mice. There was no significant difference between IL17a, IL-1b, IL-6, MCP1, PAI1, PDGFR1 and TNF α . Accordingly, expression of MCP1, NF κ B, RANTES and TNF α in the paraaortal lymphnodes were reduced by LIF. IL-1b and IL-6 expression tended to be reduced by LIF but failed to reach statistical significance. CD3⁺ cells accumulated in obstructed kidneys. LIF significantly reduced renal infiltration of CD3⁺ cells and F4/80⁺ cells. LIF treatment significantly reduced tubulointerstitial fibrosis in obstructed kidneys assessed by Sirius Red morphometry and collagen1 Western Blot analysis. LIF treatment leads to a significant increase of anti-inflammatory cytokines such as IL-10 and downregulated pro-inflammatory cytokines such as IL-6, RANTES or G-CSF in plasma assessed by Luminex analysis. These data confirm the critical role of inflammation in UUO. LIF treatment significantly attenuates tubulointerstitial fibrosis by inhibiting pro-inflammatory pathways and T-cell infiltration indicating a possible future treatment option.

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
Anti-GBM	<i>Antiglomerular basement membrane disease</i>
Bi Tregs	Foxp3 , ROR γ t, T-Zellen
CD3+	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CD4+	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CGN	<i>Crescentic glomerulonephritis</i>
CIA	<i>Collagen-induced arthritis</i>
CKD	<i>Chronic kidney disease</i>
CLG	<i>Cardiotrophin-1-like-cytokine</i>
CMC	Chronische mukokutane Candidiasis
CNTF	<i>Ciliary neurotrophic growth factor</i>
CNTR α	<i>Alpha-chain receptor</i>
Col1 α 1	Kollagen Typ 1 alpha 1
CT-1	Cardiotrophin-1
CTLA8	<i>Cytotoxic F-lymphocyte-associated antigen 8</i>
CXCL	<i>Chemokine motif ligands</i>
CXCR3	<i>C-X-C chemokine receptor type 3</i>
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
EAE	Experimentieller autoimmuner Enzephalitis
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
FAN	<i>Folic acid-induced nephropathy Modell</i>
FOXP3	<i>forkhead-box-P3</i>
F4/80+	<i>G protein coupled receptor E4</i>
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
IFN- γ	Interferon gamma
IKK2	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta</i>
IL-1b	Interleukin 1b
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5

IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
IL-17	Interleukin 17
IL-21	Interleukin 21
IL-22	Interleukin 22
IL-23	Interleukin 23
IL-25	Interleukin 25
IRF4	<i>Interferon regulatory factor-4</i>
IRI	Ischämie-Perfusions-Modell
JAK	Januskinasen
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcome</i>
LIF	<i>Leukemia Inhibitor factor</i>
MAB421	Monoklonaler Antikörper B421
MCP-1	Makrophagen chemotaktisches Protein 1
MIP-1	Makrophagen inflammatorisches Protein 1
MPO	Myeloperoxidase
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NSCs	Neurale Stammzellen
NTN Modell	<i>Nephrotoxic nephritis model</i>
PAI1	<i>Plasminogen activator inhibitor 1</i>
PAMPs	<i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGFR1	<i>Platelet derived growth factor receptor 1</i>
RANTES	<i>Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted</i>
ROR α	<i>RAR-related orphan receptor alpha</i>
ROR γ	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
SOCS3	<i>Surpressor of cytokine signaling 3</i>
STAT1	<i>Signal transducer activator of transcription 1</i>
STAT3	<i>Signal transducer activator of transcription 3</i>
STAT4	<i>Signal transducer activator of transcription 4</i>

STAT5	<i>Signal transducer activator of transcription 5</i>
STAT6	<i>Signal transducer activator of transcription 6</i>
T-bet	T-Box Transkriptionsfaktor
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TH1	Typ 1-T-Helfer-Zelle
TH2	Typ 2-T-Helfer-Zelle
TH17	Typ 17-T-Helfer-Zelle
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TyK2	Tyrosinkinase 2
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 CHRONISCHE NIERENERKRANKUNG.....	1
1.2 TUBULOINTERSTITIELLE FIBROSE.....	2
1.3 CD 4+ T-HELPERZELLEN	5
1.4 INTERLEUKIN 17	8
1.5 REGULATORISCHE T ZELLEN.....	9
1.6 LIF UND LIF REZEPTOR.....	10
1.7 DIE FUNKTION VON LIF IN DER NIERE.....	13
1.8 ZIEL DER ARBEIT.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 VERSUCHSTIERE	15
2.2 ANÄSTHESIE	15
2.3 BLUTENTNAHME	16
2.4 VERSUCHSAUFBAU	16
2.5 MODELL DER UNILATERALEN URETEROBSTRUKTION.....	16
2.6 ORGANENTNAHME	18
2.7 RNA-ISOLIERUNG AUS DER NIERE UND LYMPHKNOTEN	19
2.8 REVERSE TRANSKRIPTION.....	19
2.9 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	19
2.10 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE.....	20
2.11 QUANTITATIVE REAL-TIME-PCR (qPCR).....	20
2.12 PROTEINANALYSE	21
2.12.1 Proteinisolierung.....	21
2.12.2 Proteinbestimmung	22
2.12.3 Herstellung der Trenn- und Sammelgele.....	22
2.12.4 Elektrophorese und Western Blot für Collagen1a1 (Col1a1)	23
2.13 HISTOLOGIE.....	24
2.13.1 Entwässerungsreihe	24
2.13.2 Paraffinblockanfertigung.....	24
2.13.3 Entparaffinierung.....	24
2.13.4 Immunhistochemie	25
2.13.4.1 CD3.....	25
2.13.4.2 F4/80	26
2.13.4.3 Sirius Red.....	27
2.14 LUMINEX-ANALYSE	27
2.15 STATISTIK.....	28
3 ERGEBNISSE	28
3.1 GENEXPRESSIONSANALYSE	28
3.1.1 qPCR.....	28
3.2 PROTEINANALYSE FÜR COLLAGEN1A1 PER WESTERN BLOT.....	31
3.3 IMMUNHISTOLOGIE	31
3.3.1 CD3+	31
3.3.2 F4/80.....	32
3.3.3 Sirius Red Färbung	33
3.4 LUMINEX-ANALYSE.....	34
4 DISKUSSION	37

4.1	DER EINFLUSS VON LIF AUF DIE GENEXPRESSION PROINFLAMMATORISCHER ZYTOKINE IM UUO-MODELL	38
4.2	DER EINFLUSS VON LIF AUF DIE TUBULOINTERSTITIELLE FIBROSE.....	40
4.3	DER EINFLUSS VON LIF AUF DAS ZYTOKINPANEL DER LUMINEX-ANALYSEN	42
4.4	LIF ALS THERAPEUTIKUM – MÖGLICHE MOLEKULARE WIRKMECHANISMEN	47
5	LITERATURVERZEICHNIS	49

1 Einleitung

1.1 Chronische Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD) ist definiert als eine strukturelle oder funktionelle Veränderung der Niere über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten [1] und resultiert aus der Abnahme der glomerulären, tubulären und endokrinen Funktion beider Nieren [2]. Als Kriterien zur Diagnosestellung dienen pathologische Befunde im Urinsediment, in der Bildgebung, in der Histologie, eine Proteinurie, Tubulusstörungen und / oder eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) [1]. Die Einschränkung der glomerulären und tubulären Funktion führt zu einer Dysregulation des Wasser-, pH- und Elektrolythaushaltes sowie zu einer reduzierten Elimination von harnpflichtigen Substanzen. Eine gestörte endokrine Funktionsleistung der Niere vermindert die Produktion der Hormone Erythropoetin, Renin, die Produktion der aktiven Form des Vitamin D3 (Calcitriol), sowie die Produktion von Prostaglandinen [2].

Die Stadieneinteilung der CKD erfolgt laut *Kidney Disease Improving Global Outcome* (KDIGO) - Leitlinie 2012 nach der Ursache (C=Cause), der GFR und der Albuminurie (A1-A3) [1] (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: CKD-Stadieneinteilung und renales Risiko

GFR ml/min/1,73 m ²		Albuminurie mg/g	A1 < 30	A2 30-300	A3 > 300
G1 > 90	Keine Funktionseinschränkung				
G2 60-89	Geringgradige Funktionseinschränkung				
G3a 45-59	Gering- bis mittelgradige Funktionseinschränkung				
G3b 30-44	Mittel- bis hochgradige Funktionseinschränkung				
G4 15-29	Hochgradige Funktionseinschränkung				
G5 < 15	Nierenversagen				

Grün: geringes Risiko; gelb: moderat erhöhtes Risiko; orange: hohes Risiko; rot: sehr hohes Risiko

Zahlreiche angeborene und erworbene Nierenerkrankungen führen in ihrem Krankheitsverlauf zu einer CKD. Die erworbenen Nierenerkrankungen unterteilen sich wiederum in primäre Nierenerkrankungen wie z.B. die IgA-Nephropathie und in sekundäre

Nierenerkrankungen, die als Systemerkrankungen die Niere schädigen. Mit circa 35% stellt die diabetische Nephropathie die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz dar, gefolgt von der vaskulären (hypertensiven) Nephropathie und den Glomerulonephritiden mit circa 15 % [3]. Bei jungen Erwachsenen führen die Glomerulonephritiden, insbesondere die IgA Nephropathie, als häufigste Ursache zur terminalen Niereninsuffizienz [4]. Polyzystische Nierenerkrankungen und tubulointerstitielle Nierenerkrankungen sind in 10 % der Fälle für die Dialysepflichtigkeit verantwortlich. Bei der tubulointerstitiellen Nierenerkrankung unterscheidet man zwischen einer akuten und einer chronischen Entzündung der Tubuli und des Interstitiums der Nieren. Eine akute Schädigung des Tubulussystems der Nieren kann medikamentös/toxisch (z.B. Antibiotika, NSAR, Diuretika, Allopurinol, Omeprazol) oder infektiös (vor allem Hantaviren) bedingt sein. Analgetika können sowohl zu einem akuten oder auch chronischen Verlauf einer tubulointerstitiellen Nierenerkrankung führen. Weitere Medikamente und Toxine (z.B. Blei, Cadmium u.a.) können ebenso wie immunologische (z.B. Multiples Myelom, Lupus erythematodes) oder metabolische Vorgänge (z.B. Hyperurikämie, Hypercalcämie) durch eine dauerhafte Schädigung zu einer chronischen Niereninsuffizienz führen [5].

Weltweit stellt der Anstieg von Patienten mit CKD die Gesundheitspolitik vor Herausforderungen. Aufgrund des demographischen Wandels steigt nicht nur die Lebenserwartung der Bevölkerung, sondern auch die Anzahl älterer, nierenkranker Patienten zunehmend an [6]. Seit 1995 hat sich die Zahl der Dialysepatienten in Deutschland von 42000 auf 82367 verdoppelt, was einem jährlichen Zuwachs um etwa 5% entspricht. Zusätzlich leben mehr als 25000 nierentransplantierte Patienten in Deutschland, die ursprünglich dialysepflichtig waren, so dass sich bundesweit mehr als 100000 Patienten einer Nierenersatztherapie unterziehen. Zudem stieg die Zahl der Nierentransplantationen nicht parallel zur Prävalenz der CKD an, sondern zeigte zuletzt sogar rückläufige Tendenzen [7].

1.2 Tubulointerstitielle Fibrose

Die tubulointerstitielle Fibrose bezeichnet die Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine im Interstitium der Niere zwischen Tubuli und Kapillaren und stellt eine Endstrecke vieler zur chronischen Nierenerkrankung führender Krankheiten dar. Ausgang der tubulointerstitiellen Fibrose kann entweder eine primäre Schädigung des Interstitiums selbst oder eine primär glomeruläre oder vaskuläre Erkrankung sein, die sekundär zu einer chronischen tubulointerstitiellen Fibrose führt. Die akute oder chronische interstitielle Nephritis ist im klinischen Alltag seltener zu beobachten und dementsprechend wird die

interstitielle Fibrose häufiger durch glomeruläre oder vaskuläre, renale Grunderkrankungen hervorgerufen [8]. Bohle, A. et al. konnten zeigen, dass eine signifikante Korrelation zwischen dem Ausmaß der interstitiellen Fibrose und der Abnahme der Nierenfunktion besteht [9, 10]. Aus diesem Grund dient das Ausmaß der interstitiellen Fibrose als prognostischer Parameter für die Progression der CKD [8]. Das Ausmaß der interstitiellen Vernarbung ist somit ein Teil der Klassifikationssysteme wie zum Beispiel beim Chronizitätsindex der Lupusnephritis [11]. Anhaltende Entzündungsreaktionen und die Sekretion von proinflammatorischen sowie profibrotischen Zytokinen halten den Prozess der Fibrose aufrecht. Eine zentrale Rolle spielen dabei interstitielle, terminal differenzierte Fibroblasten, die auf sezernierte Zytokine mit der Produktion von profibrotischen Material reagieren. Die hierfür verantwortlichen Zytokine stammen aus vier verschiedenen Kompartimenten. Zum einen werden sie von dem lymphoplasmazellulären Infiltrat und den geschädigten Tubuluszellen synthetisiert. Andererseits können durch Inflammation geschädigte peritubuläre Gefäße sowie entzündete Glomerula zu der Produktion von inflammatorischen Zytokinen beitragen [8]. Hierbei induzieren insbesondere der *platelet-derived growth factor* (PDGF) und der *transforming growth factor* β (TGF β) die Fibrose [12]. Neben der Zytokinausschüttung kann auch eine bestehende Proteinurie durch Schädigung der Tubuluszellen die interstitielle Fibrose beeinflussen. Die aktivierten Tubuluszellen synthetisieren Zytokine und diese stimulieren wiederum die Fibroblasten. In der Folge entsteht durch die Akkumulation von kollagenhaltigem Material ein Verlust von peritubulären Kapillaren und eine Vergrößerung der Diffusionsstrecke. Die daraus resultierende Hypoxie kann ebenfalls als Noxe fungieren und somit eine Fibroblastenaktivierung auslösen. Da es bei der Fibrose auch zu einer Einwanderung von proliferierenden Zellen in das Interstitium kommt, wurden in den letzten Jahren verschiedene Theorien zur Zelltransdifferenzierung aufgestellt. Es bestehen Theorien zu einer endothelialen-mesenchymalen Transdifferenzierung und einer perizytären-mesenchymalen Transdifferenzierung [13-16] (s. Abb. 2).

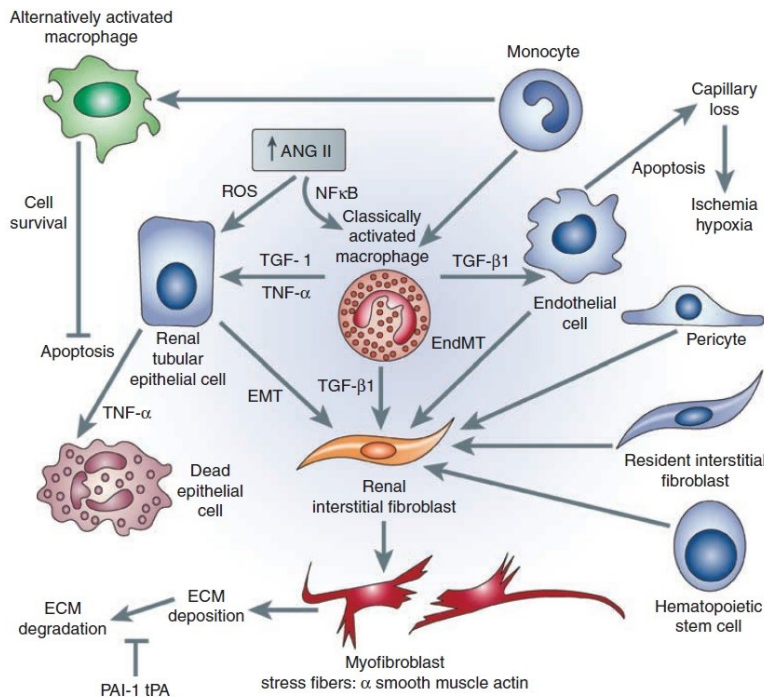


Abb. 1: Die Pathogenese der tubulointerstiellen Fibrose im UUO-Modell [17]

Sowohl die zur primären interstitiellen Nephritis führenden Noxen (z.B. Analgetika, Infektionen, immunologische Reaktionen) als auch die zur sekundären interstitiellen Nephritis führenden Systemerkrankungen (z.B. diabetische Nephropathie, hypertensive Nephropathie, familiäre Zystennieren, etc.) zeigen diese uniforme Reaktion im tubulointerstitiellen Gewebe. Dieses histopathologisch uniforme Bild erschwert zusätzlich die Diagnosestellung der zugrundeliegenden Erkrankung [8]. Während die akuten interstitiellen Nephritiden häufig durch das Beseitigen der auslösenden Noxe reversibel verlaufen, sind die medikamentösen Therapieoptionen bei der chronischen Verlaufsform auf die Gabe von Immunsuppressiva beschränkt. Das frühzeitige Erkennen und eine Korrektur der schädigenden Einflüsse stellen momentan die einzige kausale Therapie dar. Aktuell ist davon auszugehen, dass die Reaktion auf endogen oder exogen exprimierte Antigene nicht antikörper- sondern zellvermittelt erfolgt. Die entsprechenden Antigene können sich entweder direkt im Interstitium ablagern oder sie werden von den Tubuluszellen zu Antigenen metabolisiert und lösen unter Zuhilfenahme der tubulären Basalmembran als Hapten eine immunologische Reaktion aus. Demgegenüber stehen T-Suppressor-Zellen, die entzündliche Reaktionen regulieren und einen Erklärungsansatz für das sporadische Auftreten der idiopathischen akuten interstitiellen Nephritis bieten können [5]. Eine zielgerichtete Induktion dieser T-regulatorischen Zellen (Tregs) zur Unterdrückung der inflammatorischen Immunantwort stellt damit einen potentiellen Therapieansatz zur Verhinderung eines Progresses der interstitiellen Nephritis bzw. Fibrose dar.

1.3 CD 4+ T-Helferzellen

Renale Inflammation entsteht primär als protektive Antwort auf eine akute Nierenschädigung. Jedoch endet eine unkontrollierte renale Inflammation in renaler Fibrose und diese stellt das histopathologische Korrelat des Endstadiums einer chronischen Nierenerkrankung dar. Dabei führt die renale Inflammation unter anderem zu einer Aktivierung von Zellen des Immunsystems, die über die Produktion von profibrotischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren den Progress der renalen Fibrose fördern [18].

Unter diesen Zellen des Immunsystems nehmen CD4+ T-Helferzellen eine Schlüsselrolle in der Regulation der adaptiven Immunantwort und der Bekämpfung von pathogenen Erregern ein [19]. Insgesamt unterteilen sich die CD4+ T-Helferzellen anhand ihrer spezifischen Transkriptionsfaktoren und der von ihnen sezernierten Zytokine in vier Gruppen: T1-Helferzellen (TH1), T2-Helferzellen (TH2), T17-Helferzellen (TH17) und regulatorische T-Helferzellen (Tregs) [20].

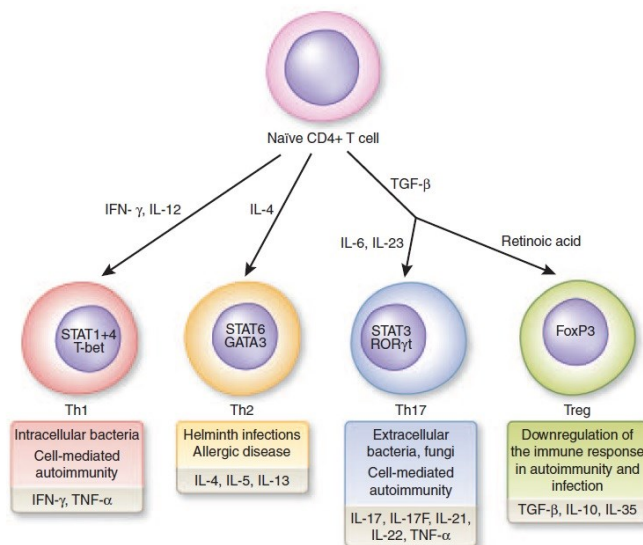


Abb. 2: **CD4+ T-Zelldifferenzierung** [21]

Im Jahre 1986 gelang es Mosman und Coffman als Erste eine Unterteilung der CD4+ T-Helferzellen in TH1 - oder TH2-Helferzellen anhand ihres Zytokinprofils vorzunehmen [22, 23].

Ob sich eine naive T-Zelle zu einer TH1 oder einer TH2 Zelle entwickelt, hängt maßgeblich von dem Zytokininmilieu ab, welches die Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. dendritische Zellen) als Reaktion auf ein Pathogen produzieren. Für die Differenzierung von CD4+ T-Zellen zu TH1-Zellen sind die Zytokine Interferon gamma (IFN- γ) und Interleukin-12 (IL-12) verantwortlich. Unter dem Einfluss von IFN- γ kommt es

zur Aktivierung von *signal transducer activator of transcription 1* (STAT1), welcher wiederum die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet in Gang setzt. Durch die Aktivierung von T-bet werden das IFN- γ -Gen und die Expression der Signaluntereinheit des IL-12-Rezeptors stimuliert. Mit diesem Schritt ist der Differenzierungsweg in Richtung TH1 Antwort festgelegt und das von den dendritischen Zellen produzierte IL-12 kann mit dem exprimierten IL-12-Rezeptor interagieren. Für die weitere Proliferation und Differenzierung der determinierten TH1-Zellen ist der *signal transducer activator of transcription 4* (STAT4) verantwortlich. Sobald es zu einem Kontakt mit einer antigenpräsentierenden Zelle kommt, bilden die so entstandenen TH1-Effektorzellen IFN- γ , sodass eine positive Rückkopplung entsteht und weitere TH1-Zellen gebildet werden [24].

Die TH1-Zellen können nach Antigenkontakt Makrophagen aktivieren, um intrazelluläre Pathogene zu zerstören. Des Weiteren können sie B-Lymphozyten über einen membranverankerten Peptid-MHC II Komplex erkennen und via Zytokinproduktion zur Synthese von Antikörpern gegen extrazelluläre Pathogene stimulieren [25]. Die aktivierten B-Lymphozyten proliferieren und differenzieren sich entweder zu antikörperproduzierenden Plasmazellen oder zu B-Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt direkt mit der Antikörperbildung beginnen können.

Während IFN- γ und IL-12 bedeutsam für die TH1 Differenzierung sind, ist Interleukin-4 (IL-4) der Hauptauslöser für die TH2-Antwort. IL-4 aktiviert den *signal transducer activator of transcription 6* (STAT6), der die Expression des Transkriptionsfaktors GATA-3 bewirkt. Durch GATA-3 werden die für die TH2-Zellen spezifischen Zytokine (z.B. IL-4) hochreguliert. Der Transkriptionsfaktor GATA-3 verursacht nicht nur die Entwicklung der TH2-Zelllinie, sondern hält die Proliferation durch Stimulierung der eigenen Expression aufrecht [25]. Die gebildeten TH2-Effektorzellen können ebenfalls naive B-Zellen stimulieren und einen Isotypwechsel hin zu IgE-Antikörpern hervorrufen, die für die Bekämpfung von z.B. parasitären Infektionen notwendig sind [26].

Neben den TH1 und TH2-Zellen existiert noch eine dritte T-Effektorzelllinie namens TH17-Zellen, die sich durch die Produktion von Interleukin 17 (IL-17) auszeichnen und weder IFN- γ noch IL-4 sezernieren [25]. Die TH17-Zellen unterscheiden sich von den beiden anderen CD4⁺-Zelllinien nicht nur durch ihr Zytokinprofil, sondern auch durch die zu ihrer Differenzierung führenden Zytokine [25]. Interleukin-6 (IL-6) und der *transforming growth factor β* (TGF β) lösen die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma* (ROR γ t), *retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha* (ROR α) und *signal transducer activator of transcription 3* (STAT3) aus [27]. ROR γ t bewirkt infolge die Aktivierung des Interleukin 23-Rezeptors (IL23-Rezeptor). Interleukin 23 stabilisiert anschließend über seinen Rezeptor die TH17-Antwort und fördert zudem

die Expansion der TH17-Zellen [25]. Interleukin 1 β (IL-1 β) ist ebenfalls für die Aufrechterhaltung und die weitere Differenzierung der TH17-Zellen verantwortlich [28]. Nurieva et al. konnten in ihrer Arbeit demonstrieren, dass TH17-Zellen zusätzlich einer autokrinen Regulation durch Interleukin 21 (IL-21) unterliegen. In Abhängigkeit von IL-6 und STAT3 kommt es zur Expression von IL-21, welches wiederum die Differenzierung der TH17 Zellen fördert und zugleich die Foxp3 Expression supprimiert [29]. Die Aufgabe der TH17-Zellen umfasst die Rekrutierung von neutrophilen Zellen zum Ort des Entzündungsgeschehens in der frühen Phase der adaptiven Immunantwort [26, 30]. Da IL17A und IL17-Rezeptor defiziente Mäuse sowie mit IL17A-Antikörpern behandelte Patienten anfälliger für Infektionen wie z.B. die chronische mukokutane Candidiasis (CMC) sind, scheinen TH17-Zellen auch an der Abwehr gegen extrazelluläre Erreger beteiligt zu sein [26, 31].

Die Teilnahme der TH17-Zellen an Autoimmunerkrankungen wurde zunächst deutlich durch Arbeiten zu Interleukin 23 (IL-23). Oppmann et al. konnten in ihrer Arbeit aufzeigen, dass IL-23 zu der IL-12 Familie gehört und genauso wie IL-12 die Untereinheit IL-12p40 besitzt. Während sich IL-12 aus den Untereinheiten IL-12p40 und IL-12p35 zusammensetzt, besteht IL-23 aus der Untereinheit IL-12p40 und dem 19 kDa Protein (p19) [32]. Obwohl eine Neutralisierung von IL-12p40 zu einer Abschwächung von entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie z.B. der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE) im Mausmodell führt [33], bleiben IFN γ defiziente Mäuse weiterhin anfällig für *collagen-induced arthritis* (CIA) oder EAE [34, 35]. Außerdem sind nur IL-12p40 und IL-12p19 defiziente Mäuse vor der Entwicklung von EAE sowie CIA geschützt. IL-12p35 defiziente Mäuse zeigen weiterhin eine Krankheitsaktivität, sodass diese Erkrankungen nicht allein durch die IL-12 induzierte TH1-Immunantwort zustande kommen können [36, 37]. Weitere Hinweise für den Beitrag der TH17-Zellen zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen stammen aus Forschungen zu IL-17 und dem Mausmodell zur EAE. So konnten mit Hilfe von *Micro Array Gene Analysen* erhöhte IL-17 Transkripte in geschädigten Hirnarealen von Multiple Sklerose Patienten detektiert werden [38]. Die Düsseldorfer Arbeitsgruppe um Hofstetter et al. konnte zudem durch die Applikation eines IL-17-Rezeptor-Fc-hybrid Fusionsproteins und des monoklonalen Antikörpers MAB421 zur Neutralisierung von IL-17 einen abgeschwächten Krankheitsverlauf im EAE Modell generieren [39]. 2015 konnten Mangang et al. noch einmal die Bedeutung der IL-23/IL-17 Achse hervorheben, indem sie mit ihren Forschungsergebnissen eine Überlegenheit einer dualen Inhibition der IL-23/IL-17 Achse gegenüber einer alleinigen IL-23 oder IL-17 Blockade belegen konnten [40]. Neben den bereits genannten Erkrankungen beeinflussen die TH17-Zellen und das von ihnen sezernierte IL-17 ebenfalls die Krankheitsentwicklung der rheumatoiden Arthritis [41], des

systemischen Lupus erythematoses [42] und spielen anscheinend eine wichtige Rolle für die zelluläre Transplantatabstoßung [43].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die glomerulären Schäden bei der *anti-glomerular basement membrane disease* (Anti-GBM) ausschließlich durch TH1-Zellen vermittelt werden, da es bei dieser Erkrankung zu Ablagerungen von TH1-assoziierten IgG Subklassen entlang der glomerulären Basalmembran kommt [44]. Jedoch waren IFN- γ defiziente Mäuse im Anti-GBM Mausmodell nicht vor dem Ausbruch der Erkrankung geschützt. Stattdessen wiesen sie im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen sogar einen signifikant schwereren Krankheitsverlauf auf [45]. Dieselbe Arbeitsgruppe um Kitching et al. konnte demonstrieren, dass die IL-23/IL-17 Achse für den glomerulären Schaden im Anti-GBM Modell verantwortlich ist. In ihrem Experiment immunisierten sie Wildtyp-Mäuse, IL-12p35 (-/-) (IL-12 defizient, IL-23 intakt), IL-12p40 (-/-) (IL-12 und IL-23 defizient) und IL-23p19 (-/-) (IL-12 intakt, IL-23 defizient mit rekombinantem Maus alpha3(IV)NC1. Trotz des Vorhandenseins von IL-12 waren IL-23 defiziente Mäuse vor dem Ausbruch der Anti-GBM Glomerulonephritis geschützt und Mäuse mit intaktem IL-23 nicht [46]. Die Hamburger Arbeitsgruppe um Panzer et al. detektierte zusätzlich das Vorhandensein von IL-17 produzierenden TH17 Zellen im Anti-GBM Modell. Weiterhin konnten sie einen milderen Krankheitsverlauf für IL-17 (-/-) Mäuse im Anti-GBM Modell zeigen [47]. Dieses Resultat ließ sich ebenfalls auf das Krankheitsbild der Pauci immunen ANCA-assoziierten Glomerulonephritis übertragen. Auch in diesem Modell wurden die IL-17(-/-) Mäuse weniger geschädigt, da durch die reduzierten IL-17 Spiegel weniger neutrophile Granulozyten rekrutiert wurden und folglich weniger glomeruläre Myeloperoxidase (MPO) Ablagerungen vorhanden waren. Die ANCA-Titer wurden durch den Knockout nicht beeinflusst [48]. In einem durch Pristan induzierten Modell zur Lupusnephritis wiesen IL-17F defiziente Mäuse einen milderen Verlauf der Lupusnephritis und eine reduzierte Mortalität auf [49].

1.4 Interleukin 17

IL-17 ist ein proinflammatorisches Zytokin und wird von verschiedenen Zelltypen wie zum Beispiel CD4⁺ TH17 Zellen, $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen, CD8⁺ (Tc17)-Zellen, natürlichen Killerzellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten gebildet [39, 50]. Rouvier et al. konnten im Jahre 1993 als Erste die Isolierung und Klonierung eines Nagetiers cDNA Transkriptes eines CD4⁺-T-Zell Hybridom beschreiben und nannten dieses cDNA Transkript *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 8* (CTLA8) [51]. Zwei Jahre später gaben Yao et al. CTLA8 basierend auf den Beobachtungen, dass es die Induktion von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B), IL-6 und die T-Zell Proliferation

fördert, den Namen IL-17 [52]. Seit der Entdeckung von IL-17, auch IL-17A genannt, wurden fünf weitere Zytokine mit ähnlicher Aminosäuresequenz beschrieben und mit den Buchstaben B bis F durchnummeriert. Die Proteinsequenzen von IL-17A-F zeigen keine Übereinstimmungen mit anderen bisher bekannten Proteinen, sodass es sich bei IL-17 um eine eigenständige, neue Zytokinfamilie handelt [53-56]. Die bereits erwähnte Arbeitsgruppe um Yao et al. konnte ebenfalls im Jahr 1995 den zum IL-17 passenden Rezeptor IL-17 Rezeptor A (IL-17RA) identifizieren [57]. Mittlerweile sind fünf verschiedene IL-17 Rezeptoren bekannt: IL-17RA, RB, RC, RD und RE. Genauso wie ihre Liganden zeichnen sich die IL-17 Rezeptoren durch homologe Aminosäuresequenzen aus und haben keine molekularen Ähnlichkeiten mit bereits beschriebenen Zytokinrezeptoren [58]. IL-17RA ist ubiquitär im Gewebe sowie auf Zellen vorhanden. Sobald der Ligand IL-17A den IL-17RA gebunden hat, heterodimerisiert dieser zusammen mit IL-17RC und setzt daraufhin die proinflammatorisch wirkende Signalkaskade in Gang [58, 59].

1.5 Regulatorische T Zellen

Für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen ist eine vierte Gruppe von T-Effektorzellen verantwortlich. Diese sogenannten regulatorischen T-Zellen sind durch die Produktion von Interleukin 10 (IL-10) und TGF β charakterisiert und können die T-Zell-Antwort inhibieren. Die regulatorischen CD4⁺-T-Zellen unterteilen sich zunächst in die natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTreg-Zellen) und in die adaptiven regulatorischen T-Zellen (iTreg-Zellen). Während nTreg-Zellen bereits im Thymus entstehen, findet die Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen zu iTreg-Zellen außerhalb des Thymus statt [60]. Da die nTreg-Zellen eine autoreaktive Komponente besitzen, erfahren sie im Thymus eine negative Selektion. Die Eliminierung der nTreg-Zellen erfolgt, wenn ihr T-Zell-Rezeptor (TCR) körpereigene Peptide bindet [61]. Die Gruppe der iTreg-Zellen unterteilt man wiederum in mehrere Subpopulationen, die unterschiedliche Eigenschaften und Phänotypen besitzen [60]. Ein entscheidender Schlüsselfaktor für die Induktion von iTreg-Zellen stellt die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead-box-protein P3* (Foxp3) dar. Fantini et al. konnten in einer ihrer Arbeiten zeigen, dass TGF β -abhängig induziertes Foxp3 einen regulatorischen Phänotyp in peripheren CD4⁺CD25⁺-T-Zellen hervorrufen kann [62]. Angesichts der verschiedenen inflammatorischen CD4⁺-T-Zelllinien kann man von der Existenz mehrerer adaptiver regulatorischer T-Zelllinien ausgehen [63]. Daher ist eine gewisse Übereinstimmung zwischen den inflammatorischen und regulatorischen T-Zellen unerlässlich für eine effektive Unterdrückung einzelner CD4⁺-Subpopulationen [64]. So kommt es während der TH1-Immunreaktion zu einer Hochregulierung von TH1 regulatorischen T-Zellen (Treg1), die zusätzlich zu Foxp3 den

Transkriptionsfaktor T-bet exprimieren. T-bet fördert die Expression von *C-X-C chemokine receptor type 3* (CXCR3) auf Treg1-Zellen und die *chemokine (C-X-C) motif ligands* (CXCL) 9, 10 sowie 11 initiieren die Migration der Treg1-Zellen zum Ort der TH1-Entzündungsreaktion [65]. Interferon regulatory factor-4 (IRF4) ist für die Differenzierung von naiven CD4+-Zellen zu TH2-Zellen unverzichtbar. Ye Zheng et al. konnten zeigen, dass Foxp3 die Expression des Transkriptionsfaktors IRF4 in regulatorischen T-Zellen induziert und in der Folge die TH2-Antwort inhibiert wird [66]. Analog dazu beschreiben Chaudry et al. in ihrer Arbeit die Existenz regulatorischer TH17-Zellen (Treg17). Nach Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor STAT3 können die Treg17-Zellen die inflammatorische TH17-Immunantwort z.B. im *crescenti -glomerulonephritis* Modell (cGN-Modell) unterdrücken [64, 67]. M. Kluger et al. wiesen eine protektive Rolle von Treg17-Zellen im Modell der Lupusnephritis nach. Sie konnten zeigen, dass die Treg-spezifische Deletion von STAT3 zu einer überschießenden TH17-Immunantwort mit Aggravation der Lupusnephritis führt [68].

Treg-Zellen sind nicht nur für die Kontrolle der Immunantwort bedeutend, sondern können auch zur antimikrobiellen Immunabwehr beitragen, indem sie IL-17 produzieren. Diese sogenannten CD4+Foxp3+CCR6+IL17-produzierenden T-Zellen exprimieren sowohl den antiinflammatorischen Transkriptionsfaktor Foxp3 als auch den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor ROR γ t. Sie befinden sich im peripheren Blut und im lymphatischen Gewebe (z.B. Tonsillen) [28]. Der Chemokinrezeptor CCR6 ermöglicht sowohl die Rekrutierung der TH17, als auch der Treg17-Zellen zum Ort der Inflammation in der Niere [69]. CD4+Foxp3+CCR6-T-Zellen können sich nach Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors und unter dem Einfluss von IL-1 β , IL-2, IL-21 und IL-23 im peripheren Blut zu IL-17-produzierenden T-Zellen entwickeln [28]. Die Hamburger Arbeitsgruppe um M. Kluger et al. untersuchte die Rolle von Foxp3+ROR γ t+-T-Zellen (biTregs) in einem Modell für akute Glomerulonephritis. Durch ihre Studie konnten sie belegen, dass es sich bei den biTregs-Zellen um eine eigene T-Zelllinie handelt. Die biTregs können sowohl antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 oder Interleukin-35 (IL-35) als auch das proinflammatorische IL-17 produzieren. Sie unterscheiden sich von den natürlichen regulatorischen T-Zellen, den Treg17-Zellen und den TH17-Zellen durch ihr Zytokinprofil, ihre Zelloberflächenmoleküle, ihre Transkriptionsfaktoren und in ihrer Funktionalität [70].

1.6 LIF und LIF Rezeptor

Leukemia inhibitory factor (LIF) gehört zur Gruppe der IL-6 Zytokine [71] genauso wie oncostatin M (OSM), *ciliary neurotrophic growth factor* (CNTF), cardiotrophin-1 (CT-1), *cardiotrophin-1-like cytokine* (CLC), IL-6, Interleukin 11 (IL-11) und wurde zum ersten Mal

von Gearing et. al. aus einer *T lymphocyte cDNA library* kloniert [72]. Laut Gearing et. al. induziert LIF die Differenzierung von M1 myeloisch leukaemischen Zellen, inhibiert jedoch deren Proliferation [72]. Mittlerweile ist bekannt, dass LIF pleiotrope Effekte ausübt und sein Rezeptor in fast allen Organen des Körpers vorkommt [73]. Der LIF Rezeptor ist ein Heterodimer bestehend aus dem Glykoprotein 130 (gp130) und dem *LIF receptor*, auch Glykoprotein 190 genannt, (LIF R oder gp190) [71], sodass nach dem Andocken des Liganden LIF ein ternärer Komplex entsteht [74, 75]. Die Komponenten gp130 und LIF R binden über ihre intrazelluläre Domäne Januskinasen (JAK) und initiieren auf diesem Wege die Signaltransduktion in das Zellinnere [76]. OSM vermittelt ebenso wie LIF seine intrazellulären Signale über den heterodimeren Rezeptorkomplex gp130 und LIF R. CNTF, CT-1 und CLC benötigen neben dem heterodimeren Rezeptorkomplex noch einen *alpha-chain receptor* (CNTFR α), wodurch ein quartärer Komplex gebildet wird. Im Gegensatz dazu binden IL-6 und IL-11 an einen Rezeptorkomplex, der sich aus zwei gp130 Ketten und zwei spezifischen alpha Ketten (IL-6R α oder IL-11R α) zusammensetzt. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass zur Funktionsfähigkeit des Rezeptorkomplexes zwei IL-6 bzw. zwei IL-11 Moleküle benötigt werden. Außerdem bindet IL-6 seine spezifische alpha Kette mit einer höheren Affinität als die gp130 Komponente, während LIF gp130 und LIF R mit der gleichen Affinität bindet. Allerdings ist die Bindung zwischen LIF und dem gp130 geringer als die Bindung zwischen LIF und LIF R. Die Ursache für die geringere Bindung ist in der Interaktion von gp130 mit den anderen oben genannten Zytokinen zu sehen. Der LIF Rezeptor selbst besitzt keine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität innerhalb seiner intrazellulär gelegenen Domäne. Stattdessen sind beide Ketten des LIF Rezeptors, gp130 und LIF R, mit Mitgliedern der Januskinase Familie verbunden. Die Januskinase Familie beinhaltet insgesamt fünf Mitglieder: Januskinase 1 (JAK1), Januskinase 2 (JAK2), Januskinase 3 (JAK3) und Tyrosinkinase 2 (TYK2), wobei der LIF Rezeptor nur mit JAK1, JAK2 und TYK2 eine Bindung eingehen kann. Innerhalb dieser Gruppe wird JAK1 als erste der Kinasen aktiviert und nimmt somit die wichtigste Stellung im Vergleich zu den anderen Januskinasen ein. Sobald LIF seinen Rezeptorkomplex gebunden hat, phosphoryliert JAK1 fünf Tyrosinreste an jeder Kette des LIF Rezeptors und generiert auf diese Weise vier Bindungsstellen für STAT3 und eine Bindungsstelle für SHP-2 oder *suppressor of cytokine signalling 3* (SOCS3). Während der Transkriptionsfaktor STAT3 den JAK/STAT Signalweg und SHP-2 den MAPK Signalweg stimuliert, unterdrückt SOCS3 die Aktivierung der beiden genannten Signalwege [73]. Zudem kann LIF via JAK1 die Aktivierung des *phosphatidylinositol 3-kinase/Akt* (PI3/Akt) Signalweges auslösen [77]. Dabei gehen JAK1 und die p85 Untereinheit der PI3-Kinase eine Verbindung ein. Es muss noch geklärt werden, ob für diesen Schritt eine vorausgehende Rezeptorphosphorylierung, wie bei der STAT und MAPK

Signalwegaktivierung, notwendig ist. Die Aktivierung der p85 Untereinheit setzt dann die innerhalb der Zellmembran lokalisierte serin/threonin Kinase Akt (protein kinase B) in Gang. Außerdem kommt es zur Aktivierung von weiteren Signalwegen wie beispielsweise des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) Signalweges, aber auch zur Herunterregulierung des WNT Signalweges durch Hemmung der glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β). In Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp, kann LIF über diese drei Signalwege Einfluss auf Zelldifferenzierungsvorgänge ausüben [73]. Tregs sind fähig LIF zu produzieren, welches wiederum die Produktion von weiteren Tregs anregt, indem es zu einer verstärkten Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 und einer Hemmung des Transkriptionsfaktors ROR γ t führt. Zusätzlich unterdrückt LIF die IL-6-vermittelte Freisetzung von IL-17A. Somit sorgt LIF für die Aufrechterhaltung von Immuntoleranz und fördert die Differenzierung von CD4 $^{+}$ -Zellen in Richtung Tregs [78].

Zusätzlich übernimmt LIF auch eine protektive Rolle gegenüber inflammatorischen Reaktionen. In einem mit Lipopolysaccharide/D-galactosamine induzierten Modell zum endotoxischen Schock konnten Weber et al. zeigen, dass endogenes LIF die Expression von Akute-Phase-Proteinen sowie IL-10 steigert und gleichzeitig die TNF α und IL-6 Antwort abschwächt [79]. Im Gegensatz dazu fördert IL-6 die Differenzierung von CD4 $^{+}$ -Zellen zu proinflammatorischen TH17-Zellen und steht somit dem protektiv wirkenden LIF gegenüber. IL-6 unterdrückt einerseits die Transkription der LIF Rezeptorkomponente LIF R andererseits induziert IL-6 eine E3 ubiquitin ligase namens axotrophin/MARCH-7, welche zum proteasomalen Abbau der LIF R Untereinheit des LIF Rezeptors führt [73, 78]. Neben dem hämatopoetischen System übt LIF auch einen Effekt auf das neuromuskuläre System aus. Entgegen der früheren Vorstellung, dass LIF eine Bedeutung für die Entwicklung bzw. Differenzierung von Nervenzellen hat, ist LIF eher ausschlaggebend für neuromuskuläre Reparaturprozesse. Curtis et al. konnten bereits Anfang der Neunziger Jahre demonstrieren, dass es nach Axotomie sowohl zu einem vermehrten axonalen Transport von LIF als auch zu einer gesteigerten LIF Expression an der Stelle der nervalen Läsion kommt [80]. LIF fördert zusätzlich die Erneuerung von neuronalen Stammzellen (NSCs) im Gehirn, jedoch auf Kosten der Entstehung von mehr differenzierten Neuronen [81]. Abgesehen von den Effekten auf die neuronalen Stammzellen, beeinflusst LIF ebenfalls die Reifung sowie das Überleben der Gliazellen des Gehirns [82]. Deverman et al. zeigten, dass LIF die Proliferation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen stimuliert und somit über die vermehrte Expression von Myelin Proteinen in die Reparaturvorgänge bei chronischer Demyelinisierung eingreift [83]. Analog zu den LIF Effekten im Nervengewebe, kommt LIF im Muskelgewebe eher eine Bedeutung bei Reparations- als bei Differenzierungsvorgängen zu. Muskeltraumata führen zu einer gesteigerten LIF *messenger ribonucleic acid* (mRNA) Synthese im

geschädigten Areal und die in vivo Applikation von LIF bewirkt eine schnellere Regeneration des verletzten Muskels [84, 85]. Zusammenfassend sind die LIF-vermittelten Effekte auf das hämatopoetische, das neuromuskuläre, das endokrine System, die Reproduktion und den Knochenumbau abhängig von den verschiedenen Aktivierungszuständen der drei Signalwege: JAK1/STAT3, PI3/Akt und MAPK, sowie vom Differenzierungsgrad der betroffenen Zellen. Das aus verschiedenen Zytokinen zusammengesetzte Umgebungsmilieu beeinflusst das Resultat der LIF Aktivierung ebenfalls [73].

1.7 Die Funktion von LIF in der Niere

Bislang liegen nur wenige Untersuchungen zu den Effekten von LIF in der Niere vor. Das Wissen um die Beteiligung von LIF an der Umwandlung von mesenchyalem in epitheliales Gewebe, gab den Anstoß für Untersuchungen, ob LIF in regenerative Prozesse nach tubulärer Schädigung involviert ist. Dabei ähnelt der Reparaturvorgang in der Niere dem Reifungsprozess des Nephrons während der embryonalen Nierenentwicklung. Im Verlauf des tubulären Reparaturvorganges werden Transkriptionsfaktoren exprimiert wie z.B. PAX2 oder Wnt-4, die auch für die normale Entwicklung der Niere eine entscheidende Rolle spielen [86, 87]. Eine Arbeitsgruppe der Keio Universität in Tokyo untersuchte als Erste einen möglichen Einfluss von LIF auf die tubuläre Regeneration im akuten Ischämie-Reperfusion Modell (IRI-Modell) sowohl in vivo also auch in vitro. Nach der Reperfusion konnten sie erhöhte LIF m-RNA Spiegel von Tag 1 an bis Tag 7 messen und mit einer Verzögerung von vier Tagen auch einen Anstieg der LIF R m-RNA bis zum Tag 14. Das in vitro Modell des akuten Nierenversagens bestand in der Depletion von ATP in renalen, epithelialen Zellen der Ratte (NRK52E). Während der Erholungsphase applizierten sie einen anti-LIF Antikörper, um den endogenen LIF Effekt zu untersuchen. Dies führte zu einer verminderten Zellzahl und DNA-Synthese innerhalb der Gruppe der geschädigten NRK52E. Auf unbeschädigte NRK52E hatte die anti-LIF Antikörper Behandlung keinen Einfluss, sodass der mitogene LIF Effekt spezifisch für die Erholungsphase nach Schädigung zu sein scheint [88]. Der Beitrag der TH17-Zellen zur Pathogenese von autoimmunentzündlichen Erkrankungen und die Rolle von LIF sind bisher am besten im EAE Modell der Maus untersucht. Cao et al. konnten in diesem Modell zeigen, dass sowohl von *neural progenitor cells* (NPCs) produziertes LIF als auch intraperitoneal appliziertes, rekombinantes LIF selektiv die TH17-Differenzierung in Milz und im zentralen Nervensystem (ZNS) inhibiert. Ihnen zufolge induziert die Bindung von LIF an den LIF R die Aktivierung von ERK und SOCS3, wodurch wiederum die Phosphorylierung von STAT3 und somit die TH17 Differenzierung

gehemmt wird. Allerdings konnten sie in ihrer Arbeit keinen Effekt von LIF auf TH1, TH2 oder Tregs beobachten [89]. Der vermutete Mechanismus beruht auf der Erkenntnis, dass es in Abwesenheit von SOCS3 zwar zu einer Zunahme der TH17-Proliferation kommt, aber nur ein minimaler Effekt auf die TH1 und TH2 Differenzierung erzielt wird [90]. In Abwesenheit von IL-6 konnte LIF zunächst die Phosphorylierung von STAT3 in CD4+-Zellen induzieren, da die ERK/SOCS3 Kaskade noch nicht vollständig in Gang gebracht wurde [89]. Mittlerweile ist bekannt, dass die Treg-17 Aktivierung unter anderem auch den Transkriptionsfaktor STAT3 benötigt. Ein eventueller Zusammenhang zwischen LIF/STAT3 und der Induktion von Tregs war aber nicht Gegenstand der Arbeit von Cao et al.

1.8 Ziel der Arbeit

Bisher wurde noch keine Arbeit veröffentlicht, die einen zugrundeliegenden Mechanismus der protektiven Funktion von LIF gegenüber der Inflammation in der Niere nachweisen konnte. Unter den experimentellen Mausmodellen zur CKD gilt das UUO-Modell seit Jahrzehnten als eines der gängigsten und am besten etabliertesten Modelle, um neue molekulare Signalwege und somit mögliche Therapieansätze zu untersuchen. Das UUO Modell löst innerhalb von 24 Stunden eine Folge von pathologischen Ereignissen aus. Im Anschluss an die vollständige Ligatur des Ureters kommt es zunächst zu einer Reduktion des renalen Blutflusses und zu einer Abnahme der GFR. Im weiteren Verlauf kommt es zur Ausbildung einer Hydronephrose, zur Einwanderung von inflammatorischen Zellen in das Interstitium und zur tubulären Apoptose. Innerhalb von ein bis zwei Wochen entsteht auf diese Weise eine tubulointerstitielle Fibrose mit Parenchym- und Nierenfunktionsverlust. Der Vorteil des Modells besteht einerseits darin, dass nahezu alle nephrologischen Erkrankungen in ihrem Endstadium zur tubulointerstitiellen Fibrose führen und dementsprechend in diesem Modell abgebildet werden. Andererseits ist dieses Modell in allen verfügbaren Mauslinien reproduzierbar und der Erfolg der renalen Schädigung ist bereits makroskopisch bei der Organentnahme erkennbar [17, 91]. Da am Anfang des UUO-Modells die T-Lymphozyten und die Infiltration von Makrophagen mit Zytokinausschüttung und konsekutiver Fibroblastenproliferation steht, konnte mit diesem Modell der Einfluss von LIF auf die renale Inflammation anhand des Endpunktes tubulointerstitieller Fibrose gemessen werden. Für das UUO Modell wurde in der Vergangenheit das Auftreten von zwei verschiedenen Makrophagenpopulationen beschrieben, welche zu unterschiedlichen Zeitpunkten entgegengesetzte Funktionen ausüben. Während M1 Makrophagen zu einem frühen Zeitpunkt nach Organschädigung auftreten und für proinflammatorische Aufgaben wie die Phagozytose von Zellresten

zuständig sind, treten M2 Makrophagen erst im Verlauf auf und üben über die Produktion von TGF β 1 einen profibrotischen Effekt im Sinne einer Gewebereparation aus. Dieser Reparationsvorgang kann durch überschießende Inflammation den Prozess der renalen Fibrose fördern [92, 93].

Da LIF zelluläre Regenerationsprozesse beeinflusst und die Differenzierung von IL-17 produzierenden TH17-Zellen in unterschiedlichen Organsystemen inhibiert, stellten wir die Hypothese auf, dass LIF inflammatorischen und fibrotischen Gewebeschaden in der Niere abschwächt. Daher untersucht die vorliegende Arbeit den Effekt einer LIF-Therapie auf die renale Inflammation und die Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose im UUO-Mausmodell.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 6-8 Wochen alte, männliche C57BL/6j-Wildtypmäuse (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) verwendet. Die Tiere wurden in der zentralen Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Typ III Polycarbonat Käfigen bei 45 % Luftfeuchtigkeit, 20-22° Celsius Raumtemperatur und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Sie hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Bei Versuchsbeginn betrug das durchschnittliche Gewicht der Mäuse 23,0 g. Die Projektnummer lautete ZETT; G91/13 und das Aktenzeichen des Tierversuches lautete AZ: 84-02.04.2013.A091. Die Teilnahme an der Versuchstierkunde erfolgte am 09.11.2012 in Düsseldorf.

2.2 Anästhesie

Alle invasiven Eingriffe wurden unter Narkose durchgeführt. Als Anästhetikum wurde eine Mischlösung aus 0,168 mg/g Körpergewicht (KG) Ketamin (10 mg/ml; Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland) und 8 mg/gKG Xylazin (2 mg/ml; AniMedica GmbH, Senden-Bösesell, Deutschland) verwendet und mit Natriumchlorid 0,9 % (NaCl) im Verhältnis 1:1:8 verdünnt. Den Versuchstieren wurde die Mischlösung in einer Dosierung von 10 μ l/g(KG) intraperitoneal (i.p.) gespritzt. Der Grad der Narkose wurde mittels Schmerzstimulus interdigital im Bereich der Hinterläufe geprüft.

2.3 Blutentnahme

Am Tag der Organentnahme wurde von den Versuchstieren nach vorangegangener Narkose (wie oben beschrieben) mittels Punktion des retroorbitalen Venenplexus Blut gewonnen. Das Versuchstier wurde nach erfolgter Anästhesie zwischen Daumen und Zeigefinger fixiert. Durch Druck auf den kontralateralen Bulbus wurde der ipsilaterale Bulbus leicht aus seiner Höhle luxiert, so dass über den medialen Augenwinkel mit Hilfe einer Pasteurpipette (230 mm lang, Assistent) der retroorbitale Venenplexus punktiert werden konnte. Pro Tier wurden etwa 500 µl Blut entnommen. Das Blut wurde in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, welches zuvor mit 5 µl Heparin (, Deutschland) versetzt wurde. Nach Zentrifugierung (Centrifuge 5417R, Eppendorf) bei 4° C und 3000 Umdrehungen/min wurde das Plasma abpipettiert, aliquotiert und weiteren Analysen zugeführt.

2.4 Versuchsaufbau

Für den Versuch wurde eine Kontroll-(UUO) und eine Behandlungsgruppe (UUO+LIF) mit männlichen C57BL/6-Wildtypmäusen mit gleichem Alter und gleicher Stückzahl gebildet. Innerhalb der beiden Gruppen wurden den 6-8 Wochen alten Versuchstieren täglich entweder 30 µg/kg KG LIF (Behandlungsgruppe; n=8) oder 30 µg/kg KG *phosphate buffered saline* (PBS) (Kontrollgruppe; n=8) i.p. gespritzt. Dabei begann die i.p. Behandlung zwei Tage (Tag -2) vor der Operation (UUO) (Tag 0) und endete am Tag der Organentnahme. Die Organentnahme der Nieren erfolgte entsprechend der Gruppenzuordnung entweder am dritten oder am zehnten postoperativen Tag. In einem zweiten Versuchsdurchlauf wurden 12 männliche C57BL/6 Wildtypmäusen im Alter von 6-8 Wochen zu gleichen Teilen der Kontroll- und der Behandlungsgruppe zugeordnet. In diesem zweiten Versuchsdurchlauf wurden zusätzlich die paraaortalen Lymphknoten und die Milz entnommen. Das zusätzliche Gewebe wurde für eine FACS-Analyse, eine Luminex-Analyse und eine Lymphknoten-Real-Time-PCR verwendet. Zum gleichen Zeitpunkt wurde eine Wildtypgruppe (WT) von 6-8 Wochen alten C57BL/6-Wildtypmäusen gebildet. Diese Wildtypiergruppe wurde nicht der UUO-OP zugeführt. Das Gewebe der Wildtypiergruppe wurde nur für die FACS- und Luminex-Analyse verwendet, um die Auswirkungen von LIF auf den ungeschädigten Organismus zu untersuchen.

2.5 Modell der Unilateralen Ureterobstruktion

Das UUO-Modell verursacht in kurzer Zeit eine Hydronephrose. Der erhöhte Druck im Bereich des ableitenden Ureters und der Rückstau bis in das Tubulussystem der Niere

bedingen ein Sistieren der Urinproduktion sowie eine Minderperfusion des Nierengewebes mit konsekutiver Inflammation.

Die Operationen erfolgten unter sterilen Bedingungen in der Tierversuchsanstalt des Universitätsklinikums Düsseldorf. Das Operationsbesteck stand vor den Operationen autoklaviert zur Verfügung. Zwischen den Operationen wurde es mittels alkoholischer Lösung gereinigt und desinfiziert. Nach Einleitung der Vollnarkose wurden die Augen der Versuchstiere mit Augensalbe (Polyspectran HC, Alcon) geschützt und der operative Zugangsweg bzw. die linke Flanke der Tiere rasiert (Andis, Sturtevant, USA). Danach wurden die Tiere in Seitenlage auf dem sterilen OP-Tuch fixiert und die Haut desinfiziert. Um ein Auskühlen der Versuchstiere zu vermeiden, wurde eine Wärmematte unter das sterile OP Tuch platziert. Im ersten Schritt der Operation wurde die Haut 1,5 cm kaudal des Rippenbogens mit einem 1,0 cm langen Längsschnitt (feine Schere, gerade, 11.5 cm, Martin) inzidiert. Im Anschluss daran wurde die Haut mit zwei anatomischen Pinzetten (fein, gebogen, 10,5 cm, Martin) stumpf von der darunterliegenden Bauchmuskulatur abpräpariert. In die Bauchmuskulatur wurde zunächst nur ein kleines Loch geschnitten, damit der Bauchsitus Luft zog und die Bauchwand von Darmgekröse befreit wurde. Der Zugang zum Bauchsitus wurde dann nach kranial und kaudal auf 1.0 cm erweitert. Durch vorsichtiges Verlagern des Darmkonvolutes wurde im nächsten Schritt das Fettgewebe am unteren Nierenpol aufgesucht, welches den Ureter beinhaltet. Danach wurde die Niere zusammen mit dem kaudalen Fettgewebe nach außen luxiert. Um den Ureter darzustellen, wurde eine Irispinzette (gebogen, 0,5 mm, Allgaier) unter das Fettgewebe mit dem Ureter platziert und aufgespannt. Im Folgenden wurde eine Ligatur (Miralene, USP 4/0, metric, 1,5, nichtresorbierbar, Braun) am unteren Nierenpol und eine zweite Ligatur an der distalen Pinzettenspitze gesetzt. Dann wurde der Ureter mit der anatomischen Schere durchtrennt. Anschließend wurde die Niere reponiert und die Muskulatur mittels resorbierbaren Nahtmaterials (Vicryl, 3-0) mit einer fortlaufenden Naht verschlossen. Die Haut wurde mittels nicht resorbierbaren Nahtmaterials (Prolene, 3-0) ebenfalls fortlaufend verschlossen und die Wunde mit steriler Kochsalzlösung 0.9% gesäubert. Im Anschluss wurde die Wunde erneut desinfiziert. Am Ende jeder OP erfolgte die Gabe von ca. 0.5 ml NaCl 0.9 % subkutan zur Flüssigkeitssubstitution. Zudem erfolgte eine analgetische Therapie mittels Buprenorphin (0.05-0.1 mg/kgKG) subcutan (s.c.) postoperativ und dann zweimal täglich für zwei Tage. Die OP Zeit betrug ca. 15 min. Die Tiere wurden bis zum Aufwachen unter eine InfrarotWärmelampe gelegt und anschließend in frischen Käfigen weiterversorgt. Das Nahtmaterial wurde in der Regel bereits frühzeitig durch die Mäuse selbst entfernt. Verbliebenes Nahtmaterial wurde bei areaktiven Wundverhältnissen nach 7 Tagen entfernt.

2.6 Organentnahme

Nach Vollnarkose sowie anschließender Euthanasie wurde bei den Versuchstieren ein horizontaler Hautschnitt am Bauch durchgeführt und mit der anatomischen Schere stumpf nach kranial präpariert. Danach erfolgte ein Längsschnitt bis auf Höhe des Processus Xiphoideus. Als nächstes wurde das Fell mit zwei stumpfen Pinzetten von der darunterliegenden Bauchmuskulatur getrennt und der Situs mit einem Längsschnitt durch die Bauchmuskulatur eröffnet. Um das Fell sowie die Bauchmuskulatur zu entlasten, folgten zwei horizontale Schnitte zu jeder Seite. Mit zwei Mosquitoklemmen (gebogen, 12,5 cm, Martin) wurde der Bauchsitus dann fixiert und aufgespannt. Danach wurde das Darmgekröse mit einem Tupfer zur linken Seite geschoben und die Ligamenti mit einer Federschere durchtrennt. Im Anschluss an diesen Schritt wurde die Ligatur für die Aorta abdominalis unter Schonung des Diaphragmas gesetzt; dabei erfolgte der Einstich auf Höhe der linken Nebenniere. Im nächsten Schritt wurden die Mesenterialgefäße mit einer Ligatur versehen, wobei der Einstich von distal erfolgte. Um die Aorta abdominalis auf Höhe ihrer Bifurkation in die Arteriae femorales communes darzustellen, wurde das paraaortale Fettgewebe mit zwei stumpfen Pinzetten präpariert und das in die Tiefe gehende Gefäßbündel bestehend aus Aorta abdominalis und Vena cava inferior aufgesucht. Anschließend wurde das Gefäßbündel zusammen mit dem umgebenden Bindegewebe mit einer Irispinzette angehoben, eine Ligatur und distal davon eine Klemme gesetzt. Nach dem Freipräpieren der Aorta vom umgebenden Bindegewebe wurde die proximale Ligatur der Aorta abdominalis unterhalb des Diaphragmas zugezogen. Nun konnte die Aorta zwischen dem Abgang der linken Arteria renalis und der Bifurkation mit einer Strabismus-Federschere (gebogen, 11,5 cm, Martin) horizontal inzidiert werden. Dann wurde die Aorta mit einem Polyethylenschlauch (Außendurchmesser 0,61 mm, Innendurchmesser 0,28 mm, neoLab, Heidelberg) kanüliert und mit Hilfe der vorgelegten Ligatur erfolgte die Fixierung des Schlauches innerhalb der Aorta. Danach wurde über einen Perfusor (Harvard Pump 11 Plus Dual Syringe, Harvard Apparatus, MA, USA) mit einer Laufrate von 2 ml/min PBS infundiert, bis sich die Nieren vollständig entfärbten (Blutleere). Kurze Zeit später wurden die Mesenterialgefäße mit der vorgelegten Ligatur abgebunden. Um den Blutabfluss aus der perfundierten Niere zu ermöglichen, wurde die Nierenvene mit der Federschere inzidiert. Im letzten Schritt der Organentnahme wurde die Fascia renalis mit zwei feinen Irispinzetten abpräpariert und beide Nieren am jeweiligen Nierenhilus mit der Federschere abgesetzt. Die Nieren wurden dann in eine mit Eis gekühlte Petrischale gelegt und sowohl der obere als auch der untere Nierenpol wurden mit einem Skalpell entfernt. Das restliche Nierengewebe wurde dann in vier Scheiben für die RNA-, Protein-, FACS-Analyse und Histologie

aufgeteilt. Die Scheibe für die RNA-Analyse wurde in acht kleine Stücke geschnitten, die sowohl Kortex als auch Medulla enthielten und in einem mit 100 µl RNA-Later (Qiagen, Venlo, Niederlande) gefüllten 0,5 ml Eppendorf Gefäß bei -20 ° C für eine Nacht konserviert. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben zur weiteren Konservierung bei -80 ° C eingefroren. Die Scheibe für die Proteinanalyse wurde geviertelt und in einem mit 100 µl Allprotect Tissue (Qiagen) gefüllten 0,5 ml Eppendorf Gefäß für eine Nacht bei -20 ° C und dann bei -80 ° C konserviert. Die Scheibe für die Histologie wurde in toto in eine Histo-Kassette gelegt und dann in einer mit 10 %-igem Formalin gefüllten Flasche für eine Nacht aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die Weiterverarbeitung des Gewebes (s. Abschnitt Entwässerungsreihe). Die letzte Scheibe für die FACS-Analyse wurde ebenfalls in toto in ein 0,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, dann in einem mit CO₂ gefüllten Behälter schockgefroren und bei -80 ° C konserviert. Um eine Kontamination der RNA Proben mit RNAsen zu vermeiden, wurden die Werkzeuge mit RNase AWAY (ThermoFischer Scientific, Waltham, USA) gereinigt. Alle beschriebenen Operationsschritte erfolgten unter einem Olympus SD 30 Mikroskop.

Paraaortale Lymphknoten wurden im Bereich des Abgangs der A. renalis freipräpariert und das paraaortale Fett entfernt. Für die weitere Aufbereitung der RNA-Analyse wurde wie mit den Nierenschnitten verfahren. Die Milz wurde in toto entfernt und für die FACS-Analyse weiterverarbeitet.

2.7 RNA-Isolierung aus der Niere und Lymphknoten

Zur RNA-Isolierung wurde ein gebrauchsfertiges Kit (RNeasy-Plus-Mini-Kit; Qiagen, Venlo, Niederlande) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Menge und Qualität der gewonnenen RNA wurde mit dem Nanodrop 2000 (ThermoFischerScientific). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.8 Reverse Transkription

Im nächsten Schritt wurde die RNA mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen Cat No./ID: 220211) gemäß den Angaben des Kit-Protokolls in cDNA umgeschrieben.

2.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Selektion und Amplifizierung der zuvor mittels reverser Transkriptase hergestellten cDNA wurde die Polymerasekettenreaktion genutzt. Die PCR-Reaktionsansätze setzten sich aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

2 µl 10-fach Puffer (Quiagen), 0,4 µl dNTP, je 0,1 µl Primer (vorwärts und rückwärts), 0,12 µl Hot

Star Taq (Qiagen), 16,78 µl HPLC-Wasser, 0,5 µl Probe (cDNA). Die PCR wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen unter Verwendung eines Thermocyclers (Eppendorf) nach dem folgenden Programm durchgeführt:

- 1.) 95°C Pause
- 2.) 15 min 95°C Initialdenaturierung 1 Zyklus
- 3.) 30 sec 95°C Denaturierung
- 4.) 30 sec 58°C Annealing
- 5.) 30 sec 72°C Elongation (Schritte 2-4 werden für 35 Zyklen wiederholt)
- 6.) 5 min 72°C Extension 1 Zyklus
- 7.) 4 min Pause

Die komplette Dauer einer PCR beträgt 1h und 40 min.

2.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mit dem Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Hierzu wurden 1,5 % Agarosegele aus 4,5 g Agarose und 300 ml 1xTAE-Puffer (40 mM Tris-acetat, 1mM EDTA) hergestellt. Die Agarose wurde nach dem Erhitzen mit 12 Tropfen Ethidiumbromid versetzt, um eine spätere Bildgebung zu ermöglichen. Schließlich erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 90 V in 1x TAE als Laufpuffer. Die Bildgebung wurde mit einem Imaging System (Alpha Innotech GmbH, Kasendorf, BRD) bei UV-Belichtung durchgeführt.

2.11 Quantitative Real-Time-PCR (qPCR)

Die Real-Time-PCR ist ein Verfahren zur Quantifizierung von cDNA und wurde mit dem 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, USA) entsprechend des TaqMan Gene Expression Assay Protocol durchgeführt. Zuvor wird ein Mastermix bestehend aus 10 µl TaqMan Mix, 8 µl RNasefreiem H₂O und 1 µl des jeweiligen Primers angesetzt. Dieser Mastermix wurde dann in einem doppelten Ansatz in 96-Well Platten (semi skirted, StarLab, Hamburg, BRD) pipettiert. Anschließend wurde 1 µl cDNA der jeweiligen Probe in jedes Well hinzu pipettiert. Die cDNA lag dabei in einer 1:3 Verdünnung mit RNasefreiem H₂O vor. Als Housekeeping Gene wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mitgeführt. Das Ergebnis wird am Ende als mittlerer Zyklusschwellenwert angegeben (CT-Wert). Zur mRNA Quantifizierung wurde die relative Quantifizierung verwendet, bei der die Expression der zu untersuchenden

Gene mit der eines nicht regulierten housekeeping genes normalisiert wird. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder Startkonzentrationen bestimmt, sondern die Expression des untersuchten Gens wird auf ein konstitutiv exprimiertes Gen bezogen. Im Folgenden wurde dafür das housekeeping gene GAPDH als Referenzpunkt verwendet. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die delta CT-Methode und wird im Folgenden als Mittelwert $\pm$ Standardfehler angegeben. Für die graphische Darstellung der qPCR Ergebnisse wurde sowohl von den delta CT Behandlungsproben als auch von den delta CT Kontrollproben der delta CT Kontrollgruppenmittelwert subtrahiert und aus den entstandenen Werten jeweils ein Mittelwert für die Behandlungs- und die Kontrollgruppe generiert. Aus der Formel $2^{\Delta\text{CT}}$ ergab sich dann für die Kontrollgruppe der Referenzwert 1 und für die Behandlungsgruppe die relativ vermehrte oder verminderte Expression der jeweiligen gemessenen mRNA.

TaqMan Primer

RANTES Mm01302427_m1

MCP-1 Mm0041242_m1

IL-1 β Mm00434228_m1

NF κ B Mm01297400_m1

IL-17a Mm00439619_m1

TNF α SS03391316_g1

IL-6 Mm00446190_m1

PDGFR1 Mm00440677_m1

PAI-1 Mm00435860_m1

TGF β Mm01178820_m1

Col1a1 Mm00801666_g1

2.12 Proteinanalyse

2.12.1 Proteinisolierung

Die asservierten Nierengewebsstücke wurden aus dem Allprotect Tissue (Qiagen) entnommen und in Eppendorfgefäße mit 500 μ l kaltem PBS überführt. Anschließend wurden die Proben aus dem PBS entnommen und nach Abtupfen der PBS-Reste in mit jeweils 150 μ l Lysispuffer gefüllte Homogenisierungsröhrchen überführt. Die genannten Arbeitsschritte wurden alle im Eiswasserbad durchgeführt. Der (Triton-)Lysispuffer bestand aus den folgenden Komponenten:

50 mM TrisHCL, pH 7,4

150 mM NaCl

1 mM EDTA

2% SDS

1% Triton

Complete Mini, 1 Tablette pro 10 ml (Protease Inhibitor Cocktail Tablette, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz)

Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte unter Verwendung des Tissue Ruptors (Qiagen) im Eiswasserbad. Es folgte eine 30-minütige Inkubationsphase des Homogenisats auf Eis. Danach wurden die Lysate in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 15 Minuten bei maximaler Rotationsgeschwindigkeit und 4 ° C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µl in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß abpipettiert, mit 100 µl 2-fach Laemmli-Puffer versetzt, 5 Minuten bei 95° C erhitzt und bei -80° C eingefroren. Weiterhin wurden 5 µl für die Proteinbestimmung entnommen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 30 µl destilliertem Wasser versetzt. Der Restüberstand wurde zusätzlich bei -80° C asserviert.

2.12.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe eines Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Herstellervorgaben durchgeführt.

2.12.3 Herstellung der Trenn- und Sammelgele

Für die Elektrophorese wurden Polyacrylamid-Gele mit Hilfe des Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) aus den folgenden Komponenten hergestellt:

Trenngel

Puffer A (pH 8,8) bestehend aus:

90 ml Tris HCL 2M

285 ml Tris Base 2M

10 ml SDS 20%

115 ml Wasser

Rotiphorese Gel 30 (Verhältnis 37,5:1, Roth)

Wasser

10% APS

TEMED (#2367, Roth)

Sammelgel

Puffer B (pH 6,9) bestehend aus:

121 ml Tris HCL 2M

4 ml Tris Base 2M
10 ml SDS 20%
365 ml Wasser
Rotiphorese Gel 30 (Verhältnis 37,5:1, Roth)
Wasser
10% APS
TEMED (#2367, Roth)

2.12.4 Elektrophorese und Western Blot für Collagen1a1 (Col1a1)

Für die Gelelektrophorese wurden 7%-ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Jede Tasche wurde mit 30 µg Protein geladen. Für das Trenngel wurde eine Stromstärke von 15 mA für 1,5 Stunden und für das Sammelgel eine Spannung von 70 V für 30 Minuten angelegt. Der Western Blot wurde in einer Mini-PROTEAN Tetra Vertical Elektrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) bei 200 mA und 2 Stunden und 45 Minuten Laufzeit durchgeführt.

Für die Färbung wurde die geblottete Membran über Nacht in einer 5%-igen Magermilchpulver-Waschpuffer-Lösung geblockt. Am Folgetag wurde die Membran zusammen mit dem ersten Antikörper anti-Kollagen-1 (Collagen Type 1 *Antibody, anti mouse*, Catalog No. 203002, *mdbioproducts*) in einer Konzentration von 1:15000 und einer 1%-igen Magermilchpulver-Waschpuffer-Lösung über Nacht bei 4° C inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal je 5 Minuten mit Proteinwaschpuffer gewaschen und mit dem zweiten Antikörper anti-Kaninchen in einer Konzentration von 1:10000 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Auch hiernach wurde drei Mal je 5 Minuten mit Proteinwaschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Membran unter Zugabe von superECL (Promega, Fitchburg, WI, USA) entwickelt und mittels Imager Fotos nach 1, 2 und 5 Minuten angefertigt. Im gleichen Zug wurde auch ein Auflichtbild für ein späteres Overlay aufgenommen.

Die Nachfärbung für eine Referenz erfolgte mit β-Actin. Hierfür wurde die Membran mit einem anti-β-Actin Antikörper (Sigma-Aldrich) in einer Konzentration von 1:7500 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend drei Mal je 5 Minuten mit Proteinwaschpuffer gewaschen. Als zweiter Antikörper wurde ein anti-Maus Antikörper in einer Konzentration von 1:10000 verwendet, in diesem Schritt wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem wie oben erläuterten Waschprozess mit Proteinwaschpuffer erfolgten auch hier die Bildentwicklung und Aufnahmen nach 30 Sekunden und 1 Minute.

2.13 Histologie

2.13.1 Entwässerungsreihe

Die Entwässerung des Gewebes erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe nach dem folgenden Protokoll:

- 1 h 70% Ethanol
- 1 h 80 % Ethanol
- 1 h 96 Ethanol
- 100 % Ethanol über Nacht
- 1 h 100 % Ethanol
- 2x 1 h Xylol
- 2x 1 h Paraffin bei 60 °C

2.13.2 Paraffinblockanfertigung

Im Anschluss an die Entwässerungsreihe wurde das Gewebe auf einer 65 °C warmen Gießstation in Einbettungsformen positioniert und mit Paraffin aufgefüllt. Nach der Aushärtung auf einer Kälteplatte bei 4 °C wurde der Paraffinblock aus der Form entnommen und bei Raumtemperatur gelagert. Dann wurden die Paraffinblöcke mit einem Mikrotom (Jung Histoslide 2000, Leica) in 1 µm dicke Schnitte geschnitten, in ein Wasserbad gegeben und dann mit einem Objekträger (Thermo Scientific, Braunschweig, BRD) aufgenommen. Im letzten Schritt wurden die Schnitte im Inkubator bei 37 °C über Nacht getrocknet.

2.13.3 Entparaffinierung

Der im Folgenden beschriebene Ablauf der Entparaffinierung ist bis 8.) für die histologischen Färbungen CD3 und F4/80 idem:

- 5 min Xylol
- 5 min Xylol
- 3 min 100 % Ethanol
- 3 min 100 % Ethanol
- 3 min 96 % Ethanol
- 3 min 80 % Ethanol
- 3 min 70 % Ethanol
- 3 min PBS
- 3 min PBS

Für die F4/80 Färbung erfolgt die Entparaffinierung der Histologieschnitte ab 8.) in einem eigenen Waschpuffer (Dako) für 2x 3 min anstatt in PBS.

2.13.4 Immunhistochemie

2.13.4.1 CD3

Der *cluster of differentiation* (CD) 3 Proteinkomplex befindet sich auf der Zelloberfläche von T-Lymphozyten und aktiviert u.a. zusammen mit dem T-Zellrezeptor (TCR) die T-Lymphozyten. Bei dieser Färbung kommt es zu einer Braunfärbung der Zellmembranen von CD3+ T-Lymphozyten. Zur Quantifizierung der CD3+ T-Lymphozyten wurden pro entnommenem Gewebestück zehn *High-Power-Fields* in 400-facher Vergrößerung abfotografiert, die allesamt den Nierenkortex mit jeweils einem assoziierten Glomerulum enthielten. Die braungefärbten Zellen wurden dann mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA) manuell gezählt und der Mittelwert aus 10 High-Power-Fields gebildet. Aus den Mittelwerten der einzelnen Histologieschnittserien wurde jeweils ein Mittelwert für die LIF-Behandlungsgruppe und ein Mittelwert für die Kontrollgruppe errechnet und gegenübergestellt.

Im ersten Schritt erfolgte die Antigendemaskierung mit der Target Retrieval Solution pH 9 Puffer (Dako Nr. S2367), um die Immunreaktivität des in formalinfixierten und in paraffineingebetteten Gewebes wiederherzustellen. Zusätzlich wurden die Schnitte für 20 min in ein 98 °C heißes Wasserbad gestellt, anschließend für 30 min im Puffer bei Raumtemperatur gelagert und dann für 2x 5 min in PBS überführt. An diesen Schritt schloss sich die Avidin-Biotin Blockierung (Dako Nr. X0590) mit jeweils 15 min Biotin Inkubation und 15 min Avidin Inkubation bei Raumtemperatur an, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Danach wurden die Peroxidase sowie die alkalische Phosphatase mit dem Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent (Dako Nr. S2003) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und somit inhibiert. Im Weiteren erfolgte eine Protein Blockierung mit dem Protein Block Serum-Free (Dako Nr. X0929) für 25 min bei Raumtemperatur, wodurch eine unspezifische Hintergrundfärbung weiter reduziert wurde. Hiernach erfolgte nur ein Abkippen des übrig gebliebenen Flüssigkeitsfilms. Auf diesen Schritt folgte die primäre Antikörper-Inkubation mit einer gebrauchsfertigen Anti-CD3 Antikörperlösung (Dako Nr. N158059) für 1 h bei Raumtemperatur, gefolgt von der sekundären AK-Inkubation mit einem *biotinylated goat anti-rabbit IgG* (Vectastain Elite ABC Kit #PK-6101) in einer 1:200 Verdünnung (in einem AK Puffer) für 30 min bei Raumtemperatur. Als nächstes wurde das VECTASTAIN Elite ABC-Reagenz (Vectastain Elite ABC Kit #PK-6101) als Konjugat zur Signalverstärkung hinzu pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Zwischen diesen Schritten erfolgte

eine Spülung der Schnitte mit PBS. Für die Entwicklung wurde das ImmPACT NovaRED Peroxidase (HRP) Substrate (Vector # SK-4805) benutzt und nach vierminütiger Inkubation wurden die Schnitte mit 350 µl Aqua dest gespült. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte für 45 sec mit der Hämalaunlösung nach Mayer behandelt und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Nach ausreichendem Trocknen wurden die Schnitte mit Roti Mount (#HP68.1) permanent eingedeckelt.

2.13.4.2 F4/80

F4/80 ist ein 160 kD schweres Glycoprotein, das auf der Zelloberfläche von Mäusemakrophagen exprimiert wird. Auch bei dieser Färbung kommt es zu einer Braunfärbung der Zellmembran von F4/80 Makrophagen und die Auswertung erfolgte entsprechend der Auswertung der CD3 Färbung.

Im ersten Schritt erfolgte die Vorbehandlung der histologischen Schnitte mit Proteinase K (gebrauchsfertig, Dako S3020) für 3 min bei Raumtemperatur, um einen proteolytischen Verdau des in formalinfixierten und in paraffineingebetteten Gewebes zu erzielen. Nach der 3-minütigen Inkubation wurde die Schnitte mit 300 µl Waschpuffer gespült. Im zweiten Schritt wurden die Schnitte mit dem Dako Peroxidase Blocking Reagent (Dako Nr. SM801) für 10 Minuten inkubiert und anschließend mit Waschpuffer gespült, damit die Enzyme Peroxidase und Pseudoperoxidase nicht mit der Färbung des Zielantigens interferieren. An diesen Schritt schloss sich die Avidin-Biotin Blockierung (Dako Nr. X0590) mit jeweils 15 min Biotin Inkubation und 15 min Avidin Inkubation bei Raumtemperatur an, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren. Des Weiteren erfolgte eine Protein Blockierung mit dem Protein Block Serum-Free (Dako Nr. X0929) für eine Stunde bei Raumtemperatur, wodurch eine unspezifische Hintergrundfärbung weiter reduziert wurde. Hiernach erfolgte nur ein Abkippen des übrig gebliebenen Flüssigkeitsfilms. Auf diesen Schritt folgte die primäre Antikörper (AK) Inkubation mit dem F4/80 AK (Abcam Nr. ab6640, Klon C1:A3-1) über Nacht bei 4 °C, gefolgt von der sekundären AK Inkubation mit einem Ziege IgG anti-Ratte IgG (H+L)-Biotin (Dianova Nr. 112-065-003) in einer 1:1000 Verdünnung (in einem AK Puffer) für 30 min bei Raumtemperatur. Als nächstes wurde Streptavidin Horseradish Peroxidase (HRP)(Dianova Nr. 016-030-084)) als Konjugat zur Signalverstärkung hinzu pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Für die Entwicklung wurde 1 Tropfen DAB aus dem Envision-Kit (Nr. DM827) mit 1 ml Substrapuffer (Nr. SM803) gemischt und nach 3,5-minütiger Inkubation wurden die Schnitte mit 350 µl Aqua Dest gespült. Für die Gegenfärbung wurden die Schnitte für 30 sec mit der Hämalaunlösung

nach Mayer behandelt und anschließend unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten gebläut. Nach ausreichendem Trocknen wurden die Schnitte mit Glyceringelatine (Dako Nr. C0563) eingedeckelt.

2.13.4.3 Sirius Red

Die Sirius Red Färbung wurde mit Hilfe des Picro-Sirius Red Stain Kits (ScyTek, Logan, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt, um die Kollagenablagerungen im Nierengewebe zu visualisieren und quantifizieren. In der Lichtmikroskopie stellen sich die Kollagenfibrillen rot, Muskelfibrillen und Zytoplasma gelb dar. Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie kann man zusätzlich zwischen Collagenfibrillen Typ I und Typ III unterscheiden. Die dicken Typ I Collagenfibrillen kommen dann in gelb-oranger und die dünnen Typ III Kollagenfibrillen in grüner Doppelbrechung zur Darstellung. Hierbei repräsentieren die rot gefärbten Kollagenfibrillen die fibrotischen Areale in der Niere. Insgesamt wurden pro entnommenem Gewebestück zehn High-Power-Fields in 400-facher Vergrößerung abfotografiert, die allesamt Nierenmark und -kortex enthielten. Im Anschluss daran wurden die rot gefärbten Fibrosebereiche mit dem Computerprogramm ImageJ (ImageJ., Wayne RasbandUSA) als prozentualer Anteil des gesamten Gewebeausschnitts angegeben und der Mittelwert aus jeweils 10 High-Power-Fields bestimmt. Im letzten Schritt wurde aus den Mittelwerten der einzelnen Histologieschnitte der Behandlungs- und Kontrollgruppe jeweils ein Mittelwert berechnet und gegenübergestellt. Die perivaskuläre Fibrosierung größerer Gefäße (Arteriolen und aufwärts) wurde nicht berücksichtigt.

2.14 Luminex-Analyse

Zur genaueren Quantifizierung der pro- und antiinflammatorischen Zytokinplasmaspiegel wurde ein Luminexverfahren für 23 Zytokine mit Hilfe eines KITS der Firma Bio-Rad nach Herstellerangaben durchgeführt (Bio-Plex Pro Mouse Cytokine 23.plex Assay #M60009RDPD). Folgende Zytokine wurden analysiert:

Eotaxin

G-CSF

GM-CSF

IFN- γ

IL-1 α

IL-1 β

IL-2

IL-3

IL-4
IL-5
IL-6
IL-9
IL-10
IL-12 (p40)
IL-12(p70)
IL-13
IL-17a
KC
MCP-1
MIP-1 α
MIP-1 β
RANTES
TNF- α

2.15 Statistik

Die Anzahl der Experimente pro Gruppe ist mit n angegeben. Zur statistischen Auswertung wurde das Computerprogramm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA) genutzt. Für jede Gruppe wurde ein arithmetischer Mittelwert mit dem jeweiligen Standardfehler ($\pm$ Standard Error of Mean; SEM) berechnet. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde entsprechend der Hypothese der Student's t-Test als unpaired one tailed t-test angewandt. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ galten als signifikant. Die Anzahl der Experimente steht für die Anzahl der einzelnen Nieren.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalyse

3.1.1 qPCR

Um zu untersuchen, ob LIF die durch das UUO Modell verursachte tubulointerstitielle Inflammation und Fibrose beeinflusst, wurde die Expression von spezifischen fibrotischen und inflammatorischen Markern auf messenger RNA (mRNA) Ebene mittels qPCR am Tag 10 untersucht. Hierfür wurden sowohl aus der Behandlungsgruppe (UUO+LIF) als auch aus der Kontrollgruppe (UUO) Gewebestücke aus den obstruierten Nieren

gewonnen, lysiert und aufbereitet. Im Folgenden werden nur die Versuchsergebnisse der Tiere dargestellt, deren Organe am zehnten postoperativen Tag entnommen worden sind. Es wurde die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL 17a, IL1b, MCP1, RANTES, NFkappaB, TNF α , IL-6 untersucht. Dabei zeigte sich in der Behandlungsgruppe ein signifikant erniedrigter Expressionsunterschied für NFkappaB (UUO: 8.7 ± 0.1 n=8 vs. UUO+LIF: 9.1 ± 0.2 n=7, $P=0.0340$) und RANTES (UUO: 4.7 ± 0.4 n=8 vs. UUO+LIF: 6.0 ± 0.5 n=7, $P=0.0296$). Für IL-17a (UUO: 12.0 ± 0.6 n=7 vs. UUO+LIF: 13.8 ± 1.3 n=7, $P=0.1131$), IL-1b (UUO: 7.0 ± 0.4 n=8 vs. UUO+LIF: 7.3 ± 0.7 n=7, $P=0.3611$), MCP-1 (UUO: 2.4 ± 0.2 n=8 vs. UUO+LIF: 2.4 ± 0.4 n=7, $P=0.4872$), IL-6 (UUO: 6.0 ± 0.6 n=8 vs. UUO+LIF: 6.6 ± 1.1 n=7, $P=0.3372$) und TNF α (UUO: 5.9 ± 0.5 n=8 vs. UUO+LIF: 5.6 ± 0.5 n=7, $P=0.3150$) ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe (Abb. 3).

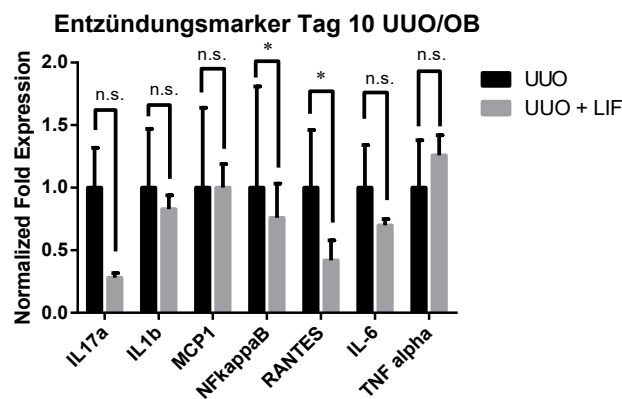


Abb. 3: **qPCR Entzündungsmarker aus obstruiertem Nierengewebe(OB) Tag 10 UUO vs. UUO+LIF:** Für NfkappaB und RANTES zeigte sich ein signifikant erniedrigter Expressionsunterschied in der Behandlungsgruppe (UUO+LIF) (* $P<0.05$; mean $\pm$ SEM). Für IL-17a, IL-1b, MCP1 und TNF α ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe ($P=n.s.$).

Zusätzlich wurde der Einfluss von LIF auf die systemische Entzündungsreaktion untersucht, indem aus der Behandlungs und Kontrollgruppe paraaortale Lymphknoten entnommen und für diese ebenfalls die mRNA Expression der oben aufgeführten Entzündungsmarker quantifiziert wurde. Hier zeigte sich für MCP-1 (UUO: 7.8 ± 0.2 n=5 vs. UUO+LIF: 8.7 ± 0.3 n=6, $P=0.0169$), NFkappaB (UUO: 6.8 ± 0.2 n=5 vs. +LIF: 7.4 ± 0.2 n=6, $P=0.0262$), RANTES (UUO: 0.8 ± 0.3 n=5 vs. UUO+LIF 1.9 ± 0.2 n=6, $P=0.0060$) und TNF α (UUO: 6.1 ± 0.3 n=5 vs. UUO+LIF: 6.9 ± 0.2 n=6, $P=0.0224$) eine signifikant geringere Genexpression der mRNA in der LIF-Behandlungsgruppe. Für IL-1b (UUO: 7.7 ± 0.2 n=5 vs. UUO+LIF: 8.2 ± 0.3 n=6, $P=0.1022$) und IL-6 (UUO: 11.6 ± 0.2 n=5 vs. UUO+LIF: 11.9 ± 0.2 n=6, $P=0.1219$) gab es zwar einen Unterschied zwischen der Behandlungs- und

der Kontrollgruppe zugunsten der Behandlungsgruppe, jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied (Abb. 4).

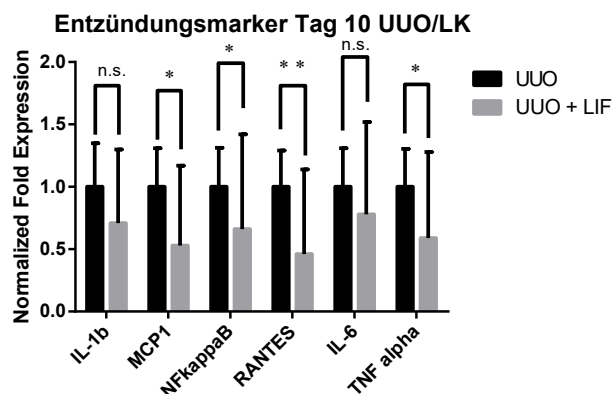


Abb. 4: **qPCR Entzündungsmarker aus paraaortalen Lymphknoten Tag 10 UUO vs. UUO+LIF:** Für MCP1, NFkappaB und TNF α zeigte sich eine signifikant geringere Genexpression der mRNA in der Behandlungsgruppe (*P<0.05, **P<0.01; mean $\pm$ SEM). Für IL-1b und IL-6 gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe (P=n.s.).

Der tubulointerstitielle Schaden und die Entzündungsreaktion führen zur Entwicklung einer interstitiellen Fibrose. Um die interstitielle Fibrose darzustellen, wurde die mRNA Genexpression der Fibrosemarker Col1a1, PAI-1, TGF- β und PDGFR bestimmt. Innerhalb der Behandlungsgruppe war die mRNA Genexpression für die Fibrosemarker Col1a1 (UUO: -1.7 ± 0.2 n=8 vs. -UUO+LIF: 0.6 ± 0.6 n=7, P=0.0422) und TGF- β (UUO: 2.9 ± 0.2 n=8 vs. UUO+LIF: 3.7 ± 0.4 n=7, P=0.0394) im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Für PAI-1 (UUO: 3.5 ± 0.4 n=8 vs. UUO+LIF 4.4 ± 0.5 n=7, P=0.0807) und PDGFR1 (UUO: 4.2 ± 0.2 n=8 vs. UUO+LIF: 4.3 ± 0.3 n=7, P=0.3645) bestand kein signifikanter Unterschied (Abb. 5).

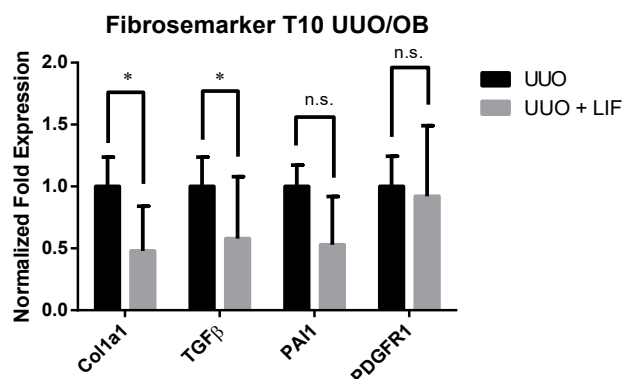


Abb. 5: **qPCR Fibrosemarker aus obstruiertem Nierengewebe (OB) Tag 10 UUO vs. UUO+LIF:** Die mRNA Genexpression für die Fibrosemarker Col1a1 und TGF- β war in der Behandlungsgruppe signifikant

erniedrigt im Vergleich mit der Kontrollgruppe (* $P < 0.05$; $\text{mean} \pm \text{SEM}$). Für PAI-1 und PDGFR1 bestand kein signifikanter Unterschied ($P = \text{n.s.}$).

3.2 Proteinanalyse für Collagen1a1 per Western Blot

Ergänzend wurde der Collagen 1 Gehalt im Gewebe am Tag 10 gemessen, der ein Hinweis für die Ausprägung der Fibrose ist. Hierfür wurde eine Western Blot Analyse für Col1a1 durchgeführt. Übereinstimmend mit dem Ergebnis der qPCR für Col1a1 fand sich auch in der Western Blot Analyse eine signifikante Reduktion von Col1a1 in der Behandlungsgruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe (UUO: 0.8 ± 0.1 $n=8$ vs. UUO+LIF 0.3 ± 0.1 $n=7$, $P=0.0077$) (Abb. 6).

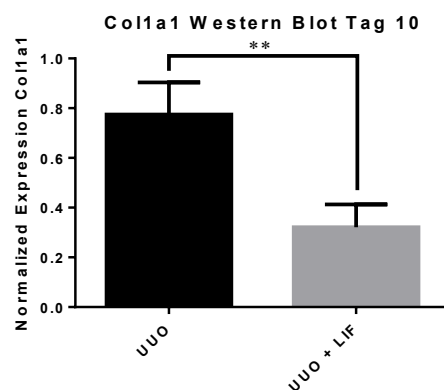


Abb. 6: Col1a1 Western Blot aus obstruiertem Nierengewebe Tag 10 UUO vs. UUO+LIF: Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion von Col1a1 in der Behandlungsgruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe (** $P < 0.01$; $\text{mean} \pm \text{SEM}$).

3.3 Immunhistologie

3.3.1 CD3+

Um den Einfluss von LIF auf die T-Lymphozyten Infiltration in das tubulointerstitielle Gewebe zu untersuchen, wurde eine CD3+ Färbung durchgeführt. Die Zahl der CD3+ Zellen war in der Behandlungsgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (UUO: 144 ± 6 $n=8$ vs. UUO+LIF: 115 ± 8 $n=7$, $P=0.0046$) (Abb. 7).

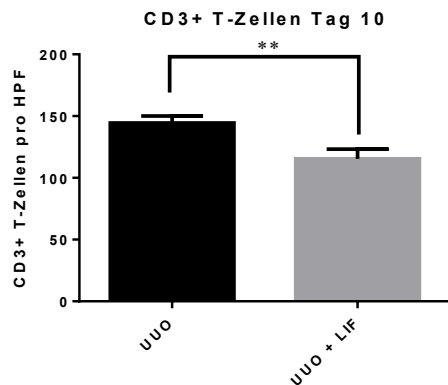


Abb. 7: **CD3+ T-Zellinfiltration in das Tubulointerstitium des obstruierten Nierengewebes Tag 10 UUO vs. UUO+LIF**: Die renale Infiltration von CD3+T-Zellen in das Tubulointerstitium des obstruierten Nierengewebes wurde durch die LIF Behandlung signifikant abgeschwächt (* $P < 0.05$; mean $\pm$ SEM).

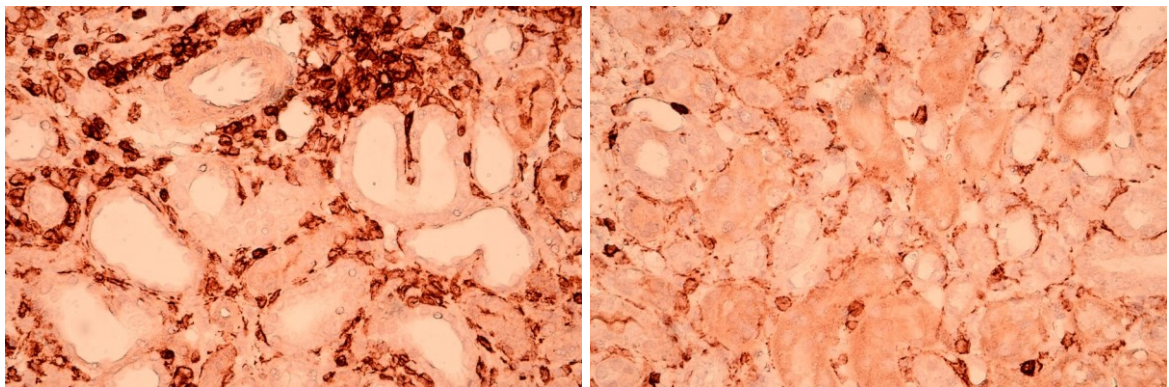


Abb. 8: **CD3+ T-Zellinfiltration in das Tubulointerstitium des obstruierten Nierengewebes Tag 10 UUO vs. UUO+LIF**, 40xfache Vergrößerung.

3.3.2 F4/80

Mit Hilfe der F4/80 Färbung untersuchten wir den Einfluss von LIF auf die Makrophagen Infiltration in das tubulointerstitielle Gewebe. Entsprechend der signifikanten Reduktion der CD3+ T-Lymphozyten Infiltration konnte auch hier eine signifikante Reduktion der Ansammlung von F4/80 Makrophagen im Nierenkortex gesehen werden (UUO: 45 ± 4 n=6 vs. UUO+LIF: 22 ± 4 n=7, $P = 0.0013$) (Abb. 9).

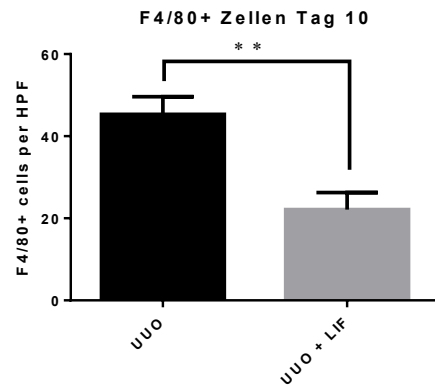


Abb. 9: **F4/80+Makrophageninfiltration in das Tubulointerstitium des obstruierten Nierengewebes Tag 10 UUO vs. UUO+LIF:** Die Akkumulation der F4/80+Makrophagen in das Tubulointerstitium des obstruierten Nierengewebes war signifikant reduziert durch die LIF-Behandlung (**P<0.01; mean±SEM).

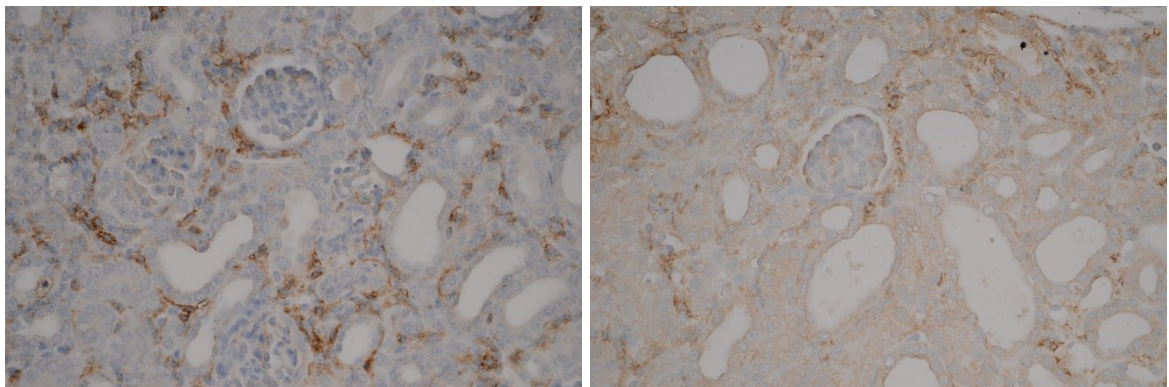


Abb. 10: **F4/80+Makrophageninfiltration in das Tubulointerstitium des obstruierten Nierengewebes Tag 10 UUO vs. UUO+LIF,** 40fache Vergrößerung.

3.3.3 Sirius Red Färbung

Zur Quantifizierung des Fibroseausmaßes auf histologischer Ebene wurde eine Sirius Red Färbung für Collagen Fibrillen Typ I und III durchgeführt. Hier zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der tubulointerstitiellen Fibrose in der Behandlungsgruppe (UUO: 10.3 ± 2.4 n=7 vs. UUO+LIF: 5.1 ± 1.2 n=7, P=0.0380) (Abb. 11.)

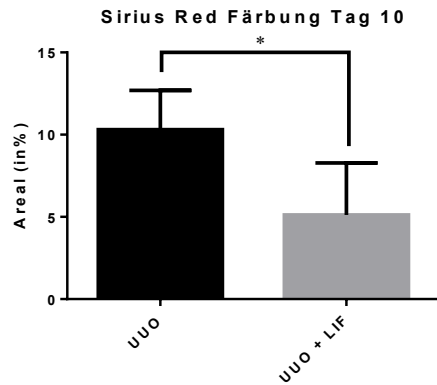


Abb. 11: **Sirius Red Färbung des obstruierten Nierengewebes Tag 10 UUO vs. UUO+LIF:** Die LIF-Behandlung schwächte die tubulointerstitielle Fibrose im obstruierten Nierengewebe signifikant ab (* $P < 0.05$; mean $\pm$ SEM).

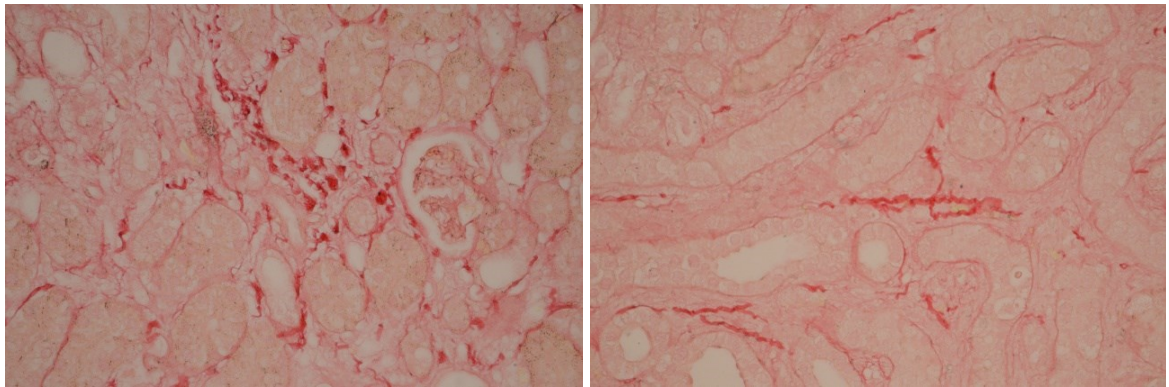


Abb. 12: **Sirius Red Färbung des obstruierten Nierengewebes Tag 10 UUO vs. UUO+LIF, 40xfache Vergrößerung.**

3.4 Luminex-Analyse

Um den Einfluss des UUO-Schädigungsmodells auf das Inflammationsgeschehen näher zu untersuchen und einen möglichen Phänotypenwechsel der Immunzellen zu charakterisieren, wurden mit Hilfe des Luminex-Verfahren die Plasmaspiegel von 5 Zytokinen in der Wildtyp-, der Behandlungs- und der Kontrollgruppe an Tag 10 gemessen. Hier zeigte sich, dass LIF in der Behandlungsgruppe einen signifikanten Effekt auf die Hochregulierung von antiinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-10 (IL-10) und Interleukin-13 (IL-13) erzielt, verglichen mit der Kontrollgruppe ($P = 0.0007$ und $P = 0.0031$) (Abb. 13 und Abb. 14). Im Vergleich mit der Wildtypgruppe war der IL-10 Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe nicht signifikant höher ($P = 0.0532$). Dahingegen war der IL-13 Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe signifikant höher als in der Wildtypgruppe ($P = 0.0179$). Der Plasmaspiegel für IL-10 war in der Wildtypgruppe geringfügig höher als in der Kontrollgruppe ($P = 0.0600$). Für IL-13 war der Plasmaspiegel in der Wildtypgruppe

signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($P=0.0008$). Zudem kam es zu einer Downregulation von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($P=0.3296$ und $P=0.4320$). Zwischen der Behandlungs- und Wildtypgruppe gab es für IL-6 und G-CSF keinen signifikanten Unterschied ($P=0.0701$ und $P=0.0759$). Innerhalb der Kontrollgruppe waren die Plasmaspiegel für IL-6 und G-CSF signifikant höher als in der Wildtypgruppe ($P=0.0078$ und $P=0.0110$) (Abb. 15 und Abb. 16). Für GM-CSF zeigte sich eine nicht signifikante Hochregulierung in der Behandlungsgruppe, verglichen mit der Wildtyp- ($P=0.2462$) und Kontrollgruppe ($P=0.2370$). Zwischen der Kontroll- und Wildtypgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied ($P=0.4284$) (Abb. 17).

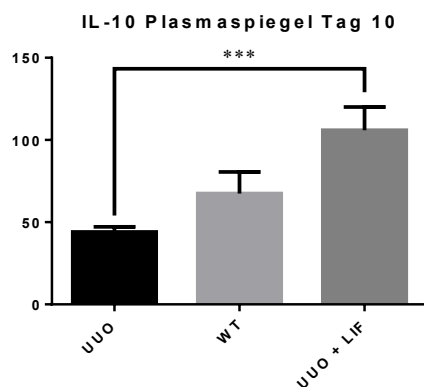


Abb. 13: **IL-10 Plasmaspiegel Tag 10 UUO vs. WT vs. UUO+LIF**: Die LIF Behandlung führte zu einem signifikanten Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in der Behandlungsgruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe ($***P<0.001$). Im Vergleich mit der Wildtypgruppe war der IL-10 Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe nicht signifikant höher. Der IL-10 Plasmaspiegel in der Wildtypgruppe war nicht signifikant höher als in der Kontrollgruppe.

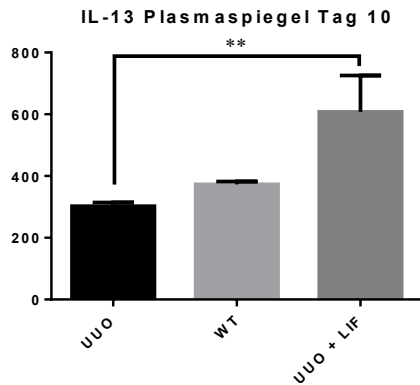


Abb. 14: **IL-13 Plasmaspiegel Tag 10 UUO vs. WT vs. UUO+LIF**: Für das antiinflammatorische Zytokin IL-13 konnte ebenfalls ein signifikanter Anstieg in der Behandlungsgruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe verzeichnet werden (** $P < 0.01$). Der IL-13 Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe war auch signifikant höher als in der Wildtypgruppe (* $P < 0.05$); mean $\pm$ SEM). Die IL-13 Plasmaspiegel in der Wildtypgruppe waren signifikant höher als in der Kontrollgruppe (*** $P < 0.001$).

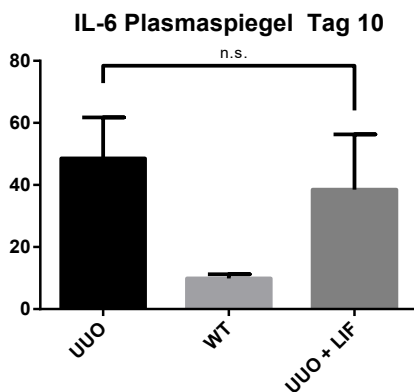


Abb. 15: **IL-6 Plasmaspiegel Tag 10 UUO vs. WT vs. UUO+LIF**: Die LIF Behandlung führte zu einer nicht signifikanten Herunterregulierung des proinflammatorischen Zytokins IL-6 in der Behandlungsgruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe ($P = \text{n.s.}$). Zwischen der Behandlungs- und Wildtypgruppe gab es für IL-6 keinen signifikanten Unterschied. Innerhalb der Kontrollgruppe waren die Plasmaspiegel für IL-6 signifikant höher als in der Wildtypgruppe (** $P < 0.01$).

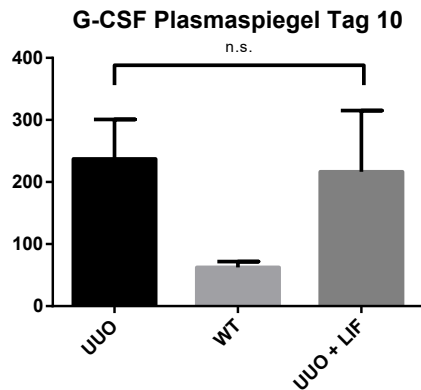


Abb. 16: **G-CSF Plasmaspiegel Tag 10 UUO vs. WT vs. UUO+LIF**: Die LIF Behandlung erzielte eine nicht signifikante Herunterregulierung des proinflammatorischen G-CSF in der Behandlungsgruppe, verglichen mit der Kontrollgruppe ($P=n.s.$). Zwischen der Behandlungs- und Wildtypgruppe gab es für G-CSF keinen signifikanten Unterschied. Innerhalb der Kontrollgruppe waren die Plasmaspiegel für G-CSF signifikant höher als in der Wildtypgruppe ($*P<0.05$).

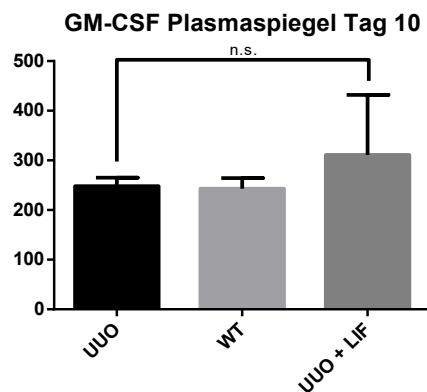


Abb. 17: **GM-CSF Plasmaspiegel Tag 10 UUO vs. WT vs. UUO+LIF**: Die GM-CSF Plasmaspiegel waren in der Behandlungsgruppe nicht signifikant höher als in der Wildtyp- und Kontrollgruppe ($P=n.s.$). Zwischen der Kontroll- und der Wildtypgruppe gab es keinen signifikanten Unterschied.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte für das UUO-Modell erstmalig gezeigt werden, dass:

1. LIF die Genexpression proinflammatorischer und profibrotischer Zytokine im Nierengewebe signifikant abschwächt.
2. Die CD3+ und F4/80+ Zellinfiltration des Nierengewebes in der Behandlungsgruppe signifikant geringer ausfällt als in der Kontrollgruppe.
3. Die Behandlungsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe einen geringeren Grad an Fibrose des Nierengewebes aufweist.

4. LIF zu einem signifikanten Anstieg von antinflammatorischen Zytokinen und einer signifikanten systemischen Erniedrigung von proinflammatorischen Zytokinen im Plasma der Versuchstiere führt.

Basierend auf dem Wissen, dass LIF zelluläre Regenerationsprozesse beeinflusst und die Differenzierung von IL17 produzierenden TH17-Zellen in unterschiedlichen Organsystemen inhibiert, wurde von unserer Arbeitsgruppe der Effekt einer LIF-Therapie auf die renale Inflammation und die Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose im UUO-Modell untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die LIF-Behandlung die tubulointerstitielle Fibrose im UUO-Modell signifikant abschwächt, indem sie proinflammatorische Zytokine supprimiert und die Gewebeeinfiltration durch Entzündungszellen inhibiert.

4.1 Der Einfluss von LIF auf die Genexpression proinflammatorischer Zytokine im UUO-Modell

Auf mRNA Ebene ist LIF in der Lage, die Genexpression proinflammatorischer Zytokine abzuschwächen. Die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine NFkappaB und RANTES war sowohl in den obstruierten Nierengeweben als auch in den paraaortalen Lymphknoten in der Behandlungsgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. RANTES rekrutiert T-Lymphozyten und Makrophagen zum Ort der Inflammation [94]. Peng et al. konnten in ihrer Arbeit darlegen, dass IL-17A im UUO-Modell zur Pathogenese der renalen Fibrose beiträgt, indem es mit Hilfe des Chemokins RANTES die Makrophageninfiltration ins Interstitium ermöglicht. Sowohl der Einsatz eines Anti-RANTES-Antikörpers als auch der Knockout von IL-17A in C57BL/6J Mäusen schwächte die Entstehung der renalen Fibrose ab [95]. Aus diesem Grund könnte ein erniedrigter RANTES Spiegel im UUO-Modell einen unmittelbar niedrigeren Fibrosegrad zur Folge haben. Dieser Mechanismus könnte auch die Reduktion der renalen Fibrose durch LIF in unserem UUO-Modell erklären. Im Gegensatz zu dem Therapieansatz von Peng et al., gezielt ein proinflammatorisches Zytokin mit einem passenden Antikörper zu neutralisieren, kann LIF über den Einfluss auf mehrere proinflammatorische Signalwege die Einwanderung von Entzündungszellen in das Interstitium verhindern. Ein Kritikpunkt der Arbeit von Peng et al. besteht in der Anwendung des IL-17A Knockout Modells im Zusammenhang mit dem UUO-Modell. So existieren innerhalb der Fibrose-Signalwege molekulare Gegenspieler, die der Entstehung der tubulointerstitiellen Fibrose entgegenwirken. Die Deletion eines potentiell schädlichen Gens kann zwar in dem betrachteten renalen Kompartiment einen protektiven Effekt erzielen, jedoch bleiben die

Auswirkungen dieses Gennockouts auf die anderen renalen Kompartimente unklar [17]. Auch ist nicht gesichert, ob ein Genknockout denselben Effekt zu verschiedenen Zeitpunkten besitzt. Um diese Limitierung zu minimieren, wurden von der Arbeitsgruppe von Peng et al. frühe und späte Beobachtungszeitpunkte gewählt. In unserer Arbeit war neben RANTES auch das proinflammatorische Zytokin NFkappaB auf mRNA Ebene herunterreguliert. Genauso wie IL-17A ist auch NFkappaB durch Hochregulierung der chemotaktischen Zytokine MCP-1, RANTES und *makrophage inflammatory protein-α* (MIP-1α) fähig, die Infiltration von Entzündungszellen in das Interstitium zu vermitteln [96]. Mittlerweile ist aber für den NFkappa-Signalweg bekannt, dass er sowohl pro-als auch antiinflammatorische Effekte induzieren kann. Gotot et al. erzielten mit dem Einsatz eines NFkappaB-Inhibitors in ihren Experimenten zur *crescentic glomerulonephritis* (cGN) zwei gegenläufige Effekte. In prophylaktischer Dosierung führte der *Inhibitor of NFκB Kinase subunit 2* (IKK2) zu einer reduzierten Aktivierung von dendritischen Zellen und T-Zellen. Auf diesem Wege kam es zu einem mildereren Krankheitsverlauf im cGN Modell. Die therapeutische Dosis führte zu einem Verlust von Tregs, der den Krankheitsverlauf im cGN Modell aggravierte [97]. Tregs benötigen neben ihrem Schlüsseltranskriptionsfaktor Foxp3 auch Komponenten des NFkappaB Signalweges wie z.B. IKK2 für ihre Entwicklung im Thymus [98, 99]. Eine Beeinflussung des NFkappaB Signalweges könnte somit auch zu weniger Tregs oder zu einer unzureichenden Tregs Immunantwort führen. Während der Entwicklung der tubulointerstitiellen Fibrose kommt es neben RANTES und NFkappaB ebenfalls zu einer stetigen Zunahme der tubulointerstitiellen Expression von MCP-1. Dieser Anstieg korreliert mit der gleichzeitigen Ansammlung von Makrophagen und T-Lymphozyten im tubulointerstitiellen Gewebe, welche die passenden Rezeptoren CCR2 und CCR5 exprimieren [94]. In der vorliegenden Arbeit kam es in den obstruierten Nierengeweben auch zu einer gesteigerten MCP-1 mRNA-Genexpression an Tag 10. Es gab jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der mit LIF behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe. Allerdings zeigte sich im Vergleich mit der Kontrollgruppe bei der Behandlungsgruppe in den paraaortalen Lymphknoten eine signifikant niedrigere mRNA-Genexpression von MCP-1. Hieraus lässt sich ein systemischer Effekt von LIF auf die Inflammation ableiten.. Zudem wurde die mRNA-Genexpression von TNFalpha in den Real-Time-PCR Lysaten aus den Nierengeweben und den paraaortalen Lymphknoten untersucht. Die Real-Time-PCR Lysate aus den Nierengeweben zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu war die mRNA-Genexpression von TNFalpha in den Real-Time-PCR Lysaten der paraaortalen Lymphknoten in der LIF Behandlungsgruppe signifikant erniedrigt, verglichen mit der Kontrollgruppe. Da TNFalpha die Apoptose und die Migration von

Makrophagen fördert, wirken sich niedrige TNFalpha-Spiegel potentiell protektiv aus. Im cGN-Modell führt die Neutralisation von TNFalpha, z.B. durch ein Antiserum, zu einem geringeren glomerulären Schaden in Form von glomerulärer Nekrose und Fibrinablagerungen, sowie zu einer geringeren Albuminurie [100]. Tang et al. untersuchten den Effekt von LIF auf das Anti-GBM-Modell bei Ratten. Die Behandlung mit LIF führte in ihrem Anti-GBM-Modell zu einer geringeren Genexpression der TNFalpha mRNA und gleichzeitig zu einer geringeren Infiltration von Monozyten und Makrophagen in das Glomerulum. Im Gegensatz zu dieser Arbeit untersuchten Tang et al. die Rolle von LIF nicht im tubulointerstitiellen Gewebe, sondern in einem anderen renalen Kompartiment, dem Glomerulum. Außerdem führten sie ihre Experimente an Ratten durch und applizierten LIF kontinuierlich über intraperitoneale Minipumpen [101].

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ergab sich in der Behandlungsgruppe für die proinflammatorischen Zytokine IL-17a, IL-6 und IL-1b sowohl in Lysaten aus Nierengewebe, als auch in Lysaten aus paraaortalen Lymphknoten, nur eine tendenziell niedrigere Genexpression auf mRNA Ebene. Immunzellen, wie z.B. T-Zellen, können durch Produktion von IFN- γ oder TNFalpha M1 Makrophagen zur Ausschüttung von IL-1 β und IL-6 aktivieren. Auch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) und Immunkomplexe haben dieselben Auswirkungen [102]. In der Folge schädigen diese beiden Zytokine, IL-1 β und IL-6, mittels ihrer jeweiligen Rezeptoren das renale Gewebe und führen zu der renalen Fibrose [103]. Da die LIF Behandlung die mRNA Expression von TNFalpha tendenziell reduziert, könnte es zu einer reduzierten mRNA Expression der Effektorzytokine IL-1 β und IL-6 kommen. Dies wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt und belegt den antiinflammatorischen sowie antifibrotischen Effekt von LIF im UUO-Modell.

4.2 Der Einfluss von LIF auf die tubulointerstitielle Fibrose

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass LIF im UUO-Modell nicht nur zu einer Reduktion von Inflammation, sondern auch zu einer Abnahme der tubulointerstitiellen Fibrose führt. In der Real-Time-PCR wurden für die vier untersuchten Fibrosemarker PAI-1, Col1a1, TGF β und PDGFR1 in der LIF Behandlungsgruppe niedrigere mRNA-Level gemessen als in der Kontrollgruppe. Allerdings waren nur die Ergebnisse für Col1a1 und TGF β signifikant. Zur weiteren Bestätigung dieses Ergebnisses wurde eine Western Blot Analyse für Col1a1 durchgeführt. Auch auf der Proteinebene zeigte sich eine signifikant

niedrigere Expression von Col1a1 in der LIF Behandlungsgruppe. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass LIF die Genexpression von Col1a1 abschwächt. Dies führt zu einer geringeren Ausprägung der tubulointerstitiellen Fibrose.

Schon 2010 gelang einer anderen Arbeitsgruppe der Nachweis, dass LIF die TGFβ1-induzierte Aktivierung von renalen, interstitiellen Fibroblasten sowie die Expression von *alpha smooth muscle actin* (α-SMA) und Collagen 1 hemmt. Jedoch handelte es sich dabei um in vitro Experimente mit interstitiellen Fibroblasten (NRK/49F) und analoge in-vivo Experimente wurden von dieser Arbeitsgruppe bislang nicht publiziert [104]. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit der Beweis erbracht werden, dass LIF auch in einem in-vivo Modell der CKD in der Lage ist, die Expression von profibrotischen Markern signifikant zu unterdrücken. In den in-vivo Experimenten von Matsumoto et al. zeigte sich hingegen kein supprimierender Effekt von LIF auf die TGFβ1-induzierte Collagensynthese. Als Tierschädigungsmodell wurde ebenfalls das UUO-Modell verwendet. In dem UUO-Modell von Matsumoto et al. wurde zunächst ein Extrakt aus endothelialen Progenitorzellen subkapsulär injiziert. Die subkapsuläre Injektion des Progenitorzellextraktes fand am Tag 0 statt. Die Organentnahme wurde an Tag 14 durchgeführt. Die subkapsuläre Injektion des Progenitorzellextraktes in das Nierengewebe führte im UUO-Modell zu einer geringeren Akkumulation von Makrophagen im Interstitium, sowie zu einer Abnahme der α-SMA-positiven Myofibroblasten. Folglich kam es zu einer Reduktion der Fibrose. Aufgrund dieses Ergebnisses bestimmten sie mit Hilfe einer Luminex Analyse die Konzentrationen der von den Progenitorzellen produzierten Zytokine und identifizierten LIF und den *vascular endothelial growth factor* (VEGF) als Hauptbestandteile des Progenitorzellextraktes. Anstelle des Progenitorzellextraktes injizierten sie LIF in das subkapsuläre Nierengewebe. Genauso wie in den vorausgegangenen Experimenten war auch LIF fähig, die TGFβ-induzierte Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten zu verhindern und eine Dichtezunahme der peritubulären Kapillaren zu bewirken. Allerdings blieb der Fibroseggrad unbeeinflusst. Im zeitlichen Verlauf kam es zu einer Abnahme des protektiven Effekts auf die Myofibroblastenentstehung [105]. Als Ursache für den nicht darstellbaren antifibrotischen Effekt von LIF kommt die Methodik in Betracht. Erstens ist nicht sicher auszuschließen, dass durch die subkapsuläre Applikation von LIF ein Hämatom entstanden ist. Ein Hämatom könnte zu einer eingeschränkten Resorption bzw. Ausbreitung von LIF im Gewebe geführt haben. Zweitens erfolgte die subkapsuläre Injektion von LIF lediglich zu einem Zeitpunkt. Eine tägliche Injektion, wie in der vorliegenden Arbeit, erhöht zwangsläufig die LIF Plasmalevel und erreicht somit auf diese Weise eher die Effektivdosis. Drittens erfolgte die subkapsuläre Injektion nur in den unteren Nierenpol, sodass sich an diesem Ort die höchste LIF-Dosis befunden haben muss. Zudem wurden

die Histologieschnitte nur in fünf Gesichtsfeldern auf kollagenhaltiges Material untersucht [105]. Interessant bleibt weiterhin die Frage, ob LIF eine tubulointerstitielle Fibrose auch rückgängig machen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Frage beantwortet, ob LIF die Entstehung von Fibrose verhindert. Ob man mit Hilfe von LIF die tubulointerstitielle Fibrose auch rückgängig machen kann, muss in weiteren Experimenten näher untersucht werden. Dass LIF potentiell solch einen Effekt erzielen kann, wurde in einer Arbeit zum Thema Herzinfarkt gezeigt. So gelang Zou et al. der Nachweis, dass LIF nach einem Myokardinfarkt einerseits Neovaskularisation im Ischämiegebiet induziert und andererseits eine Einwanderung von Knochenmarkszellen in das Myokard mit Differenzierung zu Kardiomyozyten bewirkt. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe kam es in der LIF Behandlungsgruppe zu einer abgeschwächten myokardialen Fibrose und einem schwächer ausgeprägten linksventrikulärem Remodeling [106].

Zur visuellen Darstellung und Quantifizierung der renalen Fibrose wurde in der vorliegenden Arbeit die Picro-Sirius Red Färbung verwendet. In der LIF Behandlungsgruppe wurde eine signifikant geringere Ablagerung von Collagen Typ I und III Fibrillen gemessen als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Ergebnissen aus der Real-Time-PCR und Western Blot Analyse zur Expression von Collagen und unterstreicht abschließend den antifibrotischen Effekt von LIF in der vorliegenden Arbeit. Eine Differenzierung zwischen den Collagenfibrillen Typ I und Typ III ist nur mit Hilfe einer polarisationsmikroskopischen Untersuchung möglich. Für die Beantwortung der Fragestellung dieser Arbeit war eine lichtmikroskopische Untersuchung ausreichend, da eine Differenzierung zwischen den Collagentypen nicht erforderlich war. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass LIF über eine Reduktion der renalen Inflammation den Endpunkt der tubulointerstitiellen Fibrose im UUO-Modell abschwächt.

4.3 Der Einfluss von LIF auf das Zytokinpanel der Luminex-Analysen

Mit dieser Arbeit konnte die Hypothese bestätigt werden, dass LIF die Zytokinexpression beeinflusst. Um diese Hypothese näher zu belegen, wurden mit Hilfe einer Luminex Analyse mehrere pro- und antiinflammatorische Zytokinkonzentrationen im Plasma der Versuchstiere gemessen. Diese Untersuchung ergab signifikant höhere IL-10 Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe als in der Kontroll- und der Wildtypgruppe. IL-10 ist ein immunsuppressives Zytokin und wird hauptsächlich von Tregs produziert [107]. Die erhöhten IL-10 Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe sprechen für eine größere Anzahl von Tregs im Plasma dieser Versuchstiere und somit für einen

immunmodulatorischen Effekt von LIF. Die Hauptaufgabe von IL-10 besteht in der Regulierung der angeborenen und erworbenen Immunantwort, um Gewebeschäden im Organismus zu verhindern. Des Weiteren supprimiert IL-10 inflammatorische Prozesse, indem es z.B. die Aktivierung des inflammatorischen TGF β 1- oder NF κ B-Signalweges und die Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF α , IL-1 und MCP-1 inhibiert [108-110]. Die ersten Arbeiten, die eine protektive Rolle von IL-10 in der Entstehung der Organfibrose untersuchten, stammen aus den Gebieten der Gastroenterologie und Pneumologie. In einem Modell zur Leberzirrhose konnte IL-10 über eine erniedrigte mRNA Genexpression von TGF β 1 und Fibronectin und eine Modulation von Metalloproteinasen einen signifikant niedrigeren Fibrosegrad bewirken [111]. Ähnliche Ergebnisse für die Auswirkungen von IL-10 auf den Fibrosegrad konnten in einem Modell zur Bleomycin-induzierten Lungenfibrose und zur Pankreasfibrose erbracht werden [112, 113]. Weiterhin ist bekannt, dass IL-10 vaskulärprotektive Effekte erzielt und hypertensive Endorganschäden, wie beispielsweise die renale Dysfunktion, positiv beeinflusst [114]. Die aussagekräftigste Studie zu protektiven Effekten von IL-10 in der Niere wurde von Jin et al. durchgeführt. Sie untersuchten die Rolle von IL-10 im UUO-Modell anhand eines Knockouts von IL-10 in C57BL/6 Mäusen und kamen zu dem Ergebnis, dass die IL-10 Defizienz die renale Inflammation und Fibrose im UUO-Modell aggraviert. Verglichen mit den Kontrolltieren waren die IL-10 defizienten Mäusen durch eine Hochregulierung von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. RANTES oder MCP-1 und eine erhöhte CD3 und F4/80 Zellinfiltration gekennzeichnet. Profibrotische Gene wie z.B. Fibronectin oder α -SMA waren in den IL-10 defizienten Mäusen ebenfalls stärker exprimiert als in den Kontrolltieren. Gleiches galt für den Tubulusschaden und die Kollagenablagerung im tubulointerstitiellen Gewebe. In ihren Experimenten wiesen sie eine signifikant verstärkte Aktivierung der proinflammatorischen TGF β /Smad und NF κ B-Signalwege nach [108]. Für CKD-Modelle wie die 5/6 Nephrektomie oder der Adriamycin-induzierten Nephropathie wurde schon früher gezeigt, dass IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin renale Gewebeschädigung supprimiert und die Immunantwort in Richtung Tregs verschiebt [115, 116]. Diese Arbeiten untermauern die Aussage der vorliegenden Arbeit: LIF schwächt die Entstehung von Fibrose im UUO-Modell ab, indem es die Phänotypausprägung von Immunzellen ändert und eine Verschiebung des Verhältnisses von pro- zu antiinflammatorischen Zytokinen zugunsten der antiinflammatorischen Zytokine bewirkt. Passend zu dem Phänotypenwechsel von TH-Effektorzellen zu Tregs fand sich in der immunhistochemischen Untersuchung des Nierengeweebes in der Behandlungsgruppe eine signifikant geringere CD3+ Zellinfiltration, verglichen mit der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis unterstreicht erneut den antiinflammatorischen Effekt von LIF im UUO-Modell. Die geringere CD3+ Zellinfiltration

führt zu einer geringeren inflammatorischen Antwort im tubulointerstitiellen Gewebe und in der Folge zu einer abgeschwächten renalen Fibrose. Ein Nachteil der CD3+ Färbung besteht darin, dass sie alle T-Zellen färbt und keine Unterteilung der T-Zellen in Subpopulationen vornehmen kann. Es konnte nicht differenziert werden, welche T-Zell-Subpopulation den größten Anteil an der T-Zellinfiltration in unserem UUO-Modell hatte. Abgesehen von IL-10 war auch der Plasmaspiegel des antiinflammatorischen Zytokins IL-13 in der Behandlungsgruppe signifikant höher als in der Kontroll- und Wildtypgruppe. IL-13 spielt als TH2-Effektorzytokin u.a. eine wichtige Rolle für die Makrophagendifferenzierung in der Niere [93]. Vermittelt durch verschiedene Zytokine wie MCP-1 oder MIP-1 kommt es in der erkrankten Niere zunächst zu einer Einwanderung von Monozyten [102, 117]. In Abhängigkeit des lokalen Zytokinmilieus differenzieren die Monozyten zu proinflammatorischen M1 oder antiinflammatorischen M2 Makrophagen [118]. Während die TH1-Zytokine IFN- γ oder TNF α die M1 Entwicklung fördern, kommt es unter dem Einfluss der TH2-Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 zur M2 Entwicklung [93]. Die signifikant höheren IL-10 und IL-13 Spiegel in der Behandlungsgruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe, unterstreichen erneut einen protektiven Effekt von LIF im UUO-Modell. Die Behandlung mit LIF verstärkt die Differenzierung von Monozyten zu antiinflammatorischen M2 Makrophagen. Die M2 Makrophagen können weiterhin in drei Subtypen unterteilt werden: M2a, M2b und M2c [119]. M2 Makrophagen sind hauptverantwortlich für die Reparation der Gewebeschädigung im IRI- und im UUO-Modell. Für das IRI-Modell konnte weiterhin gezeigt werden, dass es im Krankheitsverlauf zu einem Phänotypenswitch von M1 zu M2 Makrophagen kommt [120]. Ihren antiinflammatorischen Effekt erzielen die M2 Makrophagen hauptsächlich durch die Phagozytose von Zelldetritus und die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 [121]. Des Weiteren produzieren sie Wachstumsfaktoren wie TGF β oder PDGFR1, um den Wundheilungsprozess zu induzieren [93]. Die erhöhten IL-10 Spiegel in der Behandlungsgruppe können dementsprechend auch Ausdruck einer erhöhten Anzahl von M2 Makrophagen sein. Darüber hinaus können M2 Makrophagen die Produktion von Tregs induzieren und auf diese Weise zusätzlich immunsuppressiv wirken [122]. Für den Fall einer überschießenden Inflammation und insuffizienten Wundheilung, können M2 Makrophagen durch die Produktion von TGF β oder Collagen die Entstehung einer Fibrose begünstigen [18, 121]. Unter dem Einfluss von TGF β kommt es dann beispielsweise zu der epithelial-mesenchymalen-Transdifferenzierung [123]. Pilling et al. beschrieben in ihrer Arbeit, dass sich auch Monozyten zu α -SMA+ Myofibroblasten differenzieren und in der Folge Collagen produzieren können [124]. Damit sich M2 Makrophagen dieser Entwicklung unterziehen, ist ein profibrotisches Zytokinmilieu notwendig [102]. Da LIF in unseren Experimenten einen antifibrotischen Effekt erzielt hat, ist eine Entwicklung von

Monozyten oder M2 Makrophagen zu Collagen produzierenden Myofibroblasten unter dem Einfluss von LIF unwahrscheinlich. Zum sicheren Ausschluss einer Entwicklung von Makrophagen zu Myofibroblasten hätte eine zusätzliche Färbung des histologischen Gewebes für α -SMA erfolgen müssen.

Für GM-CSF und G-CSF ergaben sich auf den ersten Blick paradoxe Ergebnisse. Während der GM-CSF Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe höher als in der Kontrollgruppe war, war der G-CSF Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Sowohl für GM-CSF als auch für G-CSF wurden in der Kontrollgruppe höhere Plasmaspiegel gemessen, verglichen mit der Wildtypgruppe. Die aufgeführten Ergebnisse waren nicht signifikant. Huen et al. zeigten in ihrer Arbeit, dass die Induktion des IRI-Modells zu einer erhöhten GM-CSF Sekretion durch Tubulusepithelzellen führt. Über die Aktivierung von STAT5 durch GM-CSF entstand in ihren Experimenten eine Makrophagenzelllinie mit einem reparativen Phänotyp. Dies drückte sich durch eine erhöhte Proliferation der Tubulusepithelzellen aus und spricht für einen positiven Einfluss auf den Tubulusreparationsprozess. Die Anwendung eines GM-CSF neutralisierenden Antikörpers hob diesen protektiven Effekt auf [125]. Ein positiver Effekt von GM-CSF auf den Reparatursprozess nach renaler Schädigung lässt sich auch aus unseren Ergebnissen ableiten. So kann die LIF-induzierte Expression von GM-CSF zu einer geringeren Fibroseentstehung im UUO-Modell beigetragen haben. Die maximale GM-CSF Expression lässt sich laut Huen et al. am dritten Tag nach Induktion des Schädigungsmodells messen [125]. Eine frühere Messung des GM-CSF Plasmaspiegels mittels Luminex Analyse hätte vielleicht ein deutlicheres bzw. signifikantes Ergebnis erbracht.

Für G-CSF existiert bereits eine Arbeit im Zusammenhang mit dem UUO-Modell. Stokman et al. applizierten ihren Mäusen vor und nach der Induktion des UUO-Modells G-CSF, um den Effekt der Mobilisation von Knochenmarksstammzellen auf den Progress der renalen Fibrose zu untersuchen [126]. Dabei machten sie die Beobachtung, dass G-CSF die Migration von Knochenmarksstammzellen in Herzinfarktareale vermittelt, was sie zu weiteren Versuchen veranlasste. Vorort entwickelten sich die Knochenmarksstammzellen zu Kardiomyozyten, verbesserten die Funktion des infarzierten Herzens und senkten die Mortalitätsrate [127]. Diese Beobachtungen ließen sich jedoch nicht auf das UUO-Modell übertragen. Die Mobilisierung von Knochenmarksstammzellen beeinflusste weder die Makrophageninfiltration in das Interstitium noch die Kollagenablagerung im tubulointerstitiellen Gewebe. Zuvor wurde sichergestellt, dass die Knochenmarksstammzellen in die fibrotische Niere migrieren [126]. In der Literatur existieren weiterhin Hinweise, dass Knochenmarksstammzellen eine Quelle für Myofibroblasten sind. Diese spielen eine entscheidende Rolle für die Entstehung der

renalen Fibrose [128]. Dagegen spricht das Ergebnis von Stokman et al. zur α -SMA Färbung. Die absolute Zahl der α -SMA positiven Zellen nach UUO-Schädigung unterschied sich in den beiden Versuchsgruppen nicht. Demnach erzielte die Anwendung von G-CSF im UUO-Modell keinen profibrotischen Effekt [126]. Unter dem Einfluss von LIF kam es in unseren Experimenten zu einer signifikant niedrigeren Infiltration von F4/80+ Makrophagen in das Interstitium und somit zu einer geringeren renalen Schädigung. Die gemessenen Plasmaspiegel für GM-CSF und G-CSF scheinen dieses Resultat nicht negativ beeinflusst zu haben. Inwieweit der durch LIF erhöhte GM-CSF Plasmaspiegel zu der Entstehung von Makrophagen mit einem reparativen Phänotyp beigetragen hat, bleibt unklar. Will man diesem Mechanismus nachgehen, könnte eine F4/80+ STAT5 Doppelfärbung Aufschluss bringen.

Der Plasmaspiegel des proinflammatorischen Zytokins IL-6 war in der Behandlungsgruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. In Abhängigkeit seines Signalweges erzielt IL-6 gegenläufige Effekte. Über den klassischen Signalweg aktiviert es die membrangebundenen Rezeptoren gp130 und IL-6R α und erzielt einen antiinflammatorischen Effekt. So konnte zum Beispiel für das *nephrotoxic nephritis model* (NTN Modell) der akuten Glomerulonephritis gezeigt werden, dass die präemptive Behandlung der Versuchstiere mit einem anti-IL-6R oder anti-IL6 Antikörper den Krankheitsverlauf aggravierte. Die Induktion des NTN Modells in IL-6R Knockout-Mäusen hatte ebenfalls einen schwereren Krankheitsverlauf zur Folge [129]. Für renale Autoimmunerkrankungen scheint eine komplette IL-6-Blockade keinen protektiven Effekt zu haben. Bekanntermaßen spielen TH17 Zellen in der Pathogenese der akuten Glomerulonephritis eine entscheidende Rolle [21, 130]. Allerdings ist IL-6 nur für Initiierung der TH17-Zellen vonnöten und nicht für deren Expansion, sodass es auch unter einer IL6-Blockade zur TH17-Proliferation und folgender renaler Schädigung kommt. Des Weiteren ist eine Antikörper- bzw. Rezeptorblockade zumeist unvollständig und kleinste Mengen an residualem IL-6 reichen aus, um die TH17-Zellproliferation zu fördern [129]. Über einen zweiten, den alternativen Signalweg, erzielt IL-6 proinflammatorische Effekte. Hierbei bindet ein Komplex aus IL6 und dem löslichen IL-6R α (sIL-6R α) den ubiquitär vorkommenden gp130 [131]. Im Gegensatz dazu befindet sich der membrangebundene IL-6R α ausschließlich auf der Zelloberfläche von Hepatozyten und einigen Leukozyten [132]. Das Designer Protein sgp130Fc inhibiert spezifisch den alternativen IL-6 Aktivierungsweg und die Anwendung von sgp130Fc im NTN Modell führte zu keiner Aggravierung des Krankheitsverlaufes [129, 133]. Braun et al. konnten in ihrer Arbeit zum NTN Modell zeigen, dass die spezifische Inhibition des alternativen IL-6 Signalweges mit sgp130Fc in einen milderen Krankheitsverlauf resultierte. Die spezifische Aktivierung des alternativen IL-6 Signalweges mit einem rekombinanten Molekül namens Hyper-IL-6 (HIL-

6) führte wiederum zu einem schweren Krankheitsverlauf. Zeitgleich kam es zu einer Zunahme der IL-17 mRNA Expression und zu einer Abnahme von M2 Makrophagen und somit zu einem Überwiegen der proinflammatorischen Immunantwort. Über den klassischen Signalweg kann es zu einer Makrophagen Polarisierung von proinflammatorischen M1 in antiinflammatorische M2 Makrophagen kommen [131]. Ob die Inhibierung des proinflammatorischen alternativen Signalweges mit sgp130Fc automatisch zu einem Phänotypenswitch von M1 zu M2 Makrophagen führt bleibt ungewiss, da der Einfluss auf die Phänotypenausprägung in den Experimenten von der gewählten Mauslinie abhängig war. Des Weiteren gab es keinen statistischen Unterschied bezüglich der renalen Makrophagen und T-Zellinfiltration. Weder sgp130Fc noch HIL-6 beeinflussten die Zellinfiltration in das tubulointerstitielle Gewebe signifikant [131]. IL-6 beeinflusst nicht nur die M1/M2, sondern auch die TH17/Treg Balance. Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ROR γ t fördert IL-6 die Entwicklung der TH17-Zelllinie, während es zu einer Supprimierung der Foxp3 Tregs kommt. LIF hingegen ist in der Lage, den Transkriptionsfaktor Foxp3 zu aktivieren und somit die Entwicklung des Treg-Phänotyps zu induzieren [78, 134]. Sowohl auf mRNA Ebene als auch in der Messung der Luminex Analyse kam es in unserer Arbeit unter dem Einfluss von LIF zu einer erniedrigten IL-6 Expression. Dies ist ein weiterer Beleg für die Hypothese dieser Arbeit, dass LIF die Phänotypenausprägung von Immunzellen positiv beeinflusst und zu der Entwicklung von Tregs im Modell der unilateralen Ureterobstruktion beiträgt.

4.4 LIF als Therapeutikum – mögliche molekulare Wirkmechanismen

Trotz intensiver Forschung auf dem Feld der renalen Autoimmunerkrankungen sind die zugrundeliegenden Mechanismen in vielen Bereichen bisher nicht ausreichend verstanden. Folglich empfehlen die gängigen Therapiekonzepte die Anwendung von nicht zielgerichteten immunsuppressiven Medikamenten. Diese werden zum Teil hochdosiert verabreicht und haben deshalb ein nicht unerhebliches Spektrum an unerwünschten Nebenwirkungen. Die Anwendung von IL-6 Antikörpern in der Nephrologie ist bisher nicht weit verbreitet und beschränkt sich auf Erkrankungen wie die Lupusnephritis [135]. Auch existieren Fallberichte zu einer erfolgreichen Anwendung von IL-6 Antikörpern bei nekrotisierenden Glomerulonephritiden auf dem Boden von rheumatologischen Grunderkrankungen [136]. Ob die positiven Effekte der zielgerichteten IL-6 Antikörpertherapie Glomerulonephritis-spezifisch oder einfach nur Ausdruck einer positiven Beeinflussung der rheumatologischen Grunderkrankung sind, bleibt unklar [137]. Panzer et al. konnten im NTN Modell zeigen, dass TH17-Zellen eine zentrale Rolle für die

Pathogenese der renalen Autoimmunerkrankungen spielen [21]. Die Erforschung und das bessere Verständnis der TH17-Immunantwort könnte in Zukunft zu der Entdeckung einer zielgerichteten Anti-TH17-Zelltherapie führen. Als Mitglied der Interleukin 6 Familie erzielt LIF seine Effekte über seinen Rezeptor und das gp130 mit den sich anschließenden Signalwegen: JAK/STAT3, Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt und Ras/ERK. Unter diesen stellt JAK/STAT3 den Hauptsignalweg dar [71]. Steinmetz et al. konnten zeigen, dass die TH17-Immunantwort im NTN Modell von STAT3-abhängigen Treg17-Zellen kontrolliert wird. Ihren positiven Effekt konnten die Treg17-Zellen dadurch erzielen, dass sie den gleichen Oberflächenmarker CCR6 mit den TH17-Zellen teilen. Somit können sie an den Ort der TH17-Inflammation migrieren und die TH17-Immunantwort supprimieren. Allerdings konnten sie in ihrer Arbeit nicht die Frage beantworten, über welche Signaltransduktionskaskade es zur Induktion von STAT3 und zur Zellprogrammierung von Treg17-Zellen kam [64]. Da LIF den JAK/STAT3 Signalweg aktiviert und die Differenzierung der Treg17-Zellen STAT3 abhängig ist, könnte LIF in diesem Zusammenhang einen protektiven Effekt haben [67]. Ein denkbarer Mechanismus wäre, dass das antiinflammatorische Zytokin IL-10 die Entwicklung von CD4⁺ naiven T-Zellen zu Treg17-Zellen induziert. Chaudhry et al. konnten in ihrer Arbeit darlegen, dass Treg-Zellen in Abhängigkeit von IL-10 via *STAT3-signaling* die TH17-Immunantwort unterdrücken. Die Entfernung des IL-10 Rezeptors auf den Treg-Zellen führte zu einer dysregulierten und überschießenden TH17-Immunantwort. Allerdings führten sie ihre Experimente für die Colitis und nicht für renale Krankheitsmodelle durch. [138]. In der vorliegenden Arbeit bewirkte LIF einen signifikant höheren IL-10 Plasmaspiegel in der Behandlungsgruppe als in der Kontrollgruppe. Dies spricht für einen antiinflammatorischen Effekt von LIF auf die TH17-Immunantwort und spiegelt sich in der reduzierten Zellinfiltration in das tubulointerstitielle Gewebe sowie in der reduzierten tubulointerstitiellen Fibrose wider. Dass LIF den STAT3 Signalweg aktiviert und auf diese Weise Fibrose im UUO Modell reduziert, wird ebenfalls von der Arbeit von Yu et al. belegt, welche während der Entstehung der vorliegenden Arbeit publiziert wurde. In ihren Experimenten führte LIF zu einer Phosphorylierung bzw. Aktivierung von STAT3, welches die micro-RNA-29c hochregulierte. Micro-RNA-29c reguliert die Expression von Collagen 1 und 3 negativ, sodass es zu einer Abnahme von Collagenablagerungen kam. Eine Untersuchung der der Fibrose vorausgehenden Immunantwort fand jedoch nicht statt. [71]. In der vorliegenden Arbeit könnte LIF über erhöhte IL-13 Spiegel zu einer Induktion von M2 Makrophagen geführt haben, welche in der Folge IL-10 produzieren. Dieses IL-10 wiederum hat STAT3-abhängig zu einer Induktion von Treg-Zellen geführt und somit kam es zu einer reduzierten Immunantwort, die sich am Ende in einer reduzierten renalen Fibrose ausgedrückt hat. Von unserer Arbeitsgruppe wurden bereits in vitro

Untersuchungen durchgeführt, die zeigen, dass LIF STAT3 phosphoryliert bzw. aktiviert. In zukünftigen Arbeiten müsste eine nähere Untersuchung der Downstream-Signalwege erfolgen, um die genaue molekulare Wirkweise von LIF weiter zu entschlüsseln. Des Weiteren steht eine FACS Analyse von isolierten Leukozyten/Lymphozyten aus Milzgewebe aus, um den Einfluss von LIF auf die T-Zelldifferenzierung näher zu charakterisieren.

Der therapeutische Vorteil in der Anwendung von LIF besteht in der Möglichkeit, direkt im Organismus die Entwicklung von Tregs zu induzieren und somit ein Überwiegen der antiinflammatorischen Immunantwort zu erzielen. Dies würde einen Transfer von Tregs überflüssig machen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass LIF die Entstehung von Fibrose im UUO-Modell abschwächt, indem es die Phänotypausprägung von Immunzellen ändert und eine Verschiebung des Verhältnisses von pro- zu antiinflammatorischen Zytokinen zugunsten der antiinflammatorischen Zytokine bewirkt. LIF stellt somit eine potentielle, zukünftige Therapieoption dar.

5 Literaturverzeichnis

1. KDIGO CW, G., *KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease*. Kidney Int Suppl 2013, 2012. **3**: p. 1-150.
2. T.Mettang and U. Kuhlmann, *Chronische Niereninsuffizienz*, in *Nephrologie*, U. Kuhlmann, D. Walb, and F.C. Luft, Editors. 2003, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 306-307.
3. Herold, G., *Chronische Niereninsuffizienz und Urämie*, in *Innere Medizin*. 2015, Georg Herold Verlag: Köln. p. 638.
4. Herold, G., *IgA-Nephropathie (M.Berger)*, in *Innere Medizin*. 2015, Georg Herold Verlag: Köln. p. 606.
5. C.Machleidt and U. Kuhlmann, *Interstitielle Nephropathien*, in *Nephrologie*, U. Kuhlmann, et al., Editors. 2015, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 510-512 und 518-519.
6. Rosner, M., et al., *Geriatric nephrology: responding to a growing challenge*. Clin J Am Soc Nephrol, 2010. **5**(5): p. 936-42.
7. J.Hoyer, *Chronische Nierenerkrankung*, in *Nephrologie*, U. Kuhlmann, et al., Editors. 2015, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 384.
8. Bröcker, V., H. Kreipe, and H. Haller, *Tubulointerstitielle Fibrose*. Der Nephrologe, 2010. **5**(4): p. 284-292.
9. Bohle, A., et al., *Correlations between renal interstitium and level of serum creatinine. Morphometric investigations of biopsies in perimembranous glomerulonephritis*. Virchows Arch A Pathol Anat Histo, 1977. **373**(1): p. 15-22.
10. Bohle, A., S. Mackensen-Haen, and H. von Gise, *Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney: a morphometric contribution*. Am J Nephrol, 1987. **7**(6): p. 421-33.
11. Yu, F., et al., *Tubulointerstitial lesions of patients with lupus nephritis classified by the 2003 International Society of Nephrology and Renal Pathology Society system*. Kidney Int, 2010. **77**(9): p. 820-9.

12. C.Machleidt and U. Kuhlmann, *Interstitielle Nephropathien*, in *Nephrologie*, U. Kuhlmann, et al., Editors. 2015, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 519.
13. Lorenzen, J., T. Thum, and H. Haller, *EMT, EndMT, PMT – Mechanismen der interstitiellen Fibrose*. Der Nephrologe, 2010. **5**(4).
14. Iwano, M., et al., *Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis*. J Clin Invest, 2002. **110**(3): p. 341-50.
15. Zeisberg, E.M., et al., *Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(12): p. 2282-7.
16. Lin, S.L., et al., *Pericytes and perivascular fibroblasts are the primary source of collagen-producing cells in obstructive fibrosis of the kidney*. Am J Pathol, 2008. **173**(6): p. 1617-27.
17. Chevalier, R.L., M.S. Forbes, and B.A. Thornhill, *Ureteral obstruction as a model of renal interstitial fibrosis and obstructive nephropathy*. Kidney Int, 2009. **75**(11): p. 1145-52.
18. Meng, X.M., D.J. Nikolic-Paterson, and H.Y. Lan, *Inflammatory processes in renal fibrosis*. Nat Rev Nephrol, 2014. **10**(9): p. 493-503.
19. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
20. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in *Janeway Immunologie*. 2009, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Heidelberg. p. 444.
21. Turner, J.E., et al., *The Th17 immune response in renal inflammation*. Kidney Int, 2010. **77**(12): p. 1070-5.
22. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
23. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
24. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in *Janeway Immunologie*. 2009, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Heidelberg. p. 445.
25. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in *Janeway Immunologie*. 2009, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Heidelberg. p. 446.
26. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in *Janeway Immunität*. 2009, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Heidelberg. p. 443.
27. Palmer, M.T. and C.T. Weaver, *Autoimmunity: increasing suspects in the CD4+ T cell lineup*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 36-40.
28. Voo, K.S., et al., *Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4793-8.
29. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
30. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in *Janeway Immunologie*. 2009, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Heidelberg. p. 408.
31. Ling, Y. and A. Puel, *IL-17 and infections*. Actas Dermosifiliogr, 2014. **105 Suppl 1**: p. 34-40.
32. Oppmann, B., et al., *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
33. Leonard, J.P., K.E. Waldburger, and S.J. Goldman, *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against interleukin 12*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 381-6.

34. Matthys, P., et al., *Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice*. Eur J Immunol, 1998. **28**(7): p. 2143-51.
35. Ferber, I.A., et al., *Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 5-7.
36. Murphy, C.A., et al., *Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1951-7.
37. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
38. Lock, C., et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 500-8.
39. Hofstetter, H.H., et al., *Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis*. Cell Immunol, 2005. **237**(2): p. 123-30.
40. Mangan, P.R., et al., *Dual Inhibition of Interleukin-23 and Interleukin-17 Offers Superior Efficacy in Mouse Models of Autoimmunity*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **354**(2): p. 152-65.
41. Miossec, P., *Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(3): p. 594-601.
42. Wong, C.K., et al., *Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in autoimmunity*. Clin Immunol, 2008. **127**(3): p. 385-93.
43. Kwan, T., et al., *IL-17 deficiency attenuates allograft injury and prolongs survival in a murine model of fully MHC-mismatched renal allograft transplantation*. Am J Transplant, 2015. **15**(6): p. 1555-67.
44. Bowman, C., K. Ambrus, and C.M. Lockwood, *Restriction of human IgG subclass expression in the population of auto-antibodies to glomerular basement membrane*. Clin Exp Immunol, 1987. **69**(2): p. 341-9.
45. Kitching, A.R., et al., *Experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis: a protective role for IFN-gamma*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(7): p. 1764-74.
46. Ooi, J.D., et al., *IL-23, not IL-12, directs autoimmunity to the Goodpasture antigen*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(5): p. 980-9.
47. Paust, H.J., et al., *The IL-23/Th17 axis contributes to renal injury in experimental glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(5): p. 969-79.
48. Gan, P.Y., et al., *Th17 cells promote autoimmune anti-myeloperoxidase glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(6): p. 925-31.
49. Riedel, J.H., et al., *IL-17F Promotes Tissue Injury in Autoimmune Kidney Diseases*. J Am Soc Nephrol, 2016.
50. Turner, J.E., et al., *IL-17A production by renal gammadelta T cells promotes kidney injury in crescentic GN*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(9): p. 1486-95.
51. Rouvier, E., et al., *CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5445-56.
52. Yao, Z., et al., *Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells*. J Immunol, 1995. **155**(12): p. 5483-6.
53. Li, H., et al., *Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 773-8.
54. Starnes, T., et al., *Cutting edge: IL-17D, a novel member of the IL-17 family, stimulates cytokine production and inhibits hemopoiesis*. J Immunol, 2002. **169**(2): p. 642-6.
55. Lee, J., et al., *IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1*. J Biol Chem, 2001. **276**(2): p. 1660-4.

56. Hymowitz, S.G., et al., *IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding*. *Embo j*, 2001. **20**(19): p. 5332-41.
57. Yao, Z., et al., *Herpesvirus saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor*. *J Immunol*, 2011. **187**(9): p. 4392-402.
58. Gu, C., L. Wu, and X. Li, *IL-17 family: cytokines, receptors and signaling*. *Cytokine*, 2013. **64**(2): p. 477-85.
59. Toy, D., et al., *Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex*. *J Immunol*, 2006. **177**(1): p. 36-9.
60. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in *Janeway Immunologie*. 2009, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg: Heidelberg. p. 446-448.
61. Benoist, C. and D. Mathis, *Treg cells, life history, and diversity*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(9): p. a007021.
62. Fantini, M.C., et al., *Cutting Edge: TGF- Induces a Regulatory Phenotype in CD4+CD25- T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7*. *The Journal of Immunology*, 2004. **172**(9): p. 5149-5153.
63. Feuerer, M., et al., *Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(7): p. 689-95.
64. Kluger, M.A., et al., *Stat3 programs Th17-specific regulatory T cells to control GN*. *J Am Soc Nephrol*, 2014. **25**(6): p. 1291-302.
65. Koch, M.A., et al., *The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(6): p. 595-602.
66. Zheng, Y., et al., *Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses*. *Nature*, 2009. **458**(7236): p. 351-6.
67. Chaudhry, A., et al., *CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner*. *Science*, 2009. **326**(5955): p. 986-91.
68. Kluger, M.A., et al., *Treg17 cells are programmed by Stat3 to suppress Th17 responses in systemic lupus*. *Kidney Int*, 2015.
69. Turner, J.E., et al., *CCR6 recruits regulatory T cells and Th17 cells to the kidney in glomerulonephritis*. *J Am Soc Nephrol*, 2010. **21**(6): p. 974-85.
70. Kluger, M.A., et al., *RORgammat+Foxp3+ Cells are an Independent Bifunctional Regulatory T Cell Lineage and Mediate Crescentic GN*. *J Am Soc Nephrol*, 2015.
71. Yu, Y., et al., *Leukemia inhibitory factor attenuates renal fibrosis through Stat3-miR-29c*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015. **309**(7): p. F595-603.
72. Gearing, D.P., et al., *Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF)*. *Embo j*, 1987. **6**(13): p. 3995-4002.
73. Nicola, N.A. and J.J. Babon, *Leukemia inhibitory factor (LIF)*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015. **26**(5): p. 533-44.
74. Skiniotis, G., et al., *Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex*. *Mol Cell*, 2008. **31**(5): p. 737-48.
75. Gouin, F., et al., *Presence of leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF-receptor chain (gp190) in osteoclast-like cells cultured from human giant cell tumour of bone. Ultrastructural distribution*. *Cytokine*, 1999. **11**(4): p. 282-9.
76. Stahl, N., et al., *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components*. *Science*, 1994. **263**(5143): p. 92-5.
77. Oh, H., et al., *Activation of phosphatidylinositol 3-kinase through glycoprotein 130 induces protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation in cardiac myocytes*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(16): p. 9703-10.
78. Gao, W., et al., *Treg versus Th17 lymphocyte lineages are cross-regulated by LIF versus IL-6*. *Cell Cycle*, 2014. **8**(9): p. 1444-1450.
79. Weber, M.A., et al., *Endogenous leukemia inhibitory factor attenuates endotoxin response*. *Lab Invest*, 2005. **85**(2): p. 276-84.

80. Curtis, R., et al., *Retrograde axonal transport of LIF is increased by peripheral nerve injury: correlation with increased LIF expression in distal nerve*. Neuron, 1994. **12**(1): p. 191-204.
81. Bauer, S. and P.H. Patterson, *Leukemia inhibitory factor promotes neural stem cell self-renewal in the adult brain*. J Neurosci, 2006. **26**(46): p. 12089-99.
82. Mayer, M., K. Bhakoo, and M. Noble, *Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro*. Development, 1994. **120**(1): p. 143-53.
83. Deverman, B.E. and P.H. Patterson, *Exogenous leukemia inhibitory factor stimulates oligodendrocyte progenitor cell proliferation and enhances hippocampal remyelination*. J Neurosci, 2012. **32**(6): p. 2100-9.
84. Barnard, W., et al., *Leukemia inhibitory factor (LIF) infusion stimulates skeletal muscle regeneration after injury: injured muscle expresses lif mRNA*. J Neurol Sci, 1994. **123**(1-2): p. 108-13.
85. Reardon, K.A., et al., *Increased levels of leukemia inhibitory factor mRNA in muscular dystrophy and human muscle trauma*. Muscle Nerve, 2000. **23**(6): p. 962-6.
86. Imgrund, M., et al., *Re-expression of the developmental gene Pax-2 during experimental acute tubular necrosis in mice 1*. Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1423-31.
87. Terada, Y., et al., *Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(5): p. 1223-33.
88. Yoshino, J., et al., *Leukemia inhibitory factor is involved in tubular regeneration after experimental acute renal failure*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(12): p. 3090-101.
89. Cao, W., et al., *Leukemia inhibitory factor inhibits T helper 17 cell differentiation and confers treatment effects of neural progenitor cell therapy in autoimmune disease*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 273-84.
90. Chen, Z., et al., *Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(21): p. 8137-42.
91. Eddy, A.A., et al., *Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(8): p. 1233-47.
92. Shen, B., et al., *Macrophages regulate renal fibrosis through modulating TGFbeta superfamily signaling*. Inflammation, 2014. **37**(6): p. 2076-84.
93. Meng, X.M., et al., *Macrophage Phenotype in Kidney Injury and Repair*. Kidney Dis (Basel), 2015. **1**(2): p. 138-46.
94. Vielhauer, V., et al., *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): p. 1173-87.
95. Peng, X., et al., *IL-17A produced by both gammadelta T and Th17 cells promotes renal fibrosis via RANTES-mediated leukocyte infiltration after renal obstruction*. J Pathol, 2015. **235**(1): p. 79-89.
96. Zheng, G., et al., *The role of tubulointerstitial inflammation*. Kidney Int Suppl, 2005(94): p. S96-100.
97. Gotot, J., et al., *Inhibitor of NFkappaB Kinase Subunit 2 Blockade Hinders the Initiation but Aggravates the Progression of Crescentic GN*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(7): p. 1917-24.
98. Long, M., et al., *Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 921-31.
99. Guckel, E., et al., *Cell-intrinsic NF-kappaB activation is critical for the development of natural regulatory T cells in mice*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20003.
100. Hruby, Z.W., et al., *Antiserum against tumor necrosis factor-alpha and a protease inhibitor reduce immune glomerular injury*. Kidney Int, 1991. **40**(1): p. 43-51.

101. Tang, W.W., et al., *Leukemia inhibitory factor ameliorates experimental anti-GBM Ab glomerulonephritis*. Kidney Int, 1996. **50**(6): p. 1922-7.
102. Duffield, J.S., *Macrophages and immunologic inflammation of the kidney*. Semin Nephrol, 2010. **30**(3): p. 234-54.
103. Zhang, J.D., et al., *Type 1 angiotensin receptors on macrophages ameliorate IL-1 receptor-mediated kidney fibrosis*. J Clin Invest, 2014. **124**(5): p. 2198-203.
104. Liu, C., et al., *[Leukemia inhibitory factor suppresses renal interstitial fibroblast activation induced by transforming growth factor]*. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2010. **41**(3): p. 448-52.
105. Matsumoto, K., et al., *Instructive Role of the Microenvironment in Preventing Renal Fibrosis*. Stem Cells Transl Med, 2016.
106. Zou, Y., et al., *Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction*. Circulation, 2003. **108**(6): p. 748-53.
107. Goldman, M. and T. Velu, *Interleukin-10 and its implications for immunopathology*. Adv Nephrol Necker Hosp, 1995. **24**: p. 79-90.
108. Jin, Y., et al., *Interleukin-10 deficiency aggravates kidney inflammation and fibrosis in the unilateral ureteral obstruction mouse model*. Lab Invest, 2013. **93**(7): p. 801-11.
109. Fueki, N., et al., *Interleukin-10 regulates transforming growth factor-beta signaling in cultured human bronchial epithelial cells*. Respiration, 2007. **74**(4): p. 454-9.
110. Schottelius, A.J., et al., *Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding*. J Biol Chem, 1999. **274**(45): p. 31868-74.
111. Chou, W.Y., et al., *Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP and TIMP modulation*. Acta Pharmacol Sin, 2006. **27**(4): p. 469-76.
112. Arai, T., et al., *Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury in vivo*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **278**(5): p. L914-22.
113. Demols, A., et al., *Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002. **282**(6): p. G1105-12.
114. Nonaka-Sarukawa, M., et al., *Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats*. J Gene Med, 2008. **10**(4): p. 368-74.
115. Mu, W., et al., *IL-10 suppresses chemokines, inflammation, and fibrosis in a model of chronic renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(12): p. 3651-60.
116. Cao, Q., et al., *IL-10/TGF-beta-modified macrophages induce regulatory T cells and protect against adriamycin nephrosis*. J Am Soc Nephrol, 2010. **21**(6): p. 933-42.
117. Wilson, H.M., D. Walbaum, and A.J. Rees, *Macrophages and the kidney*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2004. **13**(3): p. 285-90.
118. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity, 2014. **41**(1): p. 14-20.
119. Anders, H.J. and M. Ryu, *Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis*. Kidney Int, 2011. **80**(9): p. 915-25.
120. Lee, S., et al., *Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(2): p. 317-26.
121. Ricardo, S.D., H. van Goor, and A.A. Eddy, *Macrophage diversity in renal injury and repair*. J Clin Invest, 2008. **118**(11): p. 3522-30.
122. Lu, J., et al., *Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease*. Kidney Int, 2013. **84**(4): p. 745-55.

123. LeBleu, V.S., et al., *Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis*. Nat Med, 2013. **19**(8): p. 1047-53.
124. Pilling, D. and R.H. Gomer, *Differentiation of circulating monocytes into fibroblast-like cells*. Methods Mol Biol, 2012. **904**: p. 191-206.
125. Huen, S.C., et al., *GM-CSF Promotes Macrophage Alternative Activation after Renal Ischemia/Reperfusion Injury*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(6): p. 1334-45.
126. Stokman, G., et al., *Enhanced mobilization of bone marrow cells does not ameliorate renal fibrosis*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(2): p. 483-91.
127. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10344-9.
128. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. J Clin Invest, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
129. Luig, M., et al., *Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(7): p. 1597-607.
130. Steinmetz, O.M., et al., *The Th17-defining transcription factor RORgammat promotes glomerulonephritis*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(3): p. 472-83.
131. Braun, G.S., et al., *IL-6 Trans-Signaling Drives Murine Crescentic GN*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(1): p. 132-42.
132. Garbers, C., et al., *Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 2012. **23**(3): p. 85-97.
133. Waetzig, G.H. and S. Rose-John, *Hitting a complex target: an update on interleukin-6 trans-signalling*. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(2): p. 225-36.
134. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
135. Kiberd, B.A., *Interleukin-6 receptor blockage ameliorates murine lupus nephritis*. J Am Soc Nephrol, 1993. **4**(1): p. 58-61.
136. Sumida, K., et al., *Complete remission of myeloperoxidase-anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated crescentic glomerulonephritis complicated with rheumatoid arthritis using a humanized anti-interleukin 6 receptor antibody*. Rheumatology (Oxford), 2011. **50**(10): p. 1928-30.
137. Iijima, T., et al., *Tocilizumab improves systemic rheumatoid vasculitis with necrotizing crescentic glomerulonephritis*. Mod Rheumatol, 2015. **25**(1): p. 138-42.
138. Chaudhry, A., et al., *Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation*. Immunity, 2011. **34**(4): p. 566-78.