

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Abteilung für Nephrologie der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar
(Leiter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Uwe Heemann)

Bedeutung des Interleukin-1 Rezeptors für den renalen Ischämie-Reperfusionsschaden

Nora Sayed

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. U. Heemann
2. Priv.-Doz. Dr. M. Baumann

Die Dissertation wurde am 24.02.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.12.2013 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Überblick	1
1.2	Renaler Ischämie-Reperfusionsschaden	3
1.2.1	Ischämie	3
1.2.2	Reperfusionsschaden	4
1.2.3	Mikrozirkulationsschaden	5
1.3	Akute Tubulusnekrose und Apoptose.....	6
1.3.1	Akute Tubulusnekrose: Hämodynamische und morphologische Veränderungen	6
1.3.2	Apoptose	9
1.4	Entzündung	16
1.4.1	Interleukin-1 und Interleukin-1 Rezeptorantagonist.....	16
1.4.2	Adhäsionsmoleküle und Leukozytenmigration	28
1.4.3	MCP-1.....	30
2	Fragestellung	31
3	Material und Methoden.....	32
3.1	Versuchstiere, Operation und Behandlung.....	32
3.2	Histologische Untersuchung.....	33
3.3	Immunhistologische Untersuchungen	35
3.3.1	APAAP-Methode.....	35
3.3.2	TUNEL-Assay.....	37
3.4	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	38
3.4.1	Isolierung und Analyse der RNA	39

3.4.2	Reverse Transkription	40
3.4.3	PCR und elektrophoretische Auswertung	41
3.4.4	Durchführung	43
3.5	Statistik	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Morphologische Beurteilung des Gewebeschadens	47
4.2	Leukozyteninfiltration	50
4.3	Apoptose der Tubuluszellen	51
4.4	mRNA-Expression von MCP-1, ICAM-1, Bcl-2 und Bax.....	54
4.4.1	MCP-1	54
4.4.2	ICAM-1	56
4.4.3	Bcl-2 und Bax.....	58
5	Diskussion	62
5.1	Histologischer Gewebeschaden.....	62
5.2	Leukozyteninfiltration und Bedeutung von ICAM-1 und MCP-1	64
5.2.1	Makrophagen und T-Zellen	64
5.2.2	ICAM-1 und MCP-1.....	67
5.3	Apoptose.....	71
5.4	Schlussfolgerung	74
6	Zusammenfassung	75
7	Abkürzungsverzeichnis.....	77
8	Literaturverzeichnis	80
9	Danksagung	106

1 Einleitung

1.1 Überblick

Der **Ischämie-Reperfusionsschaden (IR-Schaden)** der Niere stellt eine wichtige Ursache renaler Dysfunktion nach Ereignissen wie einem hämorrhagischen Schock oder einer Organtransplantation dar und hat eine bedeutende Auswirkung auf die Patientenmorbidity und -mortality. Der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose sowie auch Entzündungsreaktionen sind hierbei wichtige pathogenetische Faktoren.

Interleukin-1 (IL-1) gehört zu einer Gruppe von Zytokinen, die während der frühen Phase der Reperfusion nach renaler Ischämie freigesetzt werden [Bonventre, Zuk 2004]. Es kann sowohl Apoptose wie auch Entzündungsprozesse fördern. Letztere werden durch vermehrte Expression von weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen reguliert, welche die Leukozyteninfiltration in das geschädigte Gewebe vermitteln [Allan et al. 2005].

Die durch IL-1 ausgelösten Effekte werden durch den endogenen kompetitiven Antagonist **Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)** blockiert. Dieser verhindert die Bindung von IL-1 an die IL-1 Rezeptoren I und II und blockiert so den intrazellulären Signalweg. Dadurch wird die Entzündungsantwort abgeschwächt und die Anzahl der apoptotischen Zellen reduziert [Dripps et al. 1991].

Der beträchtliche entzündungshemmende Effekt von rekombinantem IL-1ra wurde klinisch bei der Behandlung von rheumatoider Arthritis nachgewiesen, ebenso in experimentellen Modellen zum myokardialen [Suzuki et al. 2001] und zerebralen [Yang et al. 1999a] Ischämie-Reperfusionsschaden. Weiterhin zeigte die Behandlung mit IL-1ra auch eine Reduktion der Infiltration des Nierengewebes mit polymorphkernigen Leukozyten bei renaler Ischämie und Reperfusion [Haq et al. 1998].

Auf welche Weise IL-1ra vor renalem IR-Schaden im Hinblick auf Apoptose und Expression von apoptose-regulierenden Faktoren und Adhäsionsmolekülen schützt, ist bisher noch unklar.

Die Bindung von IL-1 an den IL-1 Rezeptor führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nuklear Faktor Kappa B). Dieser bewirkt eine Gentranskription von proinflammatorischen Faktoren wie des MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und des ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül 1) [Rabb et al. 1997]. Diese Faktoren spielen eine wesentliche Rolle bei der Leukozytenrekrutierung und -infiltration und sind damit maßgeblich am Auslösen einer **Entzündungsreaktion** und somit an der Entwicklung eines Gewebes Schadens nach IR beteiligt [Dunn et al. 2002].

NF- κ B beeinflusst auch den Zelltod durch **Apoptose**, da es die Transkription von Faktoren der Bcl-2-Familie steuert. Zur Bcl-2-Familie gehören sowohl das vor Apoptose schützende Bcl-2 als auch das die Apoptose fördernde Bax.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, im Hinblick auf die proinflammatorischen und proapoptotischen Effekte von IL-1, Mechanismen zu beschreiben, die bei der Verminderung des renalen IR-Schadens durch IL-1ra eine Rolle spielen.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass IL-1ra den postischämischen Nierenschaden reduziert, da es Apoptose und Leukozyteninfiltration durch eine Beeinflussung der über NF- κ B regulierten Expression von MCP-1, ICAM-1, Bcl-2 und Bax in der Niere vermindert.

1.2 Renaler Ischämie-Reperfusionsschaden

Der Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere ist das Resultat einer verminderten Nierendurchblutung und einer anschließenden Reperfusion. Mit ihm ist eine hohe Morbidität und Mortalität verbunden. Ereignisse, die durch Verringerung der Nierendurchblutung zu dieser Art der Nierenschädigung führen können, sind beispielsweise ein schwerer Blutdruckabfall, die Unterbrechung der Nierendurchblutung im Rahmen einer Nierenoperation, eine Nierenarterienstenose oder suprarenales Clamping der Aorta [Thadhani et al. 1996].

Der Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere ist eine der Hauptursachen des akuten Nierenversagens und spielt ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Transplantationsmedizin. Hier ist er mit einer verzögerten Funktionsaufnahme des Nierentransplantats (DGF, *delayed graft function*) assoziiert, welche ein erhöhtes Risiko akuter Abstoßung birgt und eine Beeinträchtigung des Langzeitüberlebens des Transplantats nach sich zieht [Shoskes, Halloran 1996]. Für das Transplantatüberleben sind neben alloantigen-abhängigen Faktoren auch alloantigen-unabhängige Faktoren beteiligt. Der Ischämie-Reperfusionsschaden, der unweigerlich durch Entnahme, Transport und nachfolgende Wiederperfusion des Transplantats auftritt, gehört zu diesen alloantigen-unabhängigen Mechanismen [Tullius, Tilney 1995].

Die Wiederherstellung des Blutflusses nach Ischämie ist essentiell, um eine irreversible Parenchymzerstörung zu vermeiden. Paradoxerweise kann jedoch durch die folgende Reperfusion das Gewebe noch zusätzlich geschädigt werden [Grace 1994].

1.2.1 Ischämie

Durch **Ischämie** kommt es im Gewebe zu einem Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen sowie zu einer Akkumulation von aus dem Zellmetabolismus anfallenden Abfallprodukten.

Auf zellulärer Ebene führt die Hypoxie über die Zunahme der anaeroben Glycolyse zu einem Laktatanstieg mit konsekutivem Absinken des pH-Werts, daneben auch zu einem Abfall des Energiemetaboliten des Zellstoffwechsels Adenosin-5'-Triphosphat (ATP). Der **ATP-Abfall** wirkt sich in einer verminderten Funktion der ATP-abhängigen Ionenpumpen aus. Dies führt durch den Einstrom von Ionen wie Na^+ und Ca^{2+} gefolgt von Wasser zu einem Zusammenbruch der Zellhomöostase und somit zu einem Zellödem [Grace 1994; Weinberg 1991].

Der intrazelluläre Calciumanstieg löst eine Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen aus, welche zum Abbau des Zytoskeletts beitragen [Devarajan 2005].

Zudem erfolgt durch den **Abbau von ADP und AMP** eine Akkumulation der membrangängigen Purin-Nukleoside Adenosin und Inosin und durch deren Katabolismus auch eine Ansammlung von Hypoxanthin. Diese Vorläufer-Nukleoside gehen bei längerer Ischämie-Zeit über die Zellmembran verloren und stehen der Zelle bei anschließender Reperfusion nur noch vermindert zur ATP-Synthese zur Verfügung [Padanilam 2003]. Hypoxanthin kann bei folgender Reperfusion der Xanthin-Oxidase als Substrat dienen und zu vermehrter Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) führen [Brömme et al. 2002].

1.2.2 Reperfusionsschaden

Mit der Wiederaufnahme von Sauerstoff nach Wiederherstellung der Blutzirkulation bilden sich vermehrt **toxisch-reaktive Sauerstoffintermediate**, wie z. B. Superoxidradikal-Anionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale ($\bullet\text{OH}$). Unter physiologischen Bedingungen werden reaktive Sauerstoffintermediate (ROI) durch verschiedene enzymatische Reaktionen (durch Superoxiddismutasen, Glutathionperoxidase und Katalase) sowie auch nichtenzymatisch durch Radikalfänger wie Glutathion, Harnsäure oder Ascorbinsäure inaktiviert. Beim IR-Schaden übersteigt jedoch die Generierungsrate der ROI die Eliminationsrate der

Zellen, so dass das Gewebe oxidativem Stress ausgesetzt ist [Brömme et al. 2002].

Durch Reaktion der ROI mit Nukleinsäuren, Proteinen und Fetten entstehen eingreifende **strukturelle Veränderungen und Zellschäden**. ROI bewirken eine direkte Schädigung der Lipid-Zellmembran durch Lipidperoxidation. Weiterhin lösen sie eine Aktivierung der Plasmamembran-Phospholipase A₂ mit vermehrter Produktion von Arachidonsäure aus. Diese stellt eine wichtige Vorstufe der Eicosanoid-Synthese und damit von chemotaktischen Mediatoren wie Leukotrien B₄ oder Thromboxan B₂ dar. Auch steigern ROI mittels Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF-κB die Genexpression von Leukozytenadhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen. Die beiden letztgenannten Mechanismen führen zu vermehrter **Leukozytenaktivierung und Chemotaxis** [Toyokuni 1999]. Aktivierte Leukozyten bilden wiederum toxische freie Radikale, so dass ein Circulus vitiosus resultiert.

1.2.3 Mikrozirkulationsschaden

Die verminderte postischämische kapillare Reperfusion (*no-reflow*) spielt ebenfalls eine Rolle beim IR-Schaden [Vollmar, Menger 2004; Menger et al. 1997]. Die Verlagerung intravasalen Volumens nach intrazellulär führt zum Anschwellen der Endothelzellen mit einhergehender Verengung des Gefäßlumens und zu erhöhter Blutviskosität. Eine vermehrte Durchlässigkeit des kapillaren Endothels (**capillary leakage**) ist mit interstitiellem Ödem und erhöhtem Gewebedruck verbunden. Daneben verursachen eine Stagnation der Leukozyten und Mikrothrombosierungen eine **Obstruktion der Mikrogefäße** [Menger et al. 1997]. Die erwähnten Pathomechanismen sind mit einer Verlängerung der Gewebhypoxie in der Phase der Reperfusion assoziiert und verstärken somit den ischämischen Schaden.

Vasokonstriktorische Mediatoren wie Thromboxane und Endothelin verstärken die Einschränkung der Mikrozirkulation [Wilhelm et al. 1999].

Verschiedene Modelle des ischämischen akuten Nierenversagens konnten eine **postischämische Stauung der Mikrozirkulation**, besonders in der

medullären Region, nachweisen [Mason et al. 1987; Solez et al. 1974]. Diese persistiert auch in der Phase der Reperfusion. Ursache dafür ist eine Aggregation von Erythrozyten und Leukozyten. Dadurch kommt es zu einer Verlängerung der Gewebehypoxie und wiederum zur Verstärkung des ischämischen Schadens.

1.3 Akute Tubulusnekrose und Apoptose

1.3.1 Akute Tubulusnekrose: Hämodynamische und morphologische Veränderungen

Unter der akuten Tubulusnekrose (ATN) versteht man eine chemische oder toxische Schädigung der Tubuluszellen, welche ein akutes Nierenversagen verursachen kann. Neben der Nekrose spielt auch die Apoptose (der sogenannte programmierte Zelltod) eine wichtige Rolle für den Verlust funktionsfähiger Tubuluszellen [Schumer et al. 1992; Daemen et al. 2002; Racusen et al. 1991].

Die Auswirkungen des IR-Schadens zeigen sich zuerst in den Regionen der Niere, die besonders anfällig für eine Hypoxie sind. Obwohl für die Durchblutung der Niere bis zu 25% des Herzzeitvolumens zur Verfügung stehen, erhält das **Nierenmark** über die Vasa recta nur einen geringen Anteil des Blutvolumens, so dass schon unter physiologischen Bedingungen hier eine relative Hypoxie besteht [Friedewald, Rabb 2004].

Am anfälligsten für hypoxische Schäden erwies sich die im äußeren Mark gelegene Pars recta des proximalen Tubulus (S3 Segment), welche aufgrund ihrer starken Transportaktivität einen hohen Sauerstoffbedarf hat [Venkatachalam et al. 1978].

In der Phase der **Reperfusion** nach Ischämie zeigt sich trotz der wiederhergestellten Blutzufuhr eine Reduktion der renalen Durchblutung um 40–50% [Lieberthal 1997]. Mit dieser verminderten Perfusion hängt eine **Stauung der Mikrogefäße** besonders im Bereich der äußeren Medulla zusammen. Diese Stauung persistiert auch während der Reperfusion und

verlängert so die Hypoxie des Gewebes mit Verstärkung des ischämischen Zellschadens [Mason et al. 1987; Solez et al. 1974]. Durch die vermehrte Permeabilität des geschädigten Kapillarendothels (*capillary leakage*) entsteht ein interstitielles Ödem. Dieses kann durch den erhöhten Gewebedruck die peritubulären Kapillaren komprimieren und die Durchblutung drosseln.

Eine durch die Volumenverschiebung erhöhte Blutviskosität wie auch Aggregationen von Erythrozyten und eine Stagnation der Leukozyten verstärken die Obstruktion der Mikrogefäße. Aktivierte Leukozyten initiieren eine Entzündungskaskade, die die Endothelzellen zusätzlich schädigt [Molitoris, Sutton 2004; Sutton et al. 2003].

Weiterhin liegt der renalen Minderperfusion ein **Ungleichgewicht von vasodilatatorisch und vasokonstriktorisch wirkenden Faktoren** zu Grunde. Für diese Effekte werden insbesondere eine verminderte Produktion des vasodilatatorischen NO durch die konstitutive endotheliale NO-Synthase und eine vermehrte Synthese des stark vasokonstriktorisch wirkenden Endothelin-1 verantwortlich gemacht [Lieberthal 1997; Wilhelm et al. 1999].

Morphologisch erkennt man eine Vakuolisierung der Tubulusepithelzellen sowie den Verlust des apikalen Bürstensaums bei proximalen Tubulusepithelzellen.

Für die Funktionsfähigkeit der Tubuluszellen (zielgerichteter Substanztransport) ist die Aufrechterhaltung ihrer Polarität entscheidend. Der IR-Schaden führt u. a. durch die Beschädigung des Zytoskeletts zum **Zusammenbruch dieser Zellorientierung.**

Als Folge der Zytoskelettstörung zeigt sich neben dem Verlust des Bürstensaums eine Umverteilung der ursprünglich basolateral angeordneten Na^+ - K^+ -ATPasen. Diese tauchen nun auch an apikalen Bereichen der Tubuluszellen auf, woraufhin der zielgerichtete natriumgekoppelte Transport behindert wird (**Abb. 1**) [Molitoris et al. 1989].

Ähnlich verhält es sich mit den Integrinen. Dies sind transmembrane Glykoproteine, welche für die Verankerung der Tubuluszellen in der Basal-

membran verantwortlich sind. Physiologischerweise werden Integrine ausschließlich an der basolateralen Seite der Tubuluszellen exprimiert. Wird die Tubuluszelle geschädigt, kommt es zum Verlust dieser Anordnung und zur Umverteilung der Integrine auf der Zelloberfläche, wodurch die Verankerung der Tubuluszellen in der Basalmembran geschwächt wird (**Abb. 1**) [Goligorsky, DiBona 1993].

Die Abschilferung sowohl von abgestorbenen Zellen und Zellfragmenten als auch von lebensfähigen Zellen in das Tubuluslumen führt zur Bildung von Epithelzell- und Zellfragmentzylindern, die das Tubuluslumen verlegen. Die Entstehung dieser Zellaggregate wird durch die Interaktion freier Integrinrezeptoren verstärkt [Noiri et al. 1994]. Durch die **Verlegung des Tubuluslumens** steigt der intraluminale Druck proximal der Obstruktion, so dass die proximalen Tubuli dilatieren. Die durch den Rückstau des Filtrats veränderten Druckverhältnisse im Glomerulus führen zu einer weiteren Reduktion der glomerulären Filtrationsrate [Arendshorst et al. 1975; Bonventre 1993].

Durch die nun teilweise bloßliegende geschädigte tubuläre Basalmembran kann es zur Rückdiffusion des glomerulären Filtrats in die peritubulären Kapillaren kommen (**back leak**) [Schrier et al. 2004].

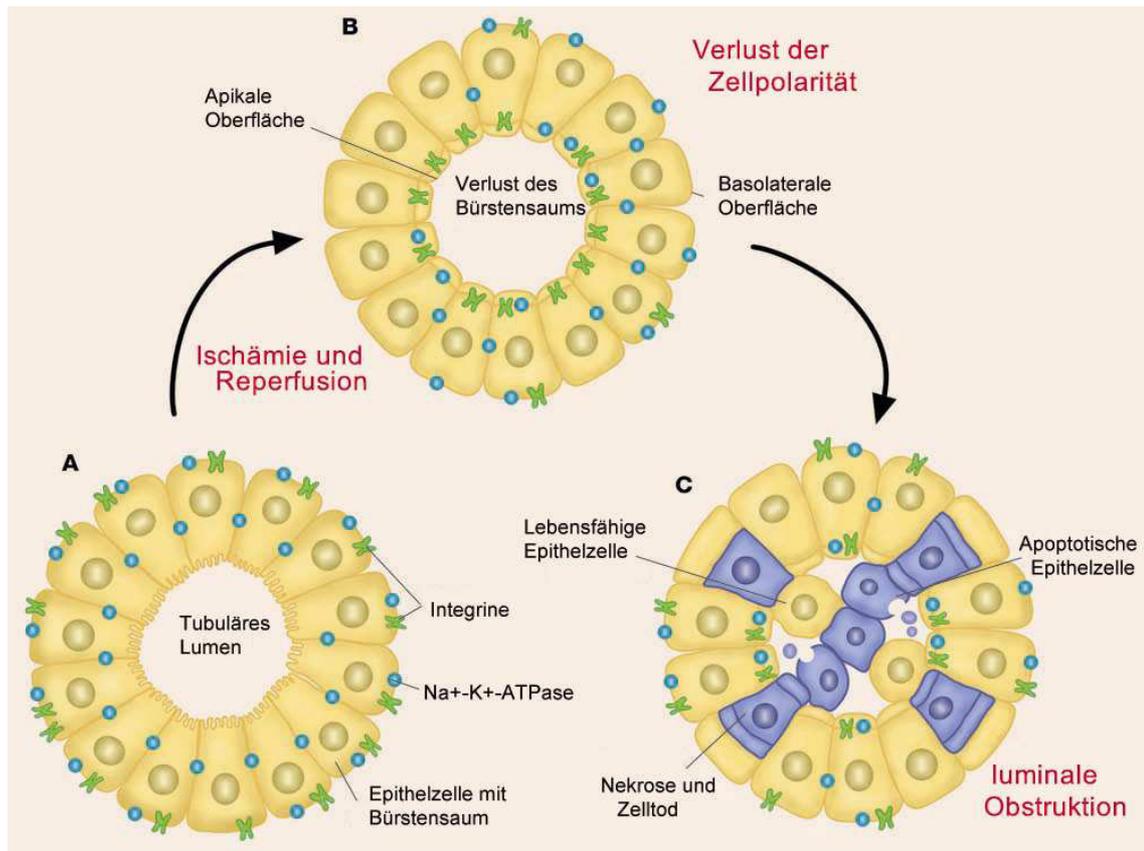


Abb. 1 Morphologische Veränderungen der proximalen Tubuli. Nach Ischämie und Reperfusion kommt es, zum Verlust des Bürstensaums sowie u. a. durch eine Umverteilung der Integrine und Na⁺-K⁺-ATPasen auf die apikale Zelloberfläche zum Verlust der Zellpolarität. Sowohl abgestorbene als auch intakte Zellen gelangen in das Tubuluslumen und können durch Bildung von Epithelzell- und Zellfragmentzylindern das Tubuluslumen obstruieren und dadurch zur Reduktion der GFR beitragen [Modifiziert nach Schrier et al. 2004 und Thadhani et al. 1996].

1.3.2 Apoptose

1.3.2.1 Definition von Apoptose und Nekrose

Der durch renale Ischämie und Reperfusion ausgelöste Zelltod kann je nach Ausmaß der Schädigung in Form von Nekrose oder Apoptose auftreten, wobei es fließende Übergänge zwischen diesen gibt [Schumer et al. 1992; Gobé et al. 2000].

Nekrosen können durch diverse schädigende Stimuli wie Toxine, physikalische Schäden und Ischämie ausgelöst werden und entstehen infolge eines schwerwiegenden Zusammenbruchs der Zellhomöostase. Typisch für

die Nekrose sind zytoplasmatische Veränderungen wie ein Anschwellen der Zellorganellen und der Zelle selbst sowie die Auflösung des Zellkerns (Karyolyse). Durch den Verlust der Plasmamembranintegrität können die Zellen platzen und Enzyme sowie chemotaktisch wirksame Zellkomponenten freisetzen. Diese können Makrophagen und Neutrophile anlocken und eine Entzündungsreaktion auslösen [Devarajan 2005]. Infolge einer renalen Ischämie und Reperfusion sterben in der Phase der Ischämie bereits einige Zellen überwiegend durch die nekrotische Form des Zelltods. Es sind v. a. die proximalen Tubuluszellen der Niere betroffen, deren Energieversorgung hauptsächlich sauerstoffabhängig durch die oxidative Phosphorylierung gewährleistet wird [Wirthensohn, Guder 1986]. Zellen, die fähig sind einen Teil der Energie durch anaerobe Glycolyse zu produzieren, werden durch den Sauerstoffmangel weniger geschädigt.

Im Gegensatz zur Nekrose ist die 1972 erstmals von Kerr et al. beschriebene **Apoptose**, der sog. programmierte Zelltod, energieabhängig. Physiologischerweise reguliert die Apoptose das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zellelimination und spielt eine zentrale Rolle während der Embryonalentwicklung. Die apoptotische Zelle verliert die Verbindung zu Nachbarzellen und löst sich damit aus dem Zellverband. Zelle und Zellorganellen bleiben jedoch im Unterschied zur Nekrose lange Zeit intakt. Die Apoptose geht mit dem Schrumpfen der Zelle, einer Kondensation des Kernchromatins und einer anschließenden Kernfragmentation einher. Vesikel aus von Zellmembran umhüllten Kernfragmenten und Zellorganellen, so genannte *apoptotic bodies*, werden abgeschnürt und durch benachbarte Zellen oder Makrophagen phagozytiert. Damit wird nach klassischem Verständnis der Apoptose eine Entzündungsreaktion umgangen [Lawen 2003]. Jedoch wurde u. a. im Rahmen des renalen IR-Schadens gezeigt, dass auch die Apoptose einen Beitrag zum Entstehen der schädigenden Entzündungsreaktion leisten kann [Daemen et al. 1999; Daemen et al. 2001a; Miwa et al. 1998].

1.3.2.2 Mechanismen der Apoptose

Caspasenkaskade

Ein zentrales Element des apoptotischen Zelltods stellt die **Caspasen-kaskade** dar. Caspasen sind in ihrem aktiven Zentrum Cystein enthaltende, nach einem Aspartatrest spaltende Proteasen. Sie übernehmen die intrazelluläre Steuerung der Apoptose und werden als inaktive Vorläufermoleküle, als Procaspasen, synthetisiert. Bislang sind 14 Mitglieder der Caspasenfamilie charakterisiert.

Caspase-1, -4 und -5 sind an der Zytokinreifung beteiligt und scheinen somit hauptsächlich in Entzündungsprozessen eine Rolle zu spielen. Die sog. **Initiatorcaspasen** (Caspase-2, -8, -9 und -10) werden in Antwort auf apoptotische Stimuli aktiviert. Sie können ihrerseits durch proteolytische Spaltung **Effektorcaspasen** wie Caspase-3, -6 und -7 aktivieren [Rupinder et al. 2007]. Effektorcaspasen können zahlreiche zelluläre Substrate spalten, darunter andere Caspasen, Proteine des Zytoskeletts und nukleäre Lamine [Hengartner 2000]. Sie lösen auch die Aktivierung bestimmter Endonukleasen aus, welche die DNA apoptotischer Zellen fragmentieren [Sakahira et al. 1998]. Typischerweise erfolgt die **Fragmentierung der DNA** zwischen den Nukleosomen, so dass für die Apoptose charakteristische Bruchstücke von ca. 180-200 bp und Vielfache davon entstehen. (In der DNA-Elektrophorese lässt sich deswegen eine charakteristische „Leiterstruktur“ erkennen.) [Cohen et al. 1992].

Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose

Die Aktivierung der Caspasen-Signalkaskade kann über verschiedene Wege erfolgen (**Abb. 2**):

Beim **extrinsischen Weg** erfolgt die Signaltransduktion über sog. Todesrezeptoren wie Fas (Apo-1, CD95) oder TNF-R1 (Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor Typ 1), die der TNF-R-Familie angehören und durch eine intrazytoplasmatische Todesdomäne (*death domaine*, DD) gekennzeichnet sind [Krammer 2000; Leist, Jaattela 2001]. Nach Bindung ihrer spezifischen Liganden FasL bzw. TNF- α oligomerisieren die Rezeptoren. Die Todesdomänen assoziieren mit spezifischen Adaptermolekülen und formieren sich mit mehreren Procaspase-8 Molekülen zum DISC (*death inducing signaling complex*) [Philchenkov 2004]. Procaspase-8 wird autolytisch zur Caspase-8 umgewandelt und induziert die Apoptose durch Aktivierung der Effektorcaspase Caspase-3 [Muzio et al. 1998].

Daneben existiert der **intrinsische, mitochondriale Weg** der Apoptose. Er kann über verschiedenste intrazelluläre Trigger, u. a. durch Hypoxie und reaktive Sauerstoffintermediate aktiviert werden. Dabei kommt es zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren, wie Cytochrom C, AIF (*apoptosis inducing factor*) und der Endonuklease Endo G aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytosol [Green, Kromer 2004]. Dort bindet Cytochrom C Moleküle des Adapterproteins Apaf-1 (*apoptosis protease activation factor-1*) und initiiert die Bildung von Apoptosomen. Dies sind Oligomere aus je sieben Molekülen Cytochrom C, Apaf-1, (d)ATP und Procaspase-9 [Waterhouse et al. 2002]. Die durch das Apoptosom gebundene Procaspase-9 wird zur Caspase-9 aktiviert und kann wiederum weitere Caspasen, wie die Effektorcaspase Caspase-3 aktivieren [Lawen 2003].

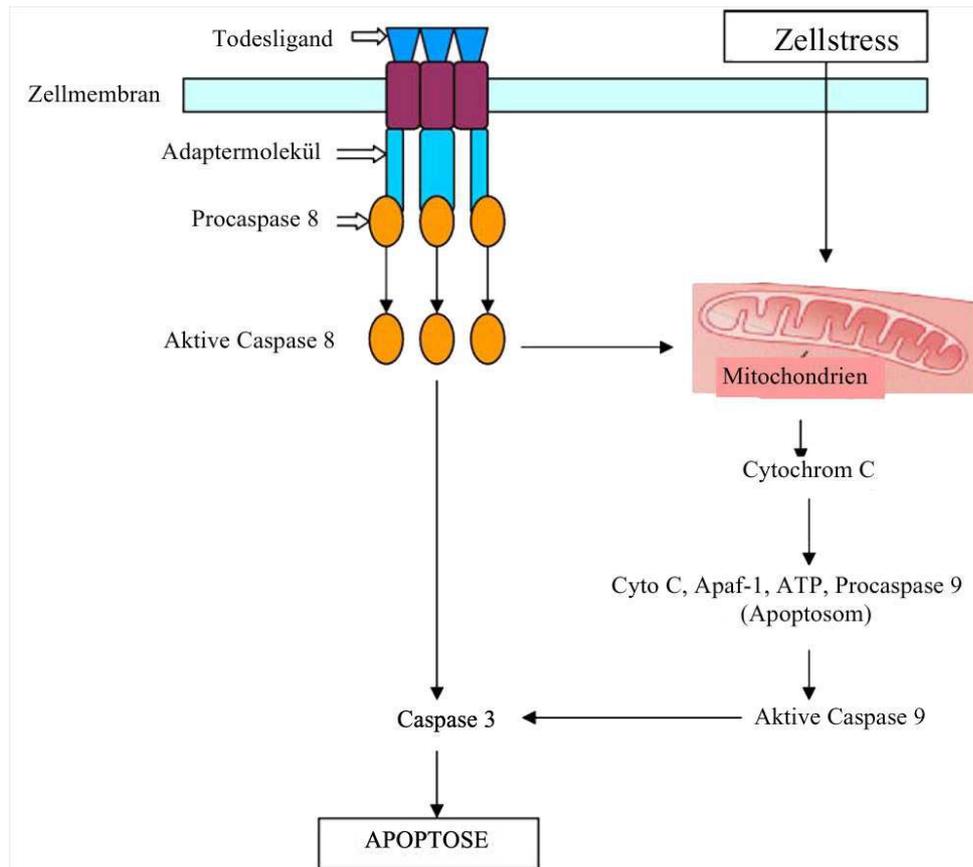


Abb. 2 Extrinsischer und intrinsischer Weg der Apoptose. Interagiert ein Todesrezeptor mit seinem Liganden (links im Bild), bildet er Oligomere mit weiteren Rezeptoren. Es werden Adapterproteine und Initiatorcaspasen wie Caspase 8 rekrutiert. Aktive Initiatorcaspasen können ihrerseits Effektorcaspasen wie Caspase 3 aktivieren und die Apoptose induzieren. Der intrinsische, mitochondriale Weg (rechts) führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Cytochrom C bindet an das Adaptermolekül Apaf-1 und rekrutiert die Initiatorcaspase Caspase 9. Die aktive Caspase 9 induziert durch Aktivierung der Effektorcaspase Caspase 3 die Apoptose [Modifiziert nach Rupinder et al. 2007].

Bax und Bcl-2

Intrazellulär wird die Apoptose unter anderem durch Mitglieder der **Bcl-2-Proteinfamilie** kontrolliert, welche die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien regulieren [Zimmermann, Green 2001]. Zwei bedeutende Vertreter der Bcl-2-Familie sind das antiapoptotisch wirksame Bcl-2, das erstmals im folliculären B-Zell-Lymphom charakterisiert wurde und der Bcl-2-Protein-Familie seinen Namen gab, und das apoptosefördernde Bax (*Bcl-2-associated X protein*) [Tsujiimoto et al. 1985].

Es wurde gezeigt, dass Bax und Bcl-2 Dimere bilden können, und das Verhältnis der beiden Proteine zueinander die Anfälligkeit einer Zelle gegenüber apoptoseinduzierenden Stimuli bestimmt [Chao, Korsmeyer 1998]. Ein Überschuss an Bcl-2-Monomeren kann die Apoptose verhindern, wohingegen durch ein Überwiegen von Bax-Homodimeren die Apoptose eingeleitet wird. Die proapoptotische Wirkung des Bax kann durch die Bildung von Bcl-2-Bax-Heterodimeren neutralisiert werden [Oltvai et al. 1993].

Wird **Bax** durch einen apoptotischen Stimulus aktiviert, wandert es aus dem Zytosol zu den Mitochondrien. Dort inseriert es mit Hilfe seiner Transmembrandomäne in die äußere Mitochondrienmembran und setzt sich zu Oligomeren zusammen, was eine Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol und damit die Aktivierung von Caspase-9 zur Folge hat (**Abb. 2**) [Desagher, Martinou 2000]. Dieser Prozess involviert vermutlich die Bildung von Kanälen. Es ist jedoch unklar, ob die Bax-Proteine selbst einen Kanal formieren und so die Freisetzung proapoptotischer Faktoren in das Zytosol ermöglichen, oder ob sie mit physiologisch präexistenten Kanälen wie der mitochondrialen Permeabilitätspore (*permeability transition pore*) interagieren. Eine Hypothese geht davon aus, dass sich die Porenöffnung durch die Interaktion mit Bax erweitert, und so die Mitochondrienmembran auch für höhermolekulare Stoffe wie Cytochrom C durchlässig wird [Tichy 2006].

Bcl-2, welches ausschließlich membrangebunden, insbesondere in den mitochondrialen Membranen vorkommt, inhibiert die Oligomerisierung von Bax und damit die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran. Die Bcl-2-Proteine können dem Ablauf der Apoptose so lange entgegenwirken bis die Konzentration des membrangebundenen Bax die von Bcl-2 übersteigt (**Abb. 3**) [Mikhailov et al. 2001; Dlugosz et al. 2006].

Der Verlust der mitochondrialen Homöostase durch die Porenbildung führt zur Schwellung der Mitochondrien. Die Mitochondrienmembranen können reißen und Proteine wie Cytochrom C in das Zytosol freisetzen. Diese morphologischen und molekularen Veränderungen wurden auch nach

Ischämie und Reperfusion der Niere beobachtet [Benitez-Bribiesca et al. 2000].

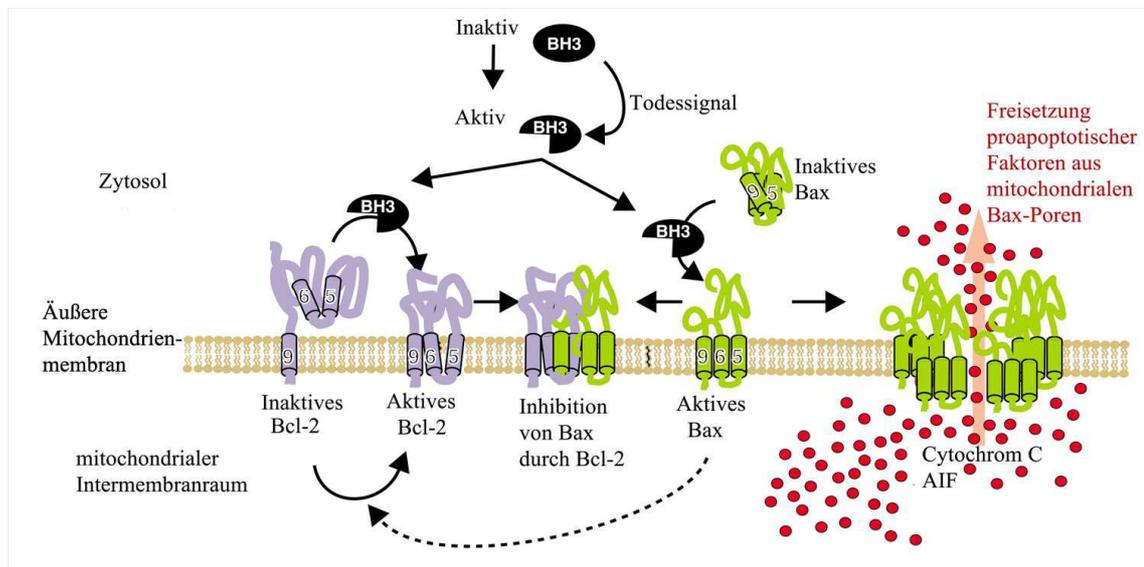


Abb. 3 Bcl-2 inhibiert aktiviertes, membrangebundenes Bax. Inaktives Bax ist als Monomer im Zytoplasma lokalisiert, wohingegen Bcl-2 nur membrangebunden vorkommt. BH3-only-Proteine, welche ebenfalls zur Bcl-2-Proteinfamilie gehören, werden durch Todessignale aktiviert. Sie bewirken eine Konformationsänderung von Bax und Bcl-2 und dadurch deren Aktivierung. Fehlt aktiviertes Bcl-2, formieren sich membrangebundene Bax-Monomere zu Oligomeren, welche die Mitochondrienmembran permeabilisieren und die Freisetzung proapoptotischer Faktoren ermöglichen. Möglicherweise kann auch aktiviertes Bax eine Konformationsänderung von Bcl-2 auslösen (gestrichelter Pfeil). Die Bindung von Bcl-2 an Bax scheint irreversibel zu sein und verhindert die Blockierung anderer Bax-Moleküle durch Bcl-2. Folglich ist für die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran ein Überschuss an Bax-Molekülen notwendig [Modifiziert nach Dlugosz et al. 2006].

Die Translokation von Bax in die äußere Mitochondrienmembran konnte auch in proximalen Tubuluszellen der Niere in Folge von Hypoxie und ATP-Depletion nachgewiesen werden [Saikumar et al. 1998]. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass eine Überexpression des antiapoptotischen Bcl-2 die mitochondriale Cytochrom C Freisetzung blockieren und den durch Hypoxie ausgelösten Zellschaden eindämmen kann [Saikumar et al. 1998].

1.4 Entzündung

Neben den direkten zytotoxischen Auswirkungen der Hypoxie, verursacht Ischämie und Reperfusion im Nierenparenchym eine Entzündungsreaktion, die mit einer Aktivierung des Endothels, verstärkter Leukozytenadhäsion und einer Beeinträchtigung des mikrovaskulären Blutflusses verbunden ist [Bonventre, Zuk 2004].

Nach renaler Ischämie und Reperfusion wurde im Tierversuch ein deutlicher Anstieg der Serumkonzentration von IL-1 β über mehrere Tage nachgewiesen [Furuichi et al. 2006]. Interleukin-1 übernimmt eine wesentliche Funktion in der Vermittlung entzündungsfördernder Prozesse.

1.4.1 Interleukin-1 und Interleukin-1 Rezeptorantagonist

1.4.1.1 Die Interleukin-1 Familie

Interleukin-1 (IL-1) gehört als proinflammatorisches Schlüsselzytokin zu den wichtigsten entzündungsfördernden Signalstoffen des Immunsystems. Es spielt eine zentrale Rolle als Mediator der durch den Ischämie-Reperfusionsschaden in der Niere ausgelösten Entzündungskaskade [Furuichi et al. 2006].

Zur **Interleukin-1 Familie** rechnet man mittlerweile 11 verschiedene Proteine: IL-1 α (IL-1F1), IL-1 β (IL-1F2), IL-1ra (IL-1F3), IL-18 (IL-1F4), IL-1F5 bis F10 und IL-33 (IL-1F11) (**Tabelle 1**) [Sims et al. 2001; Schmitz et al. 2005].

Tabelle 1. Die Familie der IL-1 Zytokine und ihre Rezeptoren [Barksby et al. 2007; Sims et al. 2001]

Zytokin	Systematischer Name	Rezeptor
IL-1 α	IL-1F1	IL-1RI, IL-1RII
IL-1 β	IL-1F2	IL-1RI, IL-1RII
IL-1ra	IL-1F3	IL-1RI (Antagonist), IL-1RII
IL-18	IL-1F4	IL-18 Ra, IL-18 R β
IL-1F5	IL-1F5	IL-1Rrp2 Rezeptor* (möglicher Antagonist)
IL-1F6	IL-1F6	IL-1Rrp2 Rezeptor* (Agonist)
IL-1F7	IL-1F7	Interagiert mit dem IL-18 <i>binding protein</i>
IL-1F8	IL-1F8	IL-1Rrp2 Rezeptor* (Agonist)
IL-1F9	IL-1F9	IL-1Rrp2 Rezeptor* (Agonist)
IL-1F10	IL-1F10	Bindet den löslichen IL-1RI
IL-33	IL-1F11	ST2

* IL-1Rrp: *IL-1 Receptor related protein*

Der klassische Begriff Interleukin-1 umfasst jedoch die beiden Moleküle **IL-1 α** und **IL-1 β** . Beide Formen binden an die gleichen Oberflächenrezeptoren **IL-1RI** und **IL-1RII (IL-1 Rezeptor Typ I und II)** und besitzen ein ähnliches biologisches Wirkspektrum [Dinarello 1991].

Ein weiteres Mitglied der IL-1 Familie ist der **IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)**. Dieser bindet als kompetitiver Rezeptorantagonist an den IL-1-Rezeptor I, löst aber keine Signaltransduktion aus. Dadurch hemmt IL-1ra die durch IL-1 vermittelten Entzündungsprozesse [Dripps et al. 1991; Dinarello 2000].

1.4.1.2 Synthese von Interleukin-1 α und Interleukin-1 β

IL-1 wird von zahlreichen Zellen wie Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Endothelzellen, dendritischen Zellen, B- und T-Lymphozyten synthetisiert [Dinarello 1991]. Auch die Tubulusepithelzellen der Niere sind in der Lage IL-1 zu produzieren [Brauner et al. 2001].

Die Synthese von IL-1 kann durch Stressfaktoren wie Ischämie und Reperfusion sowie durch verschiedenste proinflammatorische Mediatoren (darunter Lipopolysaccharide und Zytokine wie TNF- α , IL-2 und auch IL-1 selbst) induziert werden [Barksby et al. 2007; Dinarello 1996].

Die Gene, welche für IL-1 α und IL-1 β kodieren sind auf Chromosom 2 lokalisiert [Webb et al. 1986]. Beide Interleukin-1 Formen werden zunächst als größere Vorläufermoleküle mit einer molekularen Masse von 31 kDa synthetisiert [Dinarello, Wolff 1993].

Interleukin 1 α

Die IL-1 α -Vorstufe **Pro-IL-1 α** ist bereits biologisch aktiv. Es verbleibt größtenteils im Zytosol der Zelle. Von dort wandert es nach Aktivierung durch inflammatorische Stimuli in den Zellkern und kann als Transkriptionsfaktor agieren. Es spielt eine Rolle für Zellwachstum und -differenzierung [Werman et al. 2004]. Zu einem kleinen Teil wird Pro-IL-1 α nach Myristylierung zur Zelloberfläche transportiert und in der Membran verankert. Es kann an IL-1-Rezeptoren benachbarter Zellen binden und so eine parakrine Wirkung ausüben (**Abb. 4**) [Stevenson et al. 1993; Kurt-Jones et al. 1985; Brody, Durum 1989; Dinarello 1993].

Unter physiologischen Bedingungen ist IL-1 α extrazellulär nicht nachweisbar. Bei massiver Zellschädigung kann Pro-IL-1 α jedoch in den Extrazellulärraum gelangen und dort durch Proteasen in seine wirksame 17kDa Form **IL-1 α** umgewandelt werden [Kobayashi et al. 1991]. Daneben kann IL-1 α auch durch Calpain, einer Calcium-abhängigen membranassoziierten Cysteinprotease, von Pro-IL1- α abgespalten werden [Kobayashi et al. 1990].

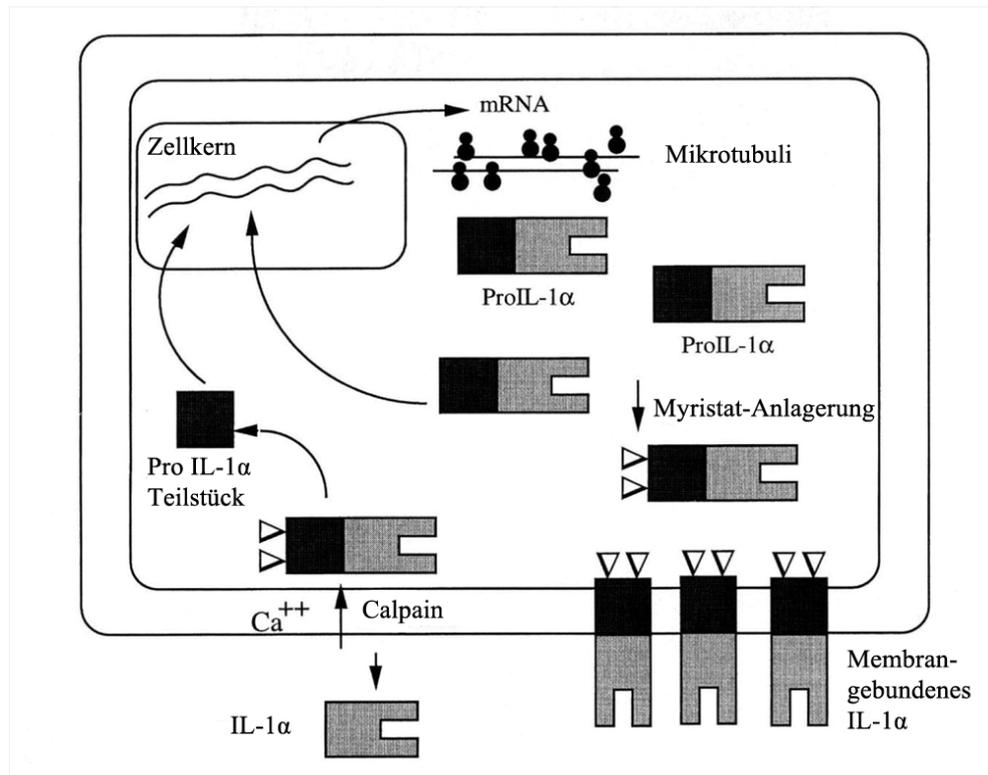


Abb. 4 Synthese von IL-1 α . Der Großteil des zunächst synthetisierten Pro-IL-1 α verbleibt im Zytosol. Nach Myristat-Anlagerung wird IL-1 α zur Zelloberfläche transportiert, wo es in der Zellmembran verankert werden kann. Daneben kann myristyliertes Pro-IL-1 α durch die membranständige, calciumabhängige Cysteineprotease Calpain zu maturem IL-1 α gespalten und in den Extrazellulärraum freigesetzt werden. Eine Spaltung durch extrazelluläre Proteasen ist ebenfalls möglich. Intrazellulär können Pro-IL-1 α oder das von ihm abgespaltene Teilstück in den Zellkern wandern und als Transkriptionsfaktoren agieren [Modifiziert nach Dinarello 1996].

Interleukin-1 β

Im Gegensatz zu IL-1 α wird IL-1 β von den Zellen sezerniert. Nach der Synthese bleibt der größte Teil der inaktiven Vorstufe **Pro-IL-1 β** zunächst im Zytosol [Singer et al. 1988]. Ein Teil wandert in spezielle sekretorische Lysosomen [Andrei et al. 1999] und wird durch Caspase-1 (früher *IL-1 β -converting-enzyme*, ICE genannt) in seine aktive Form **IL-1 β** (17kDa) umgewandelt (**Abb. 5**) [Hazuda et al. 1990; Thornberry et al. 1992].

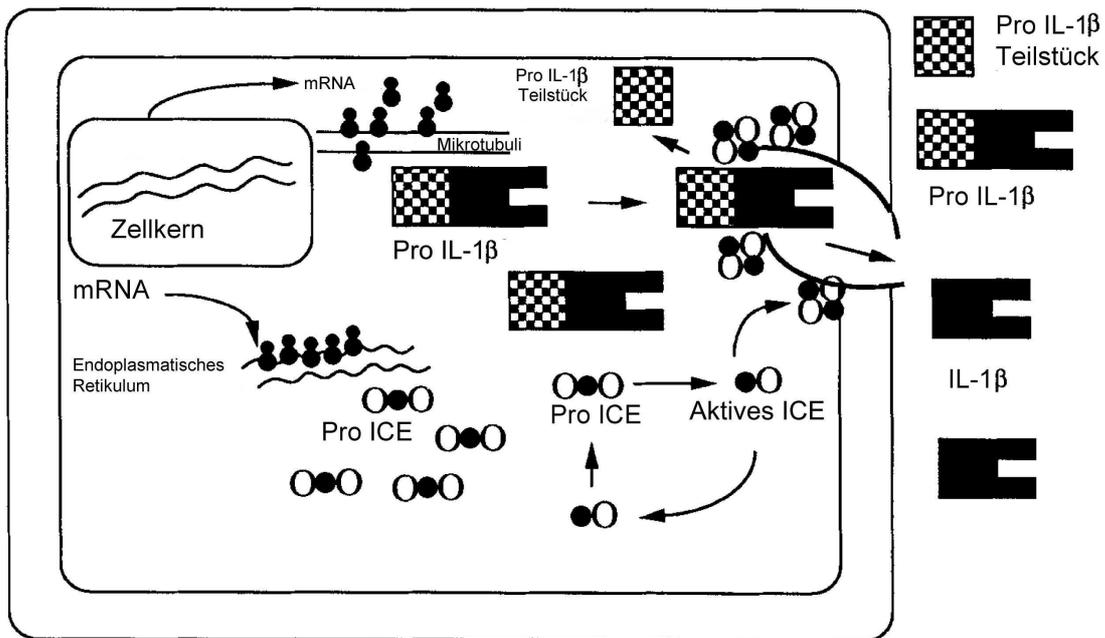


Abb. 5 Synthese von IL-1 β . mRNA, welche für Pro IL-1 β kodiert, wird an den Ribosomen translatiert. Pro IL-1 β verbleibt so lange im Zytosol, bis es durch ICE (*IL-1 β -converting-enzyme*) gespalten wird. ICE wird ebenfalls als inaktives Vorläufermolekül Pro ICE synthetisiert. Pro ICE wird selbst auch durch ICE in seine aktive Form umgewandelt. Diese kann durch Formation eines Tetramers zwei Pro IL-1 β Moleküle spalten. IL-1 β wird daraufhin in den Extrazellulärraum sezerniert [Modifiziert nach Dinarello 1996].

Für die Reifung und Freisetzung des IL-1 β spielt ein Plasmamembran-Rezeptor für extrazelluläres ATP, der Nukleotid-Rezeptor P2X₇, eine Schlüsselrolle [Solle et al. 2001; Ferrari et al. 2006]. Die Aktivierung von P2X₇-R durch extrazelluläres ATP führt über Elektrolytverschiebungen und die Aktivierung von Phospholipasen zur Exozytose der Lysosomen und damit zur Sekretion von IL-1 β [Andrei et al. 2004].

Im Folgenden wird nicht mehr zwischen IL-1 α und IL-1 β unterschieden.

1.4.1.3 Interleukin-Rezeptor Typ I und Typ II

IL-1 kann seine Wirkung durch Bindung an den für die IL-1-Signalübermittlung verantwortlichen **IL-1-Rezeptor Typ I** entfalten. Dieser gehört zur Toll-like-Rezeptor-IL-1-Rezeptor-Superfamilie, welche durch eine für die Signaltransduktion wichtige intrazelluläre TIR (Toll-/ IL-1-Rezeptor)-Domäne gekennzeichnet ist [Subramaniam et al. 2004].

Nach Bindung seines Liganden IL-1 bildet der IL-1RI mit einem weiteren Mitglied der IL-1-Rezeptor-Familie, dem **IL-1RAcP** (*IL-1 receptor accessory protein*), ein Heterodimer. Die Assoziation des Ligand-Rezeptorkomplexes mit dem IL-1RAcP steigert die Bindungsaffinität von IL-1 um ein Vielfaches [Greenfeder et al. 1995]. Das Zusammentreffen der intrazellulären TIR-Domänen der beiden Rezeptor-Proteine ermöglicht in der Zelle den Ablauf einer komplexen Signalkaskade (**Abb. 6**) [Wesche et al. 1997; Übersicht in Subramaniam et al. 2004]. Am Ende dieser Kaskade steht die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (Nuklear Faktor- κ B) und AP-1 (*activator protein 1*), die durch die Transkription ihrer Zielgene die inflammatorischen Eigenschaften von IL-1 vermitteln [Osborn et al. 1989; Bankers-Fulbright et al. 1996; Baldwin 1996].

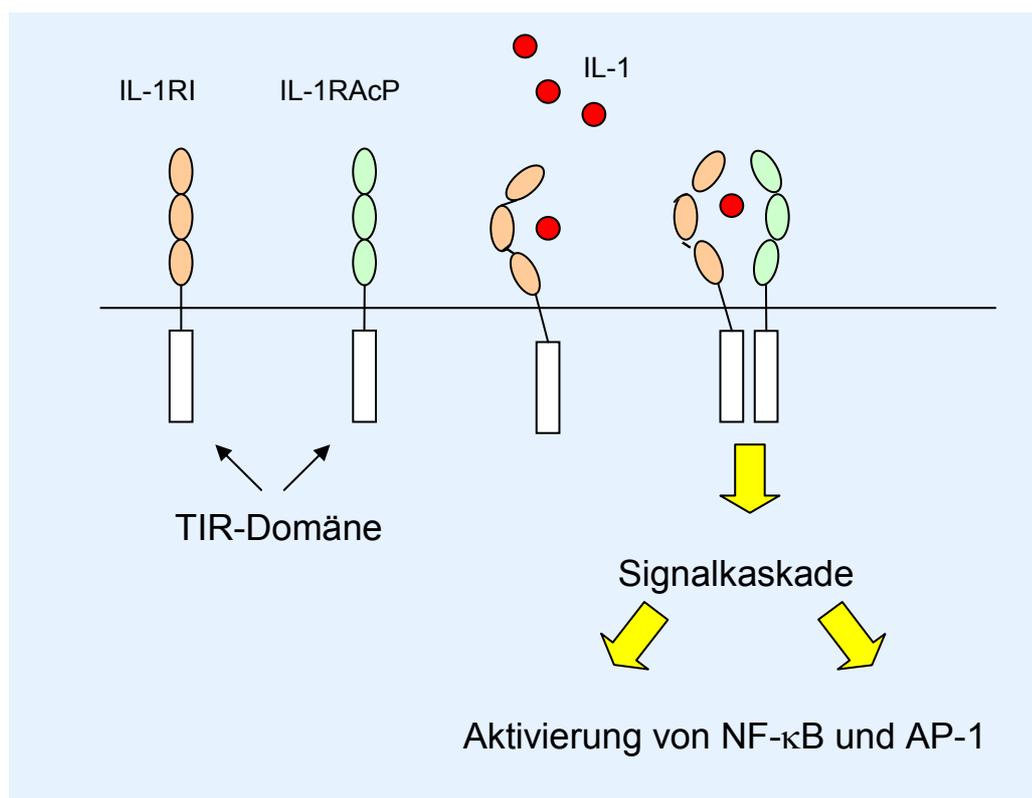


Abb. 6. Der Interleukin-1-Rezeptorkomplex. Der Interleukin-1-Rezeptor Typ I bindet IL-1 α oder IL-1 β und interagiert dann mit dem IL-1RAcP, so dass ein heterodimerer Rezeptorkomplex entsteht. Durch das Zusammentreffen der beiden TIR-Domänen wird der Ablauf einer komplexen intrazellulären Signalkaskade ermöglicht, welche in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 resultiert [Modifiziert nach Martin, Wesche 2002].

Neben dem beschriebenen IL-1-Rezeptor Typ I existiert ein weiterer Rezeptor, der **IL-1-Rezeptor Typ II**. Ihm fehlt die intrazelluläre TIR-Domäne und somit die Fähigkeit zur Signaltransduktion. IL-1RII bindet IL-1, ohne ein Signal weiterzuleiten und wird auch als „Decoy-Rezeptor“, also als „Köder-Rezeptor“, bezeichnet. Er kann als Puffer gegen exzessiv erhöhte IL-1 Konzentrationen dienen und hemmt somit die durch IL-1 vermittelten Wirkungen [Colotta et al. 1994; Subramaniam et al. 2004].

1.4.1.4 Biologische Wirkungen von IL-1

IL-1 kann pleiotrop, also auf viele verschiedene Zelltypen im Organismus, wirken (**Tabelle 2**).

Tabelle 2. *Biologische Wirkungen von IL-1 [Dinarello 1996; Dinarello 1993; Nashan, Luger 1999b]*

Metabolische und endokrine Wirkungen:

- Gesteigerte Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber
- Verminderte Synthese von Albumin
- Knorpel- und Knochenkatabolismus
- Gesteigerte Insulin- und Glukagonproduktion
- Erhöhte ACTH-Ausschüttung

Gefäßsystem:

- Hypotension und Schock
- Capillary-leak-Syndrom
- Erhöhte Gefäßpermeabilität
- Verminderter Gefäßwiderstand
- Induktion von Adhäsionsmolekülen und gesteigerte Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel

Zentrales Nervensystem:

- Fieber
- Verminderter Appetit

Tabelle 2. (Fortsetzung)

<p>Immunmodulation:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Induktion von Chemotaxis und Zytotoxizität von Monozyten▪ Aktivierung von Makrophagen▪ Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis von B-Zellen und folgende Antikörperproduktion▪ Kostimulus für Wachstum und Aktivierung von T-Zellen <p>Hämatopoetische Effekte:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Neutrophilie▪ Lymphopenie▪ Induktion von Kolonie-stimulierenden Faktoren im Knochenmark <p>Lokale Effekte:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Synthese proinflammatorischer Zytokine▪ Synthese von Arachidonsäuremetaboliten▪ Induktion und Freisetzung von Kollagenasen, Proteasen und Hyaluronidasen
--

Bei der Entzündungsreaktion im Nierenparenchym infolge eines Ischämie- und Reperfusionsschadens treten v. a. die lokalen Effekte von IL-1 in den Vordergrund. IL-1 fördert die lokale Entzündung durch Rekrutierung und Aktivierung immunkompetenter Zellen. Es induziert Chemokine wie IL-8 und MCP-1, die Monozyten und Neutrophile an den Ort des entzündlichen Geschehens locken [Sung et al. 2002; Neri et al. 2007].

Auf Endothelzellen verstärkt IL-1 die Expression von Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) und VCAM-1 (vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1), welche die Infiltration von Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten in das Gewebe ermöglichen. Überdies induziert IL-1 auf den Leukozyten auch die Expression von β_2 -Integrinen, die an ICAM-1 binden [Springer 1990; van de Stolpe, van der Saag 1996; Bevilacqua, Nelson 1993; Neish et al. 1992].

Daneben steigert IL-1 die eigene Expression sowie die weiterer proinflammatorischer Zytokine (u.a. IL-6 und TNF- α), welche die Entzündung

verstärken. Auch Arachidonsäurederivate wie Leukotriene und Prostaglandine sowie NO als potente Entzündungsmediatoren werden infolge der Induktion der Phospholipase A₂ (PLA₂), der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der NO-Synthase (iNOS) durch IL-1 verstärkt gebildet [Dinarello 1996; Bankers-Fulbright et al. 1996].

IL-1 bewirkt über die Induktion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (G-CSF und GM-CSF) die Reifung von Leukozytenvorläufern im Knochenmark, die als Nachschub für periphere Immun- und Entzündungsreaktionen zur Verfügung stehen können [Dinarello 1996; Bankers-Fulbright et al. 1996].

B-Zellen werden durch IL-1 zu vermehrter Antikörperbildung veranlasst. Über eine verstärkte Synthese von IL-2 und IL-2-Rezeptoren stimuliert IL-1 ebenfalls die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen [Dinarello 1996; Bankers-Fulbright et al. 1996].

1.4.1.5 Regulation des IL-1/ IL-1 Rezeptor Systems

Da schon geringste Mengen IL-1 eine Zellreaktion auslösen, ist eine genaue Kontrolle des IL-1/ IL-1-Rezeptor-Systems erforderlich. Um einer überschießenden Zytokinreaktion entgegenzuwirken, bestehen mehrere Mechanismen, die die Aktivität von IL-1 kontrollieren.

Neben dem bereits oben beschriebenen **IL-1 Rezeptor Typ II** gibt es einen weiteren Inhibitor der IL-1-Wirkung, den sogenannten **IL-1-Rezeptorantagonist**. Er blockiert die Bindung von IL-1 α und IL-1 β an den IL-1RI und verhindert damit die Aktivierung des Rezeptors.

IL-1 Rezeptorantagonist

Ein dem IL-1 entgegengesetzt wirkender Mediator wurde erstmals in den 80er Jahren in Überständen kultivierter Monozyten und im Urin von an Fieber leidenden Patienten entdeckt und zunächst als IL-1 Inhibitor bezeichnet [Arend et al. 1985, Seckinger et al. 1987a]. Seckinger et al. beschrieben die Eigenschaft des IL-1 Inhibitors, an IL-1-Rezeptoren zu binden, was zu der Bezeichnung **IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)**

führte [Seckinger et al. 1987b; Hannum et al. 1990]. IL-1ra konkurriert mit IL-1 um seinen Rezeptor und inhibiert somit durch kompetitive Rezeptorblockade die Zellstimulation durch IL-1 (**Abb. 7**). Damit unterdrückt IL-1ra auch die durch IL-1 bedingte Synthese weiterer proinflammatorischer Mediatoren.

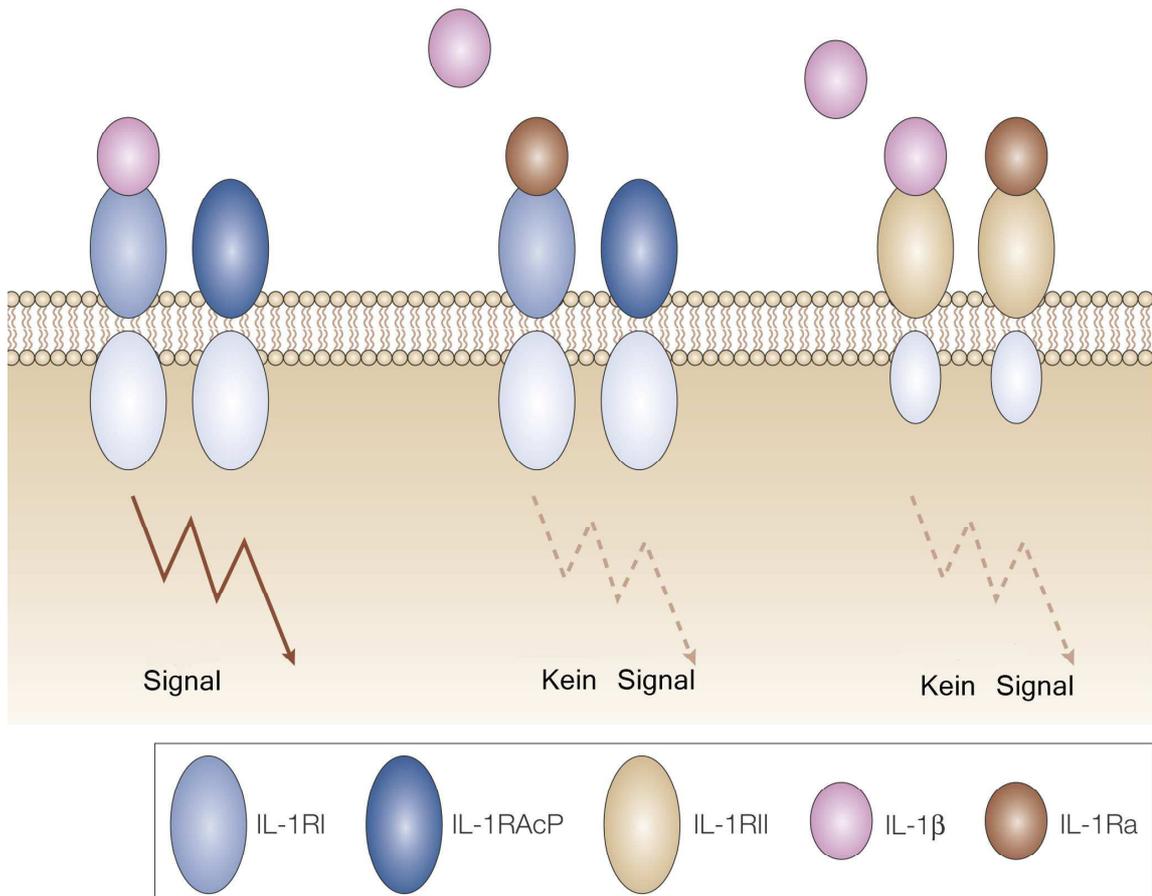


Abb. 7 Der Interleukin-1-Rezeptorkomplex und IL1-Ra. Die Bindung von IL-1 β an den IL-1RI führt zur Assoziation mit dem IL-1RAcP und damit zur Signaltransduktion. Die Bindung des kompetitiven Antagonisten IL-1ra hingegen verhindert die Weiterleitung eines Signals. Dem IL-1R Typ II fehlt die Fähigkeit zur Signaltransduktion, so dass es weder durch IL-1 β , noch durch IL-1ra zu einer intrazellulären Signalweiterleitung kommen kann [Modifiziert nach Braddock, Quinn 2004].

IL-1ra-Gen und Formen von IL-1ra

Das IL-1ra-Gen (IL-1RN) befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 2 in Nachbarschaft der IL-1-Gene [Patterson et al. 1993]. Bislang sind **vier IL-1ra-Isoformen** beschrieben:

Die sekretorische Form **sIL-1ra** (17 kDa) wird nach Abspalten einer Leadersequenz von 25 Aminosäuren als glykosiliertes Protein von 152 Aminosäuren (22-25 kDa) sezerniert.

Des Weiteren wurden drei intrazellulär verbleibende Formen beschrieben: **icIL-1ra1** (18 kDa), **icIL-1ra2** (bisher nur als mRNA charakterisiert) und **icIL-1ra3** (16 kDa). Diese entstehen durch alternatives Spleißen bzw. durch alternative Translationsinitiation [Arend, Guthridge 2000].

Die genaue Funktion der intrazellulären IL-1-Rezeptorantagonist-Isoformen ist noch unklar. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass sie ProIL-1 α antagonisieren können, und dass icIL-ra1 die IL-1-induzierte Zytokinproduktion reduzieren kann [Merhi-Soussi et al. 2005; Banda et al. 2005; Garat, Arend 2003].

sIL-1ra wird von Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Fibroblasten und einer Reihe anderer Zellen produziert. Die Synthese kann aber in den meisten Zelltypen durch eine Vielzahl von Mediatoren wie Lipopolysacchariden, Akute-Phase-Proteinen und Zytokinen (darunter IL-4, IL-10, IL-1, IL-6 und GM-CSF) induziert werden [Dinarello 1996; Arend et al. 1998].

Interaktion von IL-1ra mit dem IL-1 Rezeptor

Um die Unterschiede der Interaktion von IL-1 β bzw. IL-1ra mit dem IL-1 Rezeptor genauer zu analysieren und die Ursache der antagonistischen Wirkung von IL-1ra zu klären, wurden Kristallstrukturanalysen der Ligand-Rezeptor-Komplexe durchgeführt. Wie zu erwarten, besitzen IL-1 β und IL-1ra Gemeinsamkeiten in Struktur und Faltungsmuster. IL-1ra weist dabei eine 26%ige Aminosäure-Homologie zu IL-1 β auf [Eisenberg et al. 1990]. Er

bindet mit einer etwas höheren Affinität als IL-1 β an den IL-1RI [Sims 2002].

Der extrazelluläre Teil des IL-1RI setzt sich aus drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen zusammen und verfügt über zwei Kontaktstellen für die Bindung der Liganden. Die eine liegt in der Furche zwischen Domäne 1 und 2, die andere auf Domäne 3. Im Gegensatz zu IL-1 β , fehlt dem IL-1ra die Bindungsstelle für die Interaktion mit der dritten Domäne, welche für die Signalgenerierung notwendig wäre. Eine Blockade des IL-1RI mit IL-1ra verhindert die Komplexbildung des IL-1RI mit dem IL-1RAcP und damit die Auslösung der Signalübermittlung in der Zelle [Schreuder et al. 1997; Vigers et al. 1997].

Anwendungen von IL-1ra

Die rekombinante Form des IL-1ra, ein im Gegensatz zum natürlich sezernierten IL-1ra nichtglykosyliertes 17kD Protein, wurde bereits zur Behandlung von Patienten mit mäßig bis schwerer rheumatoider Arthritis eingesetzt und wurde von den Patienten gut toleriert [Eisenberg et al. 1990; Carter et al. 1990; Fleischmann et al. 2003; Hallegua, Weisman 2002].

Es zeigte auch Erfolge in der Behandlung des steroidrefraktären Still-Syndroms des Erwachsenenalters [Rudinskaya, Trock 2003; Fitzgerald et al. 2005].

Nach Induktion einer Glomerulonephritis bei Ratten konnte durch die Behandlung mit IL-1ra der Krankheitsverlauf unterdrückt werden. Zudem waren bei verzögerter Behandlung die fortschreitenden Veränderungen der chronischen Erkrankung reversibel [Tang et al. 1994; Lan et al. 1995; Karkar et al. 1995; Tesch et al. 1997].

Auch bei obstruktiver Nephropathie konnte im Tierversuch die tubulointerstitielle Entzündungsreaktion durch eine Genterapie mit IL-1ra signifikant reduziert werden [Yamagishi et al. 2001].

Für die Pathophysiologie des IR-Schadens ist die Entzündungsreaktion von großer Bedeutung [Bonventre, Zuk 2004]. Das Zytokin Interleukin-1 spielt

eine wichtige Rolle im inflammatorischen Geschehen und könnte Ansatzpunkt einer neuen Therapie sein. IL-1ra könnte die Entzündung vermindern und so den IR-Schaden reduzieren.

1.4.2 Adhäsionsmoleküle und Leukozytenmigration

Die Entzündungsreaktion als Antwort auf den IR-Schaden zieht eine Aktivierung des Endothels mit verstärkter Leukozytenadhäsion und folgender Gewebeeinfiltration nach sich. Für die Interaktion zwischen zirkulierenden Leukozyten und dem Gefäßendothel spielen **Adhäsionsmoleküle**, transmembrane Proteine an der Oberfläche von Leukozyten und Endothelzellen, eine Schlüsselrolle.

Es gibt drei Gruppen von Adhäsionsmolekülen: Selektine, Integrine und die Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie, zu der auch das in der vorliegenden Studie untersuchte Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1, CD54) gehört.

Die **Migration der Leukozyten** aus der Blutbahn ins Gewebe erfolgt in einer Kaskade aus bestimmten Schritten (**Abb. 8**): Zu Beginn nähern sich die zirkulierenden Leukozyten der Gefäßwand (*margination*). An dieser rollen sie langsam entlang (*rolling*). Es entsteht zunächst nur ein lockerer Kontakt mit dem Gefäßendothel (*tethering*). Dieser wird vornehmlich durch Zelladhäsionsmoleküle der Selektinfamilie vermittelt.

Die Leukozyten können durch Triggersubstanzen wie IL-8, welches von Endothelzellen in Antwort auf IL-1 oder TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) produziert wird, oder durch PAF (plättchenaktivierender Faktor) aktiviert werden (*triggering*). Daraus resultiert eine vermehrte Expression von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche [Schürmann 1997]. Diese Membranproteine vermitteln zusammen mit Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie die eigentliche, stabile Zelladhäsion (*arrest*) [Bevilacqua et al. 1994]. β_2 -Integrine wie LFA-1 (Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1, CD11a/CD18) oder Mac-1 (CD11b/CD18) erkennen an der Oberfläche der Endothelzellen u. a. das Adhäsionsmolekül ICAM-1 und leiten durch ihre Bindung die Diapedese ein. Die transendotheliale Passage

der Leukozyten wird durch das Adhäsionsmolekül PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) vermittelt [Collard, Gelman 2001; van de Stolpe, van der Saag 1996]. Haben die Leukozyten das Gewebe infiltriert, werden reaktive Sauerstoffintermediate, Proteasen und Elastasen vermehrt ausgeschüttet und dadurch Endothelpermeabilität, Ödem und parenchymaler Zelltod verstärkt [Collard, Gelman 2001].

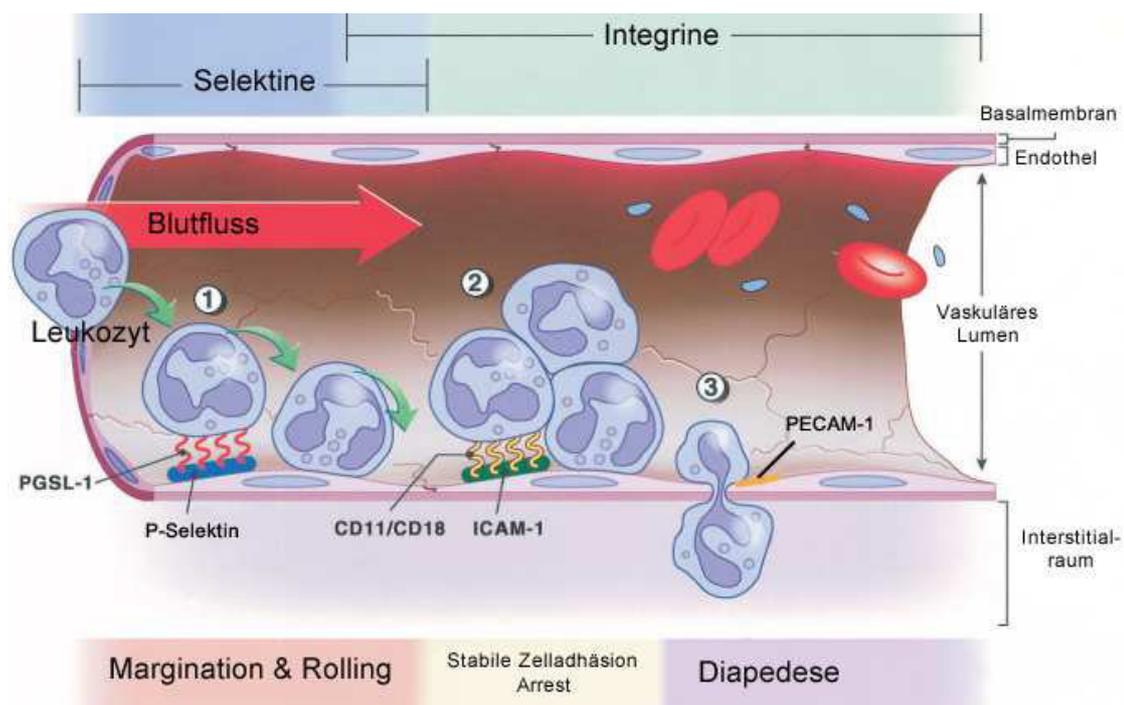


Abb. 8 Leukozyten-Endothel-Adhäsion und -Migration nach Ischämie und Reperfusion. Aktivierte Leukozyten interagieren mit dem Endothel in einer bestimmten Abfolge. Zunächst wird durch Ischämie und Reperfusion ein Anstieg der P-Selektin-Expression des Endothels induziert. Dieses interagiert mit dem Leukozyten-Rezeptor P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PGSL-1) (Schritt 1: Margination und Rolling).

Es folgt die Interaktion zwischen den β 2-Integrinen der Leukozyten, CD11a/18 und CD11b/18, mit dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (Schritt 2: Stabile Zelladhäsion, Arrest).

Die Migration der Leukozyten in den Interstitialraum wird durch das Adhäsionsmolekül PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) vermittelt (Schritt 3: Diapedese) [Modifiziert nach Collard, Gelman 2001].

1.4.3 MCP-1

Endotheliale Dysfunktion und die Aktivierung von Leukozyten und gewebeständigen Makrophagen tragen mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, wie IL-1, IL-6, TNF- α , IL-8 und MCP-1 zu einem aktiven Entzündungsprozess bei [Okusa 2002].

MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, CCL2) besitzt eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten, NK-Zellen sowie T-Zellen. Es ist v. a. durch die Regulierung der Infiltration und Aktivierung der Makrophagen von Bedeutung für den tubulointerstitiellen Schaden der ischämischen Niere [Furuichi et al. 2003a; Frangogiannis 2007].

2 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, ob durch Verabreichung des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) der Ischämie- und Reperfusionsschaden der Niere beeinflusst werden kann:

- 1) Kann durch Behandlung mit IL-1ra der Gewebeschaden nach einer Ischämie/Reperfusion der Niere vermindert werden?
- 2) Hat IL-1ra einen Einfluss auf die Leukozyteninfiltration und auf die m-RNA-Expression des Chemokins MCP-1 und des Adhäsionsmoleküls ICAM-1?
- 3) Welche Auswirkungen hat die Behandlung mit IL-1ra auf die Anzahl apoptotischer Zellen und auf die m-RNA-Expression apoptose-assoziiierter Proteine im Nierengewebe nach Ischämie/Reperfusion?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere, Operation und Behandlung

In die Studie wurden 32 männliche Lewis-Ratten einbezogen. Zur Auslösung der Ischämie und Reperfusion der linken Niere wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert, und das Abdomen per Längslaparatomie in der abdominalen Mittellinie eröffnet. Es wurde ein freier Zugang zur linken Niere geschaffen, die Nierengefäße und der Ureter wurden frei präpariert. Daraufhin wurde die linke Nierenarterie mit einer atraumatischen Gefäßklemme für 45 Minuten abgeklemmt. Währenddessen wurde eine rechtsseitige Nephrektomie durchgeführt. Nach der Ischämiezeit von 45 Minuten wurde die Gefäßklemme entfernt und das Abdomen wieder geschlossen. Um die Körpertemperatur der Tiere während der Operationszeit bei 37 °C zu halten, wurden die Ratten auf einer Wärmeplatte gelagert.

Die Tiere wurden zwei Behandlungsgruppen mit jeweils zwei von der Dauer der Reperfusion abhängigen Untergruppen zugeordnet:

- | | | |
|----|-------------------|---|
| A) | Gruppe IL-1ra 24h | Behandlung mit IL-1ra (60 mg/kg intraperitoneal zum Zeitpunkt 0), Reperfusionszeit von 24 Stunden |
| | Gruppe IL-1ra 5d | Behandlung mit IL-1ra (60 mg/kg intraperitoneal zum Zeitpunkt 0 und am Tag 3), Reperfusionszeit von 5 Tagen |
| B) | Gruppe VEH 24h | Behandlung mit dem Vehikel (VEH), Reperfusionszeit von 24 Stunden |
| | Gruppe VEH 5d | Behandlung mit dem Vehikel (VEH), Reperfusionszeit von 5 Tagen |

(Anzahl der Tiere pro Gruppe: N = 8)

Die Behandlung mit IL-1ra zum Zeitpunkt 0 erfolgte vor dem Abklemmen der Nierenarterie.

Nach einer Reperfusionzeit von 24 Stunden bzw. 5 Tagen wurde das Experiment beendet und die verbleibende Niere für die folgenden Untersuchungen entnommen.

Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten und erhielten eine Standarddiät sowie Wasser ad libitum. Die tierexperimentelle Studie wurde durch die entsprechende Behörde (Regierung von Oberbayern) genehmigt und die NIH Richtlinien für die Behandlung und die Verwendung von Labortieren eingehalten.

3.2 Histologische Untersuchung

Der durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufene Gewebeschaden wurde mittels Lichtmikroskopie beurteilt. Dazu wurde das Nierengewebe zunächst in 4%igem Formaldehyd fixiert und dann in Paraffin eingebettet. Es wurden 2 µm dicke Schnittpräparate angefertigt und diese mit Hämatoxylin und Eosin (HE) und mit Hilfe der PAS-Reaktion (Perjodsäure-Schiff-Reaktion) gefärbt.

HE-Färbung

Für die HE-Übersichtsfärbung wurden die Gewebeschnitte in Xylol entparaffiniert, in absteigender Alkoholreihe (100%, 96% und 70% Ethanol jeweils 2 min) rehydriert und mit Aqua dest. gewaschen. Daraufhin wurden sie 5 Minuten in Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt) gefärbt und 10 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gebläut. Nach erneutem Spülen in Aqua dest. erfolgte eine ca. 2-minütige Färbung mit 1%igem Eosin (CI 45380; Roth, Karlsruhe). Nach Auswaschen in destilliertem Wasser, wurden die Präparate in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Xylol geklärt und anschließend mit Eukitt (Roth, Karlsruhe) eingedeckt. Die Zellkerne stellen sich durch Färbung mit dem basischen Hämalaun blauviolett dar, das Zytoplasma erscheint durch den sauren Farbstoff Eosin rosa.

PAS-Reaktion

Mit der histochemischen PAS-Reaktion lassen sich Kohlehydratanteile der Gewebestruktur darstellen. Die Reaktion beruht darauf, dass die Hydroxylgruppen der Zucker durch die Perjodsäure (HIO_4) zu Aldehydgruppen oxidiert werden. Diese lassen sich durch Schiff'sches Reagenz (fuchsin-schweflige Säure) rot anfärben.

Die Präparate wurden wie oben entparaffiniert, in Ethanol hydriert und in Aqua dest. gewaschen. Das Gewebe wurde für 10 Minuten in 0,5%iger Perjodsäure (Roth, Karlsruhe) oxidiert und danach 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte 30 Minuten mit Schiff'schem Reagenz (Merck, Darmstadt) inkubiert und erneut gespült. Es wurde 2 Minuten mit Mayers Hämalaun gegengefärbt und unter Leitungswasser gebläut. Nach Waschen mit Aqua dest. wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe entwässert, in Xylol geklärt und zuletzt mit Eukitt (Roth, Karlsruhe) eingedeckt.

Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte verblindet durch zwei unabhängige Untersucher. Der Schweregrad der Tubulusschädigung wurde auf einer Skala von 1 bis 3 beurteilt (**Tabelle 3**). Dabei wurde der prozentuelle Anteil der Tubuli der Rinde ermittelt, die histologische Veränderungen der akuten tubulären Nekrose wie Zellnekrosen, Verlust des Bürstensaums der proximalen Tubuluszellen oder Zylinderbildung zeigten.

Tabelle 3. Einstufungsskala zur Beurteilung des tubulären Schadens im Bereich der Rinde

Grad 1	Milde tubuläre Nekrose < 25 % des histologischen Schnitts betroffen
Grad 2	Mäßige tubuläre Nekrose 25-50 % des histologischen Schnitts betroffen
Grad 3	Schwere tubuläre Nekrose > 50 % des histologischen Schnitts betroffen

3.3 Immunhistologische Untersuchungen

3.3.1 APAAP-Methode

Prinzip

Mit Hilfe der Immunhistologie lassen sich zelluläre Antigene selektiv nachweisen. In der hier vorliegenden Arbeit soll die Infiltration des Nierengewebes durch Makrophagen und T-Lymphozyten mit der APAAP-Methode dargestellt werden. Die **Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode** ermöglicht einen indirekten Nachweis der Bindung eines Primärantikörpers. In dieser Färbemethode werden insgesamt drei Antikörper verwendet (**Abb. 9**).

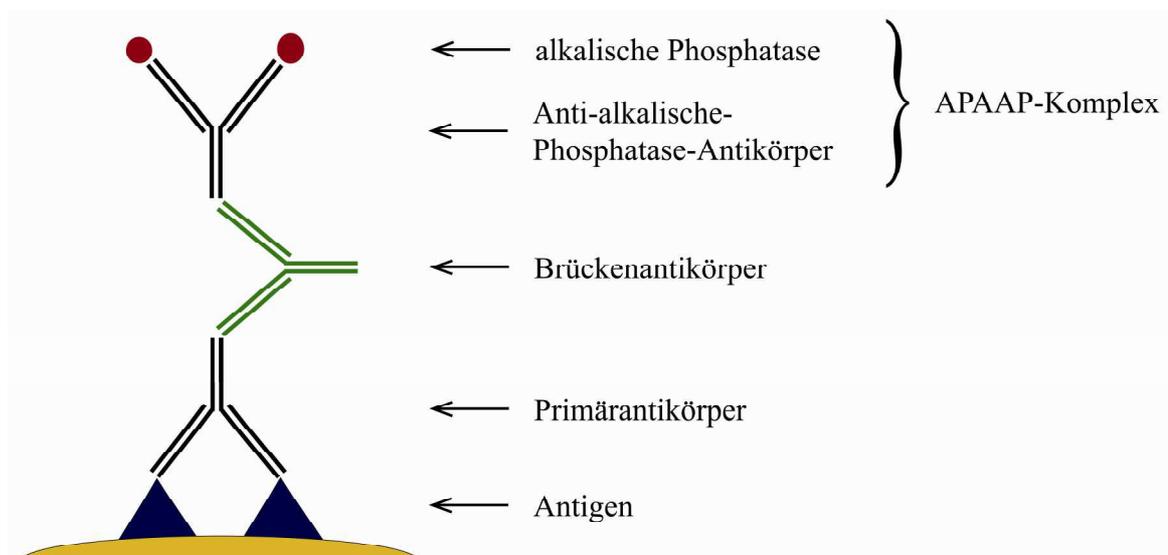


Abb. 9 Darstellung der Antikörperbindung in der APAAP-Methode

Zunächst bindet der Primärantikörper an das im Gewebe vorliegende Antigen. Der Sekundär- bzw. Brückenantikörper ist gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet und verbindet diesen mit dem Fc-Fragment des dritten Antikörpers. Der dritte Antikörper ist ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen alkalische Phosphatase und bildet zusammen mit diesem Enzym den APAAP-Komplex.

Das Ergebnis wird über eine chromogene Reaktion mit der alkalischen Phosphatase sichtbar gemacht: Durch die Entwicklung mit Naphtholsalz und Fast Red als Substrat der alkalischen Phosphatase entsteht ein leuchtend rotes Reaktionsprodukt [Cordell et al. 1984].

Durchführung

Das Nierengewebe wurde nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Mit dem Kryotom (Leica CM 3050 Cryostat, Leica, Wetzlar) wurden bei -20 °C 3 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Objektträger platziert.

Für die immunhistologische Färbung wurden die Schnitte nach dem Auftauen 10 Minuten in 4 °C kaltem Aceton fixiert und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

Nach Waschen mit TBS-Puffer (*tris buffer saline*) wurden die Schnitte mit primären monoklonalen Maus-Antikörpern (Serotec Labor-Service GmbH, Wiesbaden, Deutschland) gegen Monozyten/Makrophagen (CD 68, Klon ED1; Verdünnung 1:200) bzw. gegen T-Lymphozyten (CD5+, Klon OX19; Verdünnung 1:50) inkubiert.

Nach erneutem Spülen mit TBS wurden die Präparate mit den Kaninchen-anti-Maus-Sekundärantikörpern (DAKO A/S, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:100) inkubiert.

Einem weiteren Waschschrift folgte die Inkubation mit dem APAAP-Komplex (DAKO A/S, Hamburg, Verdünnung 1:200).

Jeder der drei Inkubationsschritte erfolgte 30 Minuten lang bei Raumtemperatur.

Schließlich wurde die Antikörperbindung durch Entwicklung des Farbsignals mittels Fast Red (DAKO A/S, Hamburg, Deutschland) sichtbar gemacht. Die Proben wurden mit Mayers Hämalaun gegengefärbt und unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die fertig gefärbten Präparate wurden mit vorgewärmter Kaisers Glycingelatine eingedeckt.

Negativkontrollen wurden statt mit dem Primärantikörper mit TBS behandelt.

Positiv gefärbte Zellen wurden gezählt und das Ergebnis als Zellen pro Gesichtsfeld (cells/fv) dargestellt. Es wurden mindestens 20 Gesichtsfelder pro Schnittpräparat bei einer 400fachen Vergrößerung ausgezählt.

3.3.2 TUNEL-Assay

Prinzip

Durch die 1992 erstmals durch Gavrieli et al. beschriebene TUNEL-Methode (**T**erminal **d**eoxynucleotidyl **t**ransferase-mediated **d**UTP **n**ick **e**nd-**l**abeling) ist es möglich apoptotische Zellen nachzuweisen. Das Enzym **T**erminale **D**eoxynukleotidyl**t**ransferase (TdT) knüpft das Nukleotid dUTP (Desoxyuridintriphosphat) an die freien 3'-OH-Enden der für die Apoptose charakteristischen DNA-Strangbrüche. Das dUTP ist mit einer Substanz, in diesem Falle mit Digoxigenin, markiert. Mit Hilfe von Anti-Digoxigenin-Antikörper-Fab-Fragmenten, die mit alkalischer Phosphatase gekoppelt sind, kann die DNA-Fragmentierung somit in einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden.

Durchführung

Die TUNEL Untersuchungen wurden an 3 µm dicken Gefrierschnitten durchgeführt, die bei Raumtemperatur in 4%igem Paraformaldehyd für 20 Minuten fixiert worden waren. Die Schnitte wurden 30 Minuten mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen. Nach zwei weiteren Waschschrritten wurden die Präparate bei 4 °C 2 Minuten mit 0,1%igem Triton und mit 0,1%iger Natriumcitratlösung als Permeabilisierungslösung versetzt. Dies ist ein notwendiger Vorgang, um die Membranen für die im Folgenden angewendeten Reagenzien durchlässig zu machen. So können diese die gewünschten Moleküle im Zellkern erreichen, und die TUNEL-Reaktion kann stattfinden.

Anschließend wurden die Schnitte wiederum mit PBS gespült und mit der TUNEL-Reaktionslösung, welche die terminale Deoxynukleotidyltransferase

(Boehringer Mannheim, Deutschland) enthält, für 90 Minuten bei 37 °C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Präparate wurden mit sog. Stop/Wash Puffer (30 mM Na-citrat und 300 mM NaCl in destilliertem Wasser) gewaschen und 15 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Stop/Wash Puffer inkubiert.

Nach einem erneutem Spülvorgang mit PBS wurde für 90 Minuten mit einem Kaninchen-anti-Digoxigenin Antikörper (DAKO A/S, Hamburg, Deutschland; Verdünnung 1:50) bei 37 °C inkubiert.

Die Antikörperbindung wurde durch 5-minütige Inkubation mit chromogener Fast Red Lösung sichtbar gemacht, wobei sich die Zellkerne der apoptotischen Zellen rot darstellten.

Die Positivkontrollen wurden 10 Minuten in der feuchten Kammer mit DNase I (Boehringer, Mannheim) behandelt und dann dem oben beschriebenen Prozess unterzogen. Bei den Negativkontrollen wurde statt der TUNEL-Lösung nur PBS verwendet.

Zusätzlich wurden die Schnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Nach Spülen mit warmem Wasser wurden die Proben mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

Die positiven Tubulusepithelzellen wurden bei einer 400fachen Vergrößerung gezählt und auf die Zahl der Gesichtsfelder pro Schnitt bezogen. Diese Beurteilung erfolgte durch zwei unabhängige Untersucher in verblindeter Weise.

3.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Mittels semiquantitativer RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) wurde die Expression der m-RNA von ICAM-1, MCP-1, Bax und Bcl-2 im renalen Gewebe bestimmt. Diese Methode koppelt reverse Transkription und PCR.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, *in vitro* spezifische Nukleinsäure-Sequenzen in exponentieller Weise zu verviel-

fältigen, so dass sie in ausreichender Menge für den Nachweis und für weitere analytische Methoden zur Verfügung stehen [Mullis et al. 1986]. Da mittels PCR nur DNA amplifiziert werden kann, wird bei der RT-PCR zuvor eine reverse Transkriptase eingesetzt, die RNA in cDNA (komplementäre DNA) umschreibt. Diese kann anschließend in der PCR als Matrize verwendet werden, um spezifische Sequenzen der cDNA zu amplifizieren.

3.4.1 Isolierung und Analyse der RNA

RNA-Isolierung aus dem Nierengewebe

Die gesamte RNA wurde aus den Geweben mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (QIAGEN, Hilden, Deutschland) entsprechend den Anweisungen des Herstellers (QIAGEN: RNeasy Mini Handbook) isoliert.

Um Kontaminationen durch RNase zu vermeiden, wurde bei der Durchführung auf das Tragen von Handschuhen und ein Arbeiten mit RNase-freien Gebrauchsmaterialien geachtet.

Das Nierengewebe wurde in 600 µl des Guanidiniisothiocyanat-haltigen RLT-Puffers lysiert und homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Optimierung der Bindungsbedingungen mit 600 µl 70%igem Ethanol gemischt und die Lösung auf *RNeasy spin* Säulen aufgetragen.

Die RNA-Isolierung erfolgt durch Adsorption der RNA an die Silicagel-Membran der *RNeasy* Säule. Dabei können nur RNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als 200 bp binden. Die Säulen wurden in 2 ml Sammelröhrchen gegeben und für 15 Sekunden bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Zur Reinigung wurden die Säulen mit 700 µl RW1-Puffer versetzt und wie oben zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl RPE-Puffer bei einer Zentrifugation von 15 Sekunden bzw. 2 Minuten. Um die Membran der *RNeasy* Säule vollständig zu trocknen, wurde noch einmal 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit leer zentrifugiert.

Die Eluierung der RNA aus dem Silicagel erfolgte in einem neuen 1,5 ml Sammelgefäß mit 30-50 µl RNase-freiem Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 rpm.

Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Nach einer Verdünnung von 1:50 in 10 mM Tris Puffer (pH 7,0) wurde die Konzentration der RNA spektralphotometrisch ermittelt. Dabei wurde der Absorptionswert (sog. optische Dichte, OD) anhand des Absorptionsmaximums von RNA bei 260 nm gemessen. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entspricht 44 µg/ml RNA. Für die Ermittlung der RNA-Konzentration ergibt sich folgende Formel:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 44 \text{ }\mu\text{g/ml}$$

Für die folgende reverse Transkription wurde aus der Konzentration das Volumen der Lösung berechnet, welches 1 µg RNA enthält, und dieses mit DEPC-Wasser zu einem Volumen von 10 µl aufgefüllt.

3.4.2 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription wurde die RNA in cDNA umgeschrieben.

Für die cDNA-Synthese mit Random Primern (Hexanukleotide) wurde je 1 µg der präparierten RNA und das First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma MIB Fermentas verwendet.

Dazu wurde die RNA zur Denaturierung mit 1 µl Random Primer in einem Endvolumen von 11 µl 5 Minuten bei 70 °C inkubiert. Um die Bindung der Primer an die RNA zu ermöglichen, wurden die Reaktionsgefäße kurz auf Eis gelagert.

Folgende Reagenzien wurden hinzu pipettiert:

4 µl 5× Reaktionspuffer

1 µl RiboLock™ Ribonuklease Inhibitor

2 µl 10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP)

Danach wurde der Ansatz 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Zur reversen Transkription wurden 2 µl M-MuLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase) hinzu gegeben und folgendes Inkubationsschema durchlaufen:

25 °C, 10 min

42 °C, 60 min

Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C gestoppt und die Proben auf Eis gekühlt.

3.4.3 PCR und elektrophoretische Auswertung

Prinzip

Die **PCR** ist ein Verfahren zur Amplifikation beliebiger Nukleinsäureabschnitte. Neben der Ausgangs-DNA werden für die PCR zwei geeignete **Primer**, ein *Forward*- und ein *Reverse*-Primer, benötigt. Primer sind kurze, einzelsträngige DNA-Moleküle (Oligonukleotide von ca. 17 – 30 bp), welche zu den Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz komplementär sind. Sie hybridisieren dort an je einem der beiden Stränge der in ihre zwei Einzelstränge aufgetrennten DNA und dienen als Starthilfe für die folgende DNA-Synthese. Diese erfolgt durch eine DNA-Polymerase, die in Gegenwart von Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der DNA-Matrize verlängert.

Die PCR läuft in **drei sich wiederholenden Grundschritten (Abb. 10)** ab:

- 1) Durch Erhitzen auf 94 °C werden zunächst die DNA-Doppelstränge in zwei Einzelstränge gespalten (***Denaturierung***).
- 2) Daraufhin lagern sich die im Überschuss dazu gegebenen Oligonukleotidprimer bei einer den Primern entsprechenden Hybridisierungstemperatur an die DNA-Einzelstränge an (***Annealing***).
- 3) Anschließend folgt das Verlängern der Primer durch Einbau der im Ansatz enthaltenen dNTPs durch die DNA-Polymerase am 3'-OH-Ende

des Primers, so dass wieder doppelsträngige DNA vorliegt (**Extension**).

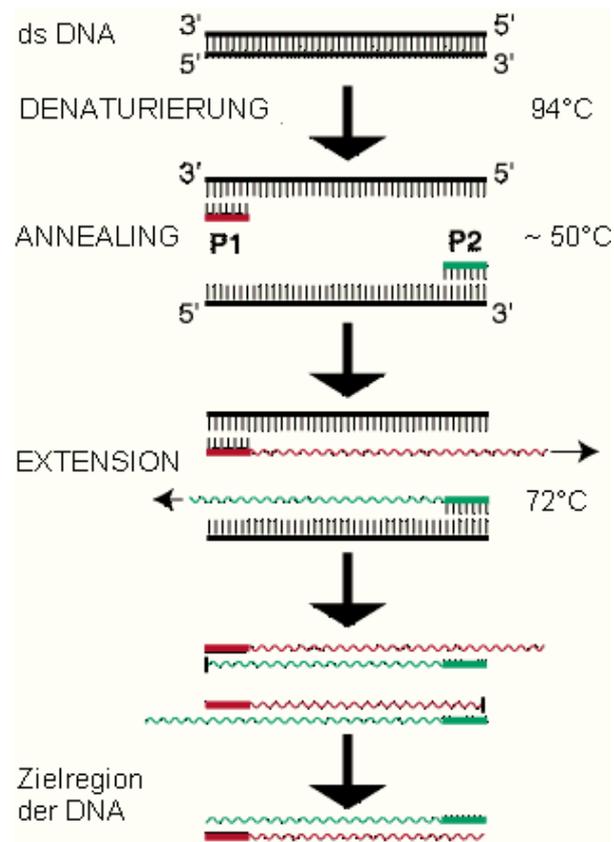


Abb. 10 Ablauf der PCR. [Modifiziert nach Meyer, Paulay 2005]

Für den dritten Schritt wird die ursprünglich aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte **Taq-Polymerase** mit ihrem Aktivitätsoptimum bei 72°C verwendet. Diese hitzestabile DNA-Polymerase übersteht die hohe Temperatur des Denaturierungsschritts, so dass sich die drei Grundschritte der PCR ohne erneute Zugabe von DNA-Polymerase zyklisch wiederholen lassen [Saiki et al. 1988]. Mehrfache Zyklen führen zu einer exponentiellen Anreicherung des PCR-Produkts im Reaktionsansatz. So ergibt z.B. eine PCR mit 20 Zyklen eine mehr als millionenfache (2^{20}) Amplifikation des relevanten DNA-Abschnitts [Erlich 1989].

Nach der PCR können die erhaltenen Produkte in der Agarosegel-Elektrophorese ihrer Größe entsprechend charakterisiert werden. Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen wandern die DNA-Moleküle nach Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Anode. Kleinere DNA-

Fragmente durchlaufen die Poren der Gelmatrix mit größerer Geschwindigkeit, so dass eine Trennung der Nukleinsäuren der Größe nach erfolgt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wird der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid eingesetzt, der in die DNA-Doppelhelix interkaliert und sie unter UV-Licht sichtbar macht. Durch die Bestimmung der optischen Dichte der Banden können die PCR-Produkte quantifiziert werden.

Für die semiquantitative Auswertung wird das zu untersuchende amplifizierte Gen in Relation zu einem aus derselben DNA-Probe heraus amplifiziertem Housekeeping-Gen wie GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) gesetzt. Als Housekeeping-Gene werden Gene bezeichnet, die für ubiquitäre Basisfunktionen in der Zelle kodieren und somit in allen Zellen und Geweben zu jeder Zeit im gleichen Ausmaß exprimiert werden. Durch die Relation werden Unterschiede der Expressionsergebnisse durch Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription, die gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping-Gen betreffen, reduziert und eine quantitative Vergleichbarkeit der einzelnen Proben zueinander gewährleistet [Pfaffl 2004].

3.4.4 Durchführung

Ein PCR-Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 50 µl enthält:

0,3 µl Taq DNA Polymerase (Fermentas MBI)

5 µl 10× Puffer

4 µl MgCl₂ (25 mM)

1 µl dNTP (10 mM)

je 1 µl der beiden Primer

36,7 µl H₂O

Dazu wurde 1 µl der vorher umgeschriebenen cDNA hinzugefügt.

Die Sequenzen der verwendeten Primer und die entsprechenden Annealing-Temperaturen für ICAM-1 [Jung et al. 2001], MCP-1 [Sung et al. 2002], Bax [Han et al. 1996], Bcl-2 [Sato et al. 1994] und GAPDH sind in **Tabelle 4** dargestellt.

Tabelle 4. Sequenzen der verwendeten Primer und Annealing-Temperaturen

	Primerpaare	Annealing-Temperatur (°C)	Produktlänge (bp)
MCP-1	Sense: 5'-ATC ACC AGC AGC AGG TGT CCC AAA GAA GCT-3' Antisense: 5'-AGA AGT GCT TGA GGT GGT TGT GGA AAA GAG-3'	60	258
ICAM-1	Sense: 5'-GGG TTG GAG ACT AAC TGG A-3' Antisense: 5'-GCA CCG CAG GAT GAG GTT CTT-3'	60	228
Bax	Sense: 5'-AAG AAG CTG AGC CAG TGT CT -3' Antisense: 5'-CAA AGA TGG TCA CTG TCT GC -3'	59	361
Bcl-2	Sense: 5'-GTA TGA TAA CCG GGA GAT CG-3' Antisense : 5'-AGC CAG GAG AAA TCA AAC AG -3'	58	612
GAPDH	Sense: 5'-GGT GAA GGT CGG AGT CAA CG-3' Antisense: 5'-CAA AGT TGT CAT GGA TGA CC-3'	56	498

Für die verschiedenen zu untersuchende Gene wurden unterschiedliche Zyklenzahlen festgelegt. Dabei wurde die Zyklenzahl so gewählt, dass die Intensität der Bande in der Elektrophorese noch ansteigend war, also die maximale Intensität der Bande (die Plateauphase der PCR) noch nicht erreicht war.

Die einzelnen PCR-Ansätze wurden in Reaktionsgefäße pipettiert und im Thermocycler (Perkin Elmer) mit folgendermaßen eingestellten Temperaturstufen inkubiert:

1. Initialer Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 min
2. A) ICAM-1 und MCP-1 (38 Zyklen):
 - Denaturierung 1 min bei 94 °C
 - Annealing 1 min bei 60 °C
 - Elongation 1 min bei 72 °CB) Bax (40 Zyklen) und Bcl-2 (35 Zyklen):
 - Denaturierung 30 s bei 94 °C
 - Annealing 45 s bei 59 °C (Bax) bzw. 58 °C (Bcl-2)
 - Elongation 1 min bei 72 °CC) GAPDH (27 Zyklen):
 - Denaturierung 1 min bei 94 °C
 - Annealing 1 min bei 56 °C
 - Elongation 1 min bei 72 °C
3. Zur Sicherstellung einer komplett verlaufenden Elongation wurde ein zusätzlich einmalig auf 10 Minuten verlängerter Elongationsschritt bei 72 °C durchgeführt.

Die PCR Produkte wurden auf 2,5%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, durch die Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Für die semiquantitative Analyse wurden die spezifischen Banden mittels computergestützter Densitometrie ausgewertet (Gel-Pro Analyser 3.1 Software). Die ermittelte Dichte der spezifischen Bande IOD (Integrierte Optische Dichte) wurde durch die Dichte der Bande des Housekeeping-Gens (GAPDH) dividiert; die Ergebnisse wurden somit als Quotient angegeben.

3.5 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM; *standard error of mean*) dargestellt. Zur Errechnung der statistischen Signifikanz wurde der Chi-Quadrat- oder der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Dabei wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als signifikant betrachtet. Die Analyse der Daten erfolgte mit dem SPSS Statistik Software Paket (v. 13.0, SPSS GmbH, München). Statistisch signifikante Unterschiede wurden in den Abbildungen durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Morphologische Beurteilung des Gewebeschadens

Um den Einfluss von IL-1ra auf die Gewebeschädigung durch Ischämie und Reperfusion zu ermitteln, wurden die Schnittpräparate der verschiedenen Gruppen lichtmikroskopisch beurteilt:

Das 24 Stunden nach der Induktion der Ischämie entnommene Gewebe wies bei den mit IL-1ra behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant verminderte tubuläre Nekrose auf ($p < 0,05$; **Abb. 11a und 11b**). Nach 5 Tagen Reperfusion war der Gewebeschaden wiederum bei den mit IL-1ra behandelten Tieren signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe ($p < 0,05$; **Abb. 11a und 11b**).

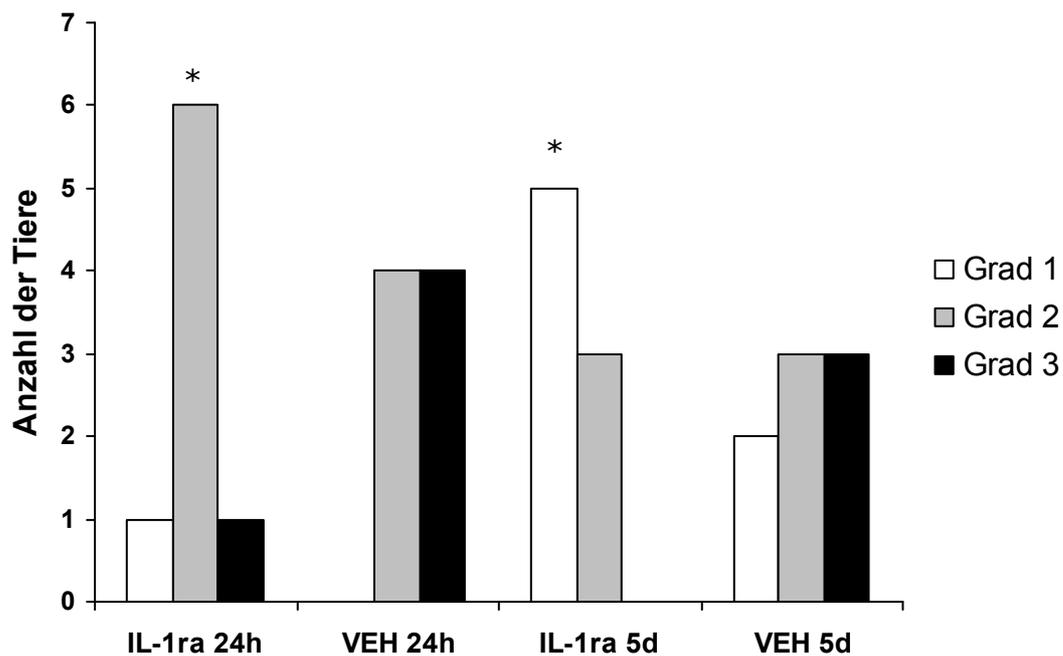


Abb. 11a Darstellung des renalen Gewebeschadens der mit IL-1ra behandelten Tiere im Vergleich zu den nur mit Vehikel behandelten Tieren 24 Stunden bzw. 5 Tage nach Auslösen der Ischämie. Es erfolgte eine Einstufung der histologischen Schnitte (n = 8 pro Gruppe) nach dem Grad der tubulären Nekrose (vgl. Tabelle 3, S.34). Sowohl 24 Stunden wie auch 5 Tage nach Ischämie zeigte sich bei den IL-1ra-Gruppen eine im Vergleich deutlich geringere Tubulusnekrose. (*p<0,05 für Behandlung mit IL-1ra versus VEH)

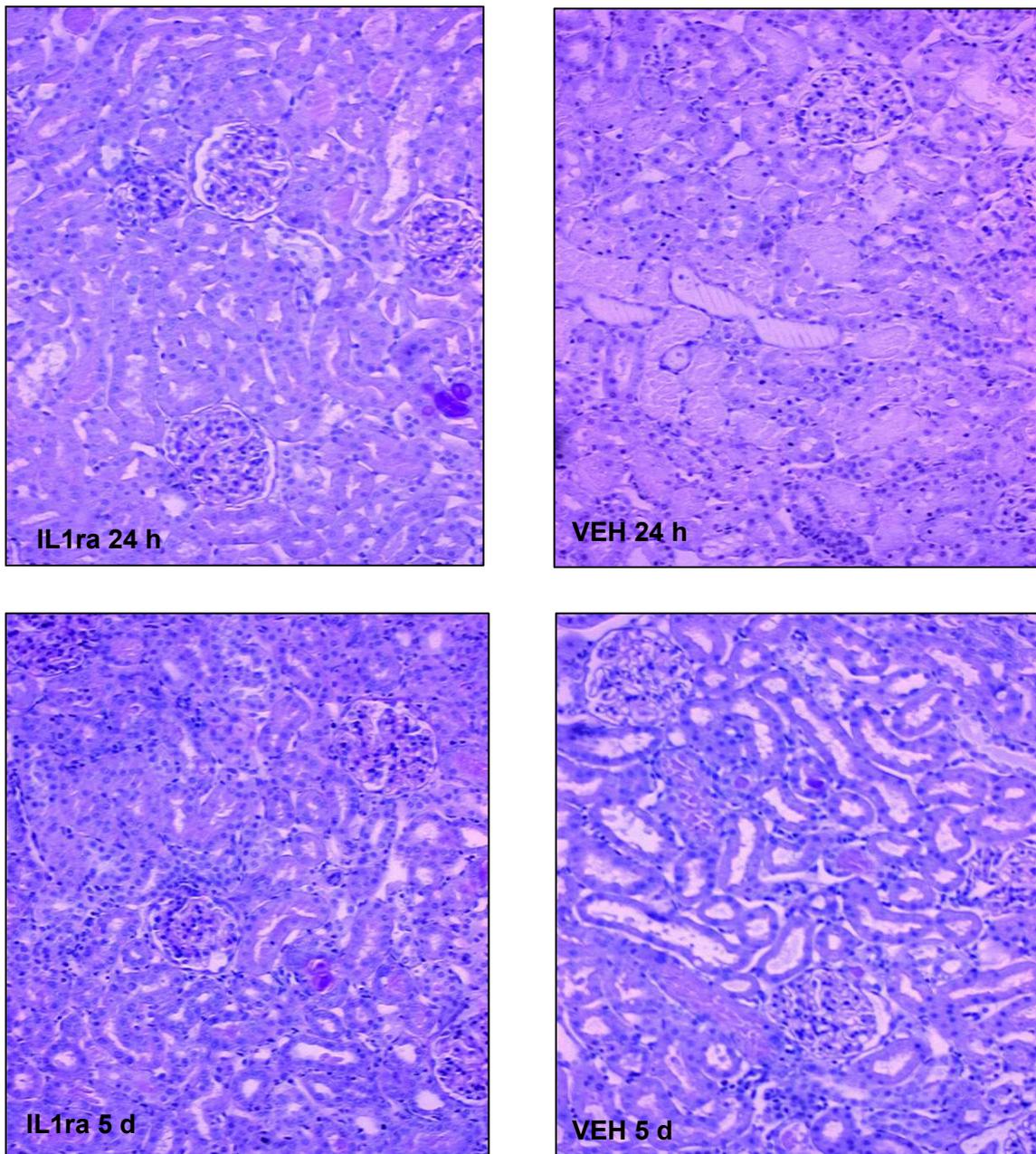


Abb. 11b Gegenüberstellung repräsentativer histologischer Schnittbilder, die den morphologischen Gewebeschaden nach einer Reperfusiondauer von 24 Stunden bzw. 5 Tagen verdeutlichen (PAS-Färbung, Vergrößerung 100×). Typische histologische Kennzeichen des Gewebeschadens (Verlust des Bürstensaums, ein Abflachen des Tubulusepithels, die Ansammlung nekrotischen Debris in den Tubuluslumina, Tubulusdilatationen) waren bei den mit Vehikel behandelten Kontrollgruppen ausgeprägter.

4.2 Leukozyteninfiltration

Die Gewebeschnitte der unterschiedlichen Gruppen wurden immunhistochemisch mit der APAAP-Methode gefärbt, um das Ausmaß der Infiltration durch **Monozyten/Makrophagen** (ED1) und **T-Zellen** (OX19) zu ermitteln.

24 Stunden nach Ischämie zeigten sich im renalen Gewebe nur sehr wenige infiltrierende CD5+ Lymphozyten und CD68+ Makrophagen.

5 Tage nach Reperfusion ließ sich eine ausgeprägte Infiltration durch die Entzündungszellen feststellen. Dabei ergab sich bei den mit IL-1ra behandelten Ratten eine signifikant niedrigere Anzahl infiltrierender Lymphozyten als bei den mit dem Vehikel behandelten Kontrolltieren (**Abb. 12**; IL-1ra 5d: $3,87 \pm 1,19$ versus VEH 5d: $5,14 \pm 1,29$; $p < 0,05$). Ebenso war eine signifikante Verminderung der Anzahl der Makrophagen bei den mit IL-1ra behandelten Tieren zu beobachten (**Abb. 12**; IL-1ra 5d: $2,63 \pm 0,44$ versus VEH 5d: $4,79 \pm 1,16$; $p < 0,05$).

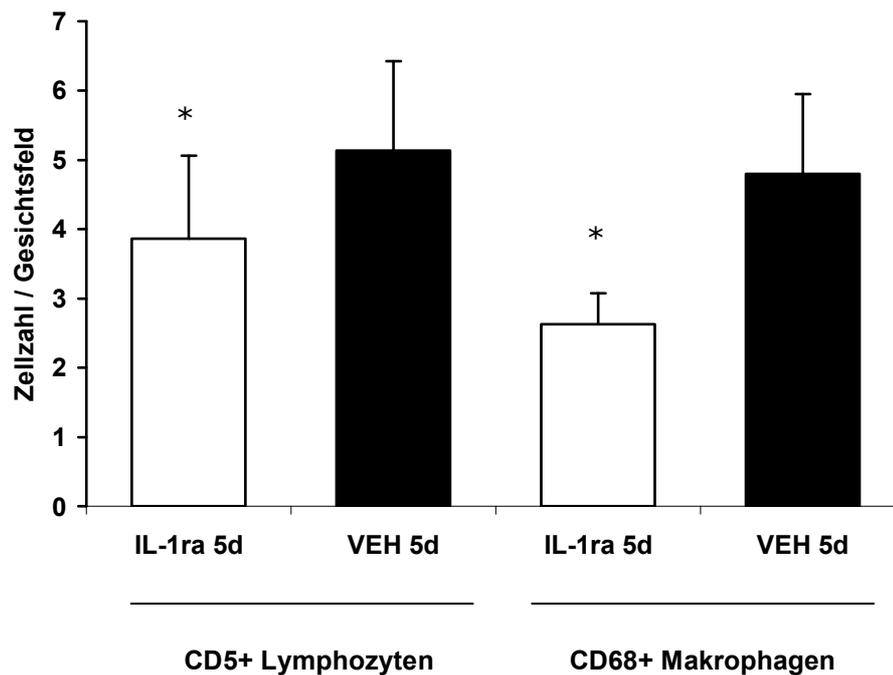


Abb. 12 Anzahl infiltrierender CD5-positiver Lymphozyten und CD68-positiver Makrophagen pro Gesichtsfeld 5 Tage nach Auslösen der Ischämie. Durch die Behandlung mit IL-1ra kam es zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl. (* $p < 0,05$ versus VEH 5d)

4.3 Apoptose der Tubuluszellen

Auswirkungen des IL-1ra auf apoptotische Vorgänge im durch Ischämie und Reperfusion geschädigten Nierengewebe wurden durch die TUNEL-Methode (***T**erminal deoxynucleotidyl transferase-mediated **d**UTP **n**ick **e**nd-**l**abeling*) untersucht. Dabei wurden die für die Apoptose charakteristischen DNA-Strangbrüche in den Zellkernen markiert.

Die Rate der **apoptotischen tubulären Zellen** im Nierengewebe der Kontrolltiere erwies sich 24 Stunden nach Ischämie im Vergleich zu den mit IL-1ra behandelten Tieren mehr als doppelt so hoch (IL-1ra 24h: $2,47 \pm 0,33$ versus VEH 24h: $5,82 \pm 1,42$; $p < 0,05$).

Jedoch nach 5 Tagen Reperfusion war zwischen den beiden Gruppen der Unterschied in der Anzahl der apoptotischen tubulären Zellen nicht mehr signifikant (IL-1ra 5d: $1,75 \pm 0,17$ versus VEH 5d: $2,02 \pm 0,61$; $p = 0,753$).

(Abb. 13a und 13b)

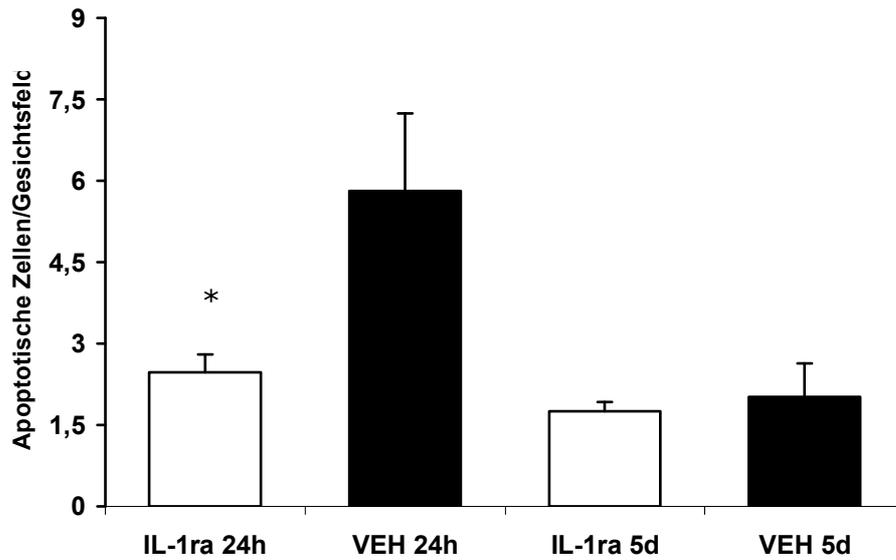


Abb. 13a Nachweis apoptotischer Zellen durch den TUNEL-Assay. Dargestellt ist die Anzahl TUNEL-positiver apoptotischer Tubuluszellen pro Gesichtsfeld nach einer Reperfusionzeit von 24 Stunden bzw. 5 Tagen. Ein signifikanter Unterschied zwischen IL-1ra-behandelten und VEH-behandelten Tieren ist 24 Stunden nach Auslösen der Ischämie zu erkennen. (* $p < 0,05$ versus VEH 24h) Nach 5 Tagen haben sich die Werte beinahe angeglichen.

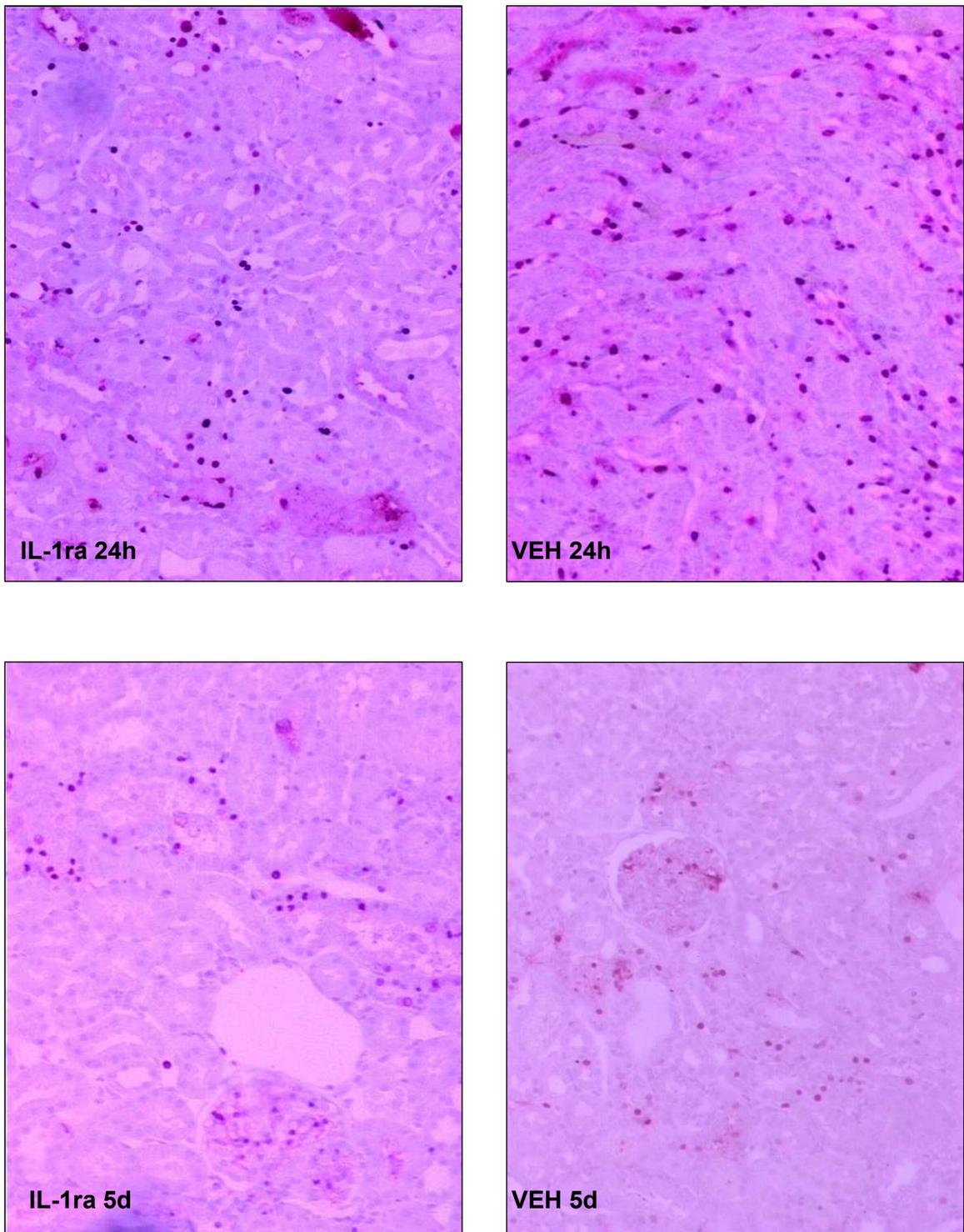


Abb. 13b Repräsentative histologische Schnittbilder des Nierengewebes nach TUNEL-Färbung 24 Stunden bzw. 5 Tage nach Induktion einer 45-minütigen Ischämie. Deutliche Unterschiede zwischen den IL1-ra-behandelten und den VEH-behandelten Ratten zeigten sich nur nach 24 Stunden.

4.4 mRNA-Expression von MCP-1, ICAM-1, Bcl-2 und Bax

Der Einfluss der Behandlung mit IL-1ra auf die mRNA-Expression von MCP-1, ICAM-1, Bcl-2 und Bax wurde durch semiquantitative RT-PCR untersucht.

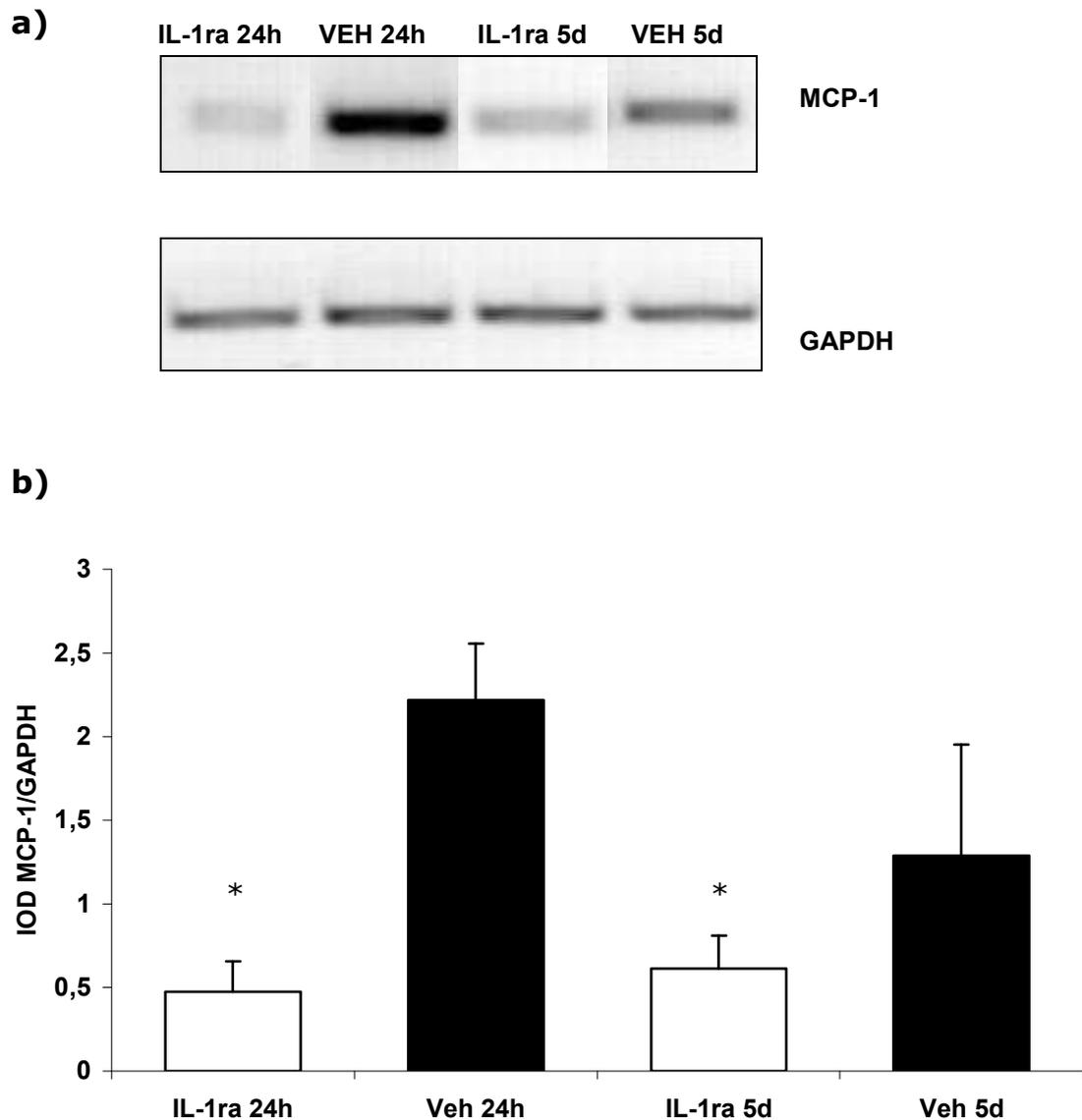
Die Amplifikationsprodukte der vier unterschiedlichen Gruppen (IL-1ra 24h, VEH 24h, IL-1ra 5d, VEH 5d) wurden für die Elektrophorese auf Agarosegel aufgetragen. Die Banden zeigten eine ihrer Moleküllänge entsprechende Laufstrecke, was anhand eines DNA-Längenstandards kontrolliert wurde (MCP-1: 258 bp; ICAM-1: 228 bp; Bax: 361 bp; Bcl-2: 612 bp; GAPDH: 498 bp).

Die Intensität der Banden wurde densitometrisch bestimmt. Um eine relative Quantifizierung der Proben zu erreichen, wurden die ermittelten Dichte-Werte in Verhältnis zur Dichte der jeweiligen GAPDH-Banden gesetzt.

4.4.1 MCP-1

Da MCP-1 eine starke chemotaktische Wirkung auf Monozyten und T-Zellen besitzt, wurde die mRNA-Expression dieses Chemokins untersucht.

Die Transkription der mRNA von MCP-1 war nach einer Reperfusionzeit von 24 Stunden in der mit IL-1ra behandelten Gruppe signifikant niedriger als in der Vehikel-Gruppe (IL-1ra 24h: $0,47 \pm 0,18$ versus VEH 24h: $2,22 \pm 0,34$; $p < 0,05$). Ebenso zeigte sich ein deutlicher Unterschied nach 5-tägiger Reperfusion (IL-1ra 5d: $0,61 \pm 0,20$ versus VEH 5d: $1,29 \pm 0,67$; $p < 0,05$). Das Ergebnis ist in **Abbildung 14** dargestellt.

**Abb. 14**

a) Repräsentatives Bild der MCP-1 RT-PCR-Analyse der IL1-ra- bzw. VEH-behandelten Tiere 24 Stunden bzw. 5 Tage nach Ischämie.

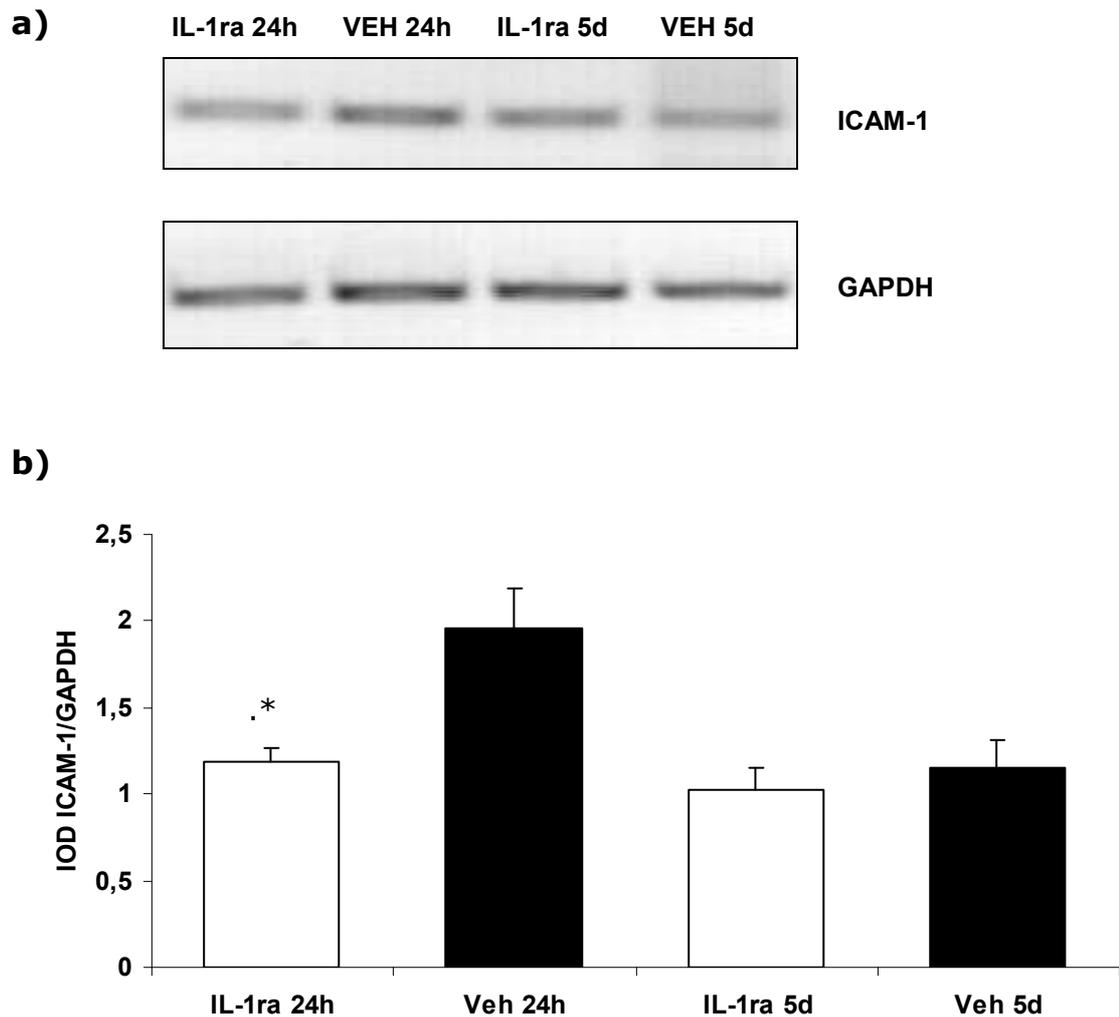
b) Diagramm: mRNA-Expression von MCP-1. Dargestellt sind die GAPDH-korrigierten Mittelwerte (Quotient aus optischer Dichte der Targetbanden und der GAPDH-Banden) \pm SEM der vier Gruppen (IL-1ra 24h, VEH 24h, IL-1ra 5d, VEH 5d). Nach Behandlung mit IL-1ra zeigt sich sowohl 24 Stunden als auch 5 Tage nach Ischämie eine reduzierte mRNA-Expression. (* $p < 0,05$ versus VEH)

4.4.2 ICAM-1

ICAM-1 gehört zu den Oberflächenadhäsionsmolekülen, die der Rekrutierung und Extravasation von Leukozyten dienen.

Die Behandlung mit IL-1ra ist bei einer Reperfusionzeit von 24 Stunden mit einer verringerten mRNA-Expression der ICAM-1 mRNA assoziiert (IL-1ra 24h: $1,2 \pm 0,03$ versus VEH 24h: $1,96 \pm 0,08$; $p < 0,05$).

Jedoch ließ sich in den Gruppen mit einer 5-tägigen Reperfusionzeit nur ein minimaler Unterschied beobachten (IL-1ra 5d: $1,02 \pm 0,04$ versus VEH 5d: $1,15 \pm 0,06$; $p = 0,564$). **Abbildung 15** veranschaulicht die Resultate.

**Abb. 15**

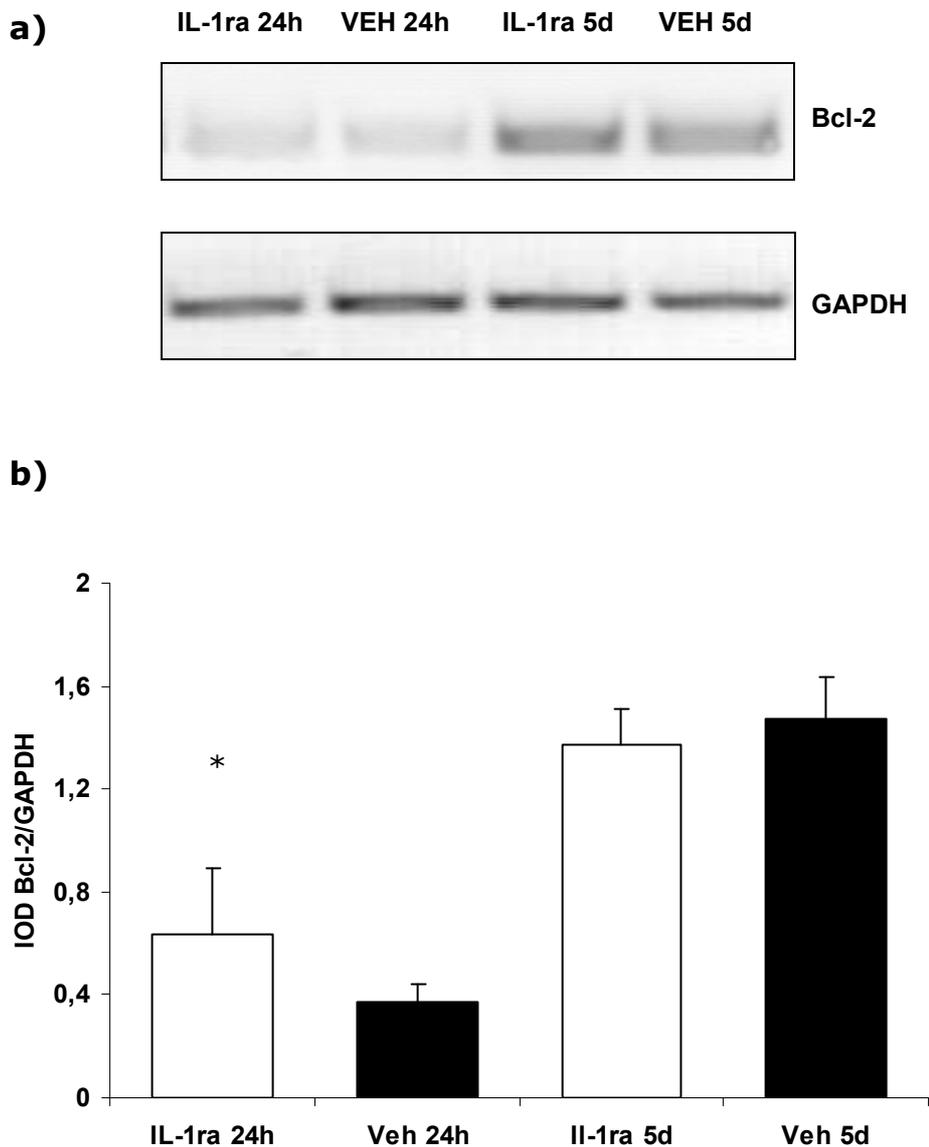
a) Repräsentatives Bild der ICAM-1 RT-PCR-Analyse der IL1-ra- bzw. VEH-behandelten Tiere 24 Stunden bzw. 5 Tage nach Ischämie.

b) Diagramm: mRNA-Expression von ICAM-1. Dargestellt sind die GAPDH-korrigierten Mittelwerte (Quotient aus optischer Dichte der Targetbanden und der GAPDH-Banden) \pm SEM der vier Gruppen (IL-1ra 24h, VEH 24h, IL-1ra 5d, VEH 5d). Nach Behandlung mit IL-1ra zeigt sich 24 Stunden nach Induktion der 45-minütigen Ischämie eine reduzierte mRNA-Expression. (* $p < 0,05$ versus VEH 24h)

4.4.3 Bcl-2 und Bax

Durch die Bestimmung der Expression der die Apoptose regulierenden Proteine Bcl-2 und Bax wurde untersucht, ob die Behandlung mit IL-1ra die Anfälligkeit der Nierenzellen für Apoptose vermindern kann.

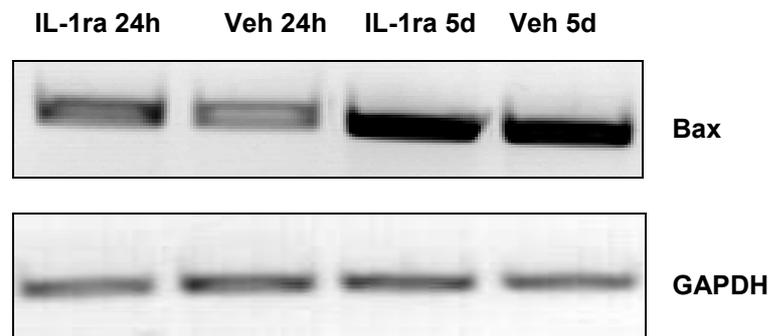
Die Ergebnisse der mRNA-Expression von Bcl-2 bzw. Bax sind in **Abb. 16** bzw. **Abb. 17** dargestellt.

**Abb. 16**

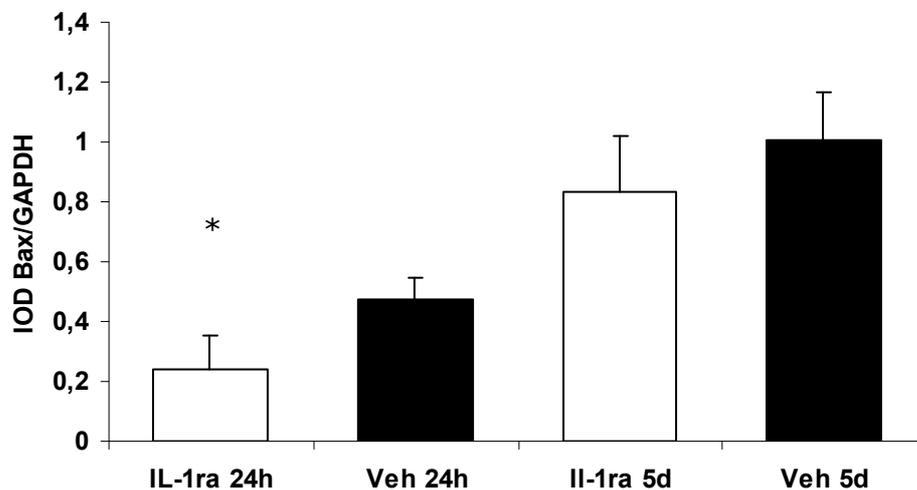
a) Repräsentatives Bild der Bcl-2 RT-PCR-Analyse der IL1-ra- bzw. VEH-behandelten Tiere 24 Stunden bzw. 5 Tage nach Ischämie.

b) Diagramm: mRNA-Expression von Bcl-2. Dargestellt sind die GAPDH-korrigierten Mittelwerte (Quotient aus optischer Dichte der Targetbanden und der GAPDH-Banden) ± SEM der vier Gruppen (IL-1ra 24h, VEH 24h, IL-1ra 5d, VEH 5d). Bei Verabreichung von IL-1ra zeigt sich 24 Stunden nach Ischämie eine im Vergleich zu der Vehikel-Gruppe gesteigerte mRNA-Expression des die Apoptose hemmenden Bcl-2. (IL-1ra 24h: $0,64 \pm 0,26$ versus VEH 24h: $0,37 \pm 0,07$; * $p < 0,05$) (IL-1ra 5d: $1,37 \pm 0,15$ versus VEH 5d: $1,47 \pm 0,16$)

a)



b)

**Abb. 17**

a) Repräsentatives Bild der Bax RT-PCR-Analyse der IL1-ra- bzw. VEH-behandelten Tiere 24 Stunden bzw. 5 Tage nach Ischämie.

b) Diagramm: mRNA-Expression von Bax. Dargestellt sind die GAPDH-korrigierten Mittelwerte (Quotient aus optischer Dichte der Targetbanden und der GAPDH-Banden) \pm SEM der vier Gruppen (IL-1ra 24h, VEH 24h, IL-1ra 5d, VEH 5d). Durch die Behandlung mit IL-1ra wurde 24 Stunden nach Ischämie eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von Bax erreicht. (IL-1ra 24h: $0,24 \pm 0,11$ versus VEH 24h: $0,48 \pm 0,07$; * $p < 0,05$)

(IL-1ra 5d: $0,83 \pm 0,18$ versus VEH 5d: $1,01 \pm 0,16$)

Um das Gleichgewicht zwischen proapoptotischem Bax und antiapoptotischen Bcl-2 beurteilen zu können, wurden die Quotienten aus den Ergebnissen der mRNA-Expression der beiden Gene berechnet. Das Verhältnis zwischen Bax und Bcl-2 war in der IL-1ra 24h-Gruppe im Vergleich

zu der Kontrollgruppe VEH 24h vermindert (IL-1ra 24h: $0,39 \pm 0,09$ versus VEH 24h: $1,34 \pm 0,16$; $p < 0,05$).

Im Gegensatz dazu wiesen die entsprechenden Quotienten nach 5-tägiger Reperfusion keinen merklichen Unterschied mehr auf (IL-1ra 5d: $0,62 \pm 0,13$ versus VEH 5d: $0,67 \pm 0,04$; $p = 0,564$; **Abb. 18**).

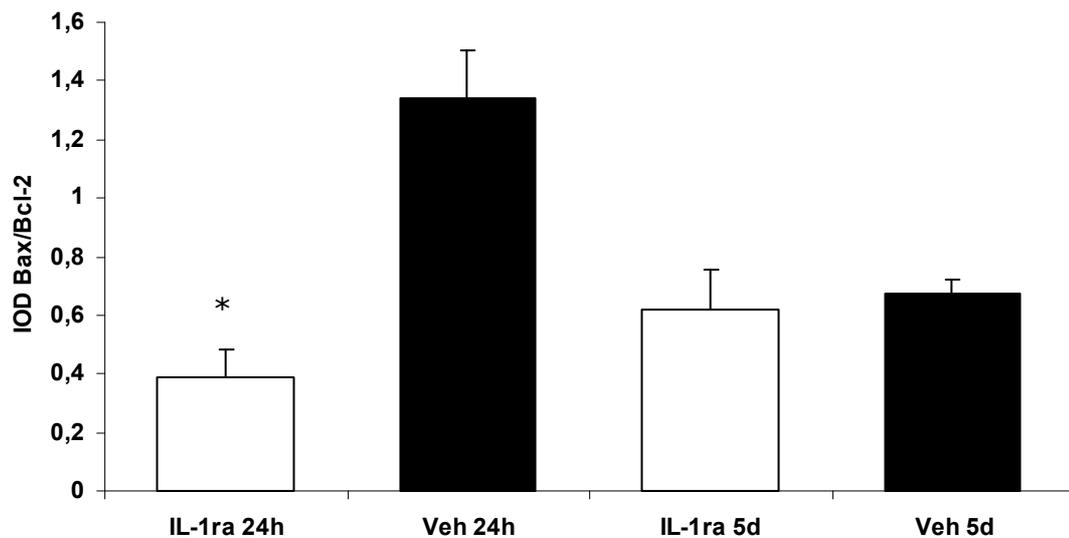


Abb. 18 Einfluss der IL-1ra Behandlung auf das Verhältnis von Bax zu Bcl-2. Nach einer Reperfusionszeit von 24 Stunden ließ sich durch IL-1ra eine signifikante Verminderung des Quotienten Bax/Bcl-2 erzielen. (* $p < 0,05$ versus VEH 24h)

Ingesamt wiesen die Daten bei den mit IL-1ra behandelten Tieren auf eine Verschiebung in Richtung Apoptose-verhindernder Faktoren hin.

5 Diskussion

In der vorgestellten Arbeit wurde die Frage untersucht, ob eine Behandlung mit dem Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) den Ischämie- und Reperfusionsschaden der Niere durch Reduktion der IL-1-vermittelten schädigenden Mechanismen beeinflussen kann.

Anstoß dazu gaben mehrere Studien, die einen Einfluss von IL-1 bei Ischämie und Reperfusion deutlich machten.

Mehrere Studien beschrieben einen tagelang anhaltenden Anstieg der mRNA-Expression von IL-1 im Nierengewebe bzw. des IL-1-Serumspiegels infolge Ischämie und Reperfusion der Niere [Kelly et al. 1996; Takada et al. 1997b; Lemay et al. 2000; Furuichi et al. 2006].

Ferner konnten diverse Untersuchungen zur Ischämie und Reperfusion anderer Organsysteme einen Anstieg des IL-1-Serumspiegels bzw. der mRNA-Expression von IL-1 infolge des IR-Schadens des Gehirns [Minami et al. 1992], der Leber [Suzuki et al. 1994] und des Herzens [Herskowitz et al. 1995] ermitteln.

5.1 Histologischer Gewebeschaden

Zur Beurteilung des histologischen Gewebeschadens wurden in der aktuellen Studie HE- und PAS-gefärbte Schnitte untersucht. Hierbei wiesen die IL-1ra-behandelten Tiere sowohl 24 Stunden als auch 5 Tage nach Auslösen der Ischämie deutlich weniger Zeichen der akuten Tubulusnekrose als die vehikel-behandelten Tiere auf.

Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Resultaten einer Studie, die den renalen IR-Schaden von Knockout-Mäusen untersuchte: IL-1 α / β -defiziente Tiere, bei denen die Gene für IL-1 α und IL-1 β ausgeschaltet waren, zeigten sowohl 24 als auch 48 Stunden nach Ischämie einen im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringeren Gewebeschaden [Furuichi et al. 2006]. Darüber hinaus wurde bei IL-1ra-defizienten Mäusen unter gleichen

Bedingungen ein wesentlich größerer tubulärer Schaden beobachtet [Furuichi et al. 2006].

Im Gegensatz zu den beschriebenen Beobachtungen konnten Haq et al. und Daemen et al. durch eine Behandlung mit IL-1ra bei Mäusen gegenüber Kontrolltieren keine Veränderung des tubulären Schadens 24 Stunden nach IR feststellen. Dieser Diskrepanz der Ergebnisse liegen möglicherweise rassenspezifische Unterschiede und/ oder verschiedene Dosierungsmodalitäten zu Grunde. Vermutlich zeigt die einmalige Verabreichung der höheren Dosis von 60 mg/kg IL-1ra wie in unserem Modell eine effizientere Wirkung als die Behandlung mit vergleichsweise niedrigeren Dosen der vorhergehenden Studien. In diesen sah die Versuchsanordnung eine Dosis von 35 mg/kg IL-1ra [Daemen et al. 2001b] bzw. mehrere Einzeldosen von je 10 mg/kg IL-1ra im Intervall von vier Stunden (jedoch mit der Gesamtdosis von ebenfalls 60 mg/kg in den ersten 24 Stunden) vor [Haq et al. 1998].

Die starke Dosisabhängigkeit der Wirkung von IL-1ra ist bekannt und wurde auch in einem Modell des kardialen IR-Schadens gezeigt [Arend et al. 1990; Li et al. 2004]. Um 50% der IL-1-vermittelten Wirkungen zu hemmen, benötigt man eine im Vergleich zu IL-1 100- bis 300-fach höhere molare Konzentration von IL-1ra [Arend et al. 1990; Dripps et al. 1991]. Für die Blockierung systemischer Wirkungen von IL-1 ist ein 100- bis 1000-facher molarer Überschuss von IL-1ra erforderlich [Ohlsson et al. 1990; Fischer et al. 1991]. Und erst ein 10.000-facher molarer Überschuss konnte die durch IL-1 induzierte Neutrophilie hemmen [McIntyre et al. 1991]. Diese hohen Konzentrationen werden trotz der etwas stärkeren Affinität von IL-1ra zum IL-1-Rezeptor Typ I benötigt, da schon die Aktivierung von weniger als 5% der vorhandenen IL-1-Rezeptoren durch IL-1 eine maximale biologische Wirkung hervorrufen kann [Arend et al. 1990].

Weitere Untersuchungen an anderen Organen demonstrierten, dass durch IL-1ra auch das Infarkt volumen nach zerebraler [Garcia et al. 1995; Loddick, Rothwell 1996; Yang et al. 1997; Yang et al. 1999a; Martin et al. 1994] und myokardialer [Suzuki et al. 2001; Li et al. 2004] Ischämie und

Reperfusion signifikant vermindert wird. Weiterhin konnte die Verabreichung von IL-1ra nach hepatischer Ischämie und Reperfusion den nekrotischen Gewebeschaden sowie auch die Produktion reaktiver Sauerstoffintermediate vermindern [Shito et al. 1997; Shirasugi et al. 1997; Harada et al. 2002].

Die Ergebnisse unserer Studie weisen darauf hin, dass IL1-ra in ausreichend hoher Dosierung die durch IR verursachte akute Tubulusnekrose deutlich vermindern kann.

5.2 Leukozyteninfiltration und Bedeutung von ICAM-1 und MCP-1

Die Minderung der Gewebeschädigung durch die Rezeptorblockade mit IL-1ra kann u. a. auf den Einfluss von IL-1 auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion zurückgeführt werden. IL-1 induziert die Synthese von für die Leukozyteninfiltration notwendigen Adhäsionsmolekülen und die Produktion von Chemokinen, die eine gerichtete Leukozytenwanderung in das geschädigte Gebiet ermöglichen und so Entzündungsprozesse auslösen bzw. verstärken können [Sung et al. 2002; Neri et al. 2007; Springer 1990; van de Stolpe, van der Saag 1996].

5.2.1 Makrophagen und T-Zellen

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von IL-1ra auf die nach Ischämie auftretende Infiltration durch Makrophagen und T-Zellen untersucht.

Die bedeutende Funktion der **Makrophagen** für das Entzündungsgeschehen beim renalen IR-Schaden ist in der Literatur gut dokumentiert.

Makrophagen können durch die Sekretion von proteolytischen Enzymen, reaktiven Sauerstoffintermediaten, NO, Komplementfaktoren und proinflammatorischen Zytokinen zur Schädigung des Nierengewebes beitragen [Nathan 1987].

Sie können vermutlich aber auch durch Produktion von Zytokininhibitoren oder anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und durch das Abräumen apoptotischer Zellen eine Rolle im Regenerierungsprozess nach IR spielen [Vinuesa et al. 2008].

Es wurde beobachtet, dass eine systemische Depletion von Monozyten/ Makrophagen den IR-Schaden der Niere abschwächen kann. Makrophagen-depletierte Ratten wiesen dabei eine geringere tubuläre Nekrose, weniger apoptotische Zellen, eine verminderte Zahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten und eine verringerte m-RNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine auf [Jo et al. 2006].

Wochen bis Monate nach renaler Ischämie ließ sich im Tierversuch ein persistierendes Entzündungsgeschehen mit einer vermutlich TGF- β_1 -vermittelten Entwicklung einer tubulointerstitiellen Fibrose beobachten. Diese Ereignisse, die eine langfristige Beeinträchtigung der Nierenfunktion zur Folge haben können, konnten ebenfalls durch die Depletion von Makrophagen deutlich vermindert werden [Ko et al. 2008].

Neben den Makrophagen wird auch den **T-Lymphozyten**, eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der Entzündungsreaktion nach Ischämie und Reperfusion zugeschrieben.

CD4/CD8-Knockout-Mäuse, bei denen die Gene für T-Helferzellen (CD4) und für zytotoxische T-Zellen (CD8) deaktiviert worden waren, zeichneten sich nach renaler IR durch eine im Vergleich zu Kontrolltieren verminderte tubuläre Nekrose, ein niedrigeres Kreatinin und eine verringerte Anzahl infiltrierender Neutrophiler aus [Rabb et al. 2000].

Des Weiteren konnte durch die Blockierung von für die T-Zell-Aktivierung notwendiger kostimulierender Signalwege die Relevanz der T-Zellen für den renalen IR-Schaden indirekt nachgewiesen werden. In einem Modell der kalten Ischämie wurde die Auswirkung der Blockade der Interaktion der Oberflächenmoleküle B7 und CD28 untersucht. Die Bindung des Zelloberflächenmoleküls B7 an den sich auf der T-Zelle befindenden Rezeptor CD28 ist für die T-Zell-Aktivierung erforderlich. Im beschriebenen Modell

führte die Blockade dieser Moleküle zur Anergie der T-Lymphozyten und darüber zu einer verbesserten Nierenfunktion und einer verminderten monozytären Infiltration [Takada et al. 1997a; Chandraker et al. 1997].

In einer anderen Studie ließ sich bei T-Zell-defizienten (*nu/nu*) Mäusen eine funktionelle und strukturelle Minderung des renalen IR-Schadens beobachten. Man nimmt an, dass im Wesentlichen CD4-positive T-Lymphozyten die für den Schaden verantwortliche Lymphozytensubpopulation darstellen. Daneben wird dem Zytokin IFN- γ eine zentrale Rolle in der Vermittlung der durch Lymphozyten verursachten Schädigung zugeschrieben [Burne et al. 2001].

Sowohl Makrophagen als auch T-Zellen können durch IL-1 aktiviert werden [Williams et al. 1985; Dinarello 2000]. Die Bedeutung von IL-1 für die Leukozytenmigration konnte auch für andere Gewebe nachgewiesen werden. So zeigte sich beispielsweise nach intrazerebraler Injektion von IL-1 β bei Ratten ein deutlicher Anstieg der Zahl neutrophiler Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten im Interstitium [Holmin, Mathiesen 2000].

In der vorliegenden Studie zeigte sich nur in den Gruppen mit einer Reperfusionszeit von 5 Tagen eine ausgeprägte Infiltration durch Lymphozyten und Makrophagen, die eine vergleichende Beurteilung zuließ. Dies entspricht den Ergebnissen eines vergleichbaren Experiments an Lewis-Ratten, in dem erst nach 2-3 Tagen eine deutliche Infiltration durch T-Zellen und Makrophagen in das postischämische Gewebe beobachtet wurde und sich ein Maximum bei 5 Tagen nach Ischämie zeigte [Takada et al. 1997b].

Im Vergleich zur Behandlung mit dem Vehikel bewirkte IL-1ra bei einer Reperfusionszeit von 5 Tagen eine deutliche Verminderung der Anzahl infiltrierender Makrophagen und T-Lymphozyten.

In vergleichbaren Studien wurde u. a. die Infiltration durch Granulozyten nach renaler IR untersucht. So verabreichten Guidot et al. Ratten IL-1 und stellten eine in Folge dessen vermehrte Infiltration der Niere durch neutrophile Granulozyten fest [Guidot et al. 1994].

Unseren Ergebnissen entsprechend fanden Haq et al. nach Behandlung von Mäusen mit IL-1ra eine signifikante Reduktion der Neutrophileninfiltration bei renalem IR-Schaden [Haq et al. 1998].

IL-1-Rezeptor-Knockout Mäuse, bei denen das Gen für den IL-1-Rezeptor Typ I deaktiviert und somit die Wirkung von IL-1 unterbunden worden war, zeigten nach renaler IR im Vergleich zu Kontrolltieren bessere Nierenfunktionsparameter, eine geringere Infiltration durch Leukozyten und auch eine raschere Erholung der Nierenfunktion [Haq et al. 1998].

Unsere Ergebnisse entsprechen denen bei IL-1 α / β -defizienten Mäusen, deren Nierenparenchym im Vergleich zu dem von IL-1ra-Knockout Mäusen nach renaler Ischämie durch eine signifikant verminderte Anzahl infiltrierender Neutrophilen und Makrophagen gekennzeichnet ist [Furuichi et al. 2006].

Daneben zeigte sich ebenfalls in einem Modell der obstruktiven Nephropathie nach Gentransfer von IL-1ra kodierender DNA durch modifizierte Knochenmarkzellen eine verminderte Makrophagenmigration in das Niereninterstitium [Yamagishi et al. 2001].

Bei myokardialer [Suzuki et al. 2001] und zerebraler [Garcia et al. 1995] Ischämie und Reperfusion konnte eine Behandlung mit IL-1ra gleichfalls das Einwandern von Leukozyten in das postischämische Gewebe vermindern.

Überdies ließ sich in einem Modell des hepatischen IR-Schadens die direkte Adhäsion von Leukozyten an das Endothel durch Behandlung mit IL-1ra reduzieren [Shirasugi et al. 1997].

Insgesamt kann man also im Einklang mit vorhergehenden Untersuchungen feststellen, dass die Behandlung mit IL-1ra eine deutliche Verminderung der Infiltration durch Entzündungszellen bewirken kann und dadurch den IR-Schaden begrenzt.

5.2.2 ICAM-1 und MCP-1

Die Adhäsion und Infiltration von Leukozyten wird durch Adhäsionsmoleküle und chemotaktische Faktoren erleichtert. Deshalb wurde in der vorliegenden

Studie die mRNA-Expression von ICAM-1 und MCP-1, die durch IL-1 beeinflusst wird, untersucht.

IL-1 induziert die Expression von **ICAM-1**, dessen Transkription über NF- κ B reguliert wird, u. a. auf Endothelzellen und Tubuluszellen der Niere [Ledebur, Parks 1995; Ishikura et al. 1991; Beekhuizen et al. 1992]. Aus diesem Grund untersuchten wir, ob die Behandlung mit IL-1ra die ICAM-1 Expression reduzieren und darüber den IR-Schaden mindern kann.

Das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 reguliert durch die Bindung an β_2 -Integrine auf Monozyten, Lymphozyten und Neutrophilen deren Adhäsion an Endothelzellen und fördert dadurch die Leukozyteninfiltration in das Entzündungsgebiet [Springer 1990].

Ferner kann eine gesteigerte Leukozytenadhäsion in der Reperfusionphase zusammen mit einer vermehrten Plättchen- und Erythrozytenaggregation eine gestörte Perfusion nach sich ziehen und dadurch zum Mikrozirkulationsschaden führen [Hellberg et al. 1991; Molitoris, Sutton 2004; Schmitz et al. 2008].

ICAM-1 hat man in der Niere sowohl auf dem Endothel der Glomeruli, der peritubulären Kapillaren und Arteriolen als auch auf interstitiellen Zellen und auf dem Bürstensaum proximaler Tubuluszellen nachgewiesen [Hill et al. 1995]. Jung et al. zeigten, dass infolge kalter Ischämie eine um bis zu 3,7-fache Steigerung der Expression von ICAM-1 im Cortex der Niere zu beobachten ist [Jung et al. 2001].

Die Hochregulation der ICAM-1-Expression auf Fibroblasten und Tubuluszellen kann nach dem Eintritt der Leukozyten in das Interstitium eine Rolle für die fokale Anhäufung und die Aktivierung der Leukozyten spielen [Hill et al. 1994].

Daneben ist ICAM-1 auch für weitere Leukozytenfunktionen wie z.B. für die T-Zell-vermittelte Zytolyse von Bedeutung [Springer 1990].

Bei ICAM-1-defizienten Mäusen wurde eine deutliche Abschwächung des IR-Schadens nach Abklemmen der Nierenarterien dokumentiert [Kelly et al. 1996]. Auch ICAM-1-Antikörper oder Antikörper gegen den ICAM-1 Rezep-

tor, CD11/CD18, konnten sowohl die funktionelle Verschlechterung der Niere als auch die mit dem postischämischen renalen Schaden assoziierten histologischen Veränderungen reduzieren [Kelly et al. 1994; Rabb et al. 1994; Rabb et al. 1995]. Ferner ließ sich der renale IR-Schaden durch die Behandlung mit Antisense-Oligonukleotiden abwenden, welche an die ICAM-1-mRNA hybridisieren und deren Translation verhindern [Dragun et al. 1998; Haller et al. 1996; Kiew et al. 2004]. Die Unterbrechung des ICAM-1-Pathways schützt die Niere vor dem IR-Schaden, vermutlich durch die Blockierung der Leukozytenmigration und Minderung der mikrovaskulären Obstruktion.

MCP-1 (*CCL2, Chemokine (C-C motif) ligand 2*) ist ein potentes Chemokin, welches die Migration von Monozyten durch die Gefäßwand in das Nierenparenchym in Gang setzt. Neben seiner chemotaktischen Funktion stimuliert es Monozyten auch zur Synthese von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen [Jiang et al. 1992]. MCP-1 nimmt ebenfalls Einfluss auf die T-Zell-Migration, -Differenzierung, und -Zytokinproduktion [Carr et al. 1994; Karpus et al. 1997; Boring et al. 1997].

Ferner wurde MCP-1 auch eine bedeutende Rolle für die Pathogenese der tubulointerstitiellen Fibrose zugeschrieben [Chow et al. 2007].

Infolge von Ischämie und Reperfusion der Niere ließ sich ein signifikanter Anstieg des MCP-1-Serumspiegels sowie der MCP-1-mRNA-Expression und des MCP-1-Proteins in der Niere beobachten [Sung et al. 2002; Furuichi et al. 2006; Lemay et al. 2000]. Auch infiltrierende Zellen tragen nach IR zur Synthese von MCP-1 bei [Furuichi et al. 2006].

Die Beteiligung von MCP-1 an der postischämischen Nierenschädigung wird durch Studien verdeutlicht, in denen durch die Blockade des MCP-1-Rezeptors (*CCR2, CC chemokine receptor 2*) sowohl Zellinfiltration und Tubulusnekrose vermindert als auch die Nierenfunktion verbessert werden konnte [Furuichi et al. 2003b; Furuichi et al. 2003a].

Neben der Produktion von ICAM-1 beeinflusst IL-1 auch die Synthese von MCP-1, dessen Expression ebenfalls über den Transkriptionsfaktor NF- κ B

vermittelt wird [Rollins et al. 1990; Gawaz et al. 1998; Sung et al. 2002]. Die Stimulation kultivierter muriner proximaler Tubuluszellen mit IL-1 α bzw. IL-1 β konnte sowohl die mRNA-Expression als auch die Sekretion von MCP-1 steigern [Prodjosudjadi et al. 1995; Furuichi et al. 2006]. Die Induktion der MCP-1-Synthese durch IL-1 wurde u. a. an Nierentubulus-, Mesangium-, und Endothelzellen demonstriert [Prodjosudjadi et al. 1995; Zoja et al. 1991; Kakizaki et al. 1995; Rollins et al. 1990].

Das vorliegende Experiment wies eine durch IL-1ra verminderte mRNA-Expression des Chemokins MCP-1 24 Stunden bzw. 5 Tage nach Auslösen der Ischämie nach. Die mRNA-Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 stellte sich nach einer Reperfusionzeit von 24 Stunden in der IL-1ra-Gruppe deutlich reduziert dar. Nach 5 Tagen war die ICAM-1-mRNA-Expression der Vehikel-Gruppe auf ein der IL-1ra-Gruppe ähnliches Niveau abgesunken.

Der Verlauf der ICAM-1-mRNA-Expression in der Kontrollgruppe stimmt mit den Ergebnissen von Takada et al. überein, die das Maximum der ICAM-1-mRNA-Expression 24 Stunden nach renaler Ischämie und einen anschließenden Abfall beobachteten [Takada et al. 1997b]. Ebenso zeigten die vehikel-behandelten Tiere einen typischen Verlauf der MCP-1-mRNA-Expression mit einem Maximum nach dem ersten Tag und einem anschließenden Abfall [Rice et al. 2002].

Unsere Daten lassen darauf schließen, dass IL-1 über die frühe Hochregulation von ICAM-1 und MCP-1 zur Rekrutierung der Leukozyten beiträgt.

Mit unseren Ergebnissen übereinstimmend konnte durch Überexpression von IL-1ra auch die endotheliale ICAM-1-Expression nach zerebraler IR signifikant gesenkt werden [Yang et al. 1999a; Yang et al. 1999b].

Mehrere Studien über die MCP-1 Expression in Nierenzellen zeigten, dass eine durch Stimulation mit IL-1 α gesteigerte MCP-1-Produktion in kultivierten Mesangiumzellen und proximalen Tubuluszellen durch die

Behandlung mit IL-1ra inhibiert werden kann [Brown et al. 1992; Rovin et al. 1992; Prodjosudjadi et al. 1995].

Ebenso konnte die MCP-1-Synthese in zerebralen Endothelzellen, welche durch hypoxische Astrozyten aktiviert worden waren, durch Inkubation mit IL-1ra unterbunden werden [Zhang et al. 2000].

5.3 Apoptose

Verschiedenste Nierenerkrankungen sowie die frühe Entwicklung der Niere sind durch Apoptose gekennzeichnet [Jaffe et al. 1997; Truong et al. 1996; Chandler et al. 1994; Lau 1999]. Die **Apoptose** renaler Tubuluszellen wird auch bei ischämischen oder toxischen Schädigungen der Niere beobachtet [Jaffe et al. 1997; Gobé et al. 1999]. Dieser Verlust funktionsfähiger Tubuluszellen ist in hohem Maße für die Entwicklung und das Fortschreiten des akuten Nierenversagens verantwortlich.

Es wurde gezeigt, dass die Apoptose der Nierenzellen mit einer vermehrten Synthese des proapoptotischen **Bax** verbunden ist [Wolfs et al. 2005; Schumer et al. 1992].

Zahlreiche Studien zeigten, dass IL-1 β die Apoptose unterschiedlicher Zellen verursachen kann [Wang et al. 2009; Shakibaei et al. 2008; Friedlander et al. 1996; Ing et al. 1999; Holmin, Mathiesen 2000].

Ob IL-1 einen direkten Einfluss auf apoptotische Prozesse der Nierenzellen hat, wurde in mehreren Studien an kultivierten proximalen Tubuluszellen untersucht.

Glynn et al. behandelten kultivierte Tubuluszellen mit einer Kombination proinflammatorischer Zytokine (IL-1 α und Interferon- γ ; zum Teil zusätzlich auch TNF- α). Sie verzeichneten eine deutlich verstärkte Ablösung nekrotischer und apoptotischer Zellen von der Monolayer-Zellkultur sowie eine vermehrte Produktion von iNOS (induzierbare NO-Synthase) und dadurch auch von NO, was einen u. a. durch NO vermittelten Mechanismus der Apoptose nahe legt [Glynn, Evans 1999; Glynn et al. 2001]. Mehrere in vitro und in vivo Studien demonstrierten, dass das durch die iNOS produ-

zierte NO zur ischämischen Tubulusschädigung beiträgt [Yaqoob et al. 1996; Ling et al. 1998; Peresleni et al. 1996; Noiri et al. 1996].

Jo et al. stimulierten kultivierte proximale Tubuluszellen nur mit IL-1 β . Sie beobachteten eine signifikante Vermehrung apoptotischer Zellen sowie eine für die Apoptose typische Spaltung von DNA-Reparatur-Enzymen. Aufgrund der ebenfalls erhöhten Synthese des Fas-Liganden und Fas-assoziiierter Adapterproteine wurde dem Fas-medierten Mechanismus eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion durch IL-1 zugeschrieben [Jo et al. 2002].

Auch Schelling et al. berichteten, dass IL-1 β eine Steigerung der Fas-Expression und darüber eine vermehrte Apoptose von Nierentubuluszellen induziert [Schelling et al. 1998].

Des Weiteren konnte durch kombinierte Stimulation von kultivierten proximalen Tubuluszellen mit IL-1 β und H₂O₂ im Vergleich zu ausschließlicher Stimulation mit H₂O₂ eine ausgeprägte Vermehrung apoptotischer und nekrotischer Zellen festgestellt werden [Furuichi et al. 2006].

Andererseits können wohl auch apoptotische Stimuli selbst die Freisetzung von IL-1 anregen und dadurch einen Beitrag zum inflammatorischen Geschehen leisten [Miwa et al. 1998].

In einer Untersuchung, bei welcher IL-1 β intrazerebral injiziert wurde, stellte sich heraus, dass das daraufhin vermehrte Auftreten apoptotischer Zellen mit einer verstärkten Expression des proapoptotisch wirksamen Bax vergesellschaftet war [Holmin, Mathiesen 2000].

Auch bei isolierten enterochromaffinen Zellen der Magenschleimhaut ließ sich durch Behandlung mit IL-1 β eine erhöhte Rate apoptotischer Zellen sowie eine verstärkte Expression von Bax und der iNOS feststellen. Durch die Applikation eines NO-Inhibitors bzw. eines NF- κ B-Inhibitors konnte die durch IL-1 β gesteigerte Apoptoserate signifikant gesenkt werden. Die Aktivierung von NF- κ B sowie NO scheinen somit für das Auslösen des apoptotischen Zelltods wesentlich zu sein [Mahr et al. 2000].

Die aktuelle Studie hat gezeigt, dass die mit IL-1ra behandelten Tiere nach einer Reperusionszeit von 24 Stunden im Gegensatz zu den mit dem

Vehikel behandelten Tieren eine wesentlich niedrigere Rate apoptotischer Tubuluszellen und eine geringere mRNA-Expression von Bax aufwiesen. Dementsprechend zeigte sich eine höhere mRNA-Expression des anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2. Das Verhältnis der Bax- zur Bcl-2-mRNA-Expression wurde durch Behandlung mit IL-1ra in Richtung des anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2 verschoben. Nach einer Reperfusionszeit von 5 Tagen waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen nicht mehr signifikant.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten einer Studie von Furuichi et al.: Dabei zeigten IL-1 α / β -defiziente Mäuse im Gegensatz zu IL-1ra-defizienten Mäusen 4 Tage nach Induktion einer renalen Ischämie eine signifikant verminderte Zahl TUNEL-positiver Tubuluszellen [Furuichi et al. 2006].

IL-1ra konnte auch im Modell myokardialer IR die Apoptose der Kardiomyozyten verringern und die Hochregulierung von Bax und Caspase 3 reduzieren. Es zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Expression von Bcl-2 (bei einer Reperfusionszeit von 24 Stunden) [Suzuki et al. 2001; Li et al. 2004; Abbate et al. 2008].

Zudem konnte eine Studie an kultivierten Pankreasinseln, in welche die für IL-1ra kodierende cDNA per adenoviralem Gentransfer eingebracht wurde, mögliche Mechanismen der Wirkung von IL-1ra verdeutlichen. Nachdem die Zellen mit IL-1 β behandelt wurden, wiesen die Zellen, die vermehrt IL-1ra produzierten, eine Verminderung von IL-1 β -induzierter NO-Bildung sowie eine Verringerung der Fas-getriggerten Apoptose auf [Giannoukakis et al. 1999].

Auch bei einer tierexperimentellen Studie zur zerebralen Ischämie zeigte sich nach intrazerebraler Injektion von IL-1ra im Vergleich zu Kontrolltieren eine Reduktion von Zelltod und Caspase-3-Aktivität [Hu et al. 2005]. Daneben trugen IL-1ra-Knockout Mäuse nach zerebraler Ischämie einen weitaus größeren neuronalen Schaden davon als der Wildtyp [Pinteaux et al. 2006].

Bei einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie über die Behandlung von Schlaganfallpatienten mit rekombinantem IL-1ra besserten sich klinische Ergebnisse und Laborparameter der Patienten deutlich durch die Verabreichung von IL-1ra, was auch auf die Möglichkeit einer therapeutischen Anwendung von IL-1ra nach Apoplex hindeutet [Emsley et al. 2005].

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-1 eine bedeutende Rolle für die Apoptose der Nierenzellen nach IR spielt, welche mit einer Aktivierung des proapoptotischen Bax verknüpft ist, und dass IL-1ra diese durch IL-1 vermittelten nachteiligen Ereignisse hemmen kann. Es beeinflusst die Apoptose der Nierenzellen durch Modifizierung der mRNA-Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Jedoch konnte durch die vorliegende Studie nicht ermittelt werden, ob es sich dabei um einen direkten oder indirekten Effekt von IL-1ra handelt.

5.4 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass die Verabreichung von rekombinantem IL-1ra den renalen IR-Schaden abschwächen kann.

IL-1ra inhibiert die Auswirkung des während der IR erhöhten IL-1 Spiegels, da es mit IL-1 um seine Rezeptoren konkurriert und hierdurch die Entzündungsantwort sowie den folgenden Parenchymschaden vermindert. Da die IL-1 vermittelte Entzündung auch die Expression von IL-1 selbst verstärkt, kann IL-1ra wiederum den Anstieg von IL-1 indirekt reduzieren und so den durch IL-1 vermittelten Nierenschaden eindämmen.

Die Behandlung mit IL-1ra begrenzt den renalen IR-Schaden sowohl durch die Verminderung der Infiltration mit Entzündungszellen als auch durch die Reduktion apoptotischer Zellen. Wir konnten zeigen, dass IL-1ra zu diesen Effekten durch die Verringerung der Expression von MCP-1 und ICAM-1 sowie durch Beeinflussung der Expression apoptose-regulierender Faktoren der Bcl-2 Familie beiträgt.

6 Zusammenfassung

Der Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere stellt nach Ereignissen wie Organtransplantationen, Operationen mit Beeinträchtigung der Nierendurchblutung oder dem hämorrhagischem Schock eine wichtige Ursache renaler Dysfunktion dar. Interleukin-1 (IL-1) gehört zu einer Gruppe von Entzündungsfaktoren, welche in der Phase der Reperfusion nach renaler Ischämie freigesetzt werden. Es fördert dabei sowohl entzündliche als auch apoptotische Prozesse. Die durch IL-1 ausgelösten Effekte können durch seinen kompetitiven Antagonisten Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) gehemmt werden. Dieser verhindert die Bindung von IL-1 an die IL-1 Rezeptoren und blockiert auf diese Weise den intrazellulären Signalweg, welcher die durch IL-1 ausgelösten Effekte vermittelt. In der vorliegenden Studie sollte die Frage geklärt werden, ob durch Verabreichung des IL-1 Rezeptorantagonisten der Ischämie- und Reperfusionsschaden der Niere begrenzt oder verhindert werden kann.

Als Versuchstiere kamen 32 männliche Lewis-Ratten zur Anwendung. Bei ihnen wurde eine 45-minütige renale Ischämie durch Abklemmen der linken A. renalis induziert. Nach 24 Stunden bzw. 5 Tagen wurden die Nieren für die histologische und molekularbiologische Untersuchung entnommen.

Zur Beurteilung des durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufenen Gewebeschadens wurden HE- bzw. PAS-gefärbte histologische Präparate angefertigt. Durch die Behandlung mit IL-1ra zeigte sich hier eine deutliche Verminderung des renalen Gewebeschadens.

Infiltrierende Makrophagen und T-Lymphozyten wurden immunhistologisch mittels der APAAP-Methode dargestellt. Bei den mit IL-1ra behandelten Tieren zeigte sich nach einer 5-tägigen Reperfusionszeit eine signifikante Verminderung der Infiltration durch die genannten Entzündungszellen. Daneben wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR festgestellt, dass IL-1ra nach einer Reperfusionszeit von 24 Stunden auch die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 reduziert. Ferner ließ sich sowohl 24 Stunden als

auch 5 Tage nach Auslösen der Ischämie eine Verminderung der Expression des Chemokins MCP-1 nachweisen.

Apoptotische Tubuluszellen wurden durch einen TUNEL-Assay sichtbar gemacht. Durch die Verabreichung von IL-1ra ließ sich die Zahl apoptotischer Tubuluszellen bei einer Reperfusionzeit von 24 Stunden halbieren. Dies ging mit einer Verminderung des Verhältnisses der mRNA-Expression von Bax/ Bcl-2 in Richtung des antiapoptotisch wirksamen Bcl-2 einher.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten zeigen, dass die Behandlung mit rekombinantem IL-1ra den renalen Ischämie-Reperfusionsschaden abschwächen kann. Die Infiltration durch Entzündungszellen sowie die Zahl apoptotischer Tubuluszellen wird durch Verabreichung von IL-1ra reduziert. Vermutlich wird die positive Wirkung von IL-1ra durch eine Verminderung der durch NF- κ B regulierten Expression von MCP-1 und ICAM-1 sowie durch eine Abnahme des Verhältnisses der mRNA-Expression von Bax zu Bcl-2 vermittelt.

Eine Empfehlung für die klinische Anwendung von IL-1ra zur Prävention oder Therapie des renalen IR-Schadens kann jedoch erst nach Ergebnissen weiterführender Studien ausgesprochen werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
Apaf-1	<i>apoptosis protease activation factor-1</i>
ATN	Akute Tubulusnekrose
ATP	Adenosin-5´-Triphosphat
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
bp	Basenpaar
CCL2	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 2</i> ; entspricht MCP-1
CCR2	<i>CC chemokine receptor 2</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
COX-2	Cyclooxygenase-2
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGF	<i>delayed graft function</i>
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphate
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat

Fas	<i>FS7-associated cell surface antigen</i>
fv	<i>field of view</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
G-CSF	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
IL-1RAcP	<i>IL-1 receptor accessory protein</i>
IL-1Rrp	<i>IL-1 receptor related protein</i>
ICE	<i>IL-1β-converting-enzyme</i>
icIL-1Ra	Intrazellulärer Interleukin-1 Rezeptor Antagonist
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IOD	Integrierte Optische Dichte
IR	Ischämie/ Reperfusion
LFA-1	Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen-1
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
NF- κ B	Nuklear Faktor Kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PGSL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1

PLA ₂	Phospholipase A ₂
ROI	Reaktive Sauerstoffintermediate
RT	Reverse Transkription
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of the mean</i>)
sIL-1Ra	Löslicher IL-1 Rezeptorantagonist
TBS	<i>Tris buffer saline</i> (Tris-Puffer)
TdT	Terminale Deoxynukleotidyltransferase
TIR	Toll-/ IL-1-Rezeptor
TGF-β ₁	<i>Transforming Growth Factor-β₁</i>
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
TNF-R1	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor Typ 1
TUNEL	<i>T</i> <i>erminal deoxynucleotidyl transferase-mediated</i> <i>d</i> <i>U</i> <i>T</i> <i>P</i> <i>n</i> <i>i</i> <i>c</i> <i>k</i> <i>e</i> <i>n</i> <i>d</i> <i>-</i> <i>l</i> <i>a</i> <i>b</i> <i>e</i> <i>l</i> <i>i</i> <i>n</i> <i>g</i>
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEH/ Veh	Vehikel

8 Literaturverzeichnis

- Abbate, A., Salloum, F.N., Vecile, E., Das, A., Hoke, N.N., Straino, S., Biondi-Zoccai, G.G., Houser, J.E., Qureshi, I.Z., Ownby, E.D., Gustini, E., Biasucci, L.M., Severino, A., Capogrossi, M.C., Vetrovec, G.W., Crea, F., Baldi, A., Kukreja, R.C., Dobrina, A. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 117 (2008) 2670-2683
- Allan, S.M., Tyrrell, P.J., Rothwell, N.J. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 629-640
- Andrei, C., Dazzi, C., Lotti, L., Torrisci, M.R., Chimini, G., Rubartelli, A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1 beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol. Biol. Cell.* 10 (1999) 1463-1475
- Andrei, C., Margiocco, P., Poggi, A., Lotti, L.V., Torrisci, M.R., Rubartelli, A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: implications for inflammatory processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 9745-9750
- Arend W.P., Guthridge C. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. *Ann. Rheum. Dis.* 59 suppl I (2000) 160-164
- Arend, W.P., Joslin, F.G., Massoni, R.J. Effects of immune complexes on production by human monocytes of interleukin 1 or an interleukin 1 inhibitor. *J. Immunol.* 134 (1985) 3868-3875
- Arend, W.P., Malyak, M., Guthridge, C.J., Gabay, C. Interleukin-1 Receptor Antagonist: Role in Biology. *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1998) 27-55
- Arend, W.P., Welgus, H.G., Thompson, R.C., Eisenberg, S.P. Biological properties of recombinant human monocyte derived interleukin 1 receptor antagonist. *J. Clin. Invest.* 85 (1990) 1694-1697

- Arendshorst, W.J., Finn, W.F., Gottschalk, C.W. Pathogenesis of acute renal failure following temporary renal ischemia in the rat. *Circ. Res.* 37 (1975) 558-568
- Baldwin, A.S. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 14 (1996) 649-681
- Banda, N.K., Guthridge, C., Sheppard, D., Cairns, K.S., Muggli, M., Bechtold, D., Dubiel, W., Arend, W.P. Intracellular IL-1 receptor antagonist type 1 inhibits IL-1-induced cytokine production in keratinocytes through binding to the third component of the COP9 signalosome. *J. Immunol.* 174 (2005) 3608-3616
- Bankers-Fulbright, J.L., Kalli, K.R., McKean, D.J. Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci.* 59 (1996) 61-83
- Barksby, H.E., Lea, S.R., Preshaw, P.M., Taylor, J.J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 149 (2007) 217-225
- Beekhuizen, H., Verdegaal, E.M.E., Blokland, I., van Furth, R. Contribution of ICAM-1 and VCAM-1 to the morphological changes in monocytes bound to human venous endothelial cells stimulated with recombinant interleukin-4 (rIL-4) or rIL-1 alpha. *Immunol.* 77 (1992) 469-472
- Benitez-Bribiesca, L., Gomez-Camarillo, M., Castellanos-Juarez, E., Mravko, E., Sánchez-Suárez, P. Morphologic, biochemical and molecular mitochondrial changes during reperfusion phase following brief renal ischemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 926 (2000) 165-179
- Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91 (1993) 379-387
- Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M., Mannori, G., Cesconi, O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human diseases. *Ann. Rev. Med.* 45 (1994) 361-378
- Bonventre, J.V. Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 43 (1993) 1160-1178

- Bonventre, J.V., Zuk, A., Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int.* 66 (2004) 480-485
- Boring, L., Gosling, J., Chensue, S.W., Kunkel, S.L., Farese, R.V. Jr., Broxmeyer, H.E., Charo, I.F. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 2552-2561
- Braddock, M., Quinn, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3 (2004) 330-339
- Brauner, A., Soderhall, M., Jacobson, S.H., Lundahl, J., Andersson U., Andersson, J. Escherichia coli-induced expression of IL-1 alpha, IL-1 beta, IL-6 and IL-8 in normal human renal tubular epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 124 (2001) 423-428
- Brody, D.T., Durum, S.K. Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *J. Immunol.* 143 (1989) 1183-1187
- Brömme, H.J., Loertzer, H., Akçetin, Z. Der postischämische Reperfusionsschaden. *Urologe* 41 (2002) 159-163
- Brown, Z., Strieter, R.M., Neild, G.H., Thompson, R.C., Kunkel, S.L., Westwick, J. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int.* 42 (1992) 95-101
- Burne, M.J., Daniels, F., El Ghandour, A., Mauiyyedi, S., Colvin, R.B., O'Donnell, M.P., Rabb, H. Identification of the CD4 (+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 1283-1290
- Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., Springer, T.A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 3652-3656
- Carter, D.B., Deibel Jr., M.R., Dunn C.J., Tomich, C.S., Laborde, A.L., Slightom, J.L., Berger, A.E., Bienkowski, M.J., Sun, F.F., McEwan,

- R.N., Harris, P.K.W., Yem, A.W., Waszak, G.A., Chosay, J.G., Sieu, L.C., Hardee, M.M., Zurcher-Neely, H.A., Reardon, I.M., Heinrikson, R.L., Truesdell, S.E., Shelly, J.A., Eessalu, T.E., Taylor B.M., Tracey, D.E. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 344 (1990) 633-638
- Chandler, D., el-Naggar, A.K., Brisbay, S., Redline, R.W., McDonnell, T.J. Apoptosis and expression of the bcl-2 Proto-oncogene in the fetal and adult human kidney: Evidence for the contribution of bcl-2 expression to renal carcinogenesis. *Hum. Pathol.* 25 (1994) 789-796
- Chandraker, A., Takada, M., Nadeau, K.C., Peach, R., Tilney, N.L., Sayegh, M.H. CD28-b7 blockade in organ dysfunction secondary to cold ischemia/ reperfusion injury. *Kidney Int.* 52 (1997) 1678-1684
- Chao, D.T., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 Family: Regulators of Cell Death. *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1998) 395-419
- Chow, F.Y., Nikolic-Peterson, D.J., Ma, F.Y., Ozols, E., Rollins, B.J., Tesch, G.H. Monocyte chemoattractant protein-1 induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia* 50 (2007) 471-480
- Cohen, G.M., Sun, X.M., Snowden, R.T., Dinsdale, D., Skilleter, D.N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.* 286 (1992) 331-334
- Collard, C.D., Gelman, S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology (US)* 94 (2001) 1133-1138
- Colotta, F., Dower, S.K., Sims, J.E., Mantovani, A. The type II decoy receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol. Today* 15 (1994) 562-566

- Cordell, J.L., Falini, B., Erber, W.N., Ghosh, A.K., Abdulaziz, Z., MacDonald, S., Pulford, K.A., Stein, H., Mason, D.Y. Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal antialkaline phosphatase (APAAP complexes). *J. Histochem. Cytochem.* 32 (1984) 219-229
- Daemen, M.A., de Vries, B., Buurman, W.A. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 73 (2002) 1693-1700
- Daemen, M.A., de Vries, B., van't Veer, C., Wolfs, T.G., Buurman, W.A. Apoptosis and chemokine induction after renal ischemia-reperfusion. *Transplantation* 71 (2001a) 1007-1011.
- Daemen, M.A., Denecker, G., van't Veer, C., Wolfs, T.G., Vandenabeele, P., Buurman, W.A. Activated caspase-1 is not a central mediator of inflammation in the course of ischemia-reperfusion. *Transplantation.* 71 (2001b) 778-784
- Daemen, M.A., van 't Veer, C., Denecker, G., Heemskerk, V.H., Wolfs, T.G., Clauss, M., Vandenabeele, P., Buurman, W.A. Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation. *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 541-549
- Desagher, S., Martinou, J.C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell. Biol.* 10 (2000) 369-377
- Devarajan, P. Cellular and molecular derangements in acute tubular necrosis. *Curr. Opin. Pediatr.* 17 (2005) 193-199
- Dinarello, C. A. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N. Engl. J. Med.* 343 (2000) 732-734
- Dinarello, C.A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood* 87 (1996) 2095-2147
- Dinarello, C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77 (1991) 1627-1652

- Dinarello, C.A., Wolff, S.M. The Role of Interleukin-1 in Disease. *N. Engl. J. Med.* 328 (1993) 106-113
- Dlugosz, P.J., Billen, L.P., Annis, M.G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., Leber, B., Andrews, D.W. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J.* 25 (2006) 2287-2296
- Dragun, D., Tullius, S.G., Park, J.K., Maasch, C., Lukitsch, I., Lippoldt, A., Gross, V., Luft, F.C., Haller, H. ICAM-1 antisense oligodesoxynucleotides prevent reperfusion injury and enhance immediate graft function in renal transplantation. *Kidney Int.* 54 (1998) 590-602
- Dripps, D.J., Brandhuber, B.J., Thompson, R.C., Eisenberg, S.P. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10331-10336
- Dunn, S.L., Young, E.A., Hall, M.D., McNulty, S. Activation of astrocyte intracellular signaling pathways by interleukin-1 in rat primary striatal cultures. *Glia.* 37 (2002) 31-42
- Eisenberg, S.P., Evans, R.J., Arend, W.P., Verderber, E., Brewer, M.T., Hannum, C.H., Thompson, R.C. Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* 343 (1990) 341-346
- Emsley, H.C., Smith, C.J., Georgiou, R.F., Vail, A., Hopkins, S.J., Rothwell, N.J., Tyrrell, P.J. Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76 (2005) 1366-1372
- Erlich, H.A. Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Immun.* 9 (1989) 437-447
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., Di Virgilio, F. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 176 (2006) 3877-3883
- Fischer, E., Marano, M.A., Barber, A.E., Hudson, A.A., Lee, K., Rock, C.S., Hawes, A.S., Thompson, R.C., Hayes, T.V., Anderson, T.D., Benjamin, W.R., Lowry, S.F., Moldawer, L.L. A comparison between

- the effects of interleukin-1 alpha administration and sublethal endotoxemia in primates. *Am. J. Physiol.* 261 (1991) R442-452
- Fitzgerald, A.A., LeClercq, S.A., Yan, A., Homik, J.E., Dinarello, C.A. Rapid responses to anakinra in patients with refractory adult-onset Still's disease. *Arthritis Rheum.* 52 (2005) 1794-1803
- Fleischmann, R.M., Schechtman, J., Bennett, R., Handel, M.L., Burmester, G.R., Tesser, J., Modafferi, D., Poulakos, J., Sun, G. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (r-metHuIL-1ra), in patients with rheumatoid arthritis: a large, international, multicenter, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 48 (2003) 927-934
- Frangogiannis, N.G. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb. Haemost.* 97 (2007) 738-747
- Friedewald, J.J., Rabb, H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 66 (2004) 486-491
- Friedlander, R.M., Gagliardini, V., Rotello, R.J., Yuan, J. Functional role of interleukin-1 beta (IL-1 beta) in IL-1 beta-converting enzyme-mediated apoptosis. *J. Exp. Med.* 184 (1996) 717-724
- Furuichi, K., Wada, T., Iwata, Y., Kitagawa, K., Kobayashi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Asano, M., Wang, H., Matsushima, K., Takeya, M., Kuziel, W.A., Mukaida, N., Yokoyama, H. CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003a) 2503-2515
- Furuichi, K., Wada, T., Iwata, Y., Kitagawa, K., Kobayashi, K., Hashimoto, H., Ishiwata, Y., Tomosugi, N., Mukaida, N., Matsushima, K., Egashira, K., Yokoyama, H. Gene therapy expressing amino-terminal truncated monocyte chemoattractant protein-1 prevents renal ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (2003b) 1066-1071
- Furuichi, K., Wada, T., Iwata, Y., Kokubo, S., Hara, A., Yamahana, J., Sugaya, T., Iwakura, Y., Matsushima, K., Asano, M., Yokoyama, H.,

- Kaneko, S. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Crit. Care Med.* 34 (2006) 2447-2455
- Garat, C., Arend, W.P. Intracellular IL-1Ra type 1 inhibits IL-1-induced IL-6 and IL-8 production in Caco-2 intestinal epithelial cells through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase and NFkappaB pathways. *Cytokine* 23 (2003) 31-40
- Garcia, J.H., Lui, K.F., Relton, J.K. Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. *Am. J. Pathol.* 147 (1995) 1477-1486
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119 (1992) 493-501
- Gawaz, M., Neumann, F.J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K.L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schömig, A., Brand, K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98 (1998) 1164-1171
- Giannoukakis, N., Rudert, W.A., Ghivizzani, S.C., Gambotto, A., Ricordi, C., Trucco, M., Robbins, P.D. Adenoviral gene transfer of the interleukin-1 receptor antagonist protein to human islets prevents IL-1beta-induced beta-cell impairment and activation of islet cell apoptosis in vitro. *Diabetes* 48 (1999) 1730-1736
- Glynn, P.A., Evans, T.J. Inflammatory cytokines induce apoptotic and necrotic cell shedding from human proximal tubular epithelial cell monolayers. *Kidney Int.* 55 (1999) 2573-2597
- Glynn, P.A., Picot, J., Evans, T.J. Coexpressed nitric oxide synthase and apical β 1 integrins influence tubule cell adhesion after cytokine-induced injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12 (2001) 2370-2383

- Gobé, G., Willgoss, D., Hogg, N., Schoch, E., Endre, Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 56 (1999) 1299–1304
- Gobé, G., Zhang, X.J., Willgoss, D.A., Schoch, E., Hogg, N.A., Endre, Z.H. Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11 (2000) 454-467
- Goligorsky, M.S., DiBona, G.F. Pathogenetic role of Arg-Gly-Asp-recognizing integrins in acute renal failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 5700-5704
- Grace, P.A. Ischaemia-reperfusion injury. *Br. J. Surg.* 81 (1994) 637-647
- Green, D.R., Kromer, G., The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 5684 (2004) 626–629
- Greenfeder, S.A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R.A., Ju, G. Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 13757–13765
- Guidot, D.M., Linas, S.L., Repine, M.J., Shanley, P.F., Fisher, H.S., Repine, J.E. Interleukin-1 treatment increases neutrophils but not antioxidant enzyme activity or resistance to ischemia-reperfusion injury in rat kidneys. *Inflammation* 18 (1994) 537-545
- Hallegua, D.S., Weisman, M.H. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 61 (2002) 960-967
- Haller, H., Dragun, D., Miethke, A., Park, J.K., Weis, A., Lippoldt, A., Gross, V., Luft, F.C. Antisense oligonucleotides for ICAM-1 attenuate reperfusion injury and renal failure in the rat. *Kidney Int.* 50 (1996) 473-480
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D., White, E. The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-

- inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev.* 10 (1996) 461-477
- Hannum, C.H., Wilcox, C.J., Arend, W.P., Joslin, F.G., Dripps, D.J., Heimdal, P.L., Armes, L.G., Sommer, A., Eisenberg, S.P., Thompson, R.C. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 343 (1990) 336-340
- Haq, M., Norman, J., Saba, S.R., Ramirez, G., Rabb, H. Role of IL-1 in renal ischemic reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9 (1998) 614-619
- Harada, H., Wakabayashi, G., Takayanagi, A., Shimazu, M., Matsumoto, K., Obara, H., Shimizu, N., Kitajima, M. Transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene into rat liver abrogates hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 74 (2002) 1434-1441
- Hazuda, D.J., Strickler, J., Kueppers, F., Simon, P.L., Young, P.R. Processing of precursor interleukin 1 beta and inflammatory disease. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6318-6322
- Hellberg, P.O.A., Källskog, O., Wolgast, M. Red cell trapping and postischemic renal blood flow. Differences between the cortex, outer and inner medulla. *Kidney Int.* 40 (1991) 625-631
- Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407 (2000) 770-776
- Herskowitz, A., Choi, S., Ansan, A.A., Wesselingh, S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 419-428
- Hill, P.A., Lan, H.Y., Nikolic-Paterson, D.J., Atkins, R.C. ICAM- 1 directs migration and localization of interstitial leukocyte infiltration in experimental glomerulonephritis: An ultrastructural study. *Kidney Int.* 45 (1994) 32-42
- Hill, P.A., Main, I.W., Atkins, R.C. ICAM-1 and VCAM-1 in human renal allograft rejection. *Kidney Int.* 47 (1995) 1383-1391

- Holmin, S., Mathiesen, T. Intracerebral administration of interleukin-1 β and induction of inflammation, apoptosis, and vasogenic edema. *J. Neurosurg.* 92 (2000) 108–120
- Hu, X., Nestic-Taylor, O., Qiu, J., Rea, H.C., Fabian, R., Rassin, D.K., Perez-Polo, J.R. Activation of nuclear factor- κ B signaling pathway by interleukin-1 after hypoxia/ischemia in neonatal rat hippocampus and cortex. *J. Neurochem.* 93 (2005) 26-37
- Ing, D.J., Zang, J., Dzau, V.J., Webster, K.A., Bishopric, N.H. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ. Res.* 84 (1999) 21-33
- Ishikura, H., Takahashi, C., Kanagawa, K., Hirata, H., Imai, K., Yoshiki, T. Cytokine regulation of ICAM-1 expression on human renal tubular epithelial cells in vitro. *Transplantation* 51 (1991) 1272-1275
- Jaffe, R., Areil, I., Beerli, R., Paltiel, O., Hiss, Y., Rosen, S., Brezis, M. Frequent apoptosis in human kidneys after acute renal hypoperfusion. *Exp. Nephrol.* 5 (1997) 399–403
- Jiang, Y., Beller, D.I., Frenzl, G., Graves, D.T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J. Immunol.* 148 (1992) 2423-2428
- Jo, S.K., Cha, D.R., Cho, W.Y., Kim, H.K., Chang, K.H., Yun, S.Y., Won, N.H. Inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce Fas-mediated apoptosis in renal tubular cells. *Nephron* 91 (2002) 406-415
- Jo, S.K., Sung, S.A., Cho, W.Y., Go, K.J., Kim, H.K. Macrophages contribute to the initiation of ischaemic acute renal failure in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21 (2006) 1231-1239
- Jung, S.I., Chang, G.J., Corbascio, M., Potts, M., Bedolli, M., Ascher, N.I., Freise, C.F. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in the cortex of preserved rat kidneys. *J. Surg. Res.* 100 (2001) 69-75

- Kakizaki, Y., Waga, S., Sugimoto, K., Tanaka, H., Nukii, K., Takeya, M., Yoshimura, T., Yokoyama, M. Production of monocyte chemoattractant protein-1 by bovine glomerular endothelial cells. *Kidney Int.* 48 (1995) 1866–1874
- Karkar, A.M., Tam, F.W., Steinkasserer, A., Kurrle, R., Langner, K., Scallon, B.J., Meager, A., Rees, A.J. Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by IL-1ra, soluble TNF receptor. *Kidney Int.* 48 (1995) 1738–1746
- Karpus, W.J., Lukacs, N.W., Kennedy, K.J., Smith, W.S., Hurst, S.D., Barrett, T.A. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J. Immunol.* 158 (1997) 4129–4136
- Kelly, K.J., Williams, W.W., Colvin, R.B., Bonventre, J.V. Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 812–816
- Kelly, K.J., Williams, W.W., Colvin, R.B., Meehan, S.M., Springer, T.A., Gutierrez-Ramos, J.C., Bonventre, J.V. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 1056–1063
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Curie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 (1972) 239–257
- Kiew, L.V., Munavvar, A.S., Law, C.H., Azizan, A.N., Nazarina, A.R., Sidik, K., Johns, E.J. Effect of antisense oligodeoxynucleotides for ICAM-1 on renal ischaemia-reperfusion injury in the anaesthetised rat. *J. Physiol.* 557 (2004) 981–989
- Ko, G.J., Boo, C.S., Jo, S.K., Cho, W.Y., Kim, H.K. Macrophages Contribute to the Development of Renal Fibrosis Following Ischaemia/Reperfusion Induced Acute Kidney Injury. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23 (2008) 842–852

- Kobayashi, Y., Oppenheim, J.J., Matsushima, K. Human preinterleukin-1 alpha and beta: Structural features revealed by limited proteolysis. *Chem. Pharmaceut. Bull.* 39 (1991) 1513-1517
- Kobayashi, Y., Yamamoto, K., Saido, T., Kawasaki, H., Oppenheim, J.J., Matsushima, K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990) 5548-5552
- Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407 (2000) 789-795
- Kurt-Jones, E.A., Beller, D.I., Mizel, S.B., Unanue, E.R. Identification of a membrane-associated interleukin-1 in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (1985) 1204-1208
- Lan, H.Y., Nikolic-Paterson, D.J., Mu, W., Vannice, J.L., Atkins, R.C. Interleukin-1 receptor antagonist halts the progression of established crescentic glomerulonephritis in the rat. *Kidney Int.* 47 (1995) 1303-1309
- Lau, A.H. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney Int.* 56 (1999) 1295-1298
- Lawen, A. Apoptosis - an introduction. *BioEssays* 25 (2003) 888-896
- Ledebur, H.C., Parks, T.P. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 933-943
- Leist, M., Jaattela, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 (2001) 589-598
- Lemay, S., Rabb, H., Postler, G., Singh, A.K. Prominent and sustained up-regulation of gp130-signaling cytokines and the chemokine MIP-2 in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 69 (2000) 959-963
- Li, Y.J., Ding, W.H., Gao, W., Huo, Y., Hong, T., Zhu, R.Y., Ma, D.L. The protective effect of interleukin-1 receptor antagonist on post-

- ischemic reperfused myocardium and its possible mechanism. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 84 (2004) 548-553
- Lieberthal, W. Biology of acute renal failure: Therapeutic implications. *Kidney Int.* 52 (1997) 1102-1115
- Ling, H., Gengaro, P.E., Edelstein, C.L., Martin, P.Y., Wangsiripaisan, A., Nemenoff, R., Schrier, R.W. Effect of hypoxia on proximal tubules isolated from nitric oxide synthase knockout mice. *Kidney Int.* 53 (1998) 1642-1646
- Loddick, S.A., Rothwell, N.J. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16 (1996) 932-940
- Mahr, S., Neumayer, N., Gerhard, M., Classen, M., Prinz, C. IL-1beta-induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF-kappaB, and Bax protein. *Gastroenterology* 118 (2000) 515-524
- Martin, D., Chinookoswong, N., Miller, G. The interleukin-1 receptor antagonist (rhIL-1ra) protects against cerebral infarction in a rat model of hypoxia-ischemia. *Exp. Neurol.* 130 (1994) 362-367
- Martin, M.U., Wesche, H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592 (2002) 265-280
- Mason, J., Welsch, J., Torhorst, J. The contribution of vascular obstruction to the functional defect that follows renal ischemia. *Kidney Int.* 31 (1987) 65-71
- McIntyre, K.W., Stepan, G.J., Kolinsky, K.D., Benjamin, W.R., Plocinski, J.M., Kaffka, K.L., Campen, C.A., Chizzonite, R.A., Kilian, P.L. Inhibition of interleukin 1 (IL-1) binding and bioactivity in vitro and modulation of acute inflammation in vivo by IL-1 receptor antagonist and anti-IL-1 receptor monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 173 (1991) 931-939

- Menger, M.D., Rücker, M., Vollmar, B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock*. 8 (1997) 2-7
- Merhi-Soussi, F., Berti, M., Wehrle-Haller, B., Gabay, C. Intracellular interleukin-1 receptor antagonist type 1 antagonizes the stimulatory effect of interleukin-1 α precursor on cell motility. *Cytokine* 32 (2005) 163-170
- Meyer, C., Paulay, G. CGDP-DNA Amplification. Part 1. Stand: 2005 URL: <http://www.flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html> (abgerufen am 18. Juli 2009)
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D.J., Dong, Z., Venkatachalam, M.A., Saikumar, P. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 18361-18374
- Minami, M., Kuraishi, Y., Yabuuchi, K., Yamazaki, A., Satoh, M. Induction of interleukin-1 beta mRNA in rat brain after transient forebrain ischemia. *J. Neurochem.* 58 (1992) 390-392
- Miwa, K., Asano, M., Horai, R., Iwakura, Y., Nagata, S., Suda, T. Caspase 1-independent IL-1 β release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nat. Med.* 4 (1998) 1287-1292
- Molitoris, B.A., Chan, L.K., Shapiro, J.I., Conger, J.D., Falk, S.A. Loss of epithelial polarity: a novel hypothesis for reduced proximal tubule Na⁺ transport following ischemic injury. *J. Membr. Biol.* 107 (1989) 119-127
- Molitoris, B.A., Sutton, T.A. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. *Kidney Int.* 66 (2004) 496-499
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 (1986) 263-273

- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G.S., Dixit, V. M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2926–2930
- Nashan, D., Luger, T.A. Interleukin 1 (Teil 2: Wirkungsmechanismen und therapeutische Möglichkeiten). *Hautarzt*, 50 (1999b) 756-763
- Nathan, C.F. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* 79 (1987) 319-326
- Neish, A.S., Williams, A.J., Palmer, H.J., Whitley, M.Z., Collins, T. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J. Exp. Med.* 176 (1992) 1583-1593
- Neri, F., Puviani, L., Tsivian, M., Prezzi, D., Pacilé, V., Cavallari, G., Bertelli, R., Bianchi, E., Piras, G.L., Pariali, M., Cavalieri, B., Bertini, R., Faenza, A., Nardo, B. Protective effect of an inhibitor of interleukin-8 (meraxin) from ischemia and reperfusion injury in a rat model of kidney transplantation. *Transplant Proc.* 39 (2007) 1771-1772
- Noiri, E., Gailit, J., Sheth, D., Magazine, H., Gurrath, M., Muller, G., Kessler, H., Goligorsky, M.S. Cyclic RGD peptides ameliorate ischemic acute renal failure in rats. *Kidney Int.* 46 (1994) 1050–1058
- Noiri, E., Peresleni, T., Miller, F., Goligorsky, M.S. In vivo targeting of inducible NO synthase with oligodeoxynucleotides protects rat kidney against ischemia. *J. Clin. Invest.* 97 (1996) 2377–2383
- Ohlsson, K., Bjork, P., Bergenfeldt, M., Hageman, R., Thompson, R.C. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 348 (1990) 550-552
- Okusa, M.D. The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure. *Nephron* 90 (2002) 133-138
- Oltvai, Z., Milliman, C., Korsmeyer, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved Homolog, Bax, that accelerates Programmed Cell Death. *Cell* 74 (1993) 609-619

- Osborn, L., Kunkel, S., Nabel, G.J. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (1989) 2336–2340
- Padanilam, B.J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 284 (2003) F608-627
- Patterson, D., Jones, C., Hart, I., Bleskan, J., Berger, R., Geyer, D., Eisenberg, S.P., Smith, M.F. Jr., Arend, W.P. The human interleukin-1 receptor antagonist (IL1RN) gene is located in the chromosome 2q14 region. *Genomics* 15 (1993) 173–76
- Peresleni, T., Noiri, E., Bahou, W.F., Goligorsky, M.S. Antisense oligodeoxynucleotides to inducible NO synthase rescue epithelial cells from oxidative stress injury. *Am. J. Physiol.* 270 (1996) F971–F977
- Pfaffl, M.W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1 (2004) 92-95
- Philchenkov, A. Caspase: potential targets for regulating cell death. *J. Cell. Mol. Med.* 8 (2004) 432–444
- Pinteaux, E., Rothwell, N.J., Boutin, H. Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia. *Glia* 53 (2006) 551-556
- Prodjosudjadi, W., Gerritsma, J.S., Klar-Mohamad, N., Gerritsen, A.F., Bruijn, J.A., Daha, M.R., van Es, L.A. Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 48 (1995) 1477-1486
- Rabb, H., Daniels, F., O'Donnell, M., Haq, M., Saba, S.R., Keane, W., Tang, W.W. Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279 (2000) F525-531

- Rabb, H., Mendiola, C.C., Dietz, J., Saba, S.R., Issekutz, T.B., Abanilla, F., Bonventre, J.V., Ramirez, G. Role of CD11a and CD11b in ischemic acute renal failure in rats. *Am. J. Physiol.* 267 (1994) F1052-1058
- Rabb, H., Mendiola, C.C., Saba, S.R., Dietz, J.R., Smith, C.W., Bonventre, J.V., Ramirez, G. Antibodies to ICAM-1 protect kidneys in severe ischemic reperfusion injury. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 211 (1995) 67-73
- Rabb, H., O'Meara, Y.M., Maderna, P., Coleman, P., Brady, H.R. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 51 (1997) 1463-1468
- Racusen, L.C., Fivush, B.A., Li, Y.L., Slatnik, I., Solez, K. Dissociation of tubular cell detachment and tubular cell death in clinical and experimental "acute tubular necrosis". *Lab. Invest.* 64 (1991) 546-556
- Rice, J.C., Spence, J.S., Yetman, D.L., Safirstein, R.L. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney. *Ren. Fail.* 24 (2002) 703-723
- Rollins, B.J., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Pober, J.S. Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE. *Am. J. Pathol.* 136 (1990) 1229-1233
- Rovin, B.H., Yoshimura, T., Tan, L. Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J. Immunol.* 148 (1992) 2148-2153
- Rudinskaya, A., Trock, D.H. Successful treatment of a patient with refractory adult-onset Still's disease with anakinra. *J. Clin. Rheumatol.* 9 (2003) 330-332
- Rupinder, S.K., Gurpreet, A.K., Manjeet, S. Cell suicide and caspases. *Vascul. Pharmacol.* 46 (2007) 383-393
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. Primer-Directed Enzymatic Amplification of

- DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (1988) 487–491
- Saikumar, P., Dong, Z., Patel, Y., Hall, K., Hopfer, U., Weinberg, J.M., Venkatachalam, M.A. Role of hypoxia-induced Bax translocation and cytochrome c release in reoxygenation injury. *Oncogene* 17 (1998) 3401-3415
- Sakahira, H., Enari, M., Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391 (1998) 96-99
- Sato, T., Irie, S., Krajewski, S., Reed, J.C. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl-2 protein. *Gene* 140 (1994) 291-292
- Schelling, J.R., Nkemere, N., Kopp, J.B., Cleveland, R.P. Fas-dependent fratricidal apoptosis is a mechanism of tubular epithelial cell deletion in chronic renal failure. *Lab. Invest.* 78 (1998) 813–824
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T.K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D.M., Bazan, J.F., Kastelein, R.A. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 23 (2005) 479–490
- Schmitz, V., Schaser, K.D., Olschewski, P., Neuhaus, P., Puhl, G. In vivo visualization of early microcirculatory changes following ischemia/reperfusion injury in human kidney transplantation. *Eur. Surg. Res.* 40 (2008) 19-25
- Schreuder, H., Tardif, C., Trump-Kallmeyer, S., Soffientini, A., Sarubbi, E., Akeson, A., Bowlin, T.L., Yanofsky, S., Barrett, R.W. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature* 386 (1997) 194–200
- Schrier, R.W., Wang, W., Poole, B., Mitra, A. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 5–14

- Schumer, M., Colombel, M.C., Sawczuk, I.S., Gobé, G., Connor, J., O'Toole, K.M., Olsson, C.A., Wise, G.J., Buttyan, R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am. J. Pathol.* 140 (1992) 831-838
- Schürmann, G. Zelladhäsion Molekulare Grundlagen und erste Aspekte für die Chirurgie. *Chirurg* 68 (1997) 477-487
- Seckinger, P., Williamson, K., Balavoine, J.F., Mach, B., Mazzei, C., Shaw, A., Dayer, J.M. A urine inhibitor of interleukin-1 activity affects both interleukin-1 alpha and -1 beta but not tumor necrosis factor beta. *J. Immunol.* 139 (1987a) 1541-1545
- Seckinger, P., Lowenthal, J.W., Williamson, K., Dayer, J.M., MacDonald, H.R. A urine inhibitor of interleukin 1 activity that blocks ligand binding. *J. Immunol.* 139 (1987b) 1546-1549
- Shakibaei, M., Csaki, C., Nebrich, S., Mobasher, A. Resveratrol suppresses interleukin-1beta-induced inflammatory signaling and apoptosis in human articular chondrocytes: potential for use as a novel nutraceutical for the treatment of osteoarthritis. *Biochem. Pharmacol.* 76 (2008) 1426-1439
- Shirasugi, N., Wakabayashi, G., Shimazu, M., Shito, M., Kawachi, S., Kitajima, M. Interleukin-1 receptor blockade attenuates oxygen-derived free radical production and microcirculatory disturbances in ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transplant. Proc.* 29 (1997) 371-373
- Shito, M., Wakabayashi, G., Ueda, M., Shimazu, M., Shirasugi, N., Endo, M., Mukai, M., Kitajima, M. Interleukin-1 receptor blockade reduces tumor necrosis factor production, tissue injury, and mortality after hepatic ischemia-reperfusion in the rat. *Transplantation* 63 (1997) 143-148

- Shoskes, D.A., Halloran, P.F. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J. Urol.* 155 (1996) 1831-1840
- Sims, J.E. IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr. Opin. Immunol.* 14 (2002) 117-122
- Sims, J.E., Nicklin, M.J., Bazan, J.F., Barton, J.L., Busfield, S.J., Ford, J.E., Kastelein, R.A., Kumar, S., Lin, H., Mulero, J.J., Pan, J.G., Pan, Y., Smithand, D.E., Young, P.R. A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends Immunol.* 22 (2001) 536-537
- Singer, I.I., Scott, S., Hall, J.L., Limjuco, G., Chin, J., Schmidt, J.A. Interleukin-1 β is localized in the cytoplasmic ground substance but is largely absent from the Golgi apparatus and the plasma membrane of stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 167 (1988) 389-407
- Solez, K., Kramer, E.C., Fox, J.A., Heptinstall, R.H. Medullary plasma flow and intravascular leukocyte accumulation in acute renal failure. *Kidney Int.* 6 (1974) 24-37
- Solle, M., Labasi, J., Perregaux, D.G., Stam, E., Petrushova, N., Koller, B.H., Griffiths, R.J., Gabel, C.A. Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 125-132
- Springer, T.A. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346 (1990) 425-434
- Stevenson, F.T., Bursten, S.L., Fanton, C., Locksley, R.M., Lovett, D.H. The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993) 7245-7249
- Subramaniam, S., Stansberg, C., Cunningham, C. The interleukin 1 receptor family. *Dev. Comp. Immunol.* 28 (2004) 415-428
- Sung, F.L., Zhu, T.Y., Au-Yeung, K.K., Siow, Y.L., O, K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappaB. *Kidney Int.* 62 (2002) 1160-1170

- Sutton, T.A., Mang, H.E., Campos, S.B., Sandoval, R.M., Yoder, M.C., Molitoris, B.A. Injury of the renal microvascular endothelium alters barrier function after ischemia. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 285 (2003) F191-198
- Suzuki, K., Murtuza, B., Smolenski, R.T., Sammut, I.A., Suzuki, N., Kaneda, Y., Yacoub, M.H. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. *Circulation* 104 (2001) 1308-1313
- Suzuki, S., Toledo-Pereyra, L.H. Interleukin-1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 57 (1994) 253-258
- Takada, M., Chandraker, A., Nadeau, K.C., Sayegh, M.H., Tilney, N.L. The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 100 (1997a) 1199-1203
- Takada, M., Nadeau, K.C., Shaw, G.D., Marquette, K.A., Tilney, N.L. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J. Clin. Invest.* 99 (1997b) 2682-2690
- Tang, W.W., Feng, L., Vannice, J.L., Wilson, C.B. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates experimental anti-glomerular basement membrane antibody-associated glomerulonephritis. *Clin. Invest.* 93 (1994) 273-279
- Tesch, G.H., Lan, H.Y., Atkins, R.C., Nikolic-Paterson, D.J. Role of interleukin-1 in mesangial cell proliferation and matrix deposition in experimental mesangioproliferative nephritis. *Am. J. Pathol.* 151 (1997) 141-150
- Thadhani, R., Pascual, M., Bonventre, J.V. Acute renal failure. *N. Engl. J. Med.* 334 (1996) 1448-1460
- Thornberry, N. A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins,

- J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F.J., Chin, J., et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature* 356 (1992) 768–774
- Tichy, A. Apoptotic machinery: the Bcl-2 family proteins in the role of inspectors and superintendents. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 49 (2006) 13-18
- Toyokuni, S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol. Int.* 49 (1999) 91–102
- Truong, L.D., Petrusevska, G., Yang, G., Gurpinar, T., Shappell, S., Lechago, J., Rouse, D., Suki, W.N. Cell apoptosis and proliferation in experimental chronic obstructive uropathy. *Kidney Int.* 50 (1996) 200–207
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228 (1985) 1440-1443
- Tullius, S.G., Tilney, N.L. Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation* 59 (1995) 313-318
- van de Stolpe, A., van der Saag, P.T. Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* 74 (1996) 13-33
- Venkatachalam, M.A., Bernard, D.B., Donohoe, J.F., Levinsky, N.G. Ischemic damage and repair in the rat proximal tubule: differences among the S1, S2, and S3 segments. *Kidney Int.* 14 (1978) 31-49
- Vigers, G., Anderson, L., Caffes, P., Brandhuber, B.J. Crystal structure of the type-1 interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1 β . *Nature* 386 (1997) 190–194
- Vinuesa, E., Hotter, G., Jung, M., Herrero-Fresneda, I., Torras, J., Sola, A. Macrophage involvement in the kidney repair phase after ischaemia/ reperfusion injury. *J. Pathol.* 214 (2008) 104-113
- Vollmar, B., Menger, M.D. Rolle der Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. *TransplantLinc* 1 (2004) 24-34

- Wang, Q., Zhang, H., Zhao, B., Fei, H. IL-1beta caused pancreatic beta-cells apoptosis is mediated in part by endoplasmic reticulum stress via the induction of endoplasmic reticulum Ca(2+) release through the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol. Cell Biochem.* 324 (2009) 183-190
- Waterhouse, N.J., Ricci, J.E., Green, D.R. And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis. *Biochimie* 84 (2002) 113-121
- Webb, A.C., Collins, K.L., Auron, P.E., Eddy, R.L., Nakai, H., Byers, M.G., Haley, L.L., Henry, W.M., Shows, T.B. Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. *Lymphokine Res.* 5 (1986) 77-85
- Weinberg, J.M. The cell biology of ischemic renal injury. *Kidney Int.* 39 (1991) 476-500
- Werman, A., Werman-Venkert, R., White, R., Lee, J.K., Werman, B., Krelin, Y., Voronov, E., Dinarello, C.A., Apte, R.N. The precursor form of IL-1 α is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 2434-2439
- Wesche, H., Korherr, C., Kracht, M., Falk, W., Resch, K., Martin, M.U. The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress-activated protein kinases (SAP kinases). *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7727-7731
- Wilhelm, S.M., Simonson, M.S., Robinson, A.V., Stowe, N.T., Schulak, J.A. Endothelin up-regulation and localization following renal ischemia and reperfusion. *Kidney Int.* 55 (1999) 1011-1018
- Williams, J.M., DeLoria, D., Hansen, J.A., Dinarello, C.A., Loertscher, R., Shapiro, H.M., Strom, T.B. The events of primary T cell activation can be staged by use of sepharose-bound anti-T3 (64.1) monoclonal antibody and purified interleukin-1. *J. Immunol.* 135 (1985) 2249-2255

- Wirthensohn, G., Guder, W.G. Renal substrate metabolism. *Physiol. Rev.* 66 (1986) 469-497
- Wolfs, T.G., de Vries, B., Walter, S.J., Peutz-Kootstra, C.J., van Heurn, L.W., Oosterhof, G.O., Buurman, W.A. Apoptotic cell death is initiated during normothermic ischemia in human kidneys. *Am. J. Transplant.* 5 (2005) 68-75
- Yamagishi, H., Yokoo, T., Imasawa, T., Mitarai, T., Kawamura, T., Utsunomiya, Y. Genetically modified bone marrow-derived vehicle cells site specifically deliver an anti-inflammatory cytokine to inflamed interstitium of obstructive nephropathy. *J. Immunol.* 166 (2001) 609-616
- Yang, G.Y., Mao, Y., Zhou, L.F., Ye, W., Liu, X.H., Gong, C., Lorriss Betz, A. Attenuation of temporary focal cerebral ischemic injury in the mouse following transfection with interleukin-1 receptor antagonist. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 72 (1999a) 129-137
- Yang, G.Y., Mao, Y., Zhou, L.F., Gong, C., Ge, H.L., Betz, A.L. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) is reduced in permanent focal cerebral ischemic mouse brain using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 65 (1999b) 143-150
- Yang, G.Y., Zhao, Y., Davidson, B.L., Betz, A.L. Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain reduces ischemic brain injury. *Brain Res.* 751 (1997) 181-188
- Yaqoob, M., Edelstein, C.L., Wieder, E.D., Alkhunaizi, A.M., Gengaro, P.E., Nemenoff, R.A., Schrier, R.W. Nitric oxide kinetics during hypoxia in proximal tubules: Effects of acidosis and glycine. *Kidney Int.* 49 (1996) 1314-1319
- Zhang, W., Smith, C., Howlett, C., Stanimirovic, D. Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1beta. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20 (2000) 967-978

-
- Zimmermann, K.C., Green, D.R. How cells die: Apoptosis pathways. *J. Allergy Clin. Immunol.* 108 (2001) 99-103
- Zoja, C., Wang, J.M., Bettoni, S., Sironi, M., Renzi, D., Chiaffarino, F., Abboud, H.E., Van Damme, J., Mantovani, A., Remuzzi, G. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α induce gene expression and production of leukocyte chemotactic factors, colony-stimulating factors, and interleukin-6 in human mesangial cells. *Am. J. Pathol.* 138 (1991) 991-1003

9 Danksagung

Für die Überlassung des Themas möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Uwe Heemann bedanken. Daneben danke ich Herrn PD Dr. med. Jens Lutz für seine engagierte Betreuung bei der Durchführung der Studie, der Auswertung der Daten und der Fertigstellung der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des nephrologischen Forschungslabors, insbesondere bei Krisztina Rusai und Hai Huang, für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank gilt außerdem Frau Sandra Haderer für ihre exzellente technische Unterstützung.

Ganz besonders danke ich auch meinen Eltern und meiner Freundin Monika Riepl für die geduldige Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit.