Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie (Prof. Dr. med. G. A. Müller) im Zentrum Innere Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Einfluss von Interleukin-1 und des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (Anakinra) auf die epithelial-mesenchymale Transition von Tubulusepithelzellen *in vitro*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Julia Takes
aus
Osnabrück

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F. Strutz

II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Krick

Tag der mündlichen Prüfung: 26.10.2011

INHALTSVERZEICHNIS

<u>ABKÜR</u>	ZUNGEN	VI
1 F :	INIL EVELINIC	1
<u>1</u> <u>E</u> 1	INLEITUNG	1
1.1 Di	e chronisch progrediente Niereninsuffizienz	1
1.2 Da	ns Tubulointerstitium der Niere	3
1.3 M	echanismen bei der Progression chronischer Nierenerkrankungen	4
1.4 In	terstitielle Fibrose	5
1.5 Re	eguläre Wundheilung und Fibrogenese	5
1.6 Di	e epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	7
1.7 In	terleukin-1	9
1.7.1 I	Die Interleukin-1-Familie	10
1.7.2	Anakinra	12
1.7.3 I	Interleukin-1-Rezeptoren	13
1.8 Fr	agestellung und Zielsetzung	15
2 N	Lampaca and Managara	16
<u>2</u> <u>M</u>	ATERIAL UND METHODEN	16
2.1 M	aterial	16
2.2 M	ethoden	20
2.2.1 I	Die Zellinien NP1 und MCT	20
2.2.2	Allgemeine Zellkultur	20
2.2.3	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	20
2.2.4	Test auf Mykoplasmen	21
2.2.5 I	Proliferationsassay	21
2.2.6	Zellzählung	22
2.2.7	Westernblot	23
2.2.7.1	Proteinisolierung	23
2.2.7.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	24
2.2.7.3	SDS-Page-Gelelektrophorese	24
2.2.7.4	Elektrophoretischer Proteintransfer (Blotting)	25
2275	Detektion	25

	Inhaltsverzeichnis	IV
2.2.8	8 Gel-Zymographie	26
2.2.9	9 ELISA	27
2.2.1	10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	28
2.2.1	10.1 RNA-Isolierung mit RNA Bee	30
2.2.1	10.2 RNA-Isolierung mittels Aufreinigung über Säulchen	30
2.2.1	10.3 Reverse Transkription (RT)	31
2.2.1	10.4 PCR	32
2.2.1	10.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	33
2.2.1	10.6 Agarosegelelektrophorese	35
2.2.1	11 Statistische Analyse	36
<u>3</u>	ERGEBNISSE	37
3.1	Keine Detektion von IL-1α und IL-1β in NP1- und MCT-Zellen mittels RT-PCR	37
3.2	Nachweis der IL-1-Rezeptoren in NP1- und MCT-Zellen mittels RT-PCR	39
3.3	Effekte von TNF-α und TGF-β ₁ auf die Expression von IL-1RI und IL-1RAcP	43
3.4	Effekte von IL-1α und IL-1β auf die Proliferation von distalen und proximalen	
	Tubulsepithelzellen im Proliferationsassay	45
3.5	Effekte des IL-1Ra auf die Proliferation von NP1- und MCT-Zellen	47
3.6	Zellzählung	51
3.7	Westernblot-Analysen zum Fibronektinnachweis in NP1- und MCT-Zellen	54
3.8	Matrixsynthese unter Stimulation mit IL-1α, IL-1β und IL-1Ra mittels ELISA	57
3.9	Matrixdegradation unter Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra mittels Gel-	
	Zymographie	58
<u>4</u>	DISKUSSION	62
4.1	Keine Expression von IL-1α und IL-1β in NP 1- und MCT-Zellen	62
4.2	Einfluss von TNF- α und TGF- β_1 auf die Synthese der IL-1- Rezeptoren	63
4.3	Einfluss von IL-1 und IL-1Ra auf die Proliferation von proximalen und distalen	
	Tubulusepithelzellen	65
4.4	Kein Effekt von IL-1 und IL-1Ra auf die Matrixsynthese von Tubulusepithelzell	en
		69
4.5	Effekte von IL-1 und IL-1Ra auf die Matrixdegradation von Tubulusepithelzelle	'n

ABKÜRZUNGEN

Abb. Abbildung

APS Ammoniumperoxidsulfat

 $\alpha ext{-SMA}$ $\alpha ext{-Glattmuskelaktin}$ BrdU Bromdeoxyuridin

°C Grad Celsius

Ct Cycle of Threshold

DAPI 4',6-Diamidino-2-phenylindol ddH₂O zweifach destilliertes Wasser

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

DTT Dithiothreitol

ECM extrazelluläre Matrix

ELISA Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMT epithelial-mesenchymale Transformation

epithenal meschenymate trans

FCS fötales Kälberserum

GAPDH Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

h Stunde

HRP "horse radish peroxidase"

IL Interleukin

IL-1Ra Interleukin-1-Rezeptorantagonist

IL-1RAcP Interleukin-1-Rezeptor-akzessorisches Protein

IL-1RI Interleukin-1-Rezeptor Typ I
IL-1RII Interleukin-1-Rezeptor Typ II

k kilo, 10^3

kDa Kilodalton, 10³ Dalton

 μ l Mikro, 10^{-6} m Milli, 10^{-3} min Minuten

MMP Matrixmetalloproteinase

MSF Phenylmethansulfonsäurefluorid

n Nano, 10⁻⁹

No RT Keine Reverse Transkription ("no reverse transcription")

NTC Negativkontrolle ("no template control")

OD Optische Dichte

PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung

PCR Polymerase-Kettenreaktion ("polymerase chain reaction")

PDGF Plateled Derived Growth Factor

PGE2 Prostaglandin E2

qPCR Quantitative Real-Time PCR

RNA Ribonukleinsäure

RT Reverse Transkription

RT-PCR Riverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

s Sekunde

SDS Sodium Dodecyl Sulfate T_A Annealing-Temperatur

Tab. Tabelle

TEMED Tetramethylethylendiamin

TFB tubulointerstitielle Fibroblasten

TGF Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)

TIMP "tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase"

TNF Tumor-Nekrose-Faktor

U/min Umdrehungen pro Minute

1 EINLEITUNG

1.1 Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz

Die chronisch progrediente Niereninsuffizienz mit dem Endstadium der terminalen Niereninsuffizienz stellt ein zentrales Problem in der Nephrologie dar (Sarnak et al. 2003). Weltweit steigt die Anzahl an Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz jährlich um bis zu 8 % (Shaheen und Al-Khader 2005). Von 1997 bis 2005 ist in Deutschland durchschnittlich ein jährlicher Zuwachs der Prävalenz der Patienten in chronischer Nierenersatztherapie von 4,8 % und der Inzidenz von 5,2 % zu verzeichnen. Dies entspricht einem Anstieg der absoluten Patientenzahlen von 59.650 auf 87.151 im genannten Zeitraum. Mit diesen Zahlen liegt Deutschland im internationalen Vergleich nach Japan und den USA an dritter Stelle. Weltweit sind zur Zeit etwa 1,8 Millionen Patienten von den verschiedenen Formen der Nierenersatztherapie abhängig (Frei und Schober-Halstenberg 2006).

Die Ursache für diesen deutlichen Inzidenzzuwachs liegt zum einen an der höheren Lebenserwartung, aber vor allem an der Zunahme des Typ-2-Diabetes und der damit verbundenen Inzidenzzunahme der diabetischen Nephropathie als die mittlerweile häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz in den westlichen Industrienationen (Strutz 2004). So lässt sich allein in den USA ein Inzidenzanstieg der durch Diabetes mellitus Typ II verursachten terminalen Niereninsuffizienz von 78 % in den Jahren 1984 bis 1994 verzeichnen (Shaheen und Al-Khader 2005). Als weitere Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz stehen die Glomerulonephritiden, interstitielle Nephritiden, die Nephrosklerose und Zystennieren im Vordergrund (Strutz et al. 2001). Die gemeinsame Endstrecke dieser pathogenetisch sehr unterschiedlichen Erkrankungen bilden die interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie und glomeruläre Sklerose (Strutz und Muller 1999). Dies führt zu einem weitgehenden Verlust der exkretorischen und inkretorischen Funktion der Niere mit dem Ergebnis der terminalen Niereninsuffizienz.

Die beiden entscheidenden Verfahren der dann notwendig werdenden Nierenersatztherapie stellen die Nierentransplantation und die verschiedenen Dialyseverfahren dar, durch die eine deutliche Verbesserung der Prognose der terminalen Niereninsuffizienz erreicht werden konnte. Jedoch bedeutet die Notwendigkeit einer dauerhaften Nierenersatztherapie für die Patienten dennoch eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität und Lebenserwartung und geht mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität gegenüber nicht niereninsuffizienten

Patienten einher (Pastan und Bailey 1998). An erster Stelle stehen hier die kardiovaskulären Erkrankungen, die bei Dialysepatienten im Vergleich zur Gesamtpopulation eine 10-30fach höhere Mortalität aufweisen (Weiner et al. 2004). Bei nierentransplantierten Patienten sind sie für 35-50 % der Gesamtmortalität verantwortlich (Sarnak et al. 2003).

Weiterhin begünstigt die deutliche Änderung der Altersstruktur zugunsten der älteren Patienten und der große Anteil an Patienten mit diabetischer Nephropathie in chronischer Nierenersatztherapie das Vorhandensein weiterer Co-Morbiditäten wie vor allem die kardiovaskulären Erkrankungen als die häufigste Todesursache dieser Patientengruppe (Shaheen und Al-Khader 2005).

Die Kosten der chronischen Nierenersatztherapie sind immens. Sie betragen für einen Dialysepatienten im Mittel 55.000 Euro im Jahr. Im Vergleich dazu liegen die Jahreskosten für einen erfolgreich nierentransplantierten Patienten mit 15.000-20.000 Euro deutlich niedriger (Salonen et al. 2003). Somit stellt die Nierentransplantation im Bezug auf die anfallenden Kosten für das Gesundheitssystem, aber auch in Bezug auf Lebensqualität (Lee et al. 2005) und Lebenserwartung (Wolfe et al. 1999) die bevorzugte Therapie dar.

Vergleicht man jedoch das Verhältnis zwischen Patienten auf der Warteliste und der Anzahl an Transplantationen, so warten drei mal mehr Patienten auf eine neue Niere wie Transplantationen durchgeführt werden (Frei und Schober-Halstenberg 2006).

Jahr	1996	1997	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Diabetes mellitus Typ 2	24	29	30	31	32	32	33	31	32
Nephrosklerose (Hochdruck)	14	16	16	15	17	18	20	22	23
Glomerulonephritis	16	15	14	15	14	14	14	12	13
Interstitielle Nephritis	13	11	11	10	9	9	8	8	8
Unbekannte Genese	11	9	10	9	10	9	9	9	8
Zystennieren	6	6	6	6	6	5	5	5	4
Systemerkrankungen*	4	4	4	4	3	4	4	4	4
Verschiedenes	4	4	3	4	4	4	4	4	4
Diabetesmellitus Typ 1	7	6	6	5	4	4	3	3	3
Angeborene Krankheiten	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tab. 1 Prozentuale Häufigkeit der Grunderkrankungen, die in Deutschland zur dialysepflichtigen chronischen Niereninsuffizienz führen (Frei und Schober-Halstenberg 2006)

^{*)} Unter Systemerkrankungen mit Nierenbeteiligung werden zusammengefasst: Lupusnephritis, Goodpasture-Syndrom, Monoklonale Gammopathien, Amyloidose, Vaskulitiden (Mikroskopische Polyangiitis, Wegener'sche Granulomatose, Churg-Strauss-Syndrom), Anti-Phospholipid-Syndrom, Hämolytisch-urämisches Syndrom, Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura.

1.2 Das Tubulointerstitium der Niere

Dem Tubulointerstitium der Niere kommt eine hohe Bedeutung für die renale Funktion zu. Es bildet im Verhältnis zu den Glomeruli, die nur etwa 3 bis 4 Prozent ausmachen, den überwiegenden Anteil am Nierenvolumen und besteht aus Nierentubuli, Interstitium und Gefäßen (Nath 1998). Das Interstitium ist dabei definiert als der extravaskuläre und intertubuläre Raum des renalen Parenchyms, bestehend aus extrazellulärer Matrix, interstitiellen Zellen und Flüssigkeit und ist für die Grundstruktur der Niere mitverantwortlich (Lemley und Kriz 1991). Es ist durch eine Basalmembran von den übrigen Strukturen abgegrenzt und hat weiterhin einen modulierenden Charakter auf die Funktionseinheiten von Nephronen und Gefäßen. In der gesunden Niere beträgt sein Anteil am Nierenvolumen bis zu 10 % des kortikalen und bis zu 40 % des medullären Parenchyms. Elektronenmikroskopisch werden die interstitiellen Zellen nach ihrer Morphologie in Fibroblasten-ähnliche Zellen (Typ-I-Zellen), Monozyten und Makrophagen (Typ II), und Perizyten (Typ III) eingeteilt (Lemley und Kritz 1991). Immunhistochemisch lassen sich die Typ-I-Zellen weiter differenzieren in Fibroblasten als mesenchymale Zellen und in dendritische Zellen als gewebsständige immunkompetente Zellen (Kaissling und Le Hir 1994). Die Fibroblasten, die, wie in allen typischen Bindegewebsstromata, den Hauptanteil der interstitiellen Zellen bilden, sind hauptsächlich verantwortlich für die Synthese der extrazellulären Matrix (ECM). Diese setzt sich zusammen aus einer Faserkomponente und der Grundsubstanz (Aumailley und Gayraud 1998). Die Faserkomponente besteht vor allem aus Kollagen Typ I, welches für die Grundstruktur des interstitiellen Raumes verantwortlich ist. In starken parallel gelagerten Kollagenfaserbündeln verleiht es dem Bindegewebe seine große Festigkeit. Daneben kommen Kollagen Typ III, IV und VI vor, wobei Kollagen Typ IV in der gesunden Niere auf die Basalmembran begrenzt ist. Kollagen Typ III bildet mit seinen Retikulinfasern das Stützgerüst für das Organ.

An Strukturglykoproteinen sind Fibronektin und Laminin vorherrschend, die den Zusammenhalt der Zellen über Integrine gewährleisten und bei der Zell-Zell- und ECM-Zell-Interaktion eine wichtige Rolle spielen. Die Grundsubstanz, die als gelartiger Stoff die Gewebsflüssigkeit locker bindet, besteht aus Glykosaminoglykanen. Diese sind in der Niere vor allem Heparansulfat, Hyaluronsäure und Dermatansulfat (Strutz et al. 1996) und sind verantwortlich für die Aufrechterhaltung des Gewebsturgors und dienen dem Stofftransport und dem Austausch von Stoffwechselprodukten im Bindegewebe. Physiologischerweise herrscht in der ECM ein streng reguliertes Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und -degradation (Strutz 1995; Eddy et al. 2000).

Eine entscheidende Rolle spielen hierbei Zink-abhängige Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), sowie deren Inhibitoren, die "Tissue Inhibitors of Matrix-Metalloproteinases" (TIMPs). MMPs sind eine Gruppe von Endopeptidasen, die die Degradation extrazellulärer Matrix bewirken (Birkedal-Hansen et al. 1993). TIMPs regulieren die Matrixdegradation, indem sie Komplexe mit MMPs bilden und so ihre Aktivität hemmen (Cheng und Lovett 2003).

1.3 Mechanismen bei der Progression chronischer Nierenerkrankungen

Bei der Progression chronischer Nierenerkrankungen, die zur terminalen Niereninsuffizienz führen, zeigt sich, unabhängig von der ursprünglichen Pathogenese oder dem Kompartiment, von dem die Erkrankung ausging, im Endstadium als morphologisches Korrelat die bindegewebig destruierte Schrumpfniere als ein relativ uniformes Bild (Nath 1998). Histologisch ist dies durch die Trias interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie und glomeruläre Sklerose gekennzeichnet (Strutz und Muller 1999), die die gemeinsame Endstrecke einer Vielzahl von pathogenetisch sehr unterschiedlichen Erkrankungen darstellen.

Auch der klinische Verlauf dieser Erkrankungen ist trotz ihrer unterschiedlichen Pathogenese vergleichbar. Sie alle können ein Stadium erreichen, von dem an es zu einem Prozess der irreversiblen Progression der Erkrankung bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz kommt, der durch die Behandlung der eigentlichen Grunderkrankung kaum noch beeinflussbar ist und der auch dann weiter fortschreitet, wenn die eigentliche Grunderkrankung ausgeheilt ist. Aufgrund der Uniformität dieser Mechanismen wurde vermutet, dass es einen einheitlichen, sich selbst unterhaltenden Mechanismus gibt, der der Progression chronischer Nierenerkrankungen zugrunde liegt (Brenner et al. 1982).

Studien konnten schon früh einen Zusammenhang zwischen der Nierenfunktion und interstitieller Schädigung nachweisen (Risdon et al. 1968; Schainuck et al. 1970; Striker et al. 1970). Welche Veränderungen jedoch genau verantwortlich für die Progression einer Nierenerkrankung sind, wurde lange Zeit kontrovers diskutiert. Erst Bohle und seine Mitarbeiter konnten nachweisen, dass von allen beobachteten Veränderungen vor allem das Ausmaß der interstitiellen Fibrose und Volumenzunahme mit der Nierenfunktion korrelieren (Bohle et al. 1994; Bohle et al. 1977), nicht jedoch glomeruläre Veränderungen (Bohle et al. 1992). Diese Ergebnisse wurden unter anderem bestätigt an Studien zur primär glomerulären Nephropathie (Abe et al. 1989; Katafuchi et al. 1987; Jepsen und Mortensen 1979), bei

Systemerkrankungen, wie z. B. dem Systemischen Lupus erythematodes (SLE) (Alexopoulos et al. 1990) und Diabetes mellitus (Bader et al. 1980; Ziyadeh 1996).

1.4 Interstitielle Fibrose

Es gibt viele, vor allem chronische Erkrankungen, bei denen die Fibrose (lat. Fiber = Faser) eine bedeutende Rolle spielt. Organe, die typischerweise von fibrosierenden Prozessen betroffen sind, sind die Lunge, das Herz, die Leber und die Niere (Franklin 1997). Bei der Fibrose kommt es zu einer Fehlregulation von physiologischen Defektheilungsmechanismen, indem eine exzessive Ablagerung von ECM-Proteinen, vor allem Fibronektin, Kollagen-Typ I und III, sowie geringere Mengen Typ IV und VI, provoziert wird (Muller et al. 2000), sowie eine Faservermehrung und Vermehrung der interstitiellen Zellen (Bohle et al. 1979) mit der Folge einer Volumenzunahme des Interstitiums bei gleichzeitiger Atrophie und Dilatation der Tubuli in der Niere ("tubulointerstitielle Fibrose"). Daraus resultiert eine die Struktur und Funktion des Organs destruierende Narbenbildung (Mutsaers et al. 1997). Makroskopisch erscheinen fibrotisch destruierte Organe durch Vermehrung des Fasergerüstes verhärtet und verkleinert ("Schrumpfniere").

1.5 Reguläre Wundheilung und Fibrogenese

Die Fähigkeit der Wundheilung ist die Voraussetzung für Lebewesen, Verletzungen und Gewebedeffekte zu überstehen. Diese Fähigkeit ist je nach Organismus und Organ unterschiedlich ausgeprägt. Niedere Vertebraten können z.B. bei Verlust ganze Körperteile regenerieren (Kovacs und DiPietro 1994), indem Zellen in den Defekt einwandern, proliferieren, und sich differenzieren. Es erfolgt eine, wenn auch langsame, restitutio ad integrum. Bei höheren Vertebraten, wie dem Menschen, laufen Reparationsmechanismen zwar wesentlich schneller ab, jedoch führen sie in den meisten Fällen nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung der Funktionsfähigkeit, sondern es kommt zu einer so genannten Defektheilung, das heißt, das geschädigte Gewebe wird durch Bindegewebe ("Narbengewebe") ersetzt. Beim Menschen ist die restitutio ad integrum im Vergleich zu niederen Vertebraten nur im Embryonalstadium möglich (Nodder und Martin 1997). Die physiologische Wundheilung verläuft in den meisten Geweben annähernd uniform und gliedert sich in eine Entzündungsphase, in der Gewebetrümmer und evtl. eingedrungene Noxen eliminiert und verschiedene Interleukine und Wachstumsfaktoren freigesetzt werden (Pierce et al. 1989) und eine Reparationsphase. In dieser Phase kommt es zu einer

gesteigerten Zellproliferation, vor allem von aktivierten Fibroblasten, so genannten Myofibroblasten, die Proteoglykane und Kollagen I und III produzieren, so dass ein junges kapillarreiches Bindegewebe entsteht. Nach Deckung des Defektes verlieren die Bindegewebszellen durch Neutralisation der auslösenden Reize ihre gesteigerte mitotische und synthetische Aktivität und es entsteht ein kapillararmes, faserreiches Bindegewebe, das Narbengewebe (Riede 1995).

Wenn es jedoch zu einer Fehlregulation entzündlicher und reparativer Prozesse kommt, können sich diese auch schädigend auswirken. Analog zu den Phasen der physiologischen Wundheilung wird der Prozess der renalen Fibrogenese in drei Phasen mit charakteristischem Verlauf eingeteilt: Induktionsphase, Phase der inflammatorischen Matrixsynthese und Phase der postinflammatorischen Matrixsythese (siehe Tabelle 2) (Kuncio et al. 1991; Strutz und Muller 1999).

1. Induktionsphase	• Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch					
	tubuläre Epithelzellen					
	• Infiltration von mononukleären Zellen					
	• Freisetzung von profibrogenen Zytokinen					
	Aktivierung und Proliferation von residenten					
	Fibroblasten					
	• Epithelial-mesenchymale Transformation					
2. Inflammatorische	Gesteigerte Synthese von extrazellulärer Matrix bei					
Phase	vermindertem Matrixabbau					
	 Fortlaufende Freisetzung von profibrotischen 					
	Zytokinen durch infiltrierende Zellen					
3. Postinflammatorische	Fehlende Stimulation durch primäre Entzündung					
Phase	 Sekretion von profibrogenen Zytokinen durch 					
	tubuläre Epithelzellen					
	• Autokrine Proliferation von (Myo-) Fibroblasten					

Tab. 2 Phasen der renalen Fibrogenese (Strutz und Neilson 2003).

In der Induktionsphase kommt es zur Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen durch tubuläre Epithelzellen, zur Infiltration von mononukleären Zellen und Freisetzung von profibrogenen Zytokinen, residente Fibroblasten werden aktiviert und proliferieren. Es folgt die Phase der inflammatorischen Matrixsynthese mit gesteigerter Bildung von extrazellulären

Matrixproteinen durch die aktivierten Fibroblasten bei gleichzeitig vermindertem Matrixabbau, fortlaufender Freisetzung von profibrotischen Zytokinen durch infiltrierende Zellen und die Sekretion von Zytokinen durch tubuläre Epithelzellen. Abweichend zur physiologischen Wundheilung kommt es bei der Fibrogenese in der dritten Phase zur post-inflammatorischen Matrixsynthese mit einem Verlust des primären inflammatorischen Stimulus durch Entzündungszellen, weiterer Sekretion von profibrogenen Zytokinen durch tubuläre Epithelzellen, autokriner Proliferation von (Myo-)Fibroblasten, vermehrter Matrixsynthese und gleichzeitig vermindertem Matrixabbau, unabhängig von der primären Entzündung und Rekrutierung von Fibroblasten aus tubulären Epithelzellen durch epithelialmesenchymale Transition (Strutz und Muller 2000).

1.6 Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

Viele verschiedene Nierenerkrankungen haben als gemeinsame Endstrecke die tubulointerstitielle Fibrose und münden unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung in der terminalen Niereninsuffizienz (Fan et al. 1999). Es kommt zu einem Verlust renaler Tubuli und zu einer verstärkten Synthese und Sekretion extrazellulärer Matrixproteine, wie Kollagen Typ I, III, IV, V und VII, Fibronektin und Laminin (Eddy 1996).

Es wird angenommen, dass vor allem Myofibroblasten hauptverantwortlich für die gesteigerte ECM-Synthese und damit die renale Fibrogenese sind (Strutz et al. 2002). Myofibroblasten, deren Name auf ihrer Fähigkeit, α -Glattmuskelaktin (α -SMA) zu exprimieren, beruht, entwickeln sich dabei aus residenten Fibroblasten, die durch profibrogene Zytokine, wie "transforming growth factor" (TGF)- β oder "fibroblast growth factor" (FGF)-2 aktiviert werden. Dabei ist α -SMA ein Marker, dessen Expression gut mit dem Schweregrad der tubulointerstitiellen Fibrose korreliert (Zeisberg et al. 2000).

Aber auch Tubulusepithelzellen spielen eine wichtige Rolle bei der renalen Fibrogenese. Auch sie können eine Anzahl extrazellulärer Proteine, wie z.B. Kollagen Typ I, Fibronektin und Proteoglykane synthetisieren (Creely et al. 1992; Tang et al. 1997) und können sich, induziert durch TGF- β_1 , in mesenchymale Zellen umwandeln (Fan et al. 1999; Strutz und Muller 2000). So konnte auch die Expression von α -SMA in Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden (Rastaldi et al. 2002). Dieser Vorgang der EMT bei der renalen Fibrogenese wurde erstmals 1995 beschrieben (Strutz et al. 1995). Dabei ist die epithelial-mesenchymale, bzw. mesenchymal-epitheliale Transition, oder allgemeiner Transdifferenzierung, ein physiologisches Geschehen während der embryonalen Entwickelung. So entstammen

Tubulusepithelzellen in der Niere, mit Ausnahme der Sammelrohre, entwicklungsgeschichtlich vom embryonalen Mesenchym (Strutz 2009).

Die EMT, als ein pathophysiologisches Geschehen, ist ein Prozess, bei dem renale Tubulusepithelzellen ihren epithelialen Phänotyp verlieren und neue mesenchymale Charakteristika erlangen (Liu 2004). Die Zellen verlieren ihre apikal-basale Polarität und gewinnen die Fähigkeit zur Migration (Greenburg und Hay 1982; Zuk et al. 1989). Sie lösen sich aus ihren tight-junctions, die sie als Zellverband zusammenhalten (Lee DB et al. 2006) und wandeln sich in fibroblastenähnliche Zellen um. Es kommt zur Downregulation epithelialer Markerproteine wie E-Cadherin, Zonula-occludens-1 (ZO) und Zytokeration, während mesenchymale Marker wie α -SMA und Vimentin neu exprimiert werden (Strutz und Zeisberg 2006).

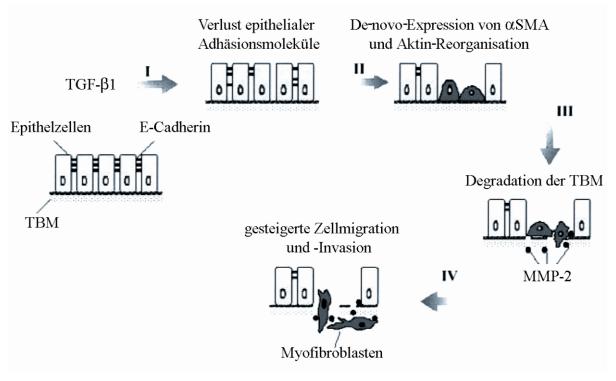


Abb. 1 Die Phasen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) nach Liu (2004, S.5)

Durch den Einfluss von TGF- β kommt es zu einem Verlust epithelialer Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin und einer de-novo-Expression von α -Glattmuskelaktin (α -SMA). Die Epithelzellen wandeln sich zu spindelförmigen Myofibroblasten um. Durch die Degradation der tubulären Basalmembran (TBM) wird mit Hilfe von MMPs die Migration der Myofibroblasten in den interstitiellen Raum ermöglicht.

Reguliert wird die EMT durch Komponenten der extrazelluären Matrix, wie Kollagen Typ I, zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine, vor allem TGF-β₁, aber auch *epidermal growth*

factor (EGF) und FGF-2 spielen hier eine wichtige Rolle (Strutz et al. 2002). Andere Faktoren wie Interleukin-1, als ein profibrogenes Zytokin, induzieren die EMT indirekt durch die Modulation von TGF- β_1 (Fan et al. 2001). Des Weiteren scheint es wiederum eine autokrine Stimulation von Tubulusepithelzellen mit TGF- β_1 zu geben (Zeisberg et al. 2001).

1.7 Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) gehört in die große Gruppe der Zytokine. Dabei handelt es sich um Polypeptide, die Einfluss haben auf Zellwachstum und -differenzierung, Immunantwort und Entzündung und auf eine Vielzahl physiologischer Vorgänge vor allem im erkrankten Organismus (Rothwell 1999). IL-1 spielt als multifunktionelles Zytokin mit hoher inflammatorischer Wirkung eine wichtige Rolle bei lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen (Dinarello 1991). Es hat einen Effekt auf nahezu jeden Zelltyp. Indem es an seine Rezeptoren an der Oberfläche einer Zelle bindet, initiiert es eine Signaltransduktionskaskade, die zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, **Gefäßdilatation** und Fieber. sowie einer starken proinflammatorischen Immunantwort führt. Der Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) bindet an denselben Rezeptor und kann so die Bioaktivität von IL-1 kompetetiv hemmen. Es wird vermutet, dass die relativen Konzentrationen von IL-1 und IL-1Ra ausschlaggebend für das Ausmaß einer proinflammatorischen Antwort sind (Uchiyama et al. 2005).

In Bezug auf renale Erkrankungen, die mit einem fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion durch intestinale Infiltration mononukleärer Zellen, tubuläre Atrophie und intestinale Fibrose einhergehen, hat IL-1 als proinflammatorisches Zytokin eine Bedeutung für die Regulation der pathophysiologischen Prozesse, die zur Niereninsuffizienz führen, indem es z.B. T- und B-Lymphozyten stimulieren und die Produktion von Zytokinen und Chemokinen steigern kann (van Kooten et al. 1999). Eine erhöhte Expression von IL-1 in der Niere konnte für verschiedene Formen von Nierenerkrankungen nachgewiesen werden, z.B. bei vaskulären Nephropathien (Rastaldi et al. 1996), bei der Transplantatnephropathie (Teppo et al. 1998) oder bei der Ig-A Nephropathie (Shu et al. 2000). Insbesondere Interleukin-1 beta (IL-1β) spielt hier eine wichtige Rolle, da es vor allem von infiltrierenden Makrophagen synthetisiert wird, die wiederum eine große Bedeutung bei der interstitiellen Fibrose haben. In humanen proximalen Tubulusepithelzellen, die aufgrund ihrer Fähigkeit, inflammatorische Mediatoren zu produzieren, einen zentralen Zelltyp bei der tubulointerstitiellen Nierenerkrankung darstellen, führt IL-1β zu einer vermehrten Expression von α-SMA, stimuliert die Fibronektinsekretion und supprimiert die DNA-Synthese. Diese profibrotischen und

antiproliferativen Effekte von IL-1β werden zum Teil durch autokrine Sekretion von TGF-β durch Tubulusepithelzellen gesteuert (Vesey et al. 2002b). Andere Studien verdeutlichten die Bedeutung von IL-1 für die renale Fibrogenese, indem sie zeigten, dass IL-1Ra in einem Modell der rapid progressiven Glomerulonephritis die Monozytenakkumulation komplett supprimieren konnte (Lan et al. 1993).

1.7.1 Die Interleukin-1-Familie

Die IL- 1-Familie beinhaltet drei Proteine, Interleukin-1 alpha (IL-1α), IL-1β und den IL-1Ra, die durch 3 unterschiedliche Gene kodiert werden, die beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 2 lokalisiert sind (Webb et al. 1986; Steinkasserer et al. 1992). Aufgrund einer signifikanten Ähnlichkeit im Aufbau der drei Gene wird angenommen, dass sie vor ca. 350 Mio. Jahren aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden sind (Eisenberg et al. 1991; Dinarello 1994). Dabei ist die Aminosäuresequenz von IL-1α und IL-1β zu 26 % und die Nukleotidsequenz der Gene zu 45 % homolog (March et al. 1985; Gubler et al. 1986). Diese homologe Struktur setzt sich zusammen aus sechs Paaren antiparalleler β-Faltblätter, die durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden und sich zu einem Tetraeder zusammenfügen lassen (Priestle et al. 1988; Gehrke et al. 1990; Boraschi et al. 1995; Auron 1998).

Die IL-1-Proteine IL-1 α und IL-1 β wirken als Agonisten und haben ähnliche biologische Aktivität durch ihre hohe Affinität zum Interleukin-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI) (Sims et al. 1993). Sie werden als intrazelluläre Vorstufen (Pro-IL-1 α und Pro-IL-1 β) mit einem Molekulargewicht von je 31 kDa synthetisiert und durch enzymatische Abspaltung des Nterminalen Segmentes durch spezifische Proteasen in die reife Form mit einem Molekulargewicht von 17 kDa überführt. Von IL-1 α ist auch die Vorstufe Pro-IL-1 α biologisch aktiv, verbleibt aber größtenteils in der Zelle, während die Vorstufe von IL-1 β , Pro-IL-1 β biologisch inaktiv ist, sodass die enzymatische Spaltung in die biologisch aktive Form einen wichtigen Regulationsschritt darstellt (Rothwell 1999). Die proteolytische Spaltung erfolgt dabei durch das Interleukin-1 konvertierende Enzym (ICE) (Cerretti et al. 1992; Thornberry et al. 1992). Das reife IL-1 β wird dann von den Zellen sezerniert und in die Zirkulation ausgeschüttet, wo es als hormonähnliches Protein systemisch wirken kann. IL-1 α reguliert dagegen primär intrazelluläre Vorgänge und ist Mediator bei lokalen Entzündungsreaktionen (Dinarello 1996), entweder als Pro-IL-1 α , welches als membranständigs Zytokin, verankert an die Plasmamembran, wirken kann (Brody und Durum 1989), oder die Membranprotease Calpain

spaltet das reife IL- 1α ab, welches dann freigesetzt wird (Kobayashi et al. 1990; Kavita und Mizel 1995).

Der als drittes Protein zur IL-1-Familie gehörende IL-1Ra ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 22 kDa, welches mit großer Affinität an den IL-1RI bindet und so die Rezeptorbindung von IL-1 kompetitiv inhibiert, ohne selbst als Agonist wirken zu können und ein intrinsisches Signal zu induzieren (Hannum et al. 1990; Dripps et al. 1991). Er agiert somit als spezifischer Inhibitor der IL-1-Aktivität, wobei die Affinität des IL-1Ra zum IL-1-Rezeptor ähnlich ist, wie die von IL-1α oder IL-1β. Seine Aminosäurensequenz entspricht zu 26-30 % der von IL-1β und zu 19 % der von IL-1α (Arend 1993). Es existieren zwei strukturelle Varianten des IL-1Ra, sIL-1Ra: ein sekretorisches Molekül, das von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Fibroblasten und anderen Zellen produziert wird; und ein intrazelluläres Molekül (icIL-1Ra), welches von Keratinozyten, anderen Epithelzellen, Makrophagen und Fibroblasten gebildet wird. Da diese Zellen ebenfalls z.T. große Mengen an IL-1 produzieren, wird vermutet, dass er regulierend auf die intrazelluläre Aktivität von IL-1 wirkt (Haskill et al. 1991).

Verschiedene Studien, die sich mit der Frage nach den für die Rezeptorbindung relevanten Regionen von IL- 1α , IL- 1β und IL-1Ra beschäftigt haben, haben ergeben, dass IL- 1α und IL- 1β über zwei Rezeptorbindungsstellen an den IL-1RI verfügen, während IL-1Ra nur über eine Bindungsstelle verfügt. Es gibt eine Region, die bei allen drei Proteinen sowohl strukturell als auch funktionell sehr ähnlich ist und jeweils eine Rezeptorbindungsstelle mit hoher Affinität zum IL-1RI darstellt. Die Region, die strukturell der zweiten Bindungsstelle in den drei Molekülen entspricht, ist jedoch, im Gegensatz zu IL- 1α und IL- 1β , beim IL-1Ra nicht an der Bindung an den IL-1RI beteiligt. Sie zeigt in direktem Vergleich die größte Strukturdifferenz zwischen IL-1 und IL-1Ra (Vigers et al. 1994). Diese Erkenntnisse lassen ein Modell der Rezeptoraktivierung vermuten, in dem IL- 1α und IL- 1β durch den Kontakt mit zwei Bindungsstellen an den Rezeptor eine Aktivierung zu provozieren vermögen, jedoch der IL-1Ra durch den Kontakt nur einer Bindungsstelle an den Rezeptor kein IL-1 Signal induzieren kann (Evans et al. 1995).

Da IL-1Ra mit seiner einen Bindungsstelle mit der gleichen Affinität an den Rezeptor bindet wie IL-1 α und IL-1 β mit beiden Bindungsstellen, wird diese Region zu einer Molekülvorlage für ein pharmakologisch zu nutzendes Protein, zur Inhibition der inflammatorischen Wirkung von Il-1.

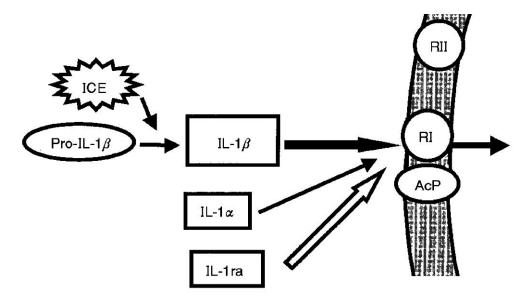


Abb. 2 Die IL-1-Familie nach Rothwell (1999, S4)

Die IL-1 Familie beinhaltet die 2 Agonisten IL-1 α und IL-1 β und den IL-1Ra. Pro IL-1 β ist inaktiv und muss durch das Enzym ICE, auch Caspase 1 genannt, aktiviert werden. Es wird angenommen, daß die Effekte von IL-1 über den IL-1RI vermittelt werden, welcher für die Signaltransduktion das Interleukin-1-akzessorische Protein (IL-1RAcP) benötigt.

1.7.2 Anakinra

Anakinra (Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA, USA) ist das erste Präparat, welches zur Inhibition von IL-1 hergestellt wurde. Es stellt die rekombinante, nicht glykosylierte Form des natürlichen IL-1Ra dar. Diese Form unterscheidet sich von dem natürlichen IL-Ra durch ein niedrigeres Molekulargewicht von 17,3 kDa, sowie durch einen zusätzlichen Methionin-Anhang am Aminoende des Proteins. Die Herstellung erfolgt mittels rekombinanter DNA-Technologie mit Hilfe von Escherichia coli (E. coli).

Anakinra ist in der Lage, die gleichen biologischen Effekte zu vermitteln wie der natürliche IL-1Ra. Es kommt dabei zu einer kompetitiven Hemmung der Bindung von IL-1 α und IL-1 β vor allem an den IL-1RI, ohne dabei, genau wie der natürliche IL-1Ra, ein intrinsisches Signal zu vermitteln. Verabreicht wird Anakinra® subkutan, die absolute Bioverfügbarkeit beträgt in gesundem Gewebe 95 %, wobei die maximale Plasmakonzentration nach 3-7 Stunden erreicht wird. Die Elimination findet renal statt, mit einer sehr kurzen Halbwertszeit von 4-6 Stunden. Dies hat den Nachteil, dass die Injektion täglich wiederholt werden muss, jedoch ist aufgrund der kurzen Wirkdauer die Substanz auch sehr gut steuerbar.

1.7.3 Interleukin-1-Rezeptoren

Es wurden bisher mehrere mutmaßliche IL-1-Rezeptoren charakterisiert, wobei der Effekt von IL-1 vermutlich durch die Bindung von IL-1 an den 80-kDa-IL-1RI vermittelt wird (Bomsztyk et al. 1989; Sims et al. 1993; Martin und Falk 1997; Loddick et al. 1998). Dieser benötigt für die Signaltransduktion ein akzessorisches Protein (IL-1RAcP) (Rothwell 1999), dessen extrazelluläre und zytoplasmatische Domäne Ähnlichkeiten mit dem IL-1RI aufweist. Indem IL-1 an den IL-1RI bindet, ändert IL-1RI seine Konformität, sodass IL-1RAcP an den IL-1/IL-1RI-Komplex binden kann und damit die Bindungsaffinität von IL-1 an den Rezeptor deutlich erhöht (Greenfeder et al. 1995). Ein eigenständiges Signal wird dabei durch das IL-1RAcP nicht vermittelt.

IL-1RI ist ein Glykoprotein, welches auf der Oberfläche von vielen Zelltypen, bevorzugt auf Epithelzellen, Endothelzellen Fibroblasten, Chondrozyten, glatten Muskelzellen und T-Lymphozyten exprimiert wird (Roux-Lombard 1998), wobei die Anzahl der Rezeptoren je nach Zelltyp und Stimulationsgrad sehr unterschiedlich sein kann (Shirakawa et al. 1987). Jedoch ist bereits eine geringe Anzahl von 50-100 Rezeptormolekülen pro Zelle für die Signalübertragung ausreichend. Dabei ist IL-1RI der einzige IL-1-Rezeptor, der, bei Bindung von IL-1, zur Signalübertragung fähig ist.

Der 68-kDa-Interleukin-1-Rezeptor Typ II (IL-1RII) hat eine kurze intrazelluläre Domäne und vermittelt kein intrinsisches Signal (Sims et al. 1993). Er wird in sehr geringer Anzahl von den gleichen Zellen exprimiert wie IL-1RI, vor allem von B-Lymphozyten, Monozyten, polynukleären Neutrophilen und hämatopoetischen Zellen (McMahan et al. 1991), aber auch von T-Lymphozyten (McKean et al. 1993). Er fungiert als natürlicher Antagonist von IL-1β, indem er mit IL-1RI um IL-1β konkurriert, welches er mit hoher Affinität binden kann und hat somit eine Art Köderfunktion für IL-1β (Colotta et al. 1993). So konnte nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression von IL-1RII die biologische Aktivität von IL-1 hemmt (Re et al. 1996), was seine antiinflammatorische Wirkung demonstriert. IL-1Ra kann an diesen Rezeptor binden, jedoch mit einer hundertfach geringeren Affinität als an IL-1RII (Granowitz et al. 1991), so steht die IL-1 inhibierende Wirkung von IL-1Ra und IL-1RII kaum in Konkurrenz zueinander.

Die drei IL-1-Rezeptoren IL-1RI, IL-1RII und IL-1RAcP werden ebenso wie die Interleukine IL-1α, IL-1β und IL-1Ra zu einer Familie zusammengefasst, die zur Familie der Immunglobuline gehört, dabei bestehen ihre extrazellulären Domänen aus drei IgG-ähnlichen Anteilen, die eine signifikante strukturelle Ähnlichkeit aufweisen (Sims et al. 1988; McMahan et al. 1991; Greenfeder et al. 1995). Die Gene von IL-1RII und IL-1RII liegen wie

die Gene der IL-1-Familie beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosoms 2 (Sims et al. 1995). Die Rezeptoren kommen zusätzlich zur membranständigen Form auch in gelöster Form als sIL-1RI und sIL-1RII vor, die durch die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Komponente des Membranrezeptors entsteht (Symons et al. 1991; Arend et al. 1994; Sims et al. 1994). sIL-1RI und sIL-1RII binden IL-1 im Kreislauf und verhindern so seine Bindung an membranständige Rezeptoren, was die Inhibition von IL-1 zur Folge hat. Sie sind ohne ihre membranständige Komponente selbst nicht mehr zur Signaltransduktion in der Lage (Kuno et al. 1993), sondern spielen als weitere Antagonisten von IL-1 eine wichtige Rolle in der Regulation von dessen Aktivität.

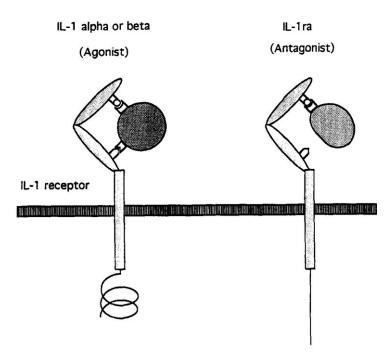


Abb. 3 Modell der Rezeptorbindung und Aktivierung (Evans et al. 1995, S. 11482)

IL-1α und IL-1β verfügen als Agonisten über zwei Rezeptorbindungsstellen, was zu einer Aktivierung des Rezeptors führt (Spirale in der Abbildung). Der IL-1Ra weist dagegen nur eine Rezeptorbindungsstelle auf und führt nicht zur Aktivierung des Rezeptors (gerader Strich in der Abbildung)

1.8 Fragestellung und Zielsetzung

Die EMT spielt für die renale Fibrogenese eine wichtige Rolle, wobei den Tubulusepithelzellen in diesem Prozess eine zentrale Bedeutung zukommt. Neben der Induktion der EMT durch Komponenten der extrazellulären Matrix und Zytokine wie TGF- β_1 und FGF-2, konnte auch eine Induktion der EMT durch IL-1 nachgewiesen werden.

Der rekombinante IL-1Ra Anakinra wird bereits erfolgreich bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Somit ergab sich die Hypothese, dass IL-1Ra als antiinflammatorischer Wirkstoff möglicherweise auch einen Effekt auf die EMT haben könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, die Effekte von IL-1 und IL-1Ra auf murine Tubulusepithelzellen zu untersuchen.

Es wurden folgende Aspekte im Einzelnen untersucht:

- 1. Detektion von IL-1 und IL-1-Rezeptoren mittels RT-PCR und die Einflüsse von TGF- β_1 und TNF- α auf die Zytokin- und Rezeptorexpression
- 2. Einfluss von IL-1 und IL-1Ra auf die Proliferation von proximalen und distalen Tubulusepithelzellen *in vitro* mittels Bromdeoxyuridininkorporation, sowie die Bestätigung mittels Zellzählung
- 3. Auswirkungen auf die Matrixsynthese in vitro mittels ELISA und Westernblot
- 4. Detektion der Effekte von IL-1 und IL-1Ra auf die Matrixdegradation *in vitro* mittels Zymographie.

Bei allen Versuchen wurden verschiedene IL-1Ra-Konzentrationen zur Inhibition des IL-1-Effektes verwendet, sowie eine Kontrolle mit alleiniger IL-1Ra-Gabe durchgeführt.

MATERIAL UND METHODEN 2

2.1 **Material**

Chemikalien:

Ethidiumbromid

Aceton Merck, Darmstadt

Gibco BRL, Paisley, GB Agarose

Fluka, Buchs, Schweiz Ammoniumpersulfat (APS)

PAA Laboratories, Österreich Bovines Serum Albumin (BSA)

BioRad, München Bradfordreagenz

Brij 35 solution (30 %) Sigma, Deisenhofen

Brillant® SYBR® Green QPCR Master Mix Stratagene, La Jolla, USA

Bromphenolblau Sigma, Deisenhofen

Chloroform Merck, Darmstadt

Coomassie R-250 Merck. Darmstadt

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) Boehringer, Mannheim

Dithiothreitol (DTT) Sigma, Deisenhofen

DMEM-Medium Gibco BRL, Paisley, GB

Dimethylsulphoxid (DMSO) Serva, Heidelberg

dNTP Mix (10 mM) Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) PAA Laboratories, Österreich

Denkendorf, Deutschland Dynatech MR 400

ECL Western Blotting Detection System Amersham Pharmacia, Braunschweig

EDTA Paesel & Lorei, Deutschland

Essigsäure Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe Ethanol

Sigma, Deisenhofen

First Strand Buffer Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Fötales Kälberserum (FCS) Gibco BRL, Paisley, GB

GAPDH Sigma, Deisenhofen

Sigma, Deisenhofen Glyzerol

Glycin Sigma, Deisenhofen

Interleukin-1α (Maus, rekombinant) Sigma, Deisenhofen Interleukin-1β (human, rekombinant) Promega, Madison, USA

IL-1α/ IL-1β Primer R & D Systems, WI-Nordenstedt

Iscove's Modified Dulbecco's Medium Gibco BRL, Paisley, GB

Isopropanol Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl) Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid Merck, Darmstadt

Kineret® Amgen, Inc., Thousand Oaks, USA

L-Glutamin PAA Laboratories, Österreich Längenstandard (DNA-Marker) MBI Fermentas, St. Leon-Rot

MagermilchpulverMerck, Darmstadtβ-MercaptoethanolSigma, DeisenhofenMethanolMerck, Darmstadt

Molekulargewichtsstandards RainbowTM Marker, Amersham Pharmacia, Braunschweig

Full Range

Natriumchlorid (NaCl) Merck, Darmstadt Natriumdodecylsulfat (SDS) Serva, Heidelberg Nuklease-freies Wasser Promega, USA

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Phenylmethansulfonsäurefluorid (PMSF)

Sigma, Deisenhofen

Plasmocin

Invivo Gen, USA

Ponceau S

Merck, Darmstadt

RNA Bee Paesel & Lorei, Deutschland
RNaseOutTM Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase H Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SuperscriptTM II Reverse Transcriptase Invitrogen GmbH, Karlsruhe

TGF- β (rekombinant) R & D Systems, WI-Nordenstedt

TNF- α R & D Systems, WI-Nordenstedt

Trypan-Blau 0,5 % (w/v)

Biochrom AG Seromed, Berlin

Trypsin/ EDTA

PAA Laboratories, Österreich

Tween® 20 Boehringer, Mannheim
BM Chemiluminescence ELISA Substrate Boehringer, Mannheim

Western LightningTM Chemiluminescence Perkin Elmer Life Sciences,

Reagent Plus Boston, USA

Kit Systeme:

RNeasy® Mini Kit Qiagen, Hilden RNase-Free DNase-Set Qiagen, Hilden

Cell Proliferation Biotrak ELISA system, Amersham Pharmacia, Braunschweig

Version 2

Antikörper:

Kaninchen-Anti-Human Fibronektin Sigma, Deisenhofen
Anti-Kaninchen-IgG-AP Boehringer, Mannheim

Anti-Kaninchen HRP Amersham Pharmacia Braunschweig

Ziege-Anti-Aktin Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

USA

Anti-Ziege HRP Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

USA

Geräte:

Autoklav Tecnorma, Ruhberg Fluor STM-MultiImager BioRad, München

Brutschrank, NuaireTM TS Autoflow

Nuaire, Plymouth, USA

Dynatech MR 400, ELISA-Reader

Denkendorf, Deutschland

Fluoreszenzreader (Mikrolumat LB 96P)

Berthold, Bad Wildbad,

Fluor S MultiImager

Gene Quant II

Pharmacia Biotech

Kühlzentrifuge, GS-6R

Beckmann, München

Kühlzentrifuge, Mikroliterzentrifuge 5402

Eppendorf, Hamburg

Mastercycler personal

Eppendorf, Hamburg

Mikroskop, Leitz Diavert

Leitz, Oberkochen

Mx3000P® Stratagene, La Jolla, USA

Photometer, Spectronic Genesys 5 Spectronic, USA
Sterilbank, Hera Safe Heraeus, Hanau
Stickstofftank, Chronos® Biosave® Messer, Griesheim

Vakuum-Zentrifuge (BaVaCo Mini 30)

Bachofer, Reutlingen, Deutschland

Wärmebad

Schütt Labortechnik, Göttingen

Wippe RT-2S Fröbel, Lindau

Gebrauchsmaterial:

Gekammerte Objektträger Falcon ® Culture Slide Falcon Röhrchen, 15/50 ml, steril Becton Dickinson, USA

Falcon Zellkulturflaschen (Luftfilter) T25, T75 Becton Dickinson, USA

Kryoröhrchen, Nunc Cryo TubeTM Vials

Nalge Nunc, Naperville, USA

Kulturplatten, 12-/ 24-Well Becton Dickinson, USA

Mehrkanalpipette, Dispenser Multipette® 4780 Eppendorf, Hamburg Mikroliter Pipetten 2,5/ 10/ 100/ 200/ 1000 μl Eppendorf, Hamburg

Mikrotiterplatten MicroliteTM 2, 96 Vertiefungen Dynex Technologies, Chandilly, USA

Neubauer-Zählkammer Saaringia, Deutschland

Pipetten 2/5/10/25 ml Greiner, Solingen

Pipettenspitzen 2,5/ 10/ 100/ 1000 μ l Eppendorf, Hamburg Reagiergefäße 0,5/1,5/2,0 ml Eppendorf, Hamburg

Röntgenfilm Kodak X-Omat Kodak, Stuttgart

Skalpelle pfm, Köln

T 25/ T 75 Zellkulturflaschen Sarstedt, Deutschland Zellschaber Sarstedt, Deutschland

Zymographiegele, 10 % Gelatine BioRad, München

Software:

Beacon Designer 3.0 Premier Biosoft, Palo Alto, USA

MikroWinTM 3.0 Mikrotek Laborsysteme, Overath

Multi AnalystTM BioRad, München

MxProTM QPCR Stratagene, LA Jolla, USA

Microsoft Office Excel 2003 Microsoft, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Die Zellinien NP1 und MCT

Bei den Zellinien NP1 und MCT handelt es sich um murine Tubulusepithelzellen des distalen (NP1), bzw. proximalen (MCT) Tubulus. Die NP1-Zellen stammen aus isolierten Tubuli von C57BL/6J-Mäusen und wurden durch Immunzytochemie charakterisiert (Strutz et al. 2002), während die MCT-Zellen aus proximalen Tubuli von SJL-Mäusen (H-2^S) isoliert wurden (Haverty et al. 1988). Beide Zelllinien wachsen adhärent als Monolayer im Kulturmedium.

2.2.2 Allgemeine Zellkultur

Die Arbeit mit Zellkulturen erfolgte angelehnt an die von Freshney 1990 beschriebenen allgemeinen Arbeitsbedingungen, wobei alle Arbeitsschritte unter einer Sterilbank (Hera Safe, Hereus) durchgeführt wurden. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einem CO₂-Inkubator (Nuaire TS Autoflow) mit 100 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ in der Begasungsluft (Freshney 1990). Für die kontinuierliche Kultur wurden die Zellen in Zell-kulturflaschen (T75, Sarstedt) mit DMEM-Medium (Gibco BRL, Paisley, GB) inkubiert, dem 10 % fötales Kälberserum (FCS), 0,5 mM/ml L-Glutamin und 0,02 % M-Plasmocin zugesetzt wurden. Zum Subkultivieren wurde alle 3 bis 5 Tage, wenn die Zellen konfluent waren, das Medium entfernt, die Zellen gewaschen und mittels Trypsin/EDTA bei 37°C für 5 min. abgelöst, anschließend erneut gewaschen, resuspendiert und, im Verhältnis 1:10 verdünnt, in neue Zellkulturflaschen wieder ausgesät.

Um bei den Zellen zu Versuchsbeginn eine optimale Konfluenz und damit optimale Wachstumsbedingungen zu erreichen, wurden 24 Stunden vor geplantem Versuchsbeginn 800.000 Zellen in Zellkulturflaschen (T25, Sarstedt) subkultiviert. So wurde nach 24 Stunden Wachstum eine gleichmäßige Konfluenz von ca. 80 % des Flaschenbodens erreicht.

2.2.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben abtrypsiniert, gewaschen und in DMEM/10 % FCS resuspendiert. Anschließend wurden sie gezählt und maximal 1x10 ⁷ Zellen in 0,9 ml Medium mit 0,9 ml Einfriermedium (DMEM/FCS/DMSO 40/40/20 v/v/v) in Kryoröhrchen (Nunc Cryo TubeTM Vials, Nalge Nunc) vermischt. Die

Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte in einer Styroporbox zunächst für 24 Stunden bei -20°C, dann für weitere 24 Stunden bei -80°C, von wo aus sie zur endgültigen Lagerung in einen Stickstofftank (-196°C) (Chronos® Biosave®, Messer) überführt wurden. Durch den Zusatz des Gefrierschutzstoffes DMSO (Serva, Heidelberg) im Einfriermedium waren die Zellen effektiv vor Zerstörung durch Eiskristalle geschützt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen kurz bei 37°C im Wasserbad erwärmt, bis das Medium außen leicht getaut war. Das flüssige Medium wurde daraufhin mit dem Eiskern in ein 15-ml-Röhrchen mit 10 ml gekühltem DMEM/20 % FCS gegeben und durchmischt, anschließend zweimal in Medium gewaschen, resuspendiert und, wie beschrieben, in Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.4 Test auf Mykoplasmen

Über die Häufigkeit von Mykoplasmeninfektionen in Zellkulturen gibt es unterschiedliche Zahlen (1-40 %) (Barile 1981). Da Mykoplasmeninfektionen, im Gegensatz zu bakteriellen oder Pilzinfektionen, mit dem bloßen Auge nicht sichtbar sind, wurden die Zellkulturen in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmeninfektionen untersucht. Hierzu wurden die Zellen mit einer Zellzahl von ca. 60.000 auf einem gekammerten Objektträger (Falcon® Culture Slide) ausgesät und für 24 Stunden wachsengelassen. Anschließend wurden sie für 10 min. mit Methanol-Aceton (1:1) bei -20°C fixiert, danach luftgetrocknet und für 5 min. mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) (1:500 (v/v) in PBS) inkubiert. Der Objektträger wurde daraufhin mit Dako® Fluorescent Mounting Medium eingedeckelt und unter einem Fluoreszenzmikroskop Mykoplasmen-freie Zellkulturen angeschaut. zeigen eine ausschließlich nukleäre Fluoreszenz, infizierte eine zusätzliche zytoplasmatische Fluoreszenz.

2.2.5 Proliferationsassay

Mittels eines nicht-radioaktiven Proliferationsassays sollten die mitogenen Effekte in vitro von IL-1 α und IL-1 β , bzw. die Wirkung des IL-1Ra Anakinra auf Tubulusepithelzellen untersucht werden. Die angewandte Methode, ein indirekter ELISA, beruht auf dem Nachweis des Thymidin-Analogons Brom-deoxy-Uridin (BrdU) (Gratzner 1982). Die Durchführung des Tests besteht aus drei Schritten: BrdU-Inkorporation, Inkubation mit Anti-BrdU-Primärantikörper und Detektion mittels eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers. Es wurde mit einem modifizierten Kit (Cell Proliferation ELISA System, Amersham) gearbeitet.

Für den Proliferationsassay wurden NP1- und MCT-Zellen (1000 Zellen/Well/100μl) in 96-Well Mikrotiterplatten (MicroliteTM, Dynex Technologies, Chandilly) ausgesät und für 24 Stunden in DMEM/10 % FCS kultiviert. Nach 24-stündiger Ruhigstellung in reinem DMEM-Medium (low glucose) wurden die Zellen für 48 Stunden in 100 μl DMEM (low glucose) mit den entsprechenden Zusätzen inkubiert. Es wurden jeweils 6 Wells mit folgenden Zusätzen angesetzt (100 μl/Well): DMEM (low glucose) (Negativkontrolle), DMEM/10 % FCS (Positivkontrolle), DMEM (low glucose) mit IL-1α in den Konzentrationen 1, 10 und 20 ng/ml und DMEM (low glucose) mit IL-1β in den Konzentrationen 0,1, 1 und 5 ng/ml. Diese Experimente wurden zweimal unabhängig wiederholt. Die unterschiedlichen Konzentrationen von IL-1α und IL-1β wurden eingesetzt mit dem Ziel, die möglichst optimale Konzentration für den zweiten Versuchsansatz zu ermitteln.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde daraufhin IL- 1α in der Konzentration 20 ng/ml und IL- 1β in der Konzentration 5 ng/ml verwendet. Es wurde jeweils der IL-1Ra Anakinra in den Konzentrationen 3, 30 und 300 ng/ml zugefügt. Zur Kontrolle wurde der IL-1Ra zusätzlich in den genannten Konzentrationen ohne IL-1 eingesetzt. Auch dieser Versuch wurde in 6-fachen Ansätzen durchgeführt. Das Gesamtergebnis ergibt sich dabei aus den Resultaten von drei unabhängigen Stimulationen.

Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen für 4 Stunden in BrdU-Labelingreagenz (1/1000 in den entsprechenden Stimulationsmedien verdünnt) bei 37°C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Fixation wurde der im Kit bereitgestellte Fixative (Ethanol, 200µl/Well, 30 min. bei Raumtemperatur) verwendet und danach mit dem ebenfalls im Kit vorhandenen Blocking Reagenz unspezifische Bindungsstellen blockiert (100 µl/Well, 30 min. bei Raumtemperatur). Daraufhin wurden die Zellen für 90 Minuten mit Anti-BrdU/Nuclease-Gemisch bei Raumtemperatur inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen, und zur Detektion mit einem Peroxidasesubstrat (Tetramethylbenzidine in 15 % (v/v) DMSO) versetzt. Die Messung der OD erfolgte bei 450 nm mit einem ELISA-Reader (Dynatech MR 400, Denkendorf, Deutschland).

2.2.6 Zellzählung

Mit Hilfe der Zellzählung sollte untersucht werden, ob sich unter Stimulation mit IL-1α, bzw. IL-1β ein mitogener Effekt auf Tubulusepithelzellen nachweisen lässt.

Hierbei wurden NP1- und MCT-Zellen (10000 Zellen/Well/ml) in 24-Well Zellkulturschalen ausgesät und für 24 Stunden in DMEM/10 % FCS kultiviert. Nach 24-stündiger Ruhigstellung in reinem DMEM-Medium (1 % FCS) wurden die Zellen für 48 Stunden in 1

ml DMEM mit den entsprechenden Zusätzen bei 37°C inkubiert. Es wurden jeweils Tripletts mit folgenden Zusätzen angesetzt (1 ml/Well): DMEM (1 % FCS) (Negativkontrolle), DMEM/10 % FCS (Positivkontrolle), DMEM (1 % FCS) + IL-1α in den Konzentrationen 1, 10 und 20 ng/ml und DMEM (1 % FCS) + IL-1β in den Konzentrationen 0,1, 1, 5 ng/ml. Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen zur Zählung mit Trypsin-EDTA abgelöst, mit Trypan-Blau 0,5 % (w/v) im Verhältnis 1:1 angefärbt und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Saaringia, Deutschland) gezählt. Es wurden insgesamt vier unabhängige Versuche durchgeführt.

Vor Versuchsbeginn wurden Verdünnungsreihen angesetzt, um die optimale Zellzahl zur Aussaat zu ermitteln.

2.2.7 Westernblot

Mittels Immunoblotverfahren sollte die Expression von Fibronektin nach 48 Stunden Stimulation mit IL-1, bzw. deren Hemmbarkeit mittels eines IL-1Ra, quantitativ (in Bezug zu β -Aktin als Standardprotein) ermittelt werden. NP1- und MCT-Zellen wurden hierfür in Zellkulturflaschen ausgesät und für 24 Stunden in DMEM/10 % FCS kultiviert, bis sich ein teilkonfluentes Monolayer gebildet hatte. Nach 24-stündiger Ruhigstellung in reinem DMEM-Medium (low glucose), erfolgte die Inkubation mit entsprechenden Zusätzen (5 ml/50ml Zellkulturflasche) für 48 Stunden: reines DMEM-Medium (low glucose) (Negativkontrolle), DMEM (low glucose) + TGF- β ₁ 10 ng/ml (Positvkontrolle), DMEM (low glucose) + IL-1 α 10 ng/ml in Kombination mit Kineret 30 ng/ml, DMEM (low glucose) + IL-1 β 1 ng/ml, DMEM (low glucose) + IL-1 β 1 ng/ml in Kombination mit Kineret 30 ng/ml und DMEM (low glucose) + Kineret 30 ng/ml (Kineret Negativkontrolle). Das Verfahren wurde in folgenden Schritten durchgeführt: Proteinisolierung, Auftrennung der Proteine mittels SDS-Page, Proteintransfer auf eine Zellulosemembran und Detektion mittels spezifischer Antikörper.

2.2.7.1 Proteinisolierung

Nach erfolgter Stimulation wurden die Zellen zweimal mit sterilem und kaltem PBS gewaschen und mit einem Lysispuffer (0,4 % (w/v) Na-Deoxycholat; 1 % (v/v) NP-40; 50 mM EGTA; 10 mM Tris (pH 7,4); 2 mM PMSF zur Hemmung endogener Proteasen) versetzt (1 ml/50 ml Zellkulturflasche) 10 min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die mechanische Lyse der Zellen mittels eines Zellschabers (Sarstedt, Deutschland) und das

Überführen des gesamten Flascheninhalts mit Hilfe einer Pipette in entsprechende Reagiergefäße (1,5 ml). Nach Zentrifugation für 6 min. bei 14.000 U/min. und 4°C wurde der proteinhaltige Überstand in neue 1,5-ml-Reagiergefäße abpipettiert und das Zellpellet verworfen. Die Proteine wurden bei -20°C gelagert.

2.2.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einer Methode (Bradford 1976), bei der die Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an die vorhandenen Proteine eine Veränderung des Absorptionsmaximums von 465 zu 595 nm bewirkt. Dabei steht die Intensität des gebildeten Farbkomplexes in proportionalem Verhältnis zur Proteinkonzentration. Zur Messung wurden 50 μl Lysispuffer (s.o.) (Leerwert), bzw. jeweils 50 μl Proteinlösung mit 2,45 ml filtrierter Bradford Reagenz (1:4 in ddH₂O; BioRad) verdünnt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration im Photometer (Spectronic Genesys 5, Spectronic, USA) bei 595 nm mit Hilfe einer Eichgrade des Proteinstandards bestimmt.

2.2.7.3 SDS-Page-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht diente die eindimensionale diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) (Laemmli 1970). Dabei wurden die durch Natriumdodecyl-Sulfat denaturierten und durch SDS negativ geladenen Proteine im elektrischen Feld durch ihre, abhängig vom Molekulargewicht, unterschiedliche Laufgeschwindigkeit voneinander getrennt. Um zusätzlich vorhandene Disulfidbrücken zu öffnen, wurde β-Mercaptoethanol als reduzierendes Reagenz zugegeben. Es wurde ein 7,5 %iges Trenngel (4,85 ml ddH₂O; 2,5 ml 1,5 M Tris HCl, pH 8,8; 100 μl 10 % SDS (w/v); 2,5 ml Acrylamid/Bis (30 %); 50 μl 10 % APS (w/v); 5 μl TEMED) frisch angesetzt, zügig zwischen die Glasplatten der Elektrophoreseapparatur gegeben und mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Auspolymerisation wurde das Isopropanol entfernt, das Sammelgel (6,1 ml ddH₂O; 2,5 ml 0,5 M Tris HCl, pH 6,8; 100 μl 10 % SDS; 1,3 ml Acrylamid/Bis (30 %); 50 μl 10 % APS; 10 μl TEMED) ebenso zügig angesetzt, auf das Trenngel gegeben und mit einem Kamm, der von oben zwischen die Glasplatten geschoben wurde, versehen.

Pro Spur wurden jeweils 50 µg Protein eingesetzt. Um die optimale Proteinmenge zu ermitteln, war zuvor eine Verdünnungsreihe mit je 25, 50, 100 und 150 µg Protein aus

unstimulierten NP1- und MCT-Zellen durchgeführt worden. Die Proteine wurden mit Aceton aus einem entsprechenden Volumen des Lysats gefällt (10 min. auf Eis), lyophilisiert und in je 25 μl Probenpuffer (4 ml ddH2O; 1 ml 0,5 M Tris HCl pH 6,8; 0,8 ml Glycerol; 1,6 ml 10 % SDS (w/v); 0,2 ml 0,05 % Bromphenolblau; frisch dazu: β-Mercaptoethanol 1:20) resuspendiert, 4 min. bei 95°C im Heizblck denaturiert und in die Taschen des Sammelgels gegeben.

Als Molekulargewichtsstandard wurden jeweis 10 µl gefärbter Rainbowmarker[®] (Amersham), vermengt mit 15 µl Probenpuffer eingesetzt. Die elektrophoretische Proteinauftrennung erfolgte in einem Mini Protean 2 System (BioRad) bei 140 V mit einem Elektrophoresepuffer (0,025 M Tris; 0,2 M Glycin; 1 % SDS (w/v); pH 8,3). Die Elektrophorese wurde jeweils beendet, nachdem die Bromphenol-Blau-Bande aus dem Gel herausgelaufen war.

2.2.7.4 Elektrophoretischer Proteintransfer (Blotting)

Die aufgetrennten Proteine wurden nun mit Hilfe einer angelegten Gleichspannung von 30 V bei 4°C über Nacht in einem Blottingpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3) aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane; Amersham) transferiert (Towbin et al. 1979).

Der erfolgreiche Transfer wurde durch eine reversible Ponceau-Proteinfärbung kontrolliert: Die Membran wurde 15 min. bei Raumtemperatur in Ponceau Färbelösung (Sigma) inkubiert und anschließend 2 x 5 min. mit 5 % Essigsäure entfärbt.

2.2.7.5 Detektion

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf dem Blot wurden die Membranen für mindestens 6 Stunden bei 4°C mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in 0,2 % (v/v) Tween 20 in PBS (pH 7,4) äquilibriert.

Nach einmaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem Primärantikörper mit spezifischer Bindung (Kaninchen Anti-Human Fibronektin (Sigma) 1:15000, in 3 % BSA/PBS-Tween) bei 4°C über Nacht und nach weiterem zweimaligen 10 minütigen Waschen die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (anti-Kaninchen HRP (Amersham) 1:3000 in 3 % BSA/PBS-Tween) für eine Stunde bei Raumtemperatur.

Zur Detektion mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm wurden die Membranen erneut 3 x 10 min. gewaschen (Waschpuffer: 1000 ml PBS, 1 g Magermilchpulver, 1 ml Tween-20), wobei sowohl Antikörperinkubation als auch Waschschritte unter Agitation statt-

fanden. Für die Detektion wurde Western LightningTM Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA) verwendet, indem jeweils direkt vor Gebrauch Lösung A mit Lösung B im Verhältnis 1:1 vermischt wurden und die Membran 60 sec. in der Lösung inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Chemilumineszenzmessung mit einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat, Stuttgart) in der Dunkelkammer.

Zur weiteren Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper β-Aktin als Bezugsgröße (Ziege-Anti-Aktin (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) (I-19) polyklonal IgG 1:1000) wurde die Membran nach Detektion erneut gewaschen und über Nacht geblockt (s.o.). Als Sekundärantikörper diente hier donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz) 1:5.000. Zur Auswertung wurden die belichteten Röntgenfilme eingescannt (BioRad Fluor S MultiImager) und densitometrisch ausgewertet (Multi AnalystTM Software; BioRad, München).

2.2.8 Gel-Zymographie

Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2 und MMP-9) sind für den Abbau extrazellulärer Proteine verantwortlich. Mit Hilfe der Gel-Zymographie (Quesada et al. 1997) sollte ermittelt werden, ob IL-1 einen Einfluss auf die Synthese von MMPs hat, bzw. ob es einen hemmenden Effekt dieser Synthese durch den IL-1Ra gibt.

Vor Versuchsbeginn wurden Verdünnungsreihen angesetzt, um anhand verschiedener Zellzahlen für die Negativ- und Positivkontrolle die optimale Zellzahl zur Aussaat zu ermitteln. Dafür wurden NP1- und MCT-Zellen (10.000 Zellen/Well/ml; 15.000 Zellen/Well/ml und 20.000 Zellen/Well/ml) ausgesät und für 24 Stunden in DMEM/10 % FCS kultiviert. Nach 24-stündiger Ruhigstellung in reinem DMEM-Medium (low glucose) wurden je Ansatz folgende Zusätze gegeben (1 ml/Well): DMEM (low glucose) (Negativkontrolle), DMEM/10 % FCS (Positivkontrolle). Nach erfolgter Inkubation für 48 Stunden wurden die Zellen zur Zählung mit Trypsin-EDTA abgelöst, mit Trypan-Blau angefärbt (0,5 % (w/v)) und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dabei stellte sich heraus, dass für die NP1-Zellen eine optimale Konfluenz der Zellen bei 15.000 Zellen/Well/ml und für die MCT-Zellen bei 17.000 Zellen/Well/ml erreicht werden konnte.

Entsprechend diesen Ergebnissen wurden nun NP1- und MCT-Zellen ausgesät. Nach 24stündigem Wachstum in DMEM/10 % FCS wurden sie für weitere 24 h einem Hungermedium (DMEM low glucose) ausgesetzt und anschließend für 48 Stunden, jeweils als Triplets, mit folgenden Zusätzen stimuliert (300 μ l/Well): DMEM (low glucose) (Negativkontrolle), DMEM (low glucose) + 10 ng/ml TGF- β_1 (Positivkontrolle), DMEM (low glucose) + IL-1α 10 ng/ml, DMEM (low glucose) + IL-1α 10 ng/ml + Kineret 30 ng/ml, DMEM (low glucose) + IL-1β 1 ng/ml, DMEM (low glucose) + IL-1β 1 ng/ml + Kineret 30 ng/ml und DMEM (low glucose) + Kineret 30 ng/ml (Kineret Negativkontrolle).

Nach erfolgter Stimulation wurden die Überstände entnommen, die Zellen gezählt, und die Überstände mittels Vakuumzentrifuge (BaVaCo Mini 30, Bachofer, Reutlingen, Deutschland) auf ca. 1/10 ihres ursprünglichen Volumens aufkonzentriert, wobei das Gewicht der Proben vor und nach der Aufkonzentrierung bestimmt wurde, um eventuell ungleichmäßige Aufkonzentrierung erfassen und rechnerisch ausgleichen zu können. Die Proben wurden daraufhin 1:1 mit Probenpuffer (2,15 ml ddH₂O; 1,25 ml 0,5 M TrisHCl pH 6,8; 2,25 ml Glycerol; 4 ml 10 % SDS; 0,1 ml 1 % Bromphenolblau) verdünnt, auf ein zehnprozentiges Gelantinegel (BioRad, München) aufgetragen und in einem Mini-Protean 2 System (Bio Rad) bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei entsprach der verwendete Elektrophoresepuffer dem des Westernblots (siehe 2.2.7).

Als Standards wurden entsprechende MMPs (2 und 9) (Chemicon international Gelatinase Zymography standards) eingesetzt, als Molekulargewichtsstandards dienten RainbowTM Marker (Amersham). Anschließend wurden die fertigen Gele für 45 min. bei 37°C renaturiert (Renaturierunspuffer: Triton X-100 (Sigma) 25 ml; mit ddH₂O auf 1000 ml auffüllen) und über Nacht (mindestens 4 h) bei 37°C in Entwickelungspuffer (Tris Base 6,06 g; NaCl 11,7 g; CaCl₂ (dehydriert) 0,56 g; 30 % Brij 0,67 ml in 900 ml ddH₂O lösen, pH 7,5; auf 1000 ml auffüllen; frisch angesetzt) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gel für 60 min. bei 37°C angefärbt (Färbepuffer: MetOH 400 ml; Essigsäure 100 % 100 ml; Coomassie-blau R-250 (Sigma) 5 g; ddH₂O 500 ml) und anschließend ca. eine Stunde bei Raumtemperatur mit häufig wechselndem Entfärbepuffer (MetOH 400 ml; Essigsäure 100 ml; ddH₂O 500 ml) solange entfärbt, bis helle Banden gegen einen blauen Hintergrund sichtbar wurden. Zum besseren Sichtbarwerden der Banden und zur Lagerung wurden die Gele noch einige Tage in Konservierungspuffer (Essigsäure 100 ml; Glycin 100 g; ddH₂O 1000 ml) inkubiert und schließlich im Fluor STM MultiImager (BioRad) mit Hilfe der Multi-AnalystTM -Software (BioRad) densitometrisch ausgewertet.

2.2.9 ELISA

Mittels ELISA sollte untersucht werden, ob Interleukin- 1α , bzw. Interleukin- 1β in vitro einen Effekt auf die Fibronektinsynthese von Tubulusepithelzellen hat, bzw. ob sich die durch IL-1 induzierte Synthese durch den IL-1Ra hemmen lässt. Die Fibronektinkonzentration wurde in

Zellkulturüberständen bestimmt, durch Chemilumineszenzmessung, bezogen auf eine Standardkurve (Rostagno et al. 1991).

Zur Gewinnung der Überstände wurde verfahren, wie unter 2.2.8 beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Überstände nicht aufkonzentriert, sondern 1:6 mit ddH₂O verdünnt wurden. Je 100 μl Überstand und die dazugehörige Standard-Verdünungsreihe (0,1 mg/ml-0,1 pg/ml in 6 Abstufungen Fibronektin Standard, Sigma F2006 Fibronektin from human Plasma) wurden auf 96-Well Mikrotiterplatten aufgetragen, und bei 37°C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Überstände abpipettiert und die Mikrotiterplatten 45 min. bei Raumtemperatur getrocknet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde eine Stunde mit PBS/3 % (w/v) Trockenmilchpulver inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Der Primärantikörper Kaninchen-anti-Fibronektin (Sigma, Deisenhofen) wurde 1:5.000 in PBS/1 % BSA verdünnt und 100 μl je Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur pipettiert, anschließend wurde dreimal mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen, der Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-AP (Boehringer Mannheim) 1:1.000 in PBS/1 % BSA verdünnt, und ebenfalls die Platten mit je 100 μl für eine Stunde inkubiert.

Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 100 μl/Well Substrat (BM Chemiluminescence ELISA Substrate (AP), Roche Deutschland) pipettiert und nach 15 min. die Chemilumineszenz mittels eines Fluoreszenzreaders (Mikrolumat LB 96 P, EG&G Berthold, Bad Wildbach Deutschland) gemessen (4 sec./Well). Mit Hilfe der Standardkurve (rekombinantes FN, Sigma, Deisenhofen) erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentration durch die MikroWinTM 3.0 Software (Mikrotek Laborsysteme, Overath).

Die erhaltenen Werte mussten nun anhand der Zellzahl korrigiert werden, die Zellzählung erfolgte dabei nach Transfer der Überstände.

2.2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode, mit deren Hilfe in vitro bestimmte DNA-Abschnitte, die von Interesse sind, amplifizierbar gemacht werden können (Mullis et al. 1992), indem enzymatisch von bestimmten Nucleotidsequenzen in zyklischer Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte millionenfach Kopien von einer Matrize (Template) erstellt werden. Ein PCR-Zyklus besteht dabei aus folgenden Schritten: thermische Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 4°C, Hybridisierung der Primer mit der Einzelstrang-DNA, DNA-Synthese (Elongation) bei 72°C mittels hitzeresistenter Polymerase (Tac-Polymerase).

Durch 30-40-malige Wiederholung des beschriebenen Zyklus ist somit eine Vervielfältigung der DNA um den Faktor 10^6 bis 10^7 möglich. Da es mit Hilfe der Tac-Polymerase nicht

möglich ist, direkt mRNA zu amplifizieren, bedient man sich des Enzyms Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, zur Umschreibung der RNA, die zuvor aus Zellen isoliert wurde, in einen komplementären DNA-Strang (cDNA) (Reverse Transkription), die somit mittels PCR amplifiziert werden kann.

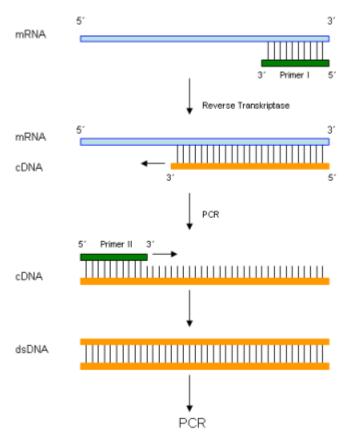


Abb. 4 Schematische Darstellung der RT-PCR (Haberhausen 1998)

Es wurde dabei eine so genannte Two-Step-RT-PCR durchgeführt, bei der im Vergleich zur One-Step-RT-PCR, die beiden Schritte Reverse Transkription und PCR nacheinander und voneinander separiert ablaufen, mit dem Vorteil, dass die Reaktionsbedingungen in beiden Ansätzen gesondert verändert und optimiert werden können.

In dieser Arbeit war das Ziel nun die Detektion von IL-1, bzw. des IL-1-Rezeptors auf den beiden Tubulusepithelzelllinien MCT und NP1 mit Hilfe der PCR. Zu diesem Zweck wurde zum einen die RNA-Isolierung aus unstimulierten NP1- und MCT-Zellen durchgeführt, und zum anderen die Zellen vor RNA-Isolierung für 48 Stunden mit TNF- α , bzw. TGF- β_1 stimuliert.

2.2.10.1 RNA-Isolierung mit RNA Bee

Die beiden Zelllinien MCT und NP1 wurden, wie unter Abschnitt 2.2.7 beschrieben, in Zell-kulturflaschen ausgesät, kultiviert und nach 24-stündiger Ruhigstellung in reinem DMEM-Medium (low glucose) zum einen für weitere 48 Stunden kultiviert zur RNA-Isolierung aus unstimulierten Zellen, zum anderen erfolgte die Stimulation beider Zelllinien mit DMEM (low glucose) + TGF- β_1 10 ng/ml, bzw. TNF- α 50 ng/ml (5 ml/50 ml Zellkulturflasche) für 48 Stunden.

Zur RNA-Isolierung erfolgte nun ein 2-maliges Waschen mit PBS, dann wurde den Flaschen je 1 ml RNA Bee (Paesel & Lorei) zugefügt, die Zellen nach 5-minütiger Lagerung der Flaschen auf Eis mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in ein Eppendorf-Cup gegeben. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe von 0,2 ml Chloroform, vorsichtiger Durchmischung und einer weiteren 5-minütigen Lagerung auf Eis, woraufhin für 15 Minuten bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert wurde. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthielt, wurde abgenommen, mit 0,5 ml Isopropanol 7 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und ein weiteres Mal bei 14.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das entstehende RNA-Pellet wurde 2 mal mit je 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet und in Nuklease-freiem Wasser (Promega, USA) aufgenommen. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Pharmacia Biotech Gene Quant II) anhand einer Eichgerade.

2.2.10.2 RNA-Isolierung mittels Aufreinigung über Säulchen

Die Stimulation der beiden Zelllinien MCT und NP1 erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben. Die RNA-Isolierung erfolgte mittels RNeasy® Mini Kit von Qiagen nach den im Protokoll des Herstellers festgelegten Arbeitsschritten. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, und für die Zelllyse mit einem RLT-Lysispuffer/ β-Mercaptoethanol Gemisch im Verhältnis 100:1 versetzt, mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in ein Eppendorf-Cup gegeben. Die Volumina wurden nun zur Homogenisierung auf eine Schreddersäule (Quiagen, Hilden) gegeben und zwei Minuten bei 10.000 U/min. und 4°C zentrifugiert, mit dem Ziel unerwünschte Zellbestandteile zu entfernen. Anschließend wurde zu den sich nach Aufzentrifugieren im Tube befindenden Proben jeweils eine identische Menge an 70 %igem Alkohol hinzugegeben. Dieses Gemisch wurde nun auf eine Zentrifugations-Säule gegeben, die mit einer Silika-Gelmembran ausgestattet ist, an die selektiv die RNA bindet. Es folgten

verschiedene Waschschritte mit in dem Kit enthaltenen Puffern und 80 % Ethanol zur Entfernung von Verunreinigungen.

Im nächsten Schritt erfolgte ein zusätzlicher DNAse I-Verdau, um auftretende Kontaminationen an genomischer DNA vollständig zu entfernen. Hierfür wurde mit einem RNAse-free DNAse Set ebenfalls von Qiagen gearbeitet. Es wurden 10 µl der DNase-Stocklösung mit 70 µl RDD-Puffer vermischt und der Ansatz direkt auf die isolierte RNA in der Säule gegeben. Nach 15 min. Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Inaktivierung der DNase durch 350 µl RW1-Puffer.

Es erfolgten weitere Waschschritte und die anschließende Trocknung der Silika-Gelmembran, um das Ethanol vollständig zu entfernen. Im letzten Schritt der RNA-Isolation wurden 32 μl im Kit enthaltendes Nuklease-freies Wasser auf die Säule gegeben und die RNA gewonnen indem ein weiteres Mal für eine Minute mit 10.000 U/min zentrifugiert wurde. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte ebenfalls photometrisch mit Hilfe des Gene Quant II (Pharmacia Biotech) anhand einer Eichgerade.

Bei allen Binde-, Wasch- und Trocknungsschritten erfolgte die Zentrifugation bei 10.000 U/min. Die gewonnene RNA wurde bei -80°C gelagert.

2.2.10.3 Reverse Transkription (RT)

Es wurde ein PCR-Kit (Amersham) verwendet. Oligo-dT, dNTP-Mix, First Strand Buffer, DTT, MgCl₂, RNAseOutTM und Superscript/ RNAse H entstammen der Firma Gibco-Invitrogen. Die Durchführung der RT-PCR erfolgte in folgenden Schritten:

3 μg RNA + 1 μl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer + 1 μl 10 mM dNTP-Mix wurden 10 min bei 70°C, anschließend 3 min bei 4°C inkubiert. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe von 4 μl First Strand Buffer, 1 μl DTT, 2 μl 25 mM MgCl₂ und 0,5 μl RNAse-OutTM als Inhibitor und weitere Inkubation für 5 min bei 42°C. Zuletzt wurden noch 1 μl SuperscriptTM II Reverse Transkriptase zugegeben und 50 min bei 42°C inkubiert. Es folgte die Inaktivierung der Reaktion, indem 15 min auf 70°C erhitzt wurde. Um nun die zur entstandenen cDNA komplementäre mRNA zu entfernen, wurde noch 1 μl RNase H zugegeben und weitere 20 min bei 37°C inkubiert. Alle Inkubationsschritte erfolgten in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf).

2.2.10.4 PCR

Der PCR-Master-Mix für die nachfolgende PCR bestand aus 1 μl RT-Reaktionsmischung (cDNA), 5 μl PCR-Puffer (10x), 1,5 μl 25 mM MgCl₂, je 1 μl Sense-bzw. Antisense-Primer, 1 μl 10 mM dNTP Mix, 0,5μl Taq-Polymerase und 39 μl Nuclease-freiem Wasser.

Für die Untersuchung der Genexpression von IL-1, bzw. des IL-1-Rezeptorantagonisten wurden folgende Primer verwendet: IL-1 α und - β , IL-1RI, IL-1RII, IL-1RAcP, außerdem zur Detektion des "housekeeping" Gens GAPDH (MWG, Deutschland). Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz ohne cDNA verwendet.

Gen	Primer	Sequenz	Produkt	T _A	Quelle
		-	(bp)	(°C)	
GAPDH	Sense Antisense	5′-ATG-AGT-CCT-TCC-ACG-ATA-CC-3′ 5′-CAA-ATC-CCA-TCA-CCA-TCT-TCC-3′	319		
IL-1RI	Sense Antisense	5′-TGG-TTG-CTC-AGG-GAT-GCT-GC-3′ 5′-TTG-AAA-CCC-CTC-CAG-CGG-TG-3′	619	60	2)
IL-1RII	Sense Antisense	5'-CCA-GCA-GTG-CAG-CAA-GAC-TCT-3' 5'-CCG-TCT-CTA-CGA-AGT-ACT-AAG-3'	298	57	1)
	Sense Antisense	5'-GAA-ACG-CAT-CCC-ACT-GTG-AG-3' 5'-CTT-GAC-CCC-AAT-GAT-GCT-GG-3'	427	56	2)
IL-1RAcP	Sense Antisense	5'-CAT-CGG-TCA-CTT-GGT-ATA-AG-3' 5'-AAT-AAC-CAG-TTC-CTC-TCC-TG-3'	275	55	1)
IL-1α	Sense Antisense	unbekannt	271	55	3)
IL-1β	Sense Antisense	unbekannt	587	55	3)

Tab. 3 Verwendete Primer; 1) (Pousset et al. 2001); 2) eigenes Design; 3) R&D Systems

Die Amplifizierung der cDNA erfolgte, wie die RT, in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf) mit 40 Zyklen, wobei sich dem letzten Zyklus die Termination bei 72°C für 10 min. anschließt. Dabei wurde die jeweils optimale Temperatur der Primer-

Hybridisierung (Annealing-Temperatur, T_A) ermittelt, sie variierte, je nach Primer zwischen 55 und 60 °C (siehe Tab. 2).

PCR-Programm (Mastercycler personal, Eppendorf)

Temperaturprotokoll:

Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	45 s	40.7-1-1
Primer-Hybridisierung	x °C	45 s	40 Zyklen
Elongation	72 °C	45 s	J

2.2.10.5 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Mittels quantitativer PCR (qPCR) kann man aus der Menge des amplifizierten PCR-Produkts auf die Menge des eingesetzten Templates (cDNA) schließen. So ist es möglich, die Häufigkeit zu ermitteln, mit der das zu untersuchende Gen transkribiert wird. In den Versuchen wurde die Real-Time PCR angewendet, die ein Verfahren der qPCR darstellt. Dabei können die PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung erfasst werden.

Das Prinzip besteht dabei darin, dass sich ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff (SYBER® Green) an die doppelsträngige DNA anlagert.

Der Ansatz für die PCR beinhaltete für die jeweiligen Primer eine individuelle Zusammensetzung, die mittels Primertitration optimiert wurde:

qPCR-Mastermix:

Brillant® SYBR® Green QPCR Master Mix	12,5 µl
Primer Sense	x μl
Primer Antisense	x μl
Nuklease-freies H ₂ O	10,5 μl
RT-Reaktionsmischung (cDNA)	1 μl
ergibt gesamt:	25 μl

Dafür wurden die Primer in verschiedenen Konzentrationen in einem qPCR-Lauf gegeneinander titriert und anschließend graphisch die am besten geeignete Kombination ermittelt. Gütekriterien für geeignete Primerkonzentrationen, die die Voraussetzungen für die jeweiligen Versuche optimieren, sind dabei: keine Bildung von Primerdimeren und ein

geringer Ct-Wert ("Cycle of threshold") bei hoher Effizienz der Amplifikation und geringer Primerkonzentration. Diese konnten am besten erreicht werden für IL-1RI mit einer Primer-Konzentration (Fwd:Rev) von 1:1,5; für IL-1RII mit einer Primer-Konzentration (Fwd:Rev) von 1,5:1 und für IL-1RacP von 1:1.

Je Ansatz wurden dabei Duplikate einer NTC (No Template Control) und einer Positivkontrolle (1 µl Template) zugefügt.

Es wurden folgende Primer eingesetzt: In Zusammenarbeit mit der Firma Stratagene wurden die Sequenzen für GAPDH; IL-1RI und IL-1RII festgelegt. Der Primer für Il-1RAcP entsprach dem oben aufgeführten.

Gen	Primer	Sequenz	Produkt (bp)
GAPDH	Sense Antisense	5′-GCC-TTC-CGT-GTT-CCT-ACC-3′ 5′-GCC-TGC-TTC-ACC-ACC-TTC-3′	101
IL-1RI	Sense Antisense	5′-GAA-GCT-GAC-CCA-GGA-TCA-ATG-3′ 5′-GTT-CCA-CAA-ATT-GAT-AGT-CTT-CAG-C-3′	139
IL-1RII	Sense Antisense	5′-GCA-CAT-TCA-GAA-ACG-CAT-CC-3′ 5′-AGT-AAC-CCG-GTG-GTG-GAG-AG-3′	127
IL- 1RAcP	Sense Antisense	Siehe Tab. 1	275

Tab. 4 Primer für qPCR (Fa. Stratagene mit Beacon Designer 3.0, Premier Biosoft).

Für die qPCR wurde das Programm "Comparative Quantitation (Calibrator)" (MxPro™ QPCR Software, Stratagene) verwendet. Die Durchführung erfolgte mit 40 Zyklen im Cycler Mx3000P® (Stratagene, USA), wobei die relative Quantität der in den Proben enthaltenen Gen-Transkripte im Vergleich zu dem als Calibrator definierten Ansatz (unstimulierte Zellen) bestimmt wurde. Für IL-1RI und IL-1RII betrug die Annealing-Temperatur 52°C, für IL-1RAcP 55°C.

Temperaturprotokoll:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	40.7-1-1
Primer-Hybridisierung	x °C	1 min	> 40 Zyklen
Elongation	72 °C	30 s	J

Im Anschluss an den letzten Zyklus erfolgte die Messung der Schmelzkurve: 30 s bei 95°C, 1 min. entsprechend der Annealing-Temperatur des jeweiligen Primers und nochmals 30 s bei 95°C. Zur Normalisierung der Proben wurde GAPDH als Referenzgen verwendet.

Jeder qPCR-Lauf beinhaltete eine Standardkurve, die der quantitativen Bestimmung der in den Proben gemessenen cDNA-Transkripte dient. Diese besitzt idealerweise eine 100 %ige Effizienz, was einer Verdoppelung der cDNA in jedem Zyklus entspricht. Um die ideale Primer-Verdünnung für die Standardkurve zu ermitteln, wurden für jedes Primerpaar vier vierstufige Verdünnungsreihen erstellt (1:5, 1:8, 1:10, und 1:13). Dabei ergab die ideale Verdünnung mit einer Effizienz von um 100 % für IL-1RI und IL-1RAcP 1:5 und für das Referenzgen GAPDH 1:10.

Um bei der Durchführung der Versuche die Anwesenheit von unspezifischen PCR-Produkten, die z.B. durch Kontamination mit DNA oder durch vom Template unabhängige Amplifizierungen der Primer (Primer Dimere) zustande kommen, erfassen zu können, wurden außerdem bei jeder PCR No Template Controls (NTC) durchgeführt. Eine weitere Kontrolle beinhaltete die No Reverse Transcription Control (No RT), die ebenfalls bei jeder PCR eingesetzt wurde, um möglicherweise vorhandene kontaminierende genomische DNA zu identifizieren.

Die Ansätze wurden jeweils in Tripletts pipettiert. Für die Analyse der Resultate wurde die Software MxProTM (Stratagene, USA) genutzt, mit der Softwareeinstellung "SYBER® Green (mit Schmelzkurve).

2.2.10.6 Agarosegelelektrophorese

Die Bestimmung der Größe von DNA-Fargmenten kann über die Auftrennung in einem Agarosegel erreicht werden. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente in dem Gel sowohl von ihrer Masse und Form, als auch von der Konzentration der Agarose in dem verwendeten Gel und der angelegten Spannung ab. Über den Vergleich mit

aufgetragenen DNA-Längenstandards (DNA Molecular Weight Marker) kann dann die Größe der gewünschten DNA-Fragmente bestimmt werden. Dabei erfolgt die Sichtbarmachung in dem Gel mit Ethidiumbromid, einem Farbstoff, der in DNA interkaliert und durch Wellenlängen im UV-Bereich (254-366 nm) zur Fluoreszenz angeregt wird.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten cDNA wurde nun ein 1,5 %iges Agarosegel, bestehend aus 0,45 g Agarose, 30 ml TAE-Puffer (2,0 M Tris, 5,71 % eiskalte Essigsäure, 0,05 M EDTA) und 2,5 μl Ethidiumbromid, hergestellt. Somit konnte die cDNA, mit Probenpuffer (Bio Rad) versetzt, unter 80 V Gleichspannung in TAE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt werden. Als Marker diente ein Längenstandard der Firma MBI. Die anschließende densitometrische Auswertung (Multi AnalystTM Software; BioRad, München) erfolgte nach Einscannen des Gels unter UV-Licht (BioRad Fluor S MultiImager).

2.2.11 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte in einem allgemeinen linearen Modell (GLM Procedure; SAS Software System), wobei eine Varianzanalyse (ANOVA) der logarithmierten Daten durchgeführt wurde, um statistische Unterschiede zwischen stimulierten Gruppen und Kontrollen zu ermitteln. Alle Werte wurden, sofern statistisch erfasst, als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Als statistisch signifikant wurden P-Werte < 0.05 angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Keine Detektion von IL-1α und IL-1β in NP1- und MCT-Zellen mittels RT-PCR

Zunächst sollte auf der Ebene der Genexpression mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die Frage geklärt werden, ob IL-1 α und IL-1 β von distalen (NP1) und proximalen (MCT) Tubulusepithelzellen synthetisiert werden. Als Bezugsgröße wurde dabei immer das "housekeeping" Gen GAPDH eingesetzt, von dem eine konstante Expression in allen Zellen zu erwarten ist. Pro Zelllinie wurde ein Versuchsansatz durchgeführt, so dass die statistische Auswertung entfiel. Es wurden jeweils sowohl unstimulierte Zellen, als auch mit TGF- β 1, bzw. TNF- α stimulierte Zellen untersucht.

Dafür wurden NP1- und MCT-Zellen entweder für 48 h ohne weitere Zusätze kultiviert oder mit 50 ng/ml TNF- α bzw. mit 10 ng/ml TGF- β_1 für dieselbe Zeit stimuliert. Anschließend wurde die RNA aus den Zellen mittels RNA Bee isoliert und mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben, die dann mittels PCR amplifiziert wurde. Zur Sichtbarmachung der Banden erfolgte schließlich die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht in einem Agarosegel und Auswertung unter UV-Licht.

Dabei konnte weder in unstimulierten noch in den mit TNF- α und TGF- β_1 stimulierten Zellen IL- 1α und IL- 1β nachgewiesen werden. Die erwartete Bande wäre hier bei 319 bp gewesen. Die Positivkontrolle (R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstedt) hingegen zeigte die zu erwartende Bande von 319 bp.

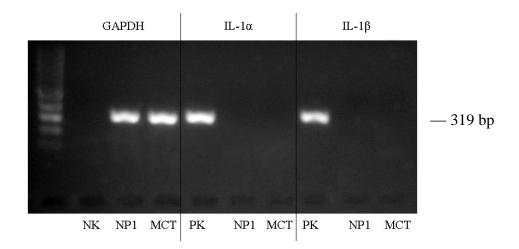


Abb. 5 Gelelektrophorese der IL-1 α und IL-1 β /GAPDH-PCR von unstimulierten NP1- und MCT-Zellen cDNA aus unstimulierten Zellen. Kein Nachweis von IL-1 α und IL-1 β in NP1- und MCT-Zellen. GAPDH als Bezugsgröße. Negativkontrolle (NK), Positivkontrolle (PK). Die Bande für GAPDH liegt bei 320 bp, die für IL-1 α und IL-1 β bei 319 bp.

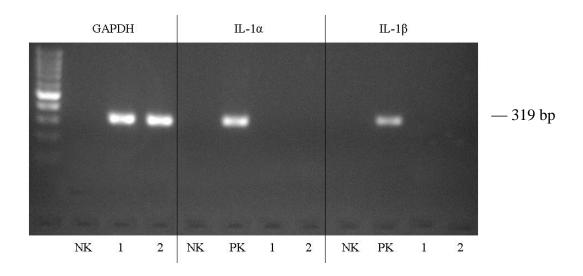


Abb. 6 Gelelektrophorese der IL-1 α und IL-1 β /GAPDH-PCR von stimulierten NP1- Zellen cDNA aus NP1-Zellen nach 48 h Stimulation mit TNF- α (1) und TGF- β_1 (2). Kein Nachweis von IL-1 α und IL-1 β . GAPDH als Bezugsgröße. Negativkontrolle (NK), Positivkontrolle (PK), die Bande für GAPDH liegt bei 320 bp, die für IL-1 α und IL-1 β bei 319 bp.

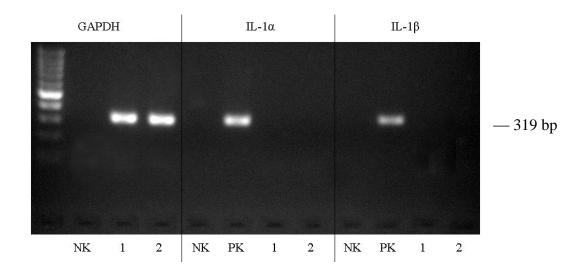


Abb. 7 Gelelektrophorese der IL-1 α und IL-1 β /GAPDH-PCR von stimulierten MCT- Zellen cDNA aus MCT-Zellen nach 48 h Stimulation mit TNF- α (1) und TGF- β_1 (2). Kein Nachweis von IL-1 α und IL-1 β . GAPDH als Bezugsgröße. Negativkontrolle (NK), Positivkontrolle (PK), die Bande für GAPDH liegt bei 320 bp, die für IL-1 α und IL-1 β bei 319 bp.

3.2 Nachweis der IL-1-Rezeptoren in NP1- und MCT-Zellen mittels RT-PCR

Die Expression der IL-1-Rezeptoren IL-1RI, IL-1RII und IL-1RAcP wurde ebenfalls mit der unter 3.1. beschriebenen Methode untersucht. Es wurde erneut RNA aus unstimulierten NP1- und MCT-Zellen gewonnen, sowie aus NP1- und MCT-Zellen, die für 48 h mit 50 ng/ml TNF- α bzw. 10 ng/ml TGF- β_1 stimuliert worden waren.

Dabei konnte der IL-1RI sowohl in unstimulierten Zellen als auch in den mit TNF- α bzw. TGF- β_1 stimulierten NP1- und MCT-Zellen mit einer Bande bei 619 bp nachgewiesen werden. Die Detektion des IL-1RII war dagegen nicht möglich. Es wurden zwei verschiedene Primerpaare versucht und die empfohlene Annealing-Tempeatur mehrfach variiert, was jedoch ebenfalls keinen Nachweis erbrachte. Der Nachweis von IL-1RAcP gelang in unstimulierten Zellen, sowie in Zellen, die mit TNF- α stimuliert worden waren, hingegen konnte dieser Rezeptor nicht in Zellen, die mit TGF- β_1 stimuliert worden waren, detektiert werden. Die zu erwartende Bande lag hier bei 275 bp.

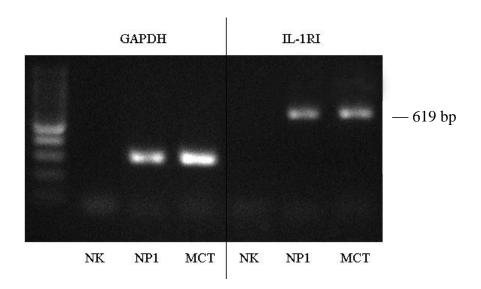


Abb. 8 Gelelektrophorese der IL-1RI/GAPDH-PCR von unstimulierten NP1- und MCT-Zellen cDNA aus unstimulierten Zellen. Nachweis des IL-1RI in NP1- und MCT-Zellen mit einer Bande bei 619 bp. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, mit einer Bande bei 320 bp. NK = Negativkontrolle.

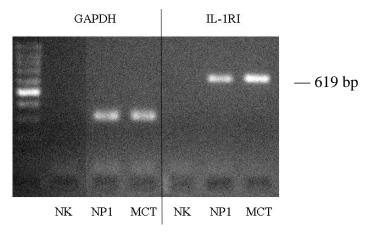


Abb. 9 Gelelektrophorese der IL-1RI/GAPDH-PCR von stimulierten NP1- und MCT-Zellen cDNA aus Zellen nach 48 h Stimulation mit TNF. Nachweis des IL-1RI in NP1- und MCT-Zellen mit einer Bande bei 619 bp. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, mit einer Bande bei 320 bp. NK = Negativkontrolle.

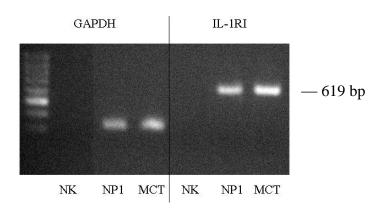


Abb. 10 Gelelektrophorese der IL-1RI/GAPDH-PCR von stimulierten NP1- und MCT-Zellen cDNA aus Zellen nach 48 h Stimulation mit TGF- β_1 . Nachweis des IL-1RI in NP1- und MCT-Zellen mit einer Bande bei 619 bp. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, mit einer Bande bei 320 bp. NK = Negativkontrolle.

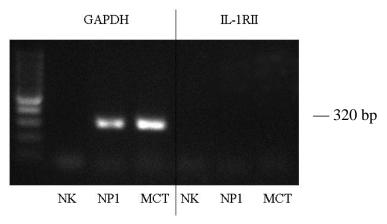


Abb. 11 Gelelektrophorese der IL-1RII/GAPDH-PCR am Beispiel von unstimulierten NP1- und MCT-Zellen Es wurde cDNA aus unstimulierten Zellen, sowie nach 48 h Stimulation mit TNF- α und TGF- β_1 eingesetzt. Der IL-1RII konnte weder in unstimulierten, noch in stimulierten NP1- und MCT-Zellen nachgewiesen werden. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, mit einer Bande bei 320 bp. NK = Negativkontrolle.

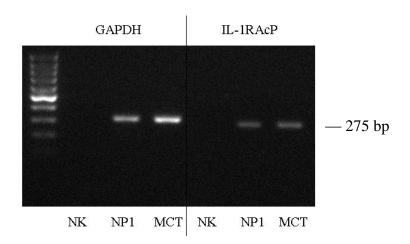


Abb. 12 Gelelektrophorese der IL-1RAcP/GAPDH-PCR von unstimulierten NP1- und MCT-Zellen cDNA aus unstimulierten Zellen. Nachweis des IL-1RAcP in NP1- und MCT-Zellen mit einer Bande bei 275 bp. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, mit einer Bande bei 320 bp. NK = Negativkontrolle.

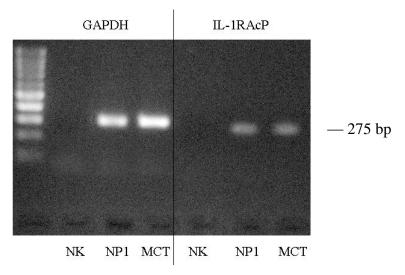


Abb. 13 Gelelektrophorese der IL-1RAcP/GAPDH-PCR von stimulierten NP1- und MCT-Zellen cDNA aus Zellen nach 48 h Stimulation mit TNF-α. Nachweis des IL-1RAcP in TNF-α stimulierten NP1- und MCT-Zellen mit einer Bande bei 275 bp. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, mit einer Bande bei 320 bp.

NK = Negativkontrolle.

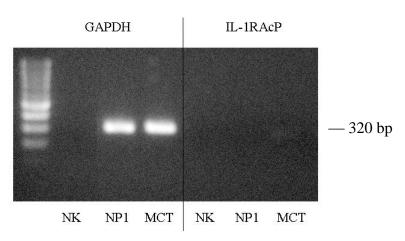


Abb. 14 Gelelektrophorese der IL-1RAcP/GAPDH-PCR von stimulierten NP1- und MCT-Zellen cDNA aus Zellen nach 48 h Stimulation mit TGF- β_1 . Fehlender Nachweis des IL-RacP in TGF- β_1 stimulierten Zellen. GAPDH wurde als Referenzgen verwendet, mit einer Bande bei 320 bp. NK = Negativkontrolle.

3.3 Effekte von TNF- α und TGF- β_1 auf die Expression von IL-1RI und IL-1RAcP

Nachdem mittels RT-PCR die Expression der IL-1-Rezeptoren IL-1RI und IL-1RAcP sowohl in NP1- als auch in MCT-Zellen nachgewiesen werden konnte, wurde nun die Methode der quantitativen Real Time-PCR (qPCR) eingesetzt, um die Einflüsse von TNF- α und TGF- β_1 auf die Synthese der IL-1-Rezeptoren genauer quantifizieren zu können. Dafür wurden NP1- und MCT-Zellen wie unter 3.1 beschrieben kultiviert, stimuliert und anschließend die RNA aus den Zellen durch Aufreinigung über Säulchen, inklusive DNase-Verdau, isoliert.

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase erfolgte daraufhin die Umschreibung der RNA in cDNA, die dann mittels PCR amplifiziert wurde.

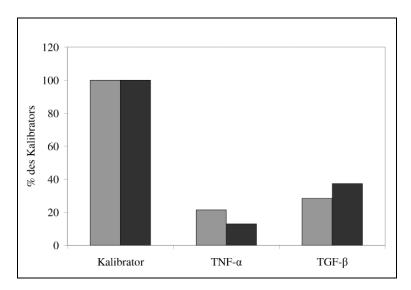
Dabei wurden die Ergebnisse der Stimulationen mit TNF- α und TGF- β_1 in Bezug auf einen Kalibrator (unstimulierte Zellen) verglichen. Als Referenzgen diente erneut GAPDH.

Für den IL-1RI zeigte sich sowohl in den NP1- als auch in den MCT-Zellen, die durch TNF- α und TGF- β_1 stimuliert worden waren, jeweils eine deutlich verminderte Synthese im Vergleich zu den entsprechenden unstimulierten Zellen. In den NP1-Zellen wurde die Synthese des IL-1RI unter Stimulation mit TNF- α auf 21,5 % reduziert und unter Stimulation mit TGF- β_1 auf 28,5 %. In den MCT-Zellen zeigte sich eine auf 13 % verminderte Synthese des IL-1RI unter Stimulation mit TNF- α und eine auf 37,4 % verminderte Synthese unter Stimulation mit TGF- β_1 .

Der Effekt von TNF- α und TGF- β_1 auf die Synthese des IL-1RAcP zeigte sich dagegen in den beiden Zellinien deutlich weniger fulminant. In den NP1-Zellen lag die Synthese des IL-

1RAcP unter Stimulation mit TNF- α bei 86,6 % im Vergleich zu den entsprechenden unstimulierten Zellen und unter Stimulation mit TGF- β_1 bei 94 %. In den MCT-Zellen ergab sich eine verminderte Synthese auf 89,6 % unter TNF- α und auf 62,2 % unter TGF- β_1 . Da die Daten jedoch nur auf jeweils einem Experiment beruhen, entzogen sie sich der statistischen Auswertung.

Bei dem Versuch den IL-1RII zu detektieren, zeigte sich ein sehr später Beginn der Amplifikation der cDNA mit Ct-Werten ("Cycle of threshold") bei ca. 37 Zyklen. Somit war die Amplifikation nach 40 Zyklen noch nicht beendet, weshalb sich das Ergebnis der statistischen Auswertung entzog.



 $\label{eq:Abb.15} \textbf{Abb. 15} \ \ \text{relative Genexpression von IL-1RI in NP1-Zellen (hellgrau) und MCT-Zellen (dunkelgrau) unter Stimulation mit TNF-α und TGF-$\beta_1$$

Als Kalibrator dienten unstimulierte NP1- bzw. MCT-Zellen. Jeder PCR-Lauf beinhaltete eine Negativ- (NTC) und No RT-Kontrolle.

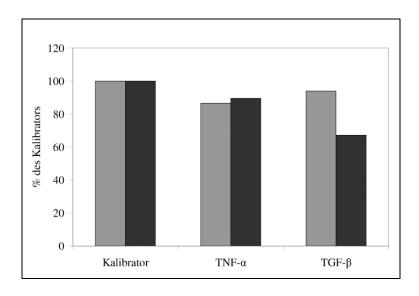


Abb. 16 relative Genexpression von IL-1RAcP in NP1-Zellen (hellgrau) und MCT-Zellen (dunkelgrau) unter Stimulation mit TNF- α und TGF- β_1

Als Kalibrator dienten unstimulierte NP1- bzw. MCT-Zellen. Jeder PCR-Lauf beinhaltete eine Negativ- (NTC) und No RT-Kontrolle.

3.4 Effekte von IL-1\alpha und IL-1\beta auf die Proliferation von distalen und proximalen Tubulsepithelzellen im Proliferationsassay

Mit Hilfe der Bromdeoyuridin- (BrdU-) Inkorporation sollten die Effekte von IL-1 α und IL-1 β auf die Proliferationsrate von NP1- und MCT-Zellen untersucht werden. Dafür wurden die NP1- und MCT-Zellen jeweils für 48 h mit IL-1 α in den Konzentrationen 1, 10 und 20 ng/ml und IL-1 β in den Konzentrationen 0,1, 1 und 5 ng/ml inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 10 % fötales Kälberserum (FCS) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente reines DMEM (low glucose).

Dabei zeigte sich in NP1-Zellen eine leicht gesteigerte Proliferationsrate unter Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 α auf 114,7 ± 3,8 % sowie unter Stimulation mit 5 ng/ml IL-1 β auf 119,1 ± 2,1 %. In MCT-Zellen wurde dagegen eine insgesamt leicht verminderte BrdU-Inkorporation sowohl unter der Stimulation mit IL-1 α als auch IL-1 β beobachtet. Da die Daten jedoch nur auf jeweils zwei unabhängigen Experimenten beruhen, entzogen sie sich der statistischen Auswertung.

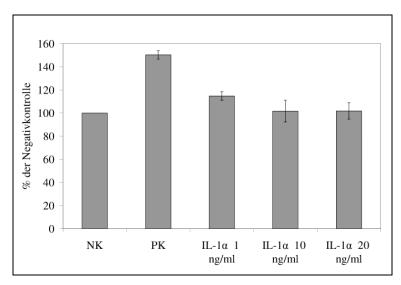


Abb. 17 Proliferationsassay von NP1-Zellen nach 48 h Stimulation mit IL- 1α Als Positivkontrolle wurde 10 % FCS eingesetzt. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle (DMEM low glucose) angegeben und zeigen den Mittelwert der relativen OD aus jeweils 6 unabhängigen Ansätzen in beiden Experimenten.

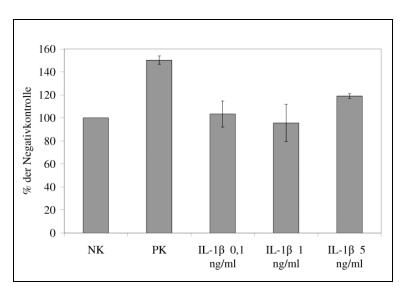


Abb. 18 Proliferationsassay von NP1-Zellen nach 48 h Stimulation mit IL-1 β Als Positivkontrolle wurde 10 % FCS eingesetzt. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle (DMEM low glucose) angegeben und zeigen den Mittelwert der relativen OD aus jeweils 6 unabhängigen Ansätzen in beiden Experimenten.

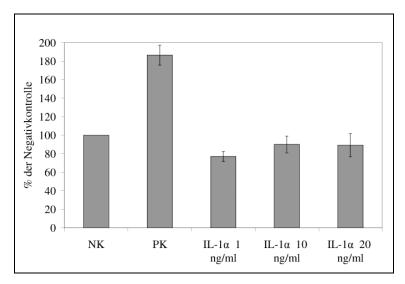


Abb. 19 Proliferationsassay von MCT-Zellen nach 48 h Stimulation mit IL-1α Als Positivkontrolle wurde 10 % FCS eingesetzt. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle (DMEM low glucose) angegeben und zeigen den Mittelwert der relativen OD aus jeweils 6 unabhängigen Ansätzen in beiden Experimenten.

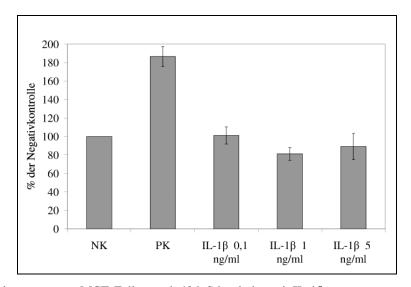


Abb. 20 Proliferationsassay von MCT-Zellen nach 48 h Stimulation mit IL-1β
Als Positivkontrolle wurde 10 % FCS eingesetzt. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle (DMEM low glucose) angegeben und zeigen den Mittelwert der relativen OD aus jeweils 6 unabhängigen Ansätzen in beiden Experimenten.

3.5 Effekte des IL-1Ra auf die Proliferation von NP1- und MCT-Zellen

In einem zweiten Versuchsansatz sollte nun untersucht werden, ob sich ein Effekt des IL-1Ra auf die Proliferationsrate von NP1- und MCT-Zellen nachweisen lässt. Dazu wurde IL-1 α mit einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt und IL-1 β in einer Konzentration von 5 ng/ml

und jeweils IL-1Ra in den Konzentrationen 3, 30 und 300 ng/ml hinzugefügt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich ein Versuchsansatz mit IL-1Ra allein ohne Zugabe von IL-1 α oder IL-1 β durchgeführt.

Unter alleiniger Stimulation mit IL-1 α oder IL-1 β konnte hierbei für die NP1-Zellen kein Effekt auf die BrdU-Inkorporation nachgewiesen werden. Es zeigte sich dagegen ein leicht proliferativer Effekt unter der Stimulation mit 20 ng/ml IL-1 α + 300 ng/ml IL-1Ra und 5 ng/ml IL-1 β + 30 ng/ml IL-1Ra, sowie unter der alleinigen Stimulation mit 300 ng/ml IL-1Ra, jedoch jeweils ohne statistische Signifikanz.

Für die MCT-Zellen wurden die bereits in den Versuchen zuvor ermittelten Ergebnisse für die Stimulation mit IL-1 α und IL-1 β nochmals bestätigt und zeigten jeweils eine leicht verminderte BrdU-Inkorporation, die unter Stimulation mit IL-1 α keine statistische Signifikanz erreichte, sich jedoch unter Stimulation mit IL-1 β auf 82,4 % \pm 12 % als signifikant erwies. Bei Zugabe des IL-1Ra zeigte sich unter der Stimulation mit IL-1 α + 3 ng/ml IL-1Ra auf 84 % \pm 10,4 % ebenfalls ein antiproliferativer Effekt, der statistische Signifikanz erreichte, sowie unter Stimulation mit IL-1 β + 3 ng/ml IL-1Ra und 3 ng/ml IL-1Ra allein, jedoch ohne statistische Signifikanz.

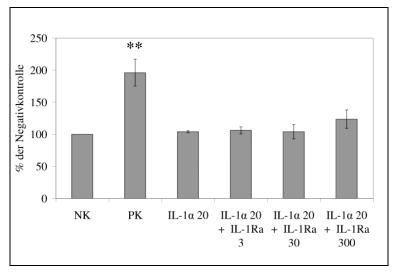


Abb. 21 Proliferationsassay von NP1-Zellen zur Untersuchung der Wirkung des IL-1Ra Es erfolgte eine Stimulation für 48 h mit IL-1α + IL-1Ra. Als Positivkontrolle diente 10 % FCS. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 6-fachen Ansätzen durchgeführt wurden. Alle Dosierungsangaben sind in der Einheit ng/ml eingesetzt worden.

^{* * =} p < 0,01; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

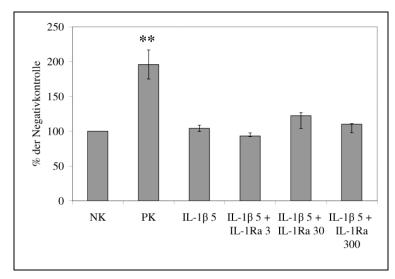


Abb. 22 Proliferationsassay von NP1-Zellen zur Untersuchung der Wirkung des IL-1Ra Es erfolgte eine Stimulation für 48 h mit IL-1 β + IL-1Ra. Als Positivkontrolle diente 10 % FCS. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 6-fachen Ansätzen durchgeführt wurden. Alle Dosierungsangaben sind in der Einheit ng/ml eingesetzt worden.

* * = p < 0.01; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

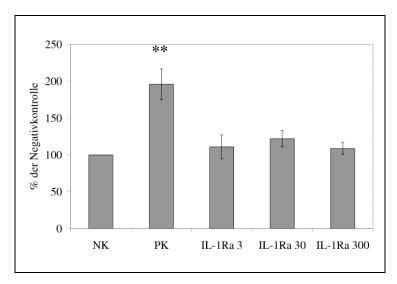


Abb. 23 Proliferationsassay von NP1-Zellen zur Untersuchung der Wirkung des IL-1Ra
Es erfolgte eine Stimulation für 48 h mit IL-1Ra alleine. Als Positivkontrolle diente 10 % FCS. Die dargestellten
Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert von 3 unabhängigen
Experimenten, die jeweils in 6-fachen Ansätzen durchgeführt wurden. Alle Dosierungsangaben sind in der
Einheit ng/ml eingesetzt worden.

^{* * =} p < 0,01; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

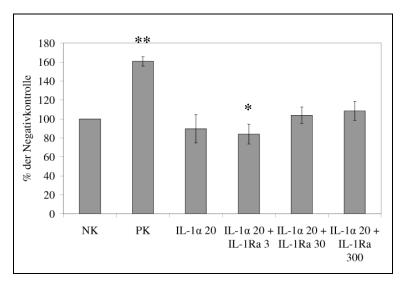


Abb. 24 Proliferationsassay von MCT-Zellen zur Untersuchung der Wirkung des IL-1Ra Es erfolgte eine Stimulation für 48 h mit IL-1α + IL-1Ra. Als Positivkontrolle diente 10 % FCS. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 6-fachen Ansätzen durchgeführt wurden. Alle Dosierungsangaben sind in der Einheit ng/ml eingesetzt worden.

* * = p < 0.001; * = p < 0.05; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

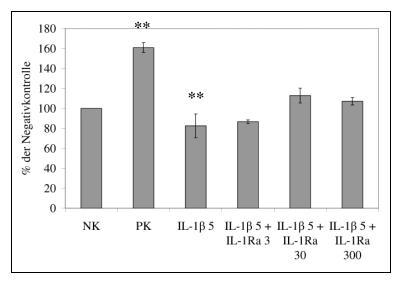


Abb. 25 Proliferationsassay von MCT-Zellen zur Untersuchung der Wirkung des IL-1Ra Es erfolgte eine Stimulation für 48 h mit IL-1 β + IL-1Ra. Als Positivkontrolle diente 10 % FCS. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 6-fachen Ansätzen durchgeführt wurden. Alle Dosierungsangaben sind in der Einheit ng/ml eingesetzt worden.

^{* * =} p < 0,001; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

Ergebnisse 51

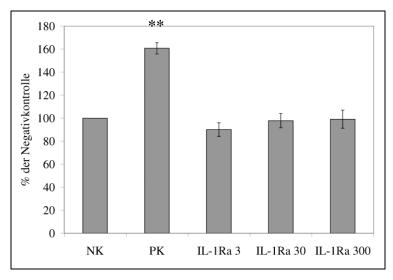


Abb. 26 Proliferationsassay von MCT-Zellen zur Untersuchung der Wirkung des IL-1Ra

Es erfolgte eine Stimulation für 48 h mit IL-1Ra. Als Positivkontrolle diente 10 % FCS. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 6-fachen Ansätzen durchgeführt wurden. Alle Dosierungsangaben sind in der Einheit ng/ml eingesetzt worden.

* * = p < 0.001; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

3.6 Zellzählung

Die Zellzählung wurde durchgeführt, um die Ergebnisse des Proliferationsassays mittels BrdU-Inkorporation zu verifizieren und auszuschließen, dass die beobachteten Effekte nur auf einer veränderten DNA-Synthese beruhen. Die Versuchsansätze entsprechen denen der Proliferationsstudien mittels BrdU-Inkorporation von NP1- und MCT-Zellen mit IL-1α und IL-1β (siehe 3.5). Dabei wurden die Ergebnisse der Proliferationsassays weitgehend bestätigt. Bei den NP1-Zellen zeigten sich signifikante Proliferationssteigerungen für die Stimulation mit 1 ng/ml IL-1α auf 112 % und für die Stimulation mit 10 ng/ml IL-1α auf 126,9 %. Abweichend hiervon war lediglich für die Stimulation mit 5 ng/ml IL-1β ein antiproliferativer Effekt zu beobachten.

Bei den MCT-Zellen wurde erneut weitgehend ein antiproliferativer Effekt beobachtet, der für die Stimulationsansätze mit 20 ng/ml IL-1α sowie 0,1, 1 und 5 ng/ml IL-1β statistische Signifikanz erreichte. Abweichend hiervon zeigte sich für die Stimulation mit 1 und 10 ng/ml IL-1α ein leicht proliferativer Effekt, jedoch ohne statistische Signifikanz.

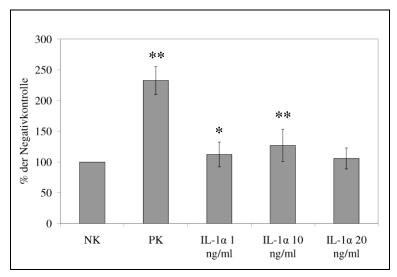


Abb. 27 Zellzählung von distalen Tubulusepithelzellen (NP1) nach 48 h Stimulation mit IL-1 α Als Positivkontrolle wurde 10 % FCS eingesetzt. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle (DMEM + 1 % FCS) angegeben und zeigen den Mittelwert von 4 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 3-fachen Ansätzen durchgeführt wurden.

* * = p <0.01; * = p < 0.05; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

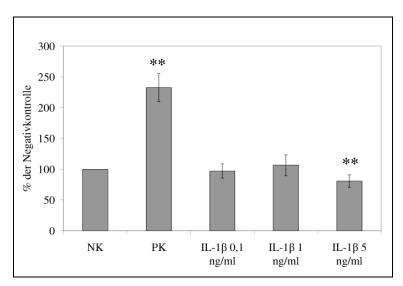


Abb. 28 Zellzählung von distalen Tubulusepithelzellen (NP1) nach 48 h Stimulation mit IL-1 β Als Positivkontrolle wurde 10 % FCS eingesetzt. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle (DMEM + 1 % FCS) angegeben und zeigen den Mittelwert von 4 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 3-fachen Ansätzen durchgeführt wurden.

^{* * =} p <0.01; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

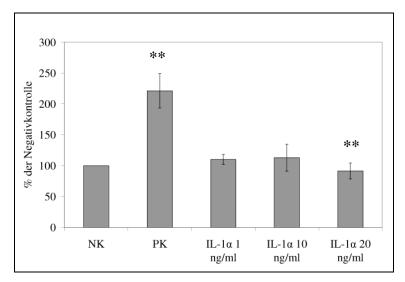


Abb. 29 Zellzählung von proximalen Tubulusepithelzellen (MCT) nach 48 h Stimulation mit IL- 1α Als Positivkontrolle wurde 10 % FCS eingesetzt. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle (DMEM + 10 % FCS) angegeben und zeigen den Mittelwert von 4 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 3-fachen Ansätzen durchgeführt wurden.

* * = p <0.01; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

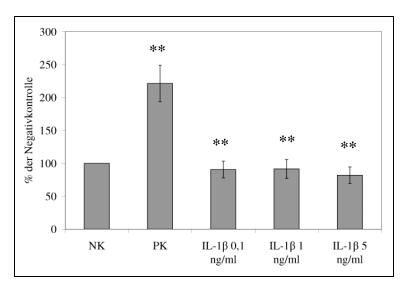


Abb. 30 Zellzählung von proximalen Tubulusepithelzellen (MCT) nach 48 h Stimulation mit IL-1 β Als Positivkontrolle wurde 10 % FCS eingesetzt. Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle (DMEM + 10 % FCS) angegeben und zeigen den Mittelwert von 4 unabhängigen Experimenten, die jeweils in 3-fachen Ansätzen durchgeführt wurden.

^{* * =} p <0.01; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

3.7 Westernblot-Analysen zum Fibronektinnachweis in NP1und MCT-Zellen

Bei der EMT kommt es zu einer verminderten Expression epithelialer Marker zu Gunsten einer gesteigerten Expression mesenchymaler Marker. Um die effektive Synthese der extrazellulären Matrixproteine zu ermitteln, wurde unter Stimulation mit IL-1α und IL-1β, bzw. deren Rezeptorantagonist IL-1Ra stellvertretend Fibronektin als mesenchymales Markerprotein mittels Immunoblotverfahren untersucht, um einen Hinweis auf eine mögliche EMT zu bekommen.

Dafür wurden NP1- und MCT-Zellen jeweils 48 h mit 10 ng/ml IL-1 α und 1 ng/ml IL-1 β stimuliert, sowie unter Zugabe von 30 ng/ml IL-1Ra. Zur Kontrolle wurde IL-1Ra in jedem Versuchsansatz zusätzlich alleine eingesetzt. Als Positivkontrolle diente TGF- β 1 in der Konzentration 10 ng/ml. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand einer Standardkurve quantitativ gemessen. Als Standardprotein wurde β -Aktin eingesetzt.

Dabei zeigte sich weder für die NP1-Zellen, noch für die MCT-Zellen eine signifikante Änderung der Fibronektinsynthese im Vergleich zur Negativkontrolle mit reinem DMEM (low glucose). In der Positivkontrolle mit TGF- β_1 zeigte sich dagegen ein erwartet positiver Effekt auf die Fibronektinsynthese, der bei den NP1-Zellen jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

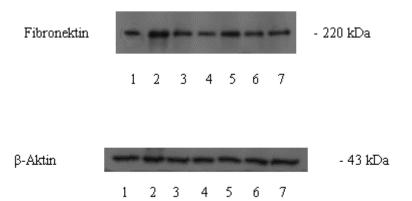


Abb. 31 Westernblot von Fibronektin bei distalen Tubulusepithelzellen (NP1) nach 48 h Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra

- 1) Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose)
- 2) Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF- β_1)
- 3) IL-1α 10 ng/ml
- 4) IL-1 α 10 ng/ml + IL-1Ra 30 ng/ml
- 5) IL-1β 1 ng/ml
- 6) IL-1 β 1 ng/ml + IL-1Ra 30 ng/ml
- 7) IL-1Ra 30 ng/ml

β-Aktin als Standardprotein zeigt eine gleichbleibende Synthese.

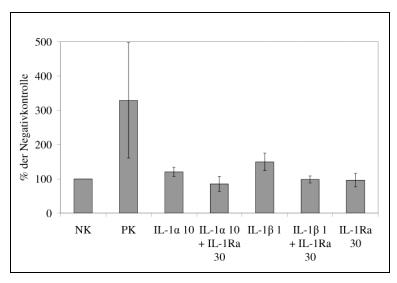


Abb. 32 Westernblot-Analyse von Fibronektin bei NP1-Zellen nach 48 h Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra

Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose); Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF- β_1). β -Aktin als Standardprotein mit gleich bleibender Synthese in allen Stimulationsansätzen.

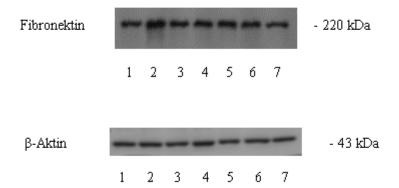


Abb. 33 Westernblot von Fibronektin bei proximalen Tubulusepithelzellen (MCT) nach 48 h Stimulation mit IL- 1α , IL- 1β und IL-1Ra

- 1) Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose)
- 2) Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF-β₁)
- 3) IL-1 α 10 ng/ml
- 4) IL-1 α 10 ng/ml + IL-1Ra 30 ng/ml
- 5) IL-1 β 1 ng/ml
- 6) IL-1 β 1 ng/ml + IL-1Ra 30 ng/ml
- 7) IL-1Ra 30 ng/ml

 $\beta\text{-}Aktin$ als Standardprotein zeigt eine gleichbleibende Synthese.

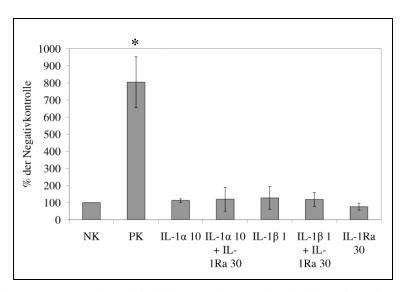


Abb. 34 Westernblot-Analyse von Fibronektin bei MCT-Zellen nach 48 h Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra

Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose); Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF- β_1) β -Aktin als Standardprotein mit gleich bleibender Synthese in allen Stimulationsansätzen

* = p< 0.05; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle

Ergebnisse 57

3.8 Matrixsynthese unter Stimulation mit IL-1α, IL-1β und IL-1Ra mittels ELISA

Bei der renalen Fibrogenese ist ein wichtiger pathophysiologischer Vorgang die Vermehrung der extrazellulären Matrix. Zur Untersuchung der Frage, inwieweit IL- 1α und IL- 1β , bzw IL-1Ra die Synthese extrazellulärer Matrixproteine bei distalen und proximalen Tubulusepithelzellen beeinflusst, wurde stellvertretend Fibronektin in Zellkulturüberständen von stimulierten NP1- und MCT-Zellen mittels ELISA bestimmt.

Die Stimulationsänsätze entsprachen denen für die Westernblot-Analysen (siehe 3.7), es wurde ebenfalls für 48 h stimuliert. Als Positivkontrolle diente TGF- β_1 , die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Standardkurve quantitativ gemessen.

Unter diesen Bedingungen zeigten sich insgesamt sowohl für NP1-Zellen als auch für MCT-Zellen keine signifikanten Effekte auf die Fibronektinsynthese im Vergleich zur Negativ-kontrolle mit DMEM (low glucose). Unter Stimulation mit TGF- β_1 konnte dagegen für beide Zellinien der erwartete positive Effekt nachgewiesen werden, der für die MCT-Zellen mit 303,3 % \pm 40,9 % statistische Signifikanz erreichte, nicht jedoch für die NP1-Zellen.

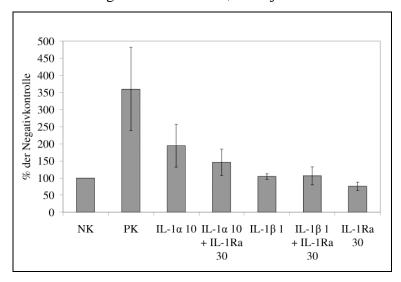


Abb. 35 Fibronektin ELISA von NP1-Zellen nach 48 h Stimulation mit IL-1α, IL-1β und IL-1Ra Die Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben. Die Daten beruhen auf jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose); Positivkontrolle (PK) (TGF-β₁)

Ergebnisse 58

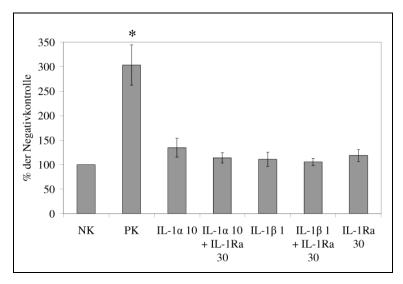


Abb. 36 Fibronektin ELISA von MCT-Zellen nach 48 h Stimulation mit IL- 1α , IL- 1β und IL-1Ra Die Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben. Die Daten beruhen auf jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose); Positivkontrolle (PK) (TGF-β₁)

3.9 Matrixdegradation unter Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra mittels Gel-Zymographie

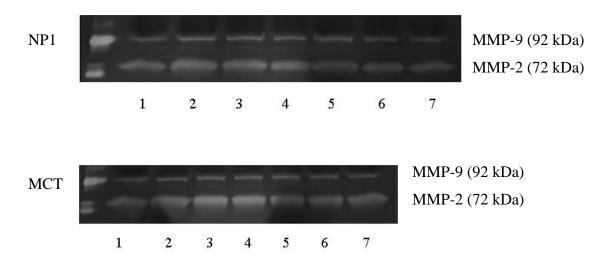
Mit Hilfe der Gel-Zymographie sollte an Zellkulturüberständen von NP1- und MCT-Zellen der Einfluss von IL- 1α und IL- 1β , bzw. IL-1Ra auf die Expression der matrixdegradierenden Enzyme MMP-2 und MMP-9 untersucht werden. Diese Enzyme sind Matrix-metalloproteinasen, die bei der renalen Fibrogenese eine wichtige Rolle spielen.

Dafür wurden die Zellen ebenfalls wie unter 3.7 (Westernblot) beschrieben für 48 h stimuliert und anschließend die Überstände gewonnen. Als Positivkontrolle wurde wiederum 10 ng/ml TGF-β₁ eingesetzt, als Negativkontrolle diente DMEM low glucose.

Die ermittelten Daten wurden densitometrisch ausgemessen und bezogen auf die Negativkontrolle in Prozent dargestellt.

Für beide Enzyme gelang in allen Versuchsansätzen der Nachweis aus den Zellkulturüberständen von NP1- und MCT-Zellen.

^{* =} p< 0.05; Werte statistisch signifikant vs Negativkontrolle



 $\label{eq:Abb.37} \textbf{Abb.37} \ \mbox{Gel-Zymographie von distalen Tubulusepithelzellen (NP1) und proximalen Tubulusepithelzellen (MCT) unter Stimulation mit IL-1α , IL-1β und IL-1$Ra$$

- 1) Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose)
- 2) Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF-β₁)
- 3) IL-1 α 10 ng/ml
- 4) IL-1 α 10 ng/ml + IL-1Ra 30 ng/ml
- 5) IL-1β 1 ng/ml
- 6) IL-1 β 1 ng/ml + IL-1Ra 30 ng/ml
- 7) IL-1Ra 30 ng/ml

MMP-9

Für MMP-9 zeigte sich insgesamt eine gesteigerte Expression im Vergleich zur Negativkontrolle in beiden Zellinien. Die dargestellten Werte der verschiedenen Stimulationen ergaben jedoch keine statistische Signifikanz. Dabei erfolgte die statistische Auswertung anhand von Ergebnissen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

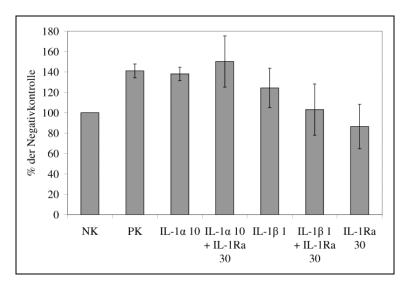


Abb. 38 Expression des matrixdegradierenden Enzyms MMP-9 in distalen Tubulusepithelzellen (NP1) nach 48 h Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra

Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose); Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF- β_1). Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten. Alle Dosierungsangaben beziehen sich auf die Einheit ng/ml.

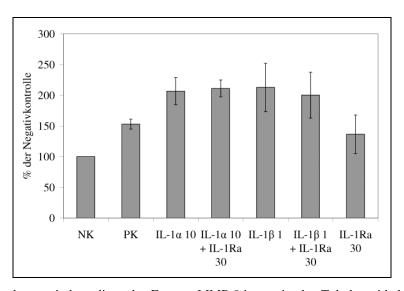


Abb. 39 Expression des matrixdegradierenden Enzyms MMP-9 in proximalen Tubulusepithelzellen (MCT) nach 48 h Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra

Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose); Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF- β_1). Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben. Alle Dosierungsangaben beziehen sich auf die Einheit ng/ml.

MMP-2

Für MMP-2 ergab sich sowohl für NP1-Zellen (auf 161 % bis 232 %) als auch für MCT-Zellen (auf 199 % bis 249 %) in allen Stimulationen eine gesteigerte Expression im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Daten entzogen sich jedoch der statistischen Auswertung, da sie jeweils nur auf einem Experiment beruhten.

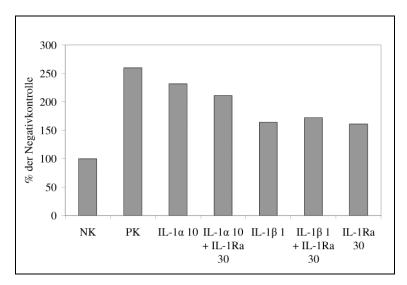
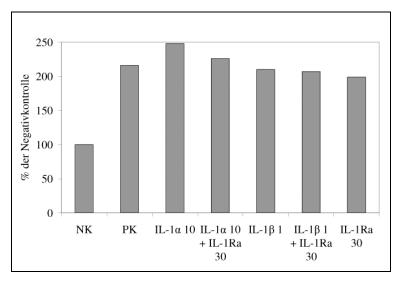


Abb. 40 Expression des matrixdegradierenden Enzyms MMP-2 in distalen Tubulusepithelzellen (NP1) nach 48 h Stimulation mit IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra

Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose); Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF- β_1). Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben. Alle Dosierungsangaben beziehen sich auf die Einheit ng/ml.



 $\label{eq:matrix-degradier} \textbf{Abb. 41} \ \text{Expression des matrix-degradierenden Enzyms MMP-2 in proximalen Tubulusepithelzellen (MCT) nach 48 h Stimulation mit IL-1α, IL-1β und IL-1Ra

Negativkontrolle (NK) (DMEM low glucose); Positivkontrolle (PK) (10 ng/ml TGF- β_1). Die dargestellten Werte sind als Prozent der Negativkontrolle angegeben und zeigen den Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten. Alle Dosierungsangaben beziehen sich auf die Einheit ng/ml.

4 DISKUSSION

Eigenschaften aufweist.

Bei der chronischen Niereninsuffizienz handelt es sich um eine Erkrankung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass ab einem bestimmten Zeitpunkt der Prozess bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz, unabhängig von der Grunderkrankung, als ein relativ uniformes Geschehen voranschreitet. Dabei kommt es zu einer zunehmenden Fibrosierung des Organs, was dessen Funktionsverlust zur Folge hat. Diese gemeinsame Endstrecke der renalen Fibrogenese kann als ein fehlregulierter Reparationsmechanismus angesehen werden, der selbsterhaltend und irreversibel fortschreitet. Die direkte therapeutische Beeinflussung dieses Prozesses ist bisher nur in sehr geringem Maße möglich. So stehen zum einen präventive Maßnahmen im Vordergrund, wie die Behandlung der arteriellen Hypertonie, die eine wichtige pathogenetische Rolle vor allem bei der diabetischen Nephropathie spielt. Im Hinblick auf kausale Behandlungsmöglichkeiten geht es zunächst um die Frage, ob fibrotische Veränderungen überhaupt potentiell reversibel sind. Dies konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden. So sind klinisch bedeutsame Medikamente wie ACE-Hemmer und Angiotensin-1 (AT1-) Rezeptorantagonisten im Einsatz, für die ein günstiger Einfluss auf die tubulointerstitielle Fibrose nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus gibt es weitere Ansätze mit dem Ziel, eine Progressionsminderung zu erreichen, wie die Gabe von BNP-7, wofür ebenfalls eine Regression fibrotischer Veränderungen nachgewiesen werden konnte. Insgesamt besteht jedoch nach wie vor ein starkes Ungleichgewicht zwischen Behandlungsbedarf einerseits und den Behandlungsmöglichkeiten der renalen Fibrose andererseits, sodass

der Erforschung neuer Therapieoptionen eine große Bedeutung zukommt. Ziel dieser Arbeit war es daher, zu untersuchen, inwieweit der IL-1Ra (Anakinra), welches bereits bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eingesetzt wird, *in vitro* antifibrotische

4.1 Keine Expression von IL-1 α und IL-1 β in NP 1- und MCT-Zellen

Zunächst ging es um die Frage, ob IL- 1α und IL- 1β direkt in NP1- und MCT-Zellen synthetisiert werden. Mit Hilfe der PCR konnte die mRNA beider Zytokine weder in unstimulierten Zellen, noch in Zellen, die über 48 Stunden mit TNF- α bzw. TGF- β_1 , stimuliert worden waren nachgewiesen werden. In der Positivkontrolle wurden IL- 1α und IL- 1β hingegen detektiert, was die Funktionstüchtigkeit der Primer selbst beweist. Dies spricht gegen eine endogene Synthese von IL- 1α und IL- 1β in NP 1- und MCT-Zellen. Zwar wird

zum Teil eine erhöhte mRNA Expression in Tubulusepithelzellen geschädigter Nieren beschrieben (Noronha et al. 1993; Waldherr et al. 1993), Jedoch scheint die IL-1-Expression immunkompetenter Zellen wie Macrophagen, T- und B-Zellen, die eine parakrine Stimulation von Tubulusepithelzellen, vermittelt über entsprechende Rezeptoren an der Zelloberfläche, hervorruft, eine bedeutendere Rolle zu spielen (Granfeldt et al. 2008).

4.2 Einfluss von TNF- α und TGF- β_1 auf die Synthese der IL-1-Rezeptoren

Bei den Untersuchungen der Effekte von IL-1 und des IL-1Ra in Tubulusepithelzellen spielt die Expression der IL-1-Rezeptoren eine bedeutende Rolle, da diese die Effekte der Zytokine und entsprechenden Antagonisten an der Zielzelle vermitteln. Dabei gibt es verschiedene IL-1-Rezeptoren, die, entsprechend ihrem jeweiligen Expressionsmuster, zum Teil gegensätzliche Effekte vermitteln. Der IL-1RI übermittelt als Agonist das IL-1-Signal ins Zellinnere. Seine Bindungsaffinität an IL-1 kann dabei gesteigert werden, indem ein zweiter Rezeptor, das IL-1RAcP an den IL-1/IL-1RI-Komplex binden kann, ein eigenständiges Signal vermag dieser Rezeptor dagegen nicht zu übermitteln. Der IL-1RII fungiert als natürlicher Antagonist, indem er IL-1 bindet ohne ein intrinsisches Signal zu vermitteln.

In dieser Arbeit sollten die Effekte von TNF-α und TGF-β₁ auf die Expression der IL-1-Rezeptoren in Tubulusepithelzellen mittels PCR untersucht werden. TGF-β₁ wird als ein bedeutendes profibrogenes Zytokin angesehen, welches in der Pathogenese der renalen Fibrose eine zentrale Rolle spielt, indem es die ECM-Synthese steigert, die Aktivierung renaler Fibroblasten zu Myofibroblasten fördert und die Matrixdegradation inhibiert. TNF-α zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen, mit ebenfalls profibrogenen Eigenschaften. Es kann mitogen und chemotaktisch auf Fibroblasten wirken und spielt eine Rolle bei der akuten glomerulären Schädigung. Es ist jedoch auch in der Lage, die Kollagenase-Aktivität zu steigern und die Kollagenexpression zu hemmen, sodass ihm auch antifibrotische Eigenschaften zukommen (Eddy 2000). Mittels PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese gelang es in der vorliegenden Arbeit die Expression von IL-1RI und IL-1RAcP sowohl in unstimulierten Zellen, als auch in Zellen, die mit TNF-α und TGF-β₁ stimuliert worden waren, nachzuweisen. Aufgrund der Vermutung, dass die Stimulation mit TNF-α und TGF-β₁ einen Einfluss auf die Rezeptorexpression haben könnte, wurde zur genaueren Analyse und quantitativen Darstellung die Methode der quantitativen Real-Time PCR (qPCR) angewandt, da die Effekte beider Zytokine bei der PCR und Gelelektrophorese nicht auszumachen waren. Dabei zeigte sich in beiden Zellinien eine deutlich verminderte

Expression des IL-1RI im Vergleich zu den entsprechenden unstimulierten Zellen. Auch das IL-1RAcP wurde vermindert exprimiert, wobei dieser Effekt geringer ausgeprägt war. Der IL-1RII, der mittels PCR und Agarosegelelektrophorese nicht nachgewiesen werden konnte, ließ sich in der qPCR zwar detektieren, jedoch war, aufgrund eines sehr späten Ct-Wertes von 37 Zyklen, die Amplifikation nach 40 Zyklen PCR-Lauf noch nicht abgeschlossen, so dass sich das Ergebnis der Auswertung entzog. Eine Erklärung für den späten Ct-Wert, der die Zyklenzahl angibt, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Rezeptor-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird, könnte einerseits eine sehr geringe Expression des IL-1RII sein, aber auch eine geringe Priming Effizienz könnte durch eine niedrige Amplifikationseffizienz deutlich werden. Eine Möglichkeit die Amplifikation abzuschließen wäre die Erhöhung der Anzahl der Zyklen auf z.B. 50. Dies ist jedoch problematisch, da die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Amplifikationen in diesem Bereich sehr groß ist.

Dass die Wirkung von IL-1 von der Anzahl der entsprechenden Rezeptoren abhängt, wurde bereits beschrieben (Curtis et al. 1989). Die durch TNF- α und TGF- β_1 beobachtete Verminderung der Expression von IL-1RI und IL-1RAcP könnte somit auf eine geringere Ansprechbarkeit der Zellen auf IL-1 hindeuten. Diese Beobachtungen erscheinen zunächst widersprüchlich zu dem Bild der renalen Fibrogenese, erwartet man doch eine durch TNF- α und TGF- β_1 vermittelte Expressionssteigerung der Rezeptoren, und damit erhöhte Ansprechbarkeit der Zellen auf IL-1. Tatsächlich wird auch von Dubois et al. eine TGF- β_1 induzierte Inhibition der IL-1-Rezeptoren bei lymphoiden und hämatopoetischen Vorläuferzellen beschrieben (Dubois et al. 1990).

Die Tatsache, dass TGF- β_1 einerseits die IL-1-Expression und -Sekretion in unterschiedlichen Zellen zu stimulieren vermag (Wahl et al. 1987; Chantry et al. 1989; McCartney-Francis et al. 1990) und andererseits die biologische Aktivität von IL-1 inhibiert, indem es zu einer Down-Regulation von IL-1-Rezeptoren und zu einer Aktivierung des IL-1-Rezeptorantagonisten führt (Dubois et al. 1990; Turner et al. 1991; Wahl et al. 1993b), könnte auf einen natürlichen Regulationsmechanismus zwischen IL-1, TGF- β_1 und der Rezeptorexpression hindeuten, in dem TGF- β_1 eine doppelte Rolle spielt. Andererseits könnten auch hier die unterschiedlichen Zelltypen eine wichtige Rolle spielen.

Für die Versuche der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten qPCR wurden die verwendeten Primer in Zusammenarbeit mit der Firma Stratagene (La Jolla, USA) neu designed, da bestimmte Primer-Eigenschaften, die für die qPCR von Bedeutung sind, den zuvor verwendeten Primern zum Teil fehlten. Als Referenzgen wurde in allen Versuchen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Der Anspruch an ein

Referenzgen besteht dabei in einer konstanten Expression in allen Versuchsansätzen, unabhängig der verwendeten Stimulationsmedien. GAPDH wird in der Literatur kontrovers diskutiert, indem eine Regulierung des Referenzgens unter anderem in Modellen mit T-Helferzellen (Hamalainen et al. 2001) und wachsenden Kollateralarterien (Deindl et al. 2002) beschrieben ist. In Adipozyten (Gorzelniak et al. 2001) und CD34+CD38- Stammzellen (Raaijmakers et al. 2002) wurde dagegen keine Regulierbarkeit von GAPDH beobachtet. Da in den vorliegenden PCR-Analysen ebenfalls keine Regulation von GAPDH nachgewiesen werden konnte, konnte es als Referenzgen verwendet werden.

4.3 Einfluss von IL-1 und IL-1Ra auf die Proliferation von proximalen und distalen Tubulusepithelzellen

In der Pathophysiologie der chronisch progredienten Niereninsuffizienz spielt die tubulointerstitielle Fibrose mit den daraus resultierenden strukturellen Veränderungen der Niere eine zentrale Rolle. Die Hauptmediatoren stellen dabei die sogenannten Myofibroblasten dar. Das sind α-SMA-positive Zellen, die sich aus interstitiellen Fibroblasten und Tubulusepithelzellen entwickeln. Durch profibrogene Zytokine aktiviert, sind sie hauptverantwortlich für eine gesteigerte Extrazellulärmatrixsynthese (Strutz 2009). Dabei werden die profibrogenen Zytokine von mononukleären Zellen, vor allem Makrophagen und T-Lymphozyten, sezerniert (Muller et al. 1992), wobei der Grad der interstitiellen Infiltration mit der Nierenfunktion korreliert. Es kommt zur Proliferation interstitieller Zellen, einer gesteigerten Matrixsynthese und verminderten Matrixdegradation mit einer daraus resultierenden Fibrosierung des Organs. Um diese Kaskade zu unterbrechen, ist es wichtig, die beteiligten profibrogenen Zytokine zu identifizieren, um diese, im Idealfall, gezielt auszuschalten. Ein Hauptmediator der beschriebenen EMT ist TGF-β₁ (Okada et al. 1997). Aber auch IL-1, als ein proinflammatorisches Zytokin, hat Auswirkungen auf eine große Anzahl lokaler und systemischer Vorgänge. Es wurde ursprünglich als Leukozyten-aktivierender Faktor bezeichnet (March et al. 1985) und wird von verschiedenen Zellen sezerniert, wobei Makrophagen die renale Hauptquelle von IL-1 im entzündlichen Nierengewebe darstellen (Nikolic-Paterson et al. 1996b) und somit als Prädiktoren der interstitiellen Nierenfibrose eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen (Nikolic-Paterson et al. 1994). Ein Zusammenhang zwischen dem von Makrophagen und Monozyten bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen vermehrt ausgeschütteten IL-1 und des renalen Fibrosierungsprozesses wurde schon früh vermutet (Schmidt et al. 1982). Auch wurde die Bedeutung des Zytokins bei renalen Erkrankungen deutlich, indem eine gesteigerte Expression von IL-1 bei verschiedenen

Nierenerkrankungen, wie der IgA-Nephropathie (Shu et al. 2000), der vaskulären Nephropathie (Rastaldi et al. 1996) und der Transplantatnephropathie (Teppo et al. 1998) nachgewiesen werden konnte. In anderen Studien wurde auch eine autokrine proliferative Wirkung von IL-1, zum einen auf Mesangiumzellen (Lovett et al. 1986) oder auf glomeruläre Epithelzellen (Tateyama et al. 2001) beschrieben. Wobei diese autokrine Proliferation der von der interstitiellen Entzündung unabhängigen und damit autonomen Phase der renalen Fibrogenese entspricht und damit von großer Bedeutung ist.

In Untersuchungen an proximalen Tubulusepithelzellen wurden profibrogene und antiproliferative Effekte von IL-1 β , zum Teil vermittelt durch TGF- β_1 , beobachtet, in Form von gesteigerter Expression von α -SMA, Sekretion von Fibronektin und verminderter DNA-Synthese (Vesey et al. 2002b), was für eine wichtige Rolle von IL-1 in der Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz spricht. So wurde ein direkter Einfluss von IL-1 auf die Schwere des Nierenschadens in einem Modell einer anti-glomeruläre Basalmembran (GBM) Antikörper vermittelten Nephritis in Ratten beschrieben (Tomosugi et al. 1989), während die parenterale Gabe des IL-1Ra die Schwere des Nierenschadens reduziert (Nikolic-Paterson et al. 1996a).

Auch wurde die Bedeutung von IL-1β für die Pathogenese der tubulointerstitiellen Fibrose unterstrichen durch die positive Wirkung des IL-1Ra in einem Modell der rapid progressiven Glomerulonephritis bei Ratten. In verschiedenen anderen Studien wurde die Bedeutung des IL-1Ra ebenfalls verdeutlicht, indem die Effekte von IL-1 ganz oder teilweise antagonisiert werden konnten. So konnte in einem anderen Modell der rapid progressiven Glomerulonephritis die Monozytenakkumulation durch IL-1Ra vollständig supprimiert werden (Lan et al. 1993), oder die chronisch progrediente Variante der unilateralen Obstruktion (UUO) durch IL-1Ra positiv beeinflusst werden (Yamagishi et al. 2001). Auch am therapeutischen Effekt von mesenchymalen Stammzellen bei der Lungenfibrose könnte IL-1Ra beteiligt sein (Ortiz et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von IL-1, sowie des IL-1Ra auf die Proliferation von murinen Tubulusepithelzellen untersucht. Dabei bestätigten die Ergebnisse der Untersuchungen an proximalen Tubulusepithelzellen die bereits in der Literatur beschriebene Inhibition des Zellwachstums durch IL-1. Eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Reduktion der Proliferationsaktivität konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Proliferationsessays mittels BrdU-Inkorporation zur Ermittelung der Proliferationsrate der Zellen wurden dabei mittels Zellzählungen bestätigt.

Die Tatsache der wachstumshemmenden Eigenschaften von IL-1 auf proximale Tubulusepithelzellen bei der Fibrogenese erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich, erwartet man aufgrund der vorbeschriebenen Literatur doch eine gesteigerte Proliferation im Tubulointerstitium, die bei der EMT eine grosse Bedeutung hat. In der oben genannten Literatur ließen sich sowohl proliferative, als auch antiproliferative Effekte von IL-1 nachweisen. Dabei spielt wahrscheinlich die Unterscheidung der unterschiedlichen Zelltypen eine wichtige Rolle. Proximale Tubulusepithelzellen scheinen somit im Hinblick auf die renale Fibrogenese eine komplexe Rolle zu spielen. Zum einen kommt es, wie beschrieben, vermittelt durch IL-1 zu einer verminderten Proliferation von Tubulusepithelzellen selbst, andererseits wurde die Entwickelung von Myofibroblasten, als Hauptmediatoren der tubulointerstitiellen Fibrose, aus Tubulusepithelzellen beschrieben. Auch scheinen proximale Tubulusepithelzellen einen direkten proliferativen Effekt auf kortikale Fibroblasten, vermittelt durch TGF-β₁, zu haben (Johnson et al. 1998). Somit ist der Effekt von IL-1, als profibrogenes Zytokin, im Bezug auf proximale Tubulusepithelzellen schlussendlich doch konklusiv: die antiproliferative Wirkung auf funktionstüchtige Tubulusepithelzellen einerseits und der proliferative Effekt auf interstitielle Zellen andererseits führen zu einem Ergebnis, und zwar zum Funktionsverlust und zur Fibrosierung des Organs.

Auch die Beteiligung von distalen Tubulusepithelzellen bei der Progression der chronischen Niereninsuffizienz ist beschrieben. Induziert durch profibrogene Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β kommt es in diesen Zellen wiederum zur Sekretion von z.B. RANTES, HLA-DR, und ICAM-1 (Baer et al. 2000). Proliferationsstudien speziell an distalen Tubulusepithelzellen sind dagegen bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich unter Stimulation mit IL-1 in den Proliferationsstudien kein signifikannter Effekt auf distale Tubuluszellen. In den erfolgten Zellzählungen hingegen war ein konzentrationsabhängiger Effekt zu sehen. Unter Stimulation mit IL-1 α in den Konzentrationen 1 und 10 ng/ml zeigte sich ein leicht proliferativer Effekt, was für eine direkte Beteiligung distaler Tubulusepithelzellen am renalen Fibrosierungsprozess sprechen könnte. Dagegen war unter Stimulation mit 5 ng/ml IL-1 β ein antiproliferativer Effekt zu beobachten, entsprechend den Beobachtungen an proximalen Tubulusepithelzellen. Somit scheinen die Beobachtungen an distalen Tubuluszellen in Proliferationsstudien nicht konklusiv zu denen in den erfolgten Zellzählungen mit gleichem Versuchsaufbau, sollen doch die Zellzählungen dem Zweck dienen, die Ergebnisse des Proliferationsessays mittels BrdU-Inkorporation zu verifizieren.

In den Untersuchungen der Effekte des IL-1Ra zeigten sich in beiden Zelllinien jeweils keine statistisch signifikanten Effekte.

Im Hinblick auf die kontroversen Ergebnisse in den Beobachtungen an distalen Tubuluszellen, bzw. die fehlenden Effekte des IL-1Ra sollte erwähnt werden, dass in den Versuchsansätzen der Zellzählungen als Stimulationsmedium DMEM-Medium verwendet wurde, dem 1 % FCS (fötales Käberserum) zugesetzt wurde, da die Tubulusepithelzellen das serumfreie Medium (Iscove's) nicht tolerierten. FCS steigert jedoch bereits die basale Proliferationsrate, was die Ergebnisse dieser Studien verfälscht haben könnte. Diese mögliche Fehlerquelle konnte jedoch, aufgrund der fehlenden Toleranz des Iscove's Mediums, nur insofern minimiert werden, als dass in den folgenden Proliferationsstudien reines DMEM-Medium (low glucose) verwendet wurde.

Des Weiteren war die anfängliche Zelldichte bei der Aussaat der Zellen in den einzelnen Versuchsansätzen problematisch. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass eine bei der Aussaat höhere Zelldichte in kurzer Zeit zu übervollen Wells führte, und damit zu einem Ablösen der Zellen aus dem Zellverband. Somit musste, um diesen Effekt zu verhindern, eine niedrigere anfängliche Zelldichte gewählt werden. Hier könnten jedoch die somit anfänglich nur wenig vorhandenen Zell-Zell-Kontakte zu einer gestörten interzellulären Kommunikation über Gap-Junctions geführt haben, woraus wiederum eine anfängliche Verlangsamung des Zellwachstums resultiert haben könnte.

Auch die Dauer der Stimulationszeit war aufgrund der fehlenden Variationsmöglichkeiten der Zellzahlen bei der Aussaat insofern kaum variabel, als dass bei einer länger als 48 h gewählten Stimulationszeit ebenfalls das Problem übervoller Wells zu einer fehlenden Auswertbarkeit der Studien führte. Somit bleibt unklar, ob eine längere Stimulationszeit zu anderen Ergebnissen, gerade im Hinblick auf die Wirkung des IL-1Ra, geführt hätte, konnte seine Wirkung doch in vielen Studien, wie oben beschrieben, nachgewiesen werden.

Gerade jedoch die Tubulusepithelzellen scheinen, unter Berücksichtigung der bisher erlangten Erkenntnisse, eine zentrale Rolle bei der renalen Fibrogenese zu spielen, indem sie sich, mittels EMT in aktivierte α -SMA-positive Myofibroblasten umwandeln können. So könnten, neben Studien zur reinen Proliferation von Tubuluszellen, Untersuchungen zum Einfluss von IL-1 und des IL-1Ra auf die TGF- β_1 induzierte α -SMA-Synthese in Myofobroblasten einen weiteren Ansatzpunkt für Studien darstellen.

Die Klärung der komplexen Zusammenhänge im Zusammenspiel zwischen profibrogenen Zytokinen und ihrer unterschiedlichen Wirkung auf die verschiedenen Zelltypen bleibt somit sicher weiteren Untersuchungen vorbehalten.

4.4 Kein Effekt von IL-1 und IL-1Ra auf die Matrixsynthese von Tubulusepithelzellen

Bei der renalen Fibrogenese kommt es zur Atrophie der normalen Gewebearchitektur und zur

Expansion des interstitiellen Raumes durch eine gesteigerte Synthese von Proteinen der ECM (Okada et al. 1996). Dabei werden aktivierte Fibroblasten, so genannte Myofibroblasten, als die Hauptquelle der gesteigerten ECM-Synthese angesehen (Strutz et al. 2002). Jedoch hat in diesem Zusammenhang in den letzten Jahren die Rolle der renalen Tubulusepithelzellen zunehmend an Bedeutung gewonnen. So wurde 1995 erstmals eine mögliche Transition von Epithelzellen in Fibroblasten im Rahmen der renalen Fibrogenese beschrieben (Strutz et al. 1995). Mittlerweile gibt es weitere Arbeitsgruppen, die eine Transdifferenzierung von Tubulusepithelzellen in mesenchymale Zellen im Rahmen der Fibrogenese beschreiben, womit diese Zellen ebenfalls einen entscheidenden Beitrag zur ECM-Synthese leisten können (Ng et al. 1998; Rastaldi et al. 2002; Yang und Liu 2002; Kalluri und Neilson 2003; Strutz und Neilson 2003). Bei der Entstehung der Nierenfibrose spielen die Proteine Fibronektin und Laminin, sowie die Kollagentypen I, III, IV, V und VII die größte Rolle (Eddy 1996), wobei die Zusammensetzung der ECM je nach Ursache des interstitiellen Schadens variieren kann, auch wenn die gemeinsame Endstrecke jeweils die tubulointerstitielle Fibrose darstellt. Verschiedene Studien beschreiben die Wirkung von IL-1 auf die ECM-Synthese (Krane und Goldring 1988; Tiggelman et al. 1995; Wang et al. 2007). In dieser Arbeit wurden proximale (MCT) und distale (NP1) Tubulusepithelzellen speziell auf die Synthese und Sekretion von Fibronektin unter Stimulation mit IL-1 und IL-1Ra untersucht. Fibronektin ist ein bei der Fibrogenese vermehrt gebildetes Glykoprotein, welches als unlöslicher Bestandteil in die ECM eingelagert wird und eine wichtige Rolle bei der Zellmigration, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion spielt (Stryer 1994). Weiterhin ist Fibronektin in der Lage, TGF-β₁ zu aktivieren (Fava und McClure 1987). Die gesteigerte Fibronektinsynthese bildet ein Gerüst für die Deposition und Fibrillogenese von Kollagen (Clark 1989) und geht der Akkumulation von ECM-Proteinen voraus (Vaheri et al. 1985). Es konnten in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Effekte von IL-1 und IL-1Ra auf die Fibronektinsynthese in Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden, während es in der Positivkontrolle mit TGF-β₁ zu einer signifikanten Synthesesteigerung kam. Dabei wurden zum einen Zellkulturüberstände mittels ELISA auf Fibronektin untersucht, zum anderen wurden Immunoblotverfahren durchgeführt zur Evaluation der gesamten Fibronektinexpression. Somit scheint IL-1, im Vergleich zu TGF- β_1 nicht in der Lage zu sein, die Fibronektinsynthese in Tubuluszellen zu stimulieren,

was widersprüchlich erscheint zu der bisher erschienenen Literatur, in der die Stimulation der

Fibronektinsynthese durch IL-1 in Tubulusepithelzellen bereits beschrieben ist (Vesey et al. 2002b; Vesey et al. 2005). Auch in einem Modell an Herzfibroblasten der Ratte konnte eine signifikant gesteigerte Fibronektinsynthese durch IL-1 nachgewiesen werden (Fernandez und Mosquera 2002).

Jedoch spielen, wie oben beschrieben, weitere Proteine eine Rolle bei der ECM-Synthese, die, induziert durch IL-1, einer Synthesesteigerung unterliegen. Da in dieser Arbeit isoliert das Fibronektin untersucht wurde, ist es denkbar, dass unter gleichen Bedingungen durchaus eine Synthesesteigerung anderer Matrixproteine festzustellen wäre.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Induzierbarkeit der ECM-Synthese durch IL-1 allein im Vergleich zu einer Positivkontrolle mit TGF- β_1 untersucht. Dass TGF- β_1 bei der renalen Fibrogenese eine bedeutende Rolle spielt, konnte bereits in einer Reihe von Studien belegt werden. Dabei liegt seine Bedeutung vor allem in der Stimulation der ECM-Synthese (Eddy et al. 2000). Somit wäre der fehlende Effekt von IL-1 auf die Fibronektin-Synthese und -Expression möglicherweise dadurch zu erklären, dass IL-1 alleine nicht in der Lage ist eine Synthesesteigerung der Matrixproteine in Tubulusepithelzellen auszulösen, sondern auf TGFβ₁ als Mediator angewiesen ist. So wurde von Vesey et al. tatsächlich ein TGF-β₁ abhängiger Effekt von IL-1 auf die Fibronektin-Synthese in proximalen Tubulusepithelzellen und primären Fibroblasten beobachtet (Vesey et al. 2002a; Vesey et al. 2002b). Und auch die Arbeitsgruppe von Fan konnte ein Fortschreiten der renalen Fibrogenese durch Induktion der EMT durch IL-1 über einen TGF-β₁ abhängigen Mechanismus zeigen (Fan et al. 2001). Des Weiteren wird die Theorie der TGF-β₁ abhängigen Induzierbarkeit der ECM-Synthese durch IL-1 gestützt durch Beobachtungen, die wiederum eine autokrine Synthesesteigerung von TGF-β₁, vermittelt durch IL-1, beschreiben (Vesey et al. 2002a). Somit scheint IL-1 als proinflammtorisches Zytokin vor allem in einem komplexen Zusammenspiel mit weiteren Zytokinen eine Rolle bei der Matrixsynthese im Rahmen der renalen Fibrogenese zu spielen.

4.5 Effekte von IL-1 und IL-1Ra auf die Matrixdegradation von Tubulusepithelzellen

Bei der tubulointerstitiellen Fibrose kommt es durch die gesteigerte Matrixsynthese zu einer massiven Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine. Daneben spielt die Matrixdegradation als ein regulatorisches System eine wichtige Rolle. Diese ist bei der renalen Fibrogenese vermindert (Strutz 1995; Franklin 1997). Maßgeblich beteiligt am Abbau extrazellulärer Matrixproteine sind im wesentlichen MMPs. Sie stellen eine Familie aus mindestens 23 Enzymen dar, denen gemeinsam ist, dass sie eine große Strukturhomologie aufweisen, sowie

ein Zink-abhängiges katalytisches Zentrum (Hartung und Kieseier 2000). Ihre unterschiedliche Substratspezifität erstreckt sich neben Kollagenen auch auf andere Matrixproteine wie Proteoglykane und Nektine. Sie werden von Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und anderen Zellen, z.B. auch Tumorzellen, gebildet und als inaktive Vorstufen in den extrazellulären Raum sezerniert, wo sie durch andere Proteinasen aktiviert werden (Löffler und Petrides 1998) und als regulatorisches System eine wichtige Rolle im Gleichgewicht zwischen Matrixsynthese und Matrixdegradation spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von MMP-2 (Gelatinase A/ 72 kDa Gelatinase) und MMP-9 (Gelatinase B/ 92 kDa Gelatinase) in distalen und proximalen Tubulusepithelzellen untersucht. Sie spielen vor allem für den Abbau der tubulären Basalmembran eine Rolle (Yang et al. 2002), deren Zusammensetzung wiederum eine entscheidende Rolle in der EMT spielt (Zeisberg et al. 2001). Im Prozess der EMT wandeln sich kubische Epithelzellen in spindelförmige Mesenchymzellen um und wandern ins Interstitium, wo sie Matrixproteine synthetisieren können und somit maßgeblich zur renalen Fibrose beitragen (Strutz und Muller 2000). Somit könnte man die chronisch progrediente Niereninsuffizienz als einen Circulus vitiosus aus Matrixsynthese, Matrixdegradation und EMT bezeichnen (Rastaldi et al. 2002).

Die Stimulation der ECM-Synthese in diesem System durch IL-1 wurde bereits in oben genannten Studien beschrieben. Nun ging es um die Frage, ob IL-1 auch zu einem verminderten Matrixabbau führen kann. Mittels Gelzymographie konnten sowohl MMP-2 als auch MMP-9 in beiden Zellinien nachgewiesen werden. Unter Stimulation mit IL-1 α und IL-1 β zeigte sich jeweils eine vermehrte Expression von MMP-2 und MMP-9 in proximalen und distalen Tubuluszellen, wobei die Werte statistisch nicht signifikant waren. Auch unter Stimulation mit TGF- β 1 in der Positivkontrolle konnte jeweils eine gesteigerte Synthese beider Enzyme nachgewiesen werden, was Studien von Wahl et al. bestätigten, die ebenfalls eine Steigerung der MMP-9 Expression durch TGF- β 1 beschrieben (Wahl et al. 1993a). Somit könnte man die gesteigerte Enzymsynthese auf eine Induktion von TGF- β 1 durch IL-1 zurückführen.

Die Beobachtungen einer möglich gesteigerten Aktivität von MMP-2 und MMP-9 unter Stimulation mit IL-1 scheinen primär nicht in das Bild der renalen Fibrogenese zu passen, erwartet man doch eine Inhibition der Matrixdegradation bei der Entwickelung der Fibrose, die neben einer gesteigerten Matrixsynthese zu einem verminderten Abbau von ECM-Bestandteilen führt und damit die normale Architektur des interstitiellen Raumes zerstört. Im Hinblick darauf, dass MMP-2 und MMP-9, wie oben beschrieben, vor allem für den Abbau

der tubulären Basalmembran verantwortlich sind, lassen sich beide Seiten jedoch vereinbaren, da diese eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des epithelialen Charakters der Tubuluszellen spielt. Die Zerstörung der strukturellen und funktionellen Integrität dieser tubulären Basalmembran scheint nach heutigem Kenntnisstand einen bedeutenden Schritt bei der EMT darzustellen, da erst so die Einwanderung von Mesenchymzellen, die sich aus Epithelzellen entwickelt haben, möglich ist und damit die Synthese von ECM-Proteinen im interstitiellen Raum.

Durch Zugabe des IL-1Ra konnte in den Versuchsansätzen kein signifikanter Effekt auf die unter IL-1 gesteigerte Enzymsynthese nachgewiesen werden. Hier könnte die bereits in 4.3 beschriebene fehlende Variabilität hinsichtlich der Stimulationszeiten eine Rolle spielen.

Im Hinblick auf das Zusammenspiel der die renale Fibrogenese beeinflussenden Faktoren sind weiterhin die natürlichen Inhibitoren der MMPs, die TIMPs zu erwähnen, die ebenfalls in der Lage sind, die Aktivität der MMPs zu regulieren. So konnte in Beobachtungen an proximalen Tubulusepithelzellen und glomerulären Mesangiumzellen zwar keine IL-1induzierte Aktivitätssteigerung von MMP-9 nachgewiesen werden, dafür jedoch eine dosisabhängige Inhibition der TIMPs durch IL-1\beta in proximalen Tubulusepithelzellen, was ebenfalls einen Effekt zugunsten der MMP-Aktivität zur Folge hat, und somit auf diesem Weg zu einer vermehrten Matrixdegradation führen kann (Nee et al. 2004; Nee et al. 2007). Die TNF-α induzierte Aktivitätssteigerung von MMP-9 wurde dagegen durch IL-1β signifikant gehemmt, was wiederum zu einem gesteigerten Anfall von Matrixproteinen führen könnte. Aber auch eine Synthesesteigerung von MMP-9, die direkt durch IL-1 vermittelt wird, ist für verschiedene Zelltypen beschrieben (Li et al. 2001; Liang et al. 2007), wobei Li et al. eine fehlende Wirkung auf die Aktivität von MMP-2 beschreiben, was dem Enzym eine gewisse Überwachungsfunktion zukommen lassen könnte. Somit scheint auch im Bezug auf die Mechanismen der Matrixsynthese und Matrixdegradation ein komplexes Zusammenspiel zwischen den beteiligten Zytokinen und Enzymen einerseits, sowie den unterschiedlichen Wirkungen auf die verschiedenen Zelltypen andererseits vorzuherrschen.

4.6 Schlussfolgerungen für den IL-1-Rezeptorantagonisten als mögliches Therapeutikum der tubulointerstitiellen Fibrose

In der Therapie der rheumatoiden Arthritis wird der Interleukin-1-Rezeptorantagonist Anakinra bereits erfolgreich eingesetzt. So konnte beispielsweise in einer Studie, in der Patienten mit rheumatoider Arthritis mit 150 mg Kineret® pro Tag behandelte wurden, nach 6 Monaten bei 43 % der Patienten eine 20 %ige Verbesserung nach den Kriterien des American

College of Rheumatology gezeigt werden (Furst 2004). Ein direkter Einfluss von IL-1 auf die Schwere des Nierenschadens wurde bereits mehrfach beschrieben (Tomosugi et al. 1989). Auch wurde eine Reduktion der Schwere eines Nierenschadens durch IL-1Ra beobachtet (Nikolic-Paterson et al. 1996a). Somit wäre der Einsatz des IL-1Ra als Therapeutikum in der Nephrologie ein reizvoller Ansatz.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher *in vitro* der Einfluss von IL-1 und IL-1Ra auf distale und proximale Tubulusepithelzellen untersucht. Dabei kam es unter Stimulation mit IL-1 zu einer verminderten Proliferation von proximalen Tubuluszellen, während auf die Matrixsynthese kein Effekt nachgewiesen werden konnte. Eine Induktion der matrixdegradierenden Enzyme MMP-2 und MMP-9 durch IL-1 konnte dagegen beschrieben werden, jedoch jeweils ohne statistische Signifikanz. Unter Stimulation mit TNF-α und TGF-β₁ kam es zu einer verminderten Synthese der IL-1-Rezeptoren IL-1RI und IL-1RAcP, was als negativer Regulationsmechanismus der Wirkung des TGF-β₁ angesehen werden kann. Unter Stimulation mit IL-1Ra konnten, entgegen den Erwartungen, die sich auf bereits genannte Studien stützen, in allen Versuchen keine signifikanten Effekte nachgewiesen werden. Eine Klärung würde hier weitere Studien voraussetzen.

Ein weiterer Punkt für den täglichen Gebrauch von Kineret® ist die Wirksamkeit des Medikamentes in vivo, die durch seine kurze Halbwertszeit von 4-6 Stunden deutlich eingeschränkt wird. Trotz täglicher subkutaner Gaben bleibt es somit fraglich, ob eine therapeutische Konzentration zwischen den Injektionen erhalten werden kann (Bendele et al. 1999). So konnten maximale therapeutische Effekte in Tiermodellen nur durch die konstante Verabreichung mittels Perfusoren erreicht werden, die sich sowohl in einer antierosiven Wirkung, als auch in einer antiinflammatorischen Wirkung bei der Kollagen-induzierten Arthritis zeigten. Dabei bestand eine Dosisabhängigkeit, indem bei niedrigeren Serumkonzentrationen zwar antierosive Effekte beobachtet werden konnten, jedoch eine signifikante antiinflammatorische Wirkung erst bei höheren Serumkonzentrationen des IL-1Ra auftraten. Da es bei der Therapie der tubulointerstitiellen Fibrose vor allem auf eine antiinflammatorische Wirkung der eingesetzten Therapeutika ankommt, scheint im Bezug auf Anakinra vor allem eine ausreichende und konstante Serumkonzentration eine Rolle zu spielen. In der vorliegenden Arbeit wurden Versuchsansätze mit verschiedenen Konzentrationen IL-1Ra durchgeführt, in denen jedoch keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten. Im Bezug auf die Stimulationszeit wurde, wie oben beschrieben, lediglich für 48 Stunden stimuliert. Unter Berücksichtigung der erhobenen Beobachtungen sind somit zur Klärung dieser Zusammenhänge sicher weitere Studien nötig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die terminale Niereninsuffizienz stellt ein zentrales Problem in der Nephrologie dar. Jährlich steigt weltweit die Prävalenz chronischer Nierenerkrankungen an. Der Prozess der renalen Fibrogenese ist dabei gekennzeichnet durch ein relativ uniformes und irreversibles Voranschreiten, unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. Es kommt zum Fibrosierungsprozess, der als ein dysregulierter Reparationsprozess angesehen werden kann. Das klinische Korrelat stellt dabei die zunehmende Insuffizienz des betroffenen Organs dar. Somit ist das Ziel therapeutischer Ansätze ein Aufhalten der Progression, bzw. im Idealfall eine Regression der fortschreitenden Fibrose zu erreichen. Jedoch wird diesem Anspruch bis heute noch kein Therapiekonzept gerecht.

IL-1 ist als proinflammatorisches Zytokin maßgeblich beteiligt in der Pathogenese der chronischen Niereninsuffizienz. Der IL-1Ra ist bereits erfolgreich in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt worden. Im Hinblick auf ein mögliches Therapeutikum der terminalen Niereninsuffizienz wurden somit in der vorliegenden Arbeit die Effekte von IL-1 und IL-1Ra auf proximale und distale Tubulusepithelzellen *in vitro* untersucht.

Mittels BrdU-Inkorporation und Zellzählung wurde die Proliferationsaktivität der Zellen analysiert, sowie die Expression und Synthese des extrazellulären Matrixproteins Fibronektin mittels ELISA und Westernblot. Die Matrixdegradation wurde mit Hilfe der Gelzymographie untersucht. Zur Detektion der IL-1-Rezeptoren wurde schließlich die PCR angewandt.

Die Expression der IL-1-Rezeptoren wurde in beiden Zelllinien nachgewiesen, sowie eine TNF- α und TGF- β_1 abhängige Verminderung der Expression von IL-1RI und IL-1RAcP, was einen negativen Regulationsmechanismus darstellen könnte. Gegen eine autokrine Stimulation mit IL-1 durch Tubuluszellen spricht dagegen, dass IL-1 α und IL-1 β in den Zellen selbst nicht detektiert werden konnten. Unter Stimulation mit IL-1 α und IL-1 β konnte eine geringgradige Proliferationshemmung in proximalen Tubulusepithelzellen beobachtet werden, während kein Einfluss auf die Fibronektinsynthese nachgewiesen werden konnte. Dagegen konnte eine Induktion der Matrixdegradation (MMP-2 und -9) durch IL-1 in beiden Zelllinien gezeigt werden. In allen Versuchen konnten keine signifikanten Effekte von IL-1Ra nachgewiesen werden, was den Erwartungen aufgrund bisheriger Erkenntnisse widerspricht, so dass es hier zur Klärung weiterer Studien bedarf. Die Effekte von IL-1, die in dieser Arbeit beobachtet werden konnten, passen in das Bild der EMT. Der fehlende Effekt auf die Fibronektinsynthese unterstützt dagegen die Bedeutung weiterer Zytokine, insbesondere

 $TGF-\beta_1$, die als Mediatoren für IL-1 dienen können. Die genaue Klärung dieser Interaktionen bleibt jedoch ebenfalls weiteren Studien vorbehalten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abe S, Amagasaki Y, Iyori S, Konishi K, Kato E und Sakaguchi H (1989): Significance of tubulointerstitial lesions in biopsy specimens of glomerulonephritic patients. <u>Am J Nephrol</u> **9**(1): 30-7.
- Alexopoulos E, Seron D, Hartley RB und Cameron JS (1990): Lupus nephritis: correlation of interstitial cells with glomerular function. Kidney Int **37**(1): 100-9.
- Arend WP (1993): Interleukin-1 receptor antagonist. Adv Immunol 54: 167-227.
- Arend WP, Malyak M, Smith MF, Jr., Whisenand TD, Slack JL, Sims JE, Giri JG und Dower SK (1994): Binding of IL-1 alpha, IL-1 beta, and IL-1 receptor antagonist by soluble IL-1 receptors and levels of soluble IL-1 receptors in synovial fluids. <u>J Immunol</u> **153**(10): 4766-74.
- Aumailley M und Gayraud B (1998): Structure and biological activity of the extracellular matrix. J Mol Med **76**(3-4): 253-65.
- Auron PE (1998): The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. <u>Cytokine Growth Factor Rev</u> **9**(3-4): 221-37.
- Bader R, Bader H, Grund KE, Mackensen-Haen S, Christ H und Bohle A (1980): Structure and function of the kidney in diabetic glomerulosclerosis. Correlations between morphological and functional parameters. Pathol Res Pract **167**(2-4): 204-16.
- Baer PC, Scherberich JE, Bereiter-Hahn J und Geiger H (2000): Induction of RANTES, HLA-DR, and intercellular adhesion molecule-1 on highly purified distal tubular cells from human kidney. Transplantation **69**(11): 2456-9.
- Barile MF (1981): Mycoplasma infections of cell cultures. Isr J Med Sci 17(7): 555-62.
- Bendele A, McAbee T, Sennello G, Frazier J, Chlipala E und McCabe D (1999): Efficacy of sustained blood levels of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of arthritis: comparison of efficacy in animal models with human clinical data. <u>Arthritis</u> Rheum **42**(3): 498-506.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A und Engler JA (1993): Matrix metalloproteinases: a review. <u>Crit Rev Oral Biol Med</u> **4**(2): 197-250.
- Bohle A, Bader R, Grund KE, Mackensen S und Neunhoeffer (1977): Serum creatinine concentration and renal interstitial volume. Analysis of correlations in endocapillary (acute) glomerulonephritis and in moderately severe mesangioproliferative glomerulonephritis. Virchows Arch A Pathol Anat Histol **375**(2): 87-96.
- Bohle A, Christ H, Grund KE und Mackensen S (1979): The role of the interstitium of the renal cortex in renal disease. <u>Contrib Nephrol</u> **16**: 109-14.
- Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Vogl W, Schmitt H, Muller CA und Muller GA (1992): The long-term prognosis of the primary glomerulonephritides. A morphological and clinical analysis of 1747 cases. <u>Pathol Res Pract</u> **188**(7): 908-24.
- Bohle A, Wehrmann M, Mackensen-Haen S, Gise H, Mickeler E, Xiao TC, Muller C und Muller GA (1994): Pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies. Nephrol Dial Transplant **9 Suppl 3**: 4-12.
- Bomsztyk K, Sims JE, Stanton TH, Slack J, McMahan CJ, Valentine MA und Dower SK (1989): Evidence for different interleukin 1 receptors in murine B- and T-cell lines. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **86**(20): 8034-8.
- Boraschi D, Bossu P, Ruggiero P, Tagliabue A, Bertini R, Macchia G, Gasbarro C, Pellegrini L, Melillo G, Ulisse E, et al. (1995): Mapping of receptor binding sites on IL-1 beta by reconstruction of IL-1ra-like domains. J Immunol **155**(10): 4719-25.

- Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. <u>Anal Biochem</u> **72**: 248-54.
- Brenner BM, Meyer TW und Hostetter TH (1982): Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. N Engl J Med 307(11): 652-9.
- Brody DT und Durum SK (1989): Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. <u>J Immunol</u> **143**(4): 1183-7.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, et al. (1992): Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. Science **256**(5053): 97-100.
- Chantry D, Turner M, Abney E und Feldmann M (1989): Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. J Immunol **142**(12): 4295-300.
- Cheng S und Lovett DH (2003): Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial-mesenchymal transformation. <u>Am J Pathol</u> **162**(6): 1937-49.
- Clark RA (1989): Wound repair. Curr Opin Cell Biol 1(5): 1000-8.
- Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M, Giri JG, Dower SK, Sims JE und Mantovani A (1993): Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. Science **261**(5120): 472-5.
- Creely JJ, DiMari SJ, Howe AM und Haralson MA (1992): Effects of transforming growth factor-beta on collagen synthesis by normal rat kidney epithelial cells. <u>Am J Pathol</u> **140**(1): 45-55.
- Curtis BM, Gallis B, Overell RW, McMahan CJ, DeRoos P, Ireland R, Eisenman J, Dower SK und Sims JE (1989): T-cell interleukin 1 receptor cDNA expressed in Chinese hamster ovary cells regulates functional responses to interleukin 1. <u>Proc Natl Acad Sci</u> U S A **86**(9): 3045-9.
- Deindl E, Boengler K, van Royen N und Schaper W (2002): Differential expression of GAPDH and beta3-actin in growing collateral arteries. Mol Cell Biochem 236(1-2): 139-46.
- Dinarello CA (1991): Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. <u>Blood</u> 77(8): 1627-52.
- Dinarello CA (1994): The interleukin-1 family: 10 years of discovery. <u>FASEB J</u> **8**(15): 1314-25.
- Dinarello CA (1996): Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood 87(6): 2095-147.
- Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC und Eisenberg SP (1991): Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. <u>J Biol Chem</u> **266**(16): 10331-6.
- Dubois CM, Ruscetti FW, Palaszynski EW, Falk LA, Oppenheim JJ und Keller JR (1990): Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. <u>J Exp Med</u> **172**(3): 737-44.
- Eddy AA (1996): Molecular insights into renal interstitial fibrosis. <u>J Am Soc Nephrol</u> **7**(12): 2495-508.
- Eddy AA (2000): Molecular basis of renal fibrosis. Pediatr Nephrol 15(3-4): 290-301.
- Eddy AA, Kim H, Lopez-Guisa J, Oda T und Soloway PD (2000): Interstitial fibrosis in mice with overload proteinuria: deficiency of TIMP-1 is not protective. <u>Kidney Int</u> **58**(2): 618-28.
- Eisenberg SP, Brewer MT, Verderber E, Heimdal P, Brandhuber BJ und Thompson RC (1991): Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A **88**(12): 5232-6.

- Evans RJ, Bray J, Childs JD, Vigers GP, Brandhuber BJ, Skalicky JJ, Thompson RC und Eisenberg SP (1995): Mapping receptor binding sites in interleukin (IL)-1 receptor antagonist and IL-1 beta by site-directed mutagenesis. Identification of a single site in IL-1ra and two sites in IL-1 beta. J Biol Chem **270**(19): 11477-83.
- Fan JM, Ng YY, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC und Lan HY (1999): Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in vitro. <u>Kidney Int</u> **56**(4): 1455-67.
- Fan JM, Huang XR, Ng YY, Nikolic-Paterson DJ, Mu W, Atkins RC und Lan HY (2001): Interleukin-1 induces tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation through a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism in vitro. <u>Am J Kidney Dis</u> **37**(4): 820-31.
- Fava RA und McClure DB (1987): Fibronectin-associated transforming growth factor. <u>J Cell Physiol</u> **131**(2): 184-9.
- Fernandez L und Mosquera JA (2002): Interleukin-1 increases fibronectin production by cultured rat cardiac fibroblasts. <u>Pathobiology</u> **70**(4): 191-6.
- Franklin TJ (1997): Therapeutic approaches to organ fibrosis. <u>Int J Biochem Cell Biol</u> **29**(1): 79-89.
- Frei U und Schober-Halstenberg HJ: <u>Bericht 2005/2006</u>; Quasi-Niere gGmbH; Berlin 2006 Freshney R: <u>Tierische Zellkulturen.</u>; Walter de Gruyter; Berlin 1990
- Furst DE (2004): Anakinra: review of recombinant human interleukin-I receptor antagonist in the treatment of rheumatoid arthritis. Clin Ther **26**(12): 1960-75.
- Gehrke L, Jobling SA, Paik LS, McDonald B, Rosenwasser LJ und Auron PE (1990): A point mutation uncouples human interleukin-1 beta biological activity and receptor binding. J Biol Chem **265**(11): 5922-5.
- Gorzelniak K, Janke J, Engeli S und Sharma AM (2001): Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. <u>Horm Metab Res</u> **33**(10): 625-7.
- Granfeldt A, Ebdrup L, Tonnesen E und Wogensen L (2008): Renal cytokine profile in an endotoxemic porcine model. <u>Acta Anaesthesiol Scand</u> **52**(5): 614-20.
- Granowitz EV, Clark BD, Mancilla J und Dinarello CA (1991): Interleukin-1 receptor antagonist competitively inhibits the binding of interleukin-1 to the type II interleukin-1 receptor. <u>J Biol Chem</u> **266**(22): 14147-50.
- Gratzner HG (1982): Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. <u>Science</u> **218**(4571): 474-5.
- Greenburg G und Hay ED (1982): Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. <u>J Cell Biol</u> **95**(1): 333-9.
- Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA und Ju G (1995): Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. J Biol Chem **270**(23): 13757-65.
- Gubler U, Chua AO, Stern AS, Hellmann CP, Vitek MP, DeChiara TM, Benjamin WR, Collier KJ, Dukovich M, Familletti PC, et al. (1986): Recombinant human interleukin 1 alpha: purification and biological characterization. <u>J Immunol</u> **136**(7): 2492-7.
- Haberhausen G: Polymerase-Kettenreaktion; in: <u>Bioanalytik</u>; hrsg. v. Lottspeich F und Zorbas H; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg 1998: 679.
- Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrola T, Ylikoski E, Warrington JA und Lahesmaa R (2001): Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. <u>Anal Biochem</u> **299**(1): 63-70.
- Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP und Thompson RC (1990): Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. Nature **343**(6256): 336-40.

- Hartung HP und Kieseier BC (2000): The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system. J Neuroimmunol 107(2): 140-7.
- Haskill S, Martin G, Van Le L, Morris J, Peace A, Bigler CF, Jaffe GJ, Hammerberg C, Sporn SA, Fong S, et al. (1991): cDNA cloning of an intracellular form of the human interleukin 1 receptor antagonist associated with epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 88(9): 3681-5.
- Haverty TP, Kelly CJ, Hines WH, Amenta PS, Watanabe M, Harper RA, Kefalides NA und Neilson EG (1988): Characterization of a renal tubular epithelial cell line which secretes the autologous target antigen of autoimmune experimental interstitial nephritis. <u>J Cell Biol</u> **107**(4): 1359-68.
- Jepsen FL und Mortensen PB (1979): Interstitial fibrosis of the renal cortex in minimal change lesion and its correlation with renal function. A quantitative study. <u>Virchows</u> Arch A Pathol Anat Histol **383**(3): 265-70.
- Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, Field MJ und Pollock CA (1998): Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. <u>Kidney Int</u> **54**(3): 747-57.
- Kaissling B und Le Hir M (1994): Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats. <u>Kidney Int</u> **45**(3): 709-20.
- Kalluri R und Neilson EG (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest 112(12): 1776-84.
- Katafuchi R, Takebayashi S, Taguchi T und Harada T (1987): Structural-functional correlations in serial biopsies from patients with glomerulonephritis. <u>Clin Nephrol</u> **28**(4): 169-73.
- Kavita U und Mizel SB (1995): Differential sensitivity of interleukin-1 alpha and -beta precursor proteins to cleavage by calpain, a calcium-dependent protease. <u>J Biol Chem</u> **270**(46): 27758-65.
- Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ und Matsushima K (1990): Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. Proc Natl Acad Sci U S A 87(14): 5548-52.
- Kovacs EJ und DiPietro LA (1994): Fibrogenic cytokines and connective tissue production. FASEB J **8**(11): 854-61.
- Krane SM und Goldring MB (1988): Potential role for interleukin-1 in fibrosis associated with chronic ambulatory peritoneal dialysis. <u>Blood Purif</u> **6**(3): 173-7.
- Kuncio GS, Neilson EG und Haverty T (1991): Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. Kidney Int **39**(3): 550-6.
- Kuno K, Okamoto S, Hirose K, Murakami S und Matsushima K (1993): Structure and function of the intracellular portion of the mouse interleukin 1 receptor (type I). Determining the essential region for transducing signals to activate the interleukin 8 gene. J Biol Chem 268(18): 13510-8.
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**(5259): 680-5.
- Lan HY, Zarama M, Nikolic-Paterson DJ, Kerr PG und Atkins RC (1993): Suppression of experimental crescentic glomerulonephritis by deoxyspergualin. <u>J Am Soc Nephrol</u> **3**(11): 1765-74.
- Lee AJ, Morgan CL, Conway P und Currie CJ (2005): Characterisation and comparison of health-related quality of life for patients with renal failure. <u>Curr Med Res Opin</u> **21**(11): 1777-83.
- Lee DB, Huang E und Ward HJ (2006): Tight junction biology and kidney dysfunction. <u>Am J Physiol Renal Physiol</u> **290**(1): F20-34.
- Lemley KV und Kriz W (1991): Anatomy of the renal interstitium. Kidney Int 39(3): 370-81.

- Li DQ, Lokeshwar BL, Solomon A, Monroy D, Ji Z und Pflugfelder SC (2001): Regulation of MMP-9 production by human corneal epithelial cells. <u>Exp Eye Res</u> **73**(4): 449-59.
- Liang KC, Lee CW, Lin WN, Lin CC, Wu CB, Luo SF und Yang CM (2007): Interleukin-1beta induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. <u>J Cell Physiol</u> **211**(3): 759-70.
- Liu Y (2004): Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. <u>J Am Soc Nephrol</u> **15**(1): 1-12.
- Loddick SA, Liu C, Takao T, Hashimoto K und De Souza EB (1998): Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders. <u>Brain Res Brain Res Rev</u> **26**(2-3): 306-19.
- Löffler G und Petrides PE: Biochemie und Pathobiochemie; Springer Verlag; Berlin 1998
- Lovett DH, Szamel M, Ryan JL, Sterzel RB, Gemsa D und Resch K (1986): Interleukin 1 and the glomerular mesangium. I. Purification and characterization of a mesangial cell-derived autogrowth factor. J Immunol **136**(10): 3700-5.
- March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K, et al. (1985): Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. <u>Nature</u> **315**(6021): 641-7.
- Martin MU und Falk W (1997): The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. <u>Eur Cytokine Netw</u> **8**(1): 5-17.
- McCartney-Francis N, Mizel D, Wong H, Wahl L und Wahl S (1990): TGF-beta regulates production of growth factors and TGF-beta by human peripheral blood monocytes. Growth Factors 4(1): 27-35.
- McKean DJ, Podzorski RP, Bell MP, Nilson AE, Huntoon CJ, Slack J, Dower SK und Sims J (1993): Murine T helper cell-2 lymphocytes express type I and type II IL-1 receptors, but only the type I receptor mediates costimulatory activity. <u>J Immunol</u> **151**(7): 3500-10.
- McMahan CJ, Slack JL, Mosley B, Cosman D, Lupton SD, Brunton LL, Grubin CE, Wignall JM, Jenkins NA, Brannan CI, et al. (1991): A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. <u>EMBO J</u> **10**(10): 2821-32.
- Muller GA, Markovic-Lipkovski J, Frank J und Rodemann HP (1992): The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. <u>J Am Soc Nephrol</u> **2**(10 Suppl): S198-205.
- Muller GA, Zeisberg M und Strutz F (2000): The importance of tubulointerstitial damage in progressive renal disease. Nephrol Dial Transplant 15 Suppl 6: 76-7.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1992): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. <u>Biotechnology</u> **24**: 17-27.
- Mutsaers SE, Bishop JE, McGrouther G und Laurent GJ (1997): Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. <u>Int J Biochem Cell Biol</u> **29**(1): 5-17.
- Nath KA (1998): The tubulointerstitium in progressive renal disease. Kidney Int **54**(3): 992-4.
- Nee L, McMorrow T, Campbell E, Slattery C und Ryan MP (2004): TNF-alpha and IL-1beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. <u>Kidney Int</u> **66**(4): 1376-86.
- Nee L, Tuite N, Ryan MP und McMorrow T (2007): TNF-alpha and IL-1 beta-mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in human glomerular mesangial cells. <u>Nephron Exp</u> Nephrol **107**(2): e73-86.
- Ng YY, Huang TP, Yang WC, Chen ZP, Yang AH, Mu W, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC und Lan HY (1998): Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. <u>Kidney Int</u> **54**(3): 864-76.

- Nikolic-Paterson DJ, Lan HY, Hill PA und Atkins RC (1994): Macrophages in renal injury. Kidney Int Suppl **45**: S79-82.
- Nikolic-Paterson DJ, Lan HY und Atkins RC (1996a): Interleukin-1 receptor antagonism. Semin Nephrol **16**(6): 583-90.
- Nikolic-Paterson DJ, Main IW, Tesch GH, Lan HY und Atkins RC (1996b): Interleukin-1 in renal fibrosis. <u>Kidney Int Suppl</u> **54**: S88-90.
- Nodder S und Martin P (1997): Wound healing in embryos: a review. <u>Anat Embryol (Berl)</u> **195**(3): 215-28.
- Noronha IL, Kruger C, Andrassy K, Ritz E und Waldherr R (1993): In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. <u>Kidney Int</u> **43**(3): 682-92.
- Okada H, Strutz F, Danoff TM, Kalluri R und Neilson EG (1996): Possible mechanisms of renal fibrosis. <u>Contrib Nephrol</u> **118**: 147-54.
- Okada H, Danoff TM, Kalluri R und Neilson EG (1997): Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. Am J Physiol **273**(4 Pt 2): F563-74.
- Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K und Phinney DG (2007): Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. Proc Natl Acad Sci U S A 104(26): 11002-7.
- Pastan S und Bailey J (1998): Dialysis therapy. N Engl J Med 338(20): 1428-37.
- Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM und Deuel TF (1989): Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms. <u>J Cell Biol</u> **109**(1): 429-40.
- Pousset F, Cremona S, Dantzer R, Kelley KW und Parnet P (2001): Dexamethasone upregulates type II IL-1 receptor in mouse primary activated astrocytes. <u>J Neurochem</u> **76**(3): 901-9.
- Priestle JP, Schar HP und Grutter MG (1988): Crystal structure of the cytokine interleukin-1 beta. EMBO J 7(2): 339-43.
- Quesada AR, Barbacid MM, Mira E, Fernandez-Resa P, Marquez G und Aracil M (1997): Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. <u>Clin Exp Metastasis</u> **15**(1): 26-32.
- Raaijmakers MH, van Emst L, de Witte T, Mensink E und Raymakers RA (2002): Quantitative assessment of gene expression in highly purified hematopoietic cells using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. Exp Hematol 30(5): 481-7.
- Rastaldi MP, Ferrario F, Tunesi S, Yang L und D'Amico G (1996): Intraglomerular and interstitial leukocyte infiltration, adhesion molecules, and interleukin-1 alpha expression in 15 cases of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated renal vasculitis. <u>Am J Kidney Dis</u> **27**(1): 48-57.
- Rastaldi MP, Ferrario F, Giardino L, Dell'Antonio G, Grillo C, Grillo P, Strutz F, Muller GA, Colasanti G und D'Amico G (2002): Epithelial-mesenchymal transition of tubular epithelial cells in human renal biopsies. Kidney Int **62**(1): 137-46.
- Re F, Sironi M, Muzio M, Matteucci C, Introna M, Orlando S, Penton-Rol G, Dower SK, Sims JE, Colotta F, et al. (1996): Inhibition of interleukin-1 responsiveness by type II receptor gene transfer: a surface "receptor" with anti-interleukin-1 function. <u>J Exp Med</u> **183**(4): 1841-50.
- Riede UN: Reparation; in: <u>Allgemeine und Spezielle Pathologie.</u>; hrsg. v. Riede UN und Schäfer H-E; Georg Thieme Verlag; Stuttgart 1995: 330-43.
- Risdon RA, Sloper JC und De Wardener HE (1968): Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. Lancet 1968,2: 363-6.

- Rostagno AA, Frangione B und Gold L (1991): Biochemical studies on the interaction of fibronectin with Ig. <u>J Immunol</u> **146**(8): 2687-93.
- Rothwell NJ (1999): Annual review prize lecture cytokines killers in the brain? <u>J Physiol</u> **514 (Pt 1**): 3-17.
- Roux-Lombard P (1998): The interleukin-1 family. Eur Cytokine Netw 9(4): 565-76.
- Salonen T, Reina T, Oksa H, Sintonen H und Pasternack A (2003): Cost analysis of renal replacement therapies in Finland. <u>Am J Kidney Dis</u> **42**(6): 1228-38.
- Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, et al. (2003): Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. <u>Hypertension</u>42(5): 1050-65.
- Schainuck LI, Striker GE, Cutler RE und Benditt EP (1970): Structural-functional correlations in renal disease. II. The correlations. <u>Hum Pathol</u> **1**(4): 631-41.
- Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D und Green I (1982): Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. <u>J Immunol</u> **128**(5): 2177-82.
- Shaheen FA und Al-Khader AA (2005): Epidemiology and causes of end stage renal disease (ESRD). <u>Saudi J Kidney Dis Transpl</u> **16**(3): 277-81.
- Shirakawa F, Tanaka Y, Ota T, Suzuki H, Eto S und Yamashita U (1987): Expression of interleukin 1 receptors on human peripheral T cells. <u>J Immunol</u> **138**(12): 4243-8.
- Shu KH, Lee SH, Cheng CH, Wu MJ und Lian JD (2000): Impact of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism on IgA nephropathy. <u>Kidney Int</u> **58**(2): 783-9.
- Sims JE, March CJ, Cosman D, Widmer MB, MacDonald HR, McMahan CJ, Grubin CE, Wignall JM, Jackson JL, Call SM, et al. (1988): cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. <u>Science</u> **241**(4865): 585-9.
- Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, et al. (1993): Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6155-9.
- Sims JE, Giri JG und Dower SK (1994): The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. <u>Clin Immunol Immunopathol</u> **72**(1): 9-14.
- Sims JE, Painter SL und Gow IR (1995): Genomic organization of the type I and type II IL-1 receptors. Cytokine **7**(6): 483-90.
- Steinkasserer A, Spurr NK, Cox S, Jeggo P und Sim RB (1992): The human IL-1 receptor antagonist gene (IL1RN) maps to chromosome 2q14-q21, in the region of the IL-1 alpha and IL-1 beta loci. <u>Genomics</u> **13**(3): 654-7.
- Striker GE, Schainuck LI, Cutler RE und Benditt EP (1970): Structural-functional correlations in renal disease. I. A method for assaying and classifying histopathologic changes in renal disease. <u>Hum Pathol</u> **1**(4): 615-30.
- Strutz F (1995): Novel aspects of renal fibrogenesis. Nephrol Dial Transplant 10(9): 1526-32.
- Strutz F (2004): Diabetische Nephropathie ein Update. Med Welt. 1-2.
- Strutz F (2009): EMT and proteinuria as progression factors. Kidney Int 75(5): 475-81.
- Strutz F und Muller GA (1999): Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. <u>Kidney Blood Press Res</u> **22**(1-2): 71-80.
- Strutz F und Muller GA (2000): Transdifferentiation comes of age. Nephrol Dial Transplant **15**(11): 1729-31.
- Strutz F und Neilson EG (2003): New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. Springer Semin Immunopathol **24**(4): 459-76.
- Strutz F und Zeisberg M (2006): Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol **17**(11): 2992-8.

- Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE und Neilson EG (1995): Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. <u>J Cell Biol</u> **130**(2): 393-405.
- Strutz F, Becker V und Muller GA (1996): [Interstitial involvement in glomerulonephritis]. Internist (Berl) **37**(11): 1143-51.
- Strutz F, Okada H und Neilson EG (2001): The role of the tubular epithelial cell in renal fibrogenesis. Clin Exp Nephrol 5: 62-74.
- Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA und Neilson EG (2002): Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. Kidney Int **61**(5): 1714-28.
- Stryer L: Bindegewebsproteine; in: <u>Biochemie</u>; hrsg. v. Stryer L; Spektrum Akad. Verlag; Heidelberg 1994.
- Symons JA, Eastgate JA und Duff GW (1991): Purification and characterization of a novel soluble receptor for interleukin 1. J Exp Med **174**(5): 1251-4.
- Tang WW, Van GY und Qi M (1997): Myofibroblast and alpha 1 (III) collagen expression in experimental tubulointerstitial nephritis. Kidney Int **51**(3): 926-31.
- Tateyama F, Yamabe H, Osawa H, Kaizuka M, Shirato K und Okumura K (2001): Interleukin-1beta is an autocrine growth factor of rat glomerular epithelial cells in culture. Nephrol Dial Transplant **16**(6): 1149-55.
- Teppo AM, Honkanen E, Ahonen J und Gronhagen-Riska C (1998): Does increased urinary interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1beta ratio indicate good prognosis in renal transplant recipients? Transplantation **66**(8): 1009-14.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al. (1992): A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. <u>Nature</u> **356**(6372): 768-74.
- Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M und Chamuleau RA (1995): Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. <u>J Hepatol</u> **23**(3): 307-17.
- Tomosugi NI, Cashman SJ, Hay H, Pusey CD, Evans DJ, Shaw A und Rees AJ (1989): Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by bacterial lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and IL-1. <u>J Immunol</u> **142**(9): 3083-90.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. <u>Proc</u> Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Turner M, Chantry D, Katsikis P, Berger A, Brennan FM und Feldmann M (1991): Induction of the interleukin 1 receptor antagonist protein by transforming growth factor-beta. <u>Eur J Immunol</u> **21**(7): 1635-9.
- Uchiyama K, Naito K, Tsuchida M, Takai K, Okayama N, Fujimura K und Hinoda Y (2005): Impact of a genetic polymorphism of the interleukin-1 receptor antagonist on technique survival in peritoneal dialysis patients. <u>Blood Purif</u> **23**(6): 450-8.
- Vaheri A, Salonen EM und Vartio T (1985): Fibronectin in formation and degradation of the pericellular matrix. Ciba Found Symp 114: 111-26.
- van Kooten C, van der Linde X, Woltman AM, van Es LA und Daha MR (1999): Synergistic effect of interleukin-1 and CD40L on the activation of human renal tubular epithelial cells. Kidney Int **56**(1): 41-51.
- Vesey DA, Cheung C, Cuttle L, Endre Z, Gobe G und Johnson DW (2002a): Interleukin-1beta stimulates human renal fibroblast proliferation and matrix protein production by means of a transforming growth factor-beta-dependent mechanism. <u>J Lab Clin Med</u> **140**(5): 342-50.

- Vesey DA, Cheung CW, Cuttle L, Endre ZA, Gobe G und Johnson DW (2002b): Interleukin-1beta induces human proximal tubule cell injury, alpha-smooth muscle actin expression and fibronectin production. <u>Kidney Int</u> **62**(1): 31-40.
- Vesey DA, Cheung C, Endre Z, Gobe G und Johnson DW (2005): Role of protein kinase C and oxidative stress in interleukin-1beta-induced human proximal tubule cell injury and fibrogenesis. Nephrology (Carlton) 10(1): 73-80.
- Vigers GP, Caffes P, Evans RJ, Thompson RC, Eisenberg SP und Brandhuber BJ (1994): X-ray structure of interleukin-1 receptor antagonist at 2.0-A resolution. <u>J Biol Chem</u> **269**(17): 12874-9.
- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB und Sporn MB (1987): Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5788-92.
- Wahl SM, Allen JB, Weeks BS, Wong HL und Klotman PE (1993a): Transforming growth factor beta enhances integrin expression and type IV collagenase secretion in human monocytes. Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4577-81.
- Wahl SM, Costa GL, Corcoran M, Wahl LM und Berger AE (1993b): Transforming growth factor-beta mediates IL-1-dependent induction of IL-1 receptor antagonist. <u>J Immunol</u> **150**(8 Pt 1): 3553-60.
- Waldherr R, Noronha IL, Niemir Z, Kruger C, Stein H und Stumm G (1993): Expression of cytokines and growth factors in human glomerulonephritides. <u>Pediatr Nephrol</u> **7**(4): 471-8.
- Wang R, Wan Q, Zhang Y, Huang F, Yu K, Xu D, Wang Q und Sun J (2007): Emodin suppresses interleukin-1beta induced mesangial cells proliferation and extracellular matrix production via inhibiting P38 MAPK. <u>Life Sci</u> **80**(26): 2481-8.
- Webb AC, Collins KL, Auron PE, Eddy RL, Nakai H, Byers MG, Haley LL, Henry WM und Shows TB (1986): Interleukin-1 gene (IL1) assigned to long arm of human chromosome 2. <u>Lymphokine Res</u> **5**(2): 77-85.
- Weiner DE, Tighiouart H, Amin MG, Stark PC, MacLeod B, Griffith JL, Salem DN, Levey AS und Sarnak MJ (2004): Chronic kidney disease as a risk factor for cardiovascular disease and all-cause mortality: a pooled analysis of community-based studies. <u>J Am Soc Nephrol</u> **15**(5): 1307-15.
- Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, Held PJ und Port FK (1999): Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. N Engl J Med 341(23): 1725-30.
- Yamagishi H, Yokoo T, Imasawa T, Mitarai T, Kawamura T und Utsunomiya Y (2001): Genetically modified bone marrow-derived vehicle cells site specifically deliver an anti-inflammatory cytokine to inflamed interstitium of obstructive nephropathy. <u>J Immunol</u> **166**(1): 609-16.
- Yang J und Liu Y (2002): Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis. <u>J Am Soc Nephrol</u> **13**(1): 96-107.
- Yang J, Shultz RW, Mars WM, Wegner RE, Li Y, Dai C, Nejak K und Liu Y (2002): Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. <u>J Clin Invest</u> **110**(10): 1525-38.
- Zeisberg M, Strutz F und Muller GA (2000): Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. J Nephrol **13 Suppl 3**: S111-20.
- Zeisberg M, Bonner G, Maeshima Y, Colorado P, Muller GA, Strutz F und Kalluri R (2001): Renal fibrosis: collagen composition and assembly regulates epithelial-mesenchymal transdifferentiation. Am J Pathol **159**(4): 1313-21.

- Ziyadeh FN (1996): Significance of tubulointerstitial changes in diabetic renal disease. <u>Kidney Int Suppl</u> **54**: S10-3.
- Zuk A, Matlin KS und Hay ED (1989): Type I collagen gel induces Madin-Darby canine kidney cells to become fusiform in shape and lose apical-basal polarity. <u>J Cell Biol</u> **108**(3): 903-19.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben, ganz herzlich danken:

Herrn Professor Dr. F. Strutz für die freundliche Überlassung des Themas, die Ermöglichung dieser Arbeit und die stets gute Beratung und Betreuung.

Frau Zeljka Sisic für die Einarbeitung und technische Hilfe bei den experimentellen Arbeiten.

Frau Dr. C. Werner stellvertretend für das Institut Medizinische Statistik für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Lebenslauf

Am 03.03.1980 wurde ich, Julia Takes, geb. Tölle, als erste Tochter meiner Eltern Dr. Christel Tölle-Görtz und Dr. Ulrich Tölle in Osnabrück geboren. Ich wuchs in Bissendorf bei Osnabrück auf, wo ich von 1986 bis 1990 die Grundschule und von 1990 bis 1992 die Orientierungsstufe besuchte. Anschließend wechselte ich auf die Ursulaschule in Osnabrück, wo ich 1999 die allgemeine Hochschulreife erwarb.

2000 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, welches ich 2006 mit dem medizinischen Staatsexamen abschloss. Mein Praktisches Jahr absolvierte ich in der Universitätsklinik Göttingen (Pädiatrie), im Regionalspital Surselva Ilanz in der Schweiz (Innere Medizin) und im Kantonsspital St. Gallen (Chirurgie).

Seit 2006 arbeitete ich bis zur Geburt meines Sohnes Moritz im Februar 2010 als Assistenzärztin in der Inneren Medizin in Ilanz und Glarus (Schweiz). Seit September 2010 arbeite ich stundenweise als Präsenzärztin im Merian Iselin Spital in Basel, wo ich seit Januar 2010 mit meinem Mann Martin Takes und unserem Sohn wohne.