

**Aus der Medizinischen Poliklinik - Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Arbeitsgruppe Klinische Biochemie

Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff

**Zur Funktion des CC-Chemokins CCL5/RANTES bei der
Immunkomplex-Glomerulonephritis**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von Michael Frink
aus Mainz

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. F.-X. Beck
Prof. Dr. Dr. med. T. Bosch
Prof. Dr. med. Th. Brocker

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Hans-Joachim Anders

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2003

Meinen Eltern

Meinen Freunden

Inhaltsverzeichnis

VORBEMERKUNGEN	7
SPRACHKONVENTIONEN	7
RECHTLICHE GRUNDLAGE DER TIERVERSUCHE	7
FÖRDERUNG DES PROJEKTES	7
 ZUSAMMENFASSUNG.....	 8
 1. EINFÜHRUNG	 11
1.1. WIRTSCHAFTLICHE UND SOZIALE BEDEUTUNG DER NIERENINSUFFIZIENZ	11
1.2. URSACHEN DER NIERENINSUFFIZIENZ	13
1.3. STADIEN PROGREDIENTER NIERENERKRANKUNGEN	14
1.4. BEDEUTUNG DER LEUKOZYTENINFILTRATION	16
1.5. CHEMOKINE UND REZEPTOREN.....	17
1.6. FUNKTIONEN VON CHEMOKINEN	21
1.7. CHEMOKINE UND NIERE.....	23
1.8. BLOCKADE VON CHEMOKINREZEPTOREN ALS THERAPIEMÖGLICHKEIT ENTZÜNDLICHER NIERENERKRANKUNGEN	28
1.9. FRAGESTELLUNG.....	32
 2. MATERIAL UND METHODEN.....	 33
2.1. TIERHALTUNG UND TIEREXPERIMENTELLE METHODEN	33
2.1.1. Tierhaltung	33
2.1.2. Studiendesign	33
2.1.3. Narkotisierung der Mäuse und Blutentnahme.....	34
2.1.4. Gewebeentnahme	35
2.1.5. Thioglykolat-Peritonitis.....	37
2.2. FUNKTIONELLE PARAMETER DER NIERENFUNKTION	37
2.2.1. Proteinurie	37
2.2.2. Serumparameter.....	38
2.3. HISTOLOGISCHE ANALYSEMETHODEN.....	39
2.3.1. Gewebeaufbereitung.....	39

2.3.2. PAS-Färbung	39
2.3.3. Immunhistochemie	40
2.3.4. Histologischer Nachweis apoptotischer Zellen	44
2.4. MORPHOMETRISCHE AUSWERTUNG	45
2.4.1. Score der glomerulären Schädigung	45
2.4.2. Score der Immunkomplexablagerungen	46
2.4.3. Score zur Charakterisierung des glomerulären Zellinfiltrats	46
2.5. ANALYSE DER HUMORALEN IMMUNREAKTION	46
2.5.1. Seramtiter von IgG, IgG 1 und IgG 2a	46
2.5.2. Zytokinproduktion von Milzzellen	47
2.6. IN VITRO-STUDIEN	48
2.6.1. Zellisolation	48
2.6.2. Apoptose Assay	48
2.6.3. Phagozytose Assay	49
2.6.4. Proliferations Assay	50
2.7. STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	50
2.8. LÖSUNGEN UND REAGENZIEN	51
2.8.1. Chemikalien	51
2.8.2. Lösungen	53
3. ERGEBNISSE	54
3.1. DIE APOFERRITIN-INDUZIERTER IMMUNKOMPLEX-GLOMERULONEPHRITIS	54
3.2. RANTES-ANTAGONISTEN REDUZIEREN DIE INFILTRATION GLOMERULÄRER MAKROPHAGEN	57
3.3. RANTES-ANTAGONISTEN REDUZIEREN DIE ZELLPROLIFERATION UND ERHÖHEN DIE ANZAHL APOPTOTISCHER ZELLEN IM GLOMERULUS	59
3.4. RANTES-ANTAGONISTEN VERSCHLECHTERN DIE GLOMERULONEPHRITIS	61
3.5. IN VITRO-STUDIEN	63
3.6. DIE ANTAGONISTEN HABEN KEINEN EFFEKT AUF DIE HUMORALE IMMUNANTWORT	64
3.7. RANTES-ANTAGONISTEN ERHÖHEN DIE EXPRESSION DER INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE	66
3.8. DER EINFLUSS AUF DIE PHAGOZYTOSEFÄHIGKEIT PERITONEALER MAKROPHAGEN	67

4. DISKUSSION.....	70
4.1. MET-RANTES UND AOP-RANTES REDUZIEREN DIE MAKROPHAGEN- INFILTRATION.....	70
4.2. MET-RANTES UND AOP-RANTES VERSTÄRKEN DIE GLOMERULÄRE SCHÄDIGUNG UND DIE PROTEINURIE.....	71
4.3. MET-RANTES UND AOP-RANTES MODULIEREN DIE MAKROPHAGENFUNKTION.....	74
5. KLINISCHE BEDEUTUNG UND AUSBLICK	79
6. ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFE	81
7. LITERATURVERZEICHNIS	84
8. ANHANG.....	103
CURRICULUM VITAE	103
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	106
DANKSAGUNG.....	107

Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Mai 1999 bis Dezember 2002 in den Forschungslaboren der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff durchgeführt.

Mitbetreut wurde die Arbeit von Herrn PD Dr. med. Hans-Joachim Anders.

Sprachkonventionen

Bei manchen im wissenschaftlichen Sprachgebrauch häufig vorkommenden englischen Fachausdrücken wurde auf ein künstlich wirkendes Übersetzen ins Deutsche verzichtet. Dies wurde durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet.

Rechtliche Grundlage der Tierversuche

Während der im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffe und Maßnahmen an Tieren wurde darauf geachtet, das Leiden der Tiere auf ein Minimum zu reduzieren.

Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern unter den Aktenzeichen 211-2531-48/95, 211-2531-64/99 und 209.1/211-2531-9/02 genehmigt.

Förderung des Projektes

Diese Arbeit wurde von der Wilhelm-Sander-Stiftung, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und im Rahmen der *FöFoLe* der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität gefördert.

Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der terminalen Niereninsuffizienz, die eine adäquate Nierenersatztherapie erfordert, stellt in Deutschland und in anderen Ländern nicht nur ein medizinisches, sondern auch ein wirtschaftliches Problem dar. Da Glomerulonephritiden eine der Hauptursachen für die terminale Niereninsuffizienz sind, ist es notwendig, für diese Erkrankung neue Therapieansätze zu entwickeln, die eine Progression bis zum terminalen Nierenversagen verhindern. Diese neuen Therapieansätze müssen an den pathophysiologischen Mechanismen der Glomerulonephritis ansetzen.

Einen wichtigen Schritt bei allen Entzündungen stellt die Migration von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe dar und spielt natürlich auch bei entzündlichen Erkrankungen der Niere eine entscheidende Rolle. Es erscheint als Therapieprinzip sinnvoll, die Leukozyteninfiltration spezifisch am Ort der Entzündung zu blockieren, wofür die lokale Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen eine wichtige Option darstellt. Dabei werden Chemokine sowohl von intrinsischen renalen Zellen als auch von infiltrierenden Leukozyten produziert und sezerniert.

Bei der experimentellen Immunkomplex-Glomerulonephritis, die durch Injektionen von *horse spleen apoferritin* (HAF) induziert wird, ist das Chemokin RANTES in den Glomeruli exprimiert, was von einer glomerulären Infiltration von Makrophagen gefolgt ist.

Im Verlauf dieser Erkrankung kommt es neben der Ablagerung von Immunkomplexen und einer mesangialen Zellproliferation auch zur Infiltration von Leukozyten und einer Proteinurie. In der frühen Phase dieser Erkrankung sind die Chemokine RANTES und MCP-1 sowie ihre Rezeptoren CCR 1, 2 und 5 vermehrt exprimiert, wobei CCR 5 eine Bindungsstelle für das Chemokin RANTES darstellt und durch die Antagonisten AOP-RANTES und Met-RANTES partiell blockiert wird.

Um die Bedeutung bzw. die Funktion von RANTES und seinen Rezeptoren in diesem Kontext genauer aufzuklären, wurde der Effekt der Chemokinantagonisten AOP-RANTES und Met-RANTES am Modell der Apoferritin (HAF)-induzierten Immunkomplex-Glomerulonephritis in der Maus untersucht.

Untersucht wurden sieben Gruppen mit folgenden täglichen intraperitonealen Injektionen über 14 Tage:

- I: 100 µl 0,9 %NaCl
- II: 40 µg Met-RANTES
- III: 10 µg AOP-RANTES
- IV: 5,1 mg HAF
- V: 5,1 mg HAF + 10 µg Met-RANTES
- VI: 5,1 mg HAF + 40 µg Met-RANTES
- VII: 5,1 mg HAF + 10 µg AOP-RANTES

Bei den Kontrolltieren der Gruppe IV führten die täglichen Injektionen des Antigens HAF über 14 Tage zu den beschriebenen Veränderungen. Wie aufgrund der bisher bekannten Funktion der Chemokine zu erwarten war, fand sich in den Mäusen, die zusätzlich zum Antigen mit den Antagonisten behandelt wurden (V-VII), immunhistologisch eine Reduzierung der glomerulären Leukozyten/Makrophagen um ca. 50 %. Bei diesen Tieren konnte auch eine verminderte Anzahl proliferierender mesangialer Zellen auf ca. 1/6 der Kontrollgruppe (IV) festgestellt werden. Neben diesen Veränderungen führte die Behandlung mit AOP-RANTES oder Met-RANTES aber auch zu kapillären Thrombosen, mesangiolytischen Veränderungen und einer stärkeren Proteinurie. Zusätzlich zeigte sich in diesen Tieren eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen in den Glomeruli.

In den Gruppen II und III konnte aufgrund fehlender histopathologischer und funktioneller Veränderungen ein nephrotoxischer Effekt der Antagonisten ausgeschlossen werden.

In vitro Studien konnten keine proliferativen Effekte oder die Induzierung von Apoptose durch die Antagonisten in murinen Mesangialzellen nachweisen.

Die weitere Charakterisierung der glomerulären Makrophagen zeigte eine verstärkte Expression der *inducible nitric oxide synthase*. Außerdem konnte in einem Phagozytose Assay ein suppressiver Effekt von Met-RANTES auf die Phagozytosefähigkeit muriner Makrophagen nachgewiesen werden.

Bei den durchgeführten Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf die Induktion eines proinflammatorischen Phänotyps glomerulärer Makrophagen. Die Wirkung der Chemokinantagonisten AOP-RANTES und Met-RANTES umfasst demnach neben den antichemotaktischen noch weitere immunmodulatorische Effekte, die eine akute

Glomerulonephritis verschlechtern können. Obwohl diese Chemokinantagonisten in anderen Krankheitsmodellen eine deutliche Verbesserung des Verlaufs erzielen konnten, müssen die hier beobachteten Effekte weiter untersucht werden, bevor Chemokinantagonisten wie AOP- oder Met-RANTES als neue Therapie bei entzündlichen Nierenerkrankungen eingesetzt werden können.

1. Einführung

1.1. Wirtschaftliche und soziale Bedeutung der Niereninsuffizienz

Die Niereninsuffizienz stellt ein in der Medizin bisher nur unzureichend zu therapierendes Krankheitsbild dar. Bei chronisch-progredientem Verlauf kommt es zur terminalen Niereninsuffizienz, wo ein Weiterleben nur mittels einer Nierenersatztherapie (Hämo- oder Peritonealdialyse) oder Nierentransplantation möglich ist.

Die Epidemiologie verdeutlicht, dass dieses Krankheitsbild nicht das Schicksal einzelner ist, sondern durchaus als ein in der Gesellschaft weit verbreitetes medizinisches Problem gesehen werden muß (siehe Diagramm 1.1.). So waren in Deutschland zum Jahreswechsel 2001/02 57.118 Menschen (696/1 Mio. Einwohner) dialysepflichtig, über weitere 18.000 Patienten befanden sich nach zum Teil Jahre dauernder Dialysebehandlung und schließlich erfolgreicher Transplantation in entsprechenden Nachsorgeverfahren (Frei).

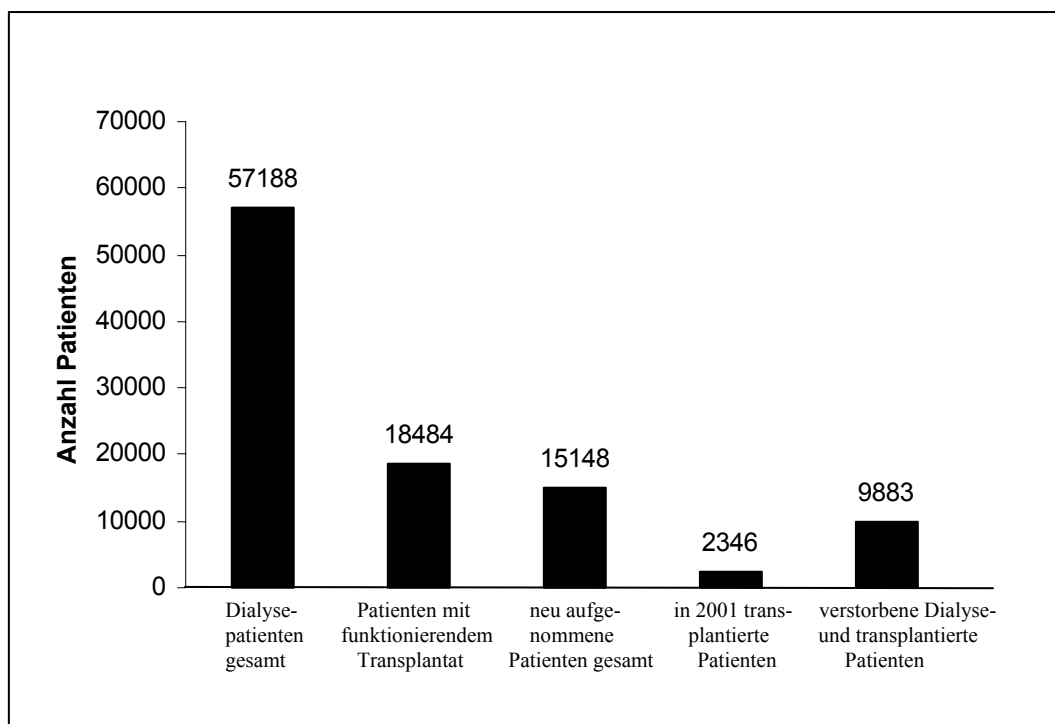


Diagramm 1.1.: Übersicht über die chronische Nierenersatztherapie in Deutschland, 2001 (QUASI Niere).

Patientenzahlen aus anderen Ländern (1997: USA: 1131/1 Mio. Einwohner; Japan 1397/1 Mio. Einwohner) geben einen Hinweis darauf, dass die Zahlen wahrscheinlich weiter ansteigen werden (Weber M, Marx).

Die Kosten für einen dialysepflichtigen Patienten belaufen sich je nach Verfahren (Hämo- oder Peritonealdialyse) zwischen EUR 30.000,- und EUR 55.000,- pro Jahr (Nebel), sodass für das Gesundheitssystem in Deutschland zur Zeit jährlich Kosten von ca. EUR 2,9 Milliarden entstehen.

Volkswirtschaftlich bedeutet dies, dass in Deutschland zur Zeit für 0,08 % der Bevölkerung, die dialysepflichtig sind, mehr als 2 % des jährlichen Budgets der gesetzlichen Krankenkassen von ca. EUR 130 Milliarden aufgewendet werden müssen. Für die USA liegt das Zahlenverhältnis etwas günstiger: 0,7 % der Bevölkerung sind dialysepflichtig und verbrauchen 5 % des jährlichen *Medicare budget* (Xue).

Aufgrund der Tatsache, dass 55 % der Kostensteigerungen der letzten Jahre auf die wachsende Patientenzahl (ca. 6 %/Jahr) zurückzuführen sind und es keine Hinweise für eine Trendwende gibt, geht man von einer Explosion der jährlichen Kosten in Deutschland um ca. 80 % auf ungefähr EUR 5,2 Milliarden in den nächsten acht Jahren aus (Neubauer). Die neuesten Voraussagen in den USA nennen eine jährliche Wachstumsrate von 6,4 % der chronisch niereninsuffizienten und 7,1 % der dialysepflichtigen Patienten. Bis 2010 wird dort mit einer Steigerung der aufzuwendenden finanziellen Mittel von \$ 12,04 Milliarden (1998) auf \$ 28,3 Milliarden gerechnet (Xue).

Die Nierentransplantation ist als Alternative zur Nierenersatztherapie nicht nur die beste, sondern mit EUR 17.000,-/Jahr auch die günstigste Behandlungsform des terminalen Nierenversagens. Nachdem aber die Anzahl der in Deutschland zur Transplantation verfügbaren Nieren nicht in dem erforderlichen Maße wächst und es außer den etablierten Dialyseverfahren keine anderen technischen Verfahren zur Nierenersatztherapie gibt, ist eine funktionierende und frühzeitige Therapie renaler Erkrankungen zur Verhinderung der Progression zum terminalen Nierenversagen erforderlich. Nicht nur im Sinne der dialysepflichtigen Patienten, die hohe Einbußen ihrer Lebensqualität hinnehmen müssen, sondern auch in volkswirtschaftlicher Hinsicht ist es unbedingt notwendig, für Erkrankungen, die in die terminale Niereninsuffizienz münden, neue Therapieansätze zu entwickeln.

1.2. Ursachen der Niereninsuffizienz

Im Jahre 2001 waren in Deutschland Glomerulonephritiden die Hauptursache für die Entwicklung der terminalen Niereninsuffizienz; an zweiter Stelle folgte die diabetische Nephropathie (Frei, QuaSi Niere). Aufgrund der genetischen Prädisposition der afro-amerikanischen Bevölkerung für Diabetes und Hypertonie ist letztere in den Vereinigten Staaten von Amerika mit 37,4 % der Hauptgrund für *End-Stage Renal Diseases* (Collins, USRDS). Als weitere Ursachen folgen interstitielle Nephritiden und vaskuläre Nephropathien (siehe Diagramm 1.2.). Mit steigendem Alter nehmen die Anteile der diabetischen Nephropathie und der hypertensiven Nephrosklerose aufgrund steigender Inzidenz der Grunderkrankung als Ursachen zu.

Bei vielen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wird die Diagnose Glomerulonephritis ohne bioptische Sicherung gestellt (USA: 60-70 %), so dass Aussagen über die Prävalenzen der einzelnen Subformen nur in begrenztem Maße möglich sind. Wie in den meisten Gegenden dieser Welt scheint jedoch die IgA-Nephropathie auch in westeuropäischen Ländern den größten Teil einzunehmen (Schena).

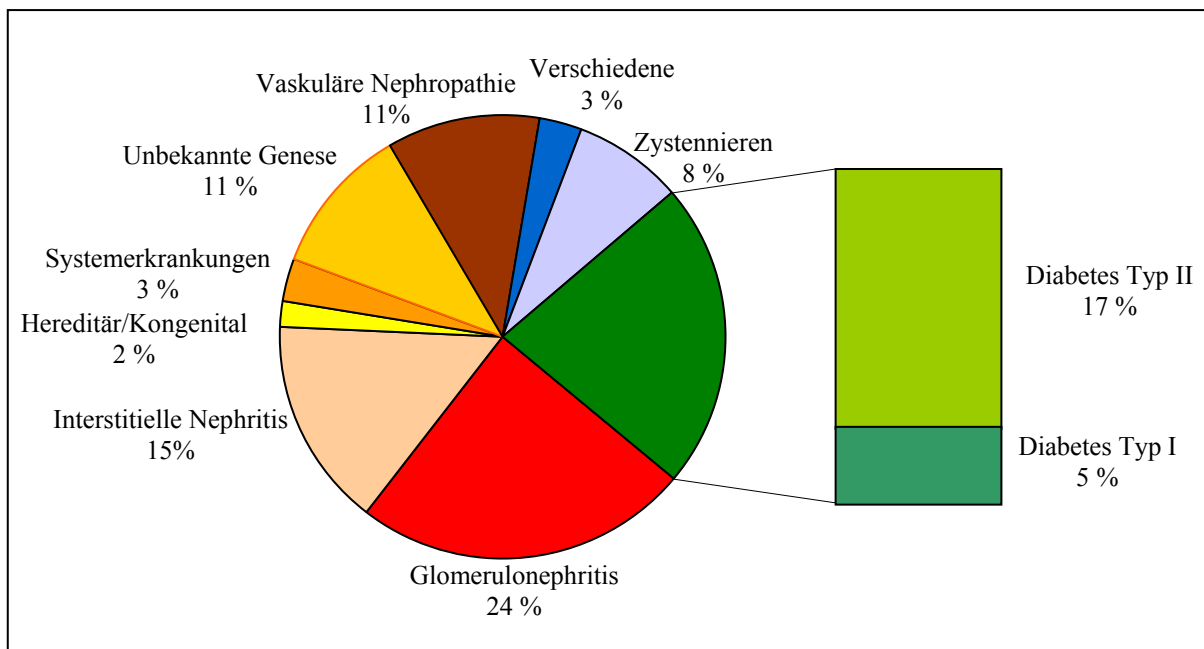


Diagramm 1.2.: Diagnoseverteilung erfasster lebender dialysepflichtiger Patienten in Deutschland, 2001 (QuaSi Niere)

Als Voraussetzung für neue und funktionierende Therapieansätze bei entzündlichen Nierenerkrankungen ist ein profundes Wissen der ablaufenden Pathomechanismen erforderlich.

1.3. Stadien progredienter Nierenerkrankungen

Die meisten Nephropathien schreiten langsam zum terminalen Nierenversagen fort und nur wenige haben die Tendenz auszuheilen. Diese Progression ist durch immer stärkere Schädigungen des Glomerulus und des Tubulointerstitium gekennzeichnet.

Zur Charakterisierung der einzelnen Abschnitte der Erkrankung hat sich ein Stufenmodell bewährt. Die Entwicklung der Glomerulonephritis und anderer Nephropathien läßt sich danach in vier Phasen einteilen: die Initiationsphase, die Amplifikationsphase, die Progressionsphase und die Terminalphase.

Initiationsphase: Die Schädigung renaler Parenchymzellen führt zur Sekretion inflammatorischer Mediatoren, die die Infiltration und Aktivierung von Leukozyten zur Folge haben. Dabei scheint dies je nach Erkrankung streng auf das betroffene Kompartiment, Glomerulus oder Tubulointerstitium, beschränkt zu sein (Anders 2001, Vielhauer). Außerdem unterstreicht auch die selektive Einwanderung von Leukozytensubpopulationen in bestimmte Kompartimente die Komplexität der Immunantwort. So finden sich T-Zellen im Verlauf glomerulärer Entzündungen außerordentlich selten im Glomerulus, dafür aber in interstitiellen Infiltraten (Segerer 1999). Dies kann zum einen an einer unterschiedlichen Expression der Adhäsionsmoleküle in interstitiellen und glomerulären Kapillaren oder an einem höheren Scherstress in der glomerulären Mikrozirkulation liegen. Dagegen finden sich Makrophagen im Verlauf proliferativer Glomerulonephritiden oft im Glomerulus geschädigter Nephrone. Deren Infiltration könnte durch die fokale Nekrosen und Halbmondbildungen hervorgerufen werden.

Amplifikationsphase: Sowohl die Infiltration von Leukozyten aus Blutgefäßen ins betroffene Gewebe als auch die Proliferation residenter Leukozyten führen zu einer verstärkten Synthese und Ausschüttung von Zytokinen und anderer inflammatorischer Mediatoren. Zusätzlich werden von infiltrierenden Makrophagen Sauerstoffradikale, Arachidonsäurederivate und andere zelltoxische Stoffe sezerniert, die für eine weitere Zerstörung des Gewebes sorgen, was wiederum im Sinne eines positiven Rückkopplungsmechanismus wirkt. Makrophagen

sind auch für die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie FGF, TGF- β , TNF- α , EGF und PDGF verantwortlich (Eddy). Diese Zytokine stimulieren unter anderem die Proliferation von Mesangialzellen, was dann zum typischen Bild der mesangioproliferativen Glomerulonephritis führt (Daha).

Im tubulointerstitiellen Kompartiment führen die Proliferation von Fibroblasten und die Ausschüttung verschiedener Stimulatoren zur Ausweitung des interstitiellen Gewebes und schlussendlich zur renalen Fibrose. In diesen Prozess sind nicht nur residente Fibroblasten involviert, sondern auch Myofibroblasten des tubulären Epithels, ein Vorgang der *epithelial-mesenchymal transformation* genannt wird (Strutz).

Aber auch in primären Glomerulopathien wie der membranösen, der fokal sklerosierenden und der mesangioproliferativen Glomerulonephritis kann es zu einem interstitiellen Infiltrat und folgend zu einer renalen Fibrose kommen. Hierfür kommen drei Mechanismen in Frage, bei allen scheint dem tubulären Epithel die vermittelnde Rolle zwischen dem glomerulären und dem interstitiellen Kompartiment zuzukommen. Proinflammatorische Mediatoren und Wachstumsfaktoren werden mit dem Primärfiltrat in die Tubuli des Nephrons gespült und werden dort zu Stimulatoren für tubuläre Epithelzellen, die ihrerseits reaktiv proinflammatorische, profibrotische und chemotaktische Zytokine ausschütten (Segeer Jan 2000). Aber auch die physiologische Blutzirkulation bringt diese Botenstoffe in das tubuläre Kompartiment und aktiviert dort peritubuläres Endothel und Tubuluszellen (Abbate). Durch Verletzungen der Bowmann'schen Kapsel fehlgeleitetes Ultrafiltrat, das ins Interstitium gelangt ist, kann dort ebenfalls entzündliche Prozesse auslösen (Kriz 2001). All diese Mechanismen sind für die Ausdehnung des primären Entzündungsherdens vom Glomerulus ins Interstitium und damit für seine deutliche Expansion verantwortlich.

Progressionsphase: Die fortwährende Stimulation renaler Parenchymzellen durch Leukozyten, sezernierte Zytokine und durch die sich nach Verletzung der Bowmann'schen Kapsel und der Basalmembran einstellende Proteinurie münden in die ständige Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix und schließlich in die irreversible Schädigung der anatomischen Struktur und führen dadurch zum Funktionsverlust. Mesangialzellen sezernieren nach Stimulation durch Makrophagen Kollagen, Laminin und Fibronectin und sind damit entscheidende Faktoren bei der Entstehung der Glomerulosklerose (Pawluczyk). Die glomeruläre Expansion führt zur Verengung oder sogar Obliteration bei einem Teil der glomerulären Kapillaren, bei einem anderen Teil dagegen zur Dilatation. Die Folgen sind

nicht nur die lokale Destruktion im Glomerulus, sondern auch eine Schädigung des gesamten Nephrons inklusive tubulärer und peritubulärer Anteile (Kriz 1996 und 2001). Die Infiltration immunkompetenter Zellen ins Interstitium führt neben der ständigen Produktion und Ausschüttung von Zytokinen und Komponenten der extrazellulären Matrix auch zu einer vergrößerten Distanz zwischen Kapillaren und von diesen versorgten Gewebeanteilen (Ljungquist). Die dadurch induzierte Ischämie ist für apoptotische und nekrotische Veränderungen und schlussendlich für die Atrophie der Tubuli verantwortlich (Kang, Marcussen).

Terminalphase: Das Zugrundegehen der Blutgefäße und die fortschreitende Vernarbung des Gewebes führen zur kompletten tubulären Atrophie und Glomerulosklerose. Der Verlust großer Teile des renalen Parenchyms und der normalen anatomischen Struktur mündet schließlich in die terminale Niereninsuffizienz (ESRD) mit allen klinischen Zeichen und Symptomen der Urämie. Während die immunkompetenten Zellen mit der Zeit wieder aus dem Gewebe auswandern, sorgen die bestehende Hypoxämie und die autokrine Stimulation für eine Aufrechterhaltung von Synthese und Ausschüttung extrazellulärer Matrixkomponenten durch renale Fibroblasten (Norman 1999 und 2000). Myofibroblasten führen schließlich zur Kontraktion des fibrotischen Gewebes und zum bekannten makroskopischen Korrelat, der Schrumpfniere.

In diesem Prozess spielen Chemokine in vielen Schritten eine Rolle. Ihre Funktion kann nicht isoliert betrachtet werden, sondern erschließt sich nur im gesamten Netzwerk von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen.

1.4. Bedeutung der Leukozyteninfiltration

“Inflammation is the reaction of a tissue and its microcirculation to a pathogenic insult. It is characterized by the generation of inflammatory mediators and movement of fluid and leukocytes from the blood into extravascular tissue.” (Rubin)

Aus diesen beiden Sätzen, mit denen im amerikanischen Standardwerk der Pathologie das Kapitel „*Inflammation*“ beginnt, wird die zentrale Bedeutung der Transmigration von immunkompetenten Zellen deutlich. Die Infiltration von Leukozyten ins entzündete Gewebe ist Ausdruck des Versuchs des Organismus fremde, virale oder bakterielle Stoffe, körperfremde oder Tumorzellen zu lokalisieren und zu eliminieren.

Entscheidend für den Erfolg dieses Vorganges ist das Gleichgewicht zwischen lokalen aggressiven Faktoren und zellprotektiven Vorgängen, die letztendlich über das Schicksal des Gewebes entscheiden: Progression oder Resolution der Entzündung.

Der Rekrutierung immunkompetenter Zellen kommt in diesem Zusammenhang eine maßgebliche Bedeutung zu. In Verbindung mit Selektinen und Integrinen (Springer 1994) vermitteln chemotaktische und andere Zytokine in einem komplizierten Netzwerk die Immunantwort des Organismus. Chemokine spielen eine entscheidende Rolle bei der Migration von Leukozyten (Baggiolini) aus den Gefäßen und deren Weg entlang eines Konzentrationsgradienten ins entzündete Gewebe. Zahlreiche Studien, in denen die Infiltration von Leukozyten verhindert wurden (siehe Kapitel 1.8.), zeigen einen weniger schweren Verlauf bei Tiermodellen entzündlicher Nierenerkrankungen.

Das Blockieren dieses essentiellen Schrittes im Rahmen der entzündlichen Reaktion stellt die neue therapeutische Strategie der selektiven Immunsuppression dar. Systemische Nebeneffekte durch eine Leukopenie oder der systemischen Immunsuppression würden mit diesem Ansatz vermieden werden.

1.5. Chemokine und Rezeptoren

Als Chemokine bezeichnet man die große Familie **chemotaktischer Zytokine**, die untereinander eine strukturelle Ähnlichkeit in der Sekundärstruktur aufweisen und von nahezu allen Zellen des menschlichen Organismus nach Stimulation synthetisiert werden können. Ihr Name ergibt sich aus ihrer hauptsächlichen Funktion, der Vermittlung der Extravasation immunkompetenter Zellen und deren Migration anhand eines Chemokingradienten ins betroffene Gewebe.

Bis heute (2002) sind mehr als 44 Chemokine und 21 Chemokin-Rezeptoren beschrieben worden (Anders 2003).

Chemokine sind 8 bis 10 kDa schwere Moleküle mit einer 20-70 %-igen Homologie in der Aminosäuresequenz. Die Tertiärstruktur wird von Disulfidbrücken stabilisiert, die sich zwischen den kondensierten Cysteinresten ausbilden.

Tabelle 1.1. CC-Chemokine und ihre Rezeptoren

Name	Chromosom	Ligand (human)	Ligand (murin)	Chemokinrezeptor
CCL1	17q11.2	I-309	TCA-3/P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	17q12	MIP-1 α /LD78	MIP-1 α	CCR1, CCR5
CCL3L1	17q12	LD78- β	unbekannt	CCR1, CCR5
CCL4	17q12	MIP-1 β	MIP-1 β	CCR5
CCL5	17q12	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
(CCL6)		unbekannt	C10/MRP-1	unbekannt
CCL7	17q11.2	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17q11.2	MCP-2	MCP-2?	CCR3, CCR5
(CCL9/10)		unbekannt	MRP-2/MIP-1 χ	CCR1
CCL11	17q11.2	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
(CCL12)		Unknown	MCP-5	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	unbekannt	CCR2, CCR3
CCL14	17q12	HCC-1	unbekannt	CCR1, CCR5
CCL15	17q12	HCC-2/Lkn-1	unbekannt	CCR1, CCR3
CCL16	17q12	HCC-4/LEC/LCC-1	unbekannt	CCR1, CCR2
CCL17	16q13	TARC	TARC/ABCD-2	CCR4
CCL18	17q12	DC-CK1/PARC	unbekannt	unbekannt
CCL19	9p13.3	MIP-3 β /ELC/exodus-3	MIP-3 β /ELC/exodus3	CCR7/CD197
CCL20	2q36.3	MIP-3/LARC/exodus-1	MIP-3/LARC/exodus1	CCR6
CCL21	9p13.3	6Ckine/SLC/exodus-2	6Ckine/SLC/exodus2	CCR7/CD197
CCL22	16q13	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	17q12	MPIF-1/CK β 8/CK β 8-1	unbekannt	CCR1
CCL24	7q11.23	Eotaxin-2/MPIF-2	MPIF-2	CCR3
CCL25	19p13.3	TECK	TECK	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	unbekannt	CCR3
CCL27	9p13.3	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC	CCR10
CCL28	5p12	MEC	unbekannt	CCR3/CCR10

Sie werden nach der Position und Art dieser Cysteine in vier Gruppen eingeteilt: in die C-, die CC-, die CXC- und die CX₃C-Unterfamilie. Während sich bei den CC-Chemokinen N-terminal aneinander angrenzend zwei Cysteine finden (Tabelle 1.1.), befindet sich bei der CXC-Unterfamilie eine beliebige Aminosäure X zwischen den beiden Cysteinen (siehe Tabelle 1.2.).

Lediglich zwei Chemokine lassen sich nicht einer dieser beiden Gruppen zuordnen: *Lymphotactin* hat keinen dieser beiden Cysteinreste, weist aber am Carboxylende Ähnlichkeiten mit den CC-Chemokinen auf (Kelner). Bei dem einzigen durch einen Muzin-Anker an der Zellmembran gebundenen Chemokin *fractalkine* (human) oder *neurotactin* (murin) befinden sich zwischen den beiden Cysteinen drei Aminosäuren; beide werden deshalb auch als CX₃C-Chemokine bezeichnet. Entsprechend den Liganden erfolgt auch die Einteilung der Chemokinrezeptoren in C-, CC-, CXC- und CX₃C-Rezeptoren (Bazan, Pan).

Tabelle 1.2. CXC-, C-, CX₃C-Chemokine und ihre Rezeptoren

Name	Chromosom	Ligand (human)	Ligand (murin)	Chemokinrezeptor
CXC Chemokine				
CXCL1	4q21.1	GRO- α /MGSA- α	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q21.1	GRO- β /MGSA- β	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2
CXCL3	4q21.1	GRO- γ /MGSA- γ	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2
CXCL4	4q21.1	PF4	PF4	unbekannt
CXCL5	4q21.1	ENA-78	GCP-2/LIX?	CXCR2
CXCL6	4q21.1	GCP-2	GCP-2/LIX?	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q21.1	NAP-2	unbekannt	CXCR2
CXCL8	4q21.1	IL-8	unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.1	Mig	Mig	CXCR3/CD138
CXCL10	4q21.1	IP-10	IP-10/CRG-2	CXCR3/CD138
CXCL11	4q21.1	I-TAC	I-TAC	CXCR3/CD138
CXCL12	10q11.21	SDF-1 α / β	SDF-1/PBSF	CXCR4/CD184
CXCL13	4q21.1	BCA-1	BLC	CXCR5
CXCL14	5q31.1	BRAK/bolekin	BRAK	unbekannt
(CXCL15)		unbekannt	Lungkin/WECH	unbekannt
CXCL16	17p13			CXCR6

C-Chemokine

XCL1	1q24.2	Lymphotactin	Lymphotactin	XCR1
XCL2	1q24.2	SCM-1 β	unbekannt	XCR1

CX₃C-Chemokine

CX ₃ CL1	16q13	Fractalkine	Neurotactin	CX3CR1
---------------------	-------	-------------	-------------	--------

Einige der Chemokine der CXC-Gruppe zeigen kurz vor den beiden Cysteinen ein gemeinsames Aminosäure-Motiv: E-L-R-C-X-C (Glutamat-Leucin-Arginin-Cystein-X-Cystein). Sie vermitteln primär die Migration Neutrophiler Granulozyten, während CXC-Chemokine ohne diese Sequenz an andere CXC-Rezeptoren binden und vorwiegend auf Lymphozyten wirken (Rovin 2000).

Chemokine vermitteln ihre biologischen Effekte durch einen G-Protein gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen (Holmes, Murphy). Die Aktivierung von Chemokinrezeptoren wird heute in einem 2-Stufen-Modell beschrieben. Im ersten Schritt erkennt das Chemokin den Rezeptor und bindet an ihn. Dem folgt eine Konformationsänderung des Chemokins, hauptsächlich im Bereich des flexiblen aminoterminalen Endes (Crump). Diese Änderung in der Tertiärstruktur erlaubt dann die Interaktion des N-Terminus mit dem Rezeptor, was schließlich zu dessen Aktivierung führt.

Der Aktivierung des Chemokinrezeptors folgt der Austausch von GDP zu GTP in der α -*subunit* des G-Proteins. Dies aktiviert verschiedene Effektormoleküle wie Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG), die eine Kaskade von *signaling events* im Zytoplasma der Zelle in Gang setzen (Mellado). So führt z. B. die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von IP3 zu einer Freisetzung von Calcium-Ionen aus intrazellulären Speichern und zu einer Aktivierung der Phosphokinase C (Howard).

Diese Signalkaskade führt schlussendlich zu physiologischen Prozessen wie Leukozytenmigration, Leukozytendegranulierung, Angiogenese oder -stase (Luther, Mackay, Szekanecz).

1.6. Funktionen von Chemokinen

Um die Rolle der Chemokine im Kontext der Entzündung zu verstehen, muß man vor allem die komplizierten Zusammenhänge der Leukozyten-Endothel-Interaktion genauer betrachten.

Im Schema *rolling, adhesion, transmigration* haben die Chemokine eine zentrale Bedeutung, weil sie auf nahezu allen Ebenen des Prozesses der Extravasation immunkompetenter Zellen eingreifen.

Im Bereich der Entzündung werden von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen Chemokine ausgeschüttet, die, von Endothelzellen präsentiert, ein Signal für *rolling leukocytes* darstellen (Brady, Springer 1995). Diese ausgeschütteten Chemokine sind dann auch im Sinne eines sich selbstverstärkenden Regelkreises für die weitere Sekretion von Chemokinen und für die Hochregulation chemokinpräsentierender Strukturen auf den Endothelzellen verantwortlich. Dabei „kriechen“ die Leukozyten an einem an der Endothelzellmembran gebundenen Chemokingradienten entlang, ein Prozess, der Haptotaxis genannt wird (Rot). Dabei scheint insbesondere dem Chemokin RANTES eine entscheidende Funktion zuzukommen (Wiedermann, Weber C).

Das aktiviert chemotaktisch wirkende Protein des Komplementsystems C5a kann in diesem Prozess auch die vermehrte endotheliale Expression von P-Selektinen induzieren. Zusätzlich sind auf Leukozyten chemokinvermittelt Integrine hochreguliert (Huber, Vaddi). Dies führt zu einer festen Bindung von Leukozyten ans Endothel und schafft damit die Grundlage für deren Extravasation.

Durch die Fähigkeit der Chemokine über Heparansulfat enthaltende Proteoglykane an die endotheliale Zell-Matrix zu binden, fungieren sie auch als direkte leukozytäre Adhäsionsmoleküle an der Oberfläche von Endothelzellen (Bazan, Mack, Tanaka). Die Sekretion chemoattraktiver Substanzen führt also zum einen zu einer größeren Bindungskapazität und zum anderen zu einer festen Bindung von Leukozyten ans Endothel, eine Voraussetzung für deren Extravasation (Hoover).

Durch Chemokine hochregulierte und aktivierte Matrix-Metalloproteinasen sorgen für eine Lyse der Basalmembran (Klier), ein Vorgang, der wiederum die Transmigration der Leukozyten erleichtert (Xia, Johnatty). Durch all diese Mechanismen wird die Transmigration immunkompetenter Zellen aus den Kapillaren ins betroffene Gewebe von chemotaktische Zytokinen ermöglicht und verstärkt.

Dabei werden in Abhängigkeit der Chemokinunterfamilie unterschiedliche Leukozytensubtypen rekrutiert. Während die CC-Familie vorwiegend auf Monozyten und Lymphozyten wirkt, werden von den CXC-Chemokinen eher die Infiltration Neutrophiler Granulozyten und T-Zellen vermittelt (Rovin 2000).

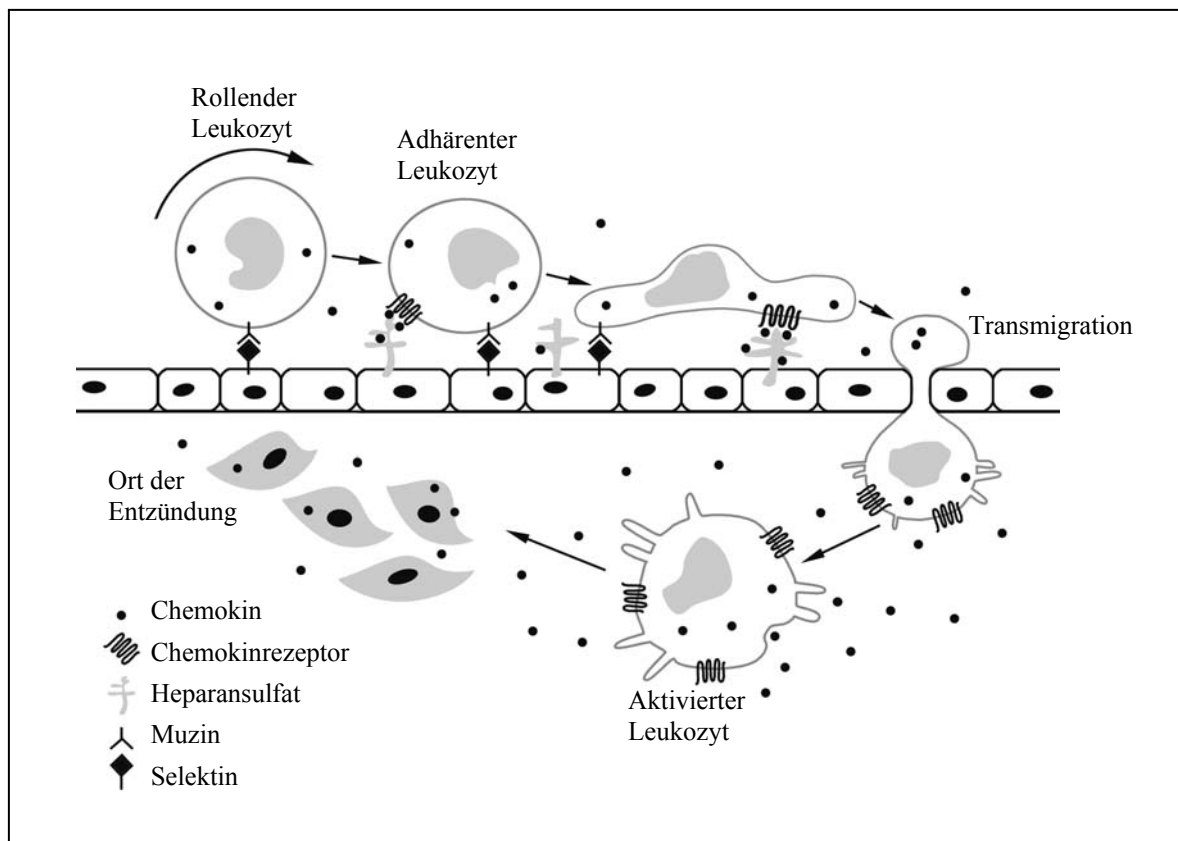


Abbildung 1.1.: Schematische Darstellung des Vorgangs der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe. Chemokine bewirken die Adhäsion der Leukozyten an Endothelzellen. Nach der Extravasation folgen sie einem von Chemokinen gebildeten Konzentrationsgradienten zum Ort der Entzündung.

Nach der Extravasation der immunkompetenten Zellen ins Gewebe folgen sie einem von Chemokinen gebildeten Gradienten zum Ort der Entzündung (Randolph).

Die Funktion der Chemokine geht aber noch weit über die Kontrolle der Transmigration von Leukozyten hinaus. Das Chemokin GRO- α (Growth-related-Oncogene- α) wurde ursprünglich als autokriner Wachstumsfaktor für Melanomzellen identifiziert (Richmond). Der CXC-Rezeptor 2 (CXCR-2) Ligand Interleukin-8 ist nicht nur ein *chemoattractant*,

sondern war ebenso wie RANTES zunächst als Stimulus für die Ausschüttung von Granula aus neutrophilen Granulozyten bekannt (Peveri, Kuna). Chemokine wirken auch bei der Hämatopoese (Butcher), der B-Zell-Lymphopoese und der Myelopoese (Nagasawa). Auch der Einfluß einiger CXC-Chemokine auf die Angiogenese konnte gezeigt werden (Belperio).

1.7. Chemokine und Niere

In vitro-Studien

Die Tatsache, dass die Induktion der Synthese und Expression von Chemokinen bei Verletzungen des glomerulären und interstitiellen Kompartiments sehr schnell vonstatten geht, macht diese Peptide zu potenten Mediatoren entzündlicher Nierenerkrankungen (Takemura, Tam). Das und die Beobachtung, dass kultivierte renale Parenchymzellen unter bestimmten Stimulationsbedingungen biologisch aktive Chemokine sezernieren können, legte die Vermutung nahe, dass sie im Verlauf entzündlicher Nierenerkrankung eine Rolle spielen könnten.

In vielen Studien wurde gezeigt, dass nicht nur RANTES und MCP-1, sondern auch IL-8, MIP-2, IP-10 und viele weitere Chemokine unter Stimulation mit diversen Zytokinen, wie z.B. IFN- γ und TNF- α , ausgeschüttet werden (Prodjosudjadi, Rovin 1992, Satriano, Wolf 1993 und 1997, Zoja). Dies beschränkt sich nicht auf Mesangialzellen, auch Tubuluszellen und glomeruläre Zellen endothelialen Ursprungs sind in der Lage, chemotaktische Zytokine zu produzieren und zu sezernieren.

Dabei scheint die differenzierte Expression von Chemokinen *in vitro* unabhängig vom aktiven Stimulus zu sein. Die Ergebnisse, dass renale Zellen verschiedene Chemokine als Antwort auf den gleichen Stimulus produzieren, stehen im Gegensatz zu Beobachtungen *in vivo*, die zeigen, dass man im zeitlichen Verlauf einer Entzündung sehr spezifisch verschiedene Chemokin- und Rezeptorexpressionen und entsprechend infiltrierende Leukozytenpopulationen detektieren kann. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass die Chemokinproduktion und -wirkung im Kontext der Entzündung gesehen werden muss, ein Prozess, der weitaus komplexer ist als die Situation in der Zellkultur.

Aber nicht nur Zytokine induzieren in Mesangialzellen die Produktion und Sekretion von Chemokinen. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass hitzeaggregiertes IgG,

ein Stimulus für den Fc-Rezeptor, in murinen Mesangialzellen MCP-1 hochreguliert (Hora, Satriano). Im Gegensatz zu murinen, exprimieren humane Mesangialzellen normalerweise keine Fc-Rezeptoren. Unter geeigneter Stimulation mit IFN- γ und Endotoxin kann dieser aber an der Zelloberfläche humaner Mesangialzellen nachgewiesen werden (Radeke). Da durch Immunkomplexe aktivierte immunkompetente Zellen in der Lage sind, das benötigte Milieu zu schaffen (Marsh), ist dieser Vorgang wahrscheinlich auch bei humanen Erkrankungen von Bedeutung.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass auch alle anderen Zellen renalen Ursprungs unter entsprechender Stimulation Chemokine synthetisieren und sezernieren. Dies läßt auf vielfältige Funktionen bei pathologischen Geschehen in der Niere schließen.

In vivo-Studien

Basierend auf den *in vitro*-Daten wurde die Expression von Chemokinen in einer ganzen Reihe tierexperimenteller Modellerkrankungen untersucht (Anders 2001, Gomez-Chiarri, Perez de Lema, Rovin 1994, Schmouder, Vielhauer). Die Relevanz der tierexperimentellen Studien für die humanen Nierenerkrankungen wurde durch zahlreiche Studien humaner Biopsien bestätigt (Segerer 1999 und Jan 2000).

Diese und auch Studien anderer Gruppen zeigen, dass Chemokine auf der Ebene der mRNA und der Proteine sowohl bei glomerulärer als auch bei interstitieller Schädigung der Niere hochreguliert sind, während sie in gesunden Nieren nicht nachweisbar sind. Dabei ist den meisten Modellen die Infiltration von Leukozyten gemein. Daten der *in situ*-Hybridisierung zeigen aber nicht nur die Expression von Chemokinen durch immunkompetente Zellen, sondern auch von Zellen des renalen Parenchyms – eine Bestätigung der *in vitro*-Daten. Auffallend ist dabei die Tatsache, dass dieser Vorgang auf das jeweilig betroffene Kompartiment der Niere (Glomerulus oder Interstitium) beschränkt ist (Anders 2003).

Tiermodelle

Im Modell der *nephrotoxic serum* Nephritis ist die mRNA von RANTES, MCP-1, IP-10 und weiteren Chemokinen hochreguliert (Lloyd, Topham). Nach Verhinderung der Leukozyteninfiltration durch Bestrahlung oder Gabe eines Antiserums vor Induktion der Erkrankung konnte zwar initial eine Reduktion der glomerulären mRNA-Expression für

diverse chemotaktische Zytokine gezeigt werden (Rovin 1994), zu späteren Zeitpunkten war die Expression aber mit den Mäusen, deren Glomeruli durch Leukozyten infiltriert waren, vergleichbar (Wu). Die Infiltration von Leukozyten ist also für die Chemokinexpression und den Verlauf der Erkrankung von Bedeutung. Eine andere Studie zeigte dagegen, dass drei Stunden nach Gabe des Anti-Serums ein Großteil der mRNA für MCP-1 durch Zellen renalen Ursprungs und nicht durch infiltrierende immunkompetente Zellen exprimiert wurden. Später dagegen waren die MCP-1 exprimierenden Zellen hauptsächlich Monozyten (Tang 1996). Diese Daten suggerieren, dass bei Schädigung des Glomerulus die initiale Chemokinproduktion und -sekretion durch intrinsische renale Zellen erfolgen kann und nach der Infiltration durch immunkompetente Zellen von diesen übernommen bzw. verstärkt wird.

Auch in anderen Tiermodellen wie dem Lupus oder dem Modell der *Anti-Thy-1*-Nephritis wurden Studien mit Leukozytendepletion durchgeführt. Dabei korrelierte die Chemokinproduktion regelmäßig mit der Anzahl der immunkompetenten Zellen im Bereich der Entzündung (Jocks, Stahl, Tang 1995, Wu).

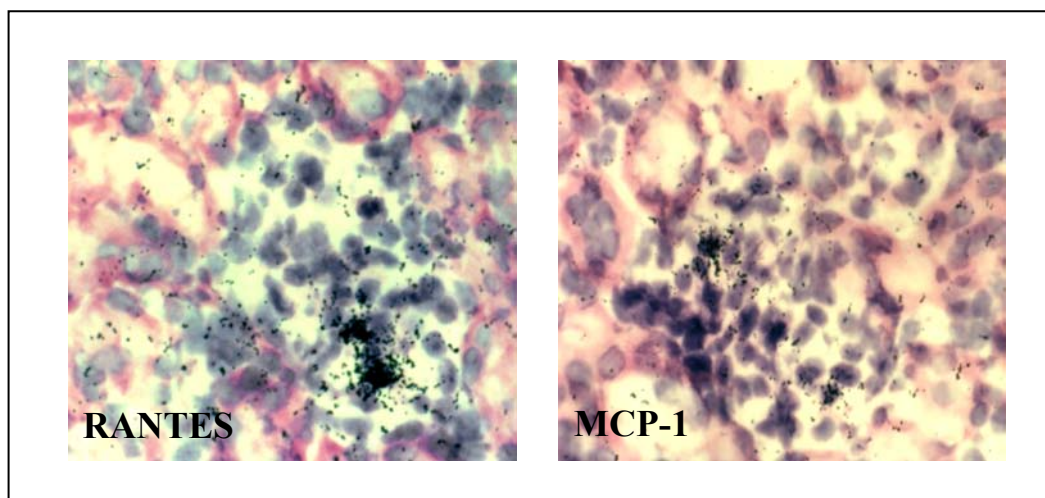


Abbildung 1.2.: In situ Hybridisierungen von Nierengewebe für RANTES und MCP-1 (Vergrößerung 600×). Nach täglicher Injektion von Apoferritin über den Zeitraum von zwei Wochen beschränken sich die Expressionen auf das Glomerulus (Anders 2001).

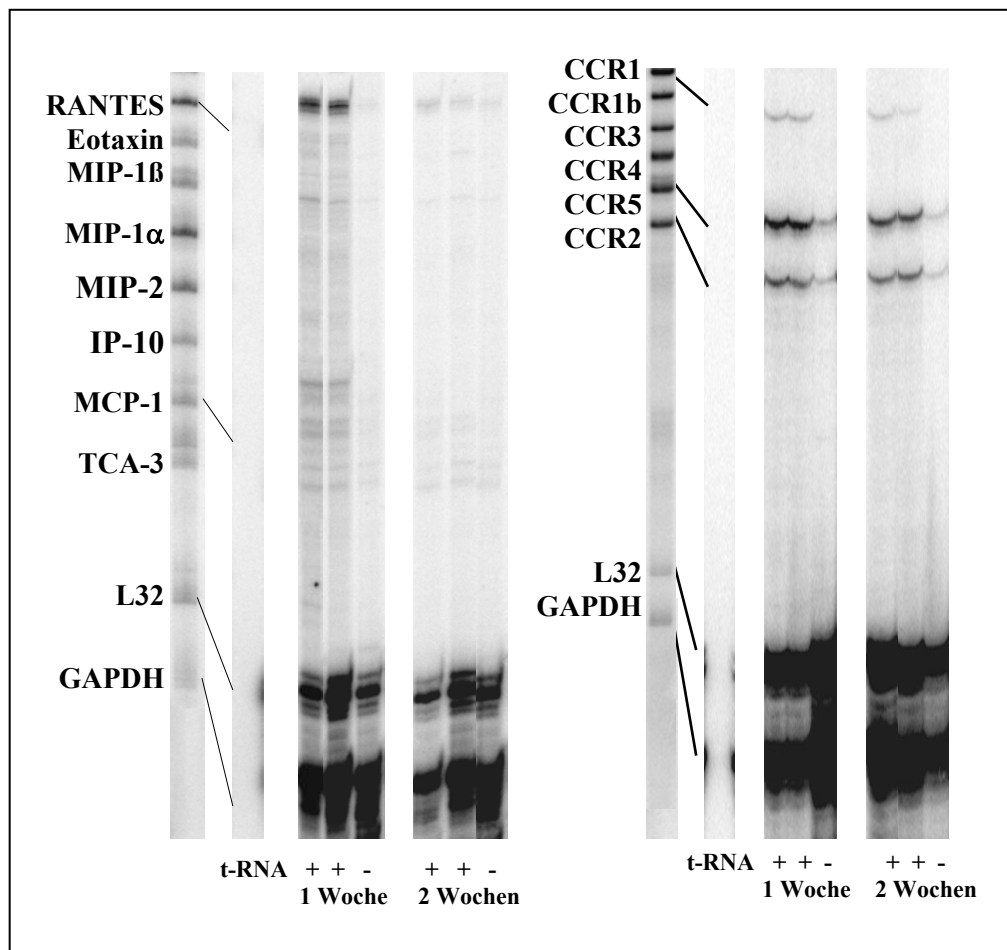


Abbildung 1.3.: *RNase Protection Assay* von RNA aus den Nieren von Mäusen mit Apoferritin-induzierter Immunkomplex-Glomerulonephritis. Nach 14 Tagen sind die Chemokine RANTES und MCP-1 sowie ihre Rezeptoren CCR 1, 2 und 5 hochreguliert (Anders 2001).

In dem in der vorgelegten Studie verwendeten Modell wird eine Immunkomplex-Glomerulonephritis durch die tägliche intraperitoneale Injektion des Fremdproteins *horse spleen apoferritin* (HAF) über 14 Tage induziert. Im Glomerulus, finden sich nach sieben Tagen die durch in-situ- Hybridisierungen und *RNase Protection Assays* nachgewiesenen Expressionen der mRNA von RANTES und MCP-1 (siehe Abbildung 1.2.). Parallel sind auch die Chemokinrezeptoren 1, 2 und 5 in den Glomeruli hochreguliert (siehe Abbildung 1.3.). Zum Zeitpunkt des maximalen leukozytären Zellinfiltrats nach 14 Tagen ist sowohl die Expression der beiden Chemokine als auch die der Chemokinrezeptoren bereits wieder herunterreguliert (Anders 2001).

Eine gesteigerte mesangiale Proliferation läßt sich in diesem Modell ebenso nachweisen wie die Ablagerung von Immunkomplexen im Glomerulus erkrankter Tiere. Die Infiltration der immunkompetenten Zellen und die Zellproliferation sind ausschließlich auf das Glomerulus beschränkt. Zusätzliche funktionelle Veränderungen wie eine Proteinurie sind ebenfalls charakteristisch für dieses Krankheitsmodell. (Anders 2001).

Humane Erkrankungen

Die Untersuchung humaner Nierenbiopsien hat gezeigt, dass Chemokine und ihre Rezeptoren im Verlauf vieler Erkrankungen vermehrt exprimiert werden. Insbesondere die Chemokine RANTES und MCP-1 scheinen eine große Rolle zu spielen.

Bei der IgA-Nephritis zeigte sich eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Expression von MCP-1. In leichten Fällen war MCP-1 kaum nachweisbar, in schweren Fällen mit monozytärem interstitiellem Infiltrat zeigte sich eine starke Expression für das Protein (Grandaliano 1996). Dabei ging die nachweisbare MCP-1 Expression mit einer signifikant reduzierten Nierenfunktion einher (Yamauchi). Auch in proliferativen Glomerulonephritiden fand sich auf RNA-Ebene die Expression verschiedener Chemokine, wie RANTES, MCP-1, MIP-1 α und β (Cockwell).

Während der akuten Abstoßung von Nierentransplantaten kann ein mononukleäres Zellinfiltrat, hauptsächlich bestehend aus T-Zellen und Makrophagen, nachgewiesen werden (Hall). In dieser entzündlichen Reaktion sind Chemokine ebenfalls involviert. Bei histologischen Untersuchungen von Biopsien ließen sich z.B. die Chemokine IL-8, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES detektieren (Budde, Grandaliano 1997, Pattison, Robertson). RANTES ist ein in diesem Zusammenhang oft untersuchtes Chemokin und wurde in vielen Studien sowohl auf infiltrierenden als auch intrinsischen Zellen gefunden (von Luetlichau).

Aber auch durch nichtinvasive Methoden wurden humane renale Erkrankungen auf ihre Chemokinexpression hin charakterisiert. In vielen Studien wurden die Konzentrationen von Chemokinen im Urin untersucht. Die Konzentrationen von MCP-1 wurden in diversen Glomerulopathien bestimmt, die höchsten Werte wurden bei entzündlichen Erkrankungen, wie der Lupusnephritis oder der infektassoziierten GN detektiert. Sie korrelierten dabei sowohl mit der Zahl der infiltrierenden Monozyten als auch mit der glomerulären Destruktion

(Rovin 1996, Yokoyama). Der Nachweis, dass die Chemokine von intrinsischen renalen Zellen produziert und nicht aus dem Plasma ins Primärfiltrat gelangt sind, wurde durch in situ-Hybridisierungen und Korrelation mit der entsprechenden Konzentration im Plasma erbracht.

1.8. Blockade von Chemokinrezeptoren als Therapiemöglichkeit entzündlicher Nierenerkrankungen

Es erscheint als Therapieprinzip sinnvoll, die Migration von Leukozyten aus dem Blut ins Gewebe spezifisch am Ort der Entzündung zu blockieren, anstatt eine generelle systemische Immunsuppression durchzuführen. Diese Idee hat Chemokine und ihre Rezeptoren ins Blickfeld des Interesses gerückt, da sie - lokal wirkend - eine entscheidende Rolle bei der Regulation des *leukocyte trafficking* spielen. Eine Blockierung dieser Chemokinwirkung ermöglicht eine selektive Immunsuppression.

Dabei ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, die Wirkung der Chemokine zu unterbinden.

Hemmung der Chemokinexpression auf RNA-Ebene

Eine Hemmung der Chemokinproduktion ist über eine Blockierung von NF- κ B und der Proteinkinase p38 (Goebeler), zwei wichtigen Faktoren bei der Transkription von MCP-1, RANTES und anderen Cytokinen, möglich. Geeignet scheinen in diesem Zusammenhang ACE-Hemmer (Ruiz-Ortega, Hisada), HMG-CoA-Reduktase-Hemmer (Ortego) und Bioflavonoide (Ishikawa). Auch Steroide haben ihre Fähigkeit, die Genexpression von Chemokinen zu unterbinden, in einem Reperusionsmodell bewiesen (Shoskes). Aufgrund der systemischen immunsuppressiven Wirkung stellen sie jedoch keinen spezifischen Ansatz dar.

Blockierende Antikörper

Die Neutralisation der biologischen Aktivität von bereits ausgeschütteten Chemokinen gelingt z. B. mit Antikörpern (Yang X-D), Proteinen des Poxvirus (Alcami, Lalani) und Glykosaminoglykanen (Douglas). Bei letzteren macht man sich die physiologische Bindung

zwischen Chemokinen und an Zelloberflächen haftenden Glykosaminoglykanen zunutze, die bei der Haptotaxis eine Rolle spielen.

Als weitere Möglichkeit bietet sich die Antagonisierung der Chemokinrezeptoren an. Zur Zeit sind drei Substanzgruppen bekannt, die in der Lage sind Chemokinrezeptoren zu blockieren.

Virale Proteine

Die Fähigkeit von Viren, Proteine zu produzieren, die in der Lage sind, an Chemokinrezeptoren als Antagonisten und partielle Agonisten zu wirken, nutzt ihnen auf zweierlei Arten. Zum einen schützt es die Viren vor der Immunantwort des infizierten Organismus, zum anderen dient es der Anlockung erforderlicher *target cells*. Ein Beispiel ist das mit dem Karposi-Sarkom assoziierten Humane Herpesvirus-8 (HHV-8), das in der Lage ist, drei chemokinähnliche Substanzen zu synthetisieren (vMIP-I, -II, III), die viele Chemokinrezeptoren blockieren, aber auch einige aktivieren können (Boshoff, Sozzani, Stine). In ähnlicher Weise sind andere Viren in der Lage, solche Proteine zu produzieren (Carfi, Parry).

Chen et al. verwendeten eine dieser Substanzen (vMIP-II) im Modell einer Anti-GBM-Glomerulonephritis in Ratten. Dabei zeigte sich unter der Behandlung mit dem Antagonisten eine Reduzierung des entzündlichen Infiltrats bestehend aus Makrophagen und T-Zellen um 50 %. Auch verbesserte vMIP-II in diesem Modell die funktionellen Parameter wie die Proteinurie und die Serumkreatininwerte um 2/3.

Niedermolekulare Antagonisten

Mehrere nichtpeptidische, niedermolekulare Antagonisten, die Chemokinrezeptoren spezifisch blockieren, wurden in den letzten Jahren entwickelt (Hesselgesser, Horuk, Baba). Einzig ein Antagonist gegen CCR 1 wurde bisher in einem Modell für entzündliche Nierenerkrankungen verwendet (Anders 2002). Im Modell der unilateralen Ureterobstruktion bewirkte der Antagonist eine Reduktion des interstitiellen Makrophagen- und Lymphozyteninfiltrats um ca. 50-60%. Marker der renalen Fibrose, wie die Anzahl der interstitiellen Fibroblasten und die Proteinexpression von Kollagen I, waren ebenfalls

signifikant reduziert. Interessanterweise erwies sich der Antagonist auch noch nach der Initiation der Fibrose als wirksam.

N-terminal modifizierte Chemokine

Die N-terminale Modifikation von Chemokinen durch Hinzufügen oder Deletion von Aminosäuren oder Hinzufügen einer funktionellen chemischen Gruppe kann zu antagonistischen Eigenschaften des veränderten Chemokins führen (Gong, Mack, McColl, Proudfoot 1996).

Die in dieser Weise veränderten Chemokinabkömmlinge AOP-RANTES (Simmons) und Met-RANTES (Proudfoot 1996; siehe Abbildung 1.4.) konnten ihre protektive Wirkung bereits in einem Nierentransplantationsmodell (Gröne), einer Anti-GBM-Glomerulonephritis (Lloyd) und in der Anti-Thy-1-Nephritis (Panzer) zeigen. Bei verschiedenen tierexperimentellen Glomerulonephritiden fanden sich neben einer geringeren Leukozyteninfiltration und Proteinurie (Lloyd) auch eine geminderte Ablagerung von Kollagen IV (Panzer). Die Behandlung mit Met-RANTES reduzierte in einem akuten Abstoßungsmodell nach einer Nierentransplantation in der Ratte pathologische Veränderungen im Bereich der Gefäße und der Glomeruli (Gröne). Beide Substanzen haben also bereits *in vitro* ihre Potenz Chemokinrezeptoren zu blockieren bewiesen und auch Experimente *in vivo* haben Effekte im therapeutischen Sinne zeigen können.

Die Blockierung von Chemokinrezeptoren durch entsprechende Antagonisten gilt unter den beschriebenen Möglichkeiten als die vielversprechendste therapeutische Option, weil mit der Blockierung eines einzelnen Rezeptors der Effekt mehrerer Liganden verhindert werden kann. Dies geht über die Neutralisation eines einzelnen Chemokins z. B. mittels eines Antikörpers hinaus. Aber auch die Inhibierung spezieller Chemokine (z. B. *fractalkine*) könnte in der Zukunft nach genauerer Charakterisierung eine interessante Interventionsmöglichkeit darstellen.

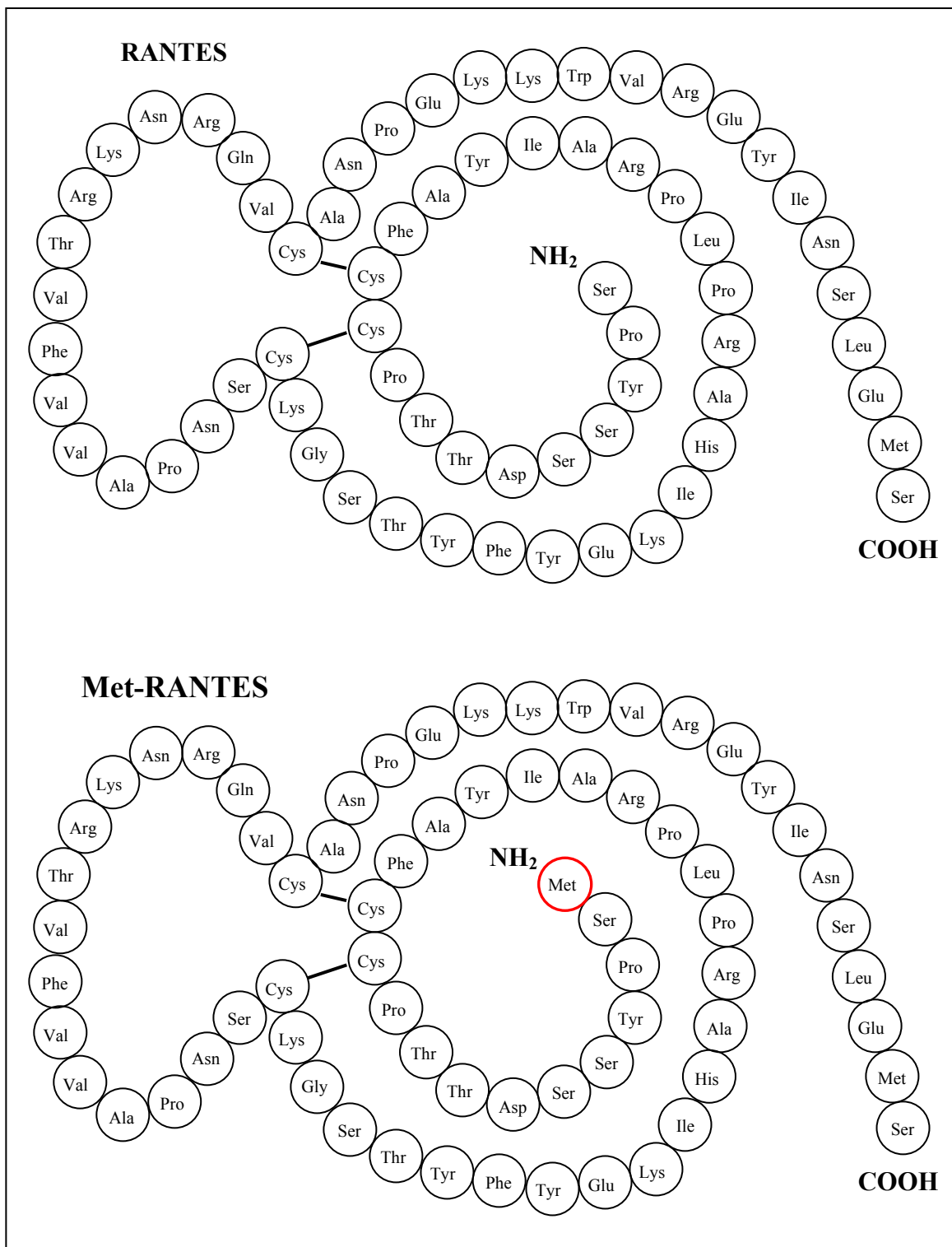


Abbildung 1.4.: Aminosäuresequenz und Sekundärstrukturen der Proteine RANTES und Met-RANTES. Die Sekundärstruktur wird von zwei Disulfidbrücken zwischen den vier konservierten Cysteinresten der CC-Chemokine stabilisiert.

Bei vielen humanen Nierenerkrankungen sowie in verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass von den Chemokinen insbesondere MCP-1, RANTES, MIP-1 α und IL-8 sowie ihre Rezeptoren CCR 1, CCR 2 und CCR 5 im Verlauf hochreguliert sind. (Perez de Lema, Schadde, Segerer *Dec* 2000, Vielhauer, Wada, Yokoyama). Dementsprechend erscheint auch eine Blockierung dieser Chemokine bzw. ihrer Rezeptoren als vielversprechender therapeutischer Ansatz bei renalen Erkrankungen.

1.9. Fragestellung

Aufgrund des Infiltrationsmechanismus immunkompetenter Zellen und unter Berücksichtigung der bisher veröffentlichten Daten sollten die Antagonisten AOP-RANTES und Met-RANTES zur Klärung der Funktion des Chemokinrezeptors 5 im Verlauf der experimentellen HAF-Glomerulonephritis beitragen.

Nach Blockierung des Chemokinrezeptors CCR 5 - und damit einem der entscheidenden Faktoren des *leukocyte trafficking* (Weber C) - durch die RANTES-Antagonisten ist eine Reduzierung des glomerulären leukozytären Zellinfiltrats zu erwarten.

Nachdem bekannt ist, dass die Inaktivierung und Entfernung von immunkompetenten Effektorzellen Voraussetzungen für das Verhindern der Chronifizierung entzündlicher Erkrankungen sind, ist insgesamt eine leichtere entzündliche Reaktion zu erwarten (Bohle, Segerer *Jan* 2000). Durch die damit verbundene geringere Sekretion proinflammatorischer Mediatoren sollte ein wichtiger, sich selbst verstärkender Rückkopplungsmechanismus blockiert sein. Da diese und andere Botenstoffe mit zelltoxischem Charakter zur Gewebsdestruktion, wie z. B. Apoptose führen (Mangan), sind auf diesem Weg geringere histopathologische Schäden und eine deutlich geminderte Destruktion des Nierenparenchyms zu erwarten. Den geringeren histopathologischen Veränderungen sollten auch weniger funktionelle Einschränkungen folgen.

Als primäre Endpunkte sind der Einfluß der RANTES-Antagonisten auf die Infiltration immunkompetenter Zellen als Ausdruck der zellulären Immunantwort und auf die histopathologische Schädigung definiert. Weiterhin untersucht werden Veränderungen der humoralen Immunantwort und die Auswirkungen all dieser Veränderungen auf funktionelle Parameter wie die Proteinurie.

2. Material und Methoden

2.1. Tierhaltung und tierexperimentelle Methoden

2.1.1. Tierhaltung

Für die Experimente wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Stammes Balb/c mit einem Gewicht von 18-22 g von der Firma Charles River, Sulzfeld, Germany verwendet. Nach dem Eintreffen wurden je maximal 5 Tiere in Macrolon Typ III Käfige gesetzt und ihnen Wasser und Futter (mouse diet, Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) nach Belieben zur Verfügung gestellt. Die ausreichende Versorgung mit frischem Wasser und Futter wurde täglich kontrolliert. In gleichen Intervallen wurde auf die Sauberkeit der Käfige und den Zustand der Tiere geachtet. Die Käfige wurden mindestens zweimal pro Woche gereinigt und das Streu gewechselt. Die Mäuse waren in einem geeigneten Stall untergebracht, in dem die Temperatur von 20-22°C und eine Luftfeuchtigkeit von 50-60% konstant gehalten wurden. Bei einem Hell-Dunkel Rhythmus von 12 Stunden wurde darauf geachtet, Manipulationen an den Tieren immer zur gleichen Zeit durchzuführen.

Bis zu Beginn des Experimentes wurde den Tieren jeweils mindestens 10 Tage Zeit gegeben, sich vom Stress des Transportes zu erholen und sich an die neue Umgebung zu gewöhnen.

2.1.2. Studiendesign

Im Zuge dieser Studie wurden sieben Gruppen untersucht, die wie folgt über einen Zeitraum von 14 Tagen intraperitoneal injiziert wurden:

Gruppe I: Diese Tiere erhielten lediglich 100 µl physiologische Kochsalzlösung.

Gruppe II: Die Mäuse dieser Gruppe erhielten Met-RANTES in der Dosierung von 40 µg, gelöst in 50 µl *Aqua ad iniectabilia* und 200 µl physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl), um einen möglichen nephrotoxischen Effekt dieser Substanz nachweisen zu können.

Gruppe III: Diese Gruppe erhielt täglich 10 µg AOP-RANTES, ebenfalls in 50 µl *Aqua ad iniectabilia* und 200 µl physiologischer Kochsalzlösung gelöst, mit dem Ziel, einen alleinigen Effekt auf die Niere ausschließen zu können.

Gruppe IV: In der Kontrollgruppe wurde die Immunkomplex-Glomerulonephritis durch die tägliche intraperitoneale Injektion von 5,1 mg des Fremdproteins *horse spleen apoferritin*

erzeugt. Zusätzlich erhielten die Tiere 250 µl physiologische Kochsalzlösung (Volumenäquivalent der Antagonistenlösung).

Gruppe V: Auch in diesen Tieren erfolgte die Induktion der Erkrankung mit 5,1 mg Apoferritin. Zusätzlich erhielten diese Tiere täglich 10 µg des Chemokinantagonisten Met-RANTES, ebenfalls gelöst wie in Gruppe II, intraperitoneal injiziert.

Gruppe VI: Auch in dieser Gruppe entwickelten die Mäuse die Immunkomplex- Glomerulonephritis aufgrund der täglichen Injektion des Fremdproteins wie in Gruppe IV. Weiterhin bekamen die Mäuse den Antagonisten in höherer Dosierung (40 µg Met-RANTES ebenfalls in 50 µl *Aqua ad iniectabilia* und 200 µl 0,9%-iger NaCl-Lösung gelöst).

Gruppe VII: Die Tiere erhielten neben dem Antigen in der obigen Dosierung täglich 10 µg AOP-RANTES (gelöst wie in Gruppe III) intraperitoneal appliziert.

2.1.3. Narkotisierung der Mäuse und Blutentnahme

Für jede Blutentnahme und auch vor der Tötung wurden die Tiere mit einem bei tierexperimentellen Studien üblichen antagonistisierbaren Narkosegemisch (siehe Tabelle 2.1. und 2.2.), das eine ausreichende Sedierung und Analgesie gewährleistet, narkotisiert. Ziel war es, die Belastung für und das Leiden der Tiere möglichst gering zu halten. Verwendet wurden folgende für diese Narkose handelsübliche Medikamente:

Tabelle 2.1. Medikamente für Narkotisierung der Mäuse

Substanz	Handelsname	Dosis	Wirkung
Fentanyl	Fentanyl Hexal®	0,05 mg/kg KG	analgetisch
Midazolam	Dormicum®	5 mg/kg KG	sedierend, anxiolytisch
Medetomidin	Domitor®	0,5 mg/kg KG	analgetisch, myorelaxierend

Desinfektion

Das vor jeder Manipulation frisch angesetzte Narkosegemisch wurde den Tieren intraperitoneal injiziert. Nach dem Fixieren der Maus mit der linken Hand wurde die

Bauchdecke mit einem handelsüblichen Desinfektionsspray vorbereitet. Eine ausreichende Narkosetiefe durch die anschließende Injektion nach etwa 10 – 20 Minuten erreicht.

Blutentnahme

Mit einer dünnen heparinisierten Glaskapillare (Bayer, São Paulo, Brazil) wurde am medialen Augenwinkel der retrobulbäre Venenplexus punktiert. Durch vorsichtiges Rotieren der Kapillare wurde eine leichte Verletzung des Plexus herbeigeführt und das aufgrund des Kapillareffektes abfließende Blut konnte in einem geeigneten Reaktionsgefäß gesammelt werden. Nach dem Entfernen der Kapillare sistierte die Blutung innerhalb kürzester Zeit durch den physiologischen Druck des Bulbus auf den medialen Augenwinkel.

Antagonisierung der Narkose

Nach erneuter sorgfältiger Desinfektion und der subkutanen Injektion des Antagonistengemisches wurden die Tiere im Käfig unter eine Infrarot-Wärmelampe gelegt und erwachten innerhalb weniger Minuten. Ohne Antagonisierung dauert die Narkose je nach Temperatur zwischen 1,25 bis 3 Stunden an.

Tabelle 2.2. Medikamente für die Antagonisierung der Narkose

Substanz	Handelsname	Dosis	Antagonist von
Naloxon	Narcanti®	1,2 mg/kg KG	Fentanyl
Flumazenil	Anexate®	0,5 mg/kg KG	Midazolam
Atipamezol	Antisedan®	2,5 mg/kg KG	Medetomidin

2.1.4. Gewebeentnahme

Am Tag 0 und 14 des Experiments wurde der Spontanurin der Mäuse untersucht und zusätzlich am Schluss des Experiments wie beschrieben unter Narkose Blut aus dem Retroorbitalplexus gewonnen. Danach wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Nieren und Milzen nach einer medianen Bauchlaparatomie entnommen (siehe Abbildung 2.1.).

Die mediane Laparatomie wurde unter weitgehend sterilen Bedingungen durchgeführt. Nach der Desinfektion der Bauchregion mit Sterilium wurde das Fell mit der Pinzette gegriffen und die Bauchdecke auf einer Länge von ca. 2,5 cm mit einem Skalpell eröffnet. Zur besseren Übersicht wurden die beiden Hautlappen beidseits mittels Kanülen an der Unterlage fixiert. Nach der Präparation des Konvoluts auf die linke Seite wurde die rechte Niere dargestellt. Nach deren Mobilisierung aus dem umgebenden Fettgewebe wurde sie mit einer Schere am Gefäßstumpf abgesetzt. Sofort nach der Entnahme wurde vom oberen Pol ein kleines Stück mit einem Skalpell abgetrennt und für die Elektronenmikroskopie fixiert (siehe Kapitel 2.3.1.). Der restliche Teil wurde in einer 4 %-igen Formalinlösung für weitere histologische Verfahren aufbewahrt. Auf der linken Seite wurde die Nephrektomie in gleicher Weise vorgenommen. Die linke Niere wurde in zwei gleiche Hälften geteilt und jeweils für Kryotomsschnitte oder die RNA-Isolation in geeigneten Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

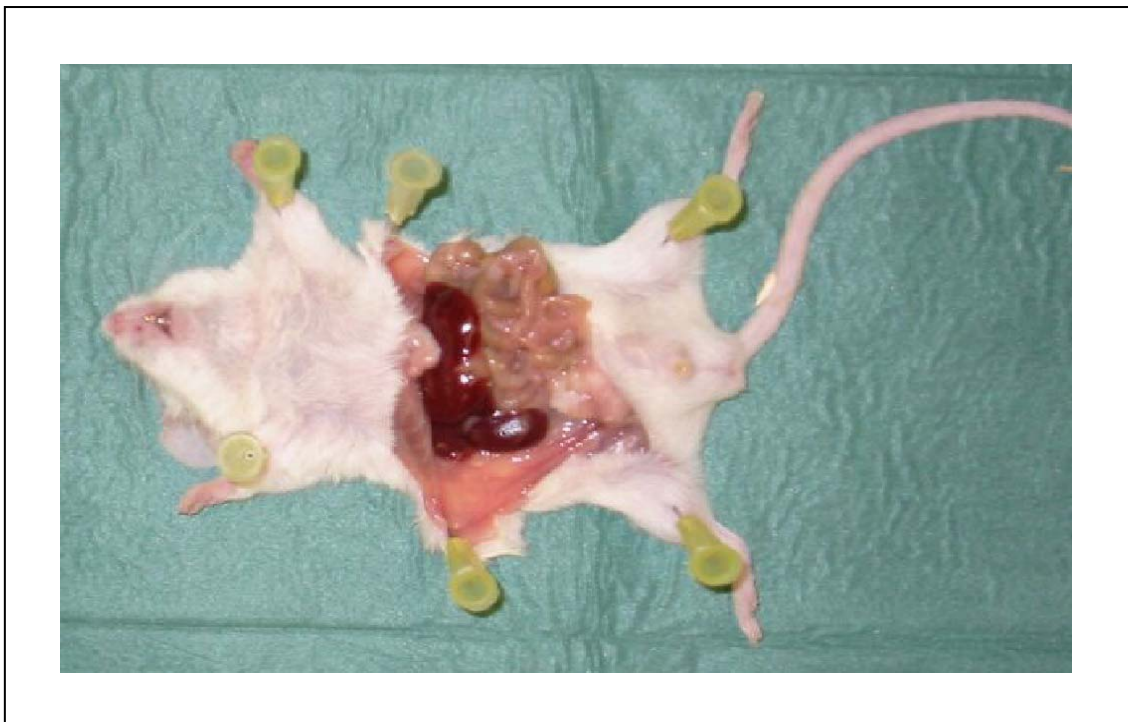


Abbildung. 2.1. Fixierte Maus. Mediane Laparatomie mit mobilisiertem Konvolut nach zervikaler Dislokation.

Bei allen Tieren wurde nach der beidseitigen Nephrektomie die Milz entnommen. Das

Konvolut wurde nach kaudal mobilisiert und die Milz stumpf aus dem umliegenden Gewebe präpariert und anschließend ebenfalls mit einer Schere am Gefäßstiel abgesetzt. Bis zur Weiterverarbeitung für die Zellisolation wurde sie max. eine halbe Stunde in eisgekühltem *Paris Buffer* aufbewahrt.

2.1.5. Thioglykolat-Peritonitis

Für die Untersuchung der Phagozytosefähigkeit von Makrophagen wurde das etablierte Modell einer durch Thioglykolat induzierten abakteriellen Peritonitis verwendet (Taylor PR).

Induziert wurde sie durch die einmalige intraperitoneale Injektion von 1,5 ml einer 4 %-igen Thioglykolat-Lösung in Mäuse des Stammes Balb/c. Bei diesem Modell sind nach 96 Stunden Makrophagen in die Bauchhöhle eingewandert und können durch eine Peritoneallavage gewonnen werden.

Peritoneallavage

Nach 96 Stunden wurden die Tiere in bereits beschriebener Weise narkotisiert (siehe Kapitel 2.1.3.), durch zervikale Dislokation getötet und eine Peritoneallavage durchgeführt.

Nach der Fixierung der Maus auf der Unterlage (siehe auch Abbildung 2.1.) wurde eine mediale Laparatomie der Bauchdecke von der Symphyse bis zum Brustbein durchgeführt. Durch stumpfe Präparation wurde die Subkutis mit der Bauchmuskulatur vorsichtig vom Peritoneum gelöst, ohne es zu penetrieren. Mit einer kleinumigen Kanüle (26G $\frac{1}{2}$: 0,45 × 13) wurden 4 ml eisgekühltes PBS in die freiliegende Bauchhöhle injiziert und die Maus für 20 Sekunden auf der Unterlage gevortext. Danach wurde die Flüssigkeit mit einer großlumigen Kanüle (21G $\frac{1}{2}$: 0,8 × 40) wieder aus der Bauchhöhle aspiriert und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.2. Funktionelle Parameter der Nierenfunktion

2.2.1. Proteinurie

Das verwendete Kit Albuwell M (Exocell, Philadelphia, USA) ermöglicht die quantitative Bestimmung ausgeschiedenen Albumins im Urin als Maß für die Proteinurie von Mäusen.

Nach der Gewinnung wurde der Urin sofort bei 2000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert (Heraeus Biofuge 15, VWR International, Darmstadt, Deutschland), um falsche Messungen durch Verunreinigungen zu verhindern.

Die zugrunde liegende Technik des kompetitiven ELISA's zeichnet sich dadurch aus, dass der Boden des Reaktionsgefäßes, in dem die Inkubation von zu messender Probe und Antikörper stattfindet, mit der zu detektierenden Substanz beschichtet ist. Während der Inkubation konkurrieren gelöstes und am Boden gebundenes Antigen nach den Gesetzen der Thermodynamik um die Bindung an den Antikörper. Nach dem Auswaschen der gelösten Antigen-Antikörper-Komplexe kann der am gebundenen Antigen haftende Antikörper mittels einer Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Dabei verhält sich die Farbintensität umgekehrt proportional zur Antigenkonzentration der Probe.

Dem Protokoll des Herstellers folgend wurden die Testproben in einer Verdünnung von 1:13 bzw. 1:50 zusammen mit einem rabbit Anti Murin Albumin-Antikörper in eine mit murinem Albumin beschichtete 96-well plate pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten folgte die Zugabe eines horseradish-Peroxidase gekoppelten Anti-Rabbit-Antikörper, der an die Anti-Albumin-Antikörper bindet. Auch bei diesem Schritt wurde für eine halbe Stunde inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS und 0,05 % Tween wurde für 8 Minuten ein Chromogensubstrat (Tetramethylbenzidin) hinzugefügt. Die Zugabe von 2 N H₂SO₄ stoppte diesen Entwicklungsvorgang.

Gemessen wurde die Absorption an einem precision microplate reader (Emax, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der Software SOFTmax Pro Ver. 1.2.0..

Anhand eines Standards wurde dann die Albuminkonzentration unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt.

2.2.2. Serumparameter

Das Serum wurde durch Zentrifugieren (5000 U/min für 5 Minuten, Heraeus Biofuge 15) des heparinisierten Vollblutes gewonnen.

Die Serumkonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff wurden mit Hilfe eines Hitachi Autoanalyzers gemessen.

2.3. Histologische Analysemethoden

2.3.1. Gewebeaufbereitung

Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden Objektträger zwei Mal für je fünf Minuten in Aceton und danach ebenfalls für fünf Minuten in APES-Lösung gewaschen. Nach zweimaligem Spülen mit destilliertem Wasser wurden sie für zwölf Stunden getrocknet.

Von der oberen Hälfte der rechten Niere wurde ein Stück des Pols abgeschnitten und zwei Stunden in 1,1 M Cacodylsäure mit 2,5 % Glutaraldehyd fixiert. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Gewebe in 1,1 M Cacodylsäure aufbewahrt. Der restliche Teil wurde in 4 %-igem phosphatgepuffertem Formalin fixiert und danach in Paraffin eingebettet.

Die Elektronenmikroskopie und die Einbettung in Paraffin erfolgte freundlicherweise durch die Abteilung für Zelluläre und Molekulare Pathologie von Prof. Dr. H.-J. Gröne im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg.

Von dem paraffinierten Gewebe wurden mit einem Schneidegerät (Jung CM 3000, Leica, Bensheim, Germany) 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf die mit APES behandelten Objektträger aufgetragen. Nach der Aufbewahrung in einem Trockenschrank bei 37°C für 12 Stunden war die Adhäsion der histologischen Schnitte für die weitere Bearbeitung gegeben.

2.3.2. PAS-Färbung

Zur lichtmikroskopischen Beurteilung der histologischen Schnitte wurden PAS-Färbungen angefertigt, die zur Bewertung pathologischer Veränderungen in Nieren etabliert sind.

Perjodsäure oxidiert selektiv bestimmte funktionelle Gruppen, wie z. B. primäre und sekundäre Amine. Während dieses Oxidationsvorganges werden die Bindungen zwischen zwei Kohlenstoffatomen gelöst und Aldehydgruppen angehängt. Diese Aldehydgruppen werden durch das schwefelige Fuchsin im Schiff'schem Reagenz in eine rosa bis purpurrote unlösliche Verbindung ähnlich dem basischen Fuchsin überführt.

Im ersten Schritt wurden die 2 µm dicken Schnitte wie für die Immunhistologie in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und in eine wässrige Lösung gebracht (siehe Kapitel 2.3.5.). Bei Raumtemperatur wurde das Gewebe für 10 Minuten in 1 %-iger Perjodsäure oxidiert und danach mit destilliertem Wasser gespült. Die nun entstandenen Aldehydgruppen ermöglichen die oben beschriebene Reaktion. Nach fünfminütiger

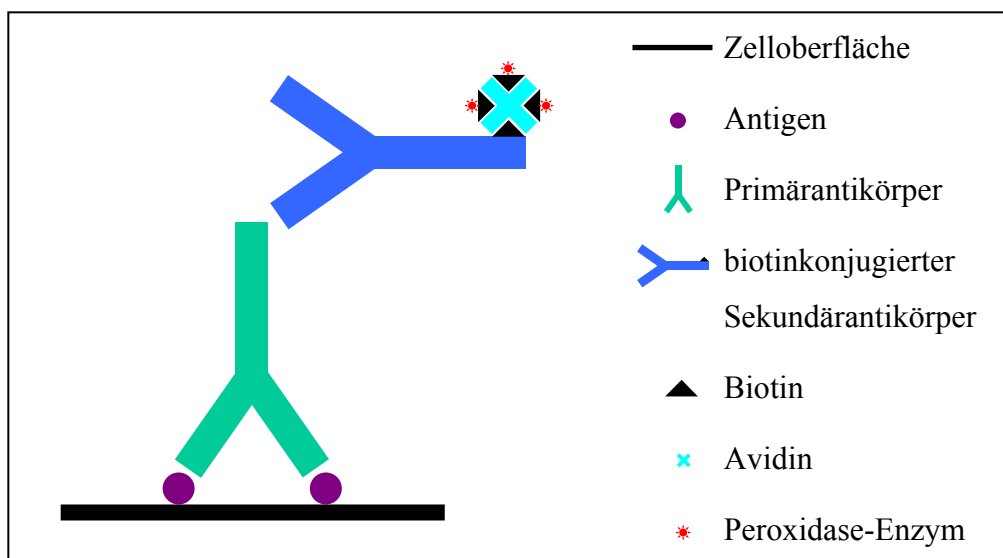
Einwirkung des Schiff'schen Reagenz (40 %) wurden die Gewebsschnitte erneut in destilliertem Wasser gespült. Nach einem Einwirken mit 0,5 %-iger Natriumbisulfit-Lösung für 2 Minuten wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaun gegengefärbt.

Nach dem Waschen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 %) und in Xylol wurden die Schnitte mit Histomount (Zytech Laboratories Inc., Berlin, Germany) eingeschlossen.

2.3.3. Immunhistochemie

Der größte Teil der Schnitte wurde für die Immunhistochemie verwendet. Mit dieser Methode ist es möglich, sowohl bestimmte Zellkomponenten auf der Oberfläche oder im Zytosol als auch Zellorganellen sichtbar zu machen. Damit ermöglicht dieses Verfahren, bestimmte Zelltypen aufgrund von bestimmten Proteinen zu unterscheiden. Verwendet wurde im Rahmen dieses Experiments die Avidin-Biotin-Methode, die auf der Fähigkeit des Glykoproteins Avidin beruht, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden (siehe Abbildung 2.2.).

Abbildung 2.2. Schematische Darstellung des Prinzips der Immunhistochemie



Im ersten Schritt bindet ein Primärantikörper spezifisch an die gesuchte Zellstruktur, die als Antigen wirkt. Ein speziesspezifischer biotinkonjugierter Sekundärantikörper ist gegen den ersten Antikörper gerichtet. Ein peroxidasegekoppelter Avidin-Biotin-Komplex bindet mit

den freien Stellen des Avidinmoleküls an das Biotin des Sekundärantikörpers und damit gegen die Zellkomponente. Mit Hilfe eines Substrats läßt sich diese nun anfärben.

Die eingebetteten Schnitte wurden mittels Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50%) entparaffiniert. Nach dem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Antigene auf 4 verschiedene Arten, abhängig vom verwendeten Antikörper, freigelegt:

1. Die Schnitte wurden drei Mal für je 2,5 Minuten in einem Citratpuffer in einer Mikrowelle bei 600 Watt erhitzt und anschließend für 10 Minuten in PBS abgekühlt und gespült.
2. Die Schnitte wurden für 30 Minuten bei 2 bar in einem Citratpuffer autoklaviert, kühlten für 15 Minuten im Gerät ab und wurden anschließend für 10 Minuten in PBS gespült.
3. Die Schnitte wurden für 10 Minuten bei 37°C mit einer Protease behandelt und anschließend für 10 Minuten in PBS gespült.
4. Die Schnitte wurden in einer *Antigen Unmasking Solution* für 30 Minuten bei 2 bar autoklaviert und anschließend für 30 Minuten in PBS gekühlt und gespült.

Danach wurde die endogene Peroxidase mit 3 %-igem Wasserstoffperoxid blockiert. Auch endogenes Avidin und Biotin wurden mit einem handelsüblichen Kit geblockt. Bei Verwendung des Antikörpers gegen KI-67 wurde der Schnitt zusätzlich für 20 Minuten mit 4 %-er Magermilch geblockt. Diese Blockierungsschnitte sind notwendig, um unspezifische Bindungen zu verhindern, die später die Auswertung aufgrund starker Hintergrundfärbung erschweren oder gar unmöglich machen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2.3. und 2.4.) erfolgte für eine Stunde. Nach dem Spülen in PBS wurde der biotinkonjugierte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.5.) für eine halbe Stunde aufgetragen und erneut gespült. Der Peroxidase-konjugierte Avidin-Biotin-Komplex (Label) wurde für eine halbe Stunde auf den Schnitt gegeben und nach erneutem Spülen wurde der histologische Schnitt mit AEC, das von der Peroxidase in ein unlösliches Chromogen umgesetzt wird, unter visueller Kontrolle entwickelt.

Bis auf die KI-67-Färbungen wurden alle Schnitte anschließend mit Hämalaun gegengefärbt. Eingeschlossen wurden die Schnitte mit Aquatex.

Immunhistochemie an kryofixiertem Gewebe

Das in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Gewebe wurde bis zur weiteren Verarbeitung in einer geeigneten Gefriertruhe bei -80°C gelagert.

Tabelle 2.3. Primärantikörper an paraffinfeingebettetem Gewebe

Antigen	Antigen- freilegung	Blockierung	Verdünnung	Spezies	Hersteller
mCD45	1	normal	1:100	rat	Pharmingen, Hamburg, Germany
hCD3	2	normal	1:50	rat	Serotec, Eching, Germany
mKI-67	3	normal + Magermilch	1:25	rabbit	Dianova, Hamburg, Germany
mMac2	4	normal	1:12000	rat	Biozol, Eching, Germany
mMac3	4	normal	1:100	rat	Pharmingen, Hamburg, Germany
mINOS	2	normal	1:2000	rabbit	Biomol, Plymouth, USA

normal: Blockierung von endogener Peroxidase, endogenen Avidins und Biotins

1: Citratpuffer + Mikrowelle

2: Citratpuffer + Autoklave

3: Protease

4: unmasking solution

Tabelle 2.4. Primärantikörper an kryofixiertem Gewebe

Antigen	Blockierung	Verdünnung	Spezies	Hersteller
mIgG ^e	normal	1:200	rat	DAKO, Hamburg, Germany
mIgG1	normal	1:50	rat	Pharmingen, Hamburg, Germany
mIgG2a	normal	1:50	rat	Pharmingen, Hamburg, Germany
mC3	normal	1:100	goat	ICN, Irvine, USA
mIgG ^f	normal	1:100	goat	Dianova, Hamburg, Germany
Apoferritin ^g	normal	1:100		Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, USA

normal: Blockierung von endogener Peroxidase, endogenen Avidins und Biotins

e: direkt HRP-konjugiert, daher kein Sekundärantikörper notwendig

f: RPE-konjugierter Antikörper

g: FITC-konjugierter Antikörper

Tabelle 2.5. Sekundärantikörper

Antigen	Verdünnung	Hersteller
Anti rat-IgG	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti rabbit-IgG	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti goat-IgG	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, USA

In *Tissue Freezing Medium* (Leica Instruments, Nussloch, Germany) eingebettet, wurden auf einer Kryoschneidemaschine (RM 2155, Leica, Bensheim, Germany) 5 µm dicke histologische Schnitte für die Immunfluoreszenz und Immunhistologie hergestellt. Die histologischen Schnitte wurden auf spezielle Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser,

Braunschweig, Germany) aufgetragen und für 12 Stunden an der Luft getrocknet, bevor sie weiter verarbeitet werden konnten. An kryofixiertem Gewebe war keine Antigenfreilegung erforderlich, ansonsten entsprach das Protokoll dem der Immunhistologie an paraffineingebettetem Gewebe.

Eine weitere Ausnahme waren die in der Immunhistologie verwendeten fluoreszierenden Antikörper. Diese waren direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, was die Verwendung eines Sekundärantikörpers und des peroxidasegekoppelten Avidin-Biotin-Komplexes unnötig machte.

2.3.4. Histologischer Nachweis apoptotischer Zellen

Der Tod einer Zelle kann durch zwei Mechanismen induziert sein: Apoptose oder Nekrose.

Während der nekrotische Zelltod durch eine Noxe oder ein Trauma entsteht, spielt die Apoptose eine physiologische Rolle in der normalen Organogenese und in der Regulation der zellulären Differenzierung sowie deren Anzahl.

Im Gegensatz zur Nekrose ist die apoptotische Zelle morphologisch durch Zellschrumpfung, Kernpyknose und Chromatinkondensation gekennzeichnet. Eine Reihe molekularer und biochemischer Vorgänge, insbesondere die Aktivität einer endogenen Endonuklease, die DNA in Oligonukleosome spaltet, sind für diesen Prozess charakteristisch. Die dabei freiwerdenden 3'-OH-Gruppen am Ende dieser Fragmente werden von dem von mir verwendeten Kit (TdT-FragELTM, Oncogene) detektiert.

Dabei wird mit einem Prinzip ähnlich dem der Immunhistologie verfahren. Nach der Entparaffinierung wurden die zu detektierenden Antigene (freie 3'-OH-Gruppen) mittels einer Proteinase freigelegt. Durch die Blockierung der endogenen Peroxidase wird eine unspezifische bzw. eine zu hohe Hintergrundfärbung verhindert. Im nächsten Schritt wurden eine Desoxynukleotid-Transferase, biotinmarkierte und nicht biotینگemerkte Desoxynukleotide hinzugegeben, die an die freien 3'-OH-Enden enzymatisch gebunden werden.

Mit *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppeltes Streptavidin bindet an das Biotin der Desoxynukleotide. Diaminobenzidine werden schließlich von der Peroxidase zu einem unlöslichen Farbkomplex umgesetzt und detektieren damit die gelabelten DNA-Fragmente (siehe auch Immunhistochemie).

Im ersten Schritt wurden die 2 µm dicken Schnitte gemäß dem Immunhistologie-Protokoll entparaffiniert und danach in PBS gespült. Nach einer Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Proteinase K zur Antigenfreilegung wurden die Schnitte erneut in PBS gespült. Die endogene Peroxidase wurde durch eine fünfminütige Inkubation mit 3 %-igem H₂O₂ blockiert und der Objektträger danach mit PBS gespült. Nach einer Inkubation mit 1**TdT Equilibration Buffer*^a für 20 Minuten wurde die Flüssigkeit vom Schnitt abgeklopft und für 90 Minuten bei 37°C mit *TdT Labeling Reaction Mixture*^a inkubiert. Nach dem Spülen in PBS wurde das Gewebe für 5 Minuten mit *Stop Solution*^a behandelt, in PBS gespült und abgeklopft. Danach wurde das Gewebe für 10 Minuten mit *Blocking Buffer* behandelt und anschließend durch Abklopfen entfernt. Zur Detektion wurden die Schnitte für 30 Minuten mit 1**Conjugate*^a inkubiert und anschließend gespült. Entwickelt wurden die Schnitte für 15 Minuten mit *Diaminobenzidinen* behandelt und in destilliertem Wasser gespült. Eingeschlossen wurde das Gewebe wie nach der Immunhistologie mit *Aquatex*.

In jeweils 20 Glomeruli wurden die positiven Signale gezählt und anschließend ausgewertet.

^a Bestandteil des Kits

2.4. Morphometrische Auswertung

2.4.1. Score der glomerulären Schädigung

Die Quantifizierung der glomerulären Schädigung (Mesangiolyse, kapilläre Obstruktion) erfolgte mit Hilfe eines entwickelten Scores. Als Maß dient die geschädigte Fläche auf den histologischen Schnitten, der nach folgendem Schema Werte zugeordnet wurden:

- 0: keine Schädigung;
- 1: bis $\frac{1}{4}$ des Glomerus geschädigt;
- 2: bis $\frac{1}{2}$ des Glomerulus geschädigt;
- 3: bis $\frac{3}{4}$ des Glomerulus geschädigt;
- 4: mehr als $\frac{3}{4}$ des Glomerulus geschädigt.

Es wurden jeweils 20 Glomeruli ausgewertet.

2.4.2. Score der Immunkomplexablagerungen

Die glomerulären Apoferritin-spezifischen Immunkomplexablagerungen wurden mit Hilfe eines Scores (0: kein Signal; 1: schwaches Signal; 2: mittleres Signal; 3: starkes Signal) quantifiziert. Verwendet wurden Referenzbilder, um eine valide Analyse der Schnitte zu gewährleisten.

2.4.3. Score zur Charakterisierung des glomerulären Zellinfiltrats

In den immunhistologisch gefärbten Schnitten wurden in jeweils 20 Glomeruli die gefärbten, für den jeweiligen Marker positiven Zellen gezählt. Auch hier wurden wieder 20 Glomeruli ausgewertet.

2.5. Analyse der humoralen Immunreaktion

2.5.1. Serumtiter von IgG, IgG 1 und IgG 2a

Die Serumtiter für IgG, IgG 1 und IgG 2a wurden mittels eines ELISA's bestimmt. Als Positivkontrollen wurde das Serum von Mäusen benutzt, denen in einem Zeitraum von 14 Tagen dreimalig 5,1 µg Apoferritin intramuskulär injiziert wurde.

Tabelle 2.6. Verwendete Antikörper bei der ELISA-Technik

Antigen	Verdünnung	Hersteller
m-IgG	1:2000	DAKO, Hamburg, Germany
m-IgG 1	1:500	Dianova, Hamburg, Germany
m-IgG 2a	1:500	Pharmingen, Hamburg, Germany

Dafür wurde eine 96-well Mikrotiter-Platte (Nunc, Wiesbaden, Germany) mit 0,05 µg Apoferritin in PBS für 12 Stunden bei 4°C beschichtet. Nach 12 Stunden wurde die Platte mit 0,05 % Tween in PBS gewaschen. Mittels einer einstündigen Inkubation bei 25°C mit 50 µl einer 5%-igen BSA-Lösung wurden die unspezifischen Bindungsstellen des Apoferritin blockiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die *wells* mit den Serumverdünnungen (1:16, 1:64, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096) für eine Stunde bei 25°C inkubiert. Nach

dreimaligem Waschen folgte eine halbstündige Inkubation mit den Detektionsantikörpern bei 25°C.

Die Antikörper gegen IgG 1 und IgG 2a waren lediglich biotinkonjugiert und mussten aus diesem Grunde noch mit einem horseradish-Peroxidase gekoppeltem Avidin-Biotin-Komplex inkubiert werden. Entwickelt wurden die Verdünnungen mit ABTS, das 30 Minuten einwirkte. Die Extinktion wurde mit einem Precision Microplate Reader (Emax, Molecular Devices) bei 450 nm gemessen und mit dem Programm SOFTmax Pro Ver. 1.2.0. ausgewertet.

2.5.2. Zytokinproduktion von Milzzellen

Nach der aseptischen Zellisolation wurden die Zellen in RPMI-1640 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) mit 10 % *fetal calf serum* (FCS) bei 4000 U/min (Heraeus Minifuge T, VWR International, Darmstadt, Germany) zentrifugiert und die darin befindlichen Erythrozyten mit *ACK lysing buffer* lysiert. Nach einigen Waschvorgängen wurden jeweils 3×10^6 Zellen in genanntem Medium (37°C, 5 % CO₂) kultiviert.

Nach 48 Stunden wurde der Überstand abpipettiert und in diesem die IFN- γ Konzentration mittels der Methode des *sandwich*-ELISAs bestimmt.

Eine 96-*well plate* wurde über Nacht bei 6°C mit 100 μ l des im Verhältnis 1:2000 in Coating Buffer verdünntem IFN- γ -Antikörper (BectonDickinson Bioscience, Heidelberg, Germany) beschichtet. Um unspezifische Bindungen, die für eine zu starke Hintergrundfärbung verantwortlich wären, zu blockieren, folgte nach fünf Waschvorgängen (0,05 % Tween) eine einstündige Inkubation mit 200 μ l 10 %-igem BSA (in PBS). Nach erneutem Waschen der *wells* wurden jeweils 100 μ l der Proben und eines Standards (400, 200, 100, 50, 25, 10, 5, 1 pg/ml) in die *wells* pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 25°C für zwei Stunden. Anschließend wurden die *wells* gewaschen und der biotinelabelte Detektionsantikörper (BectonDickinson Bioscience, Heidelberg, Germany; 1:250 in PBS, 10 % BSA) aufgetragen. Das Enzym-Reagenz (BectonDickinson Bioscience, Heidelberg, Germany) wurde innerhalb der nächsten 15 Minuten hinzugefügt. Nach einstündiger Inkubation wurde die Platte 10 mal mit 0,05 %-igem Tween gewaschen und danach die Substratlösung (TMB) aufgetragen. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Farbreaktion mit 1 M Phosphatsäure gestoppt.

Die Extinktion der Proben wurde an einem Precision Microplate Reader (Emax, Molecular Devices) bei 450 nm gemessen und die Daten mit dem Programm SOFTmax Pro Ver. 1.2.0 ausgewertet.

2.6. In vitro-Studien

2.6.1. Zellisolation

Das Vorgehen bei der Zellisolation umfasst prinzipiell zwei Schritte. Zuerst wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert und einige Male gewaschen. Danach wurden die noch verbleibenden interzellulären Strukturen enzymatisch mittels einer Kollagenaselösung verdaut.

Nach der Organentnahme wurden die Milzen in einer mit 3 ml *Paris Buffer* gefüllten Petrischale vor dem Austrocknen geschützt und mit Hilfe eines handelsüblichen Skalpells in ca. 0,5 mm große Stücke geschnitten. Nach einer Zentrifugation (4000 U/min, 5 Minuten; Heraeus Minifuge T, VWR International, Darmstadt, Germany) wurde das Pellet in *Hank's balanced salt solution* (HBSS) mit Calcium- und Magnesium-Ionen resuspendiert und danach erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das entstandene Pellet bei 37°C für 20 Minuten in einer Kollagenase/DNase-Lösung verdaut und erneut zentrifugiert. Zur Aufreinigung wurde das *Pellet* zweimal in eisgekühltem HBSS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ gewaschen. Nach einer Inkubation in 2 mM EDTA in HBSS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) bei 37°C für 20 Minuten und einer erneuten Zentrifugation folgte ein nochmaliger Verdau mit Kollagenase. Die verbleibende Suspension wurde durch mehrmaliges Aufziehen mittels einer Spritze durch immer kleinere Kanülen (20G1½: 0,9 × 40; 21G1½: 0,8 × 40) zerkleinert und noch mehrmals in eisgekühltem HBSS mit Calcium und Magnesium aufgereinigt. Nach dem Auszählen in einer Neubauer'schen Zählkammer wurden die Zellen für die folgende Inkubation in Petrischalen ausgesät.

2.6.2. Apoptose Assay

Um nachzuweisen, ob Met-RANTES eine Apoptose-induzierende Wirkung auf Mesangialzellen hat, wurden *in vitro* Versuche mit murinen Mesangialzellen durchgeführt.

In *6-well-plates* wurden jeweils 100.000 murine Mesangialzellen (Wolf 1992) bei 5 % CO₂ und 37°C in DMEM (Invitrogen Karlsruhe, Germany) und 10 % *fetal calf serum* (FCS) inkubiert. Nach 24 Stunden wurden sie mit IFN- γ (200 U/ml), TNF- α (10 ng/ml) und gegebenenfalls den Zusätzen Met-RANTES (100 ng/ml, 200 ng/ml und 400 ng/ml) oder NaCl unter den selben Bedingungen für 36 Stunden stimuliert. Danach folgte zur Induktion der Apoptose eine sechsstündige Inkubation mit einem den FAS-Rezeptor aktivierenden Antikörper (1 μ g/ml; Pharmingen, Hamburg, Germany) unter gleichen Bedingungen.

Zum Apoptosenachweis wurden die adhärennten Zellen und die apoptotischen Zellen im Überstand mehrmals mit PBS gewaschen bevor sie mit 70 %-igem Ethanol fixiert wurden. Nach einer jeweils halbstündigen Behandlung mit RNase A und Propidiumjodid wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt.

2.6.3. Phagozytose Assay

Um den Einfluss der Chemokinantagonisten auf den *cell turnover* im Glomerulus zu bestimmen, wurde die Funktion von dem Chemokinantagonisten Met-RANTES auch auf die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen untersucht. Bei diesem Assay wurde die murine Makrophagen-Zelllinie J774A (ATCC, USA) durch eine dreistündige Inkubation in einer 1 μ M Dexamethason-Lösung die Apoptose induziert. Anschließend wurden die Zellen mit TAMRA, einem Rhodaminderivat, für 20 Minuten gefärbt. TAMRA färbt dabei spezifisch freie 3'OH-Gruppen, die bei der ssDNA apoptotischer Zellen vermehrt zu finden sind (siehe auch Kapitel 2.3.4.). Von diesen gefärbten apoptotischen Zellen wurden 7×10^6 Zellen in eine seit vier Tagen bestehende Thioglykolat-Peritonitis injiziert. Untersucht wurden drei Gruppen. Die erste erhielt ungefärbte apoptotische Zellen und wurde als Negativkontrolle verwendet. Den anderen beiden Gruppen wurden gefärbte apoptotische Zellen gespritzt, wobei die Tiere eine Stunde zuvor entweder mit 10 μ g Met-RANTES oder mit NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert wurden.

Nach 20 Minuten wurde bei allen Tieren eine Peritoneallavage durchgeführt und die TAMRA positiven Peritonealmakrophagen unter Berücksichtigung der unspezifischen Hintergrundfärbung der ersten Gruppe mittels Durchflußzytometrie bestimmt. TAMRA-positive Makrophagen waren demnach Makrophagen, die apoptotische Zellen phagozytiert haben.

2.6.4. Proliferations Assay

Um den Einfluss von Met-RANTES auf die Proliferation muriner Mesangialzellen (Wolf 1992) zu untersuchen, wurde ein etablierter MTT-*proliferation assay* (Heeg) durchgeführt. Grundlage des Tests ist die Spaltung des Substrats in ein dunkelblaues Formazanprodukt durch aktive Mitochondrien. Die Konzentration des Produktes läßt sich aufgrund der Extinktion in einem *microtiter plate reader* semiquantitativ bestimmen.

In einer 96-well plate wurden 20×10^3 murine Mesangialzellen für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ in DMEM mit verschiedenen Zytokinen (IFN- γ 20 ng/ml, TNF- α 25 ng/ml, IL-1 β 10 ng/ml) vorstimuliert, um zum einen eine ausreichende Adhäsion der Zellen zu erreichen und andererseits die Expression von Chemokinrezeptoren zu induzieren.

Nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Waschen mit PBS wurden erneut 100 μ l Medium mit den entsprechenden Konzentrationen Met-RANTES (10 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml) hinzupipettiert und erneut unter gleichen Bedingungen für 48 Stunden inkubiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen mit einer MTT-Lösung (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) für drei Stunden inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Die sich gebildeten Formazankristalle wurden mit 50 μ l 0,04 N HCl in Isopropanol gelöst und die Extinktion bei 550 nm bestimmt.

2.7. Statistische Auswertungen

Von den gesammelten Daten wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Mittels der univariaten Varianzanalyse wurden die Gruppen gegeneinander untersucht. Wurden mehrere Gruppen gegenüber einer Kontrollgruppe untersucht, kam die Korrektur nach Bonferroni zur Anwendung. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert kleiner 0,05 definiert.

2.8. Lösungen und Reagenzien

2.8.1. Chemikalien

ABTS	Boehringer Mannheim, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
AEC	Biogenex, San Ramon, USA
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, USA
APES	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland
Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bovines Serum Albumin	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Cacodyl-Säure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DEPC	Fluka, Buchs, Switzerland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNase	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FAS-Antikörper	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Formalin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun, Mayers	Merck, Darmstadt, Deutschland
horse spleen apoferritin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
INF- γ	Peptotec, Rocky Hill, USA
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Label	Biogenex, San Ramon, USA
Magermilch	Merck, Darmstadt, Deutschland
MTT	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbisulfit	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ EDTA	Calbiochem, SanDiego, USA
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Protease	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Salzsäure 5N	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schiff'sches Reagenz	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
SchwefelsäureH ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sterilium	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
TAMRA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Thioglykolat	DIFCO Laboratories, Detroit, USA
TMB	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
TNF- α	Peptotec, Rocky Hill, USA
Tween	Fluka, Buchs, Switzerland
Wasserstoffperoxid	DAKO, Hamburg, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.8.2. Lösungen

ACK lysing buffer

0,15 M NH_4Cl

10 mM KHCO_3

0,1 mM Na_2EDTA

in ddH_2O

mit HCl auf pH 7,4 einstellen

APES-Lösung

5 ml APES

in 245 ml Aceton

10x Citratpuffer

110 mM Natriumcitrat

in ddH_2O

mit 2N NaOH auf pH 6 einstellen

Coating Buffer

66 mM Na_2HPO_4

0,12 M NaH_2PO_4

in ddH_2O

auf pH 6,0 einstellen

HBSS

5,4 mM KCl

0,3 mM Na_2HPO_4

0,4 mM KH_2PO_4

4,2 mM NaHCO_3

(1,3 mM CaCl)

in ddH_2O

20x PBS

2,74 M NaCl

54 mM KCl

30 mM KH_2PO_4

130 mM Na_2HPO_4

in ddH_2O

mit HCl auf pH 7,5 einstellen

Paris Buffer

125 mM NaCl

20 mM Tris- HCl

10 mM KCl

10 mM Natriumacetat

5 mM Glukose

in ddH_2O

mit 0,1 N HCl auf pH 7,4 einstellen

3. Ergebnisse

3.1. Die Apoferritin-induzierte Immunkomplex-Glomerulonephritis

Die tägliche Injektion des Antigens führte bei den Mäusen zu einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis mit den beschriebenen funktionellen und histopathologischen Veränderungen (siehe Kapitel 1.7.).

Die Tiere entwickelten gegenüber der Kontrollgruppe, die nur mit NaCl behandelt wurde, eine glomeruläre Expansion der Zellmatrix in Kombination mit einer Hyperzellularität. Die erhöhte Anzahl proliferierender Zellen (HAF: $3,2 \pm 0,2$ vs. NaCl: $0,4 \pm 0,2$; $p < 0,05$; siehe Tabelle 3.1.), durch die Färbungen gegen KI-67 gezeigt, beschränkt sich auf die Bezirke des Mesangiums, sodass sie Makrophagen und Mesangialzellen repräsentieren und keine Podozyten oder Zellen endothelialen Ursprungs sind.

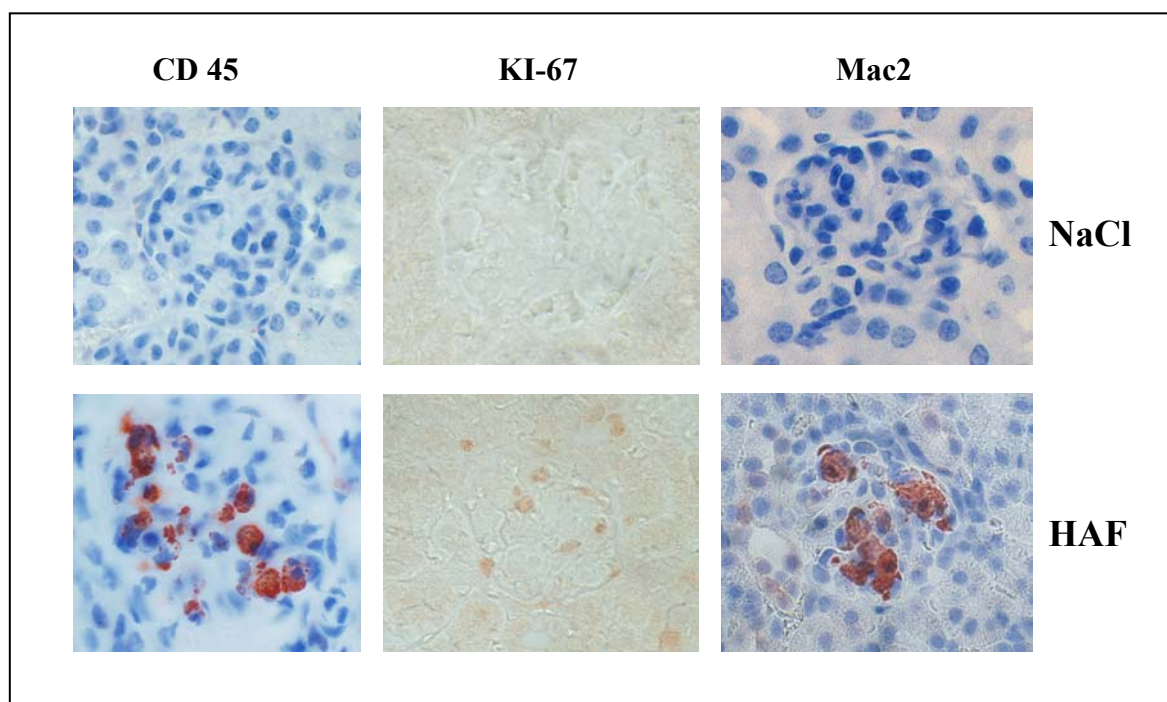


Abbildung 3.1.: Immunhistologische Veränderungen durch Apoferritin (Vergrößerung $600\times$): Leukozyteninfiltration (CD45+), gesteigerte Proliferation (KI-67+) und Makrophageninfiltration (Mac2+) in den Gruppen I (NaCl) und IV (HAF).

Die Anzahl der mittels des Oberflächenmarkers CD 45 detektierten Leukozyten war in dieser Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($9,0 \pm 0,9$ vs. $0,6 \pm 0,1$; $p < 0,01$). Färbungen von Mac3-positiven Makrophagen zeigten genauso eine erhöhte Anzahl im glomerulären Kompartiment (HAF: $5,7 \pm 0,7$ vs. NaCl $0,2 \pm 0,2$; $p < 0,01$) wie die Färbungen Mac2-positiver Makrophagen (HAF: $6,6 \pm 0,2$ vs. NaCl $0,1 \pm 0,1$; $p < 0,01$), während die Anzahl der CD 3 positiven Lymphozyten nur leicht erhöht war ($0,9 \pm 0,3$ vs. $0,2 \pm 0,2$; $p < 0,05$).

Im Sinne eines gesteigerten Zellumsatzes waren nicht nur die Anzahl proliferierender, sondern auch apoptotischer Zellen im Glomerulus der mit HAF injizierten Mäuse erhöht. Im Gegensatz dazu waren in den Glomeruli der Kontrollgruppe keine proliferierenden oder apoptotischen Zellen zu detektieren (siehe Tabelle 3.1.). Nekrosen, Halbmondbildungen oder tubulointerstitielle Läsionen waren nicht erkennbar.

Tabelle 3.1.: Charakterisierung des glomerulären Zellinfiltrats nach täglichen Injektionen mit Apoferritin über 14 Tage.

Glomeruläre Zellen						
Gruppen	CD 45+	Mac2+	Mac3+	CD3+	KI-67+	apoptot.
I (NaCl)	$0,6 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,2$	$0,0 \pm 0,0$
IV (HAF)	$9,0 \pm 0,9^a$	$6,6 \pm 0,2^a$	$5,7 \pm 0,7^a$	$0,9 \pm 0,3^a$	$3,2 \pm 0,2^a$	$0,1 \pm 0,0$

Die Behandlung mit Apoferritin führte in den Mäusen zu einer Erhöhung der HAF-spezifischen Titer von IgG und den Subtypen IgG 1 und IgG 2a. Die entstandenen zirkulierenden Immunkomplexe aus Apoferritin (Antigen) und IgG (Antikörper) ließen sich als mesangiale Ablagerungen in den Nieren histologisch nachweisen (siehe Abbildung 3.2. und Tabelle 3.2.).

Parallel zu den pathologischen histologischen Veränderungen konnte eine signifikante Albuminurie (HAF 153 ± 32 vs. NaCl: 18 ± 9 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Kreatinin_{Serum}, $p < 0,01$) in den mit HAF behandelten Mäusen beobachtet werden (siehe Tabelle 3.2.). Das Körpergewicht und die Konzentrationen von Harnstoff bzw. Kreatinin im Serum änderten sich nicht.

Tabelle 3.2.: Funktionelle Veränderungen und Apoferritin-spezifische Serumentiter und mesangiale Ablagerungen durch die Injektionen mit dem Antigen HAF.

Gruppen	Glom. Ablagerungen				Serumentiter (HAF-spezifisch)			
	Albuminurie $U_{\text{Alb}}/U_{\text{Cr}}$ [$\mu\text{g}/\text{mg}$]	IgG	IgG1	IgG2a	HAF	IgG	IgG1	IgG2a
I (NaCl)	18 ± 9	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$0,0 \pm 0,0$	$1,0 \pm 0,1$	12 ± 4	11 ± 1	9 ± 3
IV (HAF)	116 ± 13	$2,0 \pm 0,4^a$	$1,6 \pm 0,6^a$	$1,2 \pm 0,6^a$	$0,0 \pm 0,0^a$	1664 ± 530^a	384 ± 147^a	896 ± 256^a

In der Gruppe mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Mäusen, konnten weder funktionelle noch histopathologische Veränderungen beobachtet werden.

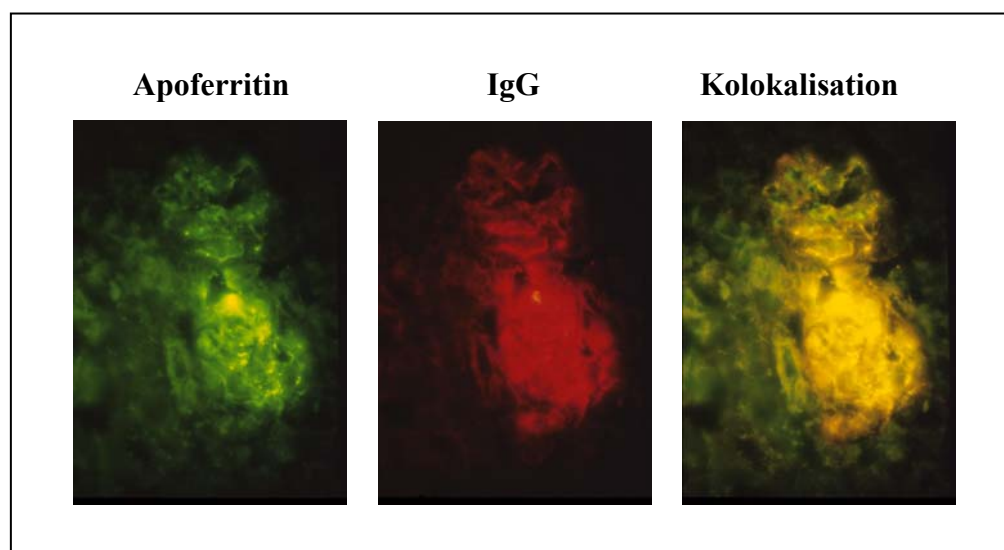


Abbildung 3.2.: Immunfluoreszenzen für Apoferritin und IgG (Vergrößerung $600\times$). Die Kokalisation von HAF und IgG im Glomerulus einer nur mit HAF behandelten Maus (Gruppe IV) repräsentiert die Ablagerung von Immunkomplexen als Folge der Produktion HAF-spezifischen IgG's.

3.2. RANTES-Antagonisten reduzieren die Infiltration glomerulärer Makrophagen

Zur Identifizierung der glomerulären Leukozyten wurde der Oberflächenmarker CD 45 und für die Makrophagen die beiden etablierten Marker (Ho 1982, 1983) Mac2 und Mac3 verwendet.

Die Behandlung mit den Chemokinantagonisten, AOP- oder Met-RANTES führte zu einer Reduzierung der Leukozyten im Glomerulus um ca. 50 – 80% (siehe Tabelle 3.3.)

Die Auswertung glomerulärer Mac2 positiver Zellen in den behandelten Gruppen ergab eine signifikante Verringerung (HAF + 10 µg Met-R: $4,5 \pm 0,3$; HAF + 40 µg Met-R: $4,7 \pm 0,2$; HAF + 10 µg AOP-R: $4,1 \pm 0,3$ vs. HAF + NaCl: $6,6 \pm 0,2$; $p < 0,01$). Die Tiere, die zum Ausschluss toxischer Effekte nur mit den Antagonisten injiziert wurden, zeigten mit dieser Färbung keine Veränderungen gegenüber der Negativkontrolle (siehe Diagramm 3.1.).

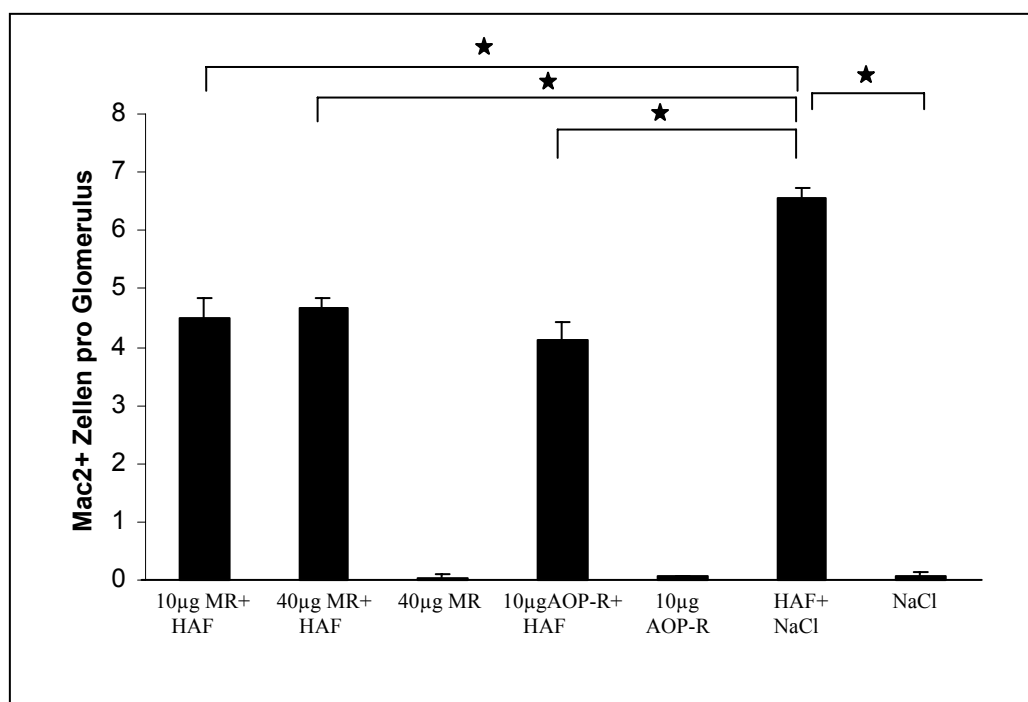


Diagramm 3.1.: Auswertung der Mac2-positiven Makrophagen in den Glomeruli (Vergrößerung 600×, ★ = $p < 0,01$). AOP-RANTES und Met-RANTES reduzieren die Anzahl Mac2-positiver Makrophagen im Glomerulus.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei den immunhistologischen Färbungen mit dem Mac3-Antikörper gemacht: Auch hier fand sich eine signifikante Erniedrigung Mac3 positiver Zellen in den Tieren, die mit den Chemokinantagonisten behandelt wurden (HAF + 10 μ g Met-R: $2,7 \pm 0,3$; HAF + 40Met-R: $2,9 \pm 0,3$; IV: HAF + AOP-R: $3,1 \pm 0,6$ vs. HAF + NaCl: $5,7 \pm 0,74$; $p < 0,05$).

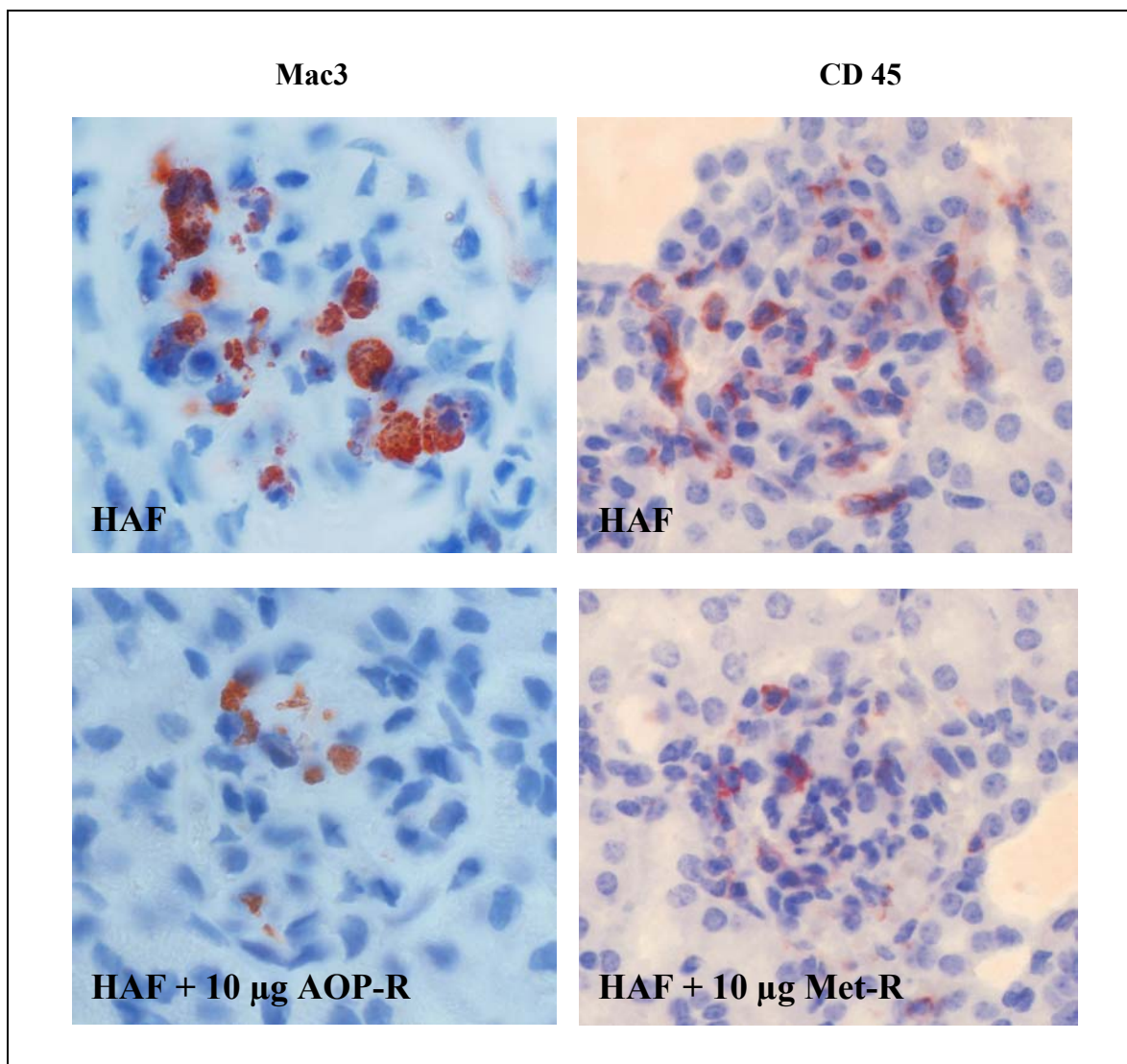


Abbildung 3.3.: Immunhistologische Färbungen für Makrophagen (Mac3) und Leukozyten (CD45) in 600-facher Vergrößerung. Wirkung der Antagonisten auf das zelluläre Infiltrat mit Apoferritin behandelter Mäuse. Sie reduzieren die Anzahl glomerulärer CD45+ Leukozyten und Mac3+ Makrophagen.

Dosisabhängige Effekte zwischen den Gruppen, die Met-RANTES und HAF injiziert bekamen, konnten dabei nicht beobachtet werden. In den Tieren, die nur mit einem der Antagonisten behandelt wurden, zeigten sich keine Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe IV, die nur mit NaCl behandelt wurde (siehe Tabelle 3.3.).

3.3. RANTES-Antagonisten reduzieren die Zellproliferation und erhöhen die Anzahl apoptotischer Zellen im Glomerulus

Als Maß für den Zellumsatz im Glomerulus wurden sowohl die Anzahl apoptotischer als auch proliferierender Zellen in diesem Kompartiment der Niere bestimmt. Dabei zeigte sich, dass in der durch HAF induzierten Glomerulonephritis nur eine geringe Zahl apoptotischer Zellen nachweisbar war; unter der Behandlung mit den Chemokinantagonisten zeigte sich dagegen ein signifikanter Anstieg ($8,22 \pm 1,86$ vs. $24 \pm 8,63$ Zellen pro Schnitt; $p < 0,01$).

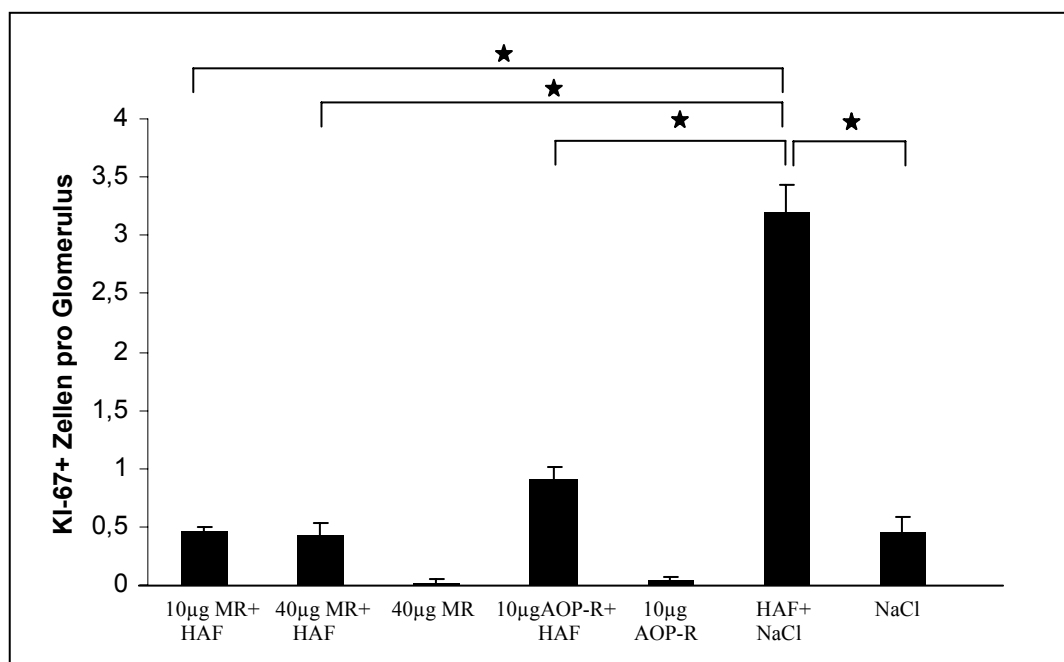


Diagramm 3.2.: Proliferierende Zellen (KI-67+) in den Glomeruli aller Gruppen, ★ = $p < 0,01$. Die RANTES-Antagonisten senken die Anzahl KI-67 positiver Zellen um mehr als 70 %.

Die Tiere, die nur Met- oder AOP-RANTES erhalten hatten, zeigten in den immunhistologischen und der Färbung für apoptotische Zellen keine veränderte Anzahl gegenüber der Kontrollgruppe, die nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurde.

Bei den mit Met-RANTES behandelten Tiere fand sich ein signifikanter Rückgang der KI-67 positiven Zellen auf 1/6 gegenüber den unbehandelten Tieren (siehe Diagramm 3.2., Abbildung 3.4. und Tabelle 3.1.).

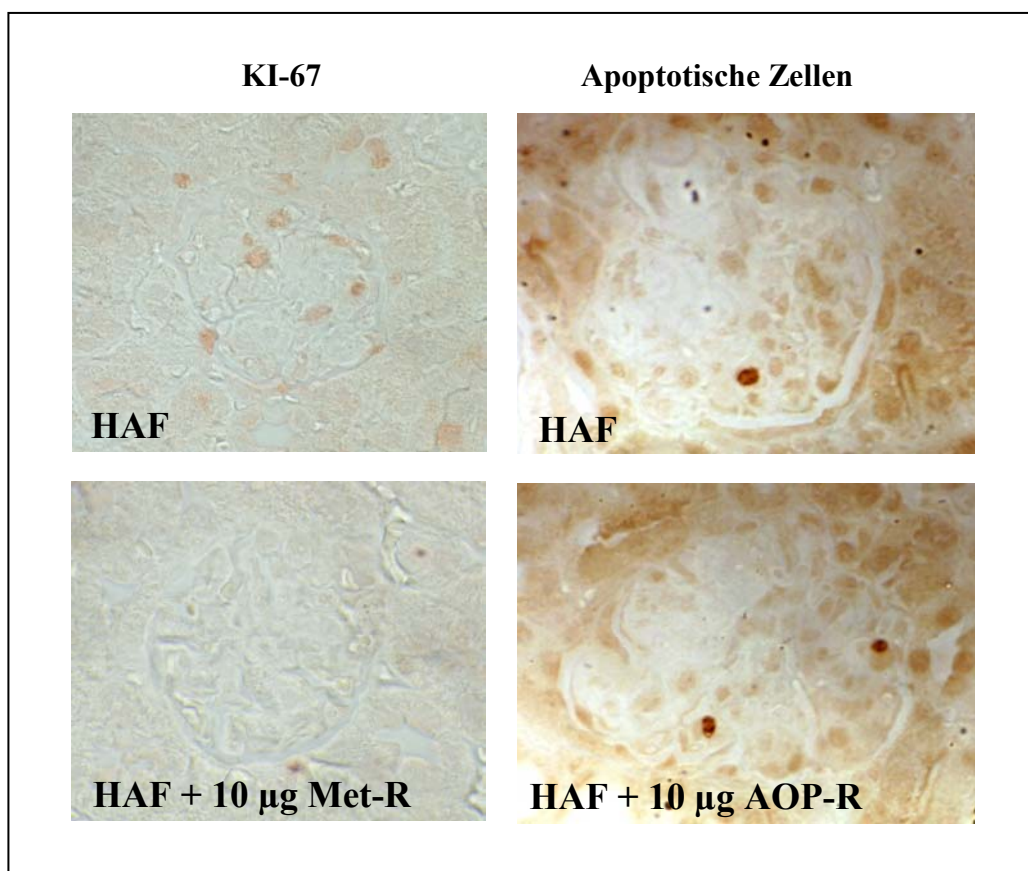


Abbildung 3.4.: Immunhistologischer Nachweis proliferierender (KI-67) und apoptotischer Zellen im Glomerulus (Vergrößerung 600×). Die Antagonisten AOP-RANTES und Met-RANTES reduzieren die Anzahl proliferierende und erhöhen Anzahl apoptotischer Zellen im Glomerulus.

Die Mäuse, die AOP-RANTES erhielten, zeigten ebenfalls eine deutlich verminderte Anzahl proliferierender Zellen im Glomerulus ($0,9 \pm 0,1$), die mit einem p-Wert unter 0,01 ebenfalls signifikant gegenüber der Gruppe IV (HAF) war.

Die Tiere, die nur mit dem Antagonisten behandelt wurden, zeigten keine Unterschiede gegenüber der nur mit NaCl injizierten Kontrollgruppe.

3.4. RANTES-Antagonisten verschlechtern die Glomerulonephritis

Die Tiere, die aufgrund der Injektionen mit Apoferritin eine Glomerulonephritis entwickelten und mit einem der RANTES-Antagonisten behandelt wurden, zeigten neben der verstärkten Proteinurie (siehe Tabelle 3.3.) zusätzlich auch histopathologische Veränderungen.

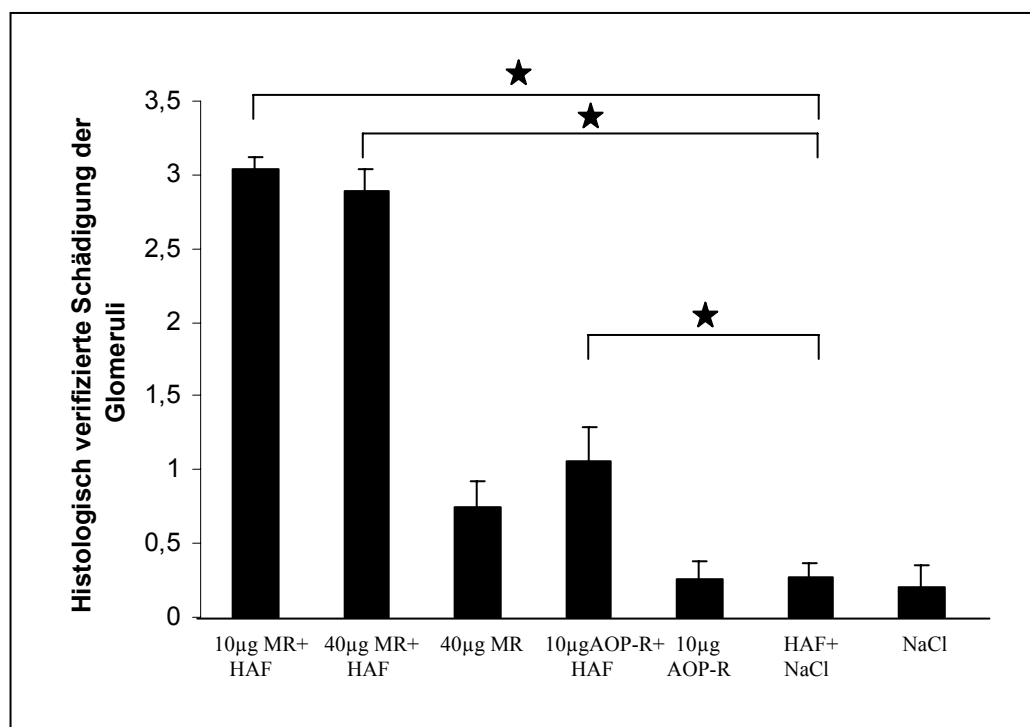


Diagramm 3.3.: Ergebnisse des Scores für histologisch erkennbare Schädigung der Glomeruli; ★ = $p < 0,01$. Die zusätzliche Behandlung mit den Antagonisten führt zu stärkeren histologischen Schädigungen als die alleinigen Injektionen mit Apoferritin.

In deren Nieren fanden sich in nahezu allen Glomeruli kapilläre Verschlüsse mit hyalinem Material, die in Tieren, die nur mit Apoferritin injiziert wurden, nicht zu detektieren waren. Weiterhin führten die Injektionen von Apoferritin und einem der Chemokinantagonisten zu elektronenmikroskopisch verifizierten Mesangiolyse (Abbildung 3.5.). Diese

histopathologischen Veränderungen konnten mit dem bereits beschriebenen Score für histologische Schädigung quantifiziert werden (siehe Diagramm 3.3.).

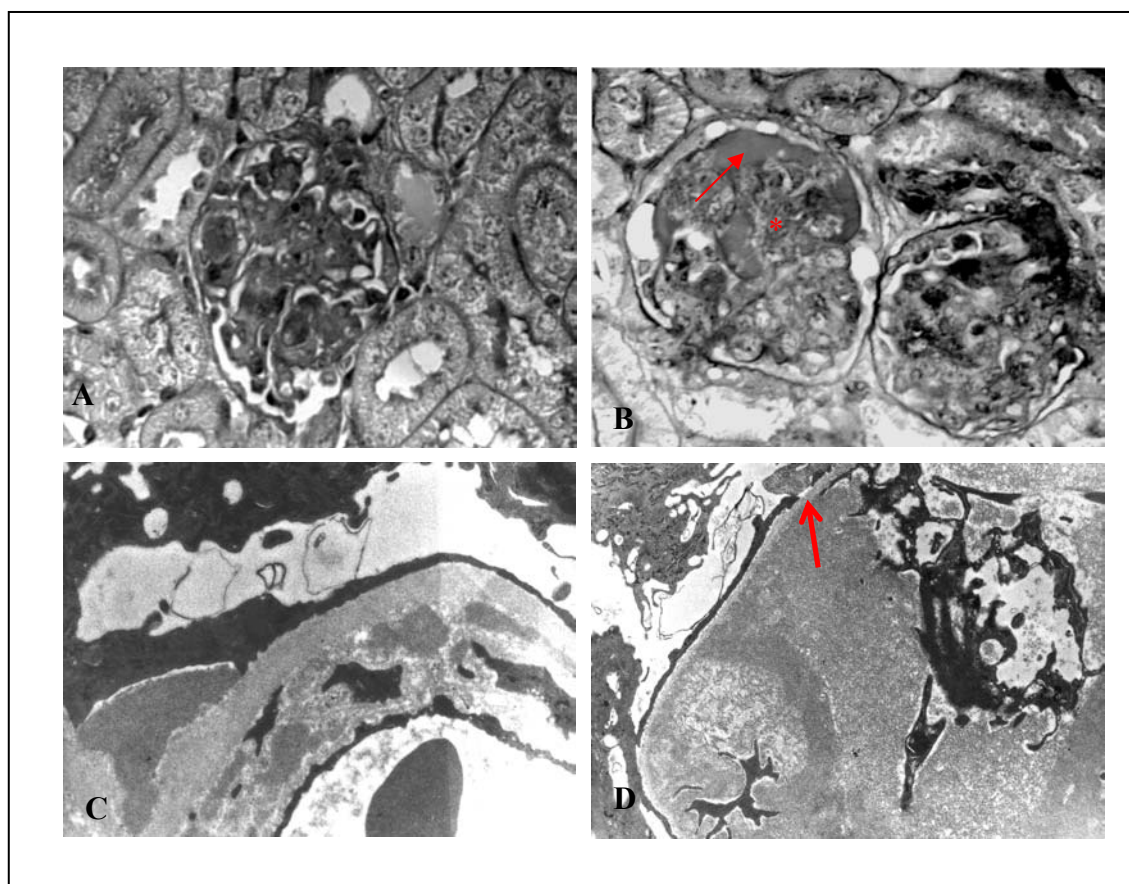


Abbildung 3.5.: Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Glomeruli einer Maus, die mit HAF und 40 μg Met-RANTES behandelt wurde. **A:** Mesangioproliferative GN mit Matrixexpansion in einem Tier der Gruppe IV durch Injektionen mit Apoferritin. **B:** Mesangiolyse (*) und dilatierte Kapillaren mit hyalinen Thromben (↑) in einem Tier der Gruppe VI (HAF+40 μg MET-R). **C:** Elektronendichte Ablagerungen finden sich subendothelial und im subepithelialen Raum des Mesangiums. **D:** Die glomerulären Kapillaren sind dilatiert und zeigen einen Verlust des fenestrierten Endothels (↑). Durchführung der elektronenmikroskopischen Untersuchungen durch Prof. Dr. med. H.-J. Gröne vom DKFZ.

Die Elektronenmikroskopie bestätigte die Mesangiolyse mit nekrotischen Zellen und zeigte zusätzlich einige apoptotische Zellen (siehe auch Abbildung 3.4.). Die Ablagerungen der Immunkomplexe in den mesangialen, subendothelialen und subepithelialen Kompartimenten der Glomeruli imponieren als elektronendichte Bezirke (siehe Abbildung 3.5.). Einige der

dilatierten Kapillaren waren mit hyalinen Thromben obliteriert und zeigten beschädigtes Endothel.

Einzelne Makrophagen, die im Lumen der Kapillaren und im Mesangium lokalisiert waren, zeigten große elektronendichte Bezirke im Sinne von zytoplasmatischen Endosomen. Diese Ultrastrukturen, die in der Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht wurden, stimmen mit den Beobachtungen aus der Immunhistologie überein, die ebenfalls im morphologischen Aspekt veränderte Makrophagen zeigten.

3.5. *In vitro*-Studien

Aufgrund der *in vivo* Daten ergab sich der Verdacht, dass die zusätzlichen Injektionen mit den Antagonisten den glomerulären Zellumsatz beeinflusst hat. Aus diesem Grund wurde der Effekt von Met-RANTES auf die Proliferation und Apoptose kultivierter muriner Mesangialzellen untersucht.

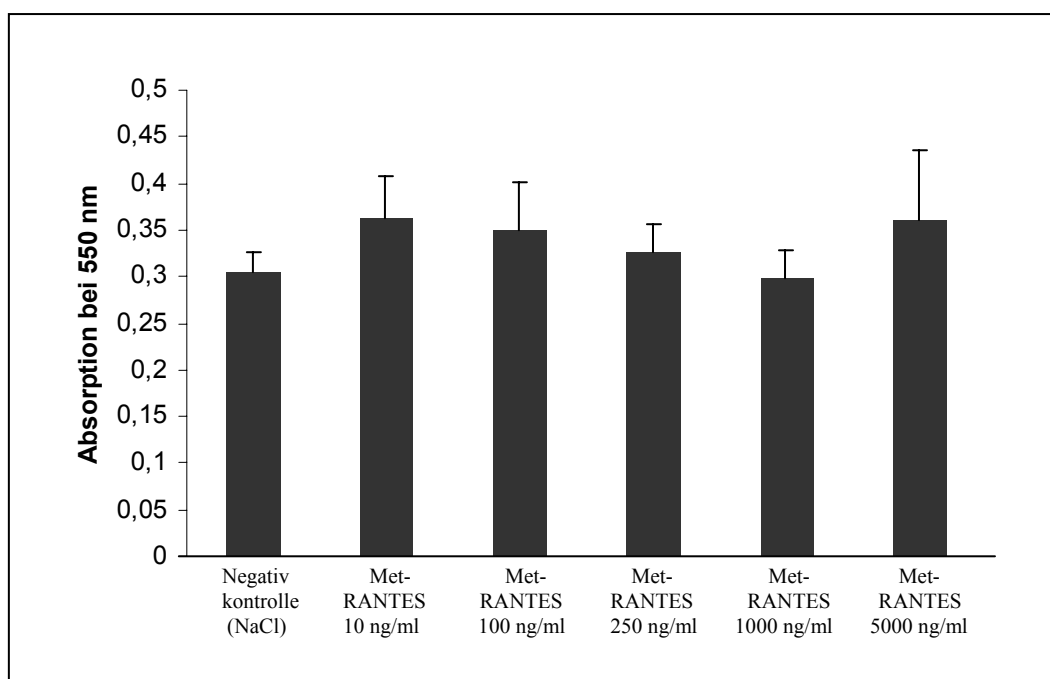


Diagramm 3.4.: Ergebnisse eines *in vitro* Proliferation Assay. Met-RANTES hat keinen Einfluß auf die Proliferation muriner Mesangialzellen *in vitro*. Die Unterschiede waren nicht signifikant gegenüber der Negativkontrolle.

In dem verwendeten *Assay* zeigten sich bei steigenden Konzentrationen von Met-RANTES keine signifikant unterschiedlichen Effekte auf die Proliferation gegenüber NaCl auf kultivierte murine Mesangialzellen (siehe Diagramm 3.4.).

Auch ein *in vitro* Apoptose *Assay* konnte keine proapoptotischen Effekte von Met-RANTES auf kultivierte Mesangialzellen zeigen (siehe Abbildung 3.6.).

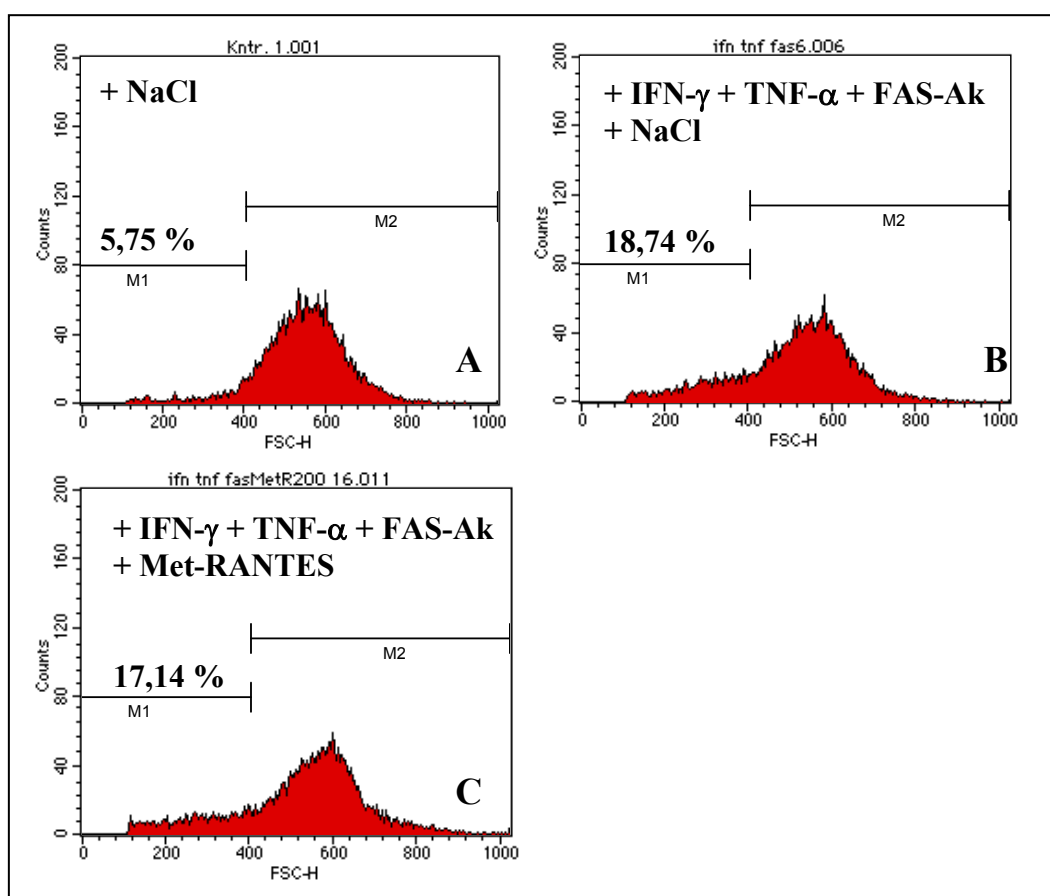


Abbildung 3.6.: FACS-Analyse des Apoptose *Assay*. Apoptotische murine Mesangialzellen befinden sich im Feld M1. Die Stimulation mit IFN- γ , TNF- α und einem FAS-Antikörper induziert Apoptose (B), zusätzliche Inkubation mit Met-RANTES hat keinen Einfluß (C). Kaum apoptotische Zellen in der nicht stimulierten Kontrollgruppe (A).

3.6. Die Antagonisten haben keinen Effekt auf die humorale Immunantwort

Zur Klärung der Mechanismen, die der beschriebenen Verschlechterung bei der Apoferritin-induzierten Glomerulonephritis zugrunde liegen könnten, wurde die Effekte der RANTES-

Antagonisten auf die humorale Immunantwort des Organismus im Verlaufe der Immunkomplex Glomerulonephritis untersucht. Hierzu wurden sowohl die HAF-spezifischen Seruntiter als auch die daraus resultierenden glomerulären Ablagerungen von IgG und den Subtypen IgG 1 und IgG 2a bestimmt.

Die Apoferritin-spezifischen Seruntiter von Immunglobulin G und seinen Subtypen IgG 1 und IgG 2a waren in allen Tieren, die mit Apoferritin behandelt wurden, im selben Bereich; die zusätzliche Behandlung mit den Antagonisten zeigte keine signifikanten Veränderungen (siehe Tabelle 3.3.).

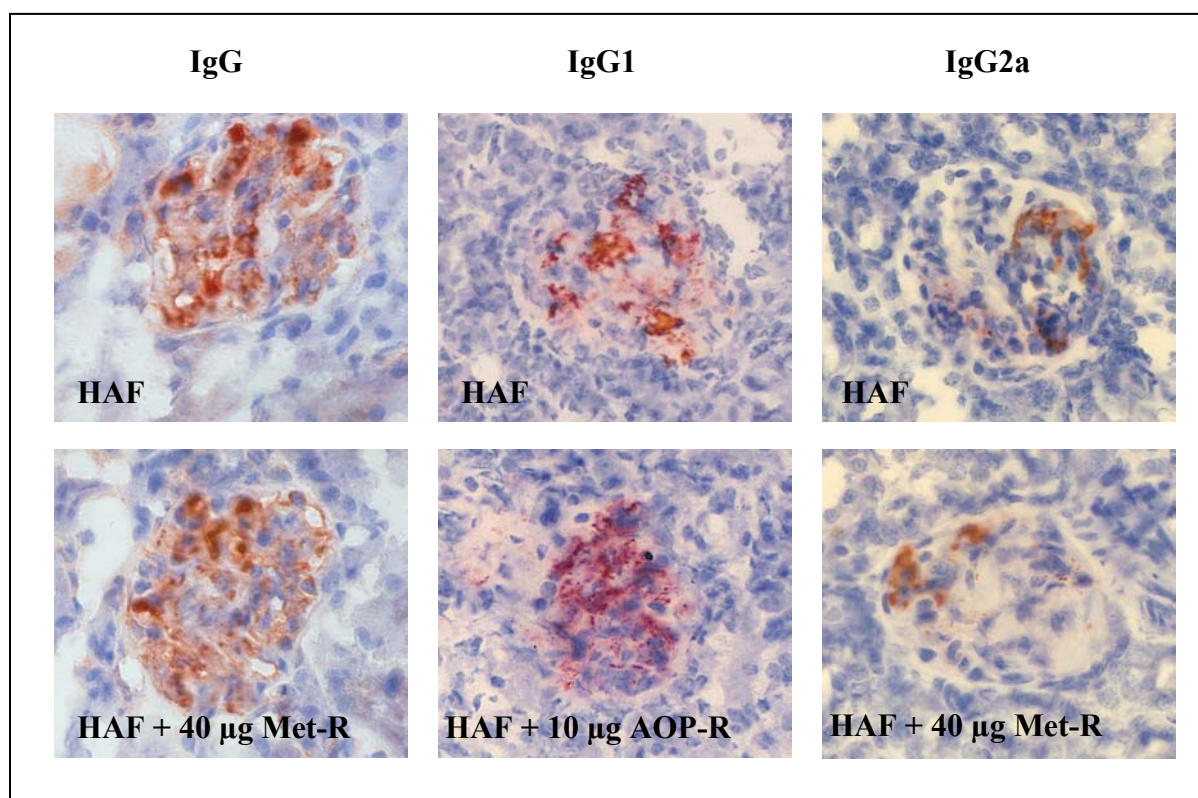


Abbildung 3.7.: Immunhistologische Färbung für IgG, IgG 1 und IgG 2a (Vergrößerung 600×). Die Antagonisten induzieren keine Unterschiede bei den Ablagerungen von Immunkomplexen, differenziert nach IgG und den Subtypen IgG1 und IgG2a.

Die mesangialen Immunkomplexablagerungen (HAF-spezifisches IgG, IgG 1, IgG 2a) waren in der Immunhistologie durch die RANTES-Antagonisten ebenso wenig verändert wie die Ablagerung des Komplementfaktors C3 (siehe Abbildung 3.7. und Tabelle 3.3.).

Die an CCR 5 bindenden Chemokine nehmen bekanntermaßen Einfluß auf die T-Zelldifferenzierung und sind dort mit einer Th1-Antwort assoziiert (Loetscher). Da eine Blockierung dieses Rezeptors eine Veränderung der Th1/Th2-Balance herbeiführen könnte, wurde der Einfluß der RANTES-Antagonisten darauf untersucht.

Die Serumtitrier der IgG-Subklassen IgG 1 und IgG 2a und die IFN- γ Sekretion von kultivierten Milzzellen als Marker für einen Th1-*shift* wurden mit Hilfe der ELISA-Technik untersucht. Dabei zeigte sich, dass weder AOP-RANTES noch Met-RANTES Veränderungen bezüglich eines IgG-Subtyps induzieren konnten. Die Serumtitrier der Mäuse, die unter den Apoferritin-Injektionen eine Glomerulonephritis entwickelten, waren alle im selben Bereich und zeigten keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 3.1.).

Auch die Konzentrationen von IFN- γ im Überstand kultivierter Milzzellen von Tieren, die zusätzlich 40 μ g Met-RANTES erhalten hatten, zeigten keinen Unterschied zum Überstand der Splenozyten der Tiere, die nur mit dem Antigen HAF behandelt wurden (HAF + 40 μ g Met-R: $45,2 \pm 6,2$ vs. HAF + NaCl: $50,8 \pm 14,2$ pg/ml; $p > 0,05$).

3.7. RANTES-Antagonisten erhöhen die Expression der *inducible nitric oxide synthase*

Nachdem keine Veränderung der systemischen Immunantwort durch die RANTES-Antagonisten nachweisbar war, stellte sich die Frage nach weiteren lokalen Veränderungen im Glomerulus. Aufgrund der in der Immun- und Elektronenmikroskopie bereits sichtbaren morphologischen Veränderungen der Makrophagen wurden funktionelle Parameter dieser Zellen untersucht. Als Marker für den proinflammatorischen Phänotyp der Makrophagen wurde die Proteinexpression der *inducible NO-Synthase* (iNOS) mit Hilfe der Immunhistologie bestimmt.

Mäuse, die nur Apoferritin injiziert bekamen, zeigten nur eine geringe Anzahl glomerulärer Zellen mit einem Signal für iNOS (siehe Abbildung 3.8.). Die Behandlung mit den Antagonisten führte zu einer signifikanten Erhöhung der iNOS positiven Zellen im Glomerulus (HAF + 10 μ g Met-R: $2,2 \pm 0,5$; HAF + 40 μ g Met-R: $2,5 \pm 0,4$; HAF + 10 μ g AOP-R: $2,4 \pm 0,6$ vs. HAF: $1,1 \pm 0,4$).

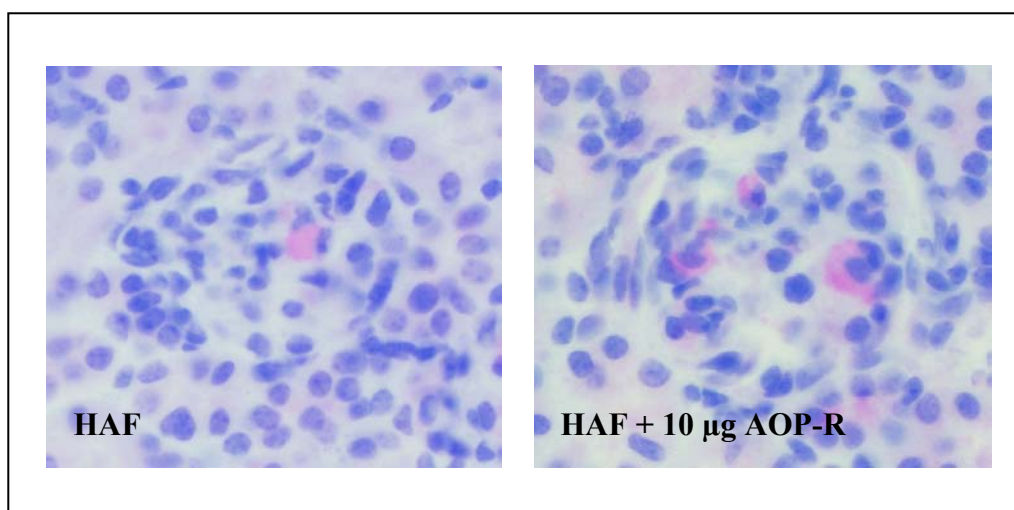


Abbildung 3.8.: Immunhistologie Färbung für iNOS (Vergrößerung 600×). Verstärkte iNOS-Expression in einem Tier unter Behandlung mit HAF und 10 µg AOP-RANTES gegenüber einem Tier der Gruppe IV (nur HAF).

3.8. Der Einfluß auf die Phagozytosefähigkeit peritonealer Makrophagen

Die Beobachtung, dass die RANTES-Antagonisten die Anzahl apoptotischer Zellen im Glomerulus erhöhte und sich kein proapoptotischer Einfluß von Met-RANTES auf Mesangialzellen nachweisen ließ, legte einen Einfluß auf die Fähigkeit der Makrophagen, apoptotische Zellen zu phagozytieren, nahe.

Hierzu wurde ein *in vivo* Assay etabliert, der es ermöglicht, die Phagozytosefähigkeit peritonealer Makrophagen zu quantifizieren. In die Bauchhöhlen von Mäusen mit einer mit Thioglykolat induzierten abakteriellen Peritonitis wurden mit TAMRA markierte apoptotische Zellen injiziert. Die Mäuse wurden zusätzlich mit Met-RANTES oder physiologischer Kochsalzlösung behandelt. In der eine halbe Stunde später durchgeführten Peritoneallavage wurde per FACS die Zahl der TAMRA-positiven Makrophagen bestimmt. Dabei repräsentieren die TAMRA-positiven Makrophagen diejenigen Makrophagen, die markierte apoptotische Zellen phagozytiert haben (siehe Abbildung 3.9.). Es zeigte sich, dass Met-RANTES die Zahl peritonealer TAMRA-positiver Makrophagen vermindert (Met-RANTES $23,4 \pm 8,1$ % vs. NaCl: $33,7 \pm 3,2$ %).

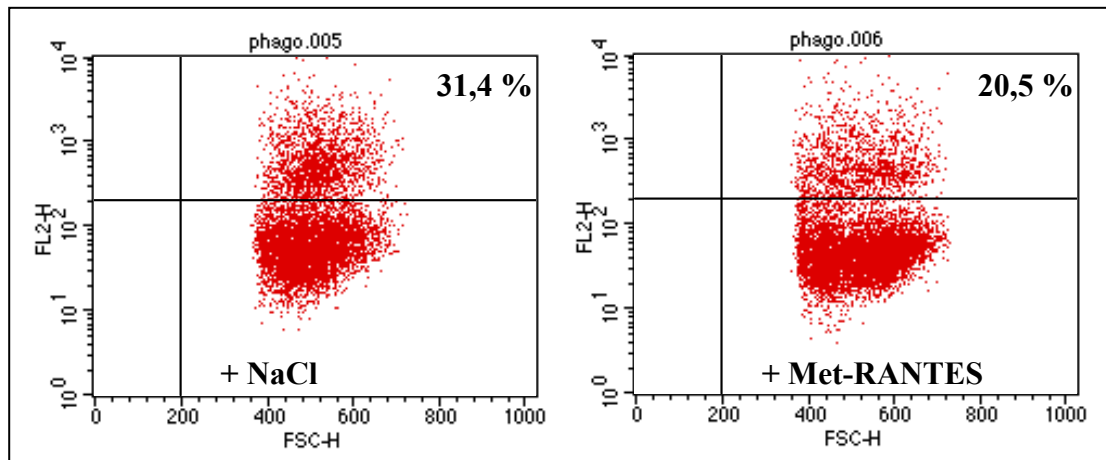


Abbildung 3.9.: Durchflußzytometrie von peritonealen Makrophagen. FL2-H repräsentiert die Farbeintensität der TAMRA-positiven Peritonealmakrophagen. Definition der Hintergrundfärbung in den linken unteren Quadranten durch die Injektion ungefärbter apoptotischer Zellen. Met-RANTES vermindert die Aufnahme apoptotischer Zellen durch peritoneale Makrophagen.

Gruppen	I	II	III	IV	V	VI	VII
	NaCl	NaCl + 40 µg Met- RANTE S	NaCl + 10 µg AOP- RANTE S	HAF	HAF + 10 µg Met- RANTES	HAF + 40 µg Met- RANTES	HAF + 10 µg AOP- RANTES
Albuminurie							
U _{Alb} /U _{Cr} [µg/mg]	18 ± 9	22 ± 9	20 ± 7	116 ± 13 ^a	312 ± 104 ^b	309 ± 93 ^b	302 ± 78 ^b
Humorale Antwort							
Serumtiter							
Anti-HAF Ig	12 ± 4	12 ± 4	11 ± 4	1664 ± 530 ^a	1536 ± 560	1532 ± 543	1707 ± 591
Anti-HAF IgG ₁	11 ± 1	10 ± 1	n.d.	384 ± 147 ^a	320 ± 128	365 ± 290	284 ± 148
Anti-HAF IgG _{2a}	9 ± 3	7 ± 3	n.d.	896 ± 256 ^a	683 ± 296	548 ± 344	597 ± 391
Glom. Ablagerungen							
HAF	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,0 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
Ig	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2,0 ± 0,4 ^a	2,5 ± 0,1	2,2 ± 0,4	2,3 ± 0,2
IgG ₁	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,6 ± 0,6 ^a	2,0 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2,1 ± 0,3
IgG _{2a}	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,2 ± 0,6 ^a	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,3
C3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1,5 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Zelluläre Infiltration [Zellen/Glom.]							
Glom. Leukozyten							
CD45 +	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,2 ± 0,0	9,0 ± 0,9 ^a	1,8 ± 0,6 ^b	2,7 ± 1,2 ^b	4,2 ± 0,7 ^b
Mac2 +	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,0	6,6 ± 0,2 ^a	4,5 ± 0,3 ^b	4,7 ± 0,2 ^b	4,1 ± 0,3 ^b
Mac3 +	0,2 ± 0,2	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,1	5,7 ± 0,7 ^a	2,7 ± 0,3 ^b	2,9 ± 0,3 ^b	3,1 ± 0,6 ^b
CD3 +	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,3 ^a	0,9 ± 0,3	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,2
Proliferation und Apoptose							
Ki-67 +	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,4 ^b	0,4 ± 0,3 ^b	0,9 ± 0,1 ^b
Apoptotische Zellen	0,0 ± 0,0	n.d.	n.d.	0,08 ± 0,02 ^a	n.d.	0,2 ± 0,9 ^b	n.d.

Tabelle 3.3.: Serumtiter, histologische und funktionelle Veränderungen in der HAF induzierten Glomerulonephritis. ^a p < 0,01 Gruppe IV (HAF-GN) vs. Gruppe I (NaCl); ^b p < 0,01 Gruppen V, VI, und VII (HAF-GN + RANTES-Antagonisten) vs. Gruppe IV (HAF-GN); ^c p < 0,01 Gruppen II und III (nur RANTES-Antagonisten) vs. Gruppe I (NaCl); n.d. = nicht durchgeführt.

4. Diskussion

Ziel der vorgelegten Studie war es, die Funktion des Chemokinrezeptors CCR 5 im Verlauf der Glomerulonephritis zu untersuchen. Wie erwartet führte die Behandlung mit den CCR 5-Antagonisten AOP- oder Met-RANTES zur Verringerung des glomerulären Infiltrats immunkompetenter Zellen und auch zur Verminderung der mesangialen Proliferation. Jedoch zeigten sich stärkere histopathologischen Schädigungen und eine schlechtere renale Funktion, sodass die Hypothese, durch Reduzierung der Leukozyteninfiltration als Folge der Behandlung mit den Chemokinantagonisten eine Besserung der Erkrankung herbeizuführen, nicht bestätigt werden konnte.

Während die humorale Immunantwort durch die Behandlung mit AOP- oder Met-RANTES nicht beeinflusst wurde, sind die beobachteten Mesangiolyse, kapillären Thrombosen sowie die verstärkte Proteinurie vermutlich Folge der Induktion eines proinflammatorischen Makrophagentyps.

Da die Verhinderung des *leukocyte trafficking* zu einer schwereren Erkrankung führte, geht die Funktion von Chemokinen und ihren Rezeptoren demzufolge über die Vermittlung der Chemotaxis hinaus. Offensichtlich sind sie in der Lage immunologische Abläufe so zu modulieren, dass sie zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort führen. Diese hat dann eine verstärkte Gewebsdestruktion und eine verschlechterte Funktion zur Folge.

4.1. Met-RANTES und AOP-RANTES reduzieren die Makrophageninfiltration

Die Beobachtung, dass die Behandlung mit RANTES-Antagonisten zur Verminderung der Anzahl infiltrierender Makrophagen führen, ist konsistent mit den Ergebnissen anderer in der Literatur veröffentlichter Studien (Lloyd, Gröne, Song, Panzer).

Lloyd et al. konnten im Modell der *nephrotoxic serum* (NTS)-Nephritis zeigen, dass die Behandlung mit Met-RANTES in gleicher gewichtsadaptierten Dosis eine Reduzierung der Infiltration mononukleärer Phagozyten um 40 % zur Folge hatte. Der Influx von T-Zellen, die in dem in dieser Studie verwendeten Modell keine Rolle zu spielen scheinen, war in der NTS-Nephritis ebenfalls um mehr als die Hälfte (52 %) vermindert (Lloyd).

Auch in einem Modell der akuten Abstoßung eines Nierentransplantats in Ratten reduzierte Met-RANTES die Anzahl glomerulärer Makrophagen um 37 % und T-Zellen um 31 % (Gröne).

In einem weiteren tierexperimentellen Modell einer Glomerulonephritis (Anti-Thy-Modell) konnte AOP-RANTES den Influx von Monozyten nach 24 Stunden um 60 % senken (Panzer).

Der Rezeptor für RANTES CCR 5 ist auf der Mehrheit in der Blutbahn zirkulierender Monozyten nicht exprimiert, wird aber nach Differenzierung zu Gewebsmakrophagen hochreguliert (Kaufmann). Met-RANTES reduziert die Bindungsdauer von Monozyten an aktivierten Endothelzellen, die auf ihrer luminalen Membran RANTES präsentieren (von Hundelshausen). So könnte die Blockierung des über CCR 5 vermittelten Weges der Makrophageninfiltration am wahrscheinlichsten für die reduzierte Zahl glomerulärer Makrophagen verantwortlich zu sein.

Da aber auch die Proliferation lokaler Makrophagen möglich ist (Yang N) und nicht nur RANTES und CCR 5, sondern auch noch andere chemotaktische Moleküle und deren Rezeptoren bei diesem Mechanismus eine Rolle spielen (Weber C, von Hundelshausen), läßt sich das Vorhandensein der übrigen glomerulären Makrophagen befriedigend erklären.

4.2. Met-RANTES und AOP-RANTES verstärken die glomeruläre Schädigung und die Proteinurie

Im Verlauf entzündlicher Erkrankungen werden gewebetoxische Stoffe, besonders reaktive Sauerstoffradikale, proinflammatorische Zytokine und Stickstoffoxyd, von immunkompetenten Zellen ausgeschüttet (Atkins, D'Souza, Holdsworth). Aus diesem Grund wäre zu erwarten, dass eine reduzierte Anzahl Makrophagen im Glomerulus auch zu einer verminderten Schädigung dieses Kompartiments führt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen dagegen, dass die Behandlung mit den Chemokinantagonisten zwar zu einer reduzierten Makrophageninfiltration geführt hat, dies aber auch mit verstärkten histopathologischen Veränderungen und einer massiven Proteinurie einherging. Daraus läßt sich schließen, dass AOP-RANTES und Met-RANTES über die Blockierung der Makrophageninfiltration hinausgehende Funktionen haben, die für diese Effekte verantwortlich gemacht werden können.

Nachdem ein direkter toxischer Effekt der Antagonisten ausgeschlossen werden konnte (siehe Kapitel 4.3.), und auch weitere *in vitro* Studien keine Anhalte für direkte zytotoxische Eigenschaften von Met-RANTES geben konnten, muß ein durch die Antagonisten ausgelöster immunmodulatorischer Effekt vermutet werden.

Ähnlich negative Effekte fanden sich im Modell der *nephrotoxic serum* Nephritis bei CCR 1- bzw. CCR 2-defizienten Mäusen (Bird, Topham). So zeigten sich in CCR 2-knockout Mäusen eine ebenfalls verminderter Infiltration von Makrophagen und eine deutliche Verschlechterung der funktionellen und histologischen Parameter (Bird). Die CCR 1-knockout Tiere zeigten statistisch signifikant eine ca. vierfach höhere Harnstoffkonzentration im Blut, erhöhte Cholesterinkonzentrationen im Plasma und eine verstärkte glomeruläre Schädigung (Topham).

Den beobachteten Effekten können nach Ausschluss der Toxizität der Antagonisten Veränderungen der humoralen und zellulären Immunantwort zugrunde liegen. Zur Klärung erfolgte sowohl eine genauere Charakterisierung des Modells als auch zusätzliche Untersuchungen *in vitro*.

Ein möglicher nephrotoxischer Effekt durch die Antagonisten wurde durch Injektionen mit AOP-RANTES - oder Met-RANTES in gesunden Tieren untersucