

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

**Modulation der zellulären Immunantwort durch *Leukemia  
Inhibitory Factor* in der Entwicklung der renalen  
tubulointerstitiellen Fibrose**

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

vorgelegt von  
Susanne Grote  
2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Ivo Quack

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

“Wenn man einmal angefangen hat, Medizin zu studieren, wird man nie damit fertig”

(Charles Horace Mayo)

## Zusammenfassung

Ein Großteil chronischer Nierenerkrankungen (CKD, *Chronic Kidney Disease*) beruht auf der Schädigung des Nierenparenchyms, einhergehend mit der Entstehung einer renalen tubulointerstitiellen Fibrose. Einen entscheidenden Stimulus für den progredienten fibrotischen Umbau stellt dabei die akute oder chronische Inflammation dar. Die zentrale Rolle in der Regulation der renalen Immunantwort sowie vorausgehender inflammatorischer Prozesse spielen  $CD4^+$  T-Helferzellen. Eine dauerhafte Aktivierung mit anhaltender Inflammation kann zu einer Schädigung des Gewebes führen. Der Balance zwischen den  $T_H17$ -Zellen und regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) kommt hier eine entscheidende Bedeutung zu. Eine überschießende renale Inflammation kann aus einer Dysregulation der  $T_H17$ -Zellen resultieren. Die Steuerung des Gleichgewichtes zwischen  $T_H17$ -Zellen und  $T_{reg}$  erfolgt unter anderem durch die Zytokine *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), einem Interleukin der IL-6 Familie und Interleukin-6 (IL-6). LIF induziert über Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead-Box-P3* (FOXP3) die Entstehung regulatorischer T-Zellen, während IL-6 über die Induktion des Transkriptionsfaktors *RAR-Related Orphan Receptor gamma* (ROR $\gamma$ t) die Entwicklung von  $T_H17$ -Zellen begünstigt. Diese Arbeit untersucht den Einfluss von LIF auf die renale Inflammation und renale tubulointerstitielle Fibrose im Rahmen des Unilateralen Ureterobstruktionsmodells (UUO). Sechs bis acht Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse wurden täglich intraperitoneal ab drei Tagen vor der UUO-OP entweder mit LIF oder Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) behandelt. Je nach Versuchsgruppe erfolgte die Entnahme von Nieren und nierennächstem *paraaortalen* Lymphknoten an Tag drei, 10 oder 14 nach UUO. LIF reduzierte signifikant das Ausmaß der renalen tubulointerstitiellen Fibrose. In der Behandlungsgruppe (UUO + LIF) ergaben sich für die Collagen1 $\alpha$ 1 Western Blot-Analysen eine signifikant niedrigere Expression, sowie eine geringere renale tubulointerstitielle Fibrose an Tag drei und 10 nach UUO in der Sirius Red Färbung. qPCR-Daten aus obstruiertem Nierengewebe ergaben für die Fibrosemarker Col1 $\alpha$ 1, PAI-1, PDGFR1 und TGF- $\beta$  im zeitlichen Verlauf reduzierte Werte durch die Behandlung mit LIF, Col1 $\alpha$ 1 zeigte eine signifikante Reduktion der Expression an Tag 14. Die proinflammatorischen Zytokine RANTES, Nf $\kappa$ B sowie MCP-1 zeigten zu allen Versuchszeitpunkten eine numerisch reduzierte mRNA-Expression durch die Behandlung mit LIF, bei IL-6 jedoch erst im zeitlichen Verlauf. Für IL-1 $\beta$  sowie TNF $\alpha$  war kein regulierender Effekt durch LIF festzustellen. Im Rahmen der Schädigungsmechanismen durch die UUO erfolgt eine Akkumulation von  $CD3^+$  T-Zellen und F4/80 $^+$  Makrophagen. Durch die Behandlung mit LIF ergab sich eine signifikante Reduktion der  $CD3^+$ -Zellinfiltration an Tag 10 und 14. Ebenso zeigte sich eine nicht signifikant reduzierte Infiltration von F4/80 $^+$  Makrophagen an Tag 10 und 14. Durchflusszytometrische Analysen ergaben eine Reduktion von  $CD4^+$  T-Lymphozyten sowie eine verringerte Anzahl an  $T_H17$ -Zellen in der LIF-Behandlungsgruppe.  $T_{reg}$  wurden durch LIF nicht erhöht. Da LIF zu einer signifikanten Reduktion der renalen tubulointerstitiellen Fibrose im UUO-Modell führt, ist seine zukünftige Verwendung als Therapieoption im Rahmen von CKD denkbar.

## Abstract

The majority of chronic kidney diseases (CKD) are based on damage to the renal parenchyma, accompanied by the development of renal tubulointerstitial fibrosis. Acute or chronic inflammation is a decisive stimulus for progressive fibrotic remodelling. CD4<sup>+</sup> T-helper cells play the central role in the regulation of the renal immune response and preceding inflammatory processes. Sustained activation with persistent inflammation can lead to tissue damage. The balance between T<sub>H</sub>17 cells and regulatory T cells (T<sub>reg</sub>) is of decisive importance here. Excessive renal inflammation can result from dysregulation of T<sub>H</sub>17 cells. The balance between T<sub>H</sub>17 cells and T<sub>reg</sub> is controlled, among other things, by the cytokines Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), an interleukin of the IL-6 family and interleukin-6 (IL-6). LIF induces the development of regulatory T cells via expression of the transcription factor Forkhead-Box-P3 (F3), while IL-6 promotes the development of T<sub>H</sub>17 cells via induction of the transcription factor RAR-Related Orphan Receptor gamma (RORγt). This work investigates the influence of LIF on renal inflammation and renal tubulointerstitial fibrosis in the context of the unilateral ureter obstruction (UUO) model. Six- to eight-week-old male C57BL/6 mice were treated daily intraperitoneally with either LIF or Phosphate-Buffered Saline (PBS) starting three days prior to UUO surgery. Depending on the experimental group, kidneys and the paraaortic lymph node closest to the kidney were harvested on day three, 10 or 14 after UUO. LIF significantly reduced the extent of renal tubulointerstitial fibrosis. In the treatment group (UUO + LIF), collagen1α1 Western blot analyses showed significantly lower expression, as well as lower renal tubulointerstitial fibrosis on day three and 10 after UUO in Sirius Red staining. qPCR data from obstructed kidney tissue showed reduced levels for the fibrosis markers Col1α1, PAI-1, PDGFR1 and TGF-β over time by treatment with LIF, Col1α1 showed a significant reduction in expression on day 14. The proinflammatory cytokines RANTES, NfκB as well as MCP-1 showed numerically reduced mRNA expression by treatment with LIF at all experimental time points, but for IL-6 only over time. For IL-1β and TNFα, no regulatory effect of LIF was observed. In the context of the damage mechanisms by the UUO, an accumulation of CD3<sup>+</sup> T cells and F4/80<sup>+</sup> macrophages occurs. Treatment with LIF resulted in a significant reduction of CD3<sup>+</sup> cell infiltration on day 10 and 14, as well as a non-significantly reduced infiltration of F4/80<sup>+</sup> macrophages on day 10 and 14. Flow cytometric analyses revealed a reduction of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and a decreased number of T<sub>H</sub>17 cells in the LIF treatment group. T<sub>reg</sub> were not increased by LIF. Since LIF leads to a significant reduction of renal tubulointerstitial fibrosis in the UUO model, its future use as a therapeutic option in the context of CKD is conceivable.

## Abkürzungsverzeichnis

|                        |  |                       |   |
|------------------------|--|-----------------------|---|
| <b>%</b>               | Prozent  | <b>FELASA</b>         | <i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i> |
| <b>-/-</b>             | <i>knockout</i>  | <b>fN2</b>            | Stickstoff  |
| <b>*</b>               | Signifikanzniveau < 0.05   | <b>FOXP3</b>          | <i>Forkhead-Box-Protein 3</i>                                       |
| <b>**</b>              | Signifikanzniveau < 0.01   | <b>FSP1</b>           | <i>Fibroblast-Specific Protein 1</i>                                |
| <b>°C</b>              | Grad Celsius   | <b>g</b>              | Gramm   |
| <b>µg</b>              | Mikrogramm   | <b>G</b>              | Gravitation<br>(Erdbeschleunigung)                                  |
| <b>µl</b>              | Mikroliter   | <b>GAPDH</b>          | Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase                              |
| <b>µm</b>              | Mikrometer   | <b>GATA3</b>          | Transkriptionsfaktor (kodiert über das GATA3 Gen)                   |
| <b>µM</b>              | Mikromol   | <b>Gd</b>             | <i>Galactose-deficient</i>  |
| <b>Abb.</b>            | Abbildung  | <b>gDNA</b>           | <i>genomic desoxyribonucleic acid</i>                               |
| <b>AK</b>              | Antikörper   | <b>GDP</b>            | Guanosindiphosphat  |
| <b>AKT</b>             | Gen der Proteinkinase B  | <b>GFP</b>            | <i>Green Fluorescent Protein</i>                                    |
| <b>AMS</b>             | Arteria mesenterica superior   | <b>GFR</b>            | Glomeruläre Filtrationsrate   |
| <b>AO</b>              | Aorta  | <b>GM-CSF</b>         | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor              |
| <b>APZ</b>             | Antigenpräsentierende Zelle  | <b>GRB2</b>           | <i>Growth Factor Receptor Bound Protein 2</i>                       |
| <b>Aq. dest.</b>       | Destilliertes Wasser   | <b>GTP</b>            | Guanosintriphosphat   |
| <b>AZ</b>              | Aktenzeichen   | <b>gp130</b>          | Glycoprotein 130  |
| <b>BCL6</b>            | <i>B-Cell Lymphoma 6 Protein</i>                                       | <b>h</b>              | <i>hour</i>   |
| <b>bp</b>              | Basenpaare   | <b>H<sub>2</sub>O</b> | Wasser  |
| <b>BSA</b>             | Bovines Serumalbumin   | <b>HCl</b>            | Hydrogenchlorid   |
| <b>ca.</b>             | zirka  | <b>HPLC</b>           | <i>High Performance Liquid Chromatography</i>                       |
| <b>Ca<sup>2+</sup></b> | Calcium  | <b>HRP</b>            | <i>HorseRadish Peroxidase</i>                                       |
| <b>CCD</b>             | <i>Charge-Couples Device</i><br>(ladungsgekoppeltes Halbleiterelement) | <b>HSA</b>            | Humanes Serumalbumin  |
| <b>CCR-6</b>           | <i>Chemokine Receptor 6</i>  | <b>i.p.</b>           | <i>intraperitoneal</i>  |
| <b>CD</b>              | <i>Cluster of Differentiation</i>                                      | <b>ID</b>             | Innerer Durchmesser   |
| <b>cDNA</b>            | <i>complementary desoxyribonucleic acid</i>                            | <b>IFN-γ</b>          | Interferon-γ  |
| <b>CKD</b>             | <i>Chronic Kidney Disease</i>  | <b>Ig</b>             | Immunglobulin   |
| <b>cm<sup>2</sup></b>  | Quadratzentimeter  | <b>IKK</b>            | <i>Inhibitor of NfκB Kinase subunit 2</i>                           |
| <b>Col1α1</b>          | Kollagen Typ 1α1   | <b>IL</b>             | Interleukin   |
| <b>d</b>               | <i>day</i>   | <b>IPEX</b>           | <i>Immunodysregulation Polyendocrinopathy X-linked Syndrome</i>     |
| <b>DAB</b>             | 3,3'-Diaminobenzidin   | <b>JAK</b>            | Januskinase   |
| <b>DMSO</b>            | Dimethylsulfoxid   | <b>kDa</b>            | Kilodalton  |
| <b>DNA</b>             | <i>Desoxyribonucleic Acid</i>  | <b>KDIGO</b>          | <i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>                    |
| <b>dNTP</b>            | Desoxyribonukleosid-triphosphat  | <b>KG</b>             | Körpergewicht   |
| <b>DZ</b>              | Dendritische Zelle   | <b>l</b>              | Liter   |
| <b>EAE</b>             | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis                            | <b>LIF</b>            | <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>                                   |
| <b>EDTA</b>            | Ethylendiamintetraessigsäure   | <b>LIFR</b>           | <i>Leukemia Inhibitory Factor Receptor</i>                          |
| <b>EMT</b>             | Epithelial-mesenchymale Transition                                     |                       |   |
| <b>EOMES</b>           | Eomesodermin ( <i>T-box brain protein (Tbr2)</i> )                     |                       |   |
| <b>ERK</b>             | <i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>                          |                       |   |
| <b>FASL</b>            | <i>Fas Ligand</i>  |                       |   |

|                               |   |                                |   |
|-------------------------------|---|--------------------------------|---|
| <b>M</b>                      | Mol pro Liter   | <b>RANTES</b>                  | <i>Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted (CCL5)</i>                |
| <b>m<sup>2</sup></b>          | Quadratmeter  | <b>Ras</b>                     | <i>Rat sarcoma protein</i>  |
| <b>mA</b>                     | Milliampere   | <b>RNA</b>                     | <i>Ribonucleic Acid</i>   |
| <b>MAPK</b>                   | <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>                                 | <b>ROR<math>\gamma</math>t</b> | <i>Retinoic acid-related Orphan nuclear Receptor gamma t</i>                    |
| <b>MCP-1</b>                  | <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>                                   | <b>rpm</b>                     | <i>rounds per minute</i>  |
| <b>MDRD</b>                   | <i>Modification of Diet in Renal Disease</i>                            | <b>RT</b>                      | Raumtemperatur  |
| <b>MeOH</b>                   | Methanol  | <b>RT</b>                      | Reverse Transkriptase   |
| <b>MHC</b>                    | <i>Major Histocompatibility Complex</i>                                 | <b>RT-qPCR</b>                 | <i>Real-time quantitative Polymerase-Chain-Reaction</i>                         |
| <b>min</b>                    | Minute  | <b>s.c.</b>                    | <i>subkutan</i>   |
| <b>ml</b>                     | Milliliter  | <b>SD</b>                      | <i>Standard Deviation</i>   |
| <b>mm</b>                     | Millimeter  | <b>SDS-PAGE</b>                | <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>                |
| <b>mM</b>                     | Millimol  | <b>sec</b>                     | <i>second</i>   |
| <b>mRNA</b>                   | <i>messenger Ribonucleic Acid</i>                                       | <b>SEM</b>                     | <i>Standard Error of Mean</i>   |
| <b>MS</b>                     | Multiple Sklerose   | <b>SFK</b>                     | <i>Scr Family of protein tyrosine Kinases</i>                                   |
| <b>n</b>                      | Anzahl der Versuchseinheiten  | <b>SOCS3</b>                   | <i>Supressor Of Cytokine Signaling</i>  |
| <b>nm</b>                     | Nanometer   | <b>SOS</b>                     | <i>Son of Sevenless</i>   |
| <b>ns</b>                     | nicht signifikant   | <b>STAT3</b>                   | <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>                         |
| <b>NaCl</b>                   | Natrium-Chlorid   | <b>Tab.</b>                    | Tabelle   |
| <b>NADPH</b>                  | Nicotinamadenin-dinukleotidphosphat                                     | <b>TAE</b>                     | Tris-Acetat-EDTA  |
| <b>NF<math>\kappa</math>B</b> | <i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> | <b>T-bet</b>                   | <i>T-box Transcription Factor</i>   |
| <b>NK</b>                     | Natürliche Killerzelle  | <b>TEMED</b>                   | N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamid   |
| <b>nm</b>                     | Nanometer   | <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | <i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>                            |
| <b>NSAR</b>                   | Nichtsteroidale Antirheumatika  | <b>TierSchG</b>                | Tierschutzgesetz  |
| <b>OP</b>                     | Operation   | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Tumornekrosefaktor- $\alpha$  |
| <b>p</b>                      | Signifikanzniveau   | <b>T<sub>reg</sub></b>         | Regulatorische T-Zelle  |
| <b>PAGE</b>                   | Polyacrylamidgel-Elektrophorese   | <b>TRIS</b>                    | Tris (hydroxymethyl)-aminomethan  |
| <b>PAI-1</b>                  | Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1                                       | <b>ü.N.</b>                    | über Nacht  |
| <b>PBS</b>                    | <i>Phosphate Buffered Saline</i>  | <b>UO</b>                      | Unilaterale Ureterobstruktion   |
| <b>PCR</b>                    | <i>Polymerase Chain Reaction</i>  | <b>V</b>                       | Volt  |
| <b>PDGF</b>                   | <i>Platelet Derived Growth Factor</i>                                   | <b>VE-Wasser</b>               | Vollentsalztes Wasser   |
| <b>PDGFR1</b>                 | <i>Platelet Derived Growth Factor Receptor 1</i>                        | <b>Vgl.</b>                    | Vergleich   |
| <b>pH</b>                     | Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung      | <b>vs.</b>                     | versus  |
| <b>PIP3K</b>                  | Phosphoinositid-3-Kinase  | <b>WT</b>                      | Wildtyp   |
| <b>qPCR</b>                   | Quantitative Polymerasekettenreaktion                                   | <b>z.B.</b>                    | zum Beispiel  |
| <b>Raf</b>                    | <i>Rat Fibrosarcoma Protein</i>   | <b>ZETT</b>                    | Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben |
| <b>RAG1</b>                   | <i>Recombination Activating Gene 1</i>                                  | <b><math>\alpha</math></b>     | alpha   |
|                               |   | <b><math>\alpha</math>-SMA</b> | <i><math>\alpha</math>-Smooth Muscle Actin</i>                                  |
|                               |   | <b><math>\beta</math></b>      | beta  |

# Inhaltsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Zusammenfassung.....   | I   |
| Abstract .....   | II  |
| Abkürzungsverzeichnis.....   | III |
| Inhaltsverzeichnis.....  | V   |
| 1 Einleitung.....  | 1   |
| 1.1 Klinische Definition und Klassifikation der chronischen Nierenerkrankung.....                              | 1   |
| 1.2 Chronische Nierenerkrankung: Epidemiologie und gesundheitsökonomische Bedeutung .....                      | 2   |
| 1.3 Pathogenese der renalen tubulointerstitiellen Fibrose .....  | 3   |
| 1.4 CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten .....   | 6   |
| 1.5 LIF und LIF-Rezeptor .....   | 10  |
| 1.6 Die Rolle von LIF in der Niere .....   | 14  |
| 1.7 Zielsetzung der Arbeit .....   | 16  |
| 2 Material und Methoden.....   | 17  |
| 2.1 Material .....   | 17  |
| 2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....   | 17  |
| 2.1.2 Laborgeräte .....  | 18  |
| 2.1.3 Chemikalien, Kits, Enzyme, Medikamente .....   | 21  |
| 2.1.4 Antikörper .....   | 24  |
| 2.1.5 TaqMan <sup>®</sup> Gene Expression Assays .....   | 25  |
| 2.1.6 Softwareprogramme .....  | 25  |
| 2.1.7 Puffer, Lösungen, Gele, Reaktionsansätze .....   | 26  |
| 2.2 Methoden.....  | 29  |
| 2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung.....   | 29  |
| 2.2.2 Versuchsaufbau .....   | 29  |
| 2.2.3 Anästhesie .....   | 31  |
| 2.2.4 Die Unilaterale Ureterobstruktion (UUO) .....  | 31  |
| 2.2.5 Organentnahme .....  | 33  |
| 2.2.6 Proteinanalyse.....  | 35  |
| 2.2.6.1 Proteinisolierung .....  | 35  |
| 2.2.6.2 Proteinmengenbestimmung .....  | 35  |
| 2.2.6.3 SDS (PAGE)-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse für Collagen1 $\alpha$ 1 (Col1 $\alpha$ 1) ..... | 36  |
| 2.2.6.4 Densitometrische Quantifizierung der Western Blots .....   | 37  |
| 2.2.7 Analyse von Nukleinsäuren .....  | 37  |
| 2.2.7.1 RNA-Präparation und Messung der RNA-Konzentration .....  | 37  |
| 2.2.7.2 Reverse Transkription .....  | 38  |

---

|   |    |
|---|----|
| 2.2.7.3 Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese ...   | 38 |
| 2.2.7.4 Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....   | 39 |
| 2.2.8 Histologie und Immunhistochemie .....   | 41 |
| 2.2.8.1 Entwässerungsreihe und Paraffinblockanfertigung .....   | 41 |
| 2.2.8.2 Paraffinschnitte und Entparaffinierung .....  | 41 |
| 2.2.8.3 <i>Sirius Red</i> -Färbung.....   | 42 |
| 2.2.8.4 CD3 <sup>+</sup> -Färbung .....   | 42 |
| 2.2.8.5 F4/80 <sup>+</sup> Makrophagenfärbung.....  | 43 |
| 2.2.9 Durchflusszytometrie .....  | 44 |
| 2.2.9.1 Probenaufbereitung von Nierengewebe und Milzgewebe .....  | 44 |
| 2.2.9.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Entzündungszellpopulation.....  | 44 |
| 2.2.10 Statistische Auswertung.....   | 45 |
| 3 Ergebnisse .....  | 46 |
| 3.1 Western Blot-Proteinanalyse für Col1 $\alpha$ 1 und Sirius Red Färbung – Ausprägung renaler tubulointerstitieller Fibrose ..... | 46 |
| 3.1.1 Western Blot-Proteinanalyse für Col1 $\alpha$ 1 .....   | 46 |
| 3.1.2 Histologie – Sirius Red Färbung von Kollagen Typ 1 (Col1 $\alpha$ 1).....   | 48 |
| 3.2 Genexpressionsanalyse .....   | 51 |
| 3.2.1 qPCR aus Nierengewebe .....   | 51 |
| 3.2.2 qPCR aus Lymphknoten.....   | 57 |
| 3.3 Immunhistochemie .....  | 63 |
| 3.3.1 CD3 <sup>+</sup> Färbung .....  | 63 |
| 3.3.2 F4/80 Färbung .....   | 66 |
| 3.4 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Entzündungszellpopulation.....  | 69 |
| 4 Diskussion.....   | 73 |
| 4.1 Die Auswirkung von LIF auf die renale tubulointerstitielle Fibrose .....  | 74 |
| 4.2 Die Auswirkung von LIF auf die Genexpression proinflammatorischer Zytokine .....  | 76 |
| 4.3 Modulation der Inflammation – Die Auswirkung von LIF auf die lokoregionäre Zelldifferenzierung und Zellmigration.....           | 79 |
| 4.4 Ausblick .....  | 82 |
| 5 Literatur- und Quellenverzeichnis.....  | 84 |
| Danksagung.....   | 89 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Klinische Definition und Klassifikation der chronischen Nierenerkrankung

Die chronische Nierenerkrankung (CKD, *Chronic Kidney Disease*) wird definiert als ein Funktionsverlust der physiologischen Nierenfunktion über einen Zeitraum von  $\geq 3$  Monaten mit einer Reduktion der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR, *estimated Glomerular Filtration Rate*)  $< 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  sowie Zeichen einer Nierenschädigung. Die Nierenschädigung kann sich dabei durch pathologisch veränderte Laborparameter im Serum, beispielsweise dem Kreatinin als wichtigster Surrogatparameter für die Bewertung der Nierenfunktion präsentieren. Zudem kann sich eine Nierenschädigung durch Elektrolytveränderungen, Proteinurie und Albuminurie, pathologisches Urinsediment, in der Bildgebung, Histologie, oder durch Tubulusfunktionsstörungen präsentieren [1]. Die Einteilung der CKD erfolgt nach der KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcome*) in 5 Stadien und ist abhängig von der glomerulären Filtrationsrate (G1-5) und der Albuminurie (A1-3) (Abb. 1) [2]. Eine weitere Spezifikation der CKD-Klassifikation erfolgt durch Angabe der renalen Krankheitsursache ( $C = \textit{Cause}$ ). CKD 5D bildet dabei als dialysepflichtige Nierenerkrankung das Endstadium [3]. Die Albuminurie wird definiert über einen Albumin-Kreatinin-Quotienten von  $> 30 \text{ mg/g}$  Kreatinin in mindestens zwei von drei Sammelurinproben [4]. Sie stellt einen unabhängigen Risikomarker für die Progression der Niereninsuffizienz sowie für ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko dar [5]. Das Risiko für die Entwicklung eines akuten Nierenversagens oder einer terminalen Niereninsuffizienz ist beim Vorliegen einer signifikanten Albuminurie und GFR von  $< 60 \text{ ml/min/1.73 m}^2$  erhöht [4].

**Prognosis of CKD by GFR and albuminuria categories: KDIGO 2012**

|   |     |                                  |           | Persistent albuminuria categories<br>Description and range |   |  |
|---|-----|----------------------------------|-----------|--|---|--|
|   |     |                                  |           | A1   | A2  | A3   |
|   |     |                                  |           | Normal to mildly increased                                 | Moderately increased                                | Severely increased                             |
|   |     |                                  |           | $< 30 \text{ mg/g}$<br>$< 3 \text{ mg/mmol}$               | $30 - 300 \text{ mg/g}$<br>$3 - 30 \text{ mg/mmol}$ | $> 300 \text{ mg/g}$<br>$> 30 \text{ mg/mmol}$ |
| GFR categories (ml/min per 1.73 m <sup>2</sup> )<br>Description and range | G1  | Normal or high                   | $\geq 90$ |  |   |  |
|   | G2  | Mildly decreased                 | 60–89     |  |   |  |
|   | G3a | Mildly to moderately decreased   | 45–59     |  |   |  |
|   | G3b | Moderately to severely decreased | 30–44     |  |   |  |
|   | G4  | Severely decreased               | 15–29     |  |   |  |
|   | G5  | Kidney failure                   | $< 15$    |  |   |  |

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); yellow: moderately increased risk; orange: high risk; red, very high risk.

Abb. 1: CKD-Stadieneinteilung und renales Risiko nach KDIGO. A = Albuminurie; GFR = Glomeruläre Filtrationsrate; m<sup>2</sup> = Quadratmeter; ml = Milliliter; min = Minute; mg = Milligramm; G 1-5 = GFR-Stadium; A 1-3 = Albuminurie-Stadium, mmol = Millimol [6] (Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Verlag und Rechteinhaber, Elsevier B.V., Amsterdam, Niederlande).

Bei ca. 35 % aller prävalenten Dialysepatienten beruhen die zur terminalen Niereninsuffizienz führenden chronischen Nierenerkrankungen auf einer durch Diabetes Mellitus verursachten Diabetischen Nephropathie. Dies stellt den größten Anteil dar. Bei 15 % aller Dialysepatienten beruht die chronische Nierenerkrankung auf Glomerulonephritiden. Polyzystische Nierenerkrankungen machen einen Anteil von 10 % aus. Weitere Ursachen stellen vaskuläre (hypertensive) Erkrankungen und chronische tubulointerstitielle Nephropathien dar [1].

Tubulointerstitielle Nephropathien sind eine heterogene Gruppe von Nierenerkrankungen und können in akute (akute interstitielle Nephritis, ATN) oder chronische Verlaufsformen (chronische tubulointerstitielle Nephritis, CTN) eingeteilt werden. In 70 % der Fälle ist die akute Schädigung des Tubulussystems und des Interstitiums medikamenteninduziert (Antibiotika, nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) und Virostatika). Eine Infektassoziation (bakteriell oder viral) liegt bei ca. 30 % der Fälle vor. Autoimmunerkrankungen wie z.B. der Systemische Lupus erythematodes (SLE) können ebenso zur ATN führen. In seltenen Fällen liegt eine idiopathische Genese vor. Chronische Verlaufsformen können neben einer möglichen infektiösen Genese (z.B. chronische Pyelonephritis) immunvermittelt (Sarkoidose, SLE) oder aufgrund der Einwirkung von Toxinen (Analgetika, Lithium, Schwermetalle etc.) entstehen. Weitere Ursachen sind hereditäre Stoffwechselerkrankungen (z.B. Zystinose), hämatologisch-neoplastische Erkrankungen (z.B. Multiples Myelom), physikalische Prozesse (Strahlennephropathie) und sekundäre Störungen des Tubulointerstitiums als Folge glomerulärer, vaskulärer und zystischer Nierenerkrankungen [7, 8]. Ein weiterer wichtiger Progressionsfaktor der CKD stellt die arterielle Hypertonie dar und betrifft ca. 80 % aller Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen [9].

Als Folge chronischer Nierenerkrankungen kommt es zum fortschreitenden Nierenfunktionsverlust. Zeichen hiervon können ein Versagen der exkretorischen Funktion, Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt sowie die Abnahme der inkretorischen Nierenfunktion mit verminderter Sekretion von Erythropoetin, Renin und Prostaglandinen als auch die verminderte Aktivierung von Vitamin D sein. Weiterhin kann es über die Retention harnpflichtiger Substanzen zu toxischen Schäden anderer Organsysteme kommen [1]. Unabhängig von der ursächlichen (renalen) Grunderkrankung können fortschreitende Nierenerkrankungen (mit/ohne Therapie) in der Entwicklung einer chronischen renalen tubulointerstitiellen Fibrose münden [7].

## **1.2 Chronische Nierenerkrankung: Epidemiologie und gesundheitsökonomische Bedeutung**

Die CKD stellt ein weltweites Gesundheitsproblem dar. Sie ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen und Tod. Levey et al. haben in einer Übersichtsarbeit weltweit Daten zur Prävalenz der CKD zusammengetragen. So leiden ca. 9-14 % der Bevölkerung der westlichen

Industrienationen an einer nicht-dialysepflichtigen CKD. Die Prävalenz der dialysepflichtigen CKD nimmt zu. Mit einem jährlichen Anstieg um ca. 5 % seit 1995 hat sich die Anzahl an dialysepflichtigen Patienten in Deutschland in den vergangenen 20 Jahren verdoppelt (1995: 42 000 Dialysepatienten). Von insgesamt ca. 100 000 Patienten mit Nierenersatztherapie in Deutschland sind laut des Datenregisters des gemeinsamen Bundesausschusses (gBA) aus dem Jahresbericht 2018 zur Qualitätssicherung in der Dialyse ca. 25 000 Patienten nierentransplantiert; 75 000 Patienten werden dialysiert. Die Prävalenz der CKD 5D beträgt somit 1006 Erkrankte pro 1 Million Einwohner [3]. Deutlich zeigt sich eine Zunahme der Prävalenz der CKD im höheren Alter [10]. Steigende Zahlen von (dialysepflichtigen) Nierenerkrankungen sind damit nicht zuletzt Ausdruck des demografischen Wandels.

Neben einer starken finanziellen Belastung des Gesundheitssystems mit erheblichen sozioökonomischen Folgen, sind Patienten mit CKD zudem von einem Verlust an Lebensqualität und einer geringeren Lebenserwartung betroffen [3, 11].

### **1.3 Pathogenese der renalen tubulointerstitiellen Fibrose**

Neben der fortschreitenden glomerulären Schädigung, stellt die renale tubulointerstitielle Fibrose unabhängig von der Ätiologie der Grunderkrankung das histopathologische Korrelat des Endstadiums vieler renaler Erkrankungen dar [12]. Kennzeichnend ist die durch exzessive Akkumulation von extrazellulären Matrixproteinen (EZM) wie Kollagen und Fibronectin irreversible renale Fibrosierung, welche mit dem zunehmenden Organfunktionsverlust einhergeht [13]. Die Akkumulation erfolgt im Interstitium der Niere zwischen Tubuli und Kapillaren und entsteht aufgrund eines Ungleichgewichts von Matrixdegradation und Matrixbildung [14].

Als Antwort auf schädigende Einflüsse entsteht eine renale Inflammation primär zur Initiierung der physiologischen Wundheilung und Elimination der Noxe. Proliferation epithelialer Zellen und Kollagenbildung folgen. Anhaltende Entzündungsprozesse, wie man sie im Rahmen chronischer Erkrankungen vorfindet, enden über die unkontrollierte chronische Inflammation in einer irreversiblen Fibrosierung des Gewebes. Dabei erfolgt unter anderem die überschießende Aktivierung von proinflammatorischen Zellen wie den CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>-Zelle), welche ihrerseits über die Produktion profibrotischer Zytokine und Wachstumsfaktoren den Fibrosierungsprozess aufrechterhalten und fördern [15]. Betroffen von der Fibrosierung sind alle Komponenten des Tubulointerstitiums. Der fortschreitende Prozess geht neben der exzessiven Akkumulation von EZM mit einer Atrophie und Dilatation der Tubuli, Infiltration mononukleärer Zellen, Rarefizierung der interstitiellen Kapillaren und einer Vergrößerung der Diffusionsstrecke einher [16, 17]. Sowohl aufgrund primärer Erkrankungen des Tubulointerstitiums wie bei der interstitiellen Nephritis als auch sekundär im Rahmen glomerulärer oder vaskulärer Erkrankungen kann es zur Fibrosierung der Niere

kommen [14]. Im Rahmen der jeweiligen Grunderkrankung wirken verschiedene Schädigungsreize auf die Tubulusepithelzellen ein. Hierzu gehören unter anderem Wachstumsfaktoren, Hyperglykämie, Hypertonie und Proteinurie. Hierdurch werden die Tubulusepithelzellen angeregt, proinflammatorische und profibrotische Zytokine sowie Wachstumsfaktoren wie z.B. VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) und TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor Beta*) zu sezernieren [18]. Die direkte toxische Wirkung der Proteinurie auf die Tubulusepithelzellen stellt dabei einen wichtigen Mechanismus dar, der bei primären glomerulären oder vaskulären Erkrankungen zu einer Schädigung des Tubulointerstitium der Niere führt. Als Antwort auf die Schädigung reagieren die Tubulusepithelzellen mit der Sekretion o.g. Zytokine. Diese entfalten ihre Wirkung über die Rekrutierung mononukleärer Zellen, welche ihrerseits zur Fibroblastenaktivierung und Differenzierung von Tubulusepithelzellen beitragen [19]. So nimmt die Proteinurie einerseits direkten Einfluss auf die Entstehung und Progression der renalen tubulointerstitiellen Fibrose, andererseits kann ihr Ausmaß als prognostischer Marker der Nierenerkrankung gewertet werden [20]. Die aus der Diffusionsstreckenvergrößerung resultierende Hypoxie stellt einen weiteren Schädigungsreiz dar und trägt ebenfalls zur Fibroblastenaktivierung bei [21] (Abb. 2).

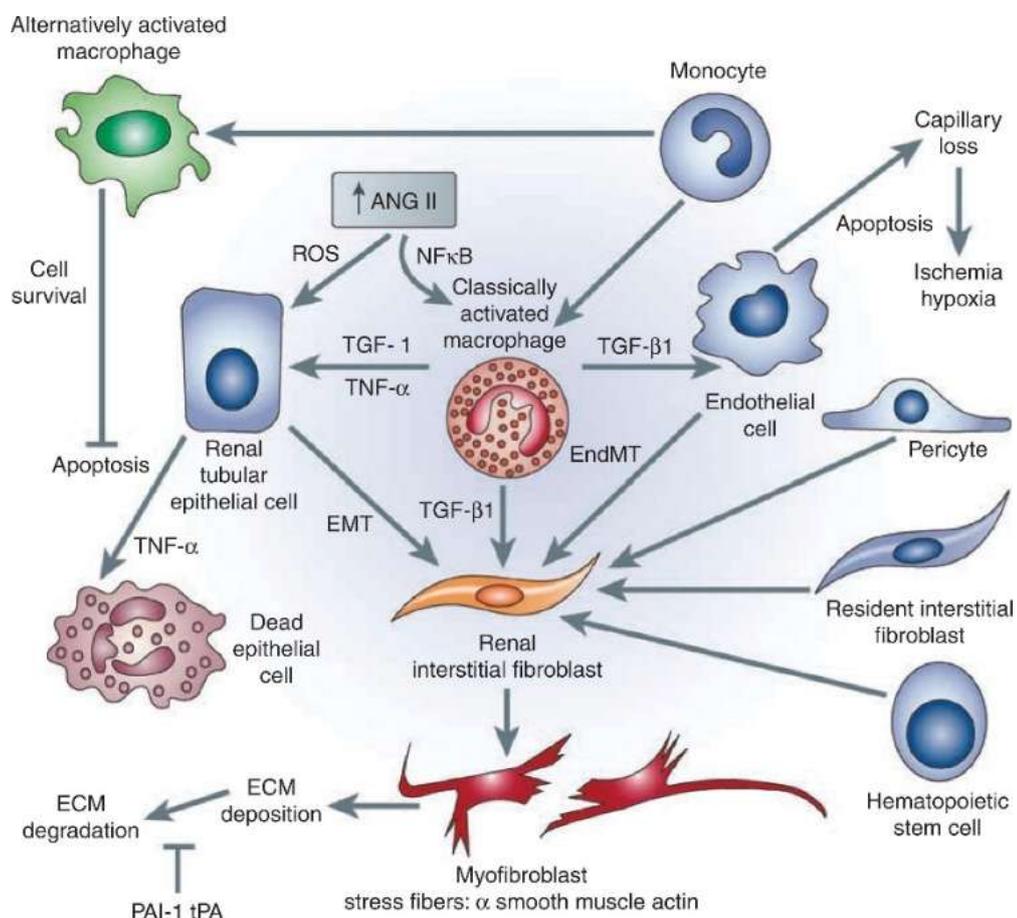


Abb. 2: *Pathogenese der renalen tubulointerstitiellen Fibrose* [22] (Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Verlag und Rechteinhaber, Elsevier B.V., Amsterdam, Niederlande).

Von zentraler Bedeutung für die Produktion extrazellulärer Matrixproteine sind interstitielle Fibroblasten, welche im Rahmen der Fibrogenese und in Abhängigkeit des sie umgebenden Zytokinmilieus einen Phänotypenwechsel zu  $\alpha$ -SMA (*Alpha Smooth Muscle Actin*) und Vimentin-produzierenden Myofibroblasten vollziehen [16]. Die aktivierenden Zytokine werden, wie oben genannt, von den geschädigten Tubulusepithelzellen sezerniert. Weitere Quellen sind neben dem lymphoplasmazellulären Infiltrat durch Inflammation geschädigte Endothelzellen peritubulärer Gefäße sowie entzündete Glomerula [14]. Weitere Ursprünge dieser Matrix-produzierenden Zellen werden kontrovers diskutiert und sind Gegenstand der Forschung. Postuliert wird neben der Entstehung über die Aktivierung residenter interstitieller Fibroblasten eine Differenzierung aus vaskulären Perizyten (periadventitiale Zellen) sowie die Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten. Zudem erfolgt die Differenzierung zu  $\alpha$ -SMA-produzierenden Myofibroblasten über die Endothelial-mesenchymale Transition (EndoMT) aus Endothelzellen sowie über die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Tubulusepithelzellen (Abb. 3) [19, 23].  $\alpha$ -SMA-produzierende Myofibroblasten werden über die von ihnen exprimierten, charakteristischen Myofibroblastenmarker wie  $\alpha$ -SMA, FSP1 (*Fibroblast-Specific Protein 1*) und Vimentin charakterisiert.

EMT beschreibt dabei einen Prozess, durch welchen Epithelzellen durch phänotypische und morphologische Änderungen ihrer epithelialen Eigenschaften in einen mesenchymalen Zelltyp transdifferenzieren. Yang und Liu konnten 2001 zeigen, dass durch TGF- $\beta$  stimulierte Epithelzellen durch Herunterregulation der Genexpression von Adhäsionsproteinen wie dem E-Cadherin ihre Polarität und Adhäsion verloren und befähigt wurden,  $\alpha$ -SMA zu exprimieren [24]. Alle Zelltypen der Niere sind in der Lage, TGF- $\beta$ , einen der wichtigsten profibrotischen Mediatoren, im Rahmen der Fibrogenese zu exprimieren [25, 26]. Ähnlich der EMT erfolgt im Rahmen der EndoMT eine Transdifferenzierung von tubulären Endothelzellen zu Myofibroblasten.

Weiterhin ist Gegenstand der Forschung, welche Zellen zur Fibrogenese beitragen und in welchem Ausmaß dies geschieht. Wie genannt erfüllen vor allem Myofibroblasten eine entscheidende Schlüsselrolle in der Fibrogenese und damit dem destruierenden, fortschreitenden Nierenfunktionsverlust bei CKD [14].

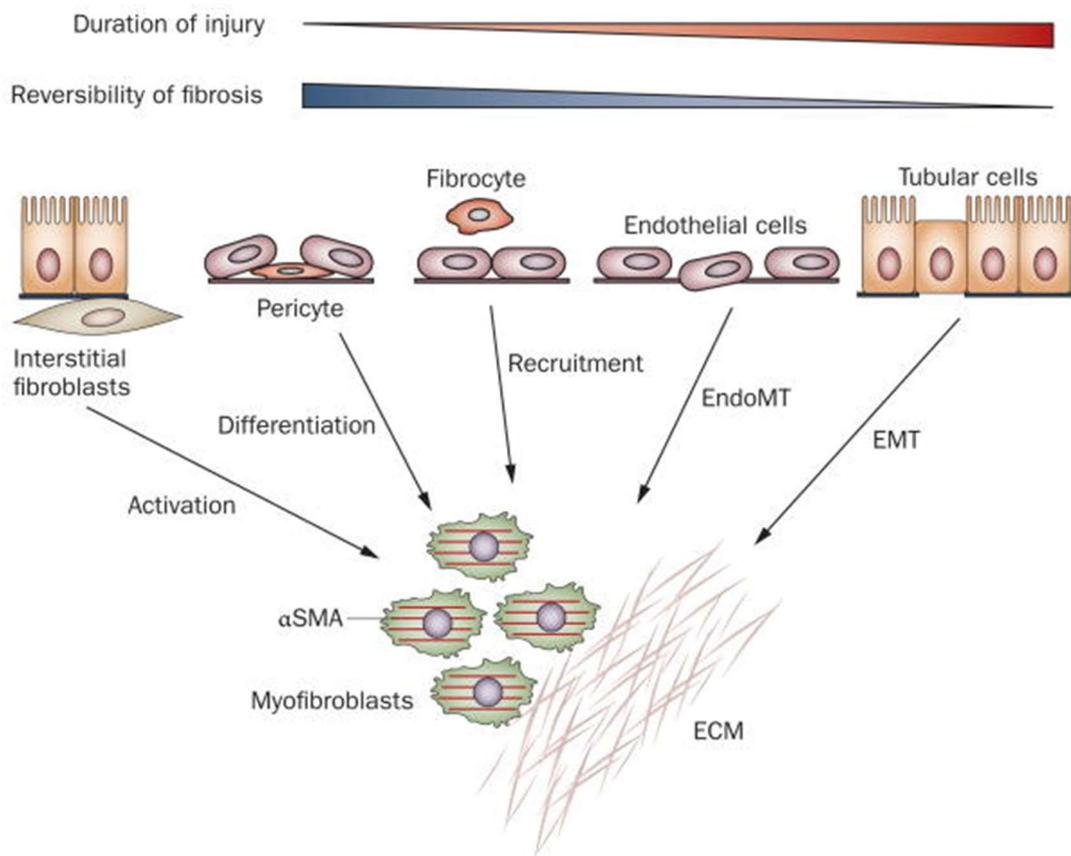


Abb. 3: **Ursprung der  $\alpha$ -SMA-produzierenden Myofibroblasten im Fibrosierungsprozess der renalen tubulointerstitiellen Fibrose.** Möglicher Ursprung von Matrix-produzierenden Myofibroblasten aus mindestens fünf verschiedenen Zelltypen: Aktivierung residenter interstitieller Fibroblasten; Differenzierung aus vaskulären Perizyten; Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten; Transdifferenzierung tubulärer Epithelzellen über EndoMT; Transdifferenzierung von Tubuluszellen über EMT; ECM = Extracellular Matrix [23] (Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Verlag und Rechteinhaber, Springer Nature, Heidelberg, Deutschland).

## 1.4 CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten

Viele Erkrankungen, welche durch eine chronische Inflammation gekennzeichnet sind, zeigen eine signifikant gesteigerte Aktivierung der adaptiven, spezifischen, angeborenen Immunantwort [27]. Einer wichtigen Zellpopulation dieser zellvermittelten Immunantwort, den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten, wird eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Progression fibrotischer Erkrankungen zugeschrieben. Tapmeier et al. zeigten im Jahr 2010 im Rahmen tierexperimenteller Studien an RAG1 (*Recombination Activating Gene 1*)-defizienten Mäusen eine geringere Fibrosierung des Gewebes im Vergleich zur Kontrollgruppe. RAG1 dient der Differenzierung reifer T- und B-Lymphozyten. Der Schweregrad der renalen tubulointerstitiellen Fibrose konnte nach Rekonstitution der RAG1<sup>-/-</sup> (*knockout*)-Mäuse durch Exposition mit CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe angehoben werden [28].

Die Bildung von T-Lymphozyten – im Folgenden als T-Zellen bezeichnet – erfolgt zunächst als Vorläuferzellen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, eine weitere Ausreifung erfolgt anschließend im Thymus. T-Zellen können anhand immunphänotypischer

Oberflächenmerkmale, den *Cluster of Differentiation* (CD), welche dem auf den T-Zellen exprimierten T-Zellrezeptor (TCR) als Korezeptoren dienen, eingeteilt werden. So unterscheidet man zwischen zunächst naiven  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen [29].

Innerhalb des lymphatischen Gewebes erfolgt anschließend eine Aktivierung sowie die Proliferation und Differenzierung der naiven  $CD4^+$  T-Zellen ( $T_H0$ ) durch auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) präsentierte Antigene und Zytokine [30].

Diese so entstandenen antigenspezifischen Effektor-T-Zellen erfahren in Abhängigkeit vom umgebenden Zytokinmilieu eine weitere phänotypische Determinierung. Über die Expression bzw. Hochregulation spezifischer Transkriptionsfaktoren nach Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege erfolgen weitere Differenzierungsvorgänge der T-Effektor-Zellen. Eine weitere Unterteilung der Zellen erfolgt neben ihrem jeweiligen Zytokinprofil und ihren spezifischen Transkriptionsfaktoren zudem anhand ihrer Effektoreigenschaften in Subtypen wie z.B. T-Helferzellen Typ 1 ( $T_H1$ ), Typ 2 ( $T_H2$ ) und Typ 17 ( $T_H17$ ). Ein weiterer Subtyp sind die regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) (Abb. 4). Die Erstbeschreibung der  $CD4^+$  Subtypen  $T_H1$  und  $T_H2$  erfolgte im Jahr 1986. T. Mosmann und R.L. Coffman gelang eine Unterteilung der T-Helferzellen in zwei Subpopulationen anhand ihres Zytokinprofils sowie ihrer unterschiedlichen Funktionen hinsichtlich regulatorischer Aufgaben und Effektorfunktionen [31].

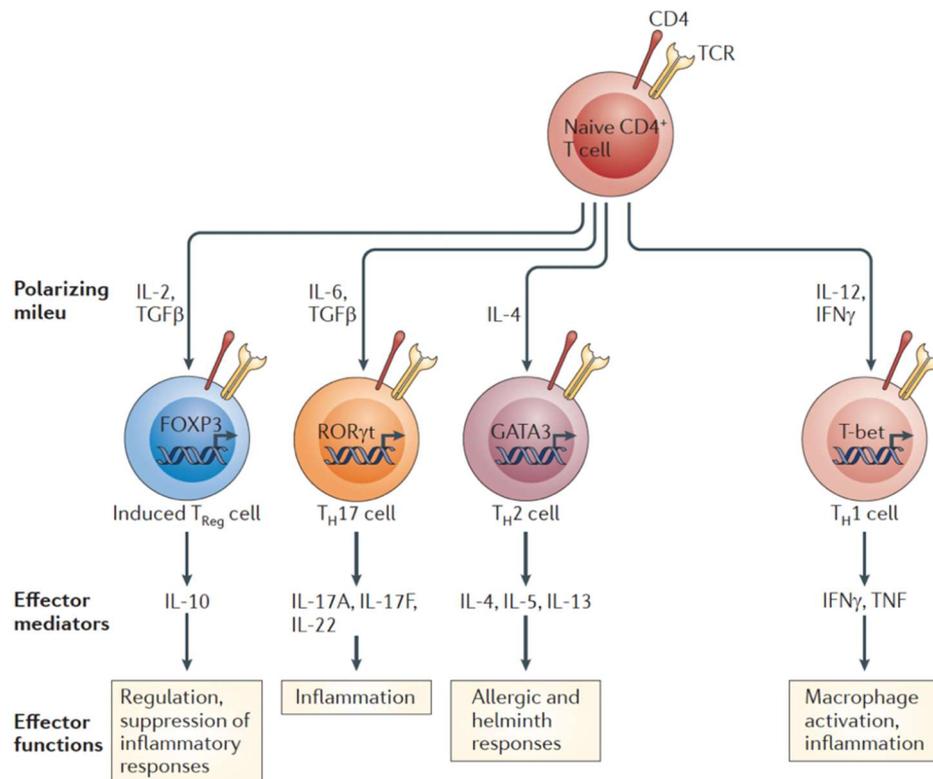


Abb. 4: Einteilung der  $CD4^+$  T-Helferzellen in ihre Subtypen. Die naiven  $CD4^+$  T-Zellen differenzieren unter anderem in Abhängigkeit des sie umgebenden Zytokinmilieus zu Effektorzellen der Subtypen  $T_H1$ ,  $T_H2$ ,  $T_H17$  und  $T_{reg}$ . Über die Produktion verschiedener Zytokine erfolgt schließlich eine unterschiedliche Beeinflussung der Immunantwort. IL = Interleukin; TGF- $\beta$  = Transforming Growth Factor- $\beta$ ; FOXP3 = Forkhead Box Protein 3; ROR $\gamma$ t = Retinoic-acid-receptor-related Orphan nuclear Receptor gamma; GATA3 = GATA-binding Protein 3; BCL-6 = B Cell Lymphoma 6; T-bet = T-Box Transcription Factor; EOMES = Eomesodermin; FASL = Fas Ligand [32] (modifiziert – Reproduktion und Nutzung genehmigt durch den Verlag und Rechteinhaber, Springer Nature, Heidelberg, Deutschland).

Die Induktion der Differenzierung naiver T-Zellen zu T<sub>H</sub>1 T-Zellen wird durch die von dendritischen Zellen und Makrophagen als Reaktion auf Pathogene sezernierten Interleukine IL-2 und IL-12 sowie von natürlichen Killerzellen (NK) sezerniertes Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) eingeleitet. IFN- $\gamma$ -abhängig erfolgt zunächst die Aktivierung des Januskinasen (JAKs)-Signalwegs, worüber anschließend die Transkriptionsfaktoren STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) und STAT-4 aktiviert werden. Der intrazelluläre Signaltransduktionsweg mündet weiterhin in einer erhöhten Expression des Mastertranskriptionsfaktors T-bet (T-Box Transkriptionsfaktor TBX21), wodurch die initiale Polarisationsrichtung zu T<sub>H</sub>1 T-Zellen vorgegeben wird. Durch direkte Bindung an den Promoter aktiviert T-bet die Expression von IFN- $\gamma$  sowie der  $\beta$ 2-Kette des IL-12-Rezeptors (IL-12R $\beta$ 2). Hierdurch ist die T-bet-Expression nicht mehr auf den TCR-Stimulus angewiesen und kann zu einem späteren Zeitpunkt über den IL-12-STAT4-Signalweg aktiviert werden. Eine Amplifikation der T<sub>H</sub>1-Differenzierung wird im Anschluss an die T<sub>H</sub>1 T-Zell-Aktivierung mittels Synthese von IFN- $\gamma$  eingeleitet. Die von diesen Helferzellen sezernierten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-2 und TNF- $\alpha$  regulieren entzündliche Prozesse und vermitteln über die Aktivierung und Rekrutierung natürlicher Killerzellen (NK) und Makrophagen die zellvermittelte Immunität bei der Abwehr intrazellulärer Antigene und Viren [33-35].

Eine Differenzierung von T<sub>H</sub>2 T-Zellen erfolgt IL-4 getriggert und wird einerseits bei einem Befall des Organismus mit Parasiten wie Darmwürmern (z.B. Helminthen) initiiert, andererseits durch die Exposition bestimmter Allergene. So stellt der T<sub>H</sub>2-Subtyp insbesondere einen entscheidenden Mediator im Rahmen Phagozytose-unabhängiger, humoraler Immunreaktionen dar und dient der Bekämpfung extrazellulärer Pathogene. Der von den T<sub>H</sub>2 T-Zellen exprimierte Mastertranskriptionsfaktor GATA-3 (*GATA Binding Protein 3*) wird über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 hochreguliert. Folge ist eine vermehrte Expression des T<sub>H</sub>2 T-Zell-spezifischen Zytokins IL-5 und des Leitzytokins IL-4, welches eine weitere Differenzierung der T<sub>H</sub>2 T-Zellen bewirkt. [34, 36, 37].

T<sub>H</sub>17-Zellen stellen einen weiteren Subtyp der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten dar. Diese Zellen unterscheiden sich maßgeblich von den bereits beschriebenen Subtypen. Einerseits hinsichtlich der zu ihrer Differenzierung führenden Zytokine, andererseits hinsichtlich ihrer sezernierten Zytokine. So erfolgt die Differenzierung der naiven T-Zelle zur T<sub>H</sub>17-Zelle über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3, welcher gemeinsam mit dem Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor*) die Immunantwort der T<sub>H</sub>17-Zellen generiert. Der Differenzierungsvorgang wird vorrangig durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und *Transforming Growth Factor beta* (TGF $\beta$ ) induziert [34]. Im Gegensatz zu T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 T-Zellen sezernieren sie weder IFN- $\gamma$  noch IL-4, sondern IL-17 (auch IL-17A genannt) als Leitzytokin, welches namensgebend für diese Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist. Bei IL-17A handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, welches neben den T<sub>H</sub>17-Zellen auch von cytotoxischen

T-Lymphozyten (CD8<sup>+</sup>),  $\gamma\delta^+$  T-Zellen, Mastzellen und neutrophilen Granulozyten sowie natürlichen Killerzellen sezerniert wird.

Weitere Effektorzytokine sind neben der Ausschüttung von IL-17A, IL-21, IL-22 und TNF- $\alpha$ . Über die Hochregulation weiterer proinflammatorischer Zytokine im Zielgewebe wie IL-6, Chemokinligand 1 (CXCL1), Chemokinligand 8 (CXCL8) und Monozyten Chemotaktisches Protein 1 (MCP-1), sind sie maßgeblich an der Rekrutierung von Effektorzellen wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten an den Ort der aktiven Immunreaktion und somit an durch Bakterien und Pilze vermittelten, extrazellulären Entzündungsvorgängen beteiligt [38].

IL-22 unterstützt darüber hinaus, die epitheliale Integrität der Gewebe zu bewahren. So stimuliert es Reparaturmechanismen zur Erhaltung der epithelialen Barriere und begünstigt die Synthese antimikrobieller Peptide [39]. IL-21 verstärkt durch positives Feedback die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung [40]. IL-23 stellt ein weiteres wichtiges Zytokin dar, welches dem Auswachsen und der Erhaltung der Effektorfunktionen bereits differenzierter T<sub>H</sub>17-Zellen dient [41].

Eine wichtige Rolle wird T<sub>H</sub>17-Zellen zudem bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben [34, 42]. Obgleich die Funktion der T<sub>H</sub>17-Zellen sowie des IL-17A in der Gesamtheit ihrer Wirkung noch nicht vollständig geklärt ist, wird eine dysregulierte T<sub>H</sub>17-Aktivität mit der Entstehung autoimmuner Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, Morbus Crohn und Psoriasis in Verbindung gebracht [43]. In der Niere zeigen erste Ergebnisse, dass T<sub>H</sub>17-Zellen über die Expression ihrer Zytokine sowie hoher Expression des Chemokinrezeptors *C-C-motif Chemokine Receptor 6* (CCR6) eine Schlüsselrolle hinsichtlich der Entstehung und des Progresses von Nierenschäden zukommt. Gegenstand der Forschung stellen dabei unter anderem die Bedeutung von T<sub>H</sub>17-Zellen für die Krankheitsentwicklung von Glomerulonephritiden und Lupusnephritis [44], aber auch die Bedeutung bei akuten Nierenerkrankungen [45] sowie ischämischen Nierenschäden [46] und Abstoßungsreaktionen von Nierentransplantaten dar [47].

Die Rolle von T<sub>H</sub>17-Zellen ist bisher am besten anhand eines Modells zur Multiplen Sklerose, dem Modell der Experimentellen Autoimmunen Encephalitis (EAE) untersucht. Ergebnisse aus dem Jahr 2018 zeigen, dass einer Imbalance zwischen T<sub>H</sub>17-Zellen und den im Folgenden beschriebenen regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) eine entscheidende Bedeutung zukommt. So resultiert eine überschießende entzündliche Aktivität aus einem Überwiegen der T<sub>H</sub>17-Zellen [38].

Den bisher genannten Zellen steht eine weitere Subpopulation mit jedoch antiinflammatorischen Eigenschaften gegenüber – die immunmodulierenden regulatorischen T-Helfer-Zellen (T<sub>reg</sub>). Sie werden über die Expression ihres Transkriptionsfaktors *Forkhead-Box-Protein P3* (FOXP3) charakterisiert. Für die Bildung regulatorischer T-Zellen im Thymus ist dieser Transkriptionsfaktor essenziell. So ist für Menschen mit X-chromosomal vererbten Mutationen im FOXP3-Gen eine vollständige Defizienz regulatorischer CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben. Folge davon sind schwere, multiple Organe betreffende Autoimmunerkrankungen, auch IPEX-Syndrom (*Immunodysregulation*

*Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked syndrome*) genannt. Defekte dieses Gens münden aufgrund des regulatorischen T-Zelldefekts in einer Immundysregulation, welche unter anderem mit Diabetes mellitus, exfoliativer Dermatitis, Lymphoproliferation, Enteropathie und Thyreoiditis einhergehen kann [48].

Sakaguchi und Kollegen beschrieben 1995 zudem die für einen Teil der  $T_{reg}$  charakteristische Expression des Oberflächenmarkers CD25. So führte das Fehlen von  $CD4^+CD25^+$  regulatorischen T-Zellen in Mäusen nach neonataler Thymektomie zur Induktion eines Autoimmunphänotyps mit Entstehung diverser Autoimmunerkrankungen. Durch den Transfer von  $CD4^+$  T-Zellen konnte die Entstehung der Autoimmunität verhindert werden [40].

Regulatorische T-Zellen können weiter in natürliche ( $nT_{reg}$ ) und induzierte  $T_{reg}$  ( $iT_{reg}$ ) unterteilt werden, wobei erstgenannte insbesondere im Rahmen der T-Zell-Differenzierung im Thymus entstehen, CD25 exprimieren und etwa 5-10 % der T-Zellen in der Peripherie ausmachen [49].  $iT_{reg}$  entstehen (*in-vitro*) in der Peripherie unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  und unter Abwesenheit proinflammatorischer Zytokine infolge der Induktion aktivierter  $CD4^+$  T-Zellen [34, 50]. Eine essenzielle Rolle der  $T_{reg}$  besteht in der Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz, Regulation sowie Kontrolle bzw. Inhibierung der Immunantwort und somit der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen. Im Gegensatz zu den T-Helferzellen wirken sie antiinflammatorisch, indem sie die Immunantwort und die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen als Antwort auf Pathogene inhibieren [40, 48]. So hemmen induzierte  $T_{reg}$  einerseits die Aktivierung naiver T-Zellen, andererseits inhibieren sie die Zytokinproduktion von  $T_H1$  und  $T_H2$  T-Zellen [51].  $T_{reg}$  zeichnen sich weiterhin über die Produktion von TGF- $\beta$  sowie der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-35 aus. Über diese Zytokine kann die T-Zelldifferenzierung und Proliferation von  $T_H1$  und  $T_H17$ -Zellen gehemmt werden, was schließlich zu einer Terminierung der Immunantwort führt [52, 53].

## 1.5 LIF und LIF-Rezeptor

*Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) ist ein Zytokin der IL-6 Familie [54]. Zu dieser Familie zählen weitere Zytokine wie z.B. Cardiotrophin-1 (CT-1), Cardiotrophin-Like-Cytokine (CLC), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), IL-6, IL-11, IL-27 und Oncostatin-M (OSM). LIF, ein 20 Kilodalton (kDa) schweres Glykoprotein [55], wurde erstmalig von Gearing et al. kloniert. Es erhielt seinen Namen aufgrund seiner einerseits differenzierungsfördernden und andererseits proliferationshemmenden Wirkung auf Leukämiezelllinien [56, 57]. LIF ist in der Lage, die terminale Differenzierung von Myeloid-Leukämiezellen einzuleiten und so das ungehemmte Wachstum zu verhindern [58]. Es entfaltet seine Wirkungen über einen heterodimeren Rezeptorkomplex, welcher einerseits aus der transmembranären Domäne, dem LIF-Rezeptor- $\beta$  (LIFR $\beta$ ), andererseits aus dem Glykoprotein gp130 aufgebaut ist [59]. Nach Bindung eines Moleküls LIF an den LIFR $\beta$  und dem so entstandenen Trimer

[60], erfolgt die Signalübertragung über die an den LIFR $\beta$  sowie das gp130 gebundenen, intrazellulär gelegenen Januskinasen (JAK). Über Phosphorylierung von Thyrosinresten werden die Signaltransduktionswege JAK/STAT, *Mitogen-Activated Protein-Kinase* (MAPK) und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI(3)K) aktiviert und somit in Abhängigkeit des Zelltyps die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von Zellen moduliert (Abb. 5). Sowohl der JAK/STAT- als auch der MAPK-Signaltransduktionsweg können über die Generierung einer Bindungsstelle für *Suppressor Of Cytokine Signalling 3* (SOCS3) durch Bindung von LIF an seinem Rezeptorkomplex negativ reguliert und somit unterdrückt werden [61, 62]. LIF-Rezeptoren werden von Zellen einer Vielzahl an Organen wie der Niere, dem zentralen Nervensystem [63], der Leber [64], den Knochen [65], dem Uterus [66] sowie auf Makrophagen und Monozyten des Hämatopoetischen Systems exprimiert [67]. Aufgrund der Vielzahl an exprimierenden Zellen sowie der unterschiedlichen Signaltransduktionswege, welche durch LIF initiiert werden können, wird LIF häufig als Zytokin mit pleiotroper Wirkung beschrieben [59].

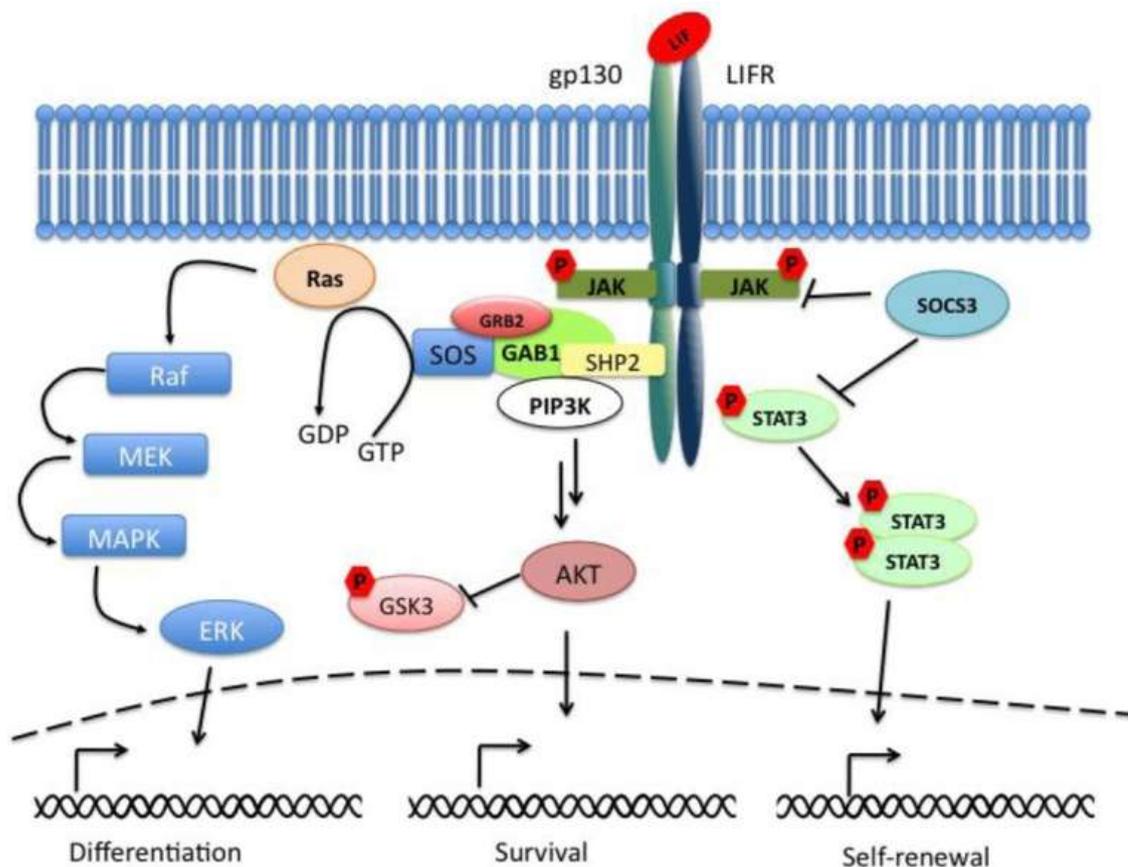


Abb. 5: **Wirkung von LIF über den LIFR mit Induktion der intrazellulären Signaltransduktionswege.** Gp130 = Glycoprotein 130; LIF = Leukemia Inhibitory Factor; LIFR = LIF Rezeptor; JAK = Januskinase; P = Phosphat; SOCS3 = Suppressor Of Cytokine Signaling 3; STAT3 = Signal Transducer And Activator Of Transcription 3; GRB2 = Growth Factor Receptor-bound Protein 2; GAB1 = GRB2-associated-binding Protein 1; SOS = Son Of Sevenless; GTP = Guanosintriphosphat; GDP = Guanosindiphosphat; Ras = Rat Sarcoma Protein; Raf = Rat Fibrosarcoma Protein; MAPK = Mitogen-activated Protein Kinase; ERK = Extracellular-signal Regulated Kinases; MEK = acronym MEK derives from MAPK/ERK Kinase; GSK3 = Glykogensynthase-Kinase 3; AKT = Gen der Proteinkinase B; PIP3K = Phosphoinositide 3-kinases [62] (Reproduktion und Nutzung genehmigt durch die Autoren und Rechteinhaber, Graf, U., Casanova, E., Cinelli, P., Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)).

Wesentliche Bedeutung wird LIF hinsichtlich der Embryogenese zugeschrieben. Exprimiert sowohl auf endometrialen Drüsenzellen sowie Blastozysten, unterstützt es die korrekte Implantation der Blastozyste in das Endometrium und trägt somit zur Fertilität und Reproduktion bei [68]. Zudem dient es dem Erhalt der Pluripotenz von murinen embryonalen Stammzellen (ES) [67].

LIF beeinflusst weiterhin den physiologischen Knochenstoffwechsel mit Wirkung auf Zellen der Skelettmuskulatur, Stromazellen, Chondrozyten, Osteoblasten, Osteozyten, Adipozyten und synovialen Fibroblasten und wie von N.A. Sims und R.W. Johnson beschrieben, maßgeblich inflammatorische Prozesse im Rahmen Rheumatoider Arthritis [69].

Nach Stand der Wissenschaft übt LIF auf das neuromuskuläre System regenerative Effekte aus [59]. Barnard und Kollegen konnten 1994 zeigen, dass LIF nach induziertem Muskeltrauma wesentlich an der schnelleren Regeneration des verletzten Muskelgewebes beteiligt war. So zeigte sich als Antwort auf die Schädigung einerseits eine deutlich erhöhte Expression der LIF-messenger-RNA (mRNA), andererseits eine erhöhte Anzahl an Muskelfibrillen im Anschluss an die lokale Injektion von LIF in das geschädigte Muskelgewebe [70]. Regeneratives Potential zeigt LIF zudem auf Kardiomyozyten nach Myokardinfarkt. So konnten Zou et al. 2003 zeigen, dass durch die Injektion von LIF-cDNA unmittelbar im Anschluss an die kardiale Schädigung sowohl die Proliferation von Kardiomyozyten angeregt wird als auch durch gesteigerte Sekretion des Proteins *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) die Neovaskularisation gefördert wird [71].

Reparative Vorgänge unterstützt LIF zudem im Nervengewebe. So zeigt sich im Anschluss an eine *in vivo* induzierte Demyelinisierung von Axonen im Hippocampus mittels Bis(cyclohexanon)oxaldihydraton (syn. Cuprizon) nach LIF-induzierter Stimulation von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen eine gesteigerte Expression von Myelin-Proteinen. LIF steigert somit die Remyelinisierung von Axonen in einem Modell der chronischen Demyelinisierung [72]. Darüber hinaus kommt es nach axonalem Trauma peripherer Nerven zu einer erhöhten Expression von LIF-mRNA, einem gesteigerten retrograden axonalen Transport von LIF zu den sensorischen Neuronen in den Gliazellen der Rückenmarkshinterwurzeln und somit einer deutlich gesteigerten Expression von LIF an der Stelle der nervalen Läsion [73, 74].

Bauer et al. fanden 2006 heraus, dass LIF sowohl in der subventrikulären Zone als auch im *Bulbus olfactorius* von Mäusegehirnen zu einer Erneuerung von neuralen Stammzellen (NCSs) beitrug, wodurch es zu einem deutlichen Anstieg an differenzierten Neuronen kam [75].

Protective Eigenschaften von LIF werden in experimentellen Arbeiten zur Schädigung von retinalen Photorezeptorzellen nach oxidativem Stress deutlich. So konnte im Anschluss an die hypoxische Schädigung von Photorezeptorzellen eine erhöhte Expression der LIF-mRNA sowie eine vermehrte Aktivierung der STAT3-Signalkaskade nachgewiesen werden. Folglich kann postuliert werden, dass LIF die retinalen Photorezeptorzellen vor Degeneration schützt und somit ihr Überleben steigert [76].

Einen wesentlichen Einfluss zeigt LIF im Rahmen inflammatorischer Prozesse und erfüllt dort protektive, antiinflammatorische Aufgaben. In einem Modell zur Multiplen Sklerose (MS), der Experimentellen Autoimmunen Encephalitis (EAE), konnten diese Effekte von LIF sehr deutlich dargestellt werden [77]. Eine kritische Rolle bei der Entstehung von inflammatorischen, zur Demyelinisierung führenden Prozessen im Rahmen der EAE spielen Interleukin-produzierende  $CD4^+$  T-Helferzellen sowie  $CD8^+$  T-Zellen [78]. Naive T-Zellen differenzieren in Abhängigkeit vom jeweiligen Zytokinmilieu in unterschiedliche Effektor-T-Zellen, die  $T_H1$ ,  $T_H2$  und  $T_H17$ -Zellen, oder in regulatorische T-Zellen aus. Wie bereits beschrieben, spielen dabei insbesondere  $T_H1$  und  $T_H17$ -Zellen eine Schlüsselrolle für inflammatorische Prozesse [79, 80]. IL-6 wirkt dabei proinflammatorisch und induziert gemeinsam mit TGF- $\beta$  eine  $T_H17$ -Zelldifferenzierung [81]. Im Liquor von Patienten mit MS wurden IL-17 produzierende  $T_H17$ -Zellen deutlich stärker exprimiert [82]. Im Modell der EAE konnte gezeigt werden, dass den neuronalen Progenitorzellen (NPZ) eine wesentliche Rolle zukommt, indem sie als Antwort auf die Schädigung verschiedene antiinflammatorische Zytokine produzieren, so beispielsweise eine gesteigerte Expression von LIF aufweisen [83]. LIF unterdrückt die  $T_H17$ -Zellantwort, indem es über den auf den  $T_H17$ -Zellen stark exprimierten LIF-Rezeptor Signaltransduktionswege initiieren kann. Nach Rezeptorbindung induziert LIF über die Aktivierung von *Extracellular-Regulated-Kinase* 1 und 2 (ERK-1, ERK-2) die Hochregulation von SOCS3. SOCS3 wiederum hemmt den STAT3-Signaltransduktionsweg, wodurch schließlich die Expression von IL-17 unterdrückt und somit die IL-6-induzierte Differenzierung von  $T_H17$ -Zellen gehemmt wird [78]. Obwohl IL-6 und LIF der gleichen Zytokinfamilie entstammen und zur Signaltransduktion beide die Rezeptoruntereinheit gp130 benötigen [59], zeigt sich hier beispielhaft die gegensätzliche Wirkweise der beiden Zytokine (Abb.6).

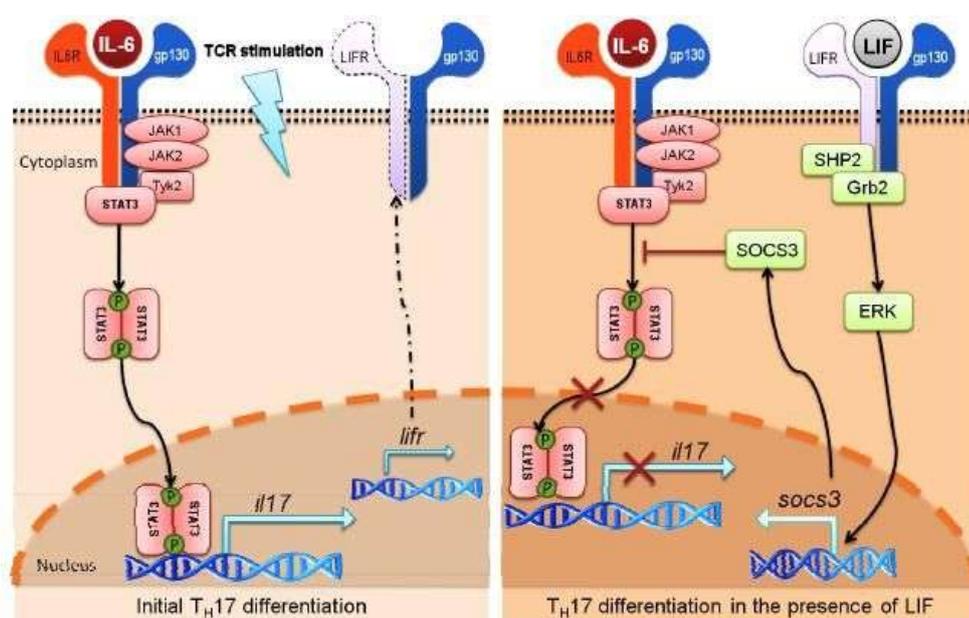


Abb. 6: Signaling mechanism of LIF through LIFR in relation to  $T_H17$  cell differentiation [84].

Mit Hilfe des Modells der EAE konnte ebenfalls ein wesentlicher Effekt von LIF auf  $T_H1$  T-Zellen und  $T_{reg}$  nachgewiesen werden [77]. Studien von Gao et al. zeigen, dass LIF die Expression von FOXP3 steigert und somit die Differenzierung regulatorischer T-Zellen fördert [85]. LIF leistet in Abhängigkeit des intrazellulären Signaltransduktionsweges, der über den LIF-Rezeptorkomplex aktiviert wird sowie in Abhängigkeit der den LIFR exprimierenden Zellen und des umgebenden Zytokinmilieus eine Vielzahl an Aufgaben. So unterstützt es regenerative, reparative und protektive Vorgänge und leistet einen nicht unwesentlichen Beitrag zur Verminderung destrukturierender Entzündungsreaktionen im Rahmen inflammatorischer Prozesse.

## 1.6 Die Rolle von LIF in der Niere

Eine wesentliche Rolle wird LIF im Hinblick auf die Umwandlung von mesenchymalem in epitheliales Gewebe und somit auf die Nephrogenese zugeschrieben. Yoshino et al. zeigten 2003 anhand eines Ischämie-Reperfusion-Modells, dass LIF an epithelialen Regenerationsprozessen nach tubulärer Schädigung beteiligt ist. Anstoß für diese Untersuchungen gab die Erkenntnis, dass LIF bereits während der Nephrogenese in den Zellen der Ureterknospen exprimiert wird. Der LIF-Rezeptor (LIFR) wird neben den Zellen der Ureterknospen zusätzlich im nephrogenen Mesenchym exprimiert [86]. Die Reparaturmechanismen nach ischämischer Schädigung ähneln dabei dem physiologischen embryonalen Reifungsprozess der Nephrone [87]. Eindrücklich sind zudem die Ergebnisse von Kosfeld und Kollegen, welche 2017 einen möglichen Zusammenhang zwischen angeborenen Malformationen des Urogenitaltraktes, der häufigsten Ursache für chronische Nierenerkrankungen im Kindesalter, und Mutationen im LIFR erkannten. 3.3 % der in die Studie eingeschlossenen Patienten zeigten in einer Analyse des gesamten Exons neue, heterozygote Rasterschubmutationen im LIFR-Gen. Diese führten zu einer Instabilität der LIF-mRNA. Die LIF-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung der STAT3-Signalkaskade war deutlich reduziert. Analog dazu wiesen  $LIFR^{-/-}$ -Mäuse Malformationen im Urogenitaltrakt auf, welche mit der Entwicklung von Hydronephrose, Hydroureter, ektopen Ureteranlagen, reduziertem Uretervolumen sowie muskulärer Hypertrophie einhergingen [88].

Neueste Ergebnisse zur Rolle von LIF in der Niere wurden im Jahr 2020 von Yamada et al. veröffentlicht. LIF erhöhte die Produktion von *Galactose-deficient* (Gd)-IgA1 Immunkomplexen in IgA1-sezernierenden Zellen bei Patienten mit IgA-Nephropathie via STAT1. Dies geschah jedoch nicht über die Aktivierung von Januskinasen, sondern über die Aktivierung einer Proteintyrosinkinase der Src (Akronym: Sarcoma) -Familie (SFK's, *Src Family Kinase*). Gewonnen wurden die Zellen aus peripherem Blut. In den Kontrollgruppen kam es nicht zu erhöhter Produktion von Gd-IgA1. Die LIF-induzierte Überproduktion von Gd-IgA1 konnte in *STAT1-knockdown*-Mäusen blockiert werden, sodass diese Methode ein denkbarer Ansatz für die Diagnostik oder therapeutische Interventionen im Rahmen der IgA Nephropathie wäre [89].

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen eine Verminderung fibrotischen Gewebes der Niere bei mit LIF behandelten Tieren mit Reduktion von Kollagen Typ 1 (Alpha-1-Typ-1-Kollagen, Col1 $\alpha$ 1) in der Proteinanalyse von Gewebeproben sowie in der Histologie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ziel der Arbeit war es, den Effekt einer LIF-Therapie auf die renale Inflammation und die Entwicklung einer renalen tubulointerstitiellen Fibrose im UUO-Modell zu untersuchen [90]. Der Grundannahme folgend, dass LIF die Differenzierung von IL-17 produzierenden T<sub>H</sub>17-Zellen in verschiedenen Organsystemen inhibiert und zelluläre Regenerationsprozesse beeinflusst [78], konnte zudem gezeigt werden, dass LIF die Genexpression profibrotischer und proinflammatorischer Zytokine im Nierengewebe signifikant abschwächt. Weiterhin wurde die Entzündungszellinfiltration von CD3<sup>+</sup> sowie F4/80<sup>+</sup> Zellen in das Nierengewebe in der Behandlungsgruppe verringert. LIF führte weiterhin zu einem signifikanten Anstieg von antiinflammatorischen Zytokinen im Nierengewebe sowie einer signifikanten Reduktion systemischer proinflammatorischer Zytokine im Plasma [90].

Des Weiteren spielt LIF eine wesentliche, bisher jedoch noch nicht vollständig verstandene Rolle in protektiven Mechanismen. Ein Beispiel ist die Protektion von Podozyten im Anschluss an eine Schädigung durch oxidativen Stress mittels Hochdosisglucose-Exposition, wie sie in Krankheitsbildern wie der diabetischen Nephropathie auftritt [91].

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits einen regulatorischen Effekt von LIF auf die Entwicklung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose darstellen. Die molekularen Mechanismen der renalen tubulointerstitiellen Fibrose und der damit einhergehende Funktionsverlust der Niere sind aufgrund der Komplexität sowie der Beteiligung vieler verschiedener Zelltypen bisher nicht vollständig geklärt. Der Grundannahme folgend, dass LIF im Rahmen der renalen tubulointerstitiellen Fibrose das inflammatorische Gleichgewicht zugunsten regulatorischer T-Helferzellen verschiebt und die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen unterdrückt, stellten wir für unsere Arbeit die Hypothese auf, dass die Therapie mit LIF den inflammatorischen und fibrotischen Gewebeschaden in einem Modell der renalen tubulointerstitiellen Fibrose reduziert.

Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften von LIF legten wir als Arbeitsgruppe den Schwerpunkt neben der Darstellung der antifibrotischen Effekte von LIF auf das Verständnis dieser immunmodulatorischen Prozesse.

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Reduziert LIF die renale tubulointerstitielle Fibrose?
2. Reduziert LIF die Genexpression von proinflammatorischen Entzündungs- und Fibrosemarkern?
3. Inwiefern beeinflusst LIF die Infiltration lokaler Entzündungszellen und deren Zusammensetzung?

Zur Untersuchung des Mechanismus der renalen tubulointerstitiellen Fibrose wurde im Rahmen dieser Arbeit das UUO-Modell angewendet. Es handelt sich hierbei um ein etabliertes Schädigungsmodell, mit Hilfe dessen die pathogenetischen Mechanismen der CKD an Mäusen erzeugt werden können.

Neben histologischer sowie immunhistochemischer Untersuchungen erfolgten zudem Protein- und Genanalysen. Ein weiterer wesentlicher Fokus der Arbeit lag auf der Quantifizierung der lokalen Entzündungszellpopulation im geschädigten Gewebe.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

| Produkt  | Hersteller/Bezugsquelle   |
|--|---|
| 96-Well PCR Platten  | STAR LAB, Hamburg (D), I1402-9700   |
| CELLSTAR®TUBES (Falcon)  | Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster (Österreich), Kat. -Nr. 227261 (50ml), Kat. -Nr. 188271 (15ml) |
| Combi tips (5 ml)  | Eppendorf   |
| Culture Tubes with Closure 12x75 mm, 5.0 ml                      | VWR, North America, Kat. -Nr. 211-0064  |
| Deckglas 24x32 mm  | Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde (D)   |
| Edding (grün/schwarz)  | Edding AG, Ahrensburg (D)   |
| Eppendorfgefäße (0.5-5 ml)                                       | Eppendorf, Hamburg (D)  |
| FEATHER DISPOSABLE SCALPEL Nr. 11                                | Pfm Medical Ag Köln (D)   |
| Fine Bore Polythene Tubing, 0.28 mm ID                           | PORTEX  |
| gDNA Eliminator Mini Spin Columns 50                             | Qiagen, Hilden (D), Mat. -Nr. 1030958   |
| Histosette I   | SIMPORT, Canada   |
| Kanülen Sterican (0.30x12 mm/0.45x12 mm)                         | BRAUN, Ref.: 4656300  |
| Klebefolie für 96-Well-PCR-Platten                               | BIOplastics, Landgraaf (NL), 157300   |
| Kompressen, steril   | ROESER  |
| Nitrile PowderFree Examination Gloves NITRA-TEX Micro-Touch®     | Ansell, Ref. 700112   |
| Nitrocellulose Blotting Membrane, 8.5x5.5 cm, 0.45 µm Porengröße | GE HealthcareLife Science Germany, 10600002   |
| Omnifix® F 1 ml  | B.Braun, Melsungen (D)  |
| OP-Tücher, steril  | HARTMANN  |
| Pasteurpipetten 150 mm   | BRAND, Wertheim (D), Kat. -Nr. 747715   |
| Petrischalen   | Sarstedt, Nümbrecht (D)   |

|  |  |
|--|--|
| Pipettenspitze mit Dualfilter 10µl M PCR clean/sterile   | Eppendorf, Kat. -Nr. 022491211             |
| Pipettenspitzen (20, 200, 1000 µl)                       | Sarstedt, Nümbrecht (D)                    |
| Prolene  | BRAUN                                      |
| QIAshredder® Mini Spin Column                            | Qiagen                                     |
| Rasierklingen CK07.1                                     | Apollo-Herkenrath, Solingen (D)            |
| RNeasy Mini Spin Column                                  | Qiagen                                     |
| Safe Lock Tubes (0.5 ml und 2 ml)                        | Eppendorf, Hamburg (D)                     |
| Superfrost®PLUS, Menzelgläser, silanisiert, 25x75x1.0 mm | Thermo Fisher Scientific (D)               |
| Thermo CryoTube™Vials                                    | Thermo Fisher Scientific, Kat. -Nr. 368632 |
| TissueRuptor®Disposable Probes                           | Qiagen, Hilden (D), Kat. -Nr. 990890       |
| Vicryl Polyglactin 910                                   | Ethicon                                    |
| Wattetupfer  | Roeser                                     |

Tabelle 1: Übersicht über Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangaben.

## 2.1.2 Laborgeräte

| Produkt                                  | Hersteller/Bezugsquelle                         |
|--|---|
| 7300 Real Time qPCR Cycler               | Life Technologies, Darmstadt (D)                |
| Akku Schermaschine Aesculap Exacta GT415 | Aesculap  |
| Alpha Innotech Imager Fluor Chem®FC2     | BiozymScientific GmbH, Hess. Oldendorf (D)      |
| Analog Heatblock                         | VWR   |
| Bio TDB-100 Dry Block Heating Thermostat | BIOSAN  |
| BioPhotometer™                           | Eppendorf                                       |
| Cell Camper®Mini-12                      | neoLab  |
| Chirurgische Schere                      | Allgaier Instrumente (D), [eg] 1060.10 rostfrei |
| Eismaschine AF 80                        | Scotsman®, Mailand (Italien)                    |
| Electrophoresis Power Supply EPS300      | Pharmacia Biotech                               |
| Elektrophoresekammer Function Line       | Heraeus   |
| Färbekammer                              | Werkstattanfertigung, intern                    |
| Feinpinzette                             | AESFULAP stainless FD281R                       |
| Feinpinzette gebogen                     | Allgaier Instrumente stainless (D)              |
| Feinwaage                                | BIZERBA Max. 310g                               |

|   |  |
|---|--|
| <b>Heraeus™ Hera Safe HS12</b>  | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)     |
| <b>Sicherheitswerkbank</b>  |  |
| <b>Heraeus™ Multifuge 4KR Centrifuge</b>                              | Thermo Electron Corporation                |
| <b>Heraeus™ Pico 21 Centrifuge</b>                                    | Thermo Electron Corporation                |
| <b>Heraeus™ Wärmeschrank Typ B12</b>                                  | Thermo Scientific, Langenselbold (D)       |
| <b>Irispinzette, stainless</b>  | Allgaier Instrumente (D)                   |
| <b>Kamera D1000</b>   | Nikon                                      |
| <b>Kimberly-Clark ® Professional Papiertücher fusselfrei 11x21 cm</b> | KIMTECH Science (UK)                       |
| <b>Knüpfpinzette gebogen mit Maul</b>                                 | Aesculap, Tuttlingen (D)                   |
| <b>Kühlblöcke für Reaktionsgefäße</b>                                 | Eppendorf, Hamburg (D)                     |
| <b>Kühlplatte</b>   | MEDITE COP30                               |
| <b>Laborglasflaschen (diverse Größen)</b>                             | Schott, Mainz (D)                          |
| <b>Labormauslinie C57BL/6j</b>  | Janvier, Le Genest Saint Isle (Frankreich) |
| <b>Labor-pH-Meter 766 Calimatic</b>                                   | Knick                                      |
| <b>Laborwaage für Agarose, Modell 572</b>                             | KERN, Balingen                             |
| <b>Lichtmikroskop</b>   | Olympus BX40                               |
| <b>Magnet-Rührplatte</b>  | IKA®RET basic safety control               |
| <b>Makrolon® Polycarbonat Käfige Typ 2 und Typ 3</b>                  | Beyer                                      |
| <b>MicroAmp® Splash Free Support Base</b>                             | Applied Biosystems Singapur                |
| <b>Mikroskop</b>  | Zeiss                                      |
| <b>Mikroskop-Leuchte</b>  | Zeiss KL 1500LCD                           |
| <b>Mikrotiterplatte 96 well</b>                                       | SARSTEDT, Nürmbrecht (D)                   |
| <b>Mikrotom</b>   | LEICA, Jung Histoslides 2000               |
| <b>Mikrowelle NN-E202-CB</b>  | Panasonic, Kadoma (J)                      |
| <b>Mini PROTEAN ® Tetra cell</b>                                      | BIORAD                                     |
| <b>Mini Protean Tetra Electrode Assembly</b>                          | BIORAD, München (D)                        |
| <b>Mini Trans-Blot Gel holder Cassette</b>                            | BIORAD München (D)                         |
| <b>Mini Trans-Blot® Cell</b>  | BIORAD Laboratories, München (D)           |
| <b>Mini-Protean Casting Frame</b>                                     | BIORAD, München (D)                        |
| <b>Mini-Protean Casting Stand</b>                                     | BIORAD, München (D)                        |
| <b>Mini-Protean Casting Stand Gaskets</b>                             | BIORAD, München (D)                        |
| <b>Mini-Protean Combs 0.75 m</b>                                      | BIORAD, München (D)                        |
| <b>Mini-Protean Gel Releasers</b>                                     | BIORAD, München (D)                        |

|   |  |
|---|--|
| <b>Mr. Frosty™ Gefrierbehälter</b>                                  | Thermo Scientific, Kat. -Nr. 5100-0001                   |
| <b>Multipette®Stream</b>  | Eppendorf  |
| <b>Nadelhalter, stainless</b>                                       | Aesculap   |
| <b>NanoDrop 2000c Spectrophotometer</b>                             | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)                   |
| <b>Paraffin-Gießstation</b>   | LEICA EG 1120  |
| <b>Perfusor Apparatus 11Plus</b>                                    | HARVARD, Kat. -Nr. 70-2209                               |
| <b>Pipetten</b>   | Eppendorf  |
| <b>Pipettierhilfe Easypet</b>                                       | Eppendorf, Hamburg (D)                                   |
| <b>Plattengestell 96-well qPCR</b>                                  | Applied Biosystems, Darmstadt (D)                        |
| <b>Plattenreader DTX 880 Multimode Detector</b>                     | Beckman Coulter®   |
| <b>Polyäthylenschlauch (Fine Bore Polythene Tubing), ID 0.28 mm</b> | Smiths Medical International, PORTEX, Ref.: 800/100/100  |
| <b>Rotlichtlampe</b>  |  |
| <b>Shaker Rocking Platform</b>                                      | VWR, Darmstadt (D)                                       |
| <b>Stereomikroskop</b>  | Olympus SD 30  |
| <b>Strabismus-Federschere</b>                                       | Allgaier Instrumente stainless (D)                       |
| <b>Summenzähler</b>   | IVO  |
| <b>Thermocycler BIOMETRA®T1 personal</b>                            | Biometra   |
| <b>Thermomixer comfort 1.5 ml</b>                                   | Eppendorf  |
| <b>Tischzentrifuge 5417R</b>  | Eppendorf  |
| <b>TissueRuptor®</b>  | Qiagen, Hilden (D)                                       |
| <b>Vakuumpumpe PC3012 Vario</b>                                     | Vacuubrand®, Wertheim (D)                                |
| <b>Vortexer REAX control</b>  | Heidolph, Schwabach (D)                                  |
| <b>Waage</b>  | A&D (Korea)  |
| <b>Wärmematte Tier-OP</b>   |  |
| <b>Wärmeschrank Modell 200 D06058</b>                               | Memmert, Schwabach (D)                                   |
| <b>Wasserbad</b>  | Pfm medical (D)  |
| <b>Wasserbad</b>  | GFL®- Gesellschaft für Labortechnik mbH<br>Burgwedel (D) |
| <b>Zentrifuge (Centrifuge 5910R)</b>                                | Eppendorf  |

Tabelle 2: Übersicht über verwendete Geräte mit Herstellerangaben.

### 2.1.3 Chemikalien, Kits, Enzyme, Medikamente

| Produkt  | Bezugsquelle/ Herstellerangaben             |
|--|---|
| 10 % Neutral Buffered Formalin v/v<br>pH 6.8-7.2                         | Richard-Allan Scientific                    |
| 100bp DNA Ladder   | New England BioLabs, Frankfurt a.M. (D)     |
| Agarose Roti®agarose NEEO Ultra-Qualität                                 | Carl Roth, Karlsruhe (D), 2267.4            |
| Albunorm 5 % Humanalbumin 12.5 g in<br>250ml N                           | Octapharma, Langenfeld (D)                  |
| Alleinfuttermittel für Mäuse   | Ssnif V1184-000                             |
| Allprotect Tissue Reagent  | Qiagen, Hilden (D), Kat. -Nr. 76405         |
| Ammonium Persulfat (APS)   | Biomol, Hamburg (D), 50404                  |
| Antibody-Diluent   | DAKO Nr. S0809                              |
| Augensalbe mit 5 % Dexpanthenol  | Bepanthen                                   |
| Bacillol®AF  | HARTMANN                                    |
| Betaisodona Lösung   | ACA Müller/ADAG Pharma AG                   |
| Bromphenolblau   | Sigma, Steinheim, B5525                     |
| Buffer RD DNA Digest Buffer  | Qiagen, Hilden (D), Kat. -Nr. 79254         |
| Buprenovet (Buprenorphin 0.3 mg/ml für<br>Hunde und Katzen)              | Bayer Vital GmbH, Zul. -Nr.: 401045.00.00   |
| Collagenase A from Clostridium<br>histolyticum, lyophilized, non-sterile | Roche, Mannheim (D)                         |
| Color Protein Standard Broad Range<br>Amt 150 gel lanes #P7712S          | New England BioLabs                         |
| Complete Mini®Tabletten  | Roche Diagnostics GmbH Mannheim (D)         |
| Dimethyl Sulphoxide<br>(DMSO) Hybri-Max                                  | SIGMA Life Science, Steinheim (D), D2650    |
| EnVision™FLEX Wash Buffer (20X)  | Dako Nr. DM831                              |
| Essigsäure 100 %   | Carl Roth, Karlsruhe (D), 6755.2            |
| Ethanol 100 %  | MERCK KGaA Darmstadt (D), 1.11727           |
| Ethanol 80 %, vollvergällt   | Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken (D) |
| Ethanol 99.5 %, vollvergällt   | VWR BDH Chemicals                           |
| Ethidiumbromidlösung 0.025 %   | Carl Roth, Karlsruhe (D), HP47.1            |
| Ethylendiamintetraessigsäure EDTA pH 8                                   | Merck, Darmstadt (D)                        |
| Ficoll 400   | Pharmacia Biotech, 17-0400-01               |

|  |   |
|--|---|
| <b>gDNA-wipeout buffer</b>                                   | Qiagen  |
| <b>Glycerin</b>  | Merck, Darmstadt (D), 104094                          |
| <b>Glycin</b>  | AppliChem, Darmstadt (D), A1377                       |
| <b>Hämalaunlösung sauer nach Meyer</b>                       | Carl Roth, Karlsruhe (D)                              |
| <b>Hautantiseptikum Octeniderm® farblos</b>                  | Schülke   |
| <b>Heparin-Natrium 25 000 I.E./5 ml</b>                      | Rotexmedica   |
| <b>HotStarTaq® DNA Polymerase Kit</b>                        | Quiagen Hilden (D), Kat.Nr.203205                     |
| <b>ImmPRESS™ anti Rabbit HRP Peroxidase (made in horse)</b>  | Vector Labs, Burlinghame (US)                         |
| <b>ImmPRESS™ anti Rat IgG, HRP-Peroxidase (made in goat)</b> | Vector Labs, Burlinghame (US)                         |
| <b>Isopropanol 100 %</b>                                     | Zentralapotheke Uniklinik Düsseldorf                  |
| <b>Isopropanol 70 % CH<sub>3</sub>CHOHCH<sub>3</sub></b>     | Nalgene™, Kat. -Nr. 20-2425-0504                      |
| <b>Kaliumchlorid KCl</b>                                     | Sigma, Steinheim, P9541                               |
| <b>Kaliumhydrogenphosphat Mallinckrodt</b>                   | Mallinckrodt Baker B.V., Deventer (Niederlande), 0240 |
| <b>Ketamin 10 %</b>  | Medistar, Zul. -Nr.: 13690.00.00                      |
| <b>Kodan® Tinktur forte</b>                                  | Schülke   |
| <b>Korsolex AF aldehydfrei</b>                               | Bode Chemie, Hamburg (D)                              |
| <b>Liquid DAB + Substrate Chromogen System</b>               | Dako, EnVision Kit Nr. DM827                          |
| <b>Lumi-Light<sup>Plus</sup> Western Blotting Substrate</b>  | Roche, Mannheim (D)                                   |
| <b>Magermilchpulver (Blotting grade, pulv., fettarm)</b>     | Carl Roth, Karlsruhe (D)                              |
| <b>Methanol</b>  | VWR Chemicals   |
| <b>Microscopy Paraffin pastilles</b>                         | Merck, Darmstadt (D)                                  |
| <b>Paraffin wax 100 %</b>                                    |   |
| <b>Natriumchlorid (NaCl)</b>                                 | FRESENIUS KABI, Bad Homburg (D)                       |
| <b>Nuclease-free water</b>                                   | Qiagen, Hilden (D)                                    |
| <b>OrangeG</b>   | Fluka, Buchs, Schweiz, 75380                          |
| <b>PCR-Puffer 10x</b>  | Qiagen, Hilden (D)                                    |
| <b>Phosphate Buffered Saline (PBS)</b>                       | Dulbecco Biochrom GmbH, L1825                         |
| <b>Picro-Sirius-Red Stain Kit (for Collagen)</b>             | Dianova GmbH Hamburg (D)                              |
| <b>Pierce TM BCA Protein Assay Kit</b>                       | Thermo Scientific, Rockford (USA) #23225              |
| <b>Propanol (2-Propanol) 100 %</b>                           | VWR Chemicals   |

|   |   |
|---|---|
| <b>Proteinase K</b>   | Dako, S3020   |
| <b>QuantiTect® Reverse Transcription Kit</b>  | Qiagen, Hilden (D), 205313  |
| <b>R.T.U. Normal Goat Serum (2.5 %)</b>   | Vector Labs, BIOZOL Diagnostica Vertrieb (D)                            |
| <b>R.T.U. Normal Horse Serum (2.5 %)</b>  | Vector Labs   |
| <b>Recombinant Mouse Leukemia Inhibitory Factor, 20 kDa, 181 amino acid residues</b>    | M Millipore, LIF 2010   |
| <b>RNA-Later</b>  | Qiagen, Hilden (D)  |
| <b>RNase AWAY®</b>  | MβP® Molecular Bio Products, Assembled in Mexico Inc San Diego, 7005-11 |
| <b>RNeasy® Plus Mini Kit Qiagen</b>   | Qiagen, Hilden (D), Kat. -Nr. 74136                                     |
| <b>Rompun 2 % Injektionslösung Xylazin</b>  | Bayer   |
| <b>Roti®-Mount Eindeckmedium</b>  | Carl Roth, Karlsruhe (D)  |
| <b>Rotiphorese® Gel 30 % (37.5:1)</b>   | Carl Roth, Karlsruhe (D), 3029.2  |
| <b>Sample Buffer, Laemmli Elektrophoresis Reagent 2x</b>                                | SIGMA®  |
| <b>SDS</b>  | Biomol, Hamburg (D), 04051.1  |
| <b>Substratpuffer</b>   | Dako Nr. SM 803   |
| <b>TaqMan® Gene Expression Master Mix 2X</b>  | ThermoFisherScientific Foster City (USA)                                |
| <b>Target Retrieval Solution pH9 (10X)</b>  | Dako, S2367   |
| <b>TEMED 99 % (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, 1.2-Bis(dimethylamino)-ethan)</b> | Carl Roth, Karlsruhe (D), 2367  |
| <b>TRIS Base</b>  | Carl Roth, Karlsruhe (D), 4855.2  |
| <b>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</b>   | SIGMA®, Steinheim, T5941  |
| <b>Triton® X-100</b>  | SIGMA®, Steinheim, T9284  |
| <b>Tween® 20 (Polysorbate)</b>  | Merck, Darmstadt (D), 8.17072.1000                                      |
| <b>Wasserstoffperoxid-Lösung 30 %</b>   | MERCK-Schuchardt, Darmstadt (D), 8070.2                                 |
| <b>Xylol (Isomergemisch)</b>  | VWR BDH Chemicals, AnalaR NORMAPUR                                      |
| <b>β-Mercaptoethanol</b>  | SIGMA GmbH Steinheim (D)  |

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Chemikalien, Kits und Enzyme mit Herstellerangaben.

## 2.1.4 Antikörper

### Primärantikörper

| Antikörper   | Quelle                          | Verdünnung      |
|--|---------------------------------|-----------------|
| <b>Anti-CD3 Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3, gebrauchsfertig</b>              | Dako Nr. IS503                  | gebrauchsfertig |
| <b>Anti-F4/80, Klon C1:A3-1</b>  | Serotec, Kat. -No. MCA497RT     | 1:100           |
| <b>Anti-Kollagen I (Collagen Type I Antibody, rabbit anti-mouse IgG 0.5ml)</b> | Mdbioproducts, Kat. -No. 203002 | 1:15 000        |
| <b>Anti-β-Actin</b>  | Sigma, Steinheim (D)            | 1:30 000        |

Tabelle 4: Übersicht über verwendete Primärantikörper mit Bezugsquelle und Verdünnung.

### Sekundärantikörper

| Antikörper  | Quelle                   | Verdünnung      |
|---|--------------------------|-----------------|
| <b>Goat anti-rabbit IgG-HRP, 200 µl/0.5 ml</b>        | Santa Cruz Biotechnology | 1:20 000        |
| <b>ImmPress anti rabbit, HRP, CD3</b>                 | Vector, Nr. MP 7401      | gebrauchsfertig |
| <b>ImmPress anti Rat, HRP, F4/80</b>                  | Vector Nr. MP 7444       | gebrauchsfertig |
| <b>Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunglobuline HRP</b> | Dako, Ref. P0447         | 1:10 000        |

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Sekundärantikörper mit Bezugsquelle und Verdünnung.

### Antikörper für die Durchflusszytometrie

| Antikörper            | Fluorochrome | Firma         | Bestellnummer | µg/Ansatz |
|-----------------------|--------------|---------------|---------------|-----------|
| <b>CD3e</b>           | PE-CF594     | BD Horizon    | 562286        | 0.5       |
| <b>CD4</b>            | BV 510       | BD Horizon    | 563106        | 0.5       |
| <b>CD8a</b>           | APC-Cy7      | BD Pharmingen | 557654        | 0.5       |
| <b>CD25</b>           | APC          | BD Pharmingen | 558643        | 0.6       |
| <b>CD44</b>           | BV 785       | BioLegend     | 103041        | 0.4       |
| <b>CD183 (CXCR3)</b>  | PE-Cy7       | Invitrogen    | 25-1831-80    | 0.5       |
| <b>CD19</b>           | PE           | BD Pharmingen | 557399        | 0.6       |
| <b>CD127 (IL-7Ra)</b> | FITC         | BioLegend     | 121105        | 1.5       |
| <b>CD196 (CCR6)</b>   | BV 421       | BioLegend     | 129817        | 0.075     |
| <b>CD197 (CCR7)</b>   | BV 605       | BioLegend     | 120125        | 0.6       |
| <b>CD45</b>           | BV 650       | BioLegend     | 103151        | 0.3       |

|              |             |           |        |      |
|--------------|-------------|-----------|--------|------|
| <b>CD62L</b> | Alexa 700   | BioLegend | 104426 | 0.75 |
| <b>CCR4</b>  | PerCP-Cy5.5 | BioLegend | 131219 | 0.5  |

Tabelle 6: Übersicht über verwendete fluorochrommarkierte Antikörper für die Durchflusszytometrie.

## 2.1.5 TaqMan® Gene Expression Assays

Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems diente als Bezugsquelle aller der in Tabelle 7 aufgeführten Assays für die quantitative Real Time PCR (qPCR).

Als endogenes Referenzgen wurde die Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet.

| TaqMan® Gene Expression Assays  | Assay ID      |
|---------------------------------|---------------|
| <b>Col1<math>\alpha</math>1</b> | Mm00801666_g1 |
| <b>GAPDH</b>                    | Mm99999915_g1 |
| <b>IL-17 A</b>                  | Mm00439618_m1 |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>   | Mm00434228_m1 |
| <b>IL-6</b>                     | Mm00446190_m1 |
| <b>MCP-1 (CCL2)</b>             | Mm00441242_m1 |
| <b>NF<math>\kappa</math>B</b>   | Mm01297400_m1 |
| <b>PAI-1 (Serpine)</b>          | Mm00435858_m1 |
| <b>PDGFR<math>\alpha</math></b> | Mm00440701_m1 |
| <b>RANTES (CCL5)</b>            | Mm01302427_m1 |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>  | Mm00443258_m1 |
| <b>TGF-<math>\beta</math>1</b>  | Mm01178820_m1 |

Tabelle 7: Übersicht über verwendete TaqMan® Gene Expression Assays für qRT-PCR von ThermoFisherScientific.  
Mm = *Mus musculus*.

## 2.1.6 Softwareprogramme

| Produkt   | Hersteller/Verwendungszweck  |
|---|--|
| <b>7300 Real Time Sequence Detection Software Version 1.4</b>   | Applied Biosystems, Foster City (USA),<br>Bedienung des Real Time PCR Gerätes              |
| <b>AlphaEaseFC™ Version 6.0.0 Imaging and Analysis Software</b> | Alpha Innotech, Santa Clara (US),<br>Densitometrische Quantifizierung der<br>Western Blots |
| <b>digiCAM Control 2V.2.1.0.0</b>                               | Fotos histologischer Schnitte  |
| <b>EndNote X9</b>   | Clarivate Analytics, Literaturverwaltung   |

|  |  |
|--|--|
| <b>FluorChem FC2 Version 6.0.2</b>                   | Alpha Innotech, Santa Clara (US) Imaging System                          |
| <b>GraphPad Prism 8</b>                              | GraphPad Software, San Diego (US), Teststatistik                         |
| <b>ImageJ Image Processing and Analysing in Java</b> | Wayne Rasband, Bethesda (US), Bildbearbeitung Histochemie                |
| <b>Microsoft Excel 2016 für Windows</b>              | Microsoft, Redmont (US), Statistische Auswertung und Diagramme           |
| <b>NanoDrop® 2000/2000c, Version 1.4.2</b>           | Thermo Fisher Scientific, Waltham (US) Spectrophotometrische Messung RNA |
| <b>Powerpoint 2016 für Windows</b>                   | Microsoft, Redmont (US)  |
| <b>tick@lab</b>                                      | Verwaltungs- und Bestellsystem Versuchstiere                             |
| <b>Word 2016 für Windows</b>                         | Microsoft, Redmont (US), Erstellen der Dissertation                      |

Tabelle 8: Übersicht über verwendete Softwareprogramme mit Herstellerangaben bzw. Verwendungszweck.

### 2.1.7 Puffer, Lösungen, Gele, Reaktionsansätze

| <b>Puffer und Lösungen für Analysen von Proteinen (SDS PAGE)</b> | <b>Zusammensetzung</b>  |
|--|---|
| <b>1 % Triton X-100 Lysispuffer</b>                              | 50 mM TrisHCl pH 7.4<br>150 mM NaCl (4 °C)<br>1 mM EDTA<br>2 % SDS<br>1 % Triton<br>1 Tablette Complete Mini®/10 ml                 |
| <b>PBS (pH 7.4)</b>  | 137 mM NaCl<br>2.68 mM KCl<br>4.29 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O<br>1.47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| <b>Trenngelpuffer (pH 8.8)</b>                                   | 90 ml Tris HCl 2 M<br>285 ml Tris Base 2 M<br>10 ml SDS 20 %<br>Auf 500 ml mit <i>Aq. dest.</i> auffüllen                           |

|  |  |
|--|--|
| <b>Sammelgelpuffer (pH 6.9)</b>                                      | 60.5 ml Tris HCl 2 M<br>2 ml Tris Base 2 M<br>5 ml SDS 20 %<br>Auf 250 ml mit <i>Aq. dest.</i> auffüllen   |
| <b>Polyacrylamidgellösung 7 %</b><br><b>Für 2 Trenngele á 3.9 ml</b> | 2.4 ml <i>Aq. dest.</i><br>5.5 ml Trenngelpuffer<br>2.1 ml Rotiphorese<br>90 µl 10 % APS<br>15 µl TEMED  |
| <b>Für 2 Sammelgele</b>  | 1.135 ml <i>Aq. dest.</i><br>1.665 ml Sammelgelpuffer<br>0.535 ml Rotiphorese<br>40 µl 10 % APS<br>5µl TEMED   |
| <b>2-fach Laemmli-Ladepuffer</b>                                     | 50 ml Tris-HCl 1M (pH 6.8)<br>100 ml 20 % SDS<br>100 ml Glycerol<br>1 g Bromphenol blau<br>Auf 500 ml mit <i>Aq. dest.</i> auffüllen<br>[Mit DTT versetzt bei -20 °C lagern (900 µl<br>2-fach Laemmli + 100 µl DTT 1 M)] |
| <b>Laufpuffer für SDS-PAGE 10x</b>                                   | 144 g Glycin<br>29 g Tris Base<br>10 g SDS<br>Auf 1 L mit <i>Aq. dest.</i> auffüllen   |
| <b>Transferpuffer für Tank Blot</b>                                  | 31 mM Tris Base<br>240 mM Glycin<br>20 % Methanol  |
| <b>Proteinwaschpuffer 25x</b>  | 340 ml Tris (1 M, pH 7.5)<br>680 ml 5M NaCl<br>34 ml Tween 20  |
| <b>Magermilchpulver-Block-Lösung</b>                                 | 5 % Magermilchpulver in Proteinwaschpuffer   |

Tabelle 9: Übersicht über verwendete Puffer, Lösungen, Gele und Reaktionsansätze für Analysen von Proteinen.

| <b>Puffer und Gele für Analysen von Genexpression</b> | <b>Zusammensetzung</b>  |
|---|---|
| <b>Agarose-Gel, 1.5 %</b>                             | 1.5 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer durch Aufkochen vollständig lösen + 4 Tropfen Ethidiumbromidlösung auf 100 ml |
| <b>5x Orange-G Ladepuffer</b>                         | 0.25 % OrangeG<br>15 % Ficoll 400<br>15 % Glycerin  |
| <b>TAE-Elektrophoresepuffer 50x</b>                   | 242 g Tris<br>57.1 ml Essigsäure 100 %<br>100 ml 0.5 M EDTA pH 8<br>Auf 1L mit <i>Aq. dest.</i> auffüllen           |

Tabelle 10: Übersicht über verwendete Puffer und Gele für Analysen von Genexpression.

| <b>Puffer, Lösungen, Medien für Analysen der Zellpopulationen (Durchflusszytometrische Analyse)</b> | <b>Zusammensetzung</b>                       |
|---|--|
| <b>Arbeitspuffer</b>  | 0.5 % Humanes Serumalbumin (HSA) in PBS      |
| <b>Kollagenaselösung</b>  | 50 mg Kollagenase A<br>33.3 ml Arbeitspuffer |
| <b>Einfriermedium</b>   | Arbeitspuffer mit 8 % DMSO                   |

Tabelle 11: Übersicht über verwendete Puffer, Lösungen und Medien für Analysen der Zellpopulationen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für alle Experimente wurden adulte, männliche, 6-8 Wochen alte, durchschnittlich 20-23 g schwere Wildtyp-Mäuse des Inzuchtstamms C57BL/6 der Firma Janvier (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine etablierte Labormauslinie, welche 1921 von C. C. LITTLE aus der Kreuzung eines Bestands von A. LATHROP entwickelt wurde. Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend der aktuellen tierschutzrechtlichen Vorgaben nach EU-Richtlinie 2010/63 sowie je nach Besatzdichte in transparenten Makrolon-Käfigen aus Polycarbonat Typ II (350 cm<sup>2</sup>) sowie Typ II lang (530 cm<sup>2</sup>). Als Einstreu wurden feine Holzspäne verwendet. In den Tierräumen der ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben der HHU) wurden die Tiere unter einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von  $20 \pm 2$  °C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 % gehalten. Pelletiertes Trockenfutter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Das Trinkwasser wurde auf einen pH von 2.8-3 mittels Chlorwasserstoffs (HCl) angesäuert und durch Ozon desinfiziert.

Alle tierexperimentellen Arbeiten erfolgten unter Berücksichtigung der geltenden Tierschutzbestimmungen. Die Projektnummer lautete ZETT; G91/13, das Aktenzeichen des Tierversuchs AZ: 84-02.04.2013.A091. Das Zertifikat über die „Versuchstierkundliche Einführung zur Erlangung des Fachkundenachweises“ gemäß §9 des geltenden TSchG entsprechend eines FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Association*)-Kurses der Kategorie B wurde am 02.02.2018 in Düsseldorf ausgestellt.

### 2.2.2 Versuchsaufbau

Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden drei Gruppen (Tag 3 (d = 3), Tag 10 (d = 10) und Tag 14 (d = 14)) mit jeweils folgender Intervention: UUO + LIF (Behandlungsgruppe) oder UUO + PBS (Kontrollgruppe) gleicher Tierzahl (n = 8) gebildet. Mit einem Vorlauf von vier Tagen (d = -4) vor dem operativen Eingriff, der unilateralen Ureterobstruktion (UUO), begann die tägliche Behandlung der Tiere. In der Behandlungsgruppe erfolgte eine *intraperitoneale* (*i.p.*) Injektion von rekombinantem *murinen* LIF, welches zu Therapiezwecken in steriler phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate buffered saline*, PBS) weiter verdünnt wurde.

Die Behandlung der Kontrollgruppe erfolgte durch die tägliche *intraperitoneale* Injektion des gleichen Volumens an sterilem PBS. Das Injektionsvolumen berechnete sich anhand des Körpergewichts der Versuchstiere mit 30 µg/kgKG. An Tag 5 (d = 0) der medikamentösen Behandlung erfolgte die UUO. Die Behandlung endete am Tag der Organentnahme (OE), welche entsprechend der

Gruppenzuordnung entweder am dritten (d = 3), 10. (d = 10) oder 14. (d = 14) postoperativen Tag durchgeführt wurde (Abb. 7).

Insgesamt konnte das Gewebe von UUO-Nieren und nierennächstem *paraaortalen* Lymphknoten von n = 47 Versuchstieren der Analyse von Proteinen, RNA sowie Analysen der Histologie und Immunhistochemie zugeführt werden. Ein Tier der Behandlungsgruppe verstarb vorzeitig.

In einem weiteren Versuchsdurchlauf erfolgte die Behandlung von insgesamt 16 Versuchstieren, wobei wiederum eine Behandlungs- sowie eine Kontrollgruppe mit jeweils n = 8 Tieren definiert wurde. Die Behandlung dieser Tiere begann *idem* zu den vorherigen Versuchsgruppen an Tag d = -4 vor dem operativen Eingriff und endete am 10. postoperativen (d = 10) Tag. Das Gewebe der UUO-Nieren von 15 dieser Tiere wurde der durchflusszytometrischen Analyse zugeführt, ein Versuchstier verstarb vorzeitig.

## Versuchsplan



C57BL/6J Wildtypiere  
6-8 Wochen alt, Ø23 g, männlich

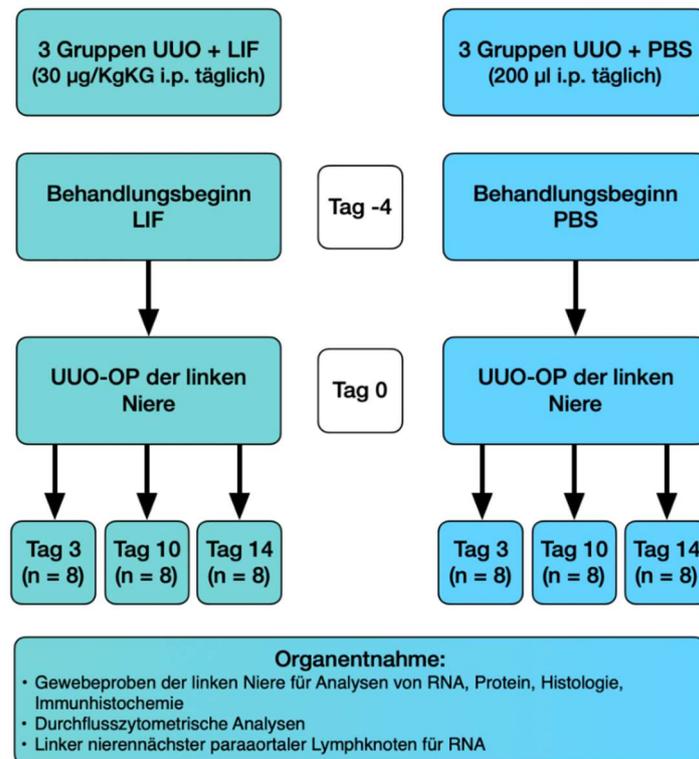


Abb. 7: Versuchsplan.

### 2.2.3 Anästhesie

Invasive Eingriffe erfolgten ausschließlich unter Vollnarkose der Versuchstiere. Hierzu wurden jedem Tier 10 µl/gKG einer Lösung bestehend aus 10 mg/ml Ketamin und 2mg/ml Xylazinhydrochlorid physiologischer Kochsalzlösung (0.9 % Natriumchlorid, NaCl) *i.p.* injiziert. Mittels *interdigitaler* Schmerzstimulation im Bereich der Hinterläufe wurde die Narkosetiefe ermittelt.

| Medikament          | Endkonzentration | Ansatz |
|---------------------|------------------|--------|
| Ketamin             | 2 mg/ml          | 1 ml   |
| Xylazinhydrochlorid | 10mg/ml          | 1 ml   |
| NaCl                | 0.9 %            | 8 ml   |

Tabelle 12: **Zusammensetzung Kleintieranästhesie.** mg = Milligramm; µg = Mikrogramm; g = Gramm; KG = Körpergewicht; ml = Milliliter; % = Prozent.

### 2.2.4 Die Unilaterale Ureterobstruktion (UUO)

Die Unilaterale Ureterobstruktion (UUO) dient als etabliertes Schädigungsmodell der Niere zur Untersuchung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose. Mit Hilfe der UUO können pathogenetische Mechanismen der CKD in Mäusen erzeugt werden. Im Anschluss an die Ligatur des Ureters folgt innerhalb von 24 Stunden eine Reihe pathologischer Ereignisse, die alle wichtigen Merkmale eines typischen Fibrosierungsprozesses aufweisen. Zunächst geht die Ligatur mit einer Erhöhung der interstitiellen Kapillarpermeabilität sowie dem Influx inflammatorischer mononukleärer Zellen einher. Insbesondere Makrophagen stellen dabei eine wichtige Zellpopulation dar. Darauf folgend kommt es zu einer erhöhten Synthese profibrotischer Moleküle wie z.B. TGF-β, der Differenzierung und Aktivierung Matrix-produzierender Myofibroblasten sowie der exzessiven Synthese extrazellulärer Matrixproteine und deren Akkumulation. Im weiteren Verlauf schließt sich ein progressiver Verlust der Tubuli durch Apoptose und eine progressive interstitielle Kapillar-Rarefizierung an, was in Hypoxie und oxidativem Stress mündet [92]. Die unilaterale Ureterligatur führt zu einem Anstieg des Ureterdrucks im Verhältnis zum hierdurch reduzierten renalen Blutfluss, sodass sich unmittelbar an die Obstruktion eine veränderte Hämodynamik mit Verringerung der GFR anschließt [93]. Infolge der andauernden Harnstauung entwickelt sich im weiteren Verlauf eine Hydronephrose. Diese geht einher mit einer vermehrten Infiltration inflammatorischer Zellen, wie aktivierter T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen, Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in das Interstitium. Schließlich kommt es zur Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine wie Kollagen Typ 1 und Fibronectin und somit innerhalb weniger Tage zur Ausbildung einer interstitiellen Fibrosierung mit tubulärem Zelltod und irreversiblen Verlust des Nierenparenchyms [94].

Die UUO erfolgte unter sterilen Bedingungen im ZETT der Universität Düsseldorf an Tag 0 des Versuchszeitraumes nach Einleitung der Narkose durch *intraperitoneale* Injektion der Narkosemischlösung. Nach Überprüfung der Narkosetiefe mittels *interdigitaler* Schmerzstimulation im Bereich der Hinterläufe erfolgte die Rasur im Operationsbereich sowie die Benetzung der Augen der Tiere zum Schutz vor Austrocknung mittels Bepanthen® Augensalbe. Die OP fand unter sterilen Kautelen statt. Die OP-Zeit betrug pro Tier durchschnittlich 8-10 min. Um die Körpertemperatur der Mäuse für die Dauer der OP aufrecht zu erhalten, erfolgte der Eingriff auf einer mit einer Wärmematte unterlegten, auf 37 °C temperierten sterilen OP-Unterlage. Nach Fixierung der Tiere in gestreckter Rechtsseitenlage mittels Tape erfolgte eine großflächige Hautdesinfektion. Anschließend wurden die Versuchstiere mit Aussparung des OP-Bereichs mittels steriler Kompressen abgedeckt. Ca. 1.5 cm *caudal* des linken Rippenbogens erfolgte nach Palpation unter Verwendung einer anatomischen Schere ein kleiner *kutaner* Flankenschnitt der Haut. Nach stumpfer Ablösung der Haut von der darunterliegenden Faszie der Bauchmuskulatur mittels zweier anatomischer Pinzetten erfolgte die Eröffnung des Bauchsitus durch zunächst kleine Inzision der Bauchmuskulatur unter Verwendung einer gebogenen Strabismus-Federschere. Anschließend erfolgte die Erweiterung des Zugangs zum Bauchsitus um ca. 1.5 cm insgesamt nach *caudal* und *cranial*. Nach Auffinden der linken Niere im *Retroperitoneum* konnte der *caudale* Nierenpol aus der Nierenloge nach außen luxiert werden. Das sich dort befindende Fettgewebe diente als Landmarke zur sicheren Identifikation des linken Ureters. Mittels Irispinzette wurde der Ureter dargestellt und aufgespannt. Es folgte die Vorlage zweier steriler Ligaturen (MIRALENE, nicht resorbierbar, USP 5/0, BRAUN) zwischen den aufgespannten Schenkeln der Irispinzette. So konnte der Ureter einerseits unmittelbar am *caudalen* Nierenpol und somit nah am Abgangsursprung des Ureters, andererseits weiter *distal* vollständig verschlossen werden. Es folgte die Durchtrennung des Ureters mittels gebogener Strabismus-Federschere.

Nach Reposition der Niere in das Nierenlager wurde die Muskulatur mittels resorbierbaren Fadens (Ethicon, Vicryl violett geflochten, USP 3-0, 3/8 Kreis, 13 mm Bogenmaß) in fortlaufender Naht sowie die Haut mittels nicht-resorbierbaren Fadens (Ethicon, Prolene, Polypropylen; monofil, 3-0, nicht resorbierbar, 17 mm Bogenmaß) durch zwei bis drei Einzelknopfnähte verschlossen. Abschließend erfolgte die Reinigung und erneute Desinfektion der Wunde unter Verwendung eines alkoholischen Hautantiseptikums. Eine unmittelbar postoperative *analgetische* Therapie erfolgte mittels *intraperitonealer* Injektion von Buprenorphin (0.05-0.1 mg/kgKG), sowie für weitere zwei Tage einmal täglich. Die Tiere wurden am Ende der OP zwecks postoperativer Gewichtskontrolle gewogen und erhielten 1 ml NaCl 0.9 % *subkutan* (*s.c.*) zur Flüssigkeitssubstitution. Nach Bedarf wurden die Tiere erneut mit Augensalbe und anschließend in frischen Käfigen weiterversorgt. Bis zum vollständigen Erwachen standen die Tiere unter ständiger Beobachtung. Ein Auskühlen der Tiere wurde durch die Verwendung einer Rotlichtwärmelampe verhindert.

Postoperativ erfolgte für den Zeitraum der Versuchsreihe täglich eine Wundkontrolle. Das Nahtmaterial wurde bei areaktiven Wundverhältnissen nach 7 Tagen postoperativ entfernt, sofern dies bis zu diesem Zeitpunkt nicht bereits eigenständig durch die Tiere erfolgt war.

Die Unilaterale Ureterobstruktion als operative Intervention ist als mäßige Belastung, die ggf. postoperativ auftretenden Beschwerden als geringe Belastung einzuschätzen. Als Abbruchkriterien des tierexperimentellen Versuchs wurden eine verminderte Futter- und Wasseraufnahme, eine Abnahme des Körpergewichts (KG) >15 %, ständiges Zittern, Krämpfe sowie unkoordinierte Bewegungen, schwere Automutilation, flache angestrengte Atmung und eine bläuliche Verfärbung der Bauchhaut sowie der Extremitäten definiert.

### 2.2.5 Organentnahme

Eingeleitet wurde die Organentnahme durch Narkotisierung der Tiere. Die Organentnahme wurde unter RNase-vermeidenden Bedingungen nach Reinigung des Operations-Bestecks mittels RNase AWAY® unter einem Stereomikroskop durchgeführt.

Im Anschluss an die Euthanasie durch zervikale Dislokation wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einer OP-Unterlage gestreckt fixiert und die Haut samt Fell großflächig mittels in Isopropanol getränkter Tupfer desinfiziert. Darauffolgend wurde die Haut in der Medianlinie im Bereich des *caudalen Abdomens* auf Höhe der Beckenkämme mittels chirurgischer Schere inzidiert. Anschließend erfolgte die stumpfe Präparation der Haut von der Faszie der Bauchmuskulatur bis zum *Xiphoid* nach *cranial* mittels zweier Knüpppinzetten. Im nächsten Schritt wurde die Bauchmuskulatur von *caudal* nach *cranial* bis zum *Xiphoid* gespalten, sodass nach darauffolgenden Entlastungsschnitten nach *lateral* auf Höhe des mittleren *Bauchsitus* die vier Quadranten der Bauchmuskulatur nach außen umgeschlagen und mittels Klemmen fixiert werden konnten. Nach vorsichtigem Verlagern des Darmkonvoluts sowie der Oberbauchorgane mittels steriler Tupfer zur rechten Seite, bot sich ein Blick auf die im *Retroperitoneum* lokalisierte Nierenloge. Der weit *dorsal* liegende *distale* Gefäßstrang, bestehend aus *Aorta abdominalis* und *Vena cava inferior* wurde im Folgenden *cranial* der Bifurkation der *Aorta abdominalis* mittels Knüpppinzetten freipräpariert. Es folgte die Vorlage einer Ligatur um das gesamte Gefäßbündel sowie das Anlegen einer stumpfen Klemme auf Höhe der Bifurkation der Aorta zur Verhinderung des Rückflusses von Blut aus den Beingefäßen. Anschließend wurden die weiter *cranial* gelegenen großkalibrigen Abgänge aus der *Aorta abdominalis* aufgesucht, ebenfalls freigelegt und präpariert. Hier erfolgte die Vorlage einer lockeren Ligatur um den *Truncus coeliacus*, die *A. mesenterica superior* sowie die Aorta. Diese Ligatur wurde zunächst nicht verschlossen, um ggf. noch vorhandene Luft im Perfusionssystem zu Beginn der Perfusion möglichst über diese Gefäße umzuleiten und so die renalen Gefäße vor Luftembolie zu schützen.

Des Weiteren wurde die *Aorta suprarenalis* unmittelbar *subdiaphragmal* aufgesucht, der *paraaortale* Bereich freipräpariert und eine weitere Ligatur vorgelegt. Als Führungsstruktur diente hierzu die *paravertebrale* Muskulatur. Daraufhin erfolgte der Schluss der *cranialen*, unmittelbar *subdiaphragmal* gelegenen Aorten-Ligatur.

Nach Präparation der *caudalen* Aorta unterhalb der vorgelegten Ligatur erfolgte eine kleine Inzision derselben zur Kanülierung mittels Polyäthylenschlauchs sowie der Beginn der Perfusion. Die Perfusion der Nieren erfolgte mit 4 °C kaltem, RNase-freien PBS bei einer Flussrate von 1.5 ml/min. Nach Kontrolle der korrekten Perfusion der Niere über eine Entfärbung derselben konnten die weiteren drainierenden Gefäße *cranial* der Nierenarterien vollständig ligiert werden. Es folgte eine Inzision der linken Nierenvene sowie der hohen Flanke links mittels Federschere, sodass Perfusat und Blut abfließen konnten. Anschließend erfolgte die Freipräparation der Niere durch Entfernung der Nierenkapsel mittels zweier Knüpfpinzetten sowie das Absetzen der Niere am Nierenhilus mittels Strabismus-Federschere. Die vollständig perfundierte und somit blutleere Niere wurde unmittelbar nach Entnahme in mit Eis gekühlte Petrischalen für die Asservierung von Protein, RNA sowie für Immunhistochemie und Histologie weiterverarbeitet. Es folgte die Entnahme der rechten Niere.

Sowohl der untere als auch der obere Nierenpol diente der Erstellung von Aliquots für Untersuchungen der RNA und Proteine unter jeweiliger Beachtung, dass alle Proben jeweils sowohl *Medulla* als auch *Kortex* enthielten. Das Mittelstück der jeweils entnommenen Niere diente *in toto* der Einbettung in Paraffin für die Immunhistochemie und Histologie.

Gewebeproben für RNA wurden in mit 300 µl RNA-*Later*-Lösung befüllte 2 ml Eppendorfgefäße überführt. In mit *Allprotect Tissue Reagent* vorgelegten 2 ml Eppendorfgefäßen wurden die Gewebestücke für Protein aliquotiert. Sowohl die Gewebeproben für RNA als auch für Protein wurden zunächst über Nacht (ü.N.) bei 4 °C gelagert, sodass das Gewebe vollständig mit RNA-*Later*-Lösung bzw. *Allprotect Tissue Reagent* durchtränkt werden konnte. Am Folgetag wurden die Proben zunächst bei -20 °C eingefroren, zur Langzeitlagerung erfolgte die Überführung in -80 °C. Die Histokassetten mit Nierengewebe für Immunhistochemie und Histologie wurden zunächst ü.N. bei RT in 10%igem, neutralgepufferten Formalin gelagert, bevor sie am Folgetag der Entwässerungsreihe mit anschließender Paraffinblockanfertigung zugeführt wurden.

Als letzter Schritt der OE wurde der *paraaortale* Lymphknoten auf der Seite der linken, im UUO-Modell geschädigten Seite aufgesucht und identisch zu den Gewebeproben für Untersuchungen der RNA asserviert.

In einem weiteren Versuchsdurchlauf erfolgte die Entnahme von Nieren *in toto* zur Aufbereitung und Zuführung zu durchflusszytometrischen Analysen.

## 2.2.6 Proteinanalyse

### 2.2.6.1 Proteinisolierung

Für die Herstellung von Proteinlysaten wurden die blutfrei perfundierten Nierengewebestücke RNase-frei aus den kurzzeitig aufgetauten Original-Aliquots entnommen, mit je 500 µl eiskaltem PBS vom *Allprotect Tissue Reagent* gereinigt, auf einem Tuch abgetupft und anschließend in mit je 200 µl eiskaltem Lysispuffer (Tabelle 9) befüllte 5 ml Homogenisierungs-Röhrchen überführt. Die Homogenisierung der Gewebeproben zum Aufschluss der Proteine erfolgte unter Verwendung des *TissueRuptor*<sup>®</sup> im Eiswasserbad. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Lysate in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend bei 4 °C und 14 000 rpm für 15 min zentrifugiert. Für die sich anschließende Proteinmengenbestimmung wurden jeweils 5 µl entnommen, bevor die verbleibenden Lysate zu drei gleichen Teilen mit je ca. 70 µl aliquotiert wurden. Eine kurzzeitige Lagerung für den Zeitraum der Analyse erfolgte bei -20 °C, die Langzeitlagerung, inklusive des Rückstandes, erfolgte bei -80 °C.

Zur Verwendung für die Proteinanalyse mittels *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)-Gelelektrophorese und Western Blot wurden die Lysate zunächst mit 2-fach Laemmli-Probepuffer (Tabelle 9) versetzt und anschließend für fünf Minuten bei 95 °C im Thermomixer inkubiert. Hierdurch erfolgte einerseits die Denaturierung der Proteine, andererseits eine Inaktivierung der Proteasen.

### 2.2.6.2 Proteinmengenbestimmung

Zur Quantifizierung des Proteingehalts der im Rahmen der Proteinisolierung gewonnenen Lysate aus Nierengewebe wurde das *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Zur Herstellung einer Standardreihe mit Konzentrationen zwischen 25-1 500 µg/ml erfolgte zunächst die Generierung einer Verdünnungsreihe aus Bovinem Serumalbumin (*Bovine Serum Albumine*, BSA) und *Aq. dest.*. Das benötigte Arbeitsreagenz – bestehend aus BCA-Reagenz A und BCA-Reagenz B – wurde hierzu in einem Verhältnis von 50:1 (A:B) angesetzt. Anschließend erfolgte die Verdünnung der zu testenden Proteinlysate im Verhältnis 1:5 mit *Aq. dest.*. 10 µl jeder Probe bzw. jeden Standards wurden in eine 96-well Mikrotiterplatte pipettiert. Es erfolgte jeweils eine Duplizierung jeder Probe sowie der Standards, um die Eliminierung eines möglichen Ablesefehlers durch den Plattenreader zu gewährleisten. Nach Hinzugabe von 200 µl Arbeitsreagenz zu jedem well wurden die Proben bei 37 °C für 25-30 min inkubiert. Die photometrische Messung der Absorption des Arbeitsreagenz und der Proteine erfolgte bei 520 Nanometern (nm) im linearen Bereich. Die in den Western Blots eingesetzte Proteinmenge lag bei 15 µg/Lane.

### 2.2.6.3 SDS (PAGE)-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse für Collagen1 $\alpha$ 1 (Col1 $\alpha$ 1)

Die zuvor aus Nierengewebe gewonnenen Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese nach Molekülgröße aufgetrennt und anschließend im Rahmen eines Western Blot-Verfahrens (*Tank-Blot*) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Darauffolgend konnte das Zielprotein Kollagen Typ 1 (Col1 $\alpha$ 1) sowie  $\beta$ -Actin als Referenzprotein immunologisch mit Hilfe des ECL Entwicklungs-Kits von Roche Promega durch den Imager Alpha Innotech Imager Fluor Chem<sup>®</sup>FC2 dargestellt werden.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Zielproteingröße von 140 kDa in 7%igen, 0.75 mm dicken Polyacrylamidgelen, welche zuvor nach einem laborinternen Protokoll (Tabelle 9) mit Hilfe des Mini-PROTEAN Tetra *Handcast* Systems polymerisiert wurden. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel (Tabelle 9) erfolgte bei 70 Volt (V) für 30 min, die Auftrennung der Proteine im Trenngel (Tabelle 9) für  $\pm$  90 Minuten je nach Trenngellänge bei 15 Milliampere (mA) pro Gel. Als Proteinstandard wurde der *Color Protein Standard Broad Range Amt 150 gel lanes* verwendet und pro Gel jeweils mit 10  $\mu$ l in der ersten Geltasche aufgetragen. In die Gelelektrophorese-Kammer wurde entsprechend der Herstellerangaben und Menge der Gelelektrophorese-Laufpuffer (Tabelle 9) eingefüllt.

Der auf die elektrophoretische Auftrennung folgende Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte im *Tank-Blot*-Verfahren in einer mit 4 °C kaltem Transferpuffer (Tabelle 9) befüllten Elektro-*Blotting*-Kammer. Die erforderliche Stromstärke für das Blotting-Verfahren lag bei 200 mA für eine Blotting-Dauer von 2 h 45 min.

Im Anschluss an den Western Blot wurde die Nitrozellulosemembran zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen ü.N. bei 4 °C in 5%ige Magermilchpulver (MMP)-Lösung überführt. Die Lösung des Magermilchpulvers erfolgte in Proteinwaschpuffer (Tabelle 9). Am Folgetag begann die Inkubation der Membran mit in 1%iger MMP-Lösung verdünntem Primär-Antikörper (*Rabbit anti-Mouse IgG* 0.5 ml, Type I Collagene, mdbioproducts) in einer Verdünnung von 1:15 000 ebenfalls ü.N. bei 4 °C auf einem Wippschüttler. Es folgte ein dreimal fünfminütiger Waschvorgang mit Proteinwaschpuffer (Tabelle 9) auf dem Wippschüttler bei Raumtemperatur (RT) zur Entfernung ungebundener Primärantikörper. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper (*Goat anti-rabbit IgG-HRP*, Santa Cruz Biotechnology) in einem Verdünnungsverhältnis von 1:20 000 in Proteinwaschpuffer bei RT für 1 h auf dem Laborschüttler. Ungebundene Anteile des Sekundärantikörpers wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Unter Verwendung des Lumi Light Entwicklungskits von Roche Promega entsprechend der Herstellerangaben konnte im Folgenden die Chemilumineszenz der Col1 $\alpha$ 1-Immunkomplexe mit Hilfe des Imager FluorChem<sup>®</sup> FC2 (Biozym) detektiert werden. Eine Generierung von Fotos der

Immunkomplexbanden erfolgte nach einer, zwei und fünf Minuten. Für ein späteres *overlay* wurde zudem ein Auflichtbild generiert.

Um das detektierte Zielantigen Col1 $\alpha$ 1 auf eine Referenz beziehen zu können, folgte die Nachfärbung der Membran für  $\beta$ -Actin. Hierzu wurde die Membran nach dreimaligem Waschschrift zunächst im Anti- $\beta$ -Actin-Antikörper (Sigma) in der Verdünnung 1:30 000 in Waschpuffer für 30 min bei RT auf dem Laborschüttler inkubiert. Nach erneutem dreifachen Waschschrift erfolgte die Inkubation im Sekundäntikörper (*Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunglobuline* HRP, Dako) in der Verdünnung 1:10 000 für 1 h bei Raumtemperatur. Abschließend folgte wie oben beschrieben erneut eine Entwicklung der Membran mit Darstellung der  $\beta$ -Actin-Immunkomplexe mit Aufnahmen nach 30 Sekunden und einer Minute.

#### **2.2.6.4 Densitometrische Quantifizierung der Western Blots**

Die densitometrische Auswertung der Intensität der digitalen Aufnahmen der Immunkomplexe erfolgte unter Verwendung der Auswertungssoftware AlphaEase FC. Nach getrennter Berechnung der Proteinmengen von Col1 $\alpha$ 1 sowie  $\beta$ -Actin, folgte der Bezug von Col1 $\alpha$ 1 auf  $\beta$ -Actin zur relativen Quantifizierung.

### **2.2.7 Analyse von Nukleinsäuren**

#### **2.2.7.1 RNA-Präparation und Messung der RNA-Konzentration**

RNA wurde aus Nierengewebe und Lymphknotengewebe unter Verwendung des gebrauchsfertigen RNeasy® Plus Mini Kits von Qiagen überwiegend entsprechend des Herstellerprotokolls unter RNase-freien Bedingungen bei RT isoliert. Abweichungen zum Herstellerprotokoll und Besonderheiten sind im Folgenden aufgeführt.

Sowohl für die Isolierung von RNA aus Nierengewebe als auch aus Lymphknotengewebe erfolgte eine Lysierung des Gewebes mittels 350  $\mu$ l des im Kit enthaltenen RLT<sup>+</sup>-Lysispuffers unter Verwendung des TissueRuptors® von Qiagen. Das Lymphknoten-Lysat wurde vor der Überführung auf die gDNA-Säule zunächst auf einen nicht im RNeasy® Plus Mini Kit enthaltenen QIAshredder® überführt. Durch diesen weiteren Homogenisierungsschritt reduzierte sich die Viskosität des Lysats.

Die Elution der RNA aus Nierengewebe erfolgte durch 50  $\mu$ l RNase-freies Wasser (H<sub>2</sub>O), die Elution der RNA aus Lymphknotengewebe durch 30  $\mu$ l RNase-freies Wasser.

Nach erfolgter Isolierung der RNA wurden je 0.5  $\mu$ l RNA zur sich später anschließenden Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Kontroll-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) entnommen.

Die Bestimmung der Menge sowie Qualität der gewonnenen RNA aus Nierengewebe erfolgte photometrisch mittels Nanodrop 2000 von ThermoFischerScientific. Die RNA aus Lymphknotengewebe wurde photometrisch mittels Eppendorf Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Verdünnung von 1:50 gemessen.

### 2.2.7.2 Reverse Transkription

In Vorbereitung auf die Quantifizierung der cDNA mittels Quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*Real-Time quantitative Polymerase-Chain-Reaction*, qRT-PCR) erfolgte im anschließenden Arbeitsschritt die Umschreibung der zuvor durch Elution gewonnenen RNA in cDNA. Verwendet wurde hierzu das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen unter überwiegender Beachtung des Herstellerprotokolls. Abweichend zum Herstellerprotokoll wurden sowohl nach dem gDNA-Verdau sowie nach der erfolgten reversen Transkription je 0.5 µl des jeweiligen Produkts jeder Probe als Substrat für die sich anschließende GAPDH-Kontroll-PCR entnommen. Diese entnommene Menge wurde durch RNase-freies Wasser ersetzt.

### 2.2.7.3 Konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der Reversen Transkriptase sowie die vollständige Eliminierung von gDNA aus Nieren- sowie Lymphknotengewebe zu überprüfen, wurde im nachfolgenden Schritt eine konventionelle Polymerasekettenreaktion mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese angeschlossen. Verwendet wurde hierzu das HotStar®Taq DNA Polymerase Kit von Qiagen. Zur relativen Semiquantifizierung von DNA-Molekülen diente als *endogenes housekeeping gene* die *ubiquitär* in Eukaryoten vorkommende Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Es wurde zunächst ein PCR-Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 19.5 µl je Probe bestehend aus folgenden Komponenten angesetzt: 16.78 µl Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*High performance liquid chromatography*, HPLC)-Wasser, 2 µl 10-fach Puffer, 0.4 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)), 0.1 µl GAPDH Vorwärtsprimer, 0.1 µl GAPDH Rückwärtsprimer, 0.12 µl Hot Star Taq DNA-Polymerase. Für die sich anschließende Genamplifikation wurden jeweils 0.5 µl der isolierten RNA, RNA nach gDNA-Verdau, cDNA nach der reversen Transkriptase sowie HPLC-Wasser als Negativkontrolle mit dem Mastermix in 0.5 ml hitzestabilen Safe-Lock Tubes von Eppendorf versetzt und anzentrifugiert, bevor der gesamte Ansatz das im Folgenden aufgeführte, insgesamt 1 h und 40-minütige Programm im Thermocycler durchlief: Nach 15-minütiger Hitzeaktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase bei 95 °C folgten 40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 sec, 95 °C), *Annealing* (30 sec, 58 °C) und Elongation (30 sec, 72 °C). Abschließend folgte die Extension bei 72 °C für 5 min. Nach erfolgter PCR kühlte der Thermocycler auf 4 °C herunter.

In weiteren Schritten wurden die PCR-Produkte im Rahmen der Agarose-Gelelektrophorese nach Basenpaarlänge unter Anlage einer konstanten Spannung von 85 V für ca. 40 min aufgetrennt. Verwendet wurden hierzu nach laborinternem Protokoll (Tabelle 10) gegossene 1.5%ige Agarosegele, denen zwecks späterer Bildgebung je 4 Tropfen Ethidiumbromidlösung pro 100 ml flüssiger Agarose zugefügt wurden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren und verändert dabei sein Absorptionsspektrum. Hierdurch wird die Fluoreszenzintensität bei Anregung mittels UV-Licht gesteigert, wodurch die DNA-Zielprodukte sichtbar gemacht und digitalisiert werden können. Nach Hinzufügen von je 2 µl Orange-G Ladepuffer (Tabelle 10) wurden je 9 µl der PCR-Produkte auf die mit TAE-Elektrophoresepuffer (Tabelle 10) bedeckten Gele aufgetragen. Mitgeführt wurden als Referenz je 7 µl einer 100 Basenpaare (bp)-DNA-Leiter. Weiterhin erfolgte die Detektion der DNA-Banden unter Verwendung einer CCD (*Charge-Coupled Device*)-sensitiven UV-Kamera mit Hilfe eines Imaging-Systems. Das Zielprodukt cDNA wurde bei einer Größe von 382 bp erwartet. Die generierte und auf Reinheit überprüfte cDNA wurde abschließend im Verhältnis 1:3 mit Nuclease-freiem H<sub>2</sub>O verdünnt und der qRT-PCR zugeführt.

#### **2.2.7.4 Quantitative Real Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Mittels TaqMan™ Quantitativer Echtzeit (*Real-Time*) PCR (qRT-PCR) wurde die Genexpression ausgewählter Gene aus RNA-Proben untersucht. Hierdurch wurde eine relative Quantifizierung verschiedener Zielgene unterschiedlicher Proben zueinander ermöglicht. Ziel dessen war es, die Beeinflussung der durch das UUO-Modell verursachten renalen tubulointerstitiellen Inflammation und Fibrose durch LIF auf die Genexpression zu untersuchen. Als Ausgangssubstrat diente die zuvor gewonnene cDNA. Untersucht wurde einerseits die aus obstruiertem Nierengewebe gewonnene RNA, andererseits die RNA aus einem nierennächsten *paraaortalen* Lymphknoten. Letzteres diente der Untersuchung der systemischen Entzündungsreaktion. Für die Analysen wurden spezifische Taq Man™ Gene Expression Assays verwendet. Eine Übersicht über die untersuchten Fibrose- und Entzündungsmarker gibt die Tabelle 13.

| Fibrosemarker                                      | Entzündungsmarker  |
|--|--|
| Col1 $\alpha$ 1 (Kollagen Typ 1)                   | IL-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ )  |
| PAI-1 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor)            | IL-6 (Interleukin-6)   |
| PDGFR1 (Platelet-Derived Growth Factor Receptor 1) | MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein 1)   |
| TGF- $\beta$ (Transforming-Growth Factor beta)     | NF $\kappa$ B (Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) |
|  | CCL5 (RANTES)  |
|  | TNF- $\alpha$ (Tumornekrosefaktor alpha)   |

Tabelle 13: Übersicht über detektierte Fibrose- und Entzündungsmarker.

Die Durchführung erfolgte entsprechend des TaqMan™ Gene Expression Assay Protokolls von Applied Biosystems (Tabelle 14). Pro Reaktionsansatz wurde zunächst ein TaqMan® Gene Expression-Mastermix mit einem Gesamtvolumen von je 19  $\mu$ l, bestehend aus 10  $\mu$ l TaqMan® qPCR Mix, 8  $\mu$ l Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O sowie 1  $\mu$ l des jeweiligen Assays vorbereitet und mit einem doppelten Ansatz in eine optische 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. In jedes well wurden anschließend 1  $\mu$ l der jeweiligen zu untersuchenden verdünnten cDNA-Probe (Verdünnung 1:3) hinzu pipettiert, wodurch der Reaktionsansatz auf ein Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l komplettiert wurde.

Jeder Probenreihe schloss sich eine Negativkontrolle (Reinheitskontrolle, NTC, No Template Control) an. Diese enthielt neben dem TaqMan® Gene Expression-Mastermix 1  $\mu$ l Nuclease-freies Wasser anstelle von cDNA. Zudem wurde jeweils GAPDH als Referenz mitgeführt. Die well-Mikrotiterplatte konnten anschließend mittels optischer, adhäsiver Folie versiegelt und der Analyse im 7300 Real Time PCR System zugeführt werden. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter DNase-freien Bedingungen sowie unter Ausschluss von Kontamination durch fremde DNA.

Insgesamt wurden im Rahmen des TaqMan™ Gene Expression Assay Protokolls 40 Zyklen zur exponentiellen Amplifikation gezielter Gensequenzabschnitte durchlaufen (Tabelle 14).

| Phase  | Anzahl der Zyklen | Temperatur (in °C) | Zeit   |
|--|-------------------|--------------------|--------|
| Initiale Hitzeaktivierung der HotStarTaq® Polymerase | 1                 | 95 °C              | 15 min |
| DNA-Denaturierung                                    | 40                | 95 °C              | 15 sec |
| Assay-Annealing, Elongation, Detektion               | 40                | 60 °C              | 60 sec |

Tabelle 14: Amplifikationsprotokoll der TaqMan™ Quantitativen Echtzeit (Real-Time) PCR (qRT-PCR). C = Grad Celsius, min = Minuten, sec = Sekunden.

Die statistische Auswertung der detektierten Expressionsunterschiede verschiedener Fibrose- und Entzündungsmarker erfolgte anhand der gemessenen mittleren Zyklusschwellenwerte (*Threshold Cycle*,  $C_T$ ) nach der Delta Delta  $C_T$  Methode ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) [95]. Die relativen, normalisierten Genexpressions-*Ratios* werden als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (*Standard Error of Mean*, *SEM*) der jeweiligen  $C_T$ -Werte angegeben.

## 2.2.8 Histologie und Immunhistochemie

### 2.2.8.1 Entwässerungsreihe und Paraffinblockanfertigung

Die mit PBS im Rahmen der Organentnahme perfundierten, vollständig blutleeren Nierenstücke wurden in Einbettkassetten gelagert und ü.N. zunächst zur Fixierung und Denaturierung der Proteine in 10%iges neutral gepuffertes Formalin überführt. Am Folgetag wurden die Nierenstücke zunächst kurz mit PBS gespült, bevor sie anschließend in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration (70 %, 80 %, 96 %, 100 % I, 100 % II) für je eine Stunde langsam dehydriert wurden. Darauffolgten wurden die Gewebestücke zweimal für je 1 h mit Xylol, einem Intermedium, welches gleichermaßen sowohl in Alkohol als auch Paraffin löslich ist, durchtränkt. Dieser Schritt diente der sorgfältigen Entfernung von Ethanolresten aus dem Präparat. Im nächsten Schritt wurden die Einbettkassetten für eine Stunde in mindestens 60 °C warmem, flüssigen Paraffin gelagert und anschließend für weitere 60 min in frisches und somit weniger Xylol kontaminiertes Paraffin überführt. Anschließend wurde das paraffinierte Gewebe in den Einbettkassetten unter Verwendung einer Gießstation von LEICA mit Paraffin ausgegossen und eingebettet. Nach Erkaltung auf einer Kühlplatte konnten die Paraffinblöcke bei RT gelagert werden.

### 2.2.8.2 Paraffinschnitte und Entparaffinierung

Die Entparaffinierung als Voraussetzung zur Färbung von Organschnitten schloss sich an die Herstellung von Gewebeschnitten der Niere an. Die in Paraffin gebetteten Proben wurden vor dem Schneiden auf einer -15 °C kalten Kühlplatte gelagert, um eine verbesserte Schneidfähigkeit zu gewährleisten. Anschließend wurden unter Verwendung eines Mikrotoms Dünnschnitte von 1  $\mu$ m Schichtdicke angefertigt. Es folgte die Überführung der Dünnschnitte auf ein 42 °C warmes Wasserbad zur Glättung, bevor sie anschließend auf silanisierte Objektträger aufgezogen werden konnten. Darauf folgte eine Trocknungsphase ü.N. bei 37 °C in vertikaler Ausrichtung.

Die Schnitte wurden anschließend für je fünf Minuten in einer Xylolreihe entparaffiniert und darauffolgend je drei Minuten in einer Ethanolreihe absteigender Ethanolkonzentration (100 %, 100 %, 96 %, 80 %, 70 %) rehydriert. Abschließend folgte die Überführung der Schnitte für je zweimal drei Minuten in *Aq. dest.*.

Die Entparaffinierungsreihe wurde unmittelbar vor der jeweiligen immunhistochemischen bzw. histologischen Färbung der Schnitte in Färbeküvetten aus Glas durchgeführt. Die immunhistochemischen und histologischen Färbungen erfolgten an Paraffingewebeschnitten der UUO-Nieren von behandelten Tieren (UUO + LIF) sowie UUO-Nieren der Kontrollgruppe (UUO + PBS).

### 2.2.8.3 Sirius Red-Färbung

Die Visualisierung und Quantifizierung von Kollagenfasern Typ 1 und Typ 2 im histologischen Präparat erfolgte durch das *Picro-Sirius Red Stain Kit for Collagen* (Scy Tek Laboratories). Im Anschluss an die Entparaffinierungsreihe wurden die Objektträger zunächst gründlich mit einem Papiertuch getrocknet, wobei eine Austrocknung der Präparate vermieden wurde. Nach Positionierung der Objektträger in der Färbekammer wurden die Präparate vollständig mit 1-2 Tropfen der Picro-Sirius Red Färbelösung bedeckt. Die Inkubationszeit für die Färbelösung betrug 60 Minuten unter Lichtausschluss. Etwas *Aq. dest.* in der Färbekammer verhinderte das Austrocknen der Präparate. Anschließend wurde die Farbe von den Präparaten abgekippt und die Präparate zweimalig sehr kurz mit 0.5%iger Essigsäure beträufelt. Es folgte die Überführung zum Spülen in Ethanol absolut und nachfolgend eine Lufttrocknung. Anschließend wurden die Präparate permanent mittels Roti®Mount Eindeckmedium und Deckglas eingedeckt und horizontal zur Lufttrocknung gelagert. Die Visualisierung der Präparate erfolgte mittels Lichtmikroskop im Rahmen dessen Kollagenfasern rot, Zytoplasma und Muskelfibrillen gelb zur Darstellung kamen. Die Quantifizierung des Kollagengehalts der einzelnen Präparate erfolgte durch die Erstellung von Fotos von 10 *High Powerfields* (HPF) in 400-facher Vergrößerung (10x Okular x 40x Objektiv) je Präparat. Zur Verwendung kam eine Nikon D7000 Kamera sowie das PC-gesteuerte Aufnahmeprogramm digiCAM Control 2 V.2.1.0.0. Jedes Foto enthielt ein zugehöriges Glomerulum sowie Nierenmark- und Cortex. Die *paravaskuläre* Fibrosierung größerer Gefäße fand bei der Auswertung nach Möglichkeit keine Beachtung.

Mit Hilfe der Software ImageJ wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Fibroseanteile am gesamten Gewebeschnitt ermittelt, bevor anschließend ein Mittelwert aus allen HPFs eines Präparats gebildet und der statistischen Auswertung zugeführt werden konnte.

### 2.2.8.4 CD3<sup>+</sup>-Färbung

Diese immunhistochemische Färbung dient der Detektion von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten über eine Braunfärbung ihrer Zellmembranen.

Vorausgehend wurden die Gewebeschnitte wie oben beschrieben entparaffiniert. Die Antigendemaskierung der in Formalin fixierten und paraffingebetteten Gewebeschnitte erfolgte mittels *Target Retrieval Solution* (pH 9; Tris-EDTA-Puffer) für 20 min bei 98 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Schnitte für 20 min bei RT gelagert, bevor sie für 10 min in ein Eiswasserbad

überführt wurden. Für den gesamten Abkühlungszeitraum verblieben die Schnitte in der mit *Target Retrieval Solution* befüllten Färbeküvette. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte mittels *Aq. dest.* erfolgte die Blockierung der endogenen Meerrettichperoxidase (*HorseRadish Peroxidase, HRP*) in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung für 10 min bei RT. Nach weiterem dreimaligem Waschen der Schnitte mittels *Aq. dest.* wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen mittels *Normal horse serum* durch Inkubation für 20 min bei RT gesättigt. Anschließend wurden die Schnitte mit Primärantikörper (*Polyclonal Rabbit Anti-Human CD3* gebrauchsfertig, Dako Nr. IS503) für 1 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte mit AK-Waschpuffer erfolgte für weitere 30 min die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (*ImmPress anti rabbit, HRP*), bevor die Schnitte erneut zweimalig in AK- Waschpuffer gewaschen wurden.

Die Entwicklung wurde mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) und Substratpuffer aus dem EnVision Kit durchgeführt, indem die Schnitte jeweils für 3.5 min bei RT mit DAB + Substratpuffer-Lösung inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte in *Aq. dest.* erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaunlösung nach Mayer für 40 sec bei RT. Nach 10-minütigem Bläuen mittels Leitungswassers und vollständiger Lufttrocknung wurden die Schnitte abschließend mittels Roti®Mount Eindeckmedium permanent eingeschlossen.

Zur Visualisierung und Quantifizierung der Zahl an CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten erfolgte die Anfertigung von Fotos *idem* zur Sirius Red Färbung. Nach manueller Auszählung der Zielzellen wurde ein Mittelwert aller Zellen der HPFs eines Präparats gebildet und der statistischen Auswertung zugeführt.

### 2.2.8.5 F4/80<sup>+</sup> Makrophagenfärbung

Mit der F4/80<sup>+</sup>-Färbung wird unter Verwendung des monoklonalen F4/80-Antikörperklons Cl:A3-1 (Primärantikörper, Serotec Nr. MCA497RT in der Verdünnung 1:100 in AK-Puffer, Dako Nr. S0809) das F4/80 Antigen detektiert. Die durch diese Färbung erzielte Braunfärbung der F4/80<sup>+</sup> Zellen bzw. ihrer Zellmembranen wurde anschließend *idem* zu den CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten visualisiert und quantifiziert.

Als Vorbereitung auf die Färbung erfolgte zunächst eine Entparaffinierung der Gewebeschnitte. Die Antigendemaskierung des in Formalin fixierten und Paraffin gebetteten Gewebes erfolgte mittels gebrauchsfertiger Proteinase K für jeweils 2.5 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit *Aq. dest.* erfolgte die Blockierung der endogenen HRP in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung für 10 min bei RT. Nach weiterem dreimaligem Waschen der Schnitte mittels *Aq. dest.* wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen für anti-F4/80 mittels *Normal goat serum* durch Inkubation der Schnitte für 20 min bei RT gesättigt. Hieraus resultierend ergibt sich eine geringere Hintergrundfärbung und somit bessere Auswertbarkeit der Präparate. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper ü.N. bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst dreimalig mit AK-Waschpuffer gespült. Weiterhin erfolgte die Inkubation der Schnitte für 30 min bei RT unter

Verwendung des HRP-konjugierten Sekundär-Antikörpers (ImmPRESS *anti Rat*, HRP [Vector Nr. MP 7444]), bevor die Schnitte erneut zweimalig in AK-Waschpuffer gewaschen wurden.

Die Entwicklung erfolgte mittels 3.3'-Diaminobenzidin (DAB) aus dem EnVision Kit, indem die Schnitte jeweils für 3.5 min bei RT mit DAB + Substratpuffer-Lösung inkubiert wurden. Nach zweimaligem Waschen der Schnitte in *Aq. dest.* erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämalaunlösung nach Mayer für 40 sec bei RT. Nach 10-minütigem Bläuen mittels Leitungswasser und vollständiger Lufttrocknung wurden die Schnitte abschließend mittels Roti®Mount Eindeckmedium permanent eingeschlossen.

## 2.2.9 Durchflusszytometrie

### 2.2.9.1 Probenaufbereitung von Nierengewebe und Milzgewebe

Die mit 4 °C kaltem PBS perfundierte und blutleere Niere wurde zunächst in einer Petrischale aus Glas grob mit einem Skalpell zerkleinert und anschließend für vier Minuten mit einer Rasierklinge unter Hinzufügen weniger Tropfen Kollagenase A-Lösung (Tabelle 11) gehackt und somit zu einem feinen Homogenisat verarbeitet. Das Homogenisat wurde anschließend in 1 ml Kollagenaselösung aufgenommen und in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C und 300-350 rpm im Thermomixer. Die durch Inkubation generierte Einzelzellsuspension wurde im darauffolgenden Schritt vorsichtig durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zum Schutz der Zellen vor Austrocknung wurde großzügig Arbeitspuffer (Tabelle 11) hinzugegeben. Kapselgewebe, Bindegewebe und Zellbestandteile, die das Sieb nicht passierten, wurden verworfen. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation der Einzelzellsuspension bei RT und 300 G. Der Überstand über dem so entstandenen Zellpellet wurde abgesogen und verworfen, das Pellet daraufhin vorsichtig aufgeschlagen. Zum Einfrieren wurden die Zellen durch Resuspension in 2 ml Einfriermedium (Tabelle 11) aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und ü.N. bei -80 °C in Thermo Scientific™ Mr. Frosty™ Gefrierbehältern eingefroren. Zur Schonung der Zellen erfolgte der Einfrierprozess langsam mit Hilfe der genannten Behälter bei einer Gefriertrate von 1 °C pro Minute. Zur Langzeitlagerung wurden die Einzelzellsuspensionen am Folgetag in die Gasphase flüssigen Stickstoffs überführt.

### 2.2.9.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Entzündungszellpopulation

In Vorbereitung auf die durchflusszytometrischen Analysen wurden die Zellen zunächst aufgetaut. Die mit Einzelzellsuspensionen versehenen Kryoröhrchen wurden hierzu kurz in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt. Noch gefrorene Anteile tauten anschließend weiter bei RT auf, um eine

größtmögliche Schonung der Zellen durch Vermeidung plötzlicher Temperaturunterschiede zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellsuspensionen zur Verdünnung und möglichen Eliminierung von Dimethylsulfoxid (DMSO) des Einfriermediums in mit Arbeitspuffer befüllte 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Mittels Zentrifugation bei 300 G für 5 min erfolgte die Pelletierung und damit einhergehend Separation der Zellen vom DMSO-Arbeitspuffergemisch. In weiteren Arbeitsschritten wurden die Überstände abgekippt, die Pellets in ca. 150  $\mu$ l Arbeitspuffer aufgenommen, resuspendiert und auf zwei 5 ml FACS-Röhrchen zu 100  $\mu$ l für die Färbung und 50  $\mu$ l für die ungefärbte Kontrolle verteilt. Die Färbung der Zielzellen erfolgte mittels Fluorochrom markierter Antikörper, welche als Gesamtmix in einem FACS-Röhrchen vorgelegt wurden. Zu jeder Probe wurde anschließend ein Antikörpermix (Tabelle 6) hinzugegeben. In einem weiteren FACS-Röhrchen wurde jeweils eine nicht gefärbte Negativkontrolle mitgeführt. Nach 20-minütiger Inkubation unter Lichtausschluss erfolgte ein Waschschrift mittels 1 ml Arbeitspuffer. Hierdurch wurden unspezifisch gebundene Antikörper entfernt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 860 G wurden die Überstände wiederum abgekippt und das entstandene Pellet in ca. 350  $\mu$ l Arbeitspuffer resuspendiert. Die Detektion der Zielzellen (CD45<sup>+</sup> T-Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> T-Zellen, T<sub>H</sub>1 T-Zellen, T<sub>H</sub>2 T-Zellen, T<sub>H</sub>17-Zellen, T<sub>reg</sub>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen) erfolgte mittels voreingestelltem CytoFLEX Durchflusszytometer der Firma Dako in der Abteilung *Core Flow Cytometry Facility* des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der HHU.

## 2.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische und graphische Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten erfolgte unter Zuhilfenahme der Auswertungssoftware GraphPad PRISM, Version 8.0. Die Anzahl der Versuchstiere jeder Gruppe ist mit n angegeben. Die Identifikation statistisch signifikanter Veränderungen entsprechend der Hypothese erfolgte mittels zweiseitigen T-Tests nach Student als *unpaired one-tailed t-test*. Bei Annahme einer Normalverteilung wurden die untersuchten Stichproben verglichen. Alle Daten werden als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Dabei wurde ein  $\alpha$ -Fehler mit den Signifikanzniveaus von  $< 0.05$  (\*) bzw. von  $< 0.01$  (\*\*) als statistisch signifikant angenommen, die Nullhypothese wurde in diesem Fall verworfen. Nicht signifikante Ergebnisse werden im Folgenden mit ns bezeichnet.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Säulendiagrammen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Western Blot-Proteinanalyse für Col1 $\alpha$ 1 und Sirius Red Färbung – Ausprägung renaler tubulointerstitieller Fibrose

#### 3.1.1 Western Blot-Proteinanalyse für Col1 $\alpha$ 1

Kollagen Typ 1 korreliert mit dem Ausmaß der renalen tubulointerstitiellen Fibrose. Zur Quantifizierung der Ausprägung des Fibrosierungsprozesses im tubulointerstitiellen Gewebe der geschädigten Nieren erfolgte eine Proteinanalyse von Col1 $\alpha$ 1 durch Erstellung von Western Blots. Hierzu wurden Proteinlysate von je sieben Tieren jeder Kontroll- sowie Behandlungsgruppe entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit und dementsprechender Organentnahme am dritten (d = 3), 10. (d = 10) und 14. (d = 14) Tag nach UUO untersucht. Als Ladekontroll-Antikörper erfolgte zudem eine Bestimmung von  $\beta$ -Actin, einem Strukturprotein des Zytoplasmas. Hierüber konnten die Expressionslevel von Col1 $\alpha$ 1 normalisiert und dadurch sichergestellt werden, dass die Proteinmengen in den generierten Lysaten gleichmäßig verteilt waren.

Zu allen drei Untersuchungszeitpunkten ergab sich eine signifikante Reduktion von Col1 $\alpha$ 1 nach Schädigung der Nieren mittels UUO in der mit LIF behandelten Gruppe (UUO + LIF) im Vergleich zur Kontrollgruppe (UUO + PBS) (\*  $p < 0.05$ ) (Abb. 8-10).

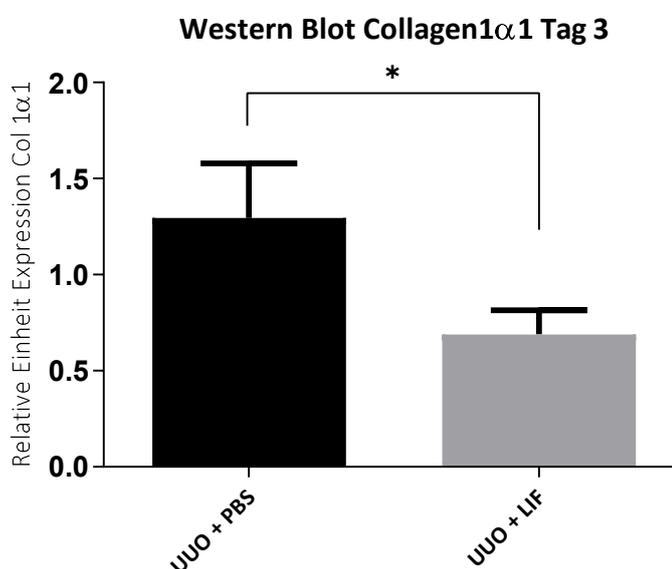


Abb. 8: Western Blot für Col1 $\alpha$ 1 aus geschädigtem Nierengewebe drei Tage (d = 3) nach UUO. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von Col1 $\alpha$ 1 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UUO + PBS (n = 7) vs. UUO + LIF (n = 7): 1.30 ± 0.28 vs. 0.69 ± 0.12 (\*  $p < 0.05$ ; mean ± SEM).

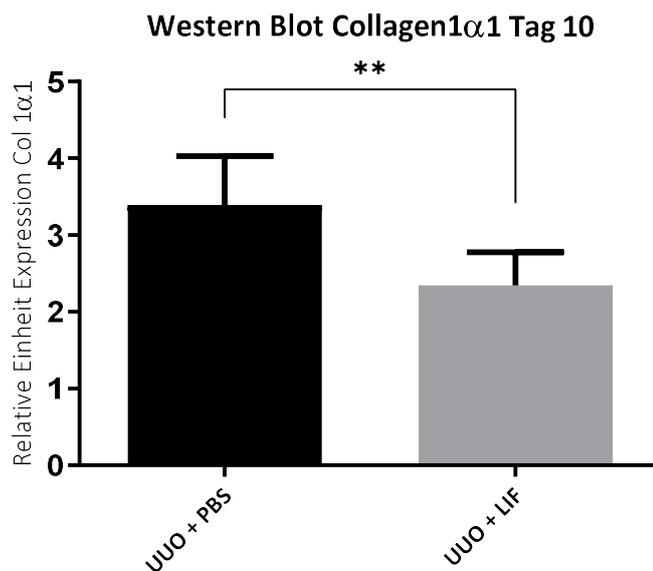


Abb. 9: **Western Blot für Col1 $\alpha$ 1 aus geschädigtem Nierengewebe 10 Tage (d = 10) nach UUU.** Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von Col1 $\alpha$ 1 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UUU + PBS (n = 7) vs. UUU + LIF (n = 7): 3.40 ± 0.23 vs. 2.34 ± 0.16 (\*\* p < 0.01 mean ± SEM).

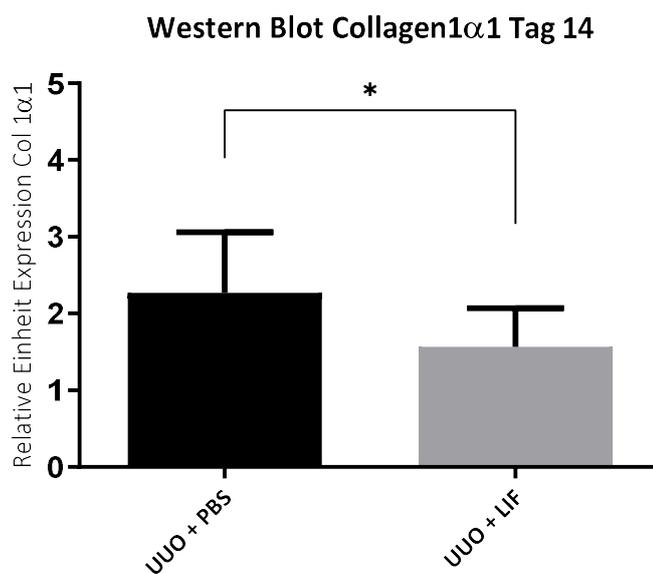


Abb. 10: **Western Blot für Col1 $\alpha$ 1 aus geschädigtem Nierengewebe 14 Tage (d = 14) nach UUU.** Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von Col1 $\alpha$ 1 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UUU + PBS (n = 7) vs. UUU + LIF (n = 7): 2.27 ± 0.30 vs. 1.56 ± 0.19 (\* p < 0.05, mean ± SEM).

### 3.1.2 Histologie – Sirius Red Färbung von Kollagen Typ 1 (Col1 $\alpha$ 1)

Die histochemische Sirius Red Färbung für Kollagen Typ 1 (Col1 $\alpha$ 1) erfolgte zur Quantifizierung des Fibrosierungsgrades auf histologischer Ebene. Neben der quantitativen Ermittlung des Fibrosierungsgrades über die Ausprägung von Kollagen Typ 1 im Nierengewebe diente dieser Nachweis der qualitativen Darstellung des Proteins. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei den mit LIF behandelten Tieren in den Gruppen d = 3 und d = 10 eine nicht signifikant geringere Färbung von Kollagen Typ 1 im Bereich des tubulointerstitiellen Nierengewebes. In der Gruppe d = 14 zeigte sich eine nicht signifikant stärkere Fibrosierung des Gewebes der mit LIF behandelten Tiere (Abb. 11-19).

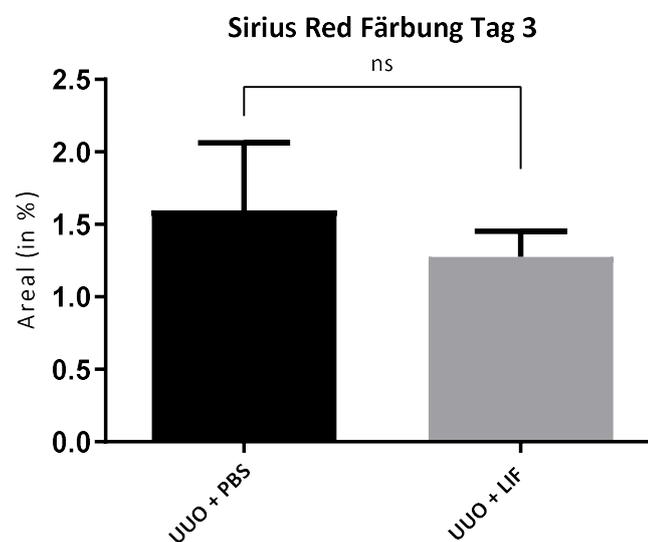


Abb. 11: **Sirius Red Färbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes drei Tage (d = 3) nach UUO.** Es zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der renalen tubulointerstitiellen Fibrose durch die Behandlung mittels LIF. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 8):  $1.60 \pm 0.46$  vs.  $1.28 \pm 0.18$  ( $p = ns$ , mean  $\pm$  SEM).

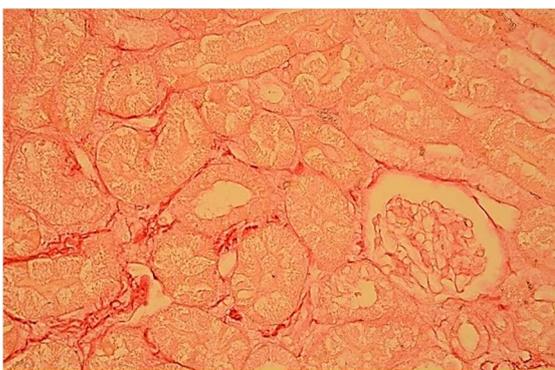


Abb. 12: **Exemplarische lichtmikroskopische histochemische Darstellung von Kollagenfasern Typ 1 im tubulointerstitiellen Nierengewebe nach SIRIUS Red Färbung an Tag drei (d = 3) UUO + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

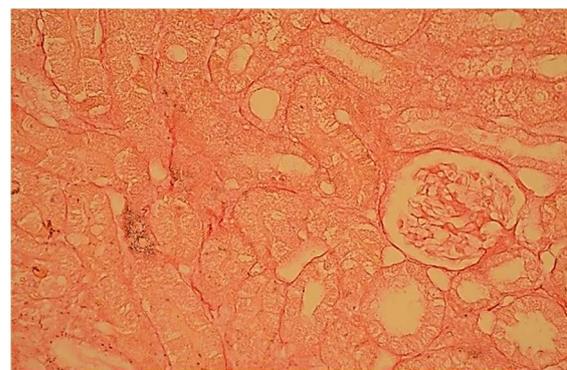


Abb. 13: **Exemplarische lichtmikroskopische histochemische Darstellung von Kollagenfasern Typ 1 im tubulointerstitiellen Nierengewebe nach SIRIUS Red Färbung an Tag drei (d = 3) UUO + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

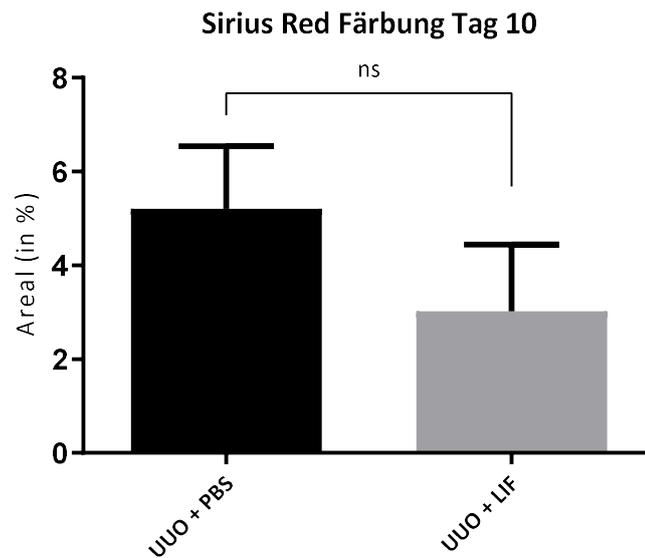


Abb. 14: **Sirius Red Färbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes 10 Tage (d = 10) nach UUO.** Es zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der renalen tubulointerstitiellen Fibrose durch die Behandlung mittels LIF. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 8):  $5.21 \pm 1.34$  vs.  $3.03 \pm 0.50$  ( $p = ns$ , mean  $\pm$  SEM).

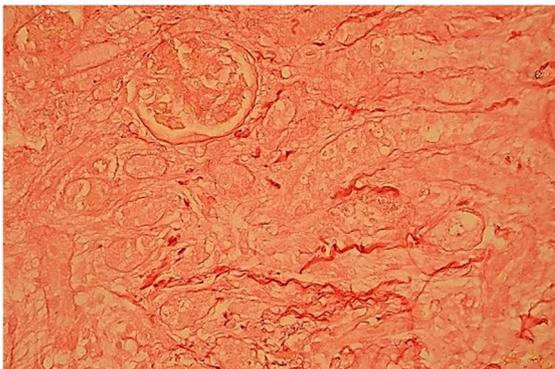


Abb. 15: **Exemplarische lichtmikroskopische histochemische Darstellung von Kollagenfasern Typ 1 im tubulointerstitiellen Nierengewebe nach SIRIUS Red Färbung an Tag 10 (d = 10) UUO + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

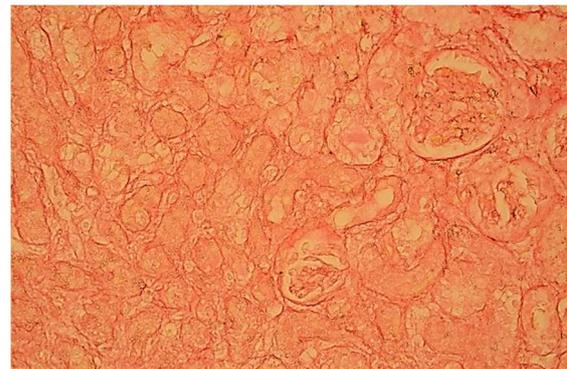


Abb. 16: **Exemplarische lichtmikroskopische histochemische Darstellung von Kollagenfasern Typ 1 im tubulointerstitiellen Nierengewebe nach SIRIUS Red Färbung an Tag 10 (d = 10) UUO + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

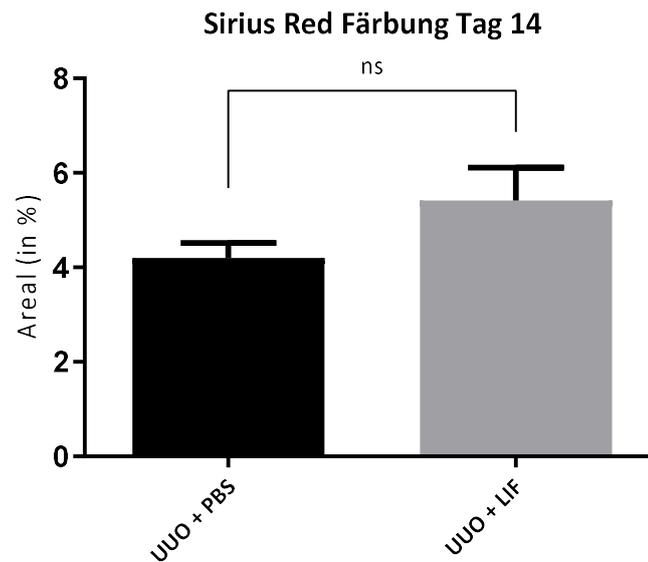


Abb. 17: **Sirius Red Färbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes 14 Tage (d = 14) nach UUO.** Es zeigte sich eine nicht signifikante Erhöhung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 7):  $4.20 \pm 0.32$  vs.  $5.42 \pm 0.69$  (p = ns, mean  $\pm$  SEM).

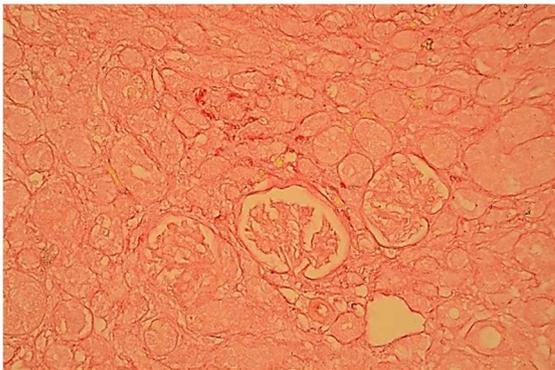


Abb. 18: **Exemplarische lichtmikroskopische histochemische Darstellung von Kollagenfasern Typ 1 im tubulointerstitiellen Nierengewebe nach SIRIUS Red Färbung an Tag 14 (d = 14) UUO + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

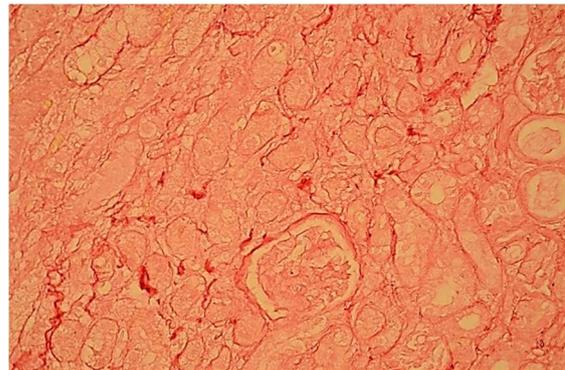


Abb. 19: **Exemplarische lichtmikroskopische histochemische Darstellung von Kollagenfasern Typ 1 im tubulointerstitiellen Nierengewebe nach SIRIUS Red Färbung an Tag 14 (d = 14) UUO + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

## 3.2 Genexpressionsanalyse

Mittels quantitativer Real Time PCR (qPCR) wurde die Genexpression spezifischer proinflammatorischer und fibrotischer Marker auf mRNA-Ebene und somit der Einfluss von LIF auf die durch das UUO-Modell erzeugte renale tubulointerstitielle Inflammation und Fibrose untersucht. Es wurden das durch UUO geschädigte Nierengewebe und der nierennächste *paraaortale* Lymphknoten untersucht, letzterer zur Untersuchung der systemischen/lokoregionalen Entzündungsreaktion.

### 3.2.1 qPCR aus Nierengewebe

Um die Entwicklung einer renalen tubulointerstitiellen Fibrose als Reaktion auf den Schädigungsreiz der UUO zu charakterisieren, erfolgte die Bestimmung der mRNA-Expression der Fibrosemarker Col1 $\alpha$ 1, PAI-1, PDGFR1 und TGF- $\beta$ .

Innerhalb der 3-Tages-Behandlungsgruppe (UUO + LIF; d = 3) zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe (UUO + PBS) eine erniedrigte mRNA-Expression von Col1 $\alpha$ 1 (UUO + PBS; n = 8; mean  $\pm$  SEM 24.82  $\pm$  2.23 vs. UUO + LIF; n = 8; mean  $\pm$  SEM 23.32  $\pm$  4.10; p = ns). Die mit LIF behandelte Gruppe wies hingegen eine erhöhte Expression der mRNA-Expression von PAI-1 (UUO + PBS; n = 8; mean  $\pm$  SEM 24.63  $\pm$  3.17 vs. UUO + LIF; n = 8; mean  $\pm$  SEM 38.12  $\pm$  13.83 p = ns), PDGFR1 (UUO + PBS; n = 8; mean  $\pm$  SEM 13.54  $\pm$  0.99 vs. UUO + LIF; n = 8; mean  $\pm$  SEM 14.01  $\pm$  1.03; p = ns) und TGF- $\beta$  (UUO + PBS; n = 8; mean  $\pm$  SEM 10.30  $\pm$  0.92 vs. UUO + LIF; n = 8; mean  $\pm$  SEM 10.73  $\pm$  1.36; p = ns) auf. Das Signifikanzniveau von p < 0.05 wurde bei keinem Marker erreicht (Abb. 20).

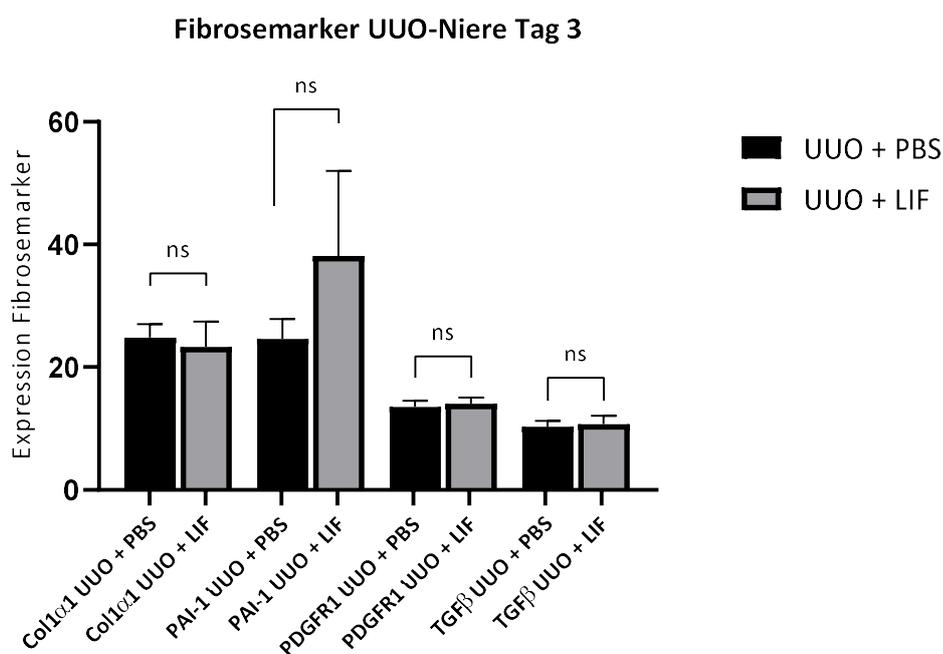


Abb. 20: qPCR Fibrosemarker aus geschädigtem Nierengewebe 3 Tage (d = 3) nach UUO. Es zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der mRNA-Expression des Fibrosemarkers Col1 $\alpha$ 1 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. PAI-1, PDGFR1 und TGF $\beta$  zeigten in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Expression.

Innerhalb der 10-Tagesgruppe (d = 10) zeigte sich in der mit LIF behandelten Gruppe eine nicht signifikant erhöhte Genexpression von PAI-1 (UUO + PBS; n = 8; mean  $\pm$  SEM  $2.57 \pm 0.22$  vs. UUO + LIF; n = 8; mean  $\pm$  SEM  $3.75 \pm 0.87$ ; p = ns). Col1 $\alpha$ 1 (UUO + PBS; n=8; mean  $\pm$  SEM  $2.18 \pm 0.39$  vs. UUO + LIF; n = 8; mean  $\pm$  SEM  $2.13 \pm 0.34$ ; p = ns), PDGFR1 (UUO + PBS; n = 8; mean  $\pm$  SEM  $1.73 \pm 0.24$  vs. UUO + LIF; n = 8; mean  $\pm$  SEM  $1.41 \pm 0.08$ ; p = ns) sowie TGF $\beta$  (UUO + PBS; n=8; mean  $\pm$  SEM  $1.45 \pm 0.22$  vs. UUO + LIF; n = 8; mean  $\pm$  SEM  $1.35 \pm 0.06$ ; p = ns) ergaben eine erniedrigte mRNA-Expression in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht (Abb. 21).

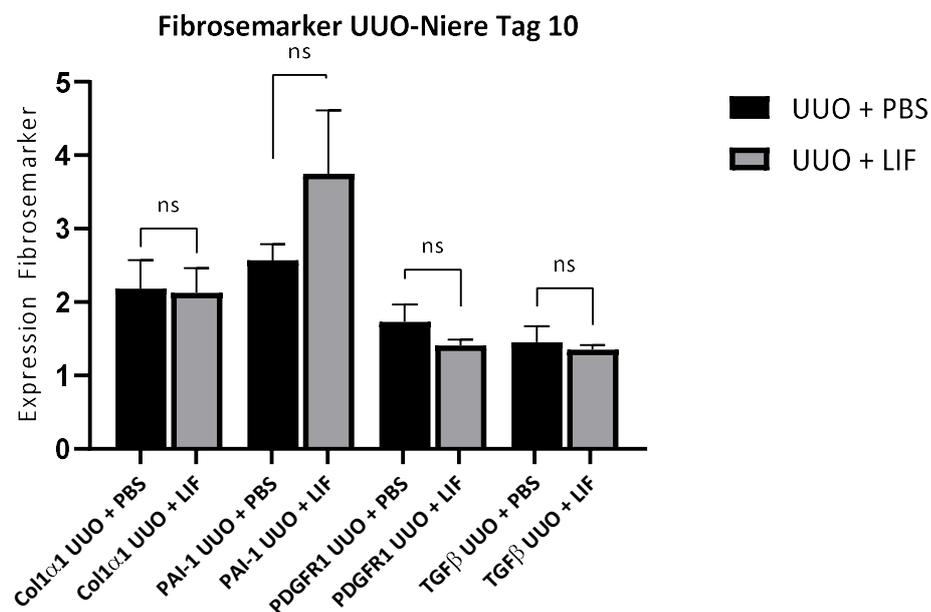


Abb. 21: qPCR Fibrosemarker aus geschädigtem Nierengewebe 10 Tage (d = 10) nach UUO. Es zeigte sich eine nicht signifikant erniedrigte mRNA-Expression der Fibrosemarker Col1 $\alpha$ 1, PDGFR1 und TGF $\beta$  in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. PAI-1 zeigte in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Genexpression.

Innerhalb der 14-Tagesgruppe (d = 14) wies die mit LIF behandelte Gruppe in allen untersuchten Fibrosemarkern eine erniedrigte Genexpression der mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die verringerte Expression von Col1 $\alpha$ 1 erreichte dabei das definierte Signifikanzniveau von \* p < 0.05.

Col1 $\alpha$ 1 (UUO + PBS; n=8; mean  $\pm$  SEM 2.81  $\pm$  0.32 vs. UUO + LIF; n = 7; mean  $\pm$  SEM 1.84  $\pm$  0.33; \* p < 0.05). PAI-1 (UUO + PBS; n=8; mean  $\pm$  SEM 2.12  $\pm$  0.50 vs. UUO + LIF; n = 7; mean  $\pm$  SEM 1.31  $\pm$  0.12; p = ns). PDGFR1 (UUO + PBS; n=8; mean  $\pm$  SEM 1.71  $\pm$  0.21 vs. UUO + LIF; n = 7; mean  $\pm$  SEM 1.46  $\pm$  0.12; p = ns). TGF $\beta$  (UUO + PBS; n=8; mean  $\pm$  SEM 1.39  $\pm$  0.11 vs. UUO + LIF; n = 7; mean  $\pm$  SEM 1.30  $\pm$  0.10; p = ns) (Abb. 22).

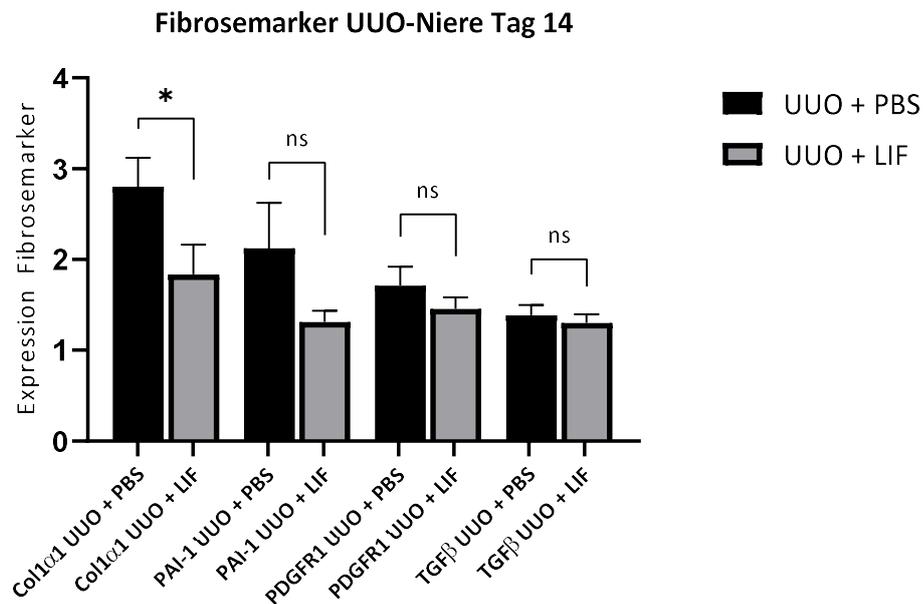


Abb. 22: qPCR-Fibrosemarker aus geschädigtem Nierengewebe 14 Tage (d = 14) nach UUO. Es zeigte sich eine Reduktion der mRNA-Expression der Fibrosemarker Col1 $\alpha$ 1, PAI-1, PDGFR1 und TGF $\beta$  in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Reduktion von Col1 $\alpha$ 1 erreichte dabei das Signifikanzniveau mit \*p < 0.05.

Zusätzlich erfolgte eine mRNA-Expressionsanalyse der proinflammatorischen Zytokine RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1, NF $\kappa$ B und TNF- $\alpha$ .

An Tag drei des Versuchszeitraumes ( $d = 3$ ) ergab sich eine nicht signifikante Reduktion der mRNA-Expression von RANTES (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $15.71 \pm 1.87$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $12.82 \pm 1.45$ ;  $p = ns$ ), MCP-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $13.92 \pm 1.81$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $13.89 \pm 1.56$ ;  $p = ns$ ) und NF $\kappa$ B (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $11.61 \pm 0.57$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $10.48 \pm 0.89$ ;  $p = ns$ ) in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hingegen zeigte sich in der Kontrollgruppe eine nicht signifikante Erniedrigung von IL-1 $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $10.66 \pm 1.18$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $11.96 \pm 2.51$ ;  $p = ns$ ), IL-6 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $23.31 \pm 4.16$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $46.47 \pm 19.82$ ;  $p = ns$ ) und TNF- $\alpha$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $12.31 \pm 1.50$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $13.80 \pm 1.15$ ;  $p = ns$ ) (Abb. 23).

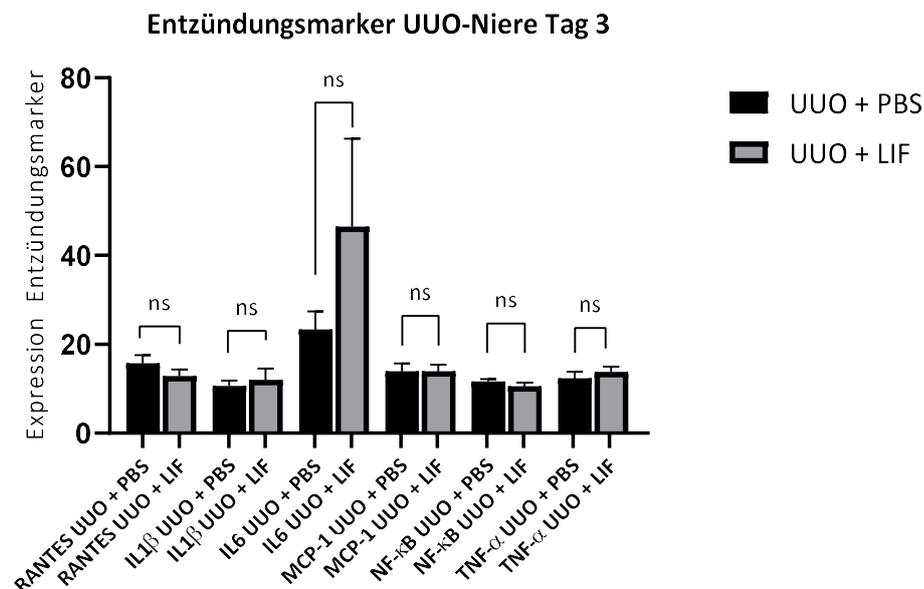


Abb. 23: *qPCR-Entzündungsmarker aus geschädigtem Nierengewebe drei Tage ( $d = 3$ ) nach UUO. Es zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der mRNA-Expression der Entzündungsmarker RANTES, MCP-1 und NF $\kappa$ B in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie TNF- $\alpha$  zeigten eine nicht signifikant erhöhte Expression in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.*

An Tag 10 des Versuchszeitraumes ( $d = 10$ ) ergab sich eine numerisch erniedrigte mRNA-Expression der Entzündungsmarker RANTES (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $3.50 \pm 0.51$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.39 \pm 0.67$ ;  $p = ns$ ), IL-1 $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $3.20 \pm 0.92$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $3.14 \pm 0.65$ ;  $p = ns$ ), IL-6 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $34.60 \pm 20.26$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $24.78 \pm 8.65$ ;  $p = ns$ ), MCP-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.79 \pm 0.62$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.42 \pm 0.41$ ;  $p = ns$ ) sowie NF $\kappa$ B (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.46 \pm 0.14$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.37 \pm 0.11$ ;  $p = ns$ ) in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht. TNF- $\alpha$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.44 \pm 0.15$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.63 \pm 0.18$ ;  $p = ns$ ) zeigte in der mit LIF behandelten Gruppe eine nicht signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 24).

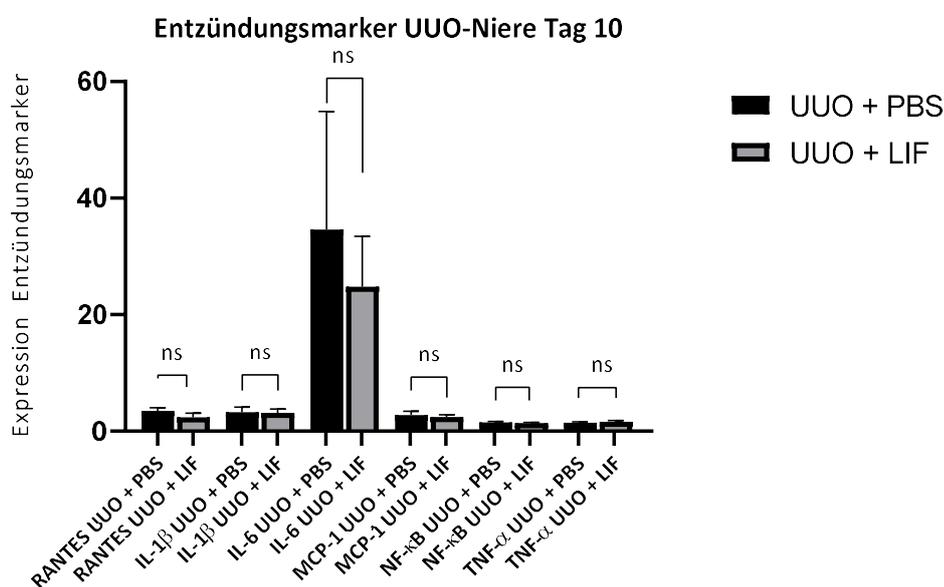


Abb. 24: qPCR-Entzündungsmarker aus geschädigtem Nierengewebe zehn Tage ( $d = 10$ ) nach UUO. Es zeigte sich eine nicht signifikant erniedrigte mRNA-Expression der Entzündungsmarker RANTES, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 und NF $\kappa$ B in der mit LIF behandelten Gruppe.

Innerhalb der 14-Tagesgruppe ( $d = 14$ ) ergab sich eine nicht signifikante Reduktion von RANTES (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 8.69 \pm 2.34$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 5.91 \pm 0.95$ ;  $p = \text{ns}$ ), IL-6 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 3.70 \pm 1.32$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 3.18 \pm 1.17$ ;  $p = \text{ns}$ ) und TNF- $\alpha$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.86 \pm 0.13$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.60 \pm 0.14$ ;  $p = \text{ns}$ ) in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Analyse von NF $\kappa$ B (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.46 \pm 0.10$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.21 \pm 0.04$ ;  $p < 0.05$ ) zeigte eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression in der LIF-Behandlungsgruppe.

Die Entzündungsmarker IL-1 $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.14 \pm 0.28$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.42 \pm 0.30$ ;  $p = \text{ns}$ ) sowie MCP-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.10 \pm 0.24$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.82 \pm 0.43$ ;  $p = \text{ns}$ ) wiesen in der Behandlungsgruppe eine nicht signifikant erhöhte Expression auf mRNA-Genebene auf (Abb. 25).

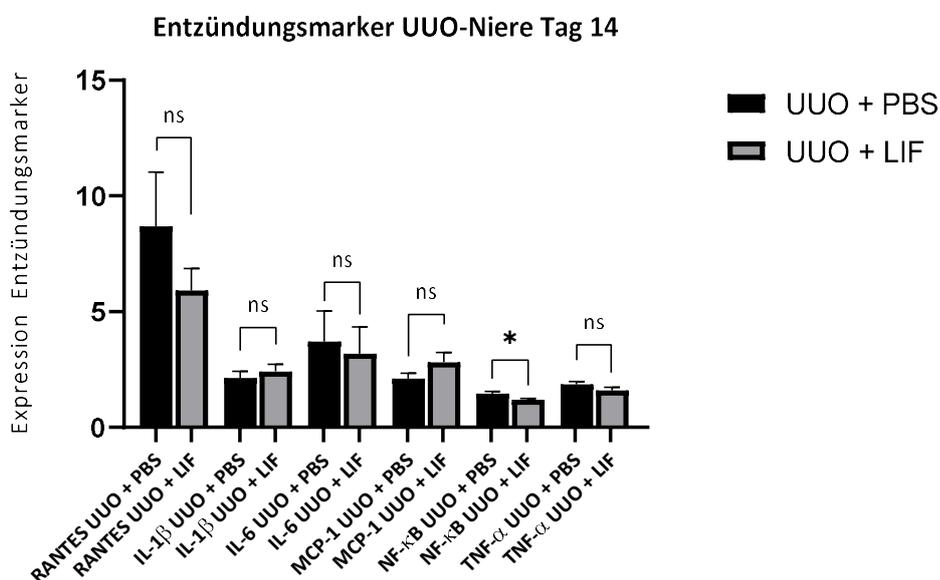


Abb. 25: qPCR-Entzündungsmarker aus geschädigtem Nierengewebe 14 Tage ( $d = 14$ ) nach UUO. Es zeigte sich eine erniedrigte mRNA-Expression der Entzündungsmarker RANTES, IL-6, NF $\kappa$ B und TNF- $\alpha$  in der mit LIF behandelten Gruppe. NF $\kappa$ B erreichte dabei das Signifikanzniveau.

### 3.2.2 qPCR aus Lymphknoten

Die Untersuchung der nierennächsten *paraaortalen* LK auf mRNA-Ebene hinsichtlich einer systemischen Entzündungsreaktion ergab folgende Ergebnisse:

An Tag drei des Versuchszeitraumes ( $d = 3$ ) zeigte die Behandlungsgruppe eine nicht signifikant erniedrigte Expression von TGF $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$   $1.45 \pm 0.07$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$   $1.39 \pm 0.07$ ;  $p = \text{ns}$ ). Col1 $\alpha$ 1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$   $1.93 \pm 0.14$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$   $2.35 \pm 0.26$ ;  $p = \text{ns}$ ), PAI-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$   $4.98 \pm 1.44$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$   $5.60 \pm 1.90$ ;  $p = \text{ns}$ ) sowie PDGFR1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$   $1.62 \pm 0.10$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM}$   $1.66 \pm 0.16$ ;  $p = \text{ns}$ ), zeigten in der mit LIF behandelten Gruppe keine geringere Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 26).

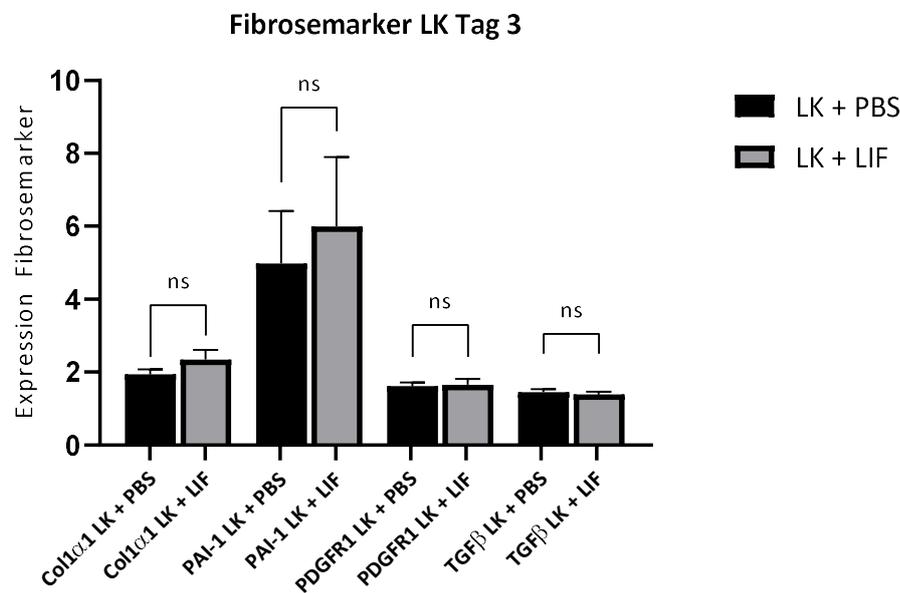


Abb. 26: qPCR-Fibrosemarker aus dem nierennächsten *paraaortalen* Lymphknoten drei Tage ( $d = 3$ ) nach UUO. Es zeigte sich eine erniedrigte mRNA-Expression des Fibrosemarkers TGF $\beta$  in der mit LIF behandelten Gruppe. Auf Col1 $\alpha$ 1, PAI-1 und PDGFR1 zeigte sich kein positiver Einfluss von LIF.

Innerhalb der 10-Tagesgruppe ( $d = 10$ ) ergab sich bei keinem Fibrosemarker eine verringerte Expression auf mRNA-Ebene durch die Behandlung mit LIF. Col1 $\alpha$ 1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.57 \pm 0.17$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.03 \pm 0.32$ ;  $p = \text{ns}$ ), PAI-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.68 \pm 0.20$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.05 \pm 0.14$ ;  $p = \text{ns}$ ), PDGFR1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.69 \pm 0.16$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.88 \pm 0.16$ ;  $p = \text{ns}$ ), TGF $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.21 \pm 0.06$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.28 \pm 0.05$ ;  $p = \text{ns}$ ) (Abb. 27).

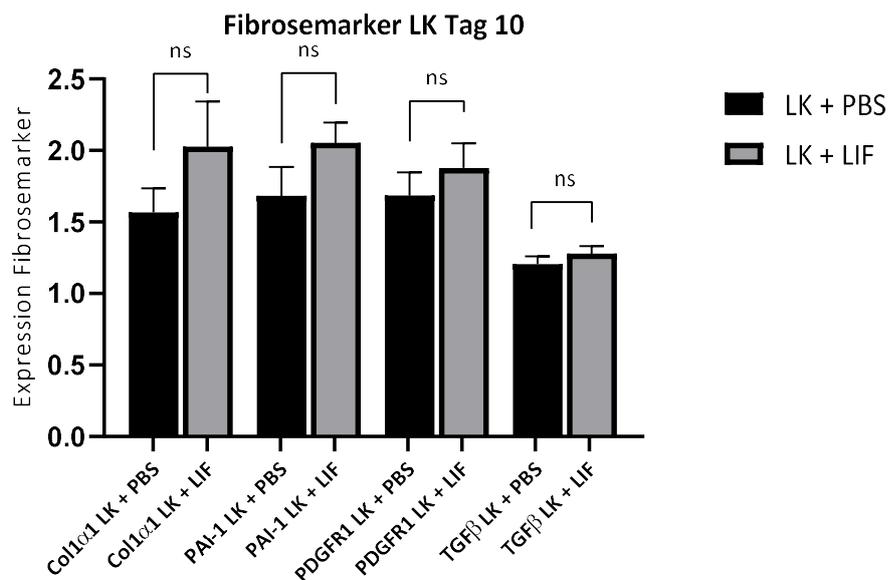


Abb. 27: qPCR-Fibrosemarker aus dem nierennächsten paraaortalen Lymphknoten 10 Tage ( $d = 10$ ) nach UUO. Es zeigte sich kein positiver Effekt von LIF auf die mRNA-Expression der Fibrosemarker Col1 $\alpha$ 1, PAI-1 PDGFR1 und TGF $\beta$  in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

An Tag 14 des Versuchszeitraumes ( $d = 14$ ) ergab sich eine verringerte Expression der Fibrosemarker Col1 $\alpha$ 1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.46 \pm 0.44$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.89 \pm 0.13$ ;  $p = ns$ ) und PAI-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $3.96 \pm 1.62$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.80 \pm 0.22$ ;  $p = ns$ ) in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht. PDGFR1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.69 \pm 0.13$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.84 \pm 0.15$ ;  $p = ns$ ) und TGF $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.45 \pm 0.10$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.60 \pm 0.10$ ;  $p = ns$ ) zeigten keine Verringerung der Expression durch die Behandlung mit LIF (Abb. 28).

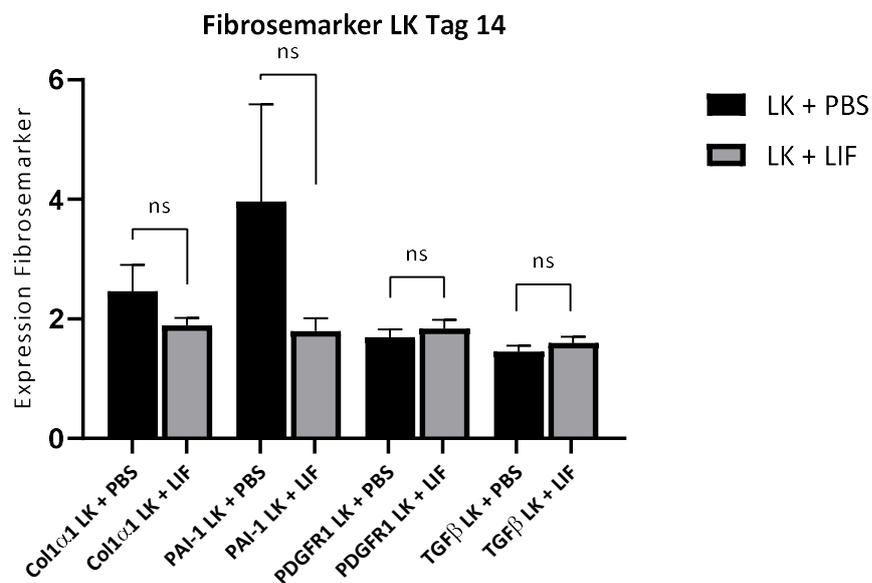


Abb. 28: qPCR-Fibrosemarker aus dem nierennächsten paraaortalen Lymphknoten 14 Tage ( $d = 14$ ) nach UUO. Es zeigte sich eine erniedrigte mRNA-Expression der Fibrosemarker Col1 $\alpha$ 1 und PAI-1 in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein positiver Einfluss von LIF auf PDGFR1 und TGF $\beta$  konnte nicht beobachtet werden.

Hinsichtlich der ausgewählten Entzündungsmarker ergab sich an Tag drei des Versuchszeitraumes ( $d = 3$ ) eine nicht signifikante Reduktion der mRNA-Expression von RANTES (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.10 \pm 0.22$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.62 \pm 0.17$ ;  $p = ns$ ), IL-6 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.61 \pm 0.73$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $2.37 \pm 0.60$ ;  $p = ns$ ), MCP-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $7.00 \pm 2.06$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $6.20 \pm 1.66$ ;  $p = ns$ ), NF $\kappa$ B (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.27 \pm 0.50$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.24 \pm 0.04$ ;  $p = ns$ ) und TNF- $\alpha$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.61 \pm 0.17$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $1.54 \pm 0.09$ ;  $p = ns$ ) in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hingegen zeigte sich in der Kontrollgruppe eine nicht signifikante Erniedrigung von IL-1 $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $3.97 \pm 0.80$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ; mean  $\pm$  SEM  $4.89 \pm 0.71$ ;  $p = ns$ ) (Abb. 29).

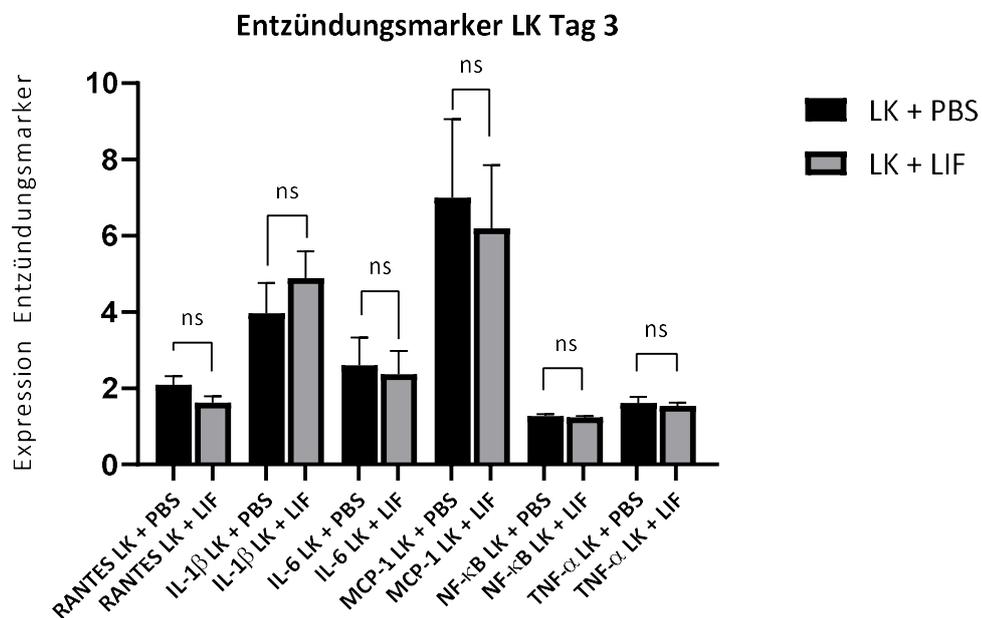


Abb. 29: qPCR-Entzündungsmarker aus dem nierennächsten paraaortalen Lymphknoten drei Tage ( $d = 3$ ) nach UUO. Es zeigte sich eine nicht signifikant erniedrigte mRNA-Expression der Entzündungsmarker RANTES, IL-6, MCP-1, NF $\kappa$ B und TNF- $\alpha$  in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

An Tag 10 des Versuchszeitraumes ( $d = 10$ ) ergab sich eine erniedrigte mRNA-Expression der Entzündungsmarker RANTES (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.24 \pm 0.12$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 0.92 \pm 0.11$ ;  $*p < 0.05$ ), MCP-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 3.20 \pm 0.54$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.89 \pm 0.54$ ;  $p = \text{ns}$ ), und TNF- $\alpha$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.38 \pm 0.09$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.32 \pm 0.10$ ;  $p = \text{ns}$ ) in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die verringerte Expression von RANTES erreichte hierbei das Signifikanzniveau. IL-1 $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.70 \pm 0.37$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 3.85 \pm 0.84$ ;  $p = \text{ns}$ ), IL-6 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.19 \pm 0.31$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.95 \pm 0.60$ ;  $p = \text{ns}$ ) sowie NF $\kappa$ B (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.36 \pm 0.08$  vs. UUO + LIF;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.38 \pm 0.04$ ;  $p = \text{ns}$ ) zeigten keine erniedrigte Expression durch die Behandlung mit LIF (Abb. 30).

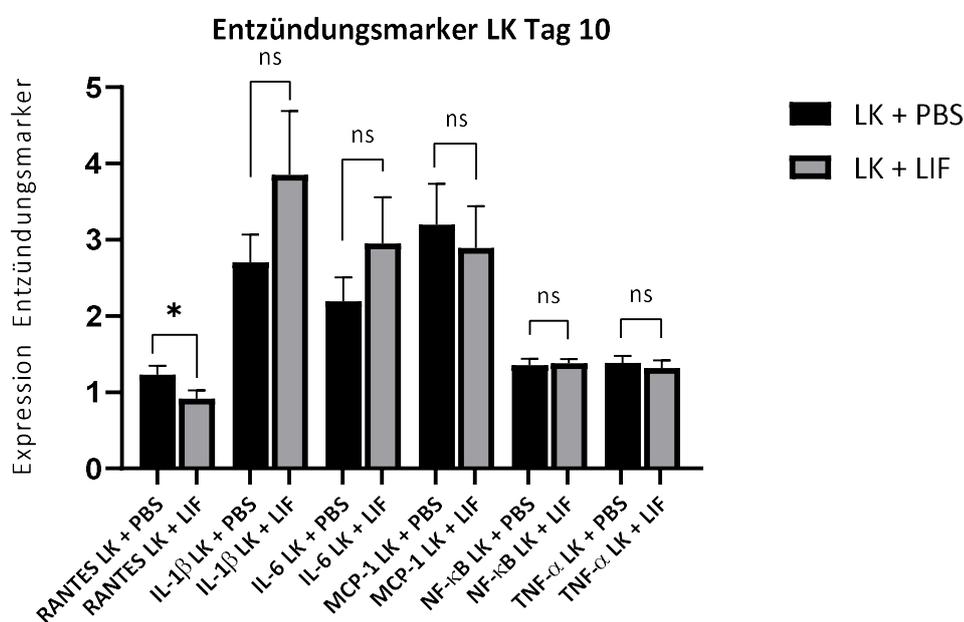


Abb. 30: qPCR-Entzündungsmarker aus dem nierennächsten paraaortalen Lymphknoten 10 Tage ( $d = 10$ ) nach UUO. Es zeigte sich eine erniedrigte mRNA-Expression der Entzündungsmarker RANTES, MCP-1 und TNF- $\alpha$  in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Erniedrigung von RANTES erreichte dabei das Signifikanzniveau.

Innerhalb der 14-Tagesgruppe ( $d = 14$ ) ergab sich eine nicht signifikante Reduktion von RANTES (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.24 \pm 0.21$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.90 \pm 0.18$ ;  $p = \text{ns}$ ), IL-1 $\beta$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 2.58 \pm 0.58$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.72 \pm 0.11$ ;  $p = \text{ns}$ ) und IL-6 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 14.57 \pm 10.94$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 5.67 \pm 0.61$ ;  $p = \text{ns}$ ) in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Entzündungsmarker MCP-1 (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 4.20 \pm 0.86$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 4.68 \pm 0.70$ ;  $p = \text{ns}$ ) und TNF- $\alpha$  (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.81 \pm 0.21$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.93 \pm 0.27$ ;  $p = \text{ns}$ ) wiesen in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine nicht signifikant erhöhte Expression auf mRNA-Ebene auf. Eine signifikante Erhöhung zeigte die Expression von NF $\kappa$ B (UUO + PBS;  $n = 8$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.16 \pm 0.06$  vs. UUO + LIF;  $n = 7$ ;  $\text{mean} \pm \text{SEM } 1.31 \pm 0.05$ ;  $p = \text{ns}$ ) in der mit LIF behandelten Gruppe (Abb. 31).

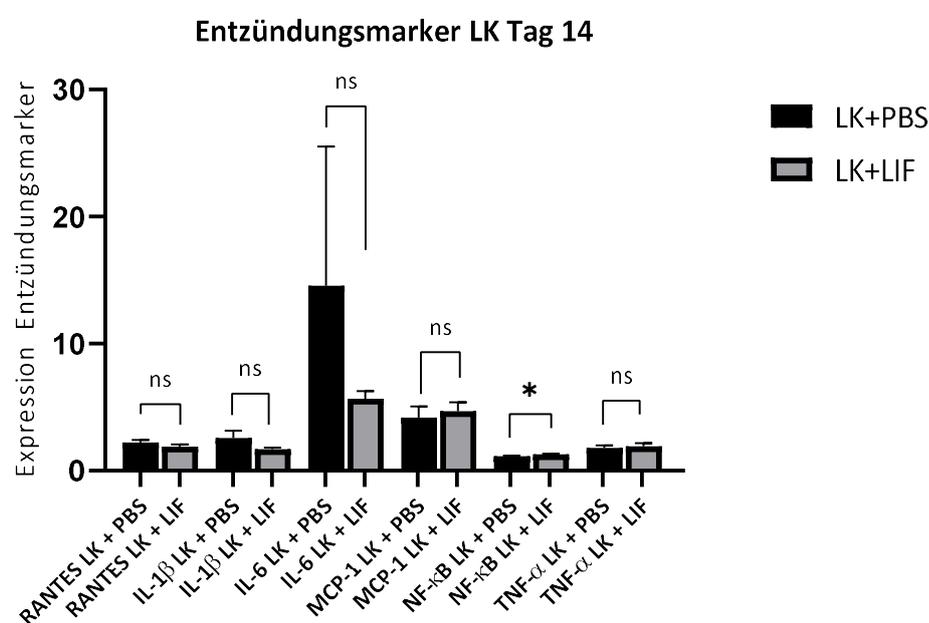


Abb. 31: *qPCR-Entzündungsmarker aus dem nierennächsten paraaortalen Lymphknoten 14 Tage ( $d = 14$ ) nach UUO. Es zeigte sich eine nicht signifikant erniedrigte mRNA-Expression der Entzündungsmarker RANTES, IL-1 $\beta$  und IL-6 in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.*

### 3.3 Immunhistochemie

Zusätzlich erfolgte die immunhistochemische Färbung auf CD3 und F4/80. Pro Färbung und Versuchsgruppe wird jeweils ein repräsentatives Bild eines HPF abgebildet.

#### 3.3.1 CD3<sup>+</sup> Färbung

Die CD3<sup>+</sup> Färbung diente der Untersuchung des Einflusses von LIF auf die Infiltration von T-Lymphozyten in das tubulointerstitielle Nierengewebe. Es zeigte sich eine geringere Zahl der CD3<sup>+</sup>T-Lymphozyten in der Behandlungsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Gruppe d = 3, das Signifikanzniveau mit einem  $\alpha$ -Fehler von  $< 0.05$  wurde nicht erreicht. In den beiden weiteren Gruppen d = 10 und d = 14 war die Zahl der CD3<sup>+</sup>T-Lymphozyten in der Behandlungsgruppe signifikant reduziert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 32-40).

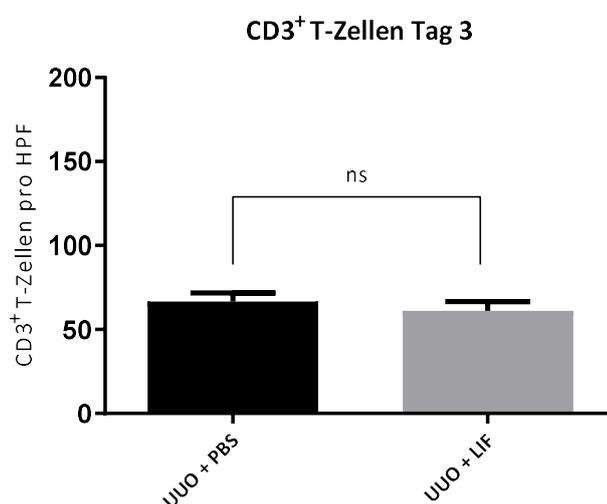


Abb. 32: **CD3<sup>+</sup> Färbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes drei Tage (d = 3) nach UUO.** Es zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch die Behandlung mit LIF. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 8):  $66.6 \pm 5.19$  vs.  $61.2 \pm 5.46$  ( $p = ns$ , mean  $\pm$  SEM).

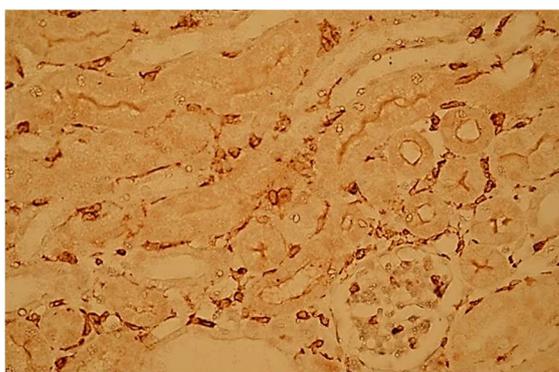


Abb. 33: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag drei (d = 3) UUO + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

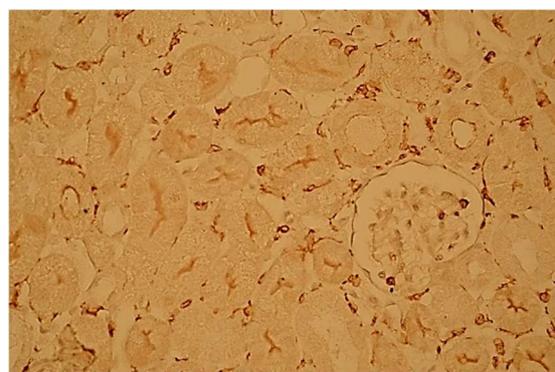


Abb. 34: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag drei (d = 3) UUO + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

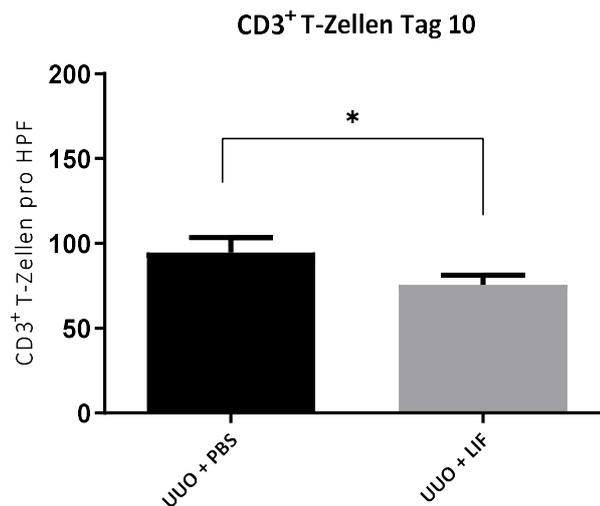


Abb. 35: **CD3<sup>+</sup> Färbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes zehn Tage (d = 10) nach UUO.** Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch die Behandlung mit LIF. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 8): 94.60 ± 8.80 vs. 75.60 ± 5.69 (\*p = <0.05, mean ± SEM).

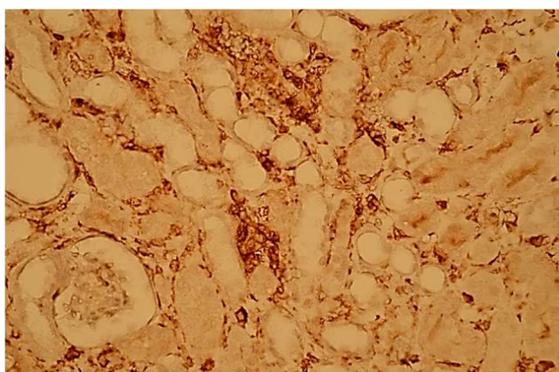


Abb. 36: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag 10 (d = 10) UUO + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

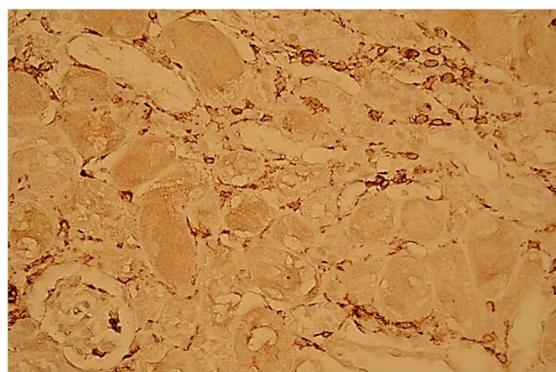


Abb. 37: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag 10 (d = 10) UUO + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

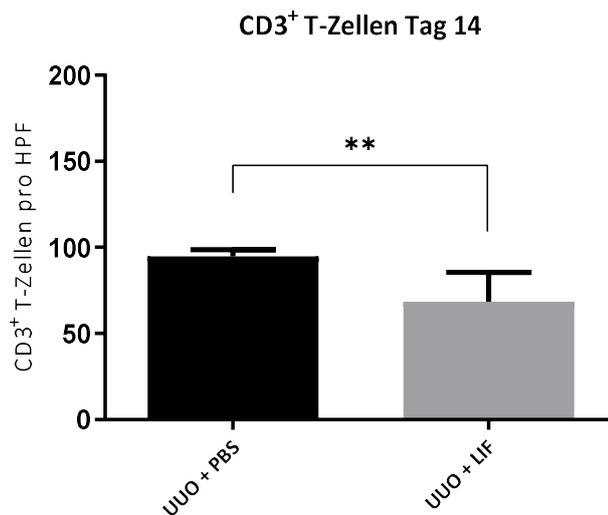


Abb. 38: **CD3<sup>+</sup> Färbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes 14 Tage (d = 14) nach UUO.** Es zeigte sich eine signifikante Reduktion von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch die Behandlung mit LIF. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 7): 94.70 ± 4.02 vs. 68.40 ± 6.43 (\*\*p = <0.01, mean ± SEM).

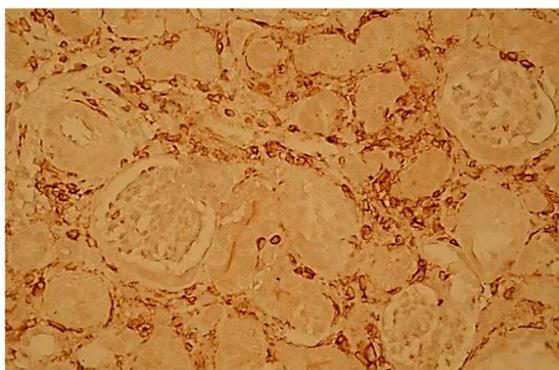


Abb. 39: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag 14 (d = 14) UUO + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

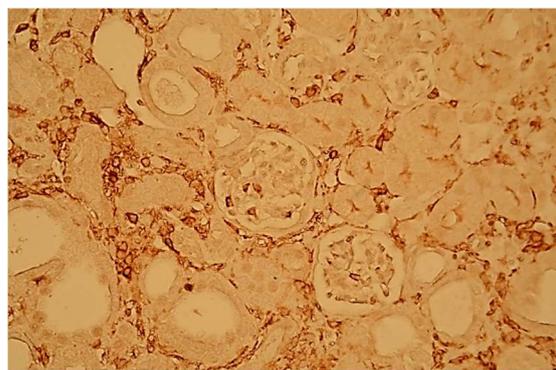


Abb. 40: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag 14 (d = 14) UUO + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

### 3.3.2 F4/80 Färbung

Die Infiltration von Makrophagen in das tubulointerstitielle Nierengewebe unter dem Einfluss von LIF wurde mit Hilfe der F4/80 Färbung untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in der mit LIF behandelten Gruppe an  $d = 3$  eine stärkere Infiltration von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in das tubulointerstitielle Nierengewebe. In den Versuchsgruppen  $d = 10$  und  $d = 14$  fand sich im untersuchten Gewebe der mit LIF behandelten Tiere eine geringere Infiltration der genannten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde zu keinem Zeitpunkt erreicht (Abb. 41-49).

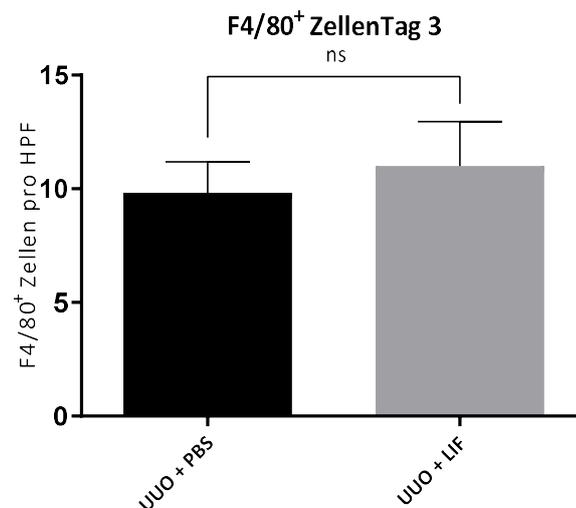


Abb. 41: **F4/80 Makrophagenfärbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes drei Tage ( $d = 3$ ) nach UUO.** Es zeigte sich eine vermehrte Infiltration von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in das tubulointerstitielle Nierengewebe in der mit LIF behandelten Gruppe. UUO + PBS ( $n = 8$ ) vs. UUO + LIF ( $n = 8$ ):  $9.83 \pm 1.36$  vs.  $11.00 \pm 1.94$  ( $p = ns$ , mean  $\pm$  SEM).

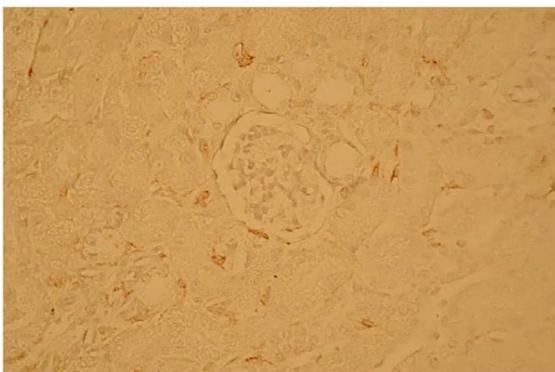


Abb. 42: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag drei ( $d = 3$ ) des Versuchszeitraumes UUO + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

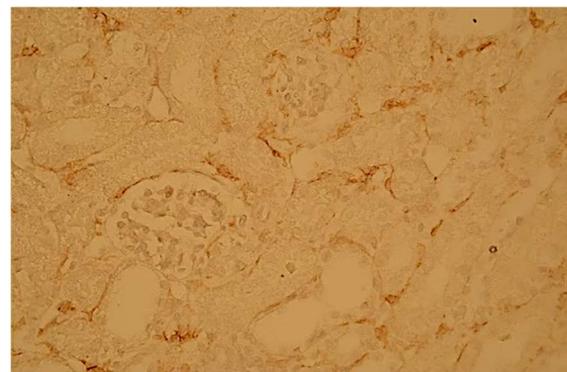


Abb. 43: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag drei ( $d = 3$ ) des Versuchszeitraumes UUO + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

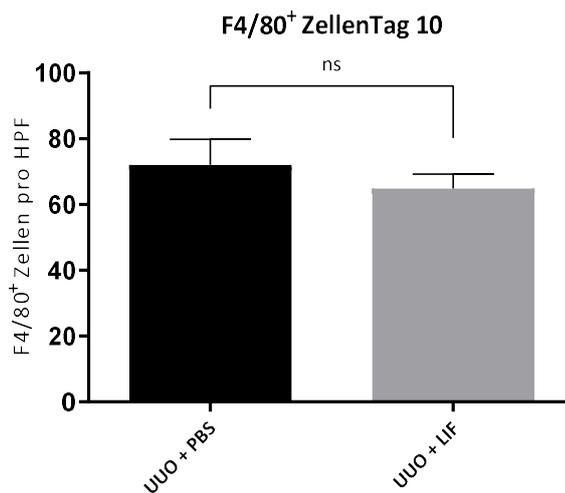


Abb. 44: **F4/80 Makrophagenfärbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes 10 Tage (d = 10) nach UUO.** Es zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der Infiltration von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in das tubulointerstitielle Nierengewebe durch die Behandlung mit LIF. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 8): 72.00 ± 7.76 vs. 64.90 ± 4.30 (p = ns, mean ± SEM).

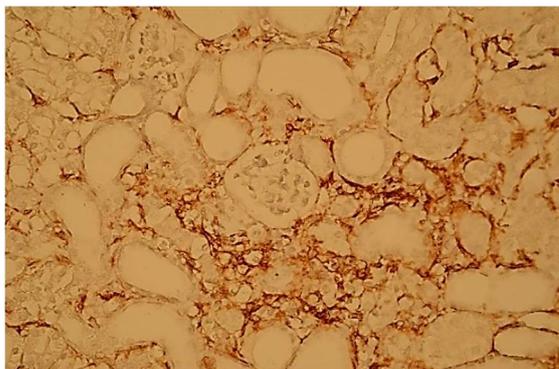


Abb. 45: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag 10 (d = 10) des Versuchszeitraumes UUO + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

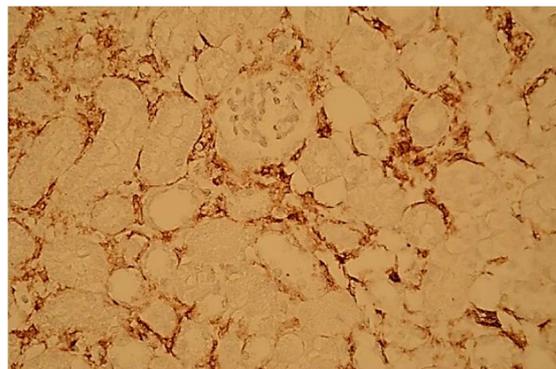


Abb. 46: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag 10 (d = 10) des Versuchszeitraumes UUO + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

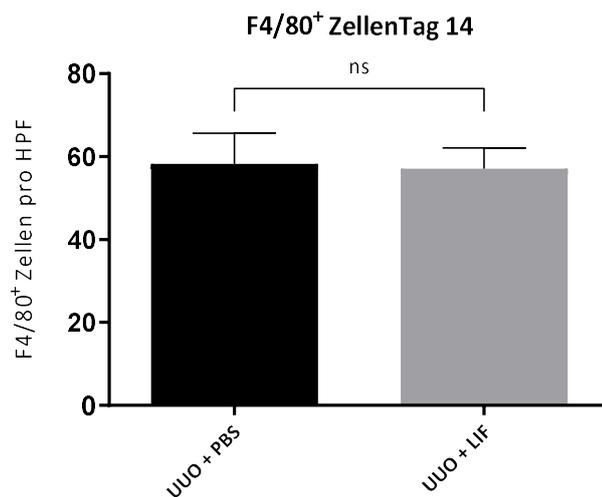


Abb. 47: **F4/80 Makrophagenfärbung des tubulointerstitiellen Nierengewebes 14 Tage (d = 14) nach UUU.** Es zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der Infiltration von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen in das tubulointerstitielle Nierengewebe durch die Behandlung mit LIF. UUU + PBS (n = 8) vs. UUU + LIF (n = 7): 58.20 ± 7.41 vs. 51.10 ± 4.97 (p = ns, mean ± SEM).

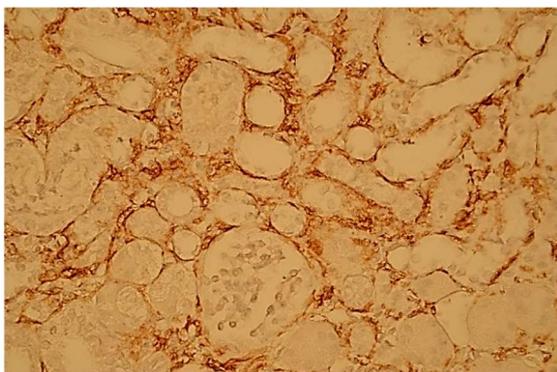


Abb. 48: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag 14 (d = 14) des Versuchszeitraumes. UUU + PBS – 400-fache Vergrößerung.**

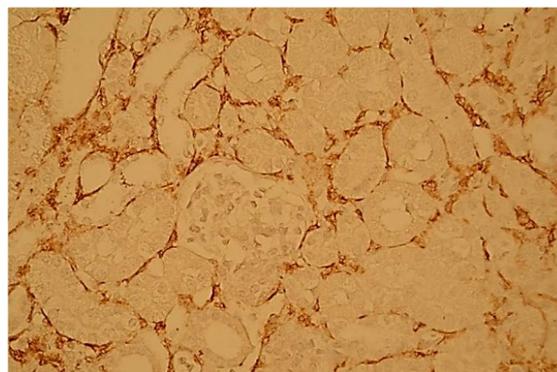


Abb. 49: **Exemplarische immunhistochemische Darstellung von F4/80<sup>+</sup> Makrophagen im tubulointerstitiellen Nierengewebe in der Lichtmikroskopie an Tag 14 (d = 14) des Versuchszeitraumes. UUU + LIF – 400-fache Vergrößerung.**

### 3.4 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Entzündungszellpopulation

Zur Quantifizierung der Entzündungszellpopulation erfolgte die durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen aus geschädigtem Nierengewebe. Die Analysen erfolgten aufgrund des Ergebnisses der CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration, der Western Blot-Analysen für Collagen1 $\alpha$ 1 und aufgrund des Umfangs der Untersuchungen ausschließlich in der 10-Tagesgruppe. Durchflusszytometrisch analysiert wurden CD 45<sup>+</sup> T-Lymphozyten, naive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (T-Helferzellen), CD8<sup>+</sup> T-Zellen, T<sub>H</sub>1 T-Helferzellen, T<sub>H</sub>2 T-Helferzellen, T<sub>H</sub>17-Zellen sowie regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>).

In den Einzelzellsuspensionen der mit LIF behandelten Gruppe fand sich eine nicht signifikant verringerte Anzahl an CD45<sup>+</sup> T-Helferzellen bei nicht signifikant gesteigerter Anzahl an T<sub>H</sub>1 T-Helferzellen sowie einer nicht signifikant gesteigerten Anzahl an T<sub>H</sub>2 T-Helferzellen. Die Anzahl an regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) sowie T<sub>H</sub>17-Zellen zeigte sich in der mit LIF behandelten Gruppe nicht signifikant reduziert. Die Analyse von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab in der Behandlungsgruppe eine signifikant gesteigerte Anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 50-56).

Durchflusszytometrie T-Lymphozyten Tag 10

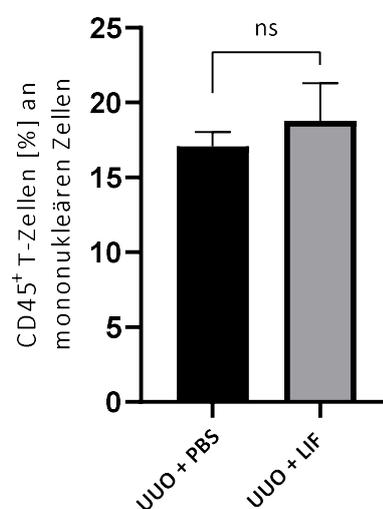


Abb. 50: **Durchflusszytometrie aus Einzelzellsuspension des tubulointerstitiellen Nierengewebes zehn Tage (d = 10) nach UVO.** Es zeigte sich eine nicht signifikant gesteigerte Anzahl der CD45<sup>+</sup> T-Zellen an mononukleären Zellen in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UVO + PBS (n = 8) vs. UVO + LIF (n = 7): 17.07 ± 0.95 vs. 18.78 ± 2.53 (p = ns, mean ± SEM).

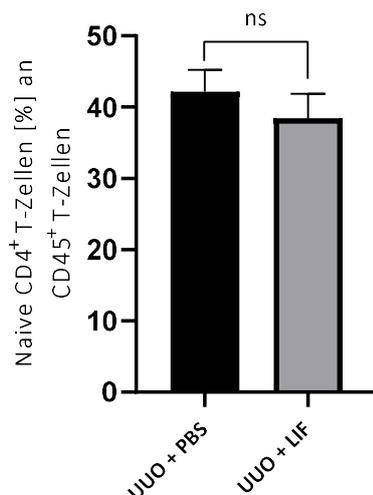
Durchflusszytometrie naive CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen Tag 10

Abb. 51: **Durchflusszytometrie aus Einzelzellsuspension des tubulointerstitiellen Nierengewebes zehn Tage (d = 10) nach UUU.** Es zeigte sich eine nicht signifikant reduzierte Anzahl der naiven CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen an CD45<sup>+</sup> T-Zellen in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UUU + PBS (n = 8) vs. UUU + LIF (n = 7): 42.19 ± 3.03 vs. 38.45 ± 3.45 (p = ns, mean ± SEM).

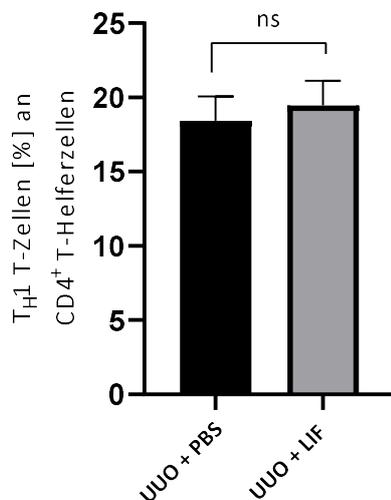
Durchflusszytometrie T<sub>H</sub>1 T-Helferzellen Tag 10

Abb. 52: **Durchflusszytometrie aus Einzelzellsuspension des tubulointerstitiellen Nierengewebes zehn Tage (d = 10) nach UUU.** Es zeigte sich eine nicht signifikant gesteigerte Anzahl der T<sub>H</sub>1 T-Helferzellen an CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UUU + PBS (n = 8) vs. UUU + LIF (n = 7): 18.43 ± 1.64 vs. 19.47 ± 1.65 (p = ns, mean ± SEM).

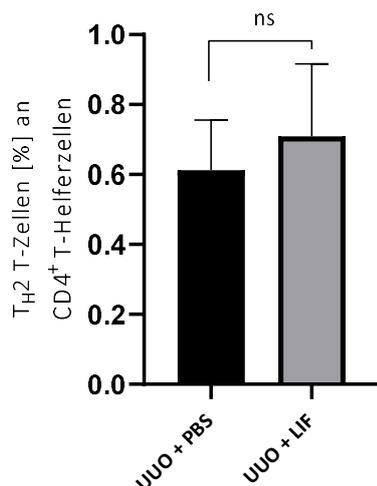
Durchflusszytometrie  $T_H2$  T-Helferzellen Tag 10

Abb. 53: **Durchflusszytometrie aus Einzelzellsuspension des tubulointerstitiellen Nierengewebes zehn Tage (d = 10) nach UVO.** Es zeigte sich eine nicht signifikant gesteigerte Anzahl der  $T_H2$  T-Helferzellen an  $CD4^+$  T-Helferzellen in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UVO + PBS (n = 8) vs. UVO + LIF (n = 7):  $0.61 \pm 0.14$  vs.  $0.71 \pm 0.21$  (p = ns, mean  $\pm$  SEM).

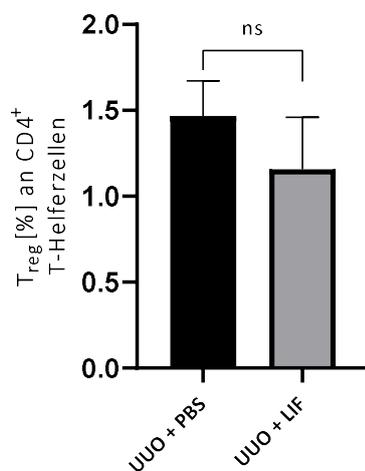
Durchflusszytometrie reg. T-Zellen ( $T_{reg}$ ) Tag 10

Abb. 54: **Durchflusszytometrie aus Einzelzellsuspension des tubulointerstitiellen Nierengewebes zehn Tage (d = 10) nach UVO.** Es zeigte sich eine nicht signifikant reduzierte Anzahl der  $T_{reg}$  an  $CD4^+$  T-Helferzellen in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UVO + PBS (n = 8) vs. UVO + LIF (n = 7):  $1.47 \pm 0.20$  vs.  $1.16 \pm 0.30$  (p = ns, mean  $\pm$  SEM).

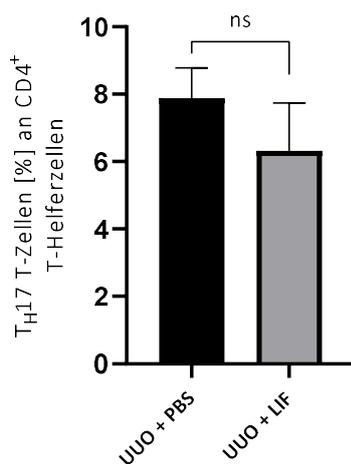
Durchflusszytometrie T<sub>H</sub>17 T-Helferzellen (Tag 10)

Abb. 55: **Durchflusszytometrie aus Einzelzellsuspension des tubulointerstitiellen Nierengewebes zehn Tage (d = 10) nach UUU.** Es zeigte sich eine nicht signifikant reduzierte Anzahl der T<sub>H</sub>17 T-Zellen an CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 7): 7.90 ± 0.91 vs. 6.31 ± 1.42 (p = ns, mean ± SEM).

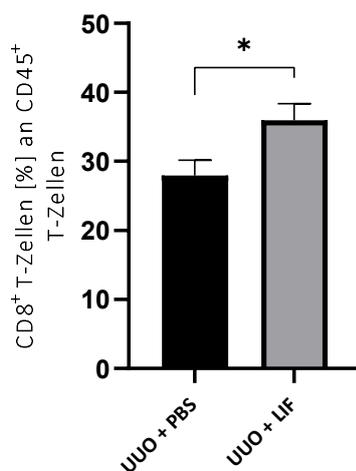
Durchflusszytometrie CD8<sup>+</sup> T-Zellen Tag 10

Abb. 56: **Durchflusszytometrie aus Einzelzellsuspension des tubulointerstitiellen Nierengewebes zehn Tage (d = 10) nach UUU.** Es zeigte sich eine signifikant gesteigerte Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen an CD45<sup>+</sup> T-Zellen in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. UUO + PBS (n = 8) vs. UUO + LIF (n = 7): 27.95 ± 2.22 vs. 35.94 ± 2.42 (p = ns, mean ± SEM).

## 4 Diskussion

Die Rolle von LIF im Rahmen inflammatorischer Prozesse der Niere wurde bisher wenig erforscht. Aufgrund der bisher gewonnenen Erkenntnisse anderer Studien, dass durch LIF die Differenzierung IL-17 A-produzierender  $T_H17$ -Zellen inhibiert wird, zelluläre Regenerationsprozesse beeinflusst werden und das zelluläre Gleichgewicht hin zu antiinflammatorischen, immunmodulierenden regulatorischen T-Zellen verschoben wird, wurde in dieser Arbeit der Effekt von LIF auf die renale Inflammation im UUO-Modell und damit einhergehend die Auswirkungen auf die Entstehung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose untersucht. Zudem lag im Rahmen dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf der Objektivierung der Beeinflussung von Zelldifferenzierungsvorgängen durch LIF mittels durchflusszytometrischer Analysen.

Zusammenfassend lassen sich für diese Arbeit folgende Kernaussagen treffen:

1. Auswirkungen von LIF auf die renale tubulointerstitielle Fibrose:
  - a. LIF führt im Rahmen von Western Blot-Analysen für Collagen1 $\alpha$ 1 bei allen Versuchsgruppen zu einer signifikanten Reduktion von Col1 $\alpha$ 1 im Vergleich zu den Kontrollgruppen.
  - b. LIF schwächt das Ausmaß von Kollagen Typ 1 und Typ 2 Fibrillen im tubulointerstitiellen Nierengewebe in den Versuchsgruppen d = 3 und d = 10 numerisch ab, das Signifikanzniveau wird nicht erreicht. An d = 14 zeigt die mit LIF behandelte Versuchsgruppe ein numerisch, nicht signifikant vergrößertes Ausmaß von Kollagen Typ 1 und Typ 2 Fibrillen im Vergleich zur Kontrollgruppe.
  - c. LIF reduziert in allen Versuchsgruppen die mRNA-Expression von Col1 $\alpha$ 1 im tubulointerstitiellen Nierengewebe. An d = 14 wird das definierte Signifikanzniveau erreicht. Für die Fibrosemarker TGF $\beta$ , PDGFR1 sowie PAI-1 zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine numerisch reduzierte mRNA-Expression durch die Behandlung mit LIF, das Signifikanzniveau wird nicht erreicht.
2. Auswirkungen von LIF auf die mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im tubulointerstitiellen Nierengewebe
  - a. LIF schwächt die mRNA-Expression von RANTES sowie Nf $\kappa$ B im tubulointerstitiellen Nierengewebe bei allen Versuchsgruppen numerisch ab. An d = 14 jedoch zeigt sich eine signifikant reduzierte mRNA-Expression von Nf $\kappa$ B in der mit LIF behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.
  - b. LIF schwächt die mRNA-Expression von MCP-1 in den Versuchsgruppen d = 3 und d = 10 numerisch ab, das Signifikanzniveau wird nicht erreicht.
  - c. LIF schwächt die mRNA-Expression von IL-6 in den Versuchsgruppen d = 10 und d = 14 numerisch ab, das Signifikanzniveau wird nicht erreicht.

- d. LIF zeigt keinen reduzierenden Effekt auf die mRNA-Expression von IL-1 $\beta$ , die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$  wird lediglich in der Versuchsgruppe d = 14 numerisch reduziert.
3. Auswirkungen von LIF auf die lokoregionäre Zelldifferenzierung und Zellmigration im tubulointerstitiellen Nierengewebe:
    - a. In den mit LIF behandelten Gruppen zeigt sich im zeitlichen Verlauf eine signifikant reduzierte Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen sowie eine nicht signifikant reduzierte Infiltration von Makrophagen in das tubulointerstitielle Nierengewebe.
    - b. LIF führt zu einer nicht signifikant reduzierten Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im tubulointerstitiellen Nierengewebe, sowie zu einer nicht signifikant reduzierten Anzahl an T<sub>H</sub>17-Zellen. Ein positiver Effekt auf eine gesteigerte Anzahl regulatorischer T-Helferzellen zeigt sich nicht. Die Annahme einer Gleichgewichtsverlagerung durch LIF hin zu regulatorischen T-Zellen kann daher nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse teilweise einen positiven Effekt von LIF auf das Ausmaß der renalen tubulointerstitiellen Fibrose im UUO-Modell. Es ergeben sich Hinweise auf eine teils signifikante Reduktion profibrotischer Zytokine sowie reduzierte Fibrose in der Analyse der Histologie und Immunhistochemie sowie in Western Blot-Analysen. Die LIF-Behandlung supprimiert vereinzelt proinflammatorische Zytokine. Dies mag die Ursache für die reduzierte Gewebeeinfiltration durch Entzündungszellen sein. Es besteht eine Tendenz zu antiinflammatorischem Potenzial von LIF. Die teilweise signifikanten Ergebnisse zeigen sich nicht kongruent zu allen Untersuchungszeitpunkten. Die Annahme einer Gleichgewichtsverschiebung hin zu regulatorischen T-Zellen, die in allen Parametern zu einer reduzierten inflammatorischen Antwort und reduzierten tubulointerstitiellen Fibrose führt, konnte in Zusammenschau aller Ergebnisse in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

## 4.1 Die Auswirkung von LIF auf die renale tubulointerstitielle Fibrose

Im Rahmen dieser experimentellen Arbeit konnte für einzelne Parameter dargestellt werden, dass die Behandlung mit LIF das Ausmaß der renalen tubulointerstitiellen Fibrose reduziert. So zeigte sich auf Proteinebene im Rahmen von Western Blot-Analysen für Col1 $\alpha$ 1 in allen Tiergruppen eine signifikante Reduktion von Col1 $\alpha$ 1 in der mit LIF behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die Therapie mit LIF das Ausmaß der renalen tubulointerstitiellen Fibrose nach UUO reduziert. Vorarbeiten von Yu et al. aus dem Jahr 2015 zeigten, dass LIF im Unilateralen Ureterobstruktionsmodell (UUO) an Mäusen die Expression von Kollagen

Typ 1 und Typ 2 unterdrückt, indem es über die Hochregulation des STAT3-Signalwegs die vermehrte Expression von microRNA-29c fördert und somit die Kollagenexpression reduziert.

Darüber hinaus erfolgte eine histopathologische Analyse und Quantifizierung des Ausmaßes von Kollagen Typ 1 und Typ 2 Fibrillen im tubulointerstitiellen Nierengewebe der obstruierten Nieren mittels Picro SIRIUS Red Färbung. Numerisch zeigte die Histologie in zwei Versuchszeitpunkten (d = 3 und d = 10) eine Verringerung des Ausmaßes der renalen tubulointerstitiellen Fibrose in der mit LIF behandelten Gruppe. Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

An Tag 14 konnte kein positiver Effekt von LIF in der Sirius Red Färbung nachgewiesen werden.

Eine Bestätigung des antifibrotischen Effektes von LIF ergaben die Analysen zur Expression verschiedener Fibrosemarker auf Genebene mittels quantitativer Real-Time PCR. Hier zeigte sich im zeitlichen Verlauf der Studie eine Reduktion der mRNA-Expression für die Fibrosemarker Col1 $\alpha$ 1, TGF $\beta$ , PDGFR1 sowie PAI-1. Die Analysen zur Expression von Col1 $\alpha$ 1 erreichten das definierte Signifikanzniveau. Diese Ergebnisse sind kongruent mit den Western Blot-Analysen und somit in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass LIF zu einer geringeren Ausprägung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose führt. Unter LIF-Therapie zeigte sich im nierennächsten *paraaortalen* Lymphknoten numerisch ausschließlich für die profibrotischen Faktoren Col1 $\alpha$ 1 und PAI-1 im zeitlichen Verlauf eine reduzierte mRNA-Expression – das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Dies mag auf die Rolle von Lymphozyten auf die Entwicklung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose in einem lokalen immunologischen Milieu über die Organgrenzen hinaus hindeuten.

Interessant in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse einer aktuellen Studie zur Rolle von LIF in Bezug auf die Entstehung renaler tubulointerstitieller Fibrose und CKD von Ende 2022. Eine Arbeitsgruppe um Xu et al. untersuchte systematisch die Expression aller Mitglieder der IL-6 Familie in Nierenbiopsieproben einer Kohorte von Patienten mit CKD und präklinischen Mausmodellen der renalen tubulointerstitiellen Fibrose. Als Mausmodelle zur Schädigung der Niere wurden das UUO-Modell sowie das Ischämie-Reperfusion-Modell verwendet. Es zeigte sich, dass von den Mitgliedern der IL-6 Familie LIF in fibrotischen Nierenläsionen am stärksten hochreguliert war [96]. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf eine der Inflammation bzw. Fibrose entgegenwirkende Reaktion von LIF als Zytokin mit embryonalen und reparativen Eigenschaften [67].

Gegenstand der Forschung war zudem das therapeutische Potenzial von LIF-neutralisierenden Antikörpern bei der Behandlung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose. Mittels Haarnadel-RNA (lenti-GFP-LIF) erzielte diese Arbeitsgruppe einen LIF-Rezeptor *knockdown*. In Assoziation mit dem ausgeschalteten LIF-Rezeptor zeigte sich womöglich kompensatorisch überexprimiertes LIF. Die durch LIF-Rezeptor *knockdown* verhinderte Wirkung von LIF führte in der Folge zu vermehrtem Col1 $\alpha$ 1 Protein in Western Blot-Analysen und somit zu einem erhöhten Ausmaß renaler tubulointerstitieller Fibrose [96]. Dies steht im Einklang mit der Hypothese der vorliegenden Arbeit.

Wird der LIF-Signalweg unterbrochen, führt dies zu vermehrter Fibrose. Hierdurch zeigt sich die antifibrotische Wirkung des LIF-Signaltransduktionsweges. Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt die Augmentation dieses Signaltransduktionsweges bei intaktem LIF-Rezeptor durch Gabe von LIF zur maximalen Rezeptorstimulation und in der Folge zu einer geringeren Kollagenexpression. Auch wenn nicht alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit signifikant die beschriebene Hypothese bestätigen, sind die Ergebnisse der Arbeit von Xu et al. kongruent zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit.

Offen bleibt die Frage, ob LIF das Ausmaß einer bereits vorbestehenden renalen tubulointerstitiellen Fibrose reduzieren kann. Hinweise diesbezüglich geben die Erkenntnisse von Zou et al. aus dem Jahr 2003, die nachweisen konnten, dass LIF nach kardialer Schädigung einerseits die Proliferation von Kardiomyozyten anregt und andererseits die Neovaskularisation im Ischämiegebiet fördert. Myokardiale Fibrose und Myokardialer Zelluntergang wurden in der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert [71, 97].

## 4.2 Die Auswirkung von LIF auf die Genexpression proinflammatorischer Zytokine

Analysen der mRNA-Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine zeigte, dass die Therapie mit LIF die Expression einzelner Zytokine abschwächt. Eine numerisch erniedrigte Genexpression zeigte sich für die proinflammatorischen Zytokine RANTES und NF $\kappa$ B im Gewebe der obstruierten Nieren, für RANTES zudem im Gewebe des nierennächsten *paraaortalen* Lymphknotens. Analysen von NF $\kappa$ B zeigten in der Versuchsgruppe d = 14 eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression in den Nierenlysaten der mit LIF behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Das chemotaktische Zytokin RANTES wirkt durch die Rekrutierung von T-Lymphozyten und Makrophagen zum Ort der Inflammation proinflammatorisch [98]. Die Arbeiten von Peng et al. lieferten Hinweise darauf, dass IL-17 A im Rahmen des UUO-Schädigungsmodells mit Hilfe von RANTES die Makrophageninfiltration in das Interstitium ermöglicht und somit die Pathogenese der renalen tubulointerstitiellen Fibrose und Inflammation fördert. In dieser Arbeit wurden sowohl die Auswirkung von RANTES-Antikörpern als auch der *knockout* von IL-17 A in C57BL/6J Mäusen analysiert. Beide Versuchsansätze führten zu einer Abschwächung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose [99].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab die Analyse der mRNA-Expression von IL-17 A keine auswertbaren Ergebnisse, da es mittels qPCR nicht detektiert werden konnte. Jedoch zeigen die Studienergebnisse von Zhang et al., dass durch LIF eine intrazelluläre, inhibitorische Signalkaskade mit Aktivierung von ERK und Hochregulation von SOCS3 initiiert wird. Dadurch wird die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung mit Entstehung von IL-17 A unterdrückt [100]. Auch wenn die vorliegende

Arbeit keinen Nachweis über eine reduzierte IL-17 A-Genexpression erbringen konnte, zeigt die verringerte Anzahl an T<sub>H</sub>17-Zellen in den durchflusszytometrischen Analysen des obstruierten Nierengewebes der mit LIF behandelten Gruppe einen Hinweis auf den antiinflammatorischen Effekt von LIF. Kongruent hierzu sind die Ergebnisse zur mRNA-Expression von RANTES und die ebenfalls in weiteren Abschnitten aufgeführte verringerte Makrophageninfiltration in den mit LIF behandelten Tieren. Die Analysen der nierennächsten *paraaortalen* Lymphknoten zeigte ebenfalls eine verringerte mRNA-Expression von RANTES infolge der Behandlung durch LIF. In der Behandlungsgruppe d = 14 wurde das Signifikanzniveau erreicht. Diese Daten unterstreichen die Annahme, dass durch die Therapie mit LIF das lokale und systemische immunologische Milieu moduliert wird und sich LIF somit positiv auf die Ausprägung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose nach UO auswirkt.

Weiterhin zeigt sich eine numerische Abschwächung der mRNA-Expression von MCP-1 in den mit LIF behandelten Gruppen. Dies könnte einen antiinflammatorischen Effekt durch LIF andeuten, jedoch wird das definierte Signifikanzniveau in keiner Versuchsgruppe erreicht. Im Rahmen der Entwicklung einer renalen tubulointerstitiellen Fibrose kommt es zu einer stetigen Zunahme der mRNA-Expression von MCP-1 im geschädigten tubulointerstitiellen Nierengewebe. In Korrelation zu einer gesteigerten mRNA-Expression von MCP-1 zeigt sich eine gesteigerte Migration von T-Lymphozyten und Makrophagen in das Nierengewebe [101]. So ist MCP-1 maßgeblich an der Rekrutierung von Effektorzellen wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten an den Ort der aktiven Immunreaktion beteiligt. MCP-1 wird unter anderem durch T<sub>H</sub>17-Zellen im Zielgewebe hochreguliert [38]. In dieser Arbeit zeigt sich eine reduzierte mRNA-Expression von MCP-1 mit reduzierter Makrophageninfiltration in das tubulointerstitielle Nierengewebe. Dies kann ein weiterer Hinweis auf eine durch LIF initiierte Reduktion von T<sub>H</sub>17-Zellen im geschädigten Nierengewebe sein. Möglicherweise ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass LIF neben antifibrotischen auch antiinflammatorische Effekte mit reduzierter Anzahl an T<sub>H</sub>17-Zellen zugunsten eines daraus resultierenden Überwiegens von T<sub>reg</sub> initiiert.

Wie oben genannt, zeigte das proinflammatorische Zytokin NfκB eine erniedrigte mRNA-Expression in den mit LIF behandelten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. In der 14-Tages-Gruppe erreichten die Ergebnisse das definierte Signifikanzniveau. Neben IL-17 A ist NfκB in der Lage, chemotaktische Zytokine wie RANTES und MCP-1 im geschädigten Gewebe hochzuregulieren und infolgedessen die Infiltration von Entzündungszellen in das Interstitium zu initiieren [102]. In unterschiedlichen Arbeiten wurde in Anlehnung an inflammatorische Systemerkrankungen (z.B. Vaskulitiden) die Rolle von NfκB in Nephritis-Modellen untersucht. Sakurai et al. zeigten in Ratten eine erhöhte Aktivierung von NfκB in Glomeruli infolge der Injektion eines Nephritis-induzierenden Serums. Damit assoziiert war eine erhöhte mRNA-Expression von beispielsweise MCP-1 und IL-1β [103]. Eine bedeutende Rolle spielt NfκB für die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu T<sub>H</sub>1- bzw. T<sub>H</sub>17-

Zellen. So ist es für die T-Zell-Rezeptor-stimulierte Expression von RORC, einem Gen welches spezifische Transkriptionsfaktoren wie ROR $\gamma$ T und ROR $\gamma$  kodiert, erforderlich. Neben der Induktion von T<sub>H</sub>17-Zellen, dient Nf $\kappa$ B so zudem als wichtiger Transkriptionsfaktor, der durch IL-17 A aktiviert wird und auf diese Weise inflammatorische Funktionen von T<sub>H</sub>17-Zellen vermittelt [104]. Kongruent zu den Ergebnissen in der Literatur konnte diese Arbeit zeigen, dass eine erniedrigte Expression von Nf $\kappa$ B auf mRNA-Ebene mit einer verringerten Anzahl an T<sub>H</sub>17-Zellen einhergeht. Dies sowie die dargestellte erniedrigte mRNA-Expression von RANTES und MCP-1 könnten mit einem möglichen antiinflammatorischen Effekt von LIF assoziiert sein.

Im Weiteren wurde die mRNA-Expression von IL-6 in Lysaten des geschädigten tubulointerstitiellen Nierengewebes mittels qPCR untersucht. Durch die Behandlung mit LIF zeigte sowohl die 10-Tagesgruppe als auch die 14-Tagesgruppe eine erniedrigte mRNA-Expression von IL-6. Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht. Die Synthese von IL-6 erfolgt durch eine Vielzahl von Zellen. So sind beispielsweise Fibroblasten, Makrophagen und T-Lymphozyten an der Synthese beteiligt [105]. Die hier gezeigte erniedrigte mRNA-Expression von IL-6 in den mit LIF behandelten Gruppen kann ein weiterer Hinweis auf die Modulation der inflammatorischen Antwort durch LIF mit daraus resultierender Verringerung der renalen tubulointerstitiellen Fibrose sein.

Für das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  ergab sich bei Analysen der Lysate aus dem mittels UUO geschädigten Nierengewebe keine reduzierte mRNA-Expression durch die Behandlung mit LIF. TNF- $\alpha$  zeigte lediglich eine numerisch reduzierte mRNA-Expression in der Behandlungsgruppe d = 14. Jeremy Duffield beschrieb 2010 in einer Arbeit über *Makrophages and Immunologic Inflammation of the Kidney* die Fähigkeit von Immunzellen wie z.B. T-Zellen, Makrophagen durch die Produktion von z.B. TNF $\alpha$  zur Ausschüttung von Effektorzytokinen wie IL-6 und IL-1 $\beta$  zu befähigen [106]. Die gesteigerte Expression von IL-6 sowie IL-1 $\beta$  führt über die Initiierung einer verstärkten lokalen Entzündungsreaktion zur Entwicklung renaler tubulointerstitieller Fibrose [107]. Die vorliegende Arbeit zeigt durch die LIF-Behandlung im zeitlichen Verlauf eine niedrigere mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Eine reduzierte mRNA-Expression von IL-6 könnte hierdurch mitbeeinflusst sein. In der vorliegenden Arbeit zeigt LIF keinen signifikanten Effekt auf IL-1 $\beta$ . Ein modulatorischer Effekt ist nicht auszuschließen.

Die Lysate aus nierennächsten *paraaortalen* Lymphknoten der UUO-geschädigten Niere lieferten im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der mRNA-Expression der Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie MCP-1 für alle Versuchsgruppen nicht signifikante Ergebnisse. Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen den mit LIF behandelten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen ergaben nur geringe Unterschiede. Wie bereits oben genannt, zeigte sich eine verringerte mRNA-Expression von RANTES in den mit LIF behandelten Versuchsgruppen. Das Signifikanzniveau wurde lediglich an d = 14 erreicht. Interessanterweise zeigte Nf $\kappa$ B über den Versuchszeitraum bis d = 10 und d = 14 nach UUO eine gesteigerte mRNA-Expression in den Lysaten der mit LIF behandelten Versuchsgruppe. In der Gruppe

d = 14 wurde das Signifikanzniveau erreicht. Die Arbeitsgruppe um Gotot et al. untersuchte in ihren Experimenten zur *Crescentic Glomerulonephritis* (cGN) die Auswirkungen eines NFκB-Inhibitors. Im Rahmen dieser Arbeiten konnten zwei divergente Effekte von NFκB dargestellt werden – zum einen antiinflammatorische Effekte und zum anderen proinflammatorische Effekte. Der *Inhibitor of NFκB Kinase subunit 2* (IKK2) wurde sowohl in niedriger als auch hoher Dosis eingesetzt. Während die prophylaktische Dosierung zu einer reduzierten Aktivierung von T-Zellen und somit einem milderen Krankheitsverlauf der cGN führte, kam es bei der Verwendung einer therapeutischen Dosis von IKK2 zu einem Verlust der T<sub>reg</sub> mit Aggravierung der cGN im Mausmodell. Einen wesentlichen Faktor für die Entwicklung der T<sub>reg</sub> im Thymus stellen neben dem Transkriptionsfaktor FOXP3 Komponenten des NFκB-Signalweges dar. Eine vermehrte statt erniedrigte mRNA-Expression von NFκB in den Lysaten der nierennächsten *paraaortalen* Lymphknoten könnte hier ein Ausdruck für die systemische Beeinflussung der inflammatorischen Antwort durch LIF sein [108, 109]. Ein Effekt von LIF auf die systemische Inflammation ist aufgrund unserer Analysen der nierennächsten *paraaortalen* Lymphknoten nicht auszuschließen.

### **4.3 Modulation der Inflammation – Die Auswirkung von LIF auf die lokoregionäre Zelldifferenzierung und Zellmigration**

Einen deutlichen Effekt von LIF stellen in dieser Arbeit die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen des tubulointerstitiellen Nierengewebes bezüglich der CD3<sup>+</sup> Zellinfiltration dar. Im UUO-Nierengewebe der mit LIF behandelten Tiere zeigt sich zu allen Versuchszeitpunkten eine reduzierte Zellinfiltration; an den Versuchstagen d = 10 sowie d = 14 wurde das Signifikanzniveau erreicht. Dieses Ergebnis weist auf einen antiinflammatorischen Effekt von LIF im UUO-Modell hin. Die signifikant reduzierte Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen in das tubulointerstitielle Nierengewebe könnte durch einen LIF-begünstigten Phänotypenwechsel von T<sub>H</sub>-Effektorzellen hin zu regulatorischen T-Zellen begünstigt sein. Aus einer geringeren Zellinfiltration resultiert eine verringerte inflammatorische Antwort und somit ein geringeres Ausmaß der renalen tubulointerstitiellen Fibrose. Komplementär zu der signifikant erniedrigten CD3<sup>+</sup>-Zellinfiltration zeigt sich die geringere mRNA-Expression von RANTES in der qPCR: In allen mit LIF behandelten Gruppen kam es zu einer numerisch reduzierten mRNA-Expression von RANTES im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Einen Zusammenhang von CD3<sup>+</sup> T-Zellen und RANTES beschrieben Dairaghi et al. im Jahr 1998. Anhand von Jurkat-T-Zellen, einer immortalisierten Zelllinie aus menschlichen T-Lymphozyten, untersuchte diese Arbeitsgruppe die Auswirkung von RANTES auf T-Lymphozyten. Sie zeigten, dass das Chemokin RANTES in T-Zellen ein einzigartiges, zweiphasiges cytoplasmatisches Ca<sup>2+</sup>-Signal auslösen kann. Die erste Phase ist G-Protein-vermittelt und initiiert die Chemotaxis der T-Zellen. Die zweite Phase dieses Signals ist verbunden mit Tyrosinkinase und hat ein Spektrum von Reaktionen zur Folge, die denen

bei antigener Stimulation von T-Zellen ähneln [98]. Die reduzierte mRNA-Expression von RANTES könnte ein Grund für eine reduzierte Aktivierung von CD3<sup>+</sup> T-Zellen und – aufgrund der fehlenden Aktivierung von Chemotaxis – geringere Infiltration von CD3<sup>+</sup> Zellen in das UO-Nierengewebe in dieser Arbeit sein.

Ein deutlicher Nachteil der immunhistochemischen Färbemethode von CD3<sup>+</sup> T-Zellen besteht darin, dass alle CD3<sup>+</sup> T-Zellen gleichermaßen gefärbt werden und sie somit keine Unterscheidung der T-Zell Subpopulationen zulässt. Daher blieb in dieser Methodik zunächst die Frage offen, welche Subpopulation den entscheidenden Teil an der Zellmigration im UO-Modell hatte. Aufschluss sollte hierüber eine durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen aus obstruiertem Nierengewebe geben. Analog zu den Analysen der CD3<sup>+</sup> T-Zellen zeigte die mit LIF behandelte Gruppe im Rahmen der durchflusszytometrischen Analysen eine geringere Einwanderung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (CD3<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren aus in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen [32]). Der Nachweis einer signifikant verringerten Migration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen in das geschädigte Nierengewebe zeigt einen möglichen antiinflammatorischen Effekt von LIF, wenn dieser auch im Rahmen der vorliegenden Analysen und in Zusammenschau aller Ergebnisse inklusive der im Folgenden aufgeführten durchflusszytometrischen Ergebnisse nicht durchgehend und umfänglich bestätigt werden konnte.

Eine überschießende Aktivierung des Immunsystems kann über die Rekrutierung von immunologischen Effektorzellen wie beispielsweise Makrophagen zu einer Schädigung des Gewebes führen und in einer chronischen Organschädigung münden. Eine Arbeitsgruppe um Hamelin-Morissette untersuchte im Jahr 2020 die Auswirkungen von LIF auf die Aktivierung inflammatorischer Signale in Makrophagen und Trophoblastenzellen. Zielsetzung der Studie war die Untersuchung, inwiefern und auf welche Weise LIF das Verhalten von Makrophagen und Trophoblastenzellen auf proinflammatorische Stressfaktoren reguliert. Gegenstand der Forschung war die Untersuchung der menschlichen Dezidua, da hier die Makrophagen eine der vorherrschenden Untergruppen von Leukozyten unter den Immunzellen mit ca. 20-30 % darstellen. Es konnte zum ersten Mal die hemmende Wirkung von LIF über IFN $\gamma$ - und GM-CSF-induzierte STAT-Signalwege in Makrophagen und Trophoblastenzellen dargestellt werden. Bei Versuchen, in denen Makrophagen IFN $\gamma$  oder GM-CSF ausgesetzt waren, zeigte sich eine STAT3-abhängige Hemmung der Makrophagen über die IFN $\gamma$ -STAT1- und GM-CSF-STAT5-Signalwege durch LIF. Zudem konnte dargestellt werden, dass Makrophagen den LIF-Rezeptor exprimieren, wodurch LIF binden und die Makrophagen deaktivieren kann [110]. Wie bereits erwähnt, rekrutieren sowohl RANTES als auch MCP-1 neben T-Lymphozyten ebenso Makrophagen zum Ort der Inflammation. Bestätigend zeigten die Analysen des tubulointerstitiellen Nierengewebes einen modulierenden Effekt durch LIF auf die Makrophageninfiltration. So konnte in der mit LIF behandelten Gruppe eine numerisch geringere mRNA-Expression von RANTES sowie MCP-1 dargestellt werden. In der histologischen Untersuchung

zeigte sich eine reduzierte Einwanderung von F4/80<sup>+</sup>-Makrophagen in das tubulointerstitielle Nierengewebe von LIF-behandelten UUO-Tieren. Das definierte Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

Eine Schlüsselrolle in der Terminierung inflammatorischer Prozesse übernehmen regulatorische T-Zellen, wobei das Gleichgewicht zwischen T<sub>H</sub>17-Zellen und T<sub>reg</sub> durch Zytokine gesteuert wird. Bisher war bekannt, dass IL-6 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T<sub>H</sub>17-Zellen fördert und somit einen Aggressor hinsichtlich der Immunreaktion darstellt. Es wirkt proinflammatorisch und hält den Prozess der Immunreaktion aufrecht. Gao et al. konnten im Jahr 2009 anhand eines *in vivo/ex vivo* Mausmodells zur Transplantattoleranz zeigen, dass der Funktion von IL-6 die Wirkung von LIF, einem Zytokin aus derselben Zytokinfamilie, gegenübersteht. Dargestellt werden konnte, dass LIF über die Steigerung von FOXP3 die Differenzierung regulatorischer T-Zellen fördert und somit destruierte Entzündungsreaktionen im Rahmen inflammatorischer Prozesse abmildert [85]. Zur Überprüfung unserer Hypothese, dass LIF in der Lage ist, eine Gleichgewichtsverschiebung hin zu regulatorischen T-Zellen bei gleichzeitiger Reduzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen zu initiieren, führten wir eine durchflusszytometrische Analyse von Einzelzellsuspensionen des UUO-Nierengewebes durch. Ziel dessen war die Differenzierung der unterschiedlichen immunologischen Zellpopulationen im tubulointerstitiellen Nierengewebe. Die Analysen ergaben in dieser Arbeit eine geringere Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in das geschädigte Gewebe in der mit LIF behandelten Gruppe. Jedoch konnten die vorliegenden Ergebnisse die Annahme, dass LIF das Gleichgewicht hin zu regulatorischen T-Zellen verschiebt, nicht bestätigen. Zwar zeigte sich in der LIF-Behandlungsgruppe eine numerisch verringerte Anzahl an T<sub>H</sub>17-Zellen, jedoch bei numerisch ebenso verringerter Anzahl regulatorischer T-Zellen. Durchflusszytometrisch ergab sich sowohl in der Behandlungsgruppe als auch in der Kontrollgruppe eine hohe Anzahl an T-Helferzellen. Die Zahl der T<sub>H</sub>17-Zellen sowie der regulatorischen T-Zellen ergab jedoch sehr geringe Werte, sodass eine Ungenauigkeit der Ergebnisse an dieser Stelle nicht auszuschließen ist.

Diese Arbeit zeigt eine veränderte mRNA-Expression von RANTES und NfκB des obstruierten tubulointerstitiellen Nierengewebes sowie eine signifikant verringerte Infiltration von CD3<sup>+</sup> T-Zellen. In Zusammenschau können die vorliegenden Ergebnisse die Hypothese einer Modulation der Immunantwort durch LIF im UUO-Schädigungsmodell jedoch nicht durchgehend und umfänglich bestätigen. Ursächlich hierfür kann sein, dass durch Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe sowie Hinweise aus der aktuellen Literatur der Power von LIF bezüglich eines Phänotypenwechsels und somit der Veränderung des Gleichgewichts hin zu regulatorischen T-Zellen und damit einhergehend eines antiinflammatorischen Effektes eine zu hohe Effektstärke zugeschrieben wurde. Möglicherweise ist der immunmodulierende Effekt von LIF damit nur unzureichend erfasst. Zudem bleibt unklar, ob

LIF ggf. andere, mit den genannten Analysen nicht erfasste Effekte auf den Krankheitsverlauf des UUO-Modells hat.

Zusammenfassend ist ein teilweise signifikanter Effekt der LIF-Therapie auf die renale tubulointerstitielle Fibrose in UUO-Tieren nachzuweisen. Zwar zeigen die einzelnen Ergebnisse wiederholt eine Tendenz zur antiinflammatorischen, immunmodulierenden Wirkung von LIF. Eine Modulation der inflammatorischen Antwort mit Gleichgewichtsverlagerung hin zu  $T_{reg}$  im Sinne einer Bestätigung der formulierten Hypothese konnte jedoch nicht gezeigt werden. In Zusammenschau aller Ergebnisse zeigt sich keine kongruente Bestätigung der Hypothese. Welche Mechanismen zur Verringerung des Ausmaßes der renalen tubulointerstitiellen Fibrose in den mit LIF behandelten Versuchsgruppen geführt haben, lässt sich im Rahmen unserer Studie somit nicht abschließend klären. An dieser Stelle bleiben in Bezug auf die genaue immunmodulatorische Wirkung von LIF Fragen offen. Die aktuelle Literatur, Übersichtsarbeiten der letzten Jahre sowie Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe liefern jedoch konkrete Hinweise auf die mögliche immunmodulatorische Kompetenz von LIF.

## 4.4 Ausblick

Die renale tubulointerstitielle Fibrose stellt das Endstadium vieler unterschiedlicher Nierenerkrankungen dar. Die CKD stellt selbst die moderne Medizin vor weitreichende Probleme – sowohl im ambulanten als auch im klinischen Bereich. Sie ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität verknüpft und stellt darüber hinaus ein weltweites gesundheitsökonomisches Problem dar [111]. Der Bedarf an präventiven Maßnahmen und neuen Therapiemöglichkeiten ist groß und daher Gegenstand intensiver Forschung. Zur Rolle von LIF in der Niere wurden bisher erst wenige Studien veröffentlicht. Jedoch gibt die bisher verfügbare Literatur neben dem antifibrotischen und immunmodulatorischen Potenzial weitere Hinweise auf eine mögliche bedeutende Rolle und ein therapeutisches Potenzial von LIF. So ist es neben dem Erhalt der Pluripotenz von murinen embryonalen Stammzellen [67] für die adulten Stammzellen der Niere bedeutsam, indem es ihre Differenzierung via Cadherin 16 induziert [112]. Neueste Arbeiten von Xu et al. aus dem Jahr 2022 konnten anhand von Bioproben einer prospektiven Kohorte von CKD-Patienten die potenzielle Rolle von LIF im Urin als möglichen Biomarker für das Fortschreiten von CKD aufzeigen [96].

Erwähnenswert an dieser Stelle ist zudem die mögliche erhebliche Bedeutung von LIF außerhalb der Niere. Gegenstand der aktuellen Forschung ist beispielsweise die Rolle von LIF in der Tumorgenese. Bian und Kollegen konnten im Jahr 2020 zeigen, dass es in Gewebeproben aus Magenkarzinomen zu einer Überexpression von LIF sowie des LIF-Rezeptors kam und LIF zellbiologische Vorgänge wie Wachstum, Differenzierung und Apoptosehemmung in den untersuchten Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* induzierte. Zudem übte LIF Effekte auf die Invasion und Migration von Tumorzellen aus [116].

Zusammenfassend erfüllt LIF zahlreiche, teilweise unvollständig verstandene Aufgaben als immunmodulierendes Zytokin in der Niere. Aufgrund der dargestellten Effekte ist eine therapeutische Anwendung von LIF oder die pharmakologische Aktivierung des LIF-Rezeptors bei verschiedenen Erkrankungen denkbar, bedarf jedoch weiterer, intensiver Forschung.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Herold, G., *Chronische Niereninsuffizienz und Urämie, Innere Medizin*. 2017: Georg Herold Verlag: Köln. p. 637-638.
2. Levey, A.S., et al., *Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)*. *Kidney Int*, 2005. **67**(6): p. 2089-100.
3. Hoyer, J., *Chronische Nierenerkrankungen*. 2015, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 381-385.
4. Levey, A.S., et al., *The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report*. *Kidney Int*, 2011. **80**(1): p. 17-28.
5. BCGuidelines.ca Chronic Kidney Disease- Identification, E.a. and Management of Adult Patients: Effective Date: October 29, 2014.
6. Levin, A. and P.E. Stevens, *Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward*. *Kidney Int*, 2014. **85**(1): p. 49-61.
7. Herold, G., *Tubulointerstitielle Nierenerkrankungen, Innere Medizin*. 2017: Georg Herold Verlag: Köln. p. 622-623.
8. Machleidt, C.a.K., U. , *Interstitielle Nephropathien*. 2015, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. p. 510.
9. KDIGO, *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Anemia Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Anemia in Chronic Kidney Disease*. *Kidney inter., Suppl.* 2012; **2**: 279–335.
10. Zhang, Q.L., et al., *Epidemiology of chronic kidney disease: results from a population of older adults in Germany*. *Prev Med*, 2009. **48**(2): p. 122-7.
11. Boor, P. and J. Floege, *The renal (myo-)fibroblast: a heterogeneous group of cells*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(8): p. 3027-36.
12. Prunotto, M., et al., *Renal fibrosis and proteomics: current knowledge and still key open questions for proteomic investigation*. *J Proteomics*, 2011. **74**(10): p. 1855-70.
13. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. *Nat Med*, 2012. **18**(7): p. 1028-40.
14. Bröcker, V., Kreipe, H., Haller, H. , *Tubulointerstitielle Fibrose*, in *Der Nephrologe*. 2010, Springer Verlag. p. 284-292.
15. Zhang, M. and S. Zhang, *T Cells in Fibrosis and Fibrotic Diseases*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1142.
16. Lawson, J., et al., *Renal fibrosis in feline chronic kidney disease: known mediators and mechanisms of injury*. *Vet J*, 2015. **203**(1): p. 18-26.
17. 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.
18. Schreml, S., et al., *Oxygen in acute and chronic wound healing*. *Br J Dermatol*, 2010. **163**(2): p. 257-68.
19. Strutz, F.M., *EMT and proteinuria as progression factors*. *Kidney Int*, 2009. **75**(5): p. 475-81.
20. Ruggenenti, P., et al., *Retarding progression of chronic renal disease: the neglected issue of residual proteinuria*. *Kidney Int*, 2003. **63**(6): p. 2254-61.
21. Norman, J.T., I.M. Clark, and P.L. Garcia, *Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts*. *Kidney Int*, 2000. **58**(6): p. 2351-66.
22. 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. 1145-1152.
23. Liu, Y., *Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2011. **7**(12): p. 684-96.
24. Yang, J. and Y. Liu, *Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis*. *Am J Pathol*, 2001. **159**(4): p. 1465-75.
25. Liu, Y., *Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics*. *Kidney Int*, 2006. **69**(2): p. 213-7.

26. Fukuda, K., et al., *Quantification of TGF-beta1 mRNA along rat nephron in obstructive nephropathy*. Am J Physiol Renal Physiol, 2001. **281**(3): p. F513-21.
27. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 199-210.
28. Tapmeier, T.T., et al., *Pivotal role of CD4+ T cells in renal fibrosis following ureteric obstruction*. Kidney Int, 2010. **78**(4): p. 351-62.
29. Neefjes, J., et al., *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(12): p. 823-36.
30. O'Hagan, D.T. and N.M. Valiante, *Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(9): p. 727-35.
31. Coffman, R.L., *Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 539-41.
32. Swain, S.L., K.K. McKinstry, and T.M. Strutt, *Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 136-48.
33. Szabo, S.J., et al., *Pillars article: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment*. Cell. 2000. **100**: 655-669. J Immunol, 2015. **194**(7): p. 2961-75.
34. O'Garra, A., L. Gabrysova, and H. Spits, *Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells*. Nat Immunol, 2011. **12**(4): p. 288-94.
35. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 549-57.
36. Zhu, J., et al., *GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors*. Cell Res, 2006. **16**(1): p. 3-10.
37. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*)*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 445-89.
38. Kurte, M., et al., *IL17/IL17RA as a Novel Signaling Axis Driving Mesenchymal Stem Cell Therapeutic Function in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 802.
39. Wang, Q., et al., *Regulation and function of IL-22 in peritoneal adhesion formation after abdominal surgery*. Wound Repair Regen, 2020. **28**(1): p. 105-117.
40. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults*. Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
41. Aggarwal, S., et al., *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17*. J Biol Chem, 2003. **278**(3): p. 1910-4.
42. Zhu, S. and Y. Qian, *IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: mechanisms and therapeutic potential*. Clin Sci (Lond), 2012. **122**(11): p. 487-511.
43. Capone, A. and E. Volpe, *Transcriptional Regulators of T Helper 17 Cell Differentiation in Health and Autoimmune Diseases*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 348.
44. Krebs, C.F., et al., *T helper type 17 cells in immune-mediated glomerular disease*. Nat Rev Nephrol, 2017. **13**(10): p. 647-659.
45. Dellepiane, S., J.S. Leventhal, and P. Cravedi, *T Cells and Acute Kidney Injury: A Two-Way Relationship*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1546.
46. Wang, F., et al., *IL-17C has a pathogenic role in kidney ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2020. **97**(6): p. 1219-1229.
47. Chung, B.H., et al., *Increase of Th17 Cell Phenotype in Kidney Transplant Recipients with Chronic Allograft Dysfunction*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0145258.
48. Alassaf, A. and R. Odeh, *IPEX syndrome: an easily-missed diagnosis of a life threatening condition*. Turk J Pediatr, 2019. **61**(3): p. 424-427.
49. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. Immunol Rev, 2006. **212**: p. 8-27.
50. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Pillars Article: Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells*. Nat. Immunol. 2003. **4**: 330-336. J Immunol, 2017. **198**(3): p. 986-992.

51. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
52. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
53. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
54. Rose-John, S., *Interleukin-6 Family Cytokines*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(2).
55. Robinson, R.C., et al., *The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding*. Cell, 1994. **77**(7): p. 1101-16.
56. Metcalf, D., *The leukemia inhibitory factor (LIF)*. Int J Cell Cloning, 1991. **9**(2): p. 95-108.
57. 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.
58. Hilton, D.J., *LIF: lots of interesting functions*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(2): p. 72-6.
59. Nicola, N.A. and J.J. Babon, *Leukemia inhibitory factor (LIF)*. Cytokine Growth Factor Rev, 2015. **26**(5): p. 533-44.
60. 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.
61. Hilton, D.J., et al., *Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 114-9.
62. Graf, U., E.A. Casanova, and P. Cinelli, *The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) - Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells*. Genes (Basel), 2011. **2**(1): p. 280-97.
63. Scott, R.L., et al., *Expression of leukemia inhibitory factor receptor mRNA in sensory dorsal root ganglion and spinal motor neurons of the neonatal rat*. Neurosci Lett, 2000. **295**(1-2): p. 49-53.
64. Hilton, D.J., N.A. Nicola, and D. Metcalf, *Distribution and comparison of receptors for leukemia inhibitory factor on murine hemopoietic and hepatic cells*. J Cell Physiol, 1991. **146**(2): p. 207-15.
65. 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.
66. Terawaki, K., et al., *The Ameliorating Effects of Tokishakuyakusan in a Rat Model of Implantation Failure Involves Endometrial Gland Leukemia Inhibitory Factor and Decidualization*. J Ethnopharmacol, 2020: p. 113288.
67. Williams, R.L., et al., *Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 684-7.
68. Stewart, C.L., et al., *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
69. Sims, N.A. and R.W. Johnson, *Leukemia inhibitory factor: a paracrine mediator of bone metabolism*. Growth Factors, 2012. **30**(2): p. 76-87.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.

74. Hendry, I.A., et al., *Binding and retrograde transport of leukemia inhibitory factor by the sensory nervous system*. J Neurosci, 1992. **12**(9): p. 3427-34.
75. 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.
76. Chollangi, S., et al., *Preconditioning-induced protection from oxidative injury is mediated by leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and its ligands in the retina*. Neurobiol Dis, 2009. **34**(3): p. 535-44.
77. 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.
78. Awasthi, A. and V.K. Kuchroo, *Value added: neural progenitor cells suppress inflammation and autoimmunity*. Immunity, 2011. **35**(2): p. 156-7.
79. Kuchroo, V.K., et al., *T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 101-23.
80. Korn, T., et al., *IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18460-5.
81. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
82. Kebir, H., et al., *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1173-5.
83. Makar, T.K., et al., *Brain derived neurotrophic factor treatment reduces inflammation and apoptosis in experimental allergic encephalomyelitis*. J Neurol Sci, 2008. **270**(1-2): p. 70-6.
84. Chinese Academy of Sciences. *Leukemia Inhibitory Factor: A Critical Player in Neural Progenitor Cell Therapy for Autoimmune Disease*. 2011, August 31; Available from: [https://english.cas.cn/newsroom/archive/research\\_archive/rp2011/201502/t20150217\\_142315.shtml](https://english.cas.cn/newsroom/archive/research_archive/rp2011/201502/t20150217_142315.shtml).
85. Gao, W., et al., *Treg versus Th17 lymphocyte lineages are cross-regulated by LIF versus IL-6*. Cell Cycle, 2009. **8**(9): p. 1444-50.
86. 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.
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. Kosfeld, A., et al., *Mutations in the leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) gene and Lifr deficiency cause urinary tract malformations*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(9): p. 1716-1731.
89. Yamada, K., et al., *Leukemia Inhibitory Factor Signaling Enhances Production of Galactose-Deficient IgA1 in IgA Nephropathy*. Kidney Dis (Basel), 2020. **6**(3): p. 168-180.
90. Srugies, F., *Untersuchung der Rolle von Leukemia Inhibitory Factor in der Therapie der renalen Inflammation und Fibrose im unilateralen Ureterobstruktionsmodell*. 2018.
91. Xu, J., et al., *Protective effects of leukemia inhibitory factor against oxidative stress during high glucose-induced apoptosis in podocytes*. Cell Stress Chaperones, 2012. **17**(4): p. 485-93.
92. Eddy, A.A., et al., *Investigating mechanisms of chronic kidney disease in mouse models*. Pediatr Nephrol, 2012. **27**(8): p. 1233-47.
93. Vaughan, E.D., Jr., et al., *Pathophysiology of unilateral ureteral obstruction: studies from Charlottesville to New York*. J Urol, 2004. **172**(6 Pt 2): p. 2563-9.
94. Schreiner, G.F., et al., *Immunological aspects of acute ureteral obstruction: immune cell infiltrate in the kidney*. Kidney Int, 1988. **34**(4): p. 487-93.
95. Rao, X., et al., *An improvement of the 2<sup>-delta delta</sup> CT method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*. Biostat Bioinforma Biomath, 2013. **3**(3): p. 71-85.
96. Xu, S., et al., *Leukemia inhibitory factor is a therapeutic target for renal interstitial fibrosis*. EBioMedicine, 2022. **86**: p. 104312.

97. 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.
98. Dairaghi, D.J., et al., *RANTES-induced T cell activation correlates with CD3 expression*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 426-33.
99. 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.
100. Zhang, Y.S., et al., *STAT4 activation by leukemia inhibitory factor confers a therapeutic effect on intestinal inflammation*. EMBO J, 2019. **38**(6).
101. 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. 1173-1187.
102. Zheng, G., et al., *The role of tubulointerstitial inflammation*. Kidney Int Suppl, 2005(94): p. S96-100.
103. Sakurai, H., et al., *Activation of transcription factor NF-kappa B in experimental glomerulonephritis in rats*. Biochim Biophys Acta, 1996. **1316**(2): p. 132-8.
104. Zhang, H. and S.C. Sun, *NF-kappaB in inflammation and renal diseases*. Cell Biosci, 2015. **5**: p. 63.
105. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochem J, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
106. Duffield, J.S., *Macrophages and immunologic inflammation of the kidney*. Semin Nephrol, 2010. **30**(3): p. 234-54.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. Hamelin-Morrisette, J., et al., *Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblast cells*. Mol Immunol, 2020. **120**: p. 32-42.
111. Abbas, N.A.T., A. El Salem, and M.M. Awad, *Empagliflozin, SGLT2 inhibitor, attenuates renal fibrosis in rats exposed to unilateral ureteric obstruction: potential role of klotho expression*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018. **391**(12): p. 1347-1360.
112. Hishikawa, K., et al., *Leukemia inhibitory factor induces multi-lineage differentiation of adult stem-like cells in kidney via kidney-specific cadherin 16*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **328**(1): p. 288-91.
113. Blanco, G., et al., *HILDA/LIF, G-CSF, IL-1 beta, IL-6, and TNF alpha production during acute rejection of human kidney allografts*. Transplantation, 1993. **56**(3): p. 597-602.
114. Kang, S.M., Q. Tang, and J.A. Bluestone, *CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: progress, challenges and prospects*. Am J Transplant, 2007. **7**(6): p. 1457-63.
115. Mortazavi, H., et al., *Cytokine profile, Treg/Th17 cell frequency changes during different posttransplantational time points in patients undergoing renal transplantation*. J Cell Physiol, 2019. **234**(11): p. 20935-20943.
116. Bian, S.B., et al., *Leukemia inhibitory factor promotes gastric cancer cell proliferation, migration, and invasion via the LIFR-Hippo-YAP pathway*. Ann N Y Acad Sci, 2020.

## Danksagung

An erster Stelle gilt mein persönlicher Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Ivo Quack für die Überlassung dieser Dissertation und seine Unterstützung.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Herrn PD Dr. med. Sebastian A. Potthoff für seine kontinuierliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase dieser Dissertation. Seine Offenheit für all meine Fragen sowie seine konstruktive Kritik haben einen wesentlichen Beitrag für die Fertigstellung dieser Arbeit geleistet.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Germing für die Übernahme der Co-Betreuung.

Des Weiteren danke ich dem gesamten Team der Experimentellen Nephrologie der HHU für die kontinuierliche Unterstützung. Besonderer Dank gilt neben Frau Nicola Kur und Christina Schwandt Frau Blanka Duvnjak. Danke für die Geduld und Hilfe in allen Fragen der Labortechnik, der Versuche und der histologischen Färbungen. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Zudem danke ich Frau Katharina Raba für ihre Unterstützung bei den durchflusszytometrischen Analysen.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Alex, ohne den ich das Studium sowie diese Arbeit niemals begonnen und beendet hätte. Danke, dass du immer zu mir stehst, mir stets eine Stütze bist und immer an mich glaubst. Danke für deine unermüdliche Unterstützung und deine liebevolle Geduld.

Ich danke von ganzem Herzen meinen beiden Söhnen Benjamin und Florentin, die mir die schönsten Augenblicke meines Lebens bescheren und aus denen ich so viel Kraft schöpfen kann. Ihr seid das Beste, was uns je passieren konnte. In Liebe – für immer!

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden für die vielen aufmunternden Worte und liebevollen Umarmungen. Danke für euren Rückhalt, eure Unterstützung und dass ihr an mich geglaubt habt, wenn ich es selbst mal nicht getan habe.

Danken möchte ich der verstorbenen Doro Püchel. Ihre Empathie für Ihre Patienten hat mich stets tief beeindruckt und einen großen Beitrag zu meiner Berufswahl geleistet. Ein kleines bisschen in ihre Fußstapfen treten zu können, erfüllt mich mit Stolz.