



Fakultät für Medizin

Charakterisierung der Rolle von STAT1 Signalwegen bei renalem Ischämie/Reperfusionsschaden

Quirin Maximilian Bachmann

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

Vorsitzender:		Prof. Dr. Ernst J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:	1.	apl. Prof. Dr. Marcus Baumann
	2.	Prof. Dr. Dr. h.c. Uwe Heemann

Die Dissertation wurde am 28.10.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.03.2022 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Innate und adaptive Immunität.....	2
1.2 TLR4-Signalweg	3
1.3 JAK2/STAT1-Signalweg.....	4
1.4 TLR4/STAT1-Signalintegration.....	4
1.5 Die akute Nierenschädigung	5
1.6 Ursache der akuten Nierenschädigung	5
1.7 Pathophysiologie des Ischämie/Reperfusionsschadens	6
1.8 STAT1 im Kurzzeitverlauf nach Ischämie/Reperfusionsschaden	9
1.9 Fibrose im Langzeitverlauf nach akuter Nierenschädigung	10
1.10 Fragestellung	11
2 Methoden	12
2.1 In vitro: Isolation von primären proximalen Tubuluszellen und Zellkultur... 12	
2.1.1 Protokoll.....	12
2.1.2 Zusammensetzung K1-Medium.....	12
2.1.3 Zellkultur	13
2.1.4 Behandlungsprotokolle.....	13
2.1.5 Hypoxie	14
2.2 In vivo: Renale Ischämie-Reperfusion im Tiermodell	14
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	16
2.3.1 Western Blot Proteinanalyse	16
2.3.2 Elisa.....	18
2.3.3 Real time quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	19
2.3.4 Klassische PCR.....	22
2.3.5 Histologie	23

2.4 Statistik	23
3 Materialien.....	24
3.1 Kits	24
3.2 Chemikalien	24
3.3 Software.....	25
3.4 Geräte.....	25
3.5 Einwegmaterialien	26
4 Ergebnisse.....	28
4.1 STAT1 abhängige Signalintegration in proximalen Tubuluszellen	28
4.2 Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in vitro.....	31
4.3 STAT1-Phosphorylierung durch Hypoxie in vitro	32
4.4 STAT1-Phosphorylierung in vitro durch Ischämie-Reperfusion	33
4.5 Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch Typ I IFN nach Ischämie/Reperfusion	35
4.6 Phänotyp des STAT1-Knockouts im Kurzzeitverlauf nach Ischämie/Reperfusion	36
4.7 In vivo STAT1-Inhibition nach Ischämie/Reperfusion.....	39
4.8 STAT1 abhängige Fibrose im Langzeitverlauf nach Ischämie/Reperfusion ...	40
5 Diskussion	43
5.1 Eine TLR4-STAT1-Signalintegration in TECs findet statt.....	43
5.2 JAK/STAT-Inhibitoren unterbrechen die Signalintegration	45
5.3 STAT1 ^{-/-} verhindert Chemokinproduktion nach oxidativem Stress	45
5.4 STAT1 wird bei renalem I/R aktiviert	46
5.5 STAT1-Defizienz schützt vor akuter Tubulusnekrose im renalen I/R.....	46
5.6 Akute Tubulusnekrose bleibt bei pharmakologischer STAT1-Inhibition unverändert.....	48
5.7 STAT1 schützt vor Fibrose im Langzeitverlauf nach Ischämie/Reperfusion .	49

5.8 Der STAT1-abhängige Makrophagenphänotyp beeinflusst den Fibrosegrad	50
5.9 Unsere Ergebnisse im Kontext anderer Untersuchungen.....	50
5.10 Fazit.....	51
6 Zusammenfassung.....	53
7 Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen.....	54
8 Anhang.....	55
9 Abkürzungsverzeichnis.....	57
10 Literaturverzeichnis.....	59

1 Einleitung

Der Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R) stellt die Hauptursache einer akuten Nierenschädigung (AKI, engl. Acute kidney injury) dar, insbesondere bei Sepsis, Multiorganversagen und verzögertem Funktionseintritt der Transplantatniere (Schrier et al. 2004). Eine spezifische Behandlungsmöglichkeit existiert nicht (Schrier et al. 2004, Kellum et al. 2008). Die Therapie bleibt auf supportive Maßnahmen und präventive Strategien limitiert. Trotz Nierenersatzverfahren mittels Dialyse ist die Mortalität bei Patienten mit AKI hoch. Pathophysiologisch handelt es sich beim I/R um eine Episode von reduziertem Blutfluss mit nachfolgender Restitution der Durchblutung. Insbesondere im Rahmen der Reperfusion kommt es durch Infiltration von immunkompetenten Zellen zu einer Aktivierung des innaten (angeborenen), aber auch des adaptiven Immunsystems.

Einerseits kommt es durch die Freisetzung verschiedener Zytokine (z.B. Interferone (IFN)) zu einer Aktivierung des Januskinase 2/Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (JAK2/STAT1) Signalweges, welcher an vielen regulierenden Prozessen im menschlichen Körper beteiligt ist. Er wird unter anderem durch Zytokine aktiviert (Aaronson et al. 2002). Andererseits spielt eine Aktivierung des Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)-Signalweges beim I/R über sogenannte Danger-Moleküle (DAMPs, engl. danger-associated molecular patterns) eine herausragende Bedeutung (Tsong et al. 2005, Mudaliar et al. 2013). Bei Untersuchungen in der Pathophysiologie der Artherosklerose konnte gezeigt werden, dass eine simultane Aktivierung des TLR4-Signalweges zu einer Potenzierung der Zielgenexpression beider Signalwege führt (Schroder et al. 2006). Dies scheint STAT1 vermittelt zu sein. Interessanter Weise passiert dies auch in nicht-Immunzellen, wie zum Beispiel (z.B.) Endothelzellen (Sikorski et al. 2011, Sikorski et al. 2012).

Ob dieser pathophysiologische Prozess in der Niere eine Rolle spielt, wurde bisher nicht untersucht. Es ist zwar bekannt, dass die Unterbrechung des JAK2/STAT1-Signalweges bei I/R von Gehirn, Herz und Leber einen protektiven Effekt hat, es gibt jedoch keine Studien in welchen dies im I/R der Niere untersucht wurde (Freitas et al. 2010, Ebner et al. 2011, McCormick et al. 2012). Ergibt sich auch in der Niere ein

Phänotyp, lässt sich weiter die Frage stellen, ob etwaige Effekte einer Inhibierung von STAT1 auf eine Unterbrechung der Signalintegration zwischen JAK/STAT1 und TLR4-Signalweg zurückzuführen ist. Proximale epitheliale Tubuluszellen (TECs, engl. proximal tubular epithelial cells) gehören zu den im renalen I/R am stärksten geschädigten Zellen, was sich histopathologisch mit dem Bild der akuten Tubulusnekrose zeigt (Sheridan et al. 2000).

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine STAT1 vermittelte Signalintegration von innatem und adaptivem Immunsystem auch in TECs stattfindet und deshalb diese erheblich zur Rekrutierung von Leukozyten beitragen. Zudem soll die Frage beantwortet werden, ob eine Inhibierung von STAT1 protektive Effekte auf I/R der Niere hat.

1.1 Innate und adaptive Immunität

Das Immunsystem setzt sich aus einem innaten unspezifischen und einem adaptiven spezifischen Teil zusammen. Die erste Barriere des innaten Immunsystems ist physikalischer und chemischer Natur und besteht aus Haut und Schleimhäuten. Auf zellulärer Ebene erkennt eine Gruppe von Rezeptoren, genannt pattern recognition receptors (PPRs), die vornehmlich von Immunzellen, wie zum Beispiel natürlichen Killerzellen, dendritischen Zellen oder Makrophagen exprimiert werden, bestimmte mikrobielle oder körpereigene Pathogene. Diese durch die sogenannten pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) provozierte Immunantwort ist unspezifisch und läuft auch bei wiederholtem Kontakt mit dem selben PAMP stets gleich ab (Cruvinel Wde et al. 2010). Ein wichtiger Vertreter der PPRs ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR) (Janeway et al. 2002). Die adaptive Immunität zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, auf einzelne Krankheitserreger mit einem gezielten Abwehrmechanismus zu reagieren. Ausschlaggebend dafür sind Lymphozyten, die die Fähigkeit besitzen Antikörper zu bilden und die Information darüber in Gedächtniszellen zu speichern (Boehm et al. 2014). So entsteht nach dem ersten Kontakt zu einem Erreger eine Immunität, die bei wiederholter Exposition eine wirksame und spezifische Antwort triggert.

Um eine wirksame Immunität aufzubauen, greifen die beiden Systeme an vielen Schnittstellen ineinander und ergänzen sich. Zytokine dienen der Regulierung und Koordination des Immunsystems. Es handelt sich um sezernierte Proteine, die viele verschiedene Funktionen ausüben (Shachar et al. 2013). Eine große Subgruppe dieser Zytokine sind Chemokine, die von vielen Zellen des Körpers gebildet werden und die Bewegung von Immunzellen regulieren (Palomino et al. 2015). Viele dieser Zytokine und Chemokine triggern den JAK/STAT-Signalweg der in vielen Bereichen der innaten und adaptiven Immunität eine Rolle spielt und diese dirigiert (Shuai et al. 2003).

1.2 TLR4-Signalweg

Die zu den PPRs gehörenden TLRs wurden ursprünglich als Rezeptoren entdeckt, die als Teil der innaten Immunität Fragmente von Mikroorganismen wie Lipopolysaccharid (LPS) binden (O'Neill et al. 2013). Bis heute sind 10 verschiedene TLR beim Menschen bekannt, die unterschiedliche PAMPs erkennen (Medzhitov 2001, Delneste et al. 2007). Zu diesen gehören LPS, bakterielle Lipoproteine und Doppelstrang-RNA. TLRs erkennen auch endogene Strukturen, die so genannten danger-associated molecular patterns (DAMPs). DAMPs werden unter Stress, beziehungsweise bei Zelltod freigesetzt. Es handelt sich um eine heterogene Gruppe die von Teilen extrazellulärer Matrix (Hyaluronfragmente) über intrazelluläre Proteine (heat-shock Proteine, HMGB1) bis zu Purinmetaboliten (ATP, GTP) und RNA bzw. DNA reicht. So bindet zum Beispiel RNA, die physiologischer Weise extrazellulär nicht vorkommt an TLR3 und HMGB1 an TLR4 (Tsong et al. 2005, Bernard et al. 2012). Betrachtet man diesen Umstand, wird klar, dass die innate Immunität keineswegs nur an der Abwehr fremder Organismen beteiligt ist, sondern auch an vielen sterilen Entzündungsprozessen (Keogh et al. 2011).

LPS bindet an einen Rezeptorkomplex aus TLR4/MD2 und CD14. Via einer Interaktion der Proteine MyD88 und TIRAP wird eine Internalisierung des TLR4/MD2-LPS eingeleitet und durch TRIF und TRAM werden die Transkriptionsfaktoren IRF3/7 und NFκB aktiviert (Bryant et al. 2015). Diese steigern die Expression proinflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel Typ I

Interferon (IFN α) und Chemokine wie das Monozyten chemoattraktive Protein-1 (MCP-1) (Ishikado et al. 2009, Plociennikowska et al. 2016).

1.3 JAK2/STAT1-Signalweg

Die JAK/STAT-Kaskade besteht aus einem Zelloberflächenrezeptor, einer JAK und zwei STAT-Proteinen (Aaronson et al. 2002). Die Familie der JAK-Rezeptoren umfasst JAK1-3 und Tyrosinkinase 2 (TYK2); es gibt 7 verschiedene STAT-Proteine. Die Bandbreite der Zelloberflächenrezeptoren ist groß, typischer Weise handelt es sich um Rezeptoren für Wachstumshormone und Zytokine. Die Bindung von Interferonen wie IFN γ oder IFN β an deren Rezeptor bedingt eine Dimerisierung zweier Rezeptor-Kinase-Komplexe und erhöht die Kinaseaktivität von JAK2, so dass STAT1-Proteine an Tyrosin 701 und Serin 727 phosphoryliert werden (Sanceau et al. 2000, Wesoly et al. 2007). Diese dissoziieren vom Rezeptor/JAK-Komplex und bilden ein Homodimer, das in den Zellkern migriert und als Transkriptionsfaktor wirksam ist. Dort aktiviert das Homodimer Gene die eine IFN γ activation site (GAS) enthalten.

1.4 TLR4/STAT1-Signalintegration

Es ist bekannt dass eine simultane Aktivierung von TLR4- und JAK/STAT1-Signalwegen zu einer starken Erhöhung der Expression bestimmter Gene führt (Hu et al. 2007). IFN γ stimuliert den JAK/STAT-Signalweg und verursacht eine Phosphorylierung von STAT1. LPS kann über TLR4 ebenfalls eine Phosphorylierung von STAT1 bedingen (Hertzog et al. 2003). Deshalb wird vermutet, dass die Aktivierung von STAT1 durch beide Signalwege zu einer Superaktivierung von STAT1 führt (Schroder et al. 2006). Der Zusammenhang wurde zuerst in Makrophagen nachgewiesen, kommt aber auch in nicht-Immunzellen wie Endothelzellen oder glatten Muskelzellen vor und ist so Teil der Pathogenese der Atherosklerose (Hu et al. 2008, Sikorski et al. 2012, Chmielewski et al. 2014). IP-10 ist ein Chemokin mit chemoattraktiver Wirkung auf Monozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Es wird von Immunzellen produziert, die mit IFN α , IFN γ oder LPS stimuliert werden (Dufour et al. 2002). Stimuliert man Endothelzellen oder glatte

Muskelzellen mit LPS nach Vorbehandlung mit IFN γ kommt es zu einer erheblichen Steigerung der Expression von IP-10 (Sikorski et al. 2011). Da beide Signalwege auch bei AKI aktiv sind, wäre es möglich, dass auch dabei die Signalintegration eine Rolle spielt (Wu et al. 2007, Yang et al. 2008).

1.5 Die akute Nierenschädigung

Um eine einheitliche Diagnose des unspezifischen Begriffs des akuten Nierenversagens zu ermöglichen, wurde 2007 der spezifische Begriff der AKI definiert. AKI kann diagnostiziert werden, wenn binnen 48 Stunden relative oder absolute Kreatininwerte überschritten werden bzw. die Urinproduktion unter einen Grenzwert sinkt (Mehta et al. 2007). Das hat den Verlust der Fähigkeit Stoffwechselprodukte auszuschcheiden, Urin zu konzentrieren und den Flüssigkeit – und Elektrolythaushalt auszugleichen zur Folge. Grund ist eine plötzliche Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (Nissenson 1998). Die hohe Mortalität (50 – 80% bei auf Intensivversorgung angewiesener Patienten) hat sich seit Einführung der Hämodialyse nicht verringert und macht es zu einem bedeutenden Problem (Star 1998, Schrier et al. 2004).

1.6 Ursache der akuten Nierenschädigung

Der I/R ist die häufigste Ursache für AKI, da es nicht nur bei Einschränkung des Flusses in den Nierenarterien (zum Beispiel (z.B.) Nierenarterienstenose) zur Ischämie kommt, sondern auch Hypovolämie, Sepsis oder Multiorganversagen mögliche Auslöser von Ischämie und Tubulusnekrose sind (Mehta et al. 2004). Bei diesen Prozessen spielt unter anderem der tubuloglomeruläre Feedbackmechanismus eine Rolle (Mason et al. 1978, Thurau 1983). Unter physiologischen Bedingungen verhindert dieser eine Überladung des Nephrons mit Primärharn. In der Macula densa des juxtaglomerulären Apparats werden NaCl-Konzentration und Harnfluss gemessen. Kommt es zu hohen NaCl-Konzentrationen schütten Zellen der Macula densa Adenosin aus, das in dem dazugehörigen Vas afferens eine Vasokonstriktion auslöst und so die GFR verringert (Schnermann et al.

1990). Werden TECs geschädigt, vermindert sich deren Fähigkeit zur NaCl-Resorption und der juxtaglomeruläre Apparat verringert die GFR. Passiert dies in einer Vielzahl von Nephronen, nimmt die gesamte GFR der Niere ab. So kommt es aufgrund einer erhöhten tubuloglomerulären Rückkopplung zu einer Vasokonstriktion, die die Ischämie verstärkt (Oken 1984, Bonventre 1993). Auch gerade bei transplantierten Nieren ist sowohl die Phase der kalten Ischämie als auch die darauffolgende Reperfusion Ursache für die verschiedenen pathologischen Prozesse. Zu ihnen gehören post-Transplantations Oligurie, gesteigerte immunologische Aktivität im Allograft, Episoden von akuten Abstoßungsreaktionen und verringertes Langzeitüberleben (Perico et al. 2004). In diesem Kontext konnte eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigen, dass die Länge der Ischämie mit verringertem Transplantatlangzeitüberleben und erhöhter Mortalität des Empfängers assoziiert ist (Debout et al. 2015).

Trotz der Verwendung präventiver Maßnahmen und Fortschritten in der Dialyse haben sich Mortalität und Morbidität des akuten Nierenversagens insgesamt kaum gebessert (Thadhani et al. 1996).

1.7 Pathophysiologie des Ischämie/Reperfusionsschadens

Der Ischämie/Reperfusionsschaden ist gekennzeichnet durch eine Periode initialer totaler oder partieller Restriktion der Blutzufuhr gefolgt von einer Wiederherstellung des Blutflusses. Dabei kommt es zu mikrovaskulären, tubulären und inflammatorischen Prozessen, die im Falle der Niere zum Endorganschaden beitragen, aber auch systemisch wirksam werden können (Tracz et al. 2007). Die Ischämie löst eine Hypoxie aus, was zu einer Unterbrechung der Atmungskette führt. Den TECs des proximalen Teils der Henle-Schleife fehlt, verglichen mit TECs aus dem dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife, die Fähigkeit zu anaeroben Glykolyse (Bonventre et al. 2004). So kommt es zur Erschöpfung von ATP und damit zu Verschiebungen des Elektrolythaushalts und zu Azidose, aber auch zu regulierter Nekrose und Apoptose (Padanilam 2003). Allerdings ist gerade die Phase der Reperfusion mit Leukozyteninfiltration und starker Inflammation, die auf

verschiedenen Wegen Zelltod auslöst, als Urheber eines Großteils der Schädigung anzusehen.

Mikrozirkulationsstörung

Anders als im Tiermodell, bei dem die Niere einer totalen Ischämie unterzogen wird, befindet sich die Niere während Hypotonie, Sepsis oder auch einer Nierenarterienstenose nur in einem teilischämischen Zustand. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Fall insbesondere das äußere Mark einer stärkeren Ischämie als der Rest der Niere ausgesetzt ist (Karlberg et al. 1983). Dieser Umstand erklärt auch, warum gerade die TECs in diesem Bereich von der Ischämie betroffen sind. Der diese Zellen versorgende Blutfluss wird von den juxtamedullären Glomeruli der inneren Rinde versorgt, die kurz nach Beendigung der Ischämie die geringste Perfusion aufweisen (Mason et al. 1983, Mason et al. 1984). Der Mechanismus hierfür begründet sich zum einen durch die in Kapitel 1.2 beschriebene tubuläre Rückkopplung, andererseits können weitere Prozesse für den Mikrozirkulationsschaden verantwortlich gemacht werden. Erhöhte Level von Endothelin-1 (ET-1), Thromboxan A₂, Leukotrienen, Adenosin und Angiotensin II sind nachweisbar (Bonventre 2003). Medikamentöse Inhibition endogener Stickstoffoxid(NO)-Produktion verschlechtert die Nierenfunktion nach Ischämie/Reperfusion, was ebenfalls die Rolle der Vasokonstriktion betont (Ozturk et al. 2001).

Inflammation im Ischämie/Reperfusionsschaden

Aufgrund von I/R werden die die Gefäße auskleidenden Endothelzellen geschädigt, was zu Schwellung und endothelialer Dysfunktion führt (Flores et al. 1972, Brodsky et al. 2002). Zusätzlich kommt es zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen. Dabei handelt es sich um Integrine, Selectine und das intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (Rabb et al. 1997, Herter et al. 2014). Dieser Umstand, die Mikrozirkulationsstörungen und die im Nierenparenchym gebildeten Zytokine und Chemokine fördern die Infiltration von Leukozyten. Unter anderem spielen TNF α , IFN β , IFN γ , IL-1 und IL-8 bei der Rekrutierung der Leukozyten eine Rolle (Daemen et al. 1999, Furuichi et al. 2002, Winterberg et al.

2013). Auch die durch Ischämie ausgelöste Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS; engl. reactive oxygen species) aktiviert Leukozyten und fördert die Produktion proinflammatorischer Signale (Ishibashi et al. 1999, Liu et al. 2016). Dabei wird sowohl das innate als auch das adaptive Immunsystem aktiviert. Neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen, Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen repräsentieren dabei die innate Immunität und stellen die unmittelbare Antwort auf den Schaden dar (Ysebaert et al. 2000), wogegen innerhalb von Stunden bis Tagen die adaptive Immunität aktiviert wird. Dabei kommt es zur Antigen-spezifischen Reifung der präsentierenden Zellen und Infiltration von T-Zellen (Rabb et al. 2000, Ysebaert et al. 2004).

Tubuluszellen im Ischämie-Reperfusionsschaden

TECs, die während der Ischämie mit am stärksten geschädigt werden, reagieren darauf einerseits mit unterschiedlichen Formen des kontrollierten Zelltods, produzieren andererseits aber auch eine große Anzahl von Mediatoren, die das Immunsystem aktivieren (Sheridan et al. 2000, Han et al. 2002). Viele dieser Prozesse laufen erst während der Reperfusion ab.

Tumornekrosefaktor- α (TNF α) wird freigesetzt und kann so die Apoptose einleiten (Furuichi et al. 2002). Intrazellulär vermitteln die Caspasen-1, -2, -3, -6, -7, -8 und -9 die Apoptose. Inhibition dieser Caspasen schützt in Tiermodellen vor Ischämie/Reperfusionsschaden (Padanilam 2003). Aufgrund der Unterbrechung der Atmungskette kommt es zu Guanosintriphosphat (GTP)-Verarmung, was ebenfalls ein Auslöser von Apoptose ist. Es konnte gezeigt werden, dass dies auch in vitro auf TECS zutrifft (Kelly et al. 2003). Ein weiterer Weg des kontrollierten Zelltods ist die Necroptose, ein Signalweg der regulierten Nekrose (RN), die unter anderem auch von TNF α eingeleitet werden kann und abhängig von receptor-interacting proteinkinase (RIPK)-3 zum Untergang der Zelle führt (Vandenabeele et al. 2010). Es konnte nämlich in den letzten Jahren gezeigt werden, dass das Schädigungsmuster bei der akuten Tubulusnekrose keineswegs ein ungerichteter Prozess ist, sondern vielmehr ähnlich zur Apoptose ein gerichtetes Zelltodprogramm darstellt. Anders als bei der Apoptose, kommt es dabei zur Ruptur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile strömen aus, welche an die Rezeptoren (z.B. TLR-Rezeptoren) anderer Zellen binden und dort erneut Zelltodprogramme der RN aktivieren. Letztendlich

wird ein Circulus vitiosus ausgelöst, der zum Organversagen führt. Es konnte gezeigt werden, dass TNF α vermittelte Necroptose in TECS stattfindet (Linkermann et al. 2012). Passiert dies, werden danger-associated molecular patterns (DAMPs) frei, die mittels TLR-Signalwegen eine inflammatorische Reaktion auslösen können (Kers et al. 2016).

Tubuluszellen sind aber auch selbst imstande, proinflammatorische Signale zu produzieren und so eine Immunantwort in der Niere zu triggern. Dazu gehören einerseits das Komplementsystem aktivierende Faktoren: die Produktion von C3 und C4 wurde in vivo gemessen, konnte aber nach Stimulation mit Interleukin-2 (IL-2) beziehungsweise Interferon- γ (IFN γ) auch in vitro nachgewiesen werden (Brooimans et al. 1991, Seelen et al. 1993, Sacks et al. 1996). Andererseits handelt es sich auch um eine größere Anzahl das Immunsystem beeinflussende Zytokine und Chemokine. Als erstes wurde von der Produktion von TNF α und IL-6 berichtet (Yard et al. 1992, Boswell et al. 1994). Aber auch MCP1, CCL5, IP-10 IL-1 β , IL-8 und IL-18, weitere Chemokine und das vasoaktive ET-2 können von Tubuluszellen produziert werden (Segeer et al. 2000, Gould et al. 2002, Segeer et al. 2005, Moreno et al. 2014). TLR2 und 4-Aktivierung ist in TECs präsent, so dass diese selbst vom Entzündungsgeschehen zu weiterer Chemokinproduktion angeregt werden. Verantwortlich für die Aktivierung von TLR4 ist im I/R unter anderem HMGB1, ein DAMP, welches auch bei Necroptose der Tubuluszellen freigesetzt wird und zu einer Steigerung der Aktivität von NF κ B führt (Mannon 2013, Mudaliar et al. 2013, Zhou et al. 2016).

1.8 STAT1 im Kurzzeitverlauf nach Ischämie/Reperfusionsschaden

Sowohl in Gehirn wie auch Herz ist bekannt, dass sich das Fehlen von STAT1 protektiv bei Ischämie auswirkt (Booz et al. 2002, Spudich et al. 2005, Darra et al. 2007, Scarabelli et al. 2009, Boengler et al. 2010, Hou et al. 2010, Ebner et al. 2011). Im Gehirn hat die Expression von iNOS, einer Isoform der NO-Synthase, eine Schlüsselrolle bei Entzündungsreaktionen. Sie wird unter anderem von den Transkriptionsfaktoren STAT1 und NF κ B reguliert, wobei zu den bekanntesten Induktoren IFN γ sowie LPS gehören (Green et al. 1994, Abbas et al. 2016). Eine

weitere Funktion übernimmt STAT1 in der Regulation der Autophagie, einem Weg der Zelle eigene Bestandteile abzubauen, bei I/R des Herzens. STAT1 defiziente Tiere zeigten eine geringere Infarktgröße und gleichzeitig erhöhte Autophagiemarker, was den Schluss zulässt, dass STAT1 Autophagie reduziert (McCormick et al. 2012). Die Rolle von STAT1 bei renalem I/R, insbesondere als Integrator zwischen dem adaptiven Immunsystem mittels JAK/STAT-Signalweg und dem innate Immunsystem (über TLR4) ist bisher nicht hinreichend untersucht worden.

In Anbetracht der letzten Kapitel zeigt sich jedoch, dass einerseits potentielle Induktoren von JAK/STAT2 und TLR4 im renalen I/R vorhanden zu sein scheinen und andererseits verschiedene Zusammenhänge auf eine mögliche integrative Rolle von STAT1 in diesem Prozess hinweisen. Insbesondere die TECs könnten dabei eine Schlüsselposition darstellen.

1.9 Fibrose im Langzeitverlauf nach akuter Nierenschädigung

Bis auf wenige Ausnahmen findet im Gewebe von Wirbeltieren nach entsprechender Schädigung stets eine Heilung mit Narbenbildung oder Defektheilung statt. So kann sich das Tubulointerstitium, anders als die nach der abgeschlossenen Nephrogenese definierte Zahl an Glomeruli, abhängig vom Ausmaß der ischämischen Schädigung aber insbesondere auch abhängig von den während der Reperfusion und dem darauf folgenden Heilverlauf bestehenden Bedingungen regenerieren.

Die im akuten I/R beginnende interstitielle und systemische Entzündung beeinflusst das Schicksal des Organs nicht nur zu diesem Zeitpunkt, sondern besteht und verändert sich über einen deutlich längeren Zeitraum. Das Milieu der dabei infiltrierenden Zellen und ausgeschütteten Mediatoren entscheidet dabei über Heilung und Narbenbildung bis zum Verlust des Organs (Ysebaert et al. 2000, Ysebaert et al. 2004).

Eine große Rolle in diesem Prozess spielen gewebeinfiltrierende Monozyten und bereits ortsständige Makrophagen (Lee et al. 2011). Innerhalb der letzten Jahre haben sich zunehmend Hinweise auf die Existenz unterschiedlicher Subtypen, zu Beginn stark angelehnt an die Modelle der unterschiedlichen T-Lymphozyten, finden lassen. STAT1 scheint dabei bei der Bildung klassisch aktivierter, proinflam-

matorischer (M1-)Makrophagen, im Gegensatz zu den alternativ aktivierten (M2-)Makrophagen, eine Schlüsselstelle zu besitzen (Lawrence et al. 2011, Lee et al. 2011, Lech et al. 2014, Wang et al. 2014). Unter anderem konnte nachgewiesen werden, dass STAT1-knockout (STAT1^{-/-})-Monozyten sich in erster Linie zu alternativ aktivierten Makrophagen differenzieren, wobei dies an Oberflächenmarkern, sowie dem Phänotyp der Produktion von ROS und dem Phagozytoseverhalten festgestellt werden konnte (Martinez et al. 2014).

1.10 Fragestellung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit die Inhibierung von STAT1 zu einem veränderten Outcome nach I/R führt. In der Literatur finden sich viele Hinweise, dass sowohl TLR4-Rezeptoren als auch der JAK2/STAT1-Signalweg maßgeblich am renalen I/R beteiligt sind. Deshalb soll weitergehend gezeigt werden, ob eine Signalintegration zwischen TLR4 und JAK2/STAT1 beim I/R stattfindet und diese durch eine STAT1-Defizienz verhindert wird.

Dies impliziert folgende Hypothesen:

1. Eine STAT1-abhängige Signalintegration von TLR4 abhängigem innaten Immunsystem und adaptivem (über den JAK-STAT-Signalweg regulierten) Immunsystem findet in vitro in renalen Tubulusepithelzellen statt.
2. In vivo hat die Inhibierung von STAT1 protektive Effekte im renalen I/R im Tierversuch. Hierbei sollen einerseits WT-Mäuse mit STAT1^{-/-}-Mäusen verglichen werden, andererseits könnte die Verwendung von STAT1-spezifischen Inhibitoren zusätzlich einen interventionellen Ansatz der AKI darstellen.

2 Methoden

2.1 In vitro: Isolation von primären proximalen Tubuluszellen und Zellkultur

Die Vitro Untersuchungen erfolgten an aus Mausnieren primär isolierten TECs. Da es sich dabei nicht um immortalisierte Zellen handelt, sondern diese nach wenigen Generationen versterben, ist es nötig, für einen neuen Versuch erneut primäre Zellen zu isolieren. Alle Prozeduren mit lebendigen Zellen wurden in einer Kammer mit laminarer Luftströmung unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Isolation erfolgte nach einem anerkannten, über unser Labor hinweg etabliertem, Protokoll und lautet wie folgt:

2.1.1 Protokoll

Frisch entnommene Nieren von *C57BL/6* und *STAT1*^{-/-} Mäusen wurden mit einem Skalpell auf Eis kleingehackt und mit einer Collagenaselösung (1mg/ml Kollagenase, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% Hepes (1mM) in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) für 1 Stunde bei 37°C verdaut. Die Suspension wurde durch ein Zellsieb mit 100µm (BD Falcon Cell Strainer 100µm Nylon) und dann 70µm (BD Falcon Cell Strainer 70µm Nylon) Porengröße gesiebt und abzentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit HBSS mit 3% fetalem bovinem Serum (FBS) wurden die Zellen in 10ml K1 Medium (siehe Kapitel 2.1.2) mit im Folgenden beschriebenen Zusätzen auf 100mm Zellkulturplatten (TPP) resuspendiert. Diese Mediumzusammensetzung ermöglicht die Selektion der TECs. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt. Nach dem zweiten Splitting wurden die Zellen für Experimente verwendet.

2.1.2 Zusammensetzung K1-Medium

DMEM/F12 + GlutaMAX (Gibco)	500ml
HEPES (1M, Gibco)	12,5ml
FBS (Sigma-Aldrich)	25ml
Penicillin (Sigma-Aldrich)	100U/ml
Streptomycin (Sigma-Aldrich)	100µl
Epidermal growth factor (100µg/ml, Calbiochem)	125µl
Hormonmix	5ml

Insulin (Sigma-Aldrich)	0,5mg/ml
Prostaglandin E1 (Cayman Chemical)	0,125µg/ml
3,3,5 Triiodothyronine (Sigma-Aldrich)	3,38ng/ml
Hydrocortison (Sigma-Aldrich)	1,8µg/ml
Transferrin (Sigma-Aldrich)	0,5mg/ml
Sodium Seletine (Sigma-Aldrich)	0,5mg/ml

2.1.3 Zellkultur

Das Medium wurde 3-mal wöchentlich gewechselt. Nach Absaugen des alten Mediums folgte einmaliges Waschen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Zum Splitten wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und nach erneuter Zugabe von Medium beklopft, bis sie sich von der Zellkulturschale gelöst haben. Die Anzahl der Zellen wurde mit einer 10µl Zählkammer (C-Chip Neubauer Improved, NanoEnteK) berechnet und die Zellen auf 100mm Zellkulturschalen für Proteinanalysen oder 60mm Zellkulturschalen für Ribonukleinsäure (RNA, engl. ribonucleic acid)-Analysen verteilt.

2.1.4 Behandlungsprotokolle

Aus WT und STAT^{-/-}-Mäusen isolierte TECs wurden mit 1µg/ml LPS für 4 Stunden, 10ng/ml IFN γ für 8 Stunden oder 10ng/ml IFN γ für 8 und 1µg/ml LPS für 4 Stunden

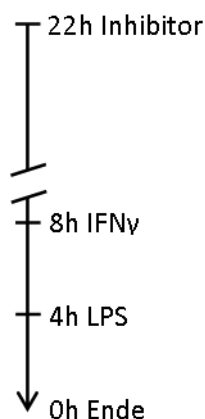


Abb. 2.1

behandelt. Als Medium diente stets das Standardmedium. Bevor den Zellen der entsprechende Wirkstoff zugegeben wurde, wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zusätzlich wurden Versuche mit den JAK/STAT-Signalweg-Inhibitoren Ag490 (75 µM), Stattic (5µM) und Fludarabine (125µM) durchgeführt. Die Wirkstoffe waren in allen 3 Fällen in einer Konzentration in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, die eine Endkonzentration von 0,25% DMSO im Medium betrug. Der Kontrolle wurde deshalb ebenfalls 0,25% DMSO beigefügt. Die Behandlung mit den Inhibitoren/DMSO begann 14 Stunden vor

der Behandlung mit IFN γ (Abb. 2.1).

Zum Ende des Protokolls wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit dem entsprechenden Puffer (siehe Kapitel 2.3.1 für Proteinanalyse bzw. Kapitel 2.3.3 für RNA-Analyse) bedeckt, mit einem Zellkulturschaber von der Platte geschabt, in ein Eppendorfgesäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.1.5 Hypoxie

Um eine Hypoxie zu erzeugen, verwendeten wir Hypoxietöpfe in denen mit Hilfe einer Pumpe ein erheblicher Unterdruck erzeugt wurde. Nachdem die Töpfe mit den Zellkulturplatten verschlossen waren, wurde ein Unterdruck von 0,3 bar erzeugt und dann ließen wir Stickstoff bis zu 1,3 bar einströmen. Diese Schritte wurden 11-mal wiederholt, so dass ein Sauerstoffpartialdruck von 1 mmHg erreicht wird. Die Töpfe wurden 24 Stunden bei 37°C bebrütet und dann die Zellen zur weiteren Analyse geerntet. Dies fand entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.1.4 statt.

2.2 In vivo: Renale Ischämie-Reperfusion im Tiermodell

Tiere

Die Tierversuche für die oben beschriebenen in vitro-Versuche wie auch den im Folgenden beschriebenen in vitro-Teil wurden unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-40-1014 von der Regierung von Oberbayern genehmigt. Es wurden vorrangig die C57Bl/6J Maus und weiterhin die STAT1^{-/-} Maus mit C57Bl/6J Hintergrund verwendet. Bei der STAT1^{-/-} Maus handelt es sich um eine „STAT1 total body knockout“, in welcher STAT1 in allen Zellen ausgeschaltet ist (Durbin et al. 1996). Die STAT1^{-/-} Mäuse stammen initial von der veterinärmedizinischen Universität Wien und wurden im Zentrum für präklinische Forschung, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München weitergezüchtet. Die C57Bl6J stammen von Charles River (Wilmington, Massachusetts, USA). Für die Versuchsdurchführung wurden ausschließlich männliche Versuchstiere im Alter von jeweils 8 – 12 Wochen verwendet. Für Versuche I/R vs. Kontrolle und die Interventionsstudien mit STAT1-Inhibitoren wurden die Tiere zufällig den Gruppen zugeteilt.

Narkose

Nach Einleitung mit Isofluran 3,5% (Atlane Isoflurane, Prover AG, Lyssach, Schweiz) wurden Medetomidin 500µg/kg, Midazolam 5mg/kg und Fentanyl 50µg/kg intraperitoneal injiziert. Während der OP wurde die Maus auf einer Wärmeplatte platziert, um eine stabile Körpertemperatur beizubehalten. Die postoperative Analgesie erfolgte über subcutane Injektion mit Buprenorphin 0,1 mg/kg (Temgesic, Essex Pharma München) zunächst 30 Minuten vor OP-Ende und dann im Verlauf.

Operation Kurzzeitverlauf

Den auf dem Rücken liegenden Tieren wurde der Bauch rasiert, um sie dann median zu laparatomieren. Die rechte Niere wurde aufgesucht und Nierenarterie, Vene und der Ureter wurden ligiert. Das Organ wurde entnommen, die Kapsel entfernt und dann zur weiteren Analyse für Histologie, RNA-Analyse oder Proteinanalyse entsprechend verarbeitet. Dann folgte die Ligation von Arterie und Vene der linken Niere mit einer Gefäßklemme. Die richtige Lage der Klemme wurde durch Weißfärbung der Niere kontrolliert. Während der Ischämiezeit verhinderte eine mit NaCl getränkte Kompresse das Austrocknen des Peritoneums. Die erfolgreiche Reperfusion wurde nach Entfernung der Klemme durch erneute Rotfärbung der Niere visuell überprüft. Die Tiere wurden mittels Faszien und kombinierter Kutan- und Subkutannaht mit 6-0 Nahtmaterial verschlossen und zur genaueren Beobachtung in Einzel-Käfigen gehalten.

Operation Langzeitverlauf

Den Tieren wurde die linke Flanke rasiert. Über einen Flankenschnitt erfolgte die Präparation der Niere mit Arterie, Vene und Ureter. Das Beibringen der Ischämie sowie das perioperative Management erfolgte dann entsprechend dem im Kurzzeitverlauf beschriebenen Vorgehen. Da der in diesem Modell verursachte I/R im Falle der Entfernung der gesunden Niere zum Tod des Tieres führt, verblieb die kontralaterale Niere bis zum Versuchsende in situ.

Versuchsaufbau

Zur Charakterisierung des Ischämie-Reperfusionsschadens wurden nach 40 Minuten Ischämie zunächst eine Reperusionszeit von 1, 3, 6, oder 24 Stunden

untersucht, um den Verlauf der Expression, STAT1 abhängiger Chemokine im I/R Modell näher charakterisieren zu können. Zu entsprechenden Zeitpunkten (1, 3, 6 und 24 Stunden post Ischämie) erfolgte die Euthanasie der Tiere durch Blutentzug aus dem Herzen in tiefer Narkose. Milz und Niere wurden nach Euthanasie entnommen und bei -80°C zu weiteren Untersuchungen kryokonserviert.

Für Gruppenvergleiche zwischen WT und STAT1^{-/-} Tieren wurde eine Ischämiezeit von 30 oder 40 Minuten verwendet und die Tiere 24 Stunden post reperfusionem wie beschrieben euthanasiert (Abb. 2.2). Das gleiche galt für Tiere die mit Fludarabine (100 μl , 125 μM), Ag490 (100 μl , 75 μM) oder DMSO (100 μl) behandelt wurden.

Im Langzeitmodell wurde eine Ischämiezeit von 30 Minuten verwendet. Nach 30 Tagen Reperfusionzeit wurden die Tiere euthanasiert und die zu untersuchenden Organe und Blut entnommen und weiterverarbeitet.

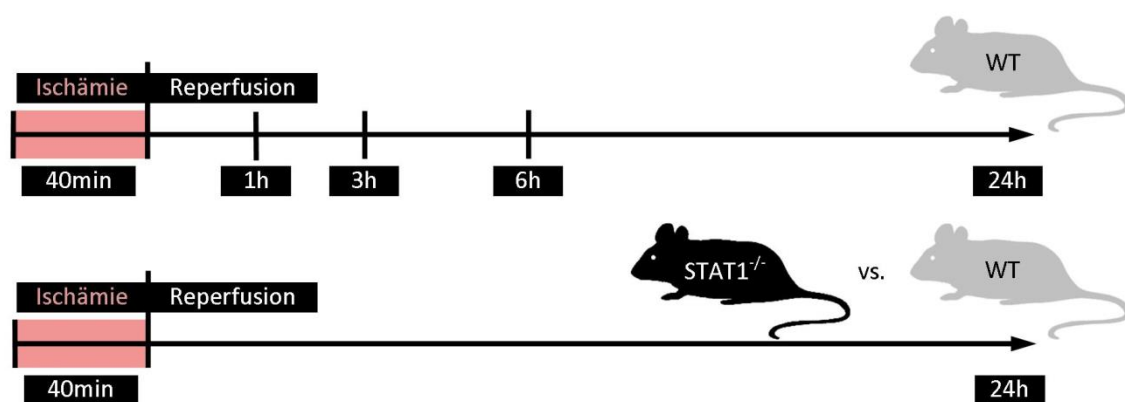


Abb. 2.2: Versuchsplanung der Ischämie-Reperfusion, Kurzzeitmodell

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Western Blot Proteinanalyse

Die Proteinanalyse mittels Western Blot ist ein Verfahren zur Identifikation und semiquantitativen Messung von Proteinen aus Probenmaterial. Mittels Gelelektrophorese werden die Proteine zuerst aufgetrennt und dann auf eine

Membran übertragen, auf der die Proteine durch Bindung an spezifische Antikörper und einer fluoreszenzfarbstoffabhängigen Reaktion sichtbar gemacht werden.

Sowohl von Zellen als auch von Nierengewebe wurden Proteinextrakte mit RIPA-Puffer (engl. radioimmunoprecipitation assay), der Protease und Phosphatase enthielt (Roche), hergestellt. TECs von 100mm Zellkulturschalen wurden in 600µl RIPA-Puffer resuspendiert. 12mg von bei -80°C gefrorenen Nieren wurden mit Hilfe von QIA-Shredder 2 mal 2 Minuten mit 30Hz in 600µl RIPA-Puffer zerkleinert und homogenisiert. Die Proteinkonzentration erfolgte mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit, das einen proteinabhängigen Farbstoff enthält, der bei 562nm Wellenlänge colormetrisch gemessen wird und es so ermöglicht, anhand einer Standardverdünnung die Konzentration zu bestimmen.

Die Proteinextrakte wurden mit 25% Sample Puffer (NuPAGE LDS Sample Buffer) und 7% Dithiothreitol (DTT) gemischt und für 10 Minuten auf 90°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Pro zu untersuchender Probe benutzten wir 30-50 µg Proteinextrakt. Die Proben wurden in Bis-Tris Gel 4-12% (NuPAGE boxed Bis-Tris Gel 4-12%) in MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure-Puffer) geladen und wanderten dann abhängig von der Proteingröße bei 200V für 1 bis zu 1,5 Stunden bei 0°C durch das Gel (Invitrogen novex mini-cell). Um die Proteinbanden anhand ihrer Größe identifizieren zu können, wurde in eine der Taschen stets ein Marker (Precision Plus Protein™ Dual Color Standard) geladen. Mittels eines nassen Transfersystems (Mini Trans-Blot Bio-rad, 30 V, 90 mA, 16 Stunden bei 4°C) wurden die Proteine auf 0,45 µm PCDF Membranen (Immobilon Transfer Membranes – P Blotting Sandwiches) transferiert und abhängig vom Antikörper in TBST mit 5% bovinem Serum Albumin (BSA) oder 5% Trockenmilch geblockt. Die Membranen wurden dann mit dem zu untersuchenden Antikörper inkubiert. Der STAT1 Antikörper (Santa Cruz SC356) wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur 1:1000 verdünnt, der pSTAT1 Antikörper (Cell Signaling #9171) bei 4°C über Nacht 1:2000 verdünnt und der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Antikörper (Cell Signaling #5174) als Standard für 1 Stunde 1:15000 verdünnt. Die Verdünnung fand für pSTAT1 und GAPDH mit 5% BSA in TBST statt und für STAT1 mit 5% Trockenmilch in TBST. Danach folgte 30 Minuten Waschen in TBST und dann 30 Minuten Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur welcher in TBST mit 5% Milch oder BSA abhängig vom Zielprotein verdünnt wurde (Anti Rabbit

Santa Cruz C2004; 1:12000 für pSTAT1 und STAT1, 1:15000 für GAPDH). Der sekundäre Antikörper bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers. An ihn ist das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, engl. horseradish peroxidase) gekoppelt, welches das später hinzugegebene Luminol-Substrat oxidiert. Nach weiteren 30 Minuten Waschen in TBST wurde die Membran für 10 Minuten lichtgeschützt mit Luminata Forte Western HRP Substrat, das auf Luminol basiert, inkubiert. Die Anregungszeit betrug 30 Sekunden bis 30 Minuten, um die Proteinbanden sichtbar zu machen.

Um mehrere Proteine auf einer Membran nachweisen zu können, verwendeten wir ein Verfahren zur Entfernung der vorhandenen Antikörper. Die Membran wurde 10 Minuten in TBST und dann 30 Minuten in einem Stripping Puffer gewaschen. Dieser wurde hergestellt aus 2 g SDS, 6,25 ml 1M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) und 0,78 ml β -Mercaptoethanol, aufgefüllt auf 100ml mit destilliertem Wasser und auf pH 6,7 eingestellt. Der Puffer wurde während der Einwirkzeit auf 50 – 70°C gehalten. Nach weiterem Waschen mit TBST für 30 Minuten (5, 10, 10, 5 Minuten) konnte die Membran wieder mit Blocking Puffer, primären und sekundären Antikörpern und Substrat behandelt werden, wie oben beschrieben.

2.3.2 Elisa

Der Begriff Elisa steht für *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* und stellt ebenfalls eine antikörperbasierte Methode zum Nachweis und zur Quantifikation von Proteinen dar. Kommt es zu einer entsprechenden Antikörperbindung, ermöglicht eine enzymatische Farbreaktion die Messung. Proteinkonzentrate wurden analog zur Beschreibung in 2.3.1 hergestellt. Bei der Elisa-Durchführung wurden alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

96-well-Mikrotiterplatten wurden mit 100 μ l des auf Arbeitsverdünnung verdünnten Fängerantikörpers des zu untersuchenden Proteins über Nacht beschichtet. Nach Aspiration des Antikörpers fand eine zweimalige Waschung mit 400 μ l Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) statt. Gefolgt wurde dies mit einstündiger Inkubation mit 300 μ l Blockpuffer (1% BSA in PBS) und Wiederholung des Waschschrilles.

Nun konnten 100 µl der Proben hinzugegeben und für 2 Stunden inkubiert werden. Nachdem die Platte wie oben beschrieben gewaschen wurde mussten 100 µl des Detektions-Antikörpers hinzugefügt und für 2 Stunden inkubiert werden. Nach erneuter Waschung wurden 100 µl der Streptavidin-HRP-Lösung hinzugegeben und für 20 Minuten inkubiert. Ab diesem Schritt war direkter Lichteinfall möglichst zu vermeiden, um eine vorzeitige Reaktion zu verhindern. Nach erneuter Waschung wurden 100 µl Substrat hinzugegeben und erneut für 20 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl Stopplösung beendet (2N H₂SO₄).

Mit der optischen Auslesemaschine wurde anhand einer Standardverdünnung die Proteinkonzentration mit einer Lichtwellenlänge von 450 nm und einer Wellenlängenkorrektur von 540 nm ausgelesen.

2.3.3 Real time quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die real time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ist ein Verfahren zur quantitativen Analyse von Desoxyribonukleinsäure (DNA; engl. desoxy ribonucleic acid). Dabei werden Konzentrationsunterschiede eines Gens zwischen Versuchsgruppen jeweils relativ zu einem in allen Gruppen gleich exprimierten Gen (Referenzgen) gemessen. Reverse Transkription von aus Zellen oder Organen isolierter RNA zu komplementärer DNA (cDNA; engl. complementary DNA) ermöglicht es, die RNA der RT-qPCR zuzuführen, da die relative Konzentration der cDNA nach Transkription denen der verwendeten RNA-Probe entsprechen.

RNA-Isolation

Zur Isolation diente das Qiagen RNeasy Mini Kit. TECS von konfluent bewachsenen 60mm Zellkulturplatten wurden in 350 µl RLT-Puffer suspendiert und durch ein Vortex-Schüttelgerät 30 Sekunden lysiert und homogenisiert. 12 mg von bei -80°C gefrorenen Nieren wurden mit Hilfe von QIA-Shredder 2 mal 2 Minuten mit 30 Hz in 600 µl RLT-Puffer zerkleinert und homogenisiert. Dem RLT-Puffer musste vor Gebrauch 0,1% β-Mercaptoethanol zugeführt werden. Der Puffer enthält eine hohe Konzentration an Guanidiniumisothiocyanat, das die Bindung der RNA an eine Silikatmembran ermöglicht. Nachdem das Lysat 3 Minuten bei maximaler

Geschwindigkeit zentrifugiert wurde, kann der Überstand 1:1 mit 70% Ethanol gemischt werden. Das Gemisch wurde in das RNeasy spin column pipettiert, das die Silikatmembran enthält und 15 Sekunden bei 10.000 U/Min durch die Membran zentrifugiert. In diesem Schritt bindet die RNA an die Membran. Die zwei Waschpuffer (Puffer RW1 und RPE), die in den folgenden Schritten durch die Membran zentrifugiert wurden dienen dazu Kohlenhydrate, Fettsäuren, Proteine und Salze zu entfernen. Es sollen nur RNA-Ketten > 200 Basen an der Membran haften. Um Verunreinigungen durch DNA zu vermeiden, wurde die Membran zusätzlich 15 Minuten bei Raumtemperatur mit einer DNase inkubiert. Damit die Membran absolut keinen Waschpuffer mehr enthält, wurde sie nochmals bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute zentrifugiert. Zuletzt wurden 30-50 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert. Während der darauffolgenden Zentrifugation (1 Minute bei 10.000 U/Min) löst sich die RNA von der Membran und ist dann im Wasser enthalten.

Reverse Transkription

Bevor mit der reversen Transkription begonnen werden konnte, musste die genaue RNA-Konzentration photometrisch gemessen werden. Der iScript Reverse Transkription Supermix diente zu reversen Transkription. Es wurden die RNA-Probe, Nuklease-freies Wasser und der iScript reverse transcription supermix (Biorad) in einem Eppendorf-Gefäß vermischt. Der Supermix enthält die reverse Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase), einen RNase-Inhibitor, dNTPs, zufällige Primer, MgCl₂, und Stabilisatoren. Das Volumen der Probe ist abhängig von der RNA-Konzentration (alle Gefäße sollen die gleiche Menge an RNA enthalten). So wird gewährleistet, dass alle Proben nach der Transkription die gleiche Konzentration an DNA enthalten. Das Volumen wurde mit Nuklease-freiem Wasser entsprechend ergänzt. Um 20µl cDNA zu erhalten, fügten wir der Reaktion 1000 ng RNA hinzu. Das Gemisch wurde 5 Minuten bei 25° geprimed, dann für 30 Minuten auf 42°C erwärmt, da bei dieser Temperatur die Transkriptase aktiv ist, und dann für 5 Minuten auf 85°C gehalten, um die Transkriptase zu Inaktivieren (BioRad iCycler).

PCR-Reaktion

Für die PCR-Reaktion wurde der SsoFast EvaGreen Supermix verwendet. Dieser enthält einen Standard PCR-Puffer, EvaGreen Farbstoff und die Sso7d-fusion Polymerase. Davon benutzten wir 12,5µl mit 2,5µl Primer (3µM), 0,5µl cDNA und 9,5µl nukleasefreiem Wasser. Doppelbestimmungen aller Proben halfen Fehler zu erkennen und zu vermeiden. Der Reaktionsmix wurde für 30 Sekunden auf 95°C erhitzt, um die Polymerase zu aktivieren. Dann folgten 40 Zyklen mit jeweils 5 Sekunden bei 95°C, um die dsDNA zu denaturieren und 10 Sekunden bei 55°C für die Kettenreaktion. Durch Verwendung einer Schmelzkurvenanalyse konnte die Spezifität und Homogenität der PCR-Produkte sichergestellt werden. Der DNA-Doppelstrang denaturiert bei einer bestimmten Temperatur und die damit verbundene Fluoreszenzänderung wird gemessen. Handelt es sich bei dem Produkt um Klone derselben DNA-Sequenz denaturieren sie bei gleicher Temperatur (BioRad iCycler). In Tabelle 2.1. sind die in der Arbeit verwendeten Primer aufgelistet.

Zur relativen Quantifizierung wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode verwendet (Livak et al. 2001). Als Standardgen diente GAPDH.

Tabelle 2.1 Für RT-qPCR verwendete Primer

Gen	Primer vorwärts 5'>3'	Primer rückwärts 5'>3'
GAPDH	TCGGTGTGAACGGATTGTC	TTTGGCTCCACCCTTCAAGTG
IP-10	TCATCCCTGCGAGCCTATCC	GGAGCCCTTTTAGACCTTTTT
CXCL9	CTGCCATGAAGTCCGCTGTTCT	TCCCCCTCTTTTGCTTTTTCTT
iNOS	TGGGGCAGTGGAGAGATTTT	TCTGGTCAAACCTCTTGGGGT
MCP-1	GCTGTAGTTTTTGTACCAAG	GATTTACGGGTCAACTTCACA
FXRD2	ATGGCTGGGGAAATATCAGAT	ACCTGCCTATGTTTCTTACCG
Calponin	ACGGCTTGTCTGCTGAAGTA	AAGATGTCGTGGGGTTTCAC
IFN γ	TGCTGATGGGAGGAGATGTCT GCAACAGCAAGGCGAAAAAG	TTTCTTTCAGGGACAGCCTGTT ATCTCTTCCCCACCCGAAT
IFN β	TCGGACCACCATCCAGGCGT	ACCTCACCTACAGGGCGGACT
STAT1	CGAACCTTCCTCCTCTTCCA	TCTGGTGCTTCCTTTGGTCT
NGAL	CCAGGGCTGGCCAGTCACTC	TGGGTCTCTGCGCATCCAGT
KIM-1	TCAGCTCGGGAATGCACAA	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT

2.3.4 Klassische PCR

Die klassische PCR ermöglicht es, Genexpression anhand von isolierter RNA aus Zellen oder Gewebe zu untersuchen. Dabei entsprechen die Isolation der RNA und die reverse Transkription den in Kapitel 2.4 beschriebenen Verfahren. Nachdem man die cDNA der PCR unterzogen hat, werden die Proben anhand ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt und können dann sichtbar gemacht und identifiziert werden.

Zur Herstellung der Gele wurde 1,5% Agarosegel aus Agarose (Seakem LE agarose, Biozym) und 1x konzentriertem TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) pH 8 benutzt. Die Mischung wurde zum Kochen gebracht und beim Abkühlen bei ca. 55°C 0,005% Ethidiumbromide hinzugemischt. Die das gegossene und getrocknete Gel enthaltende Kammer wurde erneut mit TAE-Puffer pH 8 gefüllt. Der PCR-Mix bestehend aus 0,25µl DNA-Polymerase (1,25 U/50µl Reaktion, AmpliTaq Gold 360 DNA-Polymerase), 5,0µl PCR-Puffer (1X konzentriert, AmpliTaq Gold 360 Buffer 10X), je 2,0µl vorwärts und rückwärts Primer (je 0,4µM), 1,0µl dNTP Mix (200µM/NTP, Deoxynucleotide Mix, 10mM, Sigma), 3,0µl 25mM Magnesiumchlorid (1,5mM), 10 µl cDNA-Probe und für PCR geeignetem Wasser, um das Volumen auf 50µl aufzufüllen wurde hergestellt.

Die PCR-Reaktion entspricht weitestgehend der schon in Kapitel 2.3.3 beschriebenen. Sie begann mit 94°C für 10 Minuten zur initialen Denaturierung, darauf folgten 40 Zyklen mit jeweils: 94°C für 30 Sekunden zur Denaturierung, dann 60°C für 30 Sekunden zum Annealen und schließlich 72°C für 60 Sekunden zur Amplifikation. Eine finale Amplifikation bei 72°C für 7 Minuten beendete die Reaktion.

17 µl der Proben wurden mit 3 µl Sample Buffer (Thermo-Fisher) in die Taschen im Gel pipettiert. Die PCR-Produkte bewegten sich bei 90 V für 60 Minuten durch das Gel. Mit 22,5 µl Fluoreszenzfarbstoff peqGREEN (VWR Peqlab) in 150ml TAE-Puffer wurde die DNA für 30 Minuten in Dunkelheit angefärbt. Nach einem Waschvorgang mit destilliertem Wasser für 10 Minuten können die entsprechenden Banden mittels UV-Licht visualisiert werden.

2.3.5 Histologie

In Scheiben zerteiltes Nierengewebe wurde in 4% Paraformaldehyde (PFA) für 24 Stunden fixiert um dann mit Ethanol dehydriert und in Paraffin fixiert zu werden. Die Schnitte wurden mit Periodic acid-Schiff (PAS) und Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt.

Die Schnitte wurden mithilfe eines Scanners digitalisiert (Hamamatsu NanoZoomer-XR). Die Auswertung des Ausmaßes der Tubulusnekrose erfolgte nach einem etablierten Score (Savransky et al. 2006). Der Score ist in Tabelle 2.2 abgebildet. Die Bewertung wurde von 2 Personen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Die Untersucher waren verblindet und untersuchten jeweils 15 Ausschnitte pro Niere.

Tabelle 2.2: Nekrosescore

Score	% nekrotischer Tubuli
1	0 – 10 %
2	11 – 25 %
3	26 – 50 %
4	51 – 75 %
5	76 – 100 %

2.4 Statistik

Abhängig von den zu vergleichenden Gruppen wurde entweder ein t-Test für unverbundene Stichproben, One-way ANOVA oder Two-way Anova bei gruppierten Analysen, jeweils mit Graphpad-Prism 5, durchgeführt. Balken und Punkte der Graphen repräsentieren jeweils den Mittelwert, die Fehler-Balken den Standardfehler. Sofern bei den Auswertungen der in vivo-Ergebnisse rechte Nieren zur Kontrolle benutzt wurden, erfolgte die Analyse der Gruppen ungepaart.

3 Materialien

Folgende Materialien wurden für die in der Dissertation beschriebenen Versuche verwendet:

3.1 Kits

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
RNA Isolation	RNeasy Mini Kit	Qiagen
Reverse Transkription	iScript Reverse Transcription Supermix	Bio-Rad
qRT-PCR	SsoFast EvaGreen Supermix	Bio-Rad
Proteinkonzantration	Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo-Fisher
ELISA	Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet ELISA	R&D Systems

3.2 Chemikalien

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Antibiotika	Penicillin	Sigma-Aldrich
	Streptomycin	Sigma-Aldrich
Inhibitoren	Ag490 Calbiochem	Merck Millipore
	Stattic Calbiochem	Merck Millipore
	Fludarabine	Sigma-Aldrich
Anästhesie	Sedormed/ Medetomidinhydrochlorid	Prodivet
	Midazolam	Braun
	Fentanyl	Braun
	Isofluran	CP Pharma
Liganden	LPS	Sigma-Aldrich
	IFN μ	Sigma-Aldrich
	IFN β	Sigma-Aldrich
Supplement; Blockierung	BSA	Sigma-Aldrich
	FCS	Sigma-Aldrich
	Trockenmilchpulver	Roth
Western Blot	Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad
	NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)	Thermo-Fisher
	NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo-Fisher
	NuPAGE Transfer Buffer (20X)	Thermo-Fisher
Wasch-Puffer	PBS	Sigma-Aldrich
Zellkulturmedium/-puffer	DMEM/F12 GlutaMAX	Gibco
	HEPES	Gibco
	HBSS	Gibco
Hormone	Insulin	Sigma-Aldrich
	Prostaglandin E1	Cayman Chemical

Sonstige Chemikalien	3,3,5 Triiodothyronine	Sigma-Aldrich
	Hydrocortison	Sigma-Aldrich
	Transferrin	Sigma-Aldrich
	Sodium Seletine	Sigma-Aldrich
	Ethanol	Roth
	Methanol	Merck KGaA
	TRIS	Roth
	NaCl	Roth
	2-Propanol	Sigma-Aldrich
	Glycin	Sigma-Aldrich
	DTT (Dithiothreitol)	Sigma-Aldrich
	Tween	Sigma-Aldrich
	SDS (sodium lauryl sulfate)	Sigma-Aldrich
	DMSO	Sigma-Aldrich
	HCl	Merck KGaA
	Kaliumchlorid	Roth
	Gewebefixierung	β -Mercaptoethanol
Paraformaldehyde reagent grade, crystalline		Sigma-Aldrich
Proteinextraktion	cOmplete™ ULTRA protease inhibitor Cocktail	Roche
	PhosSTOP™ phosphatase inhibitor	Roche

3.3 Software

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
RT-qPCR-Analyse	iCycler iQ	Bio-Rad
Elisa-Analyse	MARS Data Analysis	BMG Labtech
Statistik	Excel	Microsoft
	GraphPad Prism	GraphPad
Darstellung	Illustrator	Adobe

3.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Mikroskop-Imaging	NanoZoomer-XR	Hamamatsu
Mikroskop	BX40 microscope system	Olympus
ELISA Plate-Reader	FLUOstar Omega	BMG Labtech
CO2 Brutschrank	Heracell	Heraeus

Homogenisierer	Tissuelizer	Qiagen
Magnetrührer	MR-3001	Heidolph
Manuelle Pipetierhilfen	Research plus	Eppendorf
	Lambda plus	Corning
Manuelle Multikanal- pipetierhilfen	Lambda plus	Corning
Manueller Dispenser	Multipette plus	Eppendorf
Elektrische Pipettierhilfe	Research pro	Eppendorf
	Xplorer	Eppendorf
RNA-Konzentrations- messung	BioPhotometer	Eppendorf
Real-Time-PCR	My iQ iCycler	Bio-Rad
pH-Meter	PB-11	Sartorius
SDS-Gelelektrophorese- kammer	Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad
Western Blot	XCell SureLock	Thermo-Fisher
Gelelektrophoresekammer		
SDS Gelelektrophorese/ Western Blot	EC3000P	Thermo
Spannungsquelle		
Western Blotting Transfer	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Sterile Werkbänke	Herasafe	Heraeus
Vortex Mixer	Vortex Mixer VM-300	neoLab
Waage	LA 120 S	Sartorius
Wasserbadinkubator	SW 21	Julabo
Schüttler	Dupmax 1030	Heidolph
Inkubationsschüttler	Thriller	VWR Peqlab
Zentrifugen	Multifuge 3 L-R	Heraeus
	Centrifuge 5424R	Eppendorf
	Combi-Spin FVL-2400N	Biosan

3.5 Einwegmaterialien

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller
Probenaufbewahrung	Eppendorf-Tubes / Falcons 0,15ml; 1,5ml; 2ml; 15ml; 50ml	TPP, Trasadingen
Pipettenspitzen	ep Dualfilter T.I.P.S. SealMax	Eppendorf
	Optifit-Spitzen, unsteril	Sartorius
Pipetten	CELLSTAR serological pipette, sterile 5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Greiner bio-one
Skalpell	Feather disposable scalpel	Feather Safety Razor
Einmalspritzen	Einmalspritzen 2ml, 5ml, 10ml, 20ml	Braun
Zellschaber	Cell Scraper 24 cm	TPP, Trasadingen

Western Blot Membran	Immobilon-P transfer membrane 0,45µm pore size	Millipore, Merck, Darmstadt, D
Western Blot Gel	NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Protein Gels 1,0mm 10-well	Thermo-Fisher
Sterilfilter	Millex GP Filter Unit 0,22µm	Millipore, IRL
Zellsieb	Cell Strainer, Nylon, 100µm, 70µm	Falcon BD
Zellkulturschalen	Zellkulturschale 60mm, 100mm	TPP, Trasadingen
Mikrotiterplatte	96-Mikrotiterplatte	TPP, Trasadingen
Zählkammer	Hemocytometer C-Chip, Neubauer improved	NanoEnteK

4 Ergebnisse

4.1 STAT1 abhängige Signalintegration in proximalen Tubuluszellen

Um zu zeigen, dass eine Signalintegration zwischen dem JAK2/STAT1 und den TLR4 Signalwegen in renalen TECs stattfindet, haben wir diese Signalwege mit IFN γ beziehungsweise LPS aktiviert. Zu diesem Zweck wurden primäre Zellen aus *C57BL/6* und *STAT1*^{-/-} Mäusen isoliert. Abb. 8.1 (Anhang) stellt beispielhaft konfluent gewachsene TECs dar, wie sie für die Versuche verwendet wurden. Um das homogene Wachstum der TECs zu verifizieren, bestimmten wir die Expression des Tubuluszellmarkers FXYD2. Zur Kontrolle wurden Calponin und FXYD2 in vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs) bestimmt (Rensen et al. 2007, Cairo et al. 2009). Wie erwartet exprimierten die VSMCs ausschließlich Calponin, die TECs vor allem FXYD2 und zu einem geringen Anteil Calponin (Daten nicht gezeigt). Eine zweite Methode zur Bestimmung der Zellhomogenität wurde von einem Kooperationslabor bei der Etablierung desselben Protokolls benutzt. Hier wurde die Expression von E-cadherin und Zytokeratin 7 als Marker für TECs und Vimentin für Mesenchymalzellen mit konfokaler Mikroskopie gemessen (Daten nicht gezeigt).

Zunächst untersuchten wir die Aktivität von STAT1 und pSTAT1 als einen der Hauptakteure der postulierten Signalintegration. Hierfür wurden isolierte TECs (WT und *STAT1*^{-/-}) mit LPS für 4 Stunden, IFN γ für 8 Stunden oder zuerst IFN γ und dann LPS behandelt. Sowohl nach Behandlung mit IFN γ allein als auch mit IFN γ und LPS zeigt sich eine starke Aktivierung von pSTAT1 und auch Hochregulation von STAT1 (Abb. 4.1 A). Nach LPS allein wurde keine Aktivierung verzeichnet. Dies steht im Kontrast zur in Immun- und Mesenchymalzellen beobachteten Signalintegration. Auch ist kein Unterschied zwischen IFN γ allein und IFN γ kombiniert mit LPS detektierbar. In den aus *STAT1*^{-/-} Mäusen isolierten Zellen ist keine STAT1- oder pSTAT1-Aktivität vorhanden. Somit scheint neben der Phosphorylierung auch eine Steigerung der Expression von STAT1 für die folgend beobachteten Effekte verantwortlich zu sein.

Um dies „downstream“ von STAT1 bestätigen zu können, haben wir nun die Expression von TLR4 und JAK2/STAT1 abhängigen Chemokinen nach Durchführung der bereits beschriebenen Behandlung mit IFN γ , LPS oder beidem betrachtet (CXCL9, IP-10, iNOS, MCP1) (Chassin et al. 2006, Panzer et al. 2008). Hierfür wurde

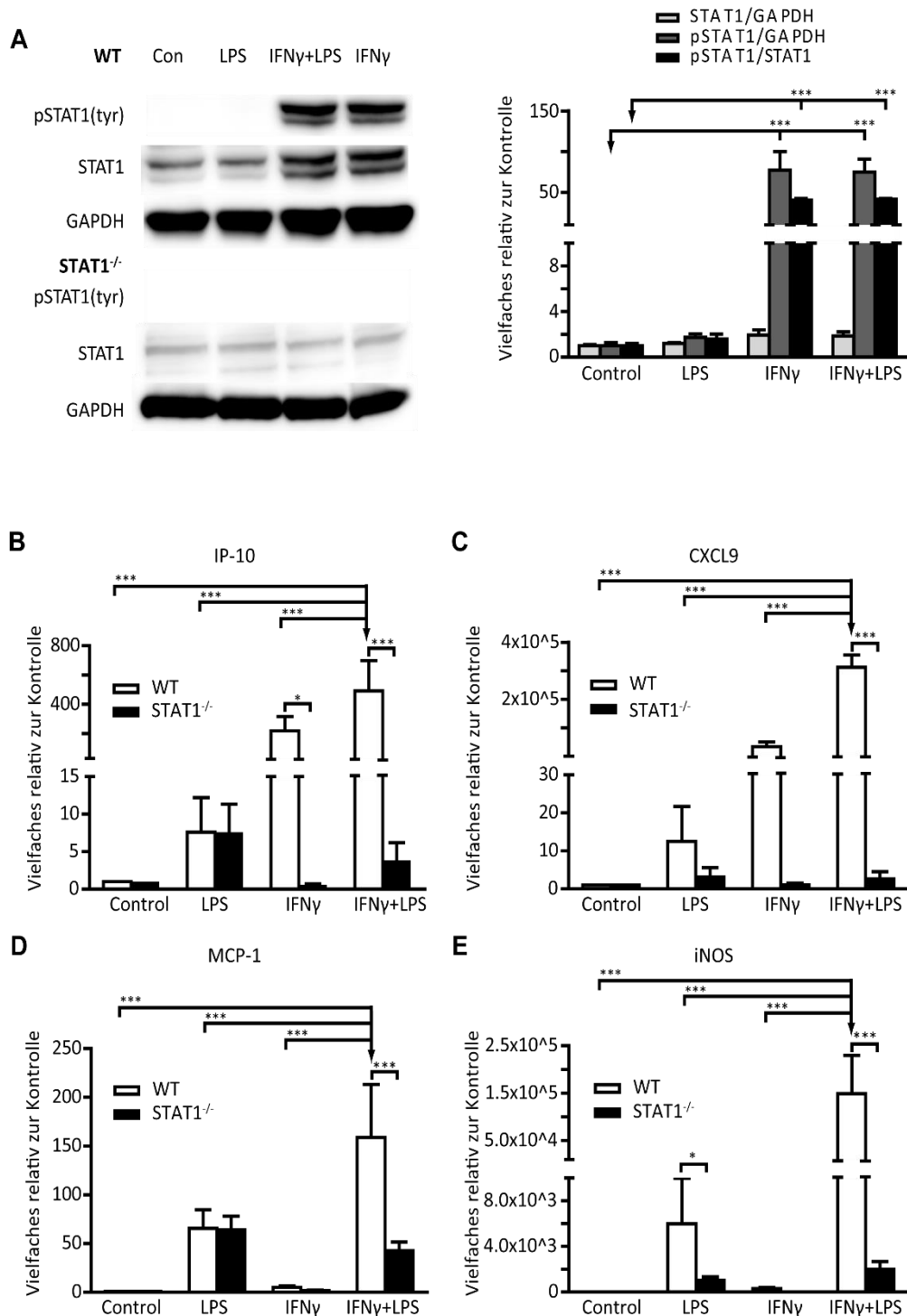


Abb. 4.1: TECs wurden aus WT und STAT1^{-/-} Mäusen isoliert und mit 1 μ g/ml LPS für 4 Stunden, 10ng/ml IFN γ für 8 Stunden oder beidem behandelt. A) Proteinextrakte wurden mithilfe von Westernblot-Analyse auf das Vorhandensein von pSTAT1, STAT1 und GAPDH als Standard untersucht und anhand der optischen Dichte im Vergleich zur Kontrolle analysiert. Der Graph zeigt den Mittelwert der optischen Dichte der Banden als Vielfaches zur Kontrolle. B-E) mRNA-Expressionslevel von IP-10 (B), CXCL9 (C), MCP-1(D) und INOS (E) wurden durch RT-qPCR nach reverser Transkription untersucht. mRNA-Expression ist als Vielfaches zur Kontrolle aus unbehandelten WT und STAT1^{-/-}-Zellen dargestellt. *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001

isolierte mRNA mithilfe von RT-qPCR analysiert. Zur Beurteilung der STAT1-Abhängigkeit der Expression wurden alle Experimente mit WT und STAT1^{-/-} TECS durchgeführt. Vergleicht man nun die untersuchten Gene, ist in allen vier Fällen zu erkennen, dass die Stimulation mit IFN γ und LPS stets zu einer stärkeren Expression führt als die Stimulation mit IFN γ oder LPS allein (Abb. 4.1 B-E). Das trifft sowohl für IP-10 und CXCL9 zu, die vor allem IFN γ abhängig aktiviert werden, als auch für MCP-1 und INOS, bei welchen die Expression nach LPS-Behandlung höher ausfällt. In den STAT1^{-/-} Zellen ist auch die Aktivierung von IP-10 und CXCL9 nach Behandlung mit IFN γ stark vermindert. Für MCP1 und INOS haben sich bei alleiniger Behandlung mit IFN γ oder LPS keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression ergeben. In allen vier Genen ist jedoch zu sehen, dass nur in Anwesenheit von funktionellem STAT1 die stärkste Expression durch Behandlung mit IFN γ und LPS stattfindet.

Zwar zeigte das Chemokinmuster die beschriebene Amplifikation nach Behandlung mit IFN γ und LPS, es gab jedoch keinen Unterschied im STAT1 Protein zwischen Behandlung mit IFN γ oder zusätzlich LPS. Also kann dies nicht für die Chemokinamplifikation von IFN γ auf IFN γ +LPS verantwortlich gemacht werden. Deshalb untersuchten wir Serin-phosphoryliertes STAT1, da ebenso beschrieben ist, dass dies für eine maximale STAT1-Aktivierung benötigt wird (Wen et al. 1995). Auch hier blieb ein Unterschied zwischen IFN γ und IFN γ + LPS aus (Abb. 4.2), sodass weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Signalintegration notwendig sind.

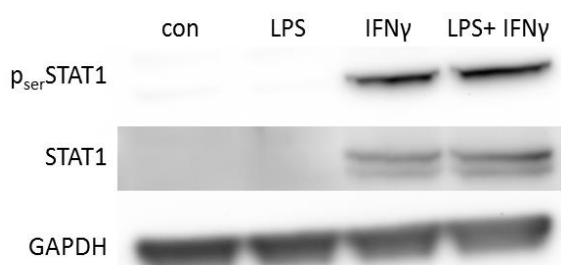


Abb. 4.2: TECS wurden aus WT und STAT1^{-/-} Mäusen isoliert und mit 1 μ g/ml LPS für 4 Stunden, 10ng/ml IFN γ für 8 Stunden oder beidem behandelt. Die aus den Zellen gewonnenen Proteinextrakte wurden mithilfe von Westernblot-Analyse auf das Vorhandensein von p_{ser}-STAT1, STAT1 und GAPDH als Standard untersucht.

4.2 Inhibition des JAK/STAT-Signalweges in vitro

Um herauszufinden, ob es möglich ist, die Signalintegration mithilfe von medikamentöser Inhibition des JAK/STAT-Signalweges zu unterbinden, verwendeten wir Inhibitoren, welche an unterschiedlichen Stellen des Signalweges eingreifen. Es handelt sich dabei um die Inhibitoren Ag490, Stattic und Fludarabine. Ag490 ist ein spezifischer JAK2 – Inhibitor (De Vos et al. 2000). Stattic gilt als spezifisch für STAT3 (Schust et al. 2006) und Fludarabine ist spezifisch für STAT1 (Frank et al. 1999). Dem Medium wurden 14 Stunden vor der Behandlung mit IFN γ (8 Stunden) und LPS (4 Stunden) der jeweilige Inhibitor zugesetzt (Abb. 4.3 A).

Aus den Zellen wurde erneut mRNA isoliert und mithilfe von RT-qPCR auf die Chemokine CXCL9, IP-10, INOS und MCP1 analysiert. Sowohl Stattic als auch Ag490 führten zu einer Reduktion der Expression von CXCL9, IP-10 und INOS. Im Falle von MCP-1 schien nur Ag490 die Expression zu reduzieren. Bei Behandlung mit Fludarabine war bei keinem der Chemokine ein Unterschied erkennbar (Abb. 4.3 B; Daten für Fludarabine nicht abgebildet).

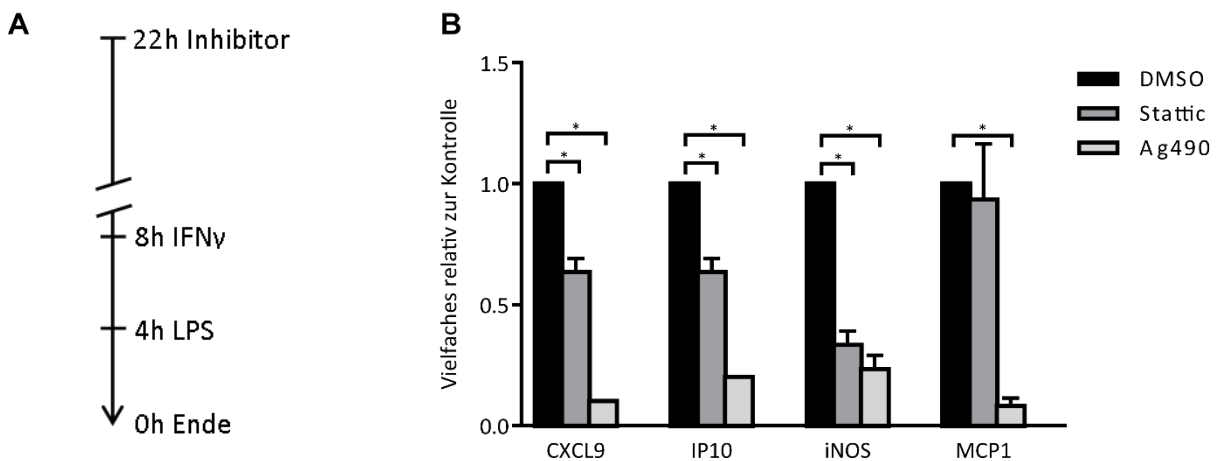


Abb. 4.3: TECs wurden aus WT Mäusen isoliert und mit 1 μ g/ml LPS für 4 Stunden und 10ng/ml IFN γ für 8 Stunden behandelt. 14 Stunden vor der Zugabe von IFN γ wurden die Zellen mit 75 μ M Ag490, 5 μ M Stattic oder nur DMSO behandelt (in allen drei Fällen betrug die DMSO-Konzentration 0,25%). mRNA wurde nach reverser Transkription mithilfe von RT-qPCR auf IP-10, CXCL9, MCP1 und iNOS untersucht. RNA Konzentration ist jeweils als Vielfaches zu nur mit DMSO behandelten Zellen. dargestellt. *=p<0,05

4.3 STAT1-Phosphorylierung durch Hypoxie in vitro

Mit den vorausgegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit IFN γ und LPS zu einer STAT1-Aktivierung mit Signalintegration führt. Da diese Versuche eine artifizielle Stimulation sind, wurden TECs einer Hypoxie für 6 oder 24 Stunden ausgesetzt, die einen Aspekt der (renalen) Ischämie imitiert (Almeida et al. 1992, Yu et al. 2016). Zur Beurteilung des STAT1-Proteins und dessen Phosphorylierung wurde ein Western Blot durchgeführt. Nach Hypoxie war sowohl STAT1 als auch pSTAT1 gegenüber der Kontrolle stärker nachweisbar (Abb. 4.4 A). Die Expression des zuvor betrachteten Chemokines iNOS sowie auch die

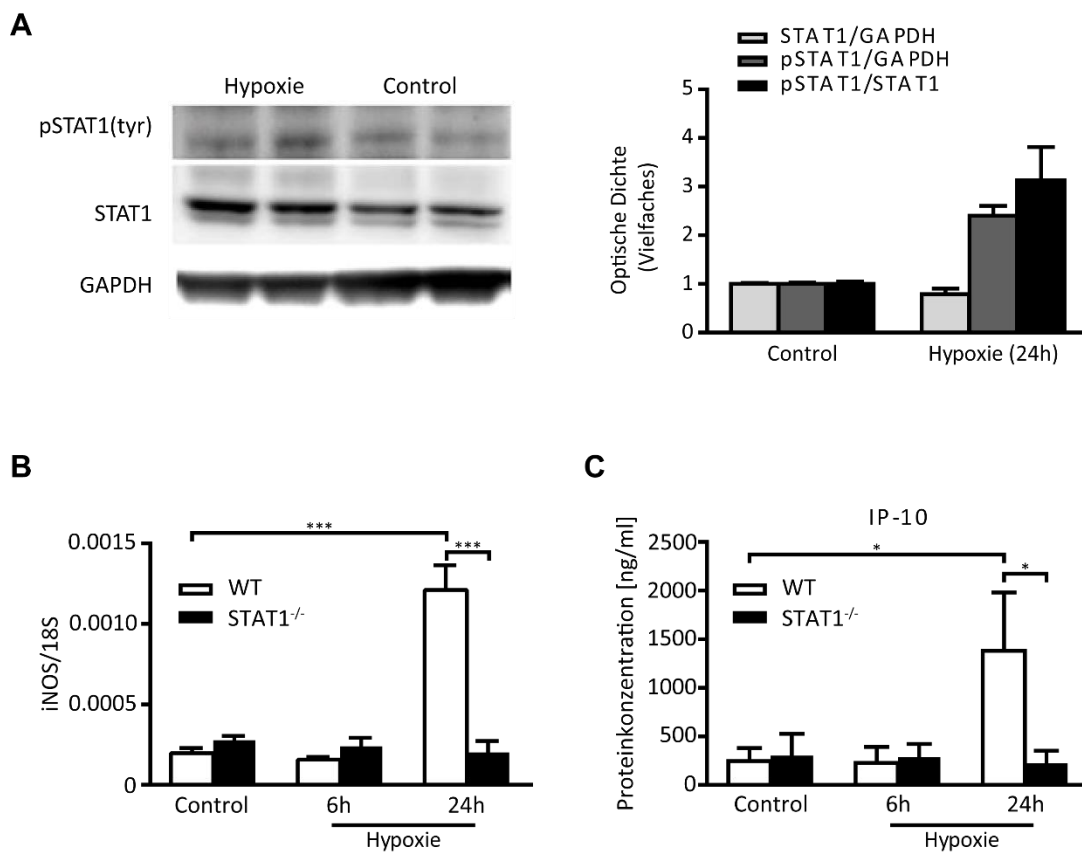


Abb. 4.4: TECs wurden aus WT und STAT1^{-/-} Mäusen isoliert und für 6 oder 24h bei 37°C einer Hypoxie ausgesetzt. A) Proteinisolate der den gleichen Bedingungen ausgesetzten Zellen wurden mittels Western Blot auf STAT1 und pSTAT1 untersucht. B) Die isolierte RNA wurde mithilfe von reverser Transkriptase in DNA umgewandelt und dann durch RT-qPCR auf iNOS untersucht. C) Ein Elisa wurde genutzt um die Proteinkonzentration von IP-10 nach oben beschriebenen Bedingungen zu untersuchen. *=p<0,05; ***=p<0,001

Übersetzung auf Proteinebene von IP-10 wurden erneut mithilfe von RT-qPCR bzw. ELISA untersucht. Dabei zeigte sich eine Hochregulierung von IP-10 und iNOS (Abb. 4.4 C, B) Bei den ebenso untersuchten Chemokinen CXCL9 und MCP1 konnte keine Steigerung der Expression festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Um nun zu beurteilen, ob die Expression von IP-10 und INOS von der Aktivierung des STAT1-Proteins abhängig ist, wurden die Versuche mit WT im Vergleich zu STAT1^{-/-} TECS wiederholt. Es zeigte sich eine verringerte Expression von iNOS (Abb. 4.4 B) und Proteintranslation von IP-10 (Abb. 4.4 C). Dies bestätigt die STAT1-Abhängigkeit.

4.4 STAT1-Phosphorylierung in vitro durch Ischämie-Reperfusion

Zum Nachweis einer STAT1-Aktivierung in vivo wurden C57BL/6 (WT) Mäuse zunächst in einem letalen Modell einer Ischämie der linken Niere für 40 Minuten nach Entfernung der rechten Niere ausgesetzt. Die Betrachtung des Zeitverlaufs (1, 3, 6, 24 und 72 Stunden Reperfusionzeit) von Kreatinin im Serum nach Ischämie ermöglicht eine Einschätzung der Nierenschädigung (Mark Moran et al. 1985). Nach

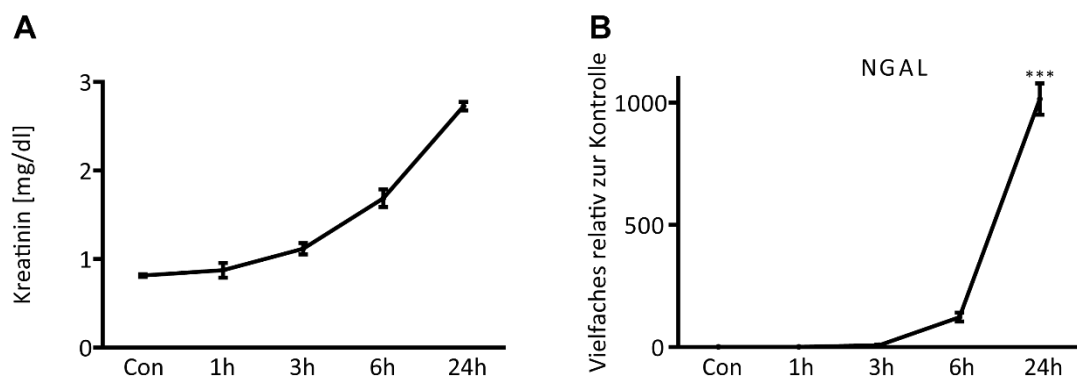


Abb. 4.5: Nach Entfernung der rechten Niere wurde mit einer Klemme die Blutzufuhr der linken Niere für 40 Minuten unterbunden. Die linken Nieren wurden nach 1, 3, 6 und 24 Stunden Reperfusionzeit entnommen und Kreatinin im Serum der Mäuse zu diesem Zeitpunkt wurde bestimmt (A). RNA wurde aus den Nieren isoliert und mit Hilfe von RT-qPCR auf NGAL analysiert (B). ***= $p < 0,001$

Setzen der Ischämie ist ein stetiger Anstieg des Kreatins zu beobachten, bis die Tiere nach etwas zwei Tagen verstarben (Abb. 4.5 A), was angesichts der ausgeprägten Schädigung den Erwartungen entspricht. Eine weitere Möglichkeit akuten ischämischen Nierenschaden einzuschätzen ist die Messung des Proteins NGAL das sich insbesondere als Marker eines Tubulusschadens darstellt (Mishra et al. 2003, Heyne et al. 2012). Unter Verwendung von RT-qPCR wurde die Expression von NGAL

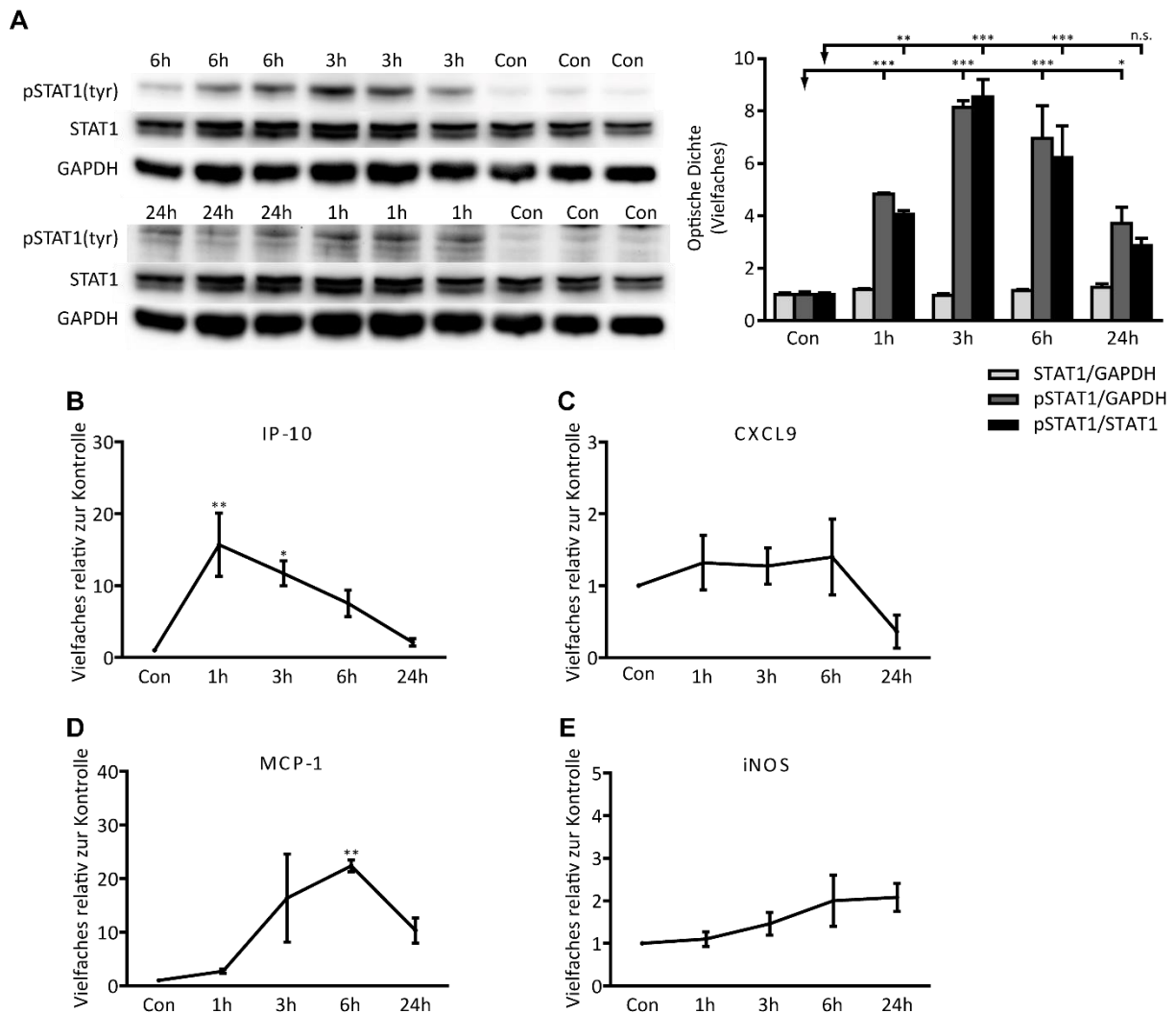


Abb. 4.6: Nach 40 Minuten unilateraler Ischämie wurde aus den Nieren nach 1, 3, 6 oder 24 Stunden Reperfuionszeit Protein oder RNA isoliert. A) Proteinisolate wurden mittels Western Blot auf STAT und pSTAT1 untersucht. Dargestellt sind beispielhafte Proteinbanden und die Quantifizierung der optischen Dichte. Als Standard diente GAPDH. B-E) Mit RT-qPCR wurde mRNA auf die Chemokine IP-10 (B), CXCL9 (C), MCP1 (D) und iNOS (E) analysiert. Als Kontrolle dienten kontralaterale, zuvor entnommene Nieren. *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001; n.s.=nicht

gemessen, wobei eine zeitlich progrediente Steigerung im Verlauf der Reperfusionzeit auffiel (Abb. 4.5 B).

Die Aktivität des STAT1-Proteins wurde mit Hilfe von Western Blot untersucht. Die Phosphorylierung von STAT1 ist abhängig von den verschiedenen Reperfusionzeiten zu erkennen. Das wird in Abb. 4.6 A quantifiziert dargestellt. Anders als in den TECS ist weniger eine Steigerung des Gesamtproteins STAT1 als eine Zunahme der Phosphorylierung zu erkennen. Sie steigt bei 1 Stunde bereits stark an und erreicht bei 3 Stunden ihren Höhepunkt.

Da sich in den Versuchen mit TECS ein Chemokinmuster nach STAT1-Aktivierung gezeigt hat, versuchten wir dieselben Chemokine auch in aus den Nieren isolierter mRNA nachzuweisen. Die Expression von IP-10 ist bereits nach einer Stunde stark erhöht und nimmt dann kontinuierlich ab, bis sie nach 24h fast wieder auf dem Ausgangsniveau angekommen ist (Abb. 4.6 B). Die Expression von MCP1 hat nach 6 Stunden ihren Höhepunkt erreicht und nimmt dann ebenfalls ab (Abb. 4.6 D). iNOS entwickelt einen stetig steigenden Trend bis zu etwa einer Verdoppelung der Expression nach 24 Stunden, jedoch reichte die gewählte Gruppengröße nicht aus, um eine Signifikanz nachzuweisen (Abb. 4.6 E).

4.5 Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch Typ I IFN nach Ischämie/Reperfusion

Da wir die isolierten TECS mit IFN γ aktivierten, stellten wir uns die Frage, ob IFN γ auch beim I/R-Schaden für die STAT1-Aktivierung verantwortlich ist und so eine

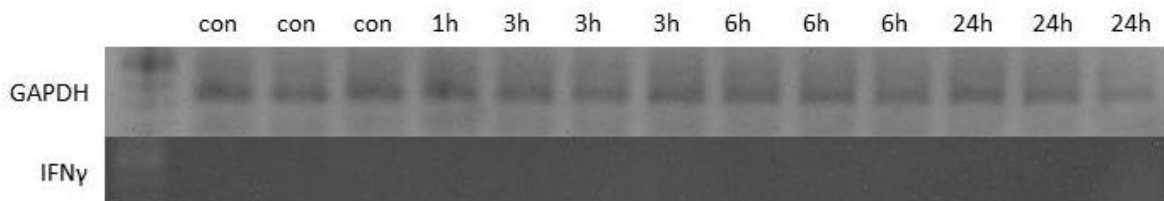


Abb. 4.7: Postischämische Nieren (40 Minuten) wurden nach 1, 3, 6 und 24 Stunden Reperfusionzeit entnommen und mittels klassischer PCR auf IFN γ untersucht. Als Kontrolle dienten Sham-operierte Tiere.

Rolle bei der Aktivierung des adaptiven Immunsystems spielt. Jedoch konnte weder mittels klassischer PCR (Abb. 4.7) noch mit RT-qPCR (Anhang, Abb. 8.2) eine Steigerung der Expression nachgewiesen werden.

Da im Rahmen der Aktivierung des JAK/STAT-pathways durch Typ I-Interferone auch eine Aktivierung von STAT1 durch IFN β existiert, untersuchten wir bei nicht nachweisbarem IFN μ die Expression dessen (Toshchakov et al. 2002). Das hierbei nachgewiesene Expressionsmuster lässt die Vermutung einer Aktivierung des pathways durch IFN β nahe (Abb. 4.8).

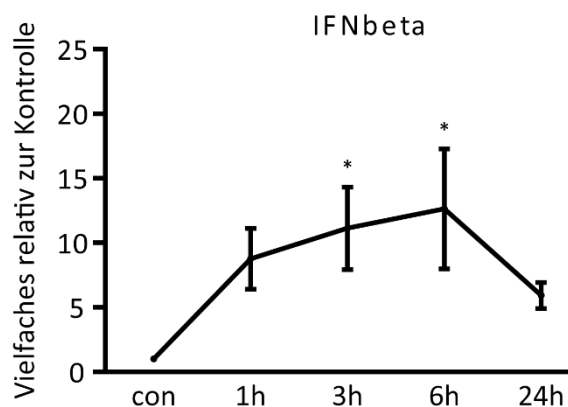


Abb. 4.8: Nach 40 Minuten unilateraler Ischämie wurde aus den Nieren nach 1, 3, 6 oder 24 Stunden Reperfusionzeit RNA isoliert und mit Hilfe von RT-qPCR auf IFN β analysiert. Als Kontrolle dienten kontralaterale, zuvor entnommene Nieren. * $p < 0,05$;

4.6 Phänotyp des STAT1-Knockouts im Kurzzeitverlauf nach Ischämie/Reperfusion

Um die Auswirkung von STAT1 $^{-/-}$ zu untersuchen, setzten wir WT und STAT1 $^{-/-}$ -Mäusen einer 40-minütigen unilateralen Ischämie, gefolgt von 24 Stunden Reperfusion aus. Da die Tubuli, insbesondere im Bereich des äußeren Markes, besonders vulnerabel für Ischämie sind, eignet sich die Tubulusnekrose als sensibler Marker. Anhand eines semiquantitativen Scores zeigte sich ein signifikanter Unterschied zugunsten der STAT1 $^{-/-}$ -Mäuse (Abb. 4.9).

Die Protektion der STAT1 $^{-/-}$ -Tiere ließ sich jedoch anhand der Nierenfunktion, also bei Betrachtung von Kreatinin und Harnstoff, nicht verifizieren (Abb. 4.10 A+B). Auch bei dem Versuch den Unterschied mit der Expression von NGAL zu bestimmen,

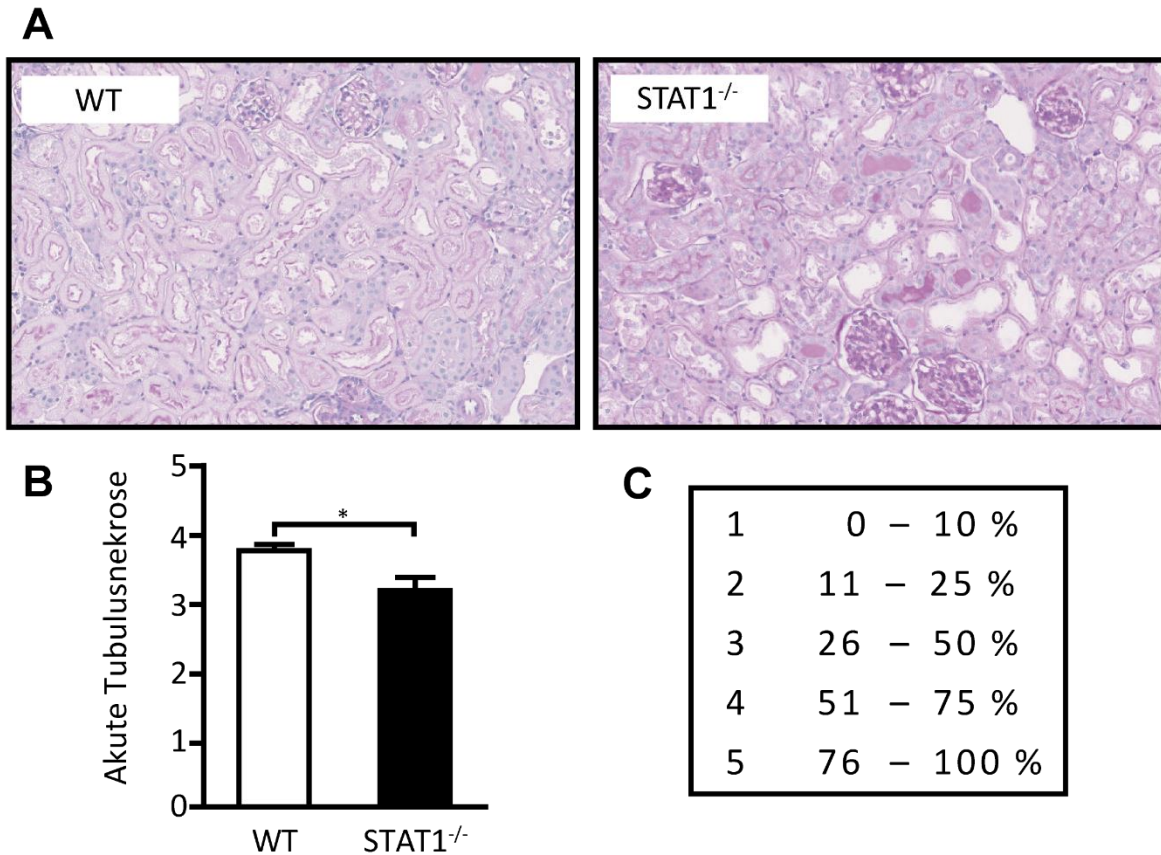


Abb. 4.9: 24 Stunden nach unilateraler Ischämie (40 Minuten) wurden linke Nieren in Paraffin eingebettet. Nach Anfertigung von Histologien (A) konnte mit Hilfe eines Scores (C) der Grad der Tubulusnekrose beurteilt werden. Im Vergleich von WT und STAT1^{-/-} zeigt sich ein niedrigerer Nekrosegrad bei STAT1^{-/-} (B). Als Kontrolle dienten kontralaterale, zuvor entnommene Nieren. *= $p < 0,05$

konnte die Verbesserung der Nierenfunktion nicht bestätigt werden (Abb. 4.10 C). Um eine Verschleierung des Phänotyps durch eine übermäßige Schädigung der Niere nach 40-minütiger Ischämie auszuschließen, wiederholten wir die Experimente mit nur 30 Minuten Ischämie. Da auch hier keine Unterschiede in Nierenfunktion oder Schädigungsmarkern gefunden werden konnten, gehen wir von einem zwar existierenden, jedoch im Orchester der akuten Schädigung nicht ausreichend prominenten Phänotyp aus. Neben den Nierenretentionsparametern (Abb. 4.11 A, B) und NGAL (Daten nicht gezeigt) zeigte auch die Expression von Kidney Injure Molecule 1 (KIM-1, Abb. 4.12 C), einem weiteren Marker für die Schädigung proximaler Tubuli, keinen Unterschied.

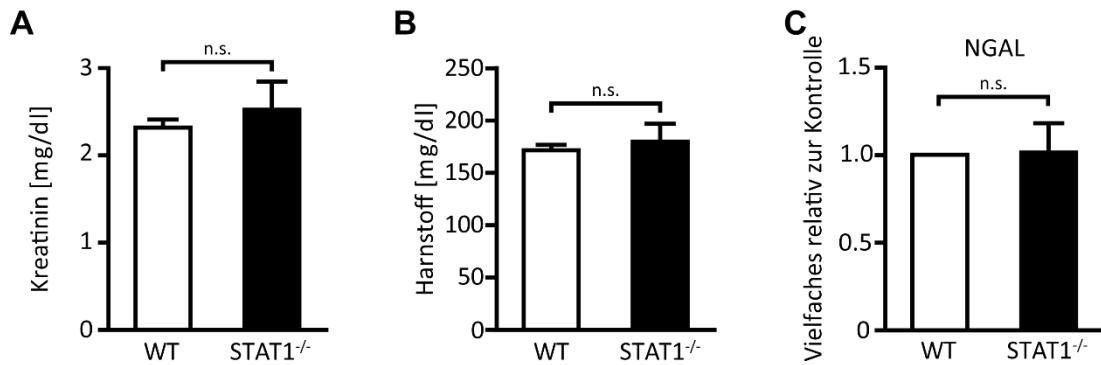


Abb. 4.10: A, B) Nach 40-minütiger unilateraler Ischämie und 24 Stunden Reperfusionzeit wurde WT und STAT1^{-/-} Mäusen Blut entnommen und die Kreatinin- (A) und Harnstoff- (B) Konzentrationen bestimmt. C) Aus den Nieren wurde mRNA isoliert und mittels reverser Transkription und RT-qPCR die Expression von NGAL untersucht. n.s.= nicht signifikant

Zusätzlich untersuchten wir erneut die bekannten und bereits in TECs als STAT1-abhängig nachgewiesenen Chemokine, um festzustellen, ob das veränderte Expressionsmuster in STAT1^{-/-} TECS auch in vivo zu finden ist. Neben IP-10 und MCP1 ist interessanterweise auch die Expression von CXCL9 stark vermindert, obwohl diese nach Ischämie/Reperfusion gegenüber Sham-operierten Tieren nicht

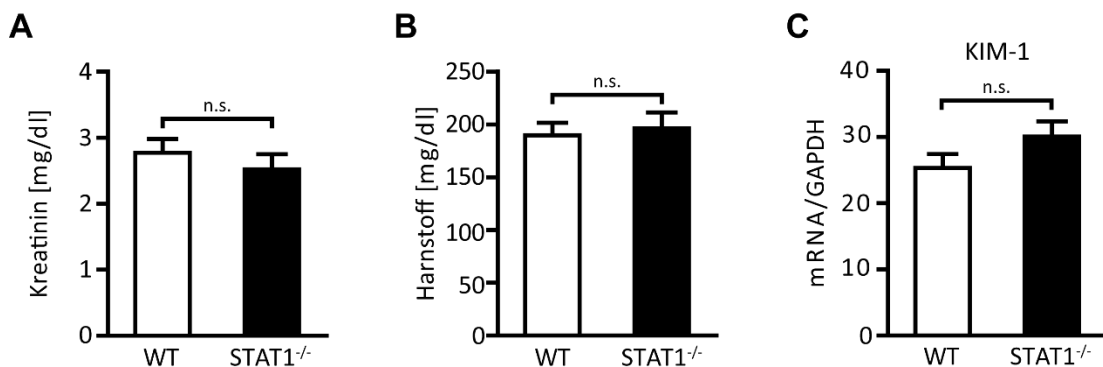


Abb. 4.11: A, B) Nach 30-minütiger unilateraler Ischämie und 24 Stunden Reperfusionzeit wurde WT und STAT1^{-/-} Mäusen Blut entnommen und die Kreatinin- (A) und Harnstoff- (B) Konzentrationen bestimmt. C) Aus den Nieren wurde RNA isoliert und mittels reverser Transkription und RT-qPCR die Expression von KIM-1 untersucht. n.s.=nicht signifikant

gesteigert war (Abb. 4.12). Auch in den TECS hatte das Fehlen von STAT1 einen enormen Einfluss auf die CXCL9 Expression.

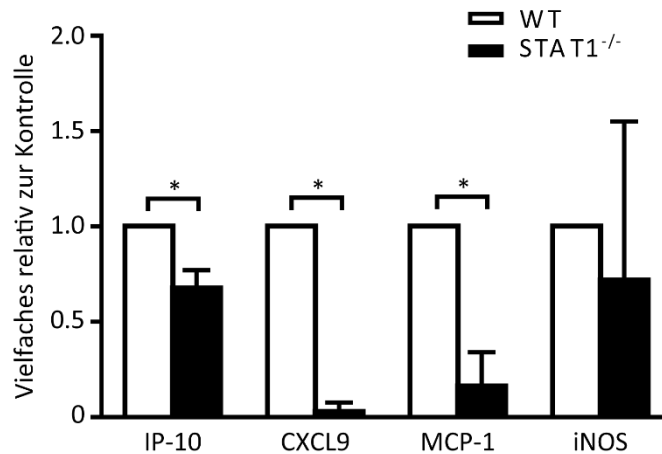


Abb. 4.12: Postischämische (40 Minuten) Nieren von WT und STAT1^{-/-} Mäusen wurden nach 24 Stunden entnommen und mRNA wurde isoliert. Mittels reverser Transkription und RT-qPCR wurde diese auf die Chemokine IP-10, CXCL9, MCP1 und iNOS untersucht. *=p<0,05

4.7 In vivo STAT1-Inhibition nach Ischämie/Reperfusion

Da anhand der akuten Tubulusnekrose ein protektiver Phänotyp von STAT1^{-/-} gezeigt werden konnte, entschieden wir uns zur Durchführung einer Interventionsstudie. Wir entschieden uns für das vielerprobte Cytostatikum Fludarabine zur selektiven Inhibition von STAT1 und applizierten dieses intraperitoneal. 2h vor Beginn der Ischämie und intraperitoneal DMSO als Kontrolle. Weder anhand der Nierenfunktion noch im Grad der akuten Tubulusnekrose konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Auch die JAK2-Inhibition im selben Modell mit AG-490 blieb ohne Unterschiede der Nierenfunktion (Abb. 8.3), was im Kontrast zu bereits im renalen I/R in Ratten erfolgten Untersuchungen steht. Anders als in vitro blieb die Reduktion der Expression STAT1-abhängiger Chemokine in diesem Versuch aus (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise spricht das für eine

unzureichende JAK2-Blockade durch AG-490 in unserem Versuchsaufbau. Aufgrund des ohnehin nur geringen Phänotyps nach STAT1^{-/-} überrascht aber die ausbleibende pharmakologische Protektion nicht.

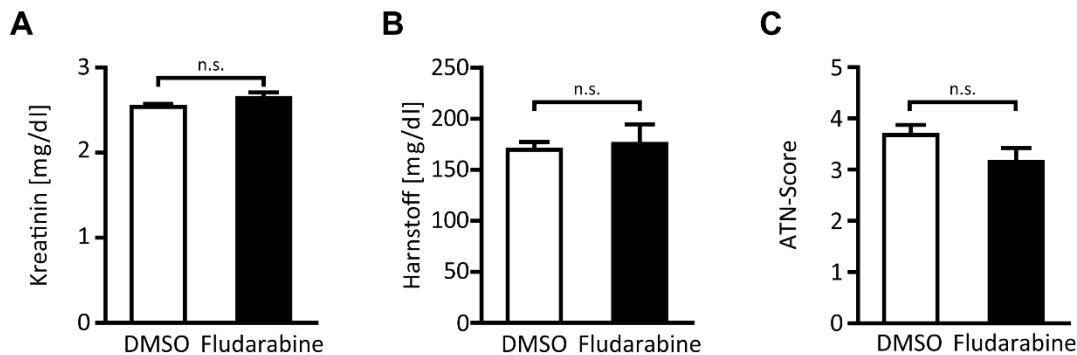


Abb. 4.13: 2 Stunden vor Beginn der 40 Minuten unilateralen Ischämie wurde WT-Mäusen 100µl Fludarabine (25mg/ml in DMSO) oder DMSO injiziert. A, B) Die Nieren wurden nach 24 Stunden Reperfusion entnommen und im Serum der Mäuse wurde Kreatinin (A) und Harnstoff (B) bestimmt. C) Nach Anfertigung von Histologien konnte mit Hilfe eines Scores der Grad der Tubulusnekrose beurteilt werden. n.s.=nicht signifikant

4.8 STAT1 abhängige Fibrose im Langzeitverlauf nach Ischämie/Reperfusion

Anhand unserer bisherigen Ergebnisse mit klarem in vitro Phänotyp der STAT1^{-/-} Tubuluszellen ohne jedoch klinisch hervorstechende Unterschiede in der Nierenfunktion im Kurzzeitverlauf nach I/R zwischen WT und STAT1^{-/-} sollten nun die möglichen Langzeitfolgen der Nierenheilung im Sinne von Fibrosebildung untersucht werden. WT- und STAT1^{-/-}-Mäuse wurden einer 30-minütigen unilateralen Ischämie, gefolgt von 30 Tagen Reperfusion, unterzogen. Die histologische Auswertung anhand immun-histochemischer Färbungen von α -smooth muscle antigen (SMA), Lectin, der glomerulären Dichte sowie eines Fibrosescores gebildet aus den Färbungen Masson trichrome, Silber und Kollagen, bestätigen den Phänotyp mit deutlich mehr Fibrose bei STAT1^{-/-} (Abb. 4.14 B-E). Dies bestätigte den visuellen Eindruck der deutlich stärker renkulierten und fibrotisch durchzogenen postischämischen Nieren der STAT1^{-/-}-Mäuse (Abb. 4.14 A). Die nicht einer Ischämie

unterzogenen rechten Nieren dienten jeweils als Kontrolle. STAT1 wirkt also protektiv vor Fibrose im Langzeitverlauf 30 Tage nach renalem I/R.

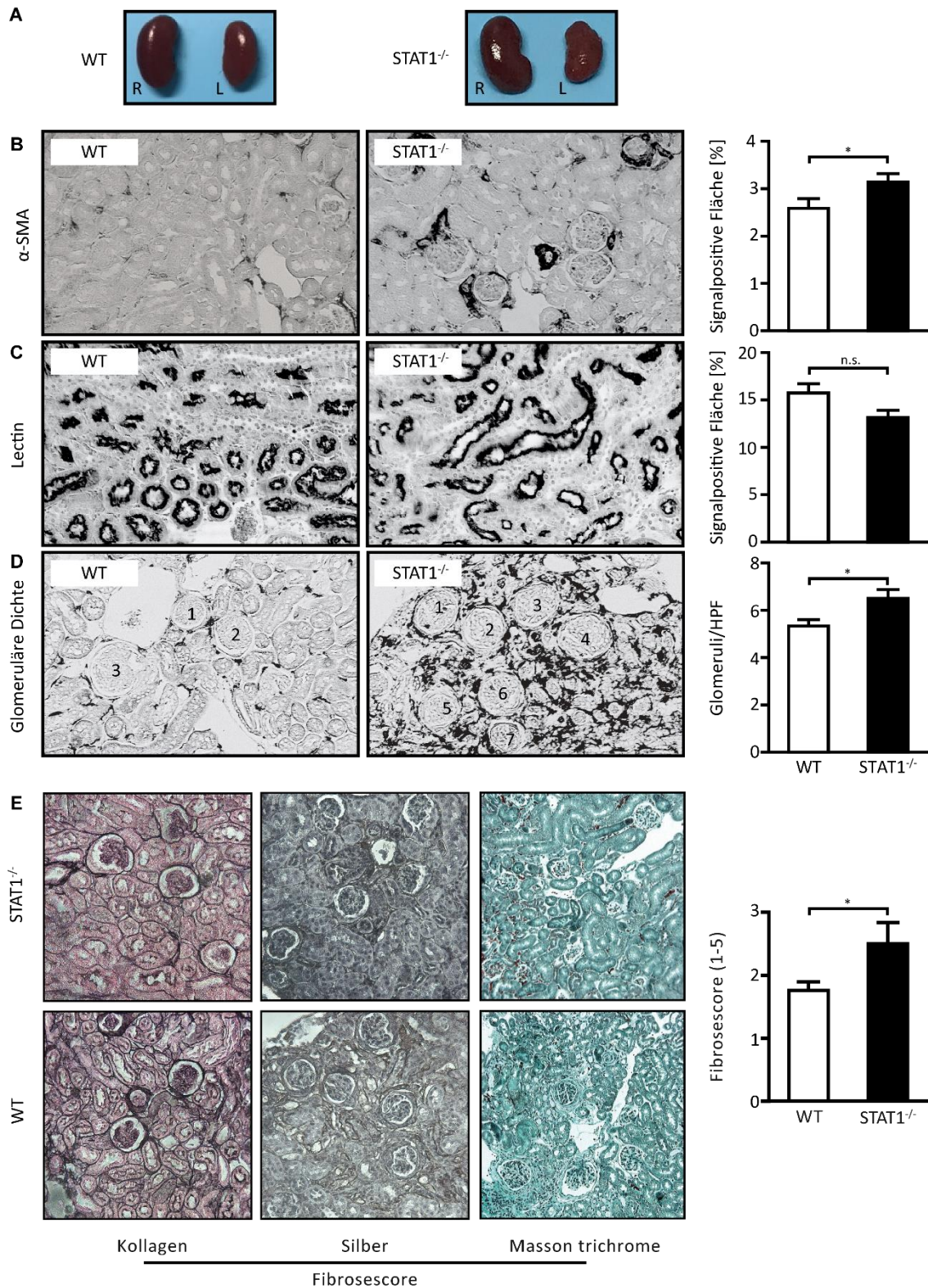


Abb. 4.14: WT und STAT1^{-/-} Mäuse wurden einer 30-minütigen unilateralen Ischämie gefolgt von 30 Tagen Reperfusion unterzogen. A) Beispielbilder für unbehandelte (r) und fibrotische (l) Nieren. B, C) Immunhistologische Bestimmung von α SMA und Lectin sowie die optische Quantifizierung. D) Anzahl der Glomeruli pro high-power-field. (HPF). E) Kollagen-, Silber- und Masson trichrome-Färbungen wurden an histologischen Schnitten durchgeführt. Der Graph zeigt den Durchschnitt eines Scores zur Bestimmung des Fibrosegrades. Adaptiert nach Kemmner und Bachmann et. al. 2019. *=p<0,05; n.s.=nicht signifikant

5 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Signalintegration nach simultaner TLR4 und STAT1-Aktivierung in TECs stattfindet. Dies ist vereinbar mit vorherigen Untersuchungen, die eine Signalintegration bereits in Makrophagen, Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen konnten (Hu et al. 2007, Hu et al. 2008, Sikorski et al. 2011, Qiao et al. 2013, Chmielewski et al. 2014). Da diese Signalwege bei der Aktivierung und Steuerung des Immunsystems beteiligt sind und die postischämische Inflammation maßgeblich zum I/R beiträgt, impliziert dieser STAT1-abhängige Signalintegrationsprozess in TECS einen möglichen positiven Nutzen einer STAT1-Inhibierung auf das Outcome der akuten Nierenschädigung. In weiteren Untersuchungen konnten wir zwar in einem letalen I/R Modell bei STAT1-Defizienz ein besseres histologisches Outcome nachweisen, dies schlug sich jedoch nicht in einer signifikant besseren Nierenfunktion 24 Stunden post reperfusionem nieder. Im Langzeitverlauf nach I/R zeigt sich allerdings deutlich mehr Fibrose bei STAT1-Defizienz. Im Weiteren sollen unsere Ergebnisse und der Einfluss von STAT1 auf den renalen Ischämie/Reperfusionsschaden diskutiert werden.

5.1 Eine TLR4-STAT1-Signalintegration in TECs findet statt

Es ist bekannt, dass eine Signalintegration zwischen IFN γ und TLR4 in verschiedenen Immunzellen wie Makrophagen aber auch in nicht Immunzellen wie Splenozyten, Milchgangepithelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen stattfindet. Wir konnten zeigen, dass dies auch in den von uns behandelten TECs vorkommt. Die hohe Expression von IP-10, CXCL9, MCP1 und iNOS nach Stimulation mit IFN γ und LPS belegt dies. Das Ausbleiben der Expressionssteigerung in den STAT1^{-/-}-Zellen, lässt den Schluss zu, dass der Effekt STAT1-vermittelt ist.

Verschiedene Mechanismen, die zur Amplifikation dieser Signale beitragen, wurden bereits identifiziert (Schroder et al. 2006, Sikorski et al. 2011, Sikorski et al. 2012). Wir konnten zeigen, dass diese Mechanismen auch in den von uns behandelten TECs ablaufen. Dabei fanden wir ein Muster proinflammatorischer Chemokine die außerdem auf eine Signalintegration zwischen dem TLR4- und

JAK2/STAT1-Signalweg schließen lässt. Die hohe Expression von IP-10, CXCL9, MCP1 und iNOS nach Stimulation mit IFN γ und LPS ist Ausdruck dessen.

Interessanterweise war zwar eine starke Phosphorylierung von STAT1 nach Behandlung mit IFN γ und IFN γ + LPS vorhanden, jedoch zeigte sich zwischen den beiden Behandlungen kein Unterschied. Ein in der Literatur beschriebener Mechanismus der Signalintegration ist die Phosphorylierung von STAT1, die nach Behandlung von IFN γ gefolgt von LPS höher ausfällt als nach Behandlung mit IFN γ alleine (Schroder et al. 2006). Dies scheint also auf TECs nicht zwangsweise zuzutreffen.

Es ist bekannt, dass zur maximalen Aktivierung von STAT1 nicht nur die Tyrosinphosphorylierung, sondern eine zusätzliche 727-Serinphosphorylierung am C-terminalen Ende benötigt wird (Wen et al. 1995, Decker et al. 2000). In humanen Makrophagen konnte gezeigt werden, dass eine Serinphosphorylierung unabhängig von JAK-Rezeptoren stattfindet, die eine gute Erklärung der Signalintegration bieten könnte (Shoenfelt et al. 2006). Die Untersuchung von mit LPS, IFN γ oder LPS+IFN γ behandelten TECs auf Serin-phosphoryliertes STAT1 zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen IFN γ allein oder mit zusätzlich LPS, so dass dieser Mechanismus nicht für das Chemokinmuster verantwortlich gemacht werden kann.

Ein jüngeres Modell beschreibt Chromatin-remodeling als Ursache für die Signalintegration (Qiao et al. 2013). Laut diesen Erkenntnissen führt IFN γ -abhängige STAT1-Aktivierung zu Histonacetylierung in Promotorregionen für TNF, IL6 und IL-12B, ohne dort Transkription zu induzieren. Vielmehr kommt es zu einer Verstärkung der Wirkung TLR4-abhängiger Transkriptionsfaktoren. Deshalb sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu determinieren, ob vielleicht dies oder ein anderer Mechanismus zur beschriebenen Signalintegration führt.

Insgesamt konnte bestätigt werden, dass TECs im Stande sind, eine Chemokinantwort auf proinflammatorische Zytokine zu generieren und dass diese bei simultaner Aktivierung von STAT1 und TLR4 massiv amplifiziert wird.

5.2 JAK/STAT-Inhibitoren unterbrechen die Signalintegration

Auch in Voraussicht möglicher I/R-Interventionsversuche mit Inhibitoren des JAK/STAT-Signalweges wählten wir mehrere Substanzen mit unterschiedlichen Angriffspunkten im JAK/STAT-Signalweg. Es gilt herauszufinden, in welchen Zellen die Aktivierung von STAT1 und die unter Umständen damit verbundene Signalintegration zum Tragen kommt. Es ließ sich zeigen, dass direkte Inhibition von STAT1 (Stattic) und indirekte via JAK2 (Ag490) die Signalintegration mit IFN γ und LPS bremst bzw. weitestgehend eliminiert (Meydan et al. 1996, Szelag et al. 2013). So kamen wir zu dem Schluss, dass an einem etwaigen positiven Effekt der Inhibition von STAT1 im I/R in vivo die Unterbrechung der Signalintegration in TECs mit verantwortlich ist.

5.3 STAT1^{-/-} verhindert Chemokinproduktion nach oxidativem Stress

Es ist eine anerkannte Methode I/R mittels sauerstoffarmer Atmosphäre zu simulieren und so entsprechende Zellen oxidativem Stress auszusetzen (Jiang et al. 2010). Dabei wird entweder versucht ganze Tubuli zu isolieren und diese einer kurzen Hypoxiezeit auszusetzen, oder kultivierte TECs werden einer längeren Hypoxie (zum Beispiel 24 Stunden) ausgesetzt (Almeida et al. 1992, Yu et al. 2016). Eine größere Anzahl an zellulären Bestandteilen und Medikamenten, die zur Protektion von TECs im I/R beitragen können wurden so identifiziert (Almeida et al. 1992, Ling et al. 1998, Lien et al. 2003, Shi et al. 2009, Linkermann et al. 2012, Suh et al. 2014, Braun et al. 2015, Yu et al. 2016). Unsere Analyse zum STAT1-Protein und die Expression davon abhängiger Chemokine (IP-10, iNOS) lässt eindeutig auf aktives STAT1 nach 24 Stunden andauernder Hypoxie schließen. Eine iNOS-Defizienz schützt TECs vor Hypoxie (Ling et al. 1998). Dies ist vermutlich damit erklärbar, dass iNOS als Isoenzym der NO-Synthase maßgeblich an der Produktion von NO beteiligt ist (Knowles et al. 1994). NO selbst wurde als Mediator von Tubuluszellschaden im I/R identifiziert (Yu et al. 1994). Auch in den STAT1^{-/-} Zellen fällt die Expression von iNOS und auch IP-10 bedeutend geringer aus als in WT, so dass auch in diesem Kontext von einem protektiven Effekt der STAT1-Defizienz ausgegangen werden kann.

5.4 STAT1 wird bei renalem I/R aktiviert

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass STAT1 im I/R aktiviert wird. Dies wurde auf Proteinebene durch Phosphorylierung von STAT1 und durch die Expressionssteigerung von Chemokinen, die STAT1-abhängig aktiviert werden können, sichtbar. Da die Expression von IP-10, CXCL9 und MCP1 in STAT1^{-/-}-Tieren gegenüber WT-Tieren niedriger ausfällt, kann man darauf schließen, dass diese Expressionssteigerung STAT1-vermittelt zu sein scheint und nicht auf einen anderen Transkriptionsfaktor zurückzuführen ist.

Üblicherweise wird der JAK2/STAT1-Signalweg von IFN γ aktiviert. In der Literatur existieren Ergebnisse, die darauf hinweisen, dass dies auch im renalen I/R passiert (Yang et al. 2008). Wahrscheinlich wird IFN γ von natürlichen Killer T (NKT)-Zellen und neutrophilen Granulozyten sezerniert, die schon nach 30 Minuten bzw. 3 Stunden die Niere infiltrieren (Li et al. 2007). Der von uns beschriebene Zeitverlauf der STAT1-Phosphorylierung geht einher mit der Infiltration der IFN γ -produzierenden Zellen. Zwar liefert die FACS-Analyse klare Ergebnisse zum Vorhandensein von IFN γ , trotzdem gibt es in der Literatur wenige Daten zum Nachweis auf mRNA und Proteinebene. Auch in unseren Untersuchungen war es leider nicht möglich IFN γ -mRNA anhand klassischer PCR mit Gelelektrophorese oder RT-qPCR nachzuweisen.

Aus diesem Grund untersuchten wir Nierengewebe auf das Vorhandensein von IFN β . Auch IFN β ist nämlich im Stande über JAK2 eine STAT1-Phosphorylierung hervorzurufen (Sanceau et al. 2000, Toshchakov et al. 2002, Wesoly et al. 2007). Tatsächlich stellte sich heraus, dass es auf mRNA-Ebene zu einer Steigerung der Expression kommt. Trotz eindeutiger Hinweise in der Literatur auf das Vorliegen einer STAT1-Aktivierung durch IFN γ , konnte so auf Expressionsebene gezeigt werden, dass ein weiteres STAT1-aktivierendes Cytokin, IFN β , zu einer STAT1-Aktivierung bei I/R führt.

5.5 STAT1-Defizienz schützt vor akuter Tubulusnekrose im renalen I/R

I/R-Versuche mit verschiedenen Knockout-Tieren konnten in der Vergangenheit zeigen, welche Rezeptoren oder intrazellulären Proteine zum verursachten Schaden

beitragen, beziehungsweise bei Inhibition protektiv wirken. Unsere Untersuchungen sollten herausfinden, ob die Signalintegration via STAT1 dazugehört. Der JAK2-Inhibitor Ag490 stellte sich als wirksames Agens bei I/R im Rattenmodell heraus (Yang et al. 2008). Auch wenn dabei ebenfalls die Phosphorylierung von STAT1 abgenommen hat, kann der Effekt nicht mit Sicherheit auf STAT1 zurückgeführt werden, da JAK2 an mehrere Rezeptoren gekoppelt sein kann und Teil von verschiedenen JAK/STAT-Signalwegen ist, bzw. indirekt auch Transkriptionsfaktoren anderer Signalweg-Familien aktiviert (Parganas et al. 1998, Herrington et al. 2001, Gu et al. 2003). Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass unsere Ergebnisse von denen Yangs et al. abweichen. In Kapitel 5.3 wurde die im I/R ablaufende STAT1-Aktivierung besprochen. Der Grad der Tubulusnekrose ist in STAT1^{-/-} geringer als in WT-Tieren, was für einen protektiven Effekt spricht. Dieser Phänotyp scheint jedoch nicht ausgeprägt genug, um einen Einfluss auf die Nierenfunktion zu haben. Möglicherweise liegt dies aber am höheren Gewicht der STAT1^{-/-}-Tiere, denn Serumkreatinin und Harnstoff korrelieren, wie im Menschen, auch in Mäusen mit dem Körpergewicht (Dunn et al. 2004). Da nur männliche Tiere desselben Alters für die Versuche verwendet wurden, ist der Gewichtsunterschied wahrscheinlich eine Ausprägung der genetischen Veränderung. Letztendlich führte die STAT1-Defizienz zu keinem so starken Phänotyp nach I/R, dass es sich durch eine bessere Nierenfunktion oder reduzierter Expression von NGAL und KIM-1 als Marker der Tubuluszellschädigung bemerkbar macht (Heyne et al. 2012).

Sowohl bei der histologischen Betrachtung der Tubulusnekrose als auch bei der Expression von NGAL, fiel ein sehr hohes Maß an Schädigung im verwendeten Modell auf. Vergleicht man nämlich die Ischämiezeit von 40 Minuten des verwendeten unilateralen Modells mit anderen in der Literatur gebräuchlichen Modellen, muss man von einem sehr hohen Grad der Nierenschädigung mit letaler Konsequenz für den Organismus ausgehen (Linkermann et al. 2013, Hesketh et al. 2014). Deshalb könnte die durch die 40 Minuten Ischämie verursachte Nierenschädigung so stark ausgeprägt sein, dass ein etwaiger Effekt der STAT1-Inhibierung nicht in der Weise zum Tragen kommt wie durch kürzere Ischämie. Womöglich resultierte auch die daraufhin gewählte Ischämiezeit von nur 30 Minuten in noch einem zu großen Schaden. Bekannterweise existiert eine große Bandbreite an inflammatorischen Prozessen die den I/R vermitteln und durch die vermutlich eine zu starke

Entzündung vermittelt wird, um die protektive Wirkung des Knockouts nachzuweisen. Deshalb sind weitere Untersuchungen mit veränderten Parametern, insbesondere einer kürzeren Ischämiezeit nötig, um die Frage endgültig beantworten zu können.

5.6 Akute Tubulusnekrose bleibt bei pharmakologischer STAT1-Inhibition unverändert

Die zwei im, ebenfalls 40-minütigen, Interventionsmodell durchgeführten Versuchsreihen können mit den in Kapitel 5.5 gezogenen Schlüssen in Einklang gebracht werden. Mit Ag490 konnte kein signifikanter Vorteil der Interventionsgruppe im gewählten letalen Modell mit 40-minütiger Ischämie nachgewiesen werden, jedoch ist angesichts der Kreatinin- und Harnstoffwerte ein Trend zugunsten dieser Gruppe ersichtlich. Dies steht interessanterweise nicht im Einklang mit dem von Yang et. Al. 2008 publizierten Ergebnis im vergleichbaren Rattenmodell. Ginge man dennoch von einer protektiven Wirkung der JAK2-Inhibition aus, lässt sich allein durch diesen Versuch nicht feststellen, ob die geringere Aktivierung von STAT1 dafür verantwortlich ist. Für einen nicht STAT1-vermittelten Effekt spricht die fehlende Reduktion der Expression von IP-10, CXCL9 und iNOS.

Betrachtet man die Daten der Versuche mit dem spezifischen STAT1-Inhibitor Fludarabine, scheint dieser keinen protektiven Einfluss auf die Nierenfunktion zu haben. Ähnlich wie bei den STAT1^{-/-}-Tieren zeigt jedoch die Tubulusnekrose einen nicht signifikanten Trend zugunsten der Interventionsgruppe. Zusammen mit den STAT1^{-/-}-Ergebnissen bestätigt dies die Vermutung, dass STAT1 zwar aktiviert wird und der JAK/STAT-Signalweg auch an der Reperfusion-Inflammation beteiligt ist, die alleinige Inhibierung von STAT1 jedoch in diesem harten Modell nicht ausreicht, um eine Verbesserung der Nierenfunktion anhand von Retentionsparametern wie Kreatinin festzustellen.

5.7 STAT1 schützt vor Fibrose im Langzeitverlauf nach Ischämie/Reperfusion

Wie bereits erwähnt, besteht die Möglichkeit einer zu großen Schädigung durch den I/R, um unmittelbar postinterventionell einen Unterschied der Nierenfunktion anhand von Retentionsparametern messen zu können. Die reduzierte Chemokinproduktion mag zwar den Influx an Immunzellen herabsetzen oder modulieren (Bernhardt et al. 2017), möglicherweise hat dies aber keinen Einfluss auf den durch Hypoxie und oxidativen Stress ausgelösten Zelltod der proximalen Tubuluszellen. Einige zu diesem Zeitpunkt durchgeführte Studien legen nahe, dass die Erforschung und Beeinflussung verschiedener zwischen Apoptose und Nekrose liegender Wege des Zelltodes vielversprechende Therapieansätze zur Unterdrückung der ATN bereithalten könnte (Linkermann et al. 2012, Friedmann Angeli et al. 2014). Detaillierter werden diese Zusammenhänge unter 5.8 diskutiert.

Vielmehr mag deshalb die Beeinflussung der Immunzellen sowie die konsekutive Inflammation den Weg der Resolution bzw. des „Aufräumens“ nach I/R eine größere Rolle als die ATN spielen, wenn man STAT1^{-/-} betrachtet. Insbesondere ist dabei die Spanne zwischen der funktionellen Heilung „ad integrum“ und der Narbenheilung, im Falle der Niere IF/TA genannt, gemeint. IF/TA stellt neben der Glomerulosklerose das histologische Pendant zum Funktionsverlust von Eigen- und Transplantatnieren dar (Nankivell et al. 2018).

Neben der bekannten STAT1-abhängigen Produktion von CXCL9 und IP-10 durch Makrophagen konnten unsere Untersuchungen zeigen, dass die primären Tubuluszellen selbst am Entzündungsgeschehen beteiligt sind. Die daraus resultierende Chemoattraktion von T-Zellen und die Beeinflussung ihres Subtyps spielt für das Schicksal des Organs eine entscheidende Rolle und entscheidet zum Beispiel über Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantation (Hidalgo et al. 2012). Die genauen Wege und Schlüsselprozesse dieses Vorganges sind Gegenstand aktueller Forschung und bedürfen weiterer Untersuchungen. Von unserer Gruppe durchgeführte Experimente an renalen Transplantatbiopsien konnte eine geringere STAT1-Expression bei höherem Grad an IF/TA nachweisen (Kemmner et al. 2019). Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen geringerer Fibrose der WT-Tiere im Vergleich zu den STAT1^{-/-} Tieren.

5.8 Der STAT1-abhängige Makrophagenphänotyp beeinflusst den Fibrosegrad

Eine in theoretischer Analogie zu den T-Zell-Subtypen entstandene Untergliederung der Makrophagen teilt diese in eher proinflammatorische, typisch aktivierte M1-Makrophagen und eher antiinflammatorische, alternativ aktivierte M2-Makrophagen. Zwar lassen sich die Makrophagen anhand der Expression von Oberflächenmarkern sowie funktionalen Assays in typisch und alternativ unterteilen, die jeweilige Rolle ist aber stark vom Untersuchungsmodell abhängig. So konnte die Produktion proinflammatorischer Marker sowie eine Mitwirkung bei der Narbenbildung in Organen als Eigenschaften alternativ aktivierter Makrophagen nachgewiesen werden (Cao et al. 2015). Wie bereits erwähnt findet die Differenzierung der Monozyten in den entsprechenden Phänotyp zum Teil abhängig vom JAK2/STAT1-Signalweg statt (Liang et al. 2017). Dies lässt die Spekulation zu, dass STAT1 neben dem inflammatorischen Chemokinmilieu über Unterschiede intrinsischer Signalkaskaden den Makrophagenphänotyp und so das Schicksal des Organs hinsichtlich Fibrose beeinflusst.

Die im Anschluss an die Experimente dieser Arbeit durchgeführten Versuche unserer Gruppe konnten die Neigung muriner STAT1^{-/-}-Knochenmarkmonozyten nachweisen, in einen alternativ aktivierten Phänotyp zu differenzieren (Kemmner et al. 2019). Dies erfolgte wiederum anhand von Oberflächenmarkern und funktionellen Versuchen. Diese STAT1 abhängige Verschiebung des Makrophagenphänotyps stellt daher einen möglichen Mechanismus des protektiven Effekts von STAT1 bezüglich der Fibrose im Langzeitverlauf nach renalem I/R dar.

5.9 Unsere Ergebnisse im Kontext anderer Untersuchungen

Vielversprechende Ansätze zur Behandlung der AKI nach I/R konnten in vielen Signalwegen der regulierten Nekrose nachgewiesen werden. Schaltet man ein Schlüsselmolekül der Necroptose, RIPK1, mit einem Inhibitor aus, haben die Mäuse einen signifikanten Vorteil nach I/R (Linkermann et al. 2012). Gleiches gilt für RIPK3 und Cyclophilin (Cyp)D, Moleküle die vermutlich Teile verschiedener Signalwege der RN sind und deshalb besonders in doppelknockout-Mäusen einen großen Überlebensvorteil nach I/R bringen (Linkermann et al. 2013). RIPK3 vermittelt

Necroptose und CypD mitochondriale Permeabilitäts transition (MPT). Pyroptose, bei der via NLRP3, Caspase-1 und Caspase-11, ein cytosolischer Proteinkomplex („Inflammasom“) gebildet wird das zur Porenbildung in der Membran von Makrophagen führt oder Parthanatos, das via PARP-1 den programmierten Zelltod einleitet, sind weitere Signalwege der RN, die eine wichtige Rolle bei Ischämie/Reperfusion spielen könnten (Suzuki et al. 2007, Bergsbaken et al. 2009, Devalaraja-Narashimha et al. 2009, Cerqueira et al. 2015). Diese Signalwege haben alle gemein, dass Knockout-Mäuse der Schlüssel-moleküle keinen Phänotyp zeigen, anders als Knockout-Mäuse von Caspasen die zur Apoptose führen (Salmena et al. 2003). Unter Berücksichtigung dieses schnell wachsenden Forschungsfeldes, mit rasch hinzukommenden neuen Erkenntnissen, scheint aktuell eine herausragende Rolle von STAT1 bei der akuten Nierenschädigung fraglich.

Andererseits haben es die Ergebnisse der bis heute seit Jahrzehnten andauernde Forschung zur medikamentösen Beeinflussung eines hypoxischen Schadens parenchymatöser Organe wie Leber und der Niere aber auch von Herz und Gehirn nicht erlaubt, eine klinisch wirksame Therapie zu entwickeln (Soares et al. 2019). Teil von Spekulation bleibt, ob die eingesetzten Modelle Phänotypen bestimmter Signalwege bevorzugen oder sich die akute Schädigung möglicherweise doch als mehr hypoxisch-unkontrollierter Natur infolge einer fehlgeleiteten Antwort des Immunsystems darstellt. In diesem Sinne bleibt es spannend, ob die Ergebnisse der zu Beginn dieses Abschnitts zitierten Arbeiten eine reellere Chance einer klinischen Relevanz haben.

5.10 Fazit

In dieser Arbeit wurde erstmals die Auswirkung einer STAT1-Defizienz auf den I/R in Mäusen als Model der AKI untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die postulierte Signalintegration zwischen TLR4 und JAK/STAT in TECs stattfindet und STAT1-abhängig ist. Sowohl das Ausschalten des STAT1-Gens wie auch Inhibitoren von JAK/STAT-Signalwegen deaktivieren die Signalintegration. Das gleiche gilt für TECs unter hypoxischen Bedingungen, was den Schluss zulässt, dass auch TECs bei I/R, die auch Hypoxie erleiden, ähnlich reagieren. Betrachtet man den Grad der

Tubulusnekrose nach 30 und 40 Minuten Ischämie und 24 Stunden Reperfusion der Niere fällt dieser in WT-Mäusen höher als in STAT1^{-/-}-Mäusen aus. Trotzdem ist kein Unterschied in der Nierenfunktion ersichtlich. Der Langzeitverlauf von 30 Tagen nach Ischämie/Reperfusion zeigt bei STAT1-Defizienz signifikant mehr Fibrose im Vergleich zum Wildtyp. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Aktivierung von STAT1 im Rahmen des I/R stattfindet. Ein gering protektiver Effekt einer STAT1 Defizienz lässt sich zwar im Kurzzeitverlauf beobachten, im Langzeitverlauf zeigt sich dann allerdings ein gegenteiliger Effekt mit mehr Fibrose. Deshalb gehen wir von unterschiedlichen Effekten von STAT1 zu unterschiedlichen Zeiten im I/R-Prozess aus. Vermutlich ist die STAT1-vermittelte Chemokinexpression und Leukozyteninfiltration nur einer von vielen parallel ablaufenden Prozessen. Ein Unterschied im Phänotyp kann deshalb möglicherweise nur in einem engen Korridor aus gesetztem Schaden nachgewiesen werden.

6 Zusammenfassung

Der renale Ischämie/Reperfusionsschaden mit dem histologischen Korrelat der akuten Tubulusnekrose ist Hauptursache der akuten Nierenschädigung und postischämische Entzündungsprozesse tragen maßgeblich zur hohen Mortalität und Morbidität bei. Die Inhibierung von JAK2 und TLR4 im Einzelnen wirken protektiv auf I/R im Mausmodell.

Vorherige Untersuchungen u.a. im Modell der Atherosklerose konnten bei simultaner Aktivierung von TLR4 und dem JAK2/STAT1-Signalweg eine Amplifikation der Zielgene nachweisen.

Wie auch in Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen findet in TECs eine STAT1-abhängige Signalintegration nach Stimulation mit IFN γ und LPS statt, die zur Expressionssteigerung der Chemokine IP-10, CXCL9, MCP1 und iNOS führt. Die der Hypoxie ausgesetzten TECs zeigten ebenfalls eine STAT1-abhängige Expressionssteigerung von IP-10 und iNOS. Auch der I/R löste eine STAT1-Aktivierung mit einem entsprechenden Chemokinmuster aus. Jedoch war kein Unterschied zwischen Wildtyp und STAT1^{-/-} Mäusen in der Nierenfunktion, an Kreatinin und Harnstoff gemessen, feststellbar. Trotzdem zeigten die STAT1^{-/-}-Mäuse eine geringe ausgeprägte Tubulusnekrose.

Im Langzeitverlauf zeigen STAT1^{-/-}-Mäuse einen höheren Grad renaler Fibrose nach I/R. Eine Neigung zum alternativ aktivierten Phänotyp der STAT1^{-/-}-Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp stellt einen möglichen Mechanismus zur Erklärung dieser Beobachtung dar.

Wir konnten zeigen, dass es sowohl zur Signalintegration in TECs, als auch zur Aktivierung des JAK2/STAT1-Signalwegs im I/R der Niere kommt. Letztendlich aber lassen die vorliegenden Ergebnisse nicht darauf schließen, dass eine STAT1 Defizienz einen protektiven Effekt in diesem Modell hat. Deshalb sind weitere Versuche mit weniger drastischen Modellen notwendig um die Frage, ob sich eine STAT1-Defizienz im Kurzzeitverlauf protektiv auswirkt, endgültig zu beantworten. Im Langzeitverlauf ist ein schädlicher Einfluss einer STAT1-Inhibition zu erwarten.

7 Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen

- 1) S. Kemmner*, Q. Bachmann*, S. Steiger, G. Lorenz, M. Honarpisheh, O. Foresto-Neto, S. Wang, J. Carbajo-Lozoya, V. Alt, C. Schulte, S. Chmielewski, H. A. R. Bluysen, U. Heemann, M. Baumann, M. Lech[#] and C. Schmaderer[#] (2019). "STAT1 regulates macrophage number and phenotype and prevents renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury." *Am J Physiol Renal Physiol* 316(2): F277-f291 DOI: 10.1152/ajprenal.00004.2018. *(Fachartikel, *,# geteilte Autorenschaft)*
- 2) Q. Bachmann, M. Lech, S. Steiger, O. Foresto Neto, G. Lorenz, M. Honarpisheh, V. Alt, U. Heemann, M. Baumann, C. Schmaderer, S. Kemmner (2017). „STAT1 unterdrückt renale Fibrose durch Regulation von Makrophagendichte und Phänotyp nach renaler Ischämie“. *(Vortrag Deutsche Gesellschaft für Nephrologie)*
- 3) S. Kemmner, Q. Bachmann, G. Lorenz, O. Foresto-Neto, M. Baumann, U. Heemann, M. Lech, C. Schmaderer (2017). „STAT1 prevents renal fibrosis via regulation of macrophage number upon renal ischemic injury“. *(Vortrag ESOT)*
- 4) S. Kemmner, Q. Bachmann, S. Chmielewski, U. Heemann, M. Baumann (2014). „Die Vernetzung der Signalwege von innatem und adaptivem Immunsystem über STAT1 führt zu verstärkter Chemokin Expression in Tubuluszellen“. *(Poster Deutsche Gesellschaft für Nephrologie)*

8 Anhang

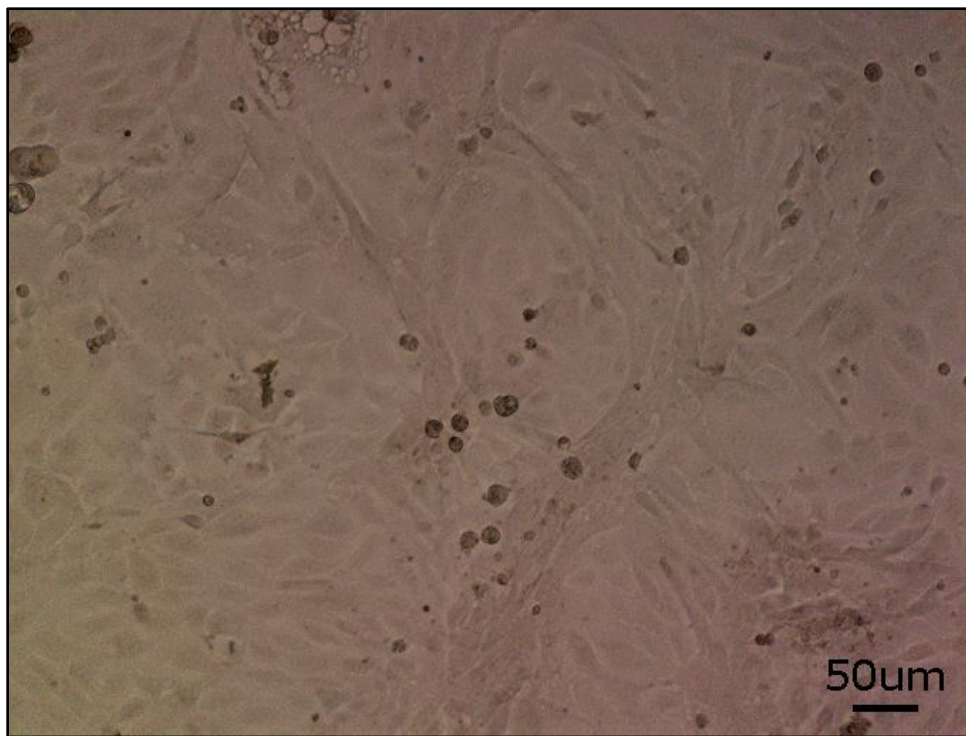


Abb. 8.1: Konfluent gewachsene TECSs

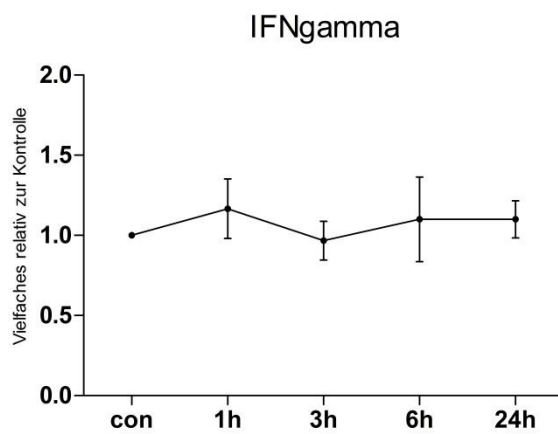


Abb. 8.2: Nach 40 Minuten Ischämie wurde aus den Nieren nach 1, 3, 6 oder 24 Stunden Reperusionszeit RNA isoliert und mit Hilfe von RT-qPCR auf IFN γ analysiert. Als Kontrolle dienten rechte Nieren.

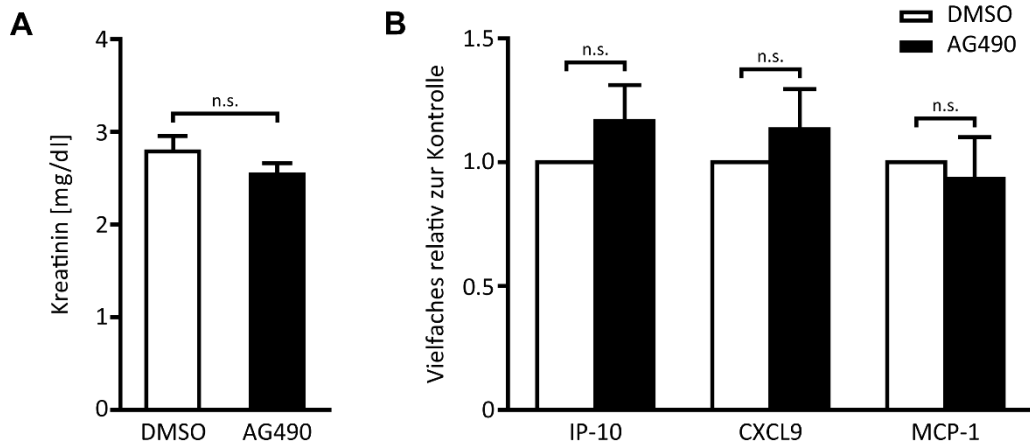


Abb. 8.3: 2 Stunden vor Beginn der 40 Minuten unilateralen Ischämie wurde WT-Mäusen 100µl AG490 (75 µM in DMSO) oder DMSO injiziert. A) Aus dem den Tieren entnommenen Blut wurde Kreatinin bestimmt. B) Aus den Nieren wurde RNA isoliert und mittels reverser Transkription und RT-qPCR die Expression von KIM-1 untersucht. n.s.=nicht signifikant

9 Abkürzungsverzeichnis

AKI	Akute Nierenschädigung; engl. akute kidney Injury
BSA	bovines Serum Albumin
CypD	Cyclophilin D
DAMP	danger-associated molecular pattern
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl. desoxy ribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ET-1	Endothelin-1
FBS	Fetales bovines Serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	IFN μ activation site
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase; engl. horseradish peroxidase
ICAM-1	intracellular adhaesion molecule-1
IFN	Interferon
I/R	Ischämie/Reperfusionsschaden
JAK	Januskinase
KIM-1	kidney injure molecule 1
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
NO	Stickstoffoxid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung; engl. phosphate buffered saline
TECS	proximale Tubuluszellen
RIPA	engl.: Radioimmunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure, engl. ribonucleic acid
ROS	reactive Sauerstoffspezien, engl. reactive oxygen species
RT-qPCR	real time quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumlaurylsulfat; engl. sodium dodecylsulfate
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAE	TRIS-Acetat-EDTA

TLR	toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TYK	Tyrosinkinase
-/-	knockout

10 Literaturverzeichnis

Aaronson, D. S. and C. M. Horvath (2002). "A road map for those who don't know JAK-STAT." Science **296**(5573): 1653-1655 DOI: 10.1126/science.1071545.

Abbas, S., S. Alam, A. Pal, M. Kumar, D. Singh and K. M. Ansari (2016). "UVB exposure enhanced benzanthrone-induced inflammatory responses in SKH-1 mouse skin by activating the expression of COX-2 and iNOS through MAP kinases/NF-kappaB/AP-1 signalling pathways." Food Chem Toxicol **96**: 183-190 DOI: 10.1016/j.fct.2016.07.034.

Almeida, A. R., D. Bunnachak, M. Burnier, J. F. Wetzels, T. J. Burke and R. W. Schrier (1992). "Time-dependent protective effects of calcium channel blockers on anoxia- and hypoxia-induced proximal tubule injury." J Pharmacol Exp Ther **260**(2): 526-532.

Bergsbaken, T., S. L. Fink and B. T. Cookson (2009). "Pyroptosis: host cell death and inflammation." Nat Rev Microbiol **7**(2): 99-109 DOI: 10.1038/nrmicro2070.

Bernard, J. J., C. Cowing-Zitron, T. Nakatsuji, B. Muehleisen, J. Muto, A. W. Borkowski, L. Martinez, E. L. Greidinger, B. D. Yu and R. L. Gallo (2012). "Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3." Nat Med **18**(8): 1286-1290 DOI: 10.1038/nm.2861.

Bernhardt, A., A. Fehr, S. Brandt, S. Jerchel, T. M. Ballhause, L. Philipsen, S. Stolze, R. Geffers, H. Weng, K. D. Fischer, B. Isermann, M. C. Brunner-Weinzierl, A. Batra, B. Siegmund, C. Zhu, J. A. Lindquist and P. R. Mertens (2017). "Inflammatory cell infiltration and resolution of kidney inflammation is orchestrated by the cold-shock protein Y-box binding protein-1." Kidney Int **92**(5): 1157-1177 DOI: 10.1016/j.kint.2017.03.035.

Boehm, T. and J. B. Swann (2014). "Origin and evolution of adaptive immunity." Annu Rev Anim Biosci **2**: 259-283 DOI: 10.1146/annurev-animal-022513-114201.

Boengler, K., D. Hilfiker-Kleiner, G. Heusch and R. Schulz (2010). "Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion." Basic Res Cardiol **105**(6): 771-785 DOI: 10.1007/s00395-010-0124-1.

Bonventre, J. V. (1993). "Mechanisms of ischemic acute renal failure." Kidney International **43**(5): 1160-1178 DOI: 10.1038/ki.1993.163.

Bonventre, J. V. (2003). "Recent Advances in the Pathophysiology of Ischemic Acute Renal Failure." Journal of the American Society of Nephrology **14**(8): 2199-2210 DOI: 10.1097/01.asn.0000079785.13922.f6.

Bonventre, J. V. and A. Zuk (2004). "Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease?" Kidney Int **66**(2): 480-485 DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.761_2.x.

Booz, G. W., J. N. Day and K. M. Baker (2002). "Interplay between the cardiac renin angiotensin system and JAK-STAT signaling: role in cardiac hypertrophy, ischemia/reperfusion dysfunction, and heart failure." J Mol Cell Cardiol **34**(11): 1443-1453.

Boswell, R. N., B. A. Yard, E. Schrama, L. A. van Es, M. R. Daha and F. J. van der Woude (1994). "Interleukin 6 production by human proximal tubular epithelial cells in vitro: analysis of the

effects of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and other cytokines." Nephrol Dial Transplant **9**(6): 599-606.

Braun, N., D. Klumpp, J. Hennenlotter, J. Bedke, C. Duranton, M. Bleif and S. M. Huber (2015). "UCP-3 uncoupling protein confers hypoxia resistance to renal epithelial cells and is upregulated in renal cell carcinoma." Sci Rep **5**: 13450 DOI: 10.1038/srep13450.

Brodsky, S. V., T. Yamamoto, T. Tada, B. Kim, J. Chen, F. Kajiya and M. S. Goligorsky (2002). "Endothelial dysfunction in ischemic acute renal failure: rescue by transplanted endothelial cells." Am J Physiol Renal Physiol **282**(6): F1140-1149 DOI: 10.1152/ajprenal.00329.2001.

Brooimans, R. A., A. P. Stegmann, W. T. van Dorp, A. A. van der Ark, F. J. van der Woude, L. A. van Es and M. R. Daha (1991). "Interleukin 2 mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells." J Clin Invest **88**(2): 379-384 DOI: 10.1172/jci115314.

Bryant, C. E., M. Symmons and N. J. Gay (2015). "Toll-like receptor signalling through macromolecular protein complexes." Mol Immunol **63**(2): 162-165 DOI: 10.1016/j.molimm.2014.06.033.

Cairo, E. R., H. G. Swarts, M. J. Wilmer, P. H. Willems, E. N. Levtchenko, J. J. De Pont and J. B. Koenderink (2009). "FXD2 and Na,K-ATPase expression in isolated human proximal tubular cells: disturbed upregulation on renal hypomagnesemia?" J Membr Biol **231**(2-3): 117-124 DOI: 10.1007/s00232-009-9210-4.

Cao, Q., D. C. Harris and Y. Wang (2015). "Macrophages in kidney injury, inflammation, and fibrosis." Physiology (Bethesda) **30**(3): 183-194 DOI: 10.1152/physiol.00046.2014.

Cerqueira, D. M., M. S. Pereira, A. L. Silva, L. D. Cunha and D. S. Zamboni (2015). "Caspase-1 but Not Caspase-11 Is Required for NLRC4-Mediated Pyroptosis and Restriction of Infection by Flagellated Legionella Species in Mouse Macrophages and In Vivo." J Immunol **195**(5): 2303-2311 DOI: 10.4049/jimmunol.1501223.

Chassin, C., J.-M. Goujon, S. Darche, L. du Merle, M. Bens, F. Cluzeaud, C. Werts, E. Ogier-Denis, C. Le Bouguéneq and D. Buzoni-Gatel (2006). "Renal collecting duct epithelial cells react to pyelonephritis-associated Escherichia coli by activating distinct TLR4-dependent and-independent inflammatory pathways." The Journal of immunology **177**(7): 4773-4784.

Chmielewski, S., A. Olejnik, K. Sikorski, J. Pelisek, K. Blaszczyk, C. Aoqui, H. Nowicka, A. Zerneck, U. Heemann, J. Wesoly, M. Baumann and H. A. Bluysen (2014). "STAT1-dependent signal integration between IFN γ and TLR4 in vascular cells reflect pro-atherogenic responses in human atherosclerosis." PLoS One **9**(12): e113318 DOI: 10.1371/journal.pone.0113318.

Cruvinel Wde, M., D. Mesquita, Jr., J. A. Araujo, T. T. Catelan, A. W. de Souza, N. P. da Silva and L. E. Andrade (2010). "Immune system - part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response." Rev Bras Reumatol **50**(4): 434-461.

Daemen, M. A., C. van't Veer, T. G. Wolfs and W. A. Buurman (1999). "Ischemia/reperfusion-induced IFN- γ up-regulation: involvement of IL-12 and IL-18." J Immunol **162**(9): 5506-5510.

Darra, E., K. Shoji, S. Mariotto and H. Suzuki (2007). "Protective effect of epigallocatechin-3-gallate on ischemia/reperfusion-induced injuries in the heart: STAT1 silencing flavonoid." Genes Nutr **2**(3): 307-310 DOI: 10.1007/s12263-007-0060-3.

De Vos, J., M. Jourdan, K. Tarte, C. Jasmin and B. Klein (2000). "JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells." Br J Haematol **109**(4): 823-828.

Debout, A., Y. Foucher, K. Trebern-Launay, C. Legendre, H. Kreis, G. Mourad, V. Garrigue, E. Morelon, F. Buron, L. Rostaing, N. Kamar, M. Kessler, M. Ladriere, A. Poignas, A. Blidi, J. P. Souillou, M. Giral and E. Dantan (2015). "Each additional hour of cold ischemia time significantly increases the risk of graft failure and mortality following renal transplantation." Kidney Int **87**(2): 343-349 DOI: 10.1038/ki.2014.304.

Decker, T. and P. Kovarik (2000). "Serine phosphorylation of STATs." Oncogene **19**(21): 2628-2637 DOI: 10.1038/sj.onc.1203481.

Delneste, Y., C. Beauvillain and P. Jeannin (2007). "[Innate immunity: structure and function of TLRs]." Med Sci (Paris) **23**(1): 67-73 DOI: 10.1051/medsci/200723167.

Devalaraja-Narashimha, K. and B. J. Padanilam (2009). "PARP-1 inhibits glycolysis in ischemic kidneys." J Am Soc Nephrol **20**(1): 95-103 DOI: 10.1681/asn.2008030325.

Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane and A. D. Luster (2002). "IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking." J Immunol **168**(7): 3195-3204.

Durbin, J. E., R. Hackenmiller, M. C. Simon and D. E. Levy (1996). "Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease." Cell **84**(3): 443-450 DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81289-1.

Ebner, F. H., S. Mariotto, E. Darra, H. Suzuki and E. Cavalieri (2011). "Use of STAT1 inhibitors in the treatment of brain I/R injury and neurodegenerative diseases." Cent Nerv Syst Agents Med Chem **11**(1): 2-7.

Flores, J., D. R. DiBona, C. H. Beck and A. Leaf (1972). "The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute." J Clin Invest **51**(1): 118-126 DOI: 10.1172/jci106781.

Frank, D. A., S. Mahajan and J. Ritz (1999). "Fludarabine-induced immunosuppression is associated with inhibition of STAT1 signaling." Nat Med **5**(4): 444-447 DOI: 10.1038/7445.

Freitas, M. C., Y. Uchida, D. Zhao, B. Ke, R. W. Busuttill and J. W. Kupiec-Weglinski (2010). "Blockade of Janus kinase-2 signaling ameliorates mouse liver damage due to ischemia and reperfusion." Liver Transpl **16**(5): 600-610 DOI: 10.1002/lt.22036.

Friedmann Angeli, J. P., M. Schneider, B. Proneth, Y. Y. Tyurina, V. A. Tyurin, V. J. Hammond, N. Herbach, M. Aichler, A. Walch, E. Eggenhofer, D. Basavarajappa, O. Rådmark, S. Kobayashi, T. Seibt, H. Beck, F. Neff, I. Esposito, R. Wanke, H. Förster, O. Yefremova, M. Heinrichmeyer, G. W. Bornkamm, E. K. Geissler, S. B. Thomas, B. R. Stockwell, V. B. O'Donnell, V. E. Kagan, J. A. Schick

and M. Conrad (2014). "Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice." Nat Cell Biol **16**(12): 1180-1191 DOI: 10.1038/ncb3064.

Furuichi, K., T. Wada, H. Yokoyama and K. I. Kobayashi (2002). "Role of Cytokines and Chemokines in Renal Ischemia-Reperfusion Injury." Drug News Perspect **15**(8): 477-482.

Gould, S. E., M. Day, S. S. Jones and H. Dorai (2002). "BMP-7 regulates chemokine, cytokine, and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells." Kidney Int **61**(1): 51-60 DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00103.x.

Green, S. J., L. F. Scheller, M. A. Marletta, M. C. Seguin, F. W. Klotz, M. Slayter, B. J. Nelson and C. A. Nancy (1994). "Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens." Immunol Lett **43**(1-2): 87-94.

Gu, F., N. Dube, J. W. Kim, A. Cheng, J. Ibarra-Sanchez Mde, M. L. Tremblay and Y. R. Boisclair (2003). "Protein tyrosine phosphatase 1B attenuates growth hormone-mediated JAK2-STAT signaling." Mol Cell Biol **23**(11): 3753-3762.

Han, W. K., V. Bailly, R. Abichandani, R. Thadhani and J. V. Bonventre (2002). "Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury." Kidney Int **62**(1): 237-244 DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x.

Herrington, J. and C. Carter-Su (2001). "Signaling pathways activated by the growth hormone receptor." Trends Endocrinol Metab **12**(6): 252-257.

Herter, J. M., J. Rossaint, T. Spieker and A. Zarbock (2014). "Adhesion molecules involved in neutrophil recruitment during sepsis-induced acute kidney injury." J Innate Immun **6**(5): 597-606 DOI: 10.1159/000358238.

Hertzog, P. J., L. A. O'Neill and J. A. Hamilton (2003). "The interferon in TLR signaling: more than just antiviral." Trends in Immunology **24**(10): 534-539 DOI: 10.1016/j.it.2003.08.006.

Hesketh, E. E., A. Czopek, M. Clay, G. Borthwick, D. Ferenbach, D. Kluth and J. Hughes (2014). "Renal ischaemia reperfusion injury: a mouse model of injury and regeneration." J Vis Exp(88) DOI: 10.3791/51816.

Heyne, N., S. Kemmner, C. Schneider, S. Nadalin, A. Konigsrainer and H. U. Haring (2012). "Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin accurately detects acute allograft rejection among other causes of acute kidney injury in renal allograft recipients." Transplantation **93**(12): 1252-1257 DOI: 10.1097/TP.0b013e31824fd892.

Hidalgo, L. G., J. Sellares, B. Sis, M. Mengel, J. Chang and P. F. Halloran (2012). "Interpreting NK cell transcripts versus T cell transcripts in renal transplant biopsies." Am J Transplant **12**(5): 1180-1191 DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03970.x.

Hou, Y. C., K. T. Liou, C. M. Chern, Y. H. Wang, J. F. Liao, S. Chang, Y. H. Chou and Y. C. Shen (2010). "Preventive effect of silymarin in cerebral ischemia-reperfusion-induced brain injury in rats possibly through impairing NF-kappaB and STAT-1 activation." Phytomedicine **17**(12): 963-973 DOI: 10.1016/j.phymed.2010.03.012.

Hu, X., S. D. Chakravarty and L. B. Ivashkiv (2008). "Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms." Immunol Rev **226**: 41-56 DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00707.x.

Hu, X., J. Chen, L. Wang and L. B. Ivashkiv (2007). "Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation." J Leukoc Biol **82**(2): 237-243 DOI: 10.1189/jlb.1206763.

Ishibashi, N., M. Weisbrot-Lefkowitz, K. Reuhl, M. Inouye and O. Mirochnitchenko (1999). "Modulation of chemokine expression during ischemia/reperfusion in transgenic mice overproducing human glutathione peroxidases." J Immunol **163**(10): 5666-5677.

Ishikado, A., Y. Nishio, K. Yamane, A. Mukose, K. Morino, Y. Murakami, O. Sekine, T. Makino, H. Maegawa and A. Kashiwagi (2009). "Soy phosphatidylcholine inhibited TLR4-mediated MCP-1 expression in vascular cells." Atherosclerosis **205**(2): 404-412 DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.01.010.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annu Rev Immunol **20**: 197-216 DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

Jiang, M., K. Liu, J. Luo and Z. Dong (2010). "Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia-reperfusion injury." Am J Pathol **176**(3): 1181-1192 DOI: 10.2353/ajpath.2010.090594.

Karlberg, L., B. J. Norlen, G. Ojteg and M. Wolgast (1983). "Impaired medullary circulation in postischemic acute renal failure." Acta Physiol Scand **118**(1): 11-17 DOI: 10.1111/j.1748-1716.1983.tb07234.x.

Kellum, J. A., R. Bellomo and C. Ronco (2008). "Definition and classification of acute kidney injury." Nephron Clin Pract **109**(4): c182-187 DOI: 10.1159/000142926.

Kelly, K. J., Z. Plotkin, S. L. Vulgamott and P. C. Dagher (2003). "P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion: protective role of a p53 inhibitor." J Am Soc Nephrol **14**(1): 128-138.

Kemmner, S., Q. Bachmann, S. Steiger, G. Lorenz, M. Honarpisheh, O. Foresto-Neto, S. Wang, J. Carbajo-Lozoya, V. Alt, C. Schulte, S. Chmielewski, H. A. R. Bluysen, U. Heemann, M. Baumann, M. Lech and C. Schmaderer (2019). "STAT1 regulates macrophage number and phenotype and prevents renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury." Am J Physiol Renal Physiol **316**(2): F277-f291 DOI: 10.1152/ajprenal.00004.2018.

Keogh, B. and A. E. Parker (2011). "Toll-like receptors as targets for immune disorders." Trends Pharmacol Sci **32**(7): 435-442 DOI: 10.1016/j.tips.2011.03.008.

Kers, J., J. C. Leemans and A. Linkermann (2016). "An Overview of Pathways of Regulated Necrosis in Acute Kidney Injury." Semin Nephrol **36**(3): 139-152 DOI: 10.1016/j.semnephrol.2016.03.002.

Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." Biochem J **298** (Pt 2): 249-258.

Lawrence, T. and G. Natoli (2011). "Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity." Nat Rev Immunol **11**(11): 750-761 DOI: 10.1038/nri3088.

Lech, M., R. Grobmayr, M. Ryu, G. Lorenz, I. Hartter, S. R. Mulay, H. E. Susanti, K. S. Kobayashi, R. A. Flavell and H. J. Anders (2014). "Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes--kidney regeneration versus atrophy." J Am Soc Nephrol **25**(2): 292-304 DOI: 10.1681/asn.2013020152.

Lee, S., S. Huen, H. Nishio, S. Nishio, H. K. Lee, B. S. Choi, C. Ruhrberg and L. G. Cantley (2011). "Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair." J Am Soc Nephrol **22**(2): 317-326 DOI: 10.1681/asn.2009060615.

Li, L., L. Huang, S. s. J. Sung, P. I. Lobo, M. G. Brown, R. K. Gregg, V. H. Engelhard and M. D. Okusa (2007). "NKT Cell Activation Mediates Neutrophil IFN- Production and Renal Ischemia-Reperfusion Injury." The Journal of Immunology **178**(9): 5899-5911 DOI: 10.4049/jimmunol.178.9.5899.

Liang, Y. B., H. Tang, Z. B. Chen, L. J. Zeng, J. G. Wu, W. Yang, Z. Y. Li and Z. F. Ma (2017). "Downregulated SOCS1 expression activates the JAK1/STAT1 pathway and promotes polarization of macrophages into M1 type." Mol Med Rep **16**(5): 6405-6411 DOI: 10.3892/mmr.2017.7384.

Lien, Y.-H. H., L.-W. Lai and A. L. Silva (2003). "Pathogenesis of renal ischemia/reperfusion injury: lessons from knockout mice." Life Sciences **74**(5): 543-552 DOI: 10.1016/j.lfs.2003.08.001.

Ling, H., P. E. Gengaro, C. L. Edelstein, P. Y. Martin, A. Wangsiripaisan, R. Nemenoff and R. W. Schrier (1998). "Effect of hypoxia on proximal tubules isolated from nitric oxide synthase knockout mice." Kidney Int **53**(6): 1642-1646 DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00913.x.

Linkermann, A., J. H. Brasen, M. Darding, M. K. Jin, A. B. Sanz, J. O. Heller, F. De Zen, R. Weinlich, A. Ortiz, H. Walczak, J. M. Weinberg, D. R. Green, U. Kunzendorf and S. Krautwald (2013). "Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(29): 12024-12029 DOI: 10.1073/pnas.1305538110.

Linkermann, A., J. H. Brasen, N. Himmerkus, S. Liu, T. B. Huber, U. Kunzendorf and S. Krautwald (2012). "Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury." Kidney Int **81**(8): 751-761 DOI: 10.1038/ki.2011.450.

Linkermann, A., J. H. Bräsen, N. Himmerkus, S. Liu, T. B. Huber, U. Kunzendorf and S. Krautwald (2012). "Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury." Kidney Int **81**(8): 751-761 DOI: 10.1038/ki.2011.450.

Liu, D., H. Shang and Y. Liu (2016). "Stanniocalcin-1 Protects a Mouse Model from Renal Ischemia-Reperfusion Injury by Affecting ROS-Mediated Multiple Signaling Pathways." Int J Mol Sci **17**(7) DOI: 10.3390/ijms17071051.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408 DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

Mannon, R. B. (2013). "Necroptosis in solid organ transplantation: a missing link to immune activation?" Am J Transplant **13**(11): 2785-2786 DOI: 10.1111/ajt.12450.

Mark Moran, S. and B. D. Myers (1985). "Course of acute renal failure studied by a model of creatinine kinetics." Kidney International **27**(6): 928-937 DOI: 10.1038/ki.1985.101.

Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000Prime Rep **6**: 13 DOI: 10.12703/p6-13.

Mason, J., T. Takabatake, C. Olbricht and K. Thurau (1978). "The early phase of experimental acute renal failure. III. Tubuloglomerular feedback." Pflugers Arch **373**(1): 69-76.

Mason, J., J. Torhorst and J. Welsch (1984). "Role of the medullary perfusion defect in the pathogenesis of ischemic renal failure." Kidney Int **26**(3): 283-293.

Mason, J., J. Welsch and T. Takabatake (1983). "Disparity between surface and deep nephron function early after renal ischemia." Kidney Int **24**(1): 27-36.

McCormick, J., N. Suleman, T. M. Scarabelli, R. A. Knight, D. S. Latchman and A. Stephanou (2012). "STAT1 deficiency in the heart protects against myocardial infarction by enhancing autophagy." J Cell Mol Med **16**(2): 386-393 DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01323.x.

Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-145 DOI: 10.1038/35100529.

Mehta, R. L., J. A. Kellum, S. V. Shah, B. A. Molitoris, C. Ronco, D. G. Warnock and A. Levin (2007). "Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury." Crit Care **11**(2): R31 DOI: 10.1186/cc5713.

Mehta, R. L., M. T. Pascual, S. Soroko, B. R. Savage, J. Himmelfarb, T. A. Ikizler, E. P. Paganini, G. M. Chertow and D. Program to Improve Care in Acute Renal (2004). "Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience." Kidney Int **66**(4): 1613-1621 DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.00927.x.

Meydan, N., T. Grunberger, H. Dadi, M. Shahar, E. Arpaia, Z. Lapidot, J. S. Leeder, M. Freedman, A. Cohen, A. Gazit, A. Levitzki and C. M. Roifman (1996). "Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor." Nature **379**(6566): 645-648 DOI: 10.1038/379645a0.

Mishra, J., Q. Ma, A. Prada, M. Mitsnefes, K. Zahedi, J. Yang, J. Barasch and P. Devarajan (2003). "Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury." J Am Soc Nephrol **14**(10): 2534-2543.

Moreno, J. A., S. Moreno, A. Rubio-Navarro, C. Gomez-Guerrero, A. Ortiz and J. Egido (2014). "Role of chemokines in proteinuric kidney disorders." Expert Rev Mol Med **16**: e3 DOI: 10.1017/erm.2014.3.

Mudaliar, H., C. Pollock, M. G. Komala, S. Chadban, H. Wu and U. Panchapakesan (2013). "The role of Toll-like receptor proteins (TLR) 2 and 4 in mediating inflammation in proximal tubules." Am J Physiol Renal Physiol **305**(2): F143-154 DOI: 10.1152/ajprenal.00398.2012.

Nankivell, B. J., M. Shingde, K. L. Keung, C. L. Fung, R. J. Borrows, P. J. O'Connell and J. R. Chapman (2018). "The causes, significance and consequences of inflammatory fibrosis in kidney transplantation: The Banff i-IFTA lesion." Am J Transplant **18**(2): 364-376 DOI: 10.1111/ajt.14609.

Nissenson, A. R. (1998). "Acute renal failure: definition and pathogenesis." Kidney Int Suppl **66**: S7-10.

O'Neill, L. A., D. Golenbock and A. G. Bowie (2013). "The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity." Nat Rev Immunol **13**(6): 453-460 DOI: 10.1038/nri3446.

Oken, D. E. (1984). "Hemodynamic basis for human acute renal failure (vasomotor nephropathy)." Am J Med **76**(4): 702-710.

Ozturk, H., M. Aldemir, H. Buyukbayram, A. I. Dokucu and S. Otcu (2001). "The effects of the nitric oxide donor molsidomine prevent in warm ischemia-reperfusion injury of the rat renal--a functional and histopathological study." Int Urol Nephrol **32**(4): 601-607.

Padanilam, B. J. (2003). "Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis." Am J Physiol Renal Physiol **284**(4): F608-627 DOI: 10.1152/ajprenal.00284.2002.

Palomino, D. C. and L. C. Marti (2015). "Chemokines and immunity." Einstein (Sao Paulo) **13**(3): 469-473 DOI: 10.1590/s1679-45082015rb3438.

Panzer, U., G. Zahner, U. Wienberg, O. M. Steinmetz, A. Peters, J. E. Turner, H. J. Paust, G. Wolf, R. A. Stahl and A. Schneider (2008). "15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits INF-gamma-induced JAK/STAT1 signalling pathway activation and IP-10/CXCL10 expression in mesangial cells." Nephrol Dial Transplant **23**(12): 3776-3785 DOI: 10.1093/ndt/gfn361.

Parganas, E., D. Wang, D. Stravopodis, D. J. Topham, J. C. Marine, S. Teglund, E. F. Vanin, S. Bodner, O. R. Colamonici, J. M. van Deursen, G. Grosveld and J. N. Ihle (1998). "Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors." Cell **93**(3): 385-395.

Perico, N., D. Cattaneo, M. H. Sayegh and G. Remuzzi (2004). "Delayed graft function in kidney transplantation." Lancet **364**(9447): 1814-1827 DOI: 10.1016/S0140-6736(04)17406-0.

Plociennikowska, A., A. Hromada-Judycka, J. Dembinska, P. Roszczenko, A. Ciesielska and K. Kwiatkowska (2016). "Contribution of CD14 and TLR4 to changes of the PI(4,5)P2 level in LPS-stimulated cells." J Leukoc Biol DOI: 10.1189/jlb.2VMA1215-577R.

Qiao, Y., E. G. Giannopoulou, C. H. Chan, S. H. Park, S. Gong, J. Chen, X. Hu, O. Elemento and L. B. Ivashkiv (2013). "Synergistic activation of inflammatory cytokine genes by interferon-gamma-induced chromatin remodeling and toll-like receptor signaling." Immunity **39**(3): 454-469 DOI: 10.1016/j.immuni.2013.08.009.

Rabb, H., F. Daniels, M. O'Donnell, M. Haq, S. R. Saba, W. Keane and W. W. Tang (2000). "Pathophysiological role of T lymphocytes in renal ischemia-reperfusion injury in mice." Am J Physiol Renal Physiol **279**(3): F525-531.

Rabb, H., Y. M. O'Meara, P. Maderna, P. Coleman and H. R. Brady (1997). "Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure." Kidney Int **51**(5): 1463-1468.

Rensen, S. S., P. A. Doevendans and G. J. van Eys (2007). "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity." Neth Heart J **15**(3): 100-108.

Sacks, S. H., W. Zhou and N. S. Sheerin (1996). "Complement synthesis in the injured kidney: does it have a role in immune complex glomerulonephritis?" J Am Soc Nephrol **7**(11): 2314-2319.

Salmena, L., B. Lemmers, A. Hakem, E. Matysiak-Zablocki, K. Murakami, P. Y. Au, D. M. Berry, L. Tambllyn, A. Shehabeldin, E. Migon, A. Wakeham, D. Bouchard, W. C. Yeh, J. C. McGlade, P. S. Ohashi and R. Hakem (2003). "Essential role for caspase 8 in T-cell homeostasis and T-cell-mediated immunity." Genes Dev **17**(7): 883-895 DOI: 10.1101/gad.1063703.

Sanceau, J., J. Hiscott, O. Delattre and J. Wietzerbin (2000). "IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7." Oncogene **19**(30): 3372-3383 DOI: 10.1038/sj.onc.1203670.

Savransky, V., R. R. Molls, M. Burne-Taney, C. C. Chien, L. Racusen and H. Rabb (2006). "Role of the T-cell receptor in kidney ischemia-reperfusion injury." Kidney Int **69**(2): 233-238 DOI: 10.1038/sj.ki.5000038.

Scarabelli, T. M., S. Mariotto, S. Abdel-Azeim, K. Shoji, E. Darra, A. Stephanou, C. Chen-Scarabelli, J. D. Marechal, R. Knight, A. Ciampa, L. Saravolatz, A. C. de Prati, Z. Yuan, E. Cavalieri, M. Menegazzi, D. Latchman, C. Pizza, D. Perahia and H. Suzuki (2009). "Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury." FEBS Lett **583**(3): 531-541 DOI: 10.1016/j.febslet.2008.12.037.

Schnermann, J., H. Weihprecht and J. P. Briggs (1990). "Inhibition of tubuloglomerular feedback during adenosine1 receptor blockade." Am J Physiol **258**(3 Pt 2): F553-561.

Schrier, R. W. and W. Wang (2004). "Acute renal failure and sepsis." N Engl J Med **351**(2): 159-169 DOI: 10.1056/NEJMra032401.

Schrier, R. W., W. Wang, B. Poole and A. Mitra (2004). "Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy." Journal of Clinical Investigation **114**(1): 5-14 DOI: 10.1172/jci200422353.

Schroder, K., M. J. Sweet and D. A. Hume (2006). "Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages." Immunobiology **211**(6-8): 511-524 DOI: 10.1016/j.imbio.2006.05.007.

Schust, J., B. Sperl, A. Hollis, T. U. Mayer and T. Berg (2006). "Stattic: a small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization." Chem Biol **13**(11): 1235-1242 DOI: 10.1016/j.chembiol.2006.09.018.

Seelen, M. A., R. A. Brooimans, F. J. van der Woude, L. A. van Es and M. R. Daha (1993). "IFN-gamma mediates stimulation of complement C4 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells." Kidney Int **44**(1): 50-57.

Segerer, S. and P. J. Nelson (2005). "Chemokines in renal diseases." ScientificWorldJournal **5**: 835-844 DOI: 10.1100/tsw.2005.105.

Segerer, S., P. J. Nelson and D. Schlondorff (2000). "Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies." J Am Soc Nephrol **11**(1): 152-176.

Shachar, I. and N. Karin (2013). "The dual roles of inflammatory cytokines and chemokines in the regulation of autoimmune diseases and their clinical implications." J Leukoc Biol **93**(1): 51-61 DOI: 10.1189/jlb.0612293.

Sheridan, A. M. and J. V. Bonventre (2000). "Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure." Curr Opin Nephrol Hypertens **9**(4): 427-434.

Shi, Q., Y. N. Feng, J. Fang and K. Xu (2009). "Pretreatment with glutamine attenuates anoxia/reoxygenation injury of human proximal renal tubular epithelial cells via induction of heme oxygenase-1." Pharmacology **84**(1): 1-8 DOI: 10.1159/000220767.

Shoenfelt, J. L. and M. J. Fenton (2006). "TLR2- and TLR4-dependent activation of STAT1 serine phosphorylation in murine macrophages is protein kinase C-delta-independent." J Endotoxin Res **12**(4): 231-240 DOI: 10.1179/096805106x102219.

Shuai, K. and B. Liu (2003). "Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system." Nat Rev Immunol **3**(11): 900-911 DOI: 10.1038/nri1226.

Sikorski, K., S. Chmielewski, A. Olejnik, J. Z. Wesoly, U. Heemann, M. Baumann and H. Bluysen (2012). "STAT1 as a central mediator of IFN γ and TLR4 signal integration in vascular dysfunction." Jakstat **1**(4): 241-249 DOI: 10.4161/jkst.22469.

Sikorski, K., S. Chmielewski, L. Przybyl, U. Heemann, J. Wesoly, M. Baumann and H. A. Bluysen (2011). "STAT1-mediated signal integration between IFN γ and LPS leads to increased EC and SMC activation and monocyte adhesion." Am J Physiol Cell Physiol **300**(6): C1337-1344 DOI: 10.1152/ajpcell.00276.2010.

Soares, R. O. S., D. M. Losada, M. C. Jordani, P. Évora and E. S. O. Castro (2019). "Ischemia/Reperfusion Injury Revisited: An Overview of the Latest Pharmacological Strategies." Int J Mol Sci **20**(20) DOI: 10.3390/ijms20205034.

Spudich, A., R. Frigg, E. Kilic, U. Kilic, B. Oesch, A. Raeber, C. L. Bassetti and D. M. Hermann (2005). "Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: role of ERK-1/-2 and STAT-1." Neurobiol Dis **20**(2): 442-449 DOI: 10.1016/j.nbd.2005.04.002.

Star, R. A. (1998). "Treatment of acute renal failure." Kidney Int **54**(6): 1817-1831 DOI: 10.1046/j.1523-1755.1998.00210.x.

Suh, H. N., Y. J. Lee, M. O. Kim, J. M. Ryu and H. J. Han (2014). "Glucosamine-induced Sp1 O-GlcNAcylation ameliorates hypoxia-induced SGLT dysfunction in primary cultured renal proximal tubule cells." J Cell Physiol **229**(10): 1557-1568 DOI: 10.1002/jcp.24599.

Suzuki, T., L. Franchi, C. Toma, H. Ashida, M. Ogawa, Y. Yoshikawa, H. Mimuro, N. Inohara, C. Sasakawa and G. Nunez (2007). "Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages." PLoS Pathog **3**(8): e111 DOI: 10.1371/journal.ppat.0030111.

Szelag, M., K. Sikorski, A. Czerwoniec, K. Szatkowska, J. Wesoly and H. A. Bluysen (2013). "In silico simulations of STAT1 and STAT3 inhibitors predict SH2 domain cross-binding specificity." Eur J Pharmacol **720**(1-3): 38-48 DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.10.055.

Thadhani, R., M. Pascual and J. V. Bonventre (1996). "Acute renal failure." N Engl J Med **334**(22): 1448-1460 DOI: 10.1056/NEJM199605303342207.

Thurau, K. (1983). "Tubuloglomerular feedback theory." Nihon Jinzo Gakkai Shi **25**(7): 765-775.

Toshchakov, V., B. W. Jones, P. Y. Perera, K. Thomas, M. J. Cody, S. Zhang, B. R. Williams, J. Major, T. A. Hamilton, M. J. Fenton and S. N. Vogel (2002). "TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages." Nat Immunol **3**(4): 392-398 DOI: 10.1038/ni774.

Tracz, M. J., J. P. Juncos, A. J. Croatt, A. W. Ackerman, J. P. Grande, K. L. Knutson, G. C. Kane, A. Terzic, M. D. Griffin and K. A. Nath (2007). "Deficiency of heme oxygenase-1 impairs renal hemodynamics and exaggerates systemic inflammatory responses to renal ischemia." Kidney Int **72**(9): 1073-1080 DOI: 10.1038/sj.ki.5002471.

Tsung, A., R. Sahai, H. Tanaka, A. Nakao, M. P. Fink, M. T. Lotze, H. Yang, J. Li, K. J. Tracey, D. A. Geller and T. R. Billiar (2005). "The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion." J Exp Med **201**(7): 1135-1143 DOI: 10.1084/jem.20042614.

Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe and G. Kroemer (2010). "Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(10): 700-714 DOI: 10.1038/nrm2970.

Wang, N., H. Liang and K. Zen (2014). "Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance." Front Immunol **5**: 614 DOI: 10.3389/fimmu.2014.00614.

Wen, Z., Z. Zhong and J. E. Darnell, Jr. (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell **82**(2): 241-250.

Wesoly, J., Z. Szweykowska-Kulinska and H. A. Bluysen (2007). "STAT activation and differential complex formation dictate selectivity of interferon responses." Acta Biochim Pol **54**(1): 27-38.

Winterberg, P. D., Y. Wang, K. M. Lin, J. R. Hartono, G. T. Nagami, X. J. Zhou, J. M. Shelton, J. A. Richardson and C. Y. Lu (2013). "Reactive oxygen species and IRF1 stimulate IFNalpha production by proximal tubules during ischemic AKI." Am J Physiol Renal Physiol **305**(2): F164-172 DOI: 10.1152/ajprenal.00487.2012.

Wu, H., G. Chen, K. R. Wyburn, J. Yin, P. Bertolino, J. M. Eris, S. I. Alexander, A. F. Sharland and S. J. Chadban (2007). "TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury." J Clin Invest **117**(10): 2847-2859 DOI: 10.1172/JCI31008.

Yang, N., M. Luo, R. Li, Y. Huang, R. Zhang, Q. Wu, F. Wang, Y. Li and X. Yu (2008). "Blockage of JAK/STAT signalling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat." Nephrol Dial Transplant **23**(1): 91-100 DOI: 10.1093/ndt/gfm509.

Yard, B. A., M. R. Daha, M. Kooymans-Couthino, J. A. Bruijn, M. E. Paape, E. Schrama, L. A. van Es and F. J. van der Woude (1992). "IL-1 alpha stimulated TNF alpha production by cultured human proximal tubular epithelial cells." Kidney Int **42**(2): 383-389.

Ysebaert, D. K., K. E. De Greef, A. De Beuf, A. R. Van Rompay, S. Vercauteren, V. P. Persy and M. E. De Broe (2004). "T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury." Kidney Int **66**(2): 491-496 DOI: 10.1111/j.1523-1755.2004.761_4.x.

Ysebaert, D. K., K. E. De Greef, S. R. Vercauteren, M. Ghielli, G. A. Verpooten, E. J. Eyskens and M. E. De Broe (2000). "Identification and kinetics of leukocytes after severe ischaemia/reperfusion renal injury." Nephrol Dial Transplant **15**(10): 1562-1574.

Yu, L., P. E. Gengaro, M. Niederberger, T. J. Burke and R. W. Schrier (1994). "Nitric oxide: a mediator in rat tubular hypoxia/reoxygenation injury." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(5): 1691-1695.

Yu, W., Y. Li, Z. Wang, L. Liu, J. Liu, F. Ding, X. Zhang, Z. Cheng, P. Chen and J. Dou (2016). "Transcriptomic changes in human renal proximal tubular cells revealed under hypoxic conditions by RNA sequencing." Int J Mol Med **38**(3): 894-902 DOI: 10.3892/ijmm.2016.2677.

Zhou, J. Q., T. Qiu, L. Zhang, Z. B. Chen, Z. S. Wang, X. X. Ma and D. Li (2016). "Allopurinol preconditioning attenuates renal ischemia/reperfusion injury by inhibiting HMGB1 expression in a rat model." Acta Cir Bras **31**(3): 176-182 DOI: 10.1590/s0102-865020160030000005.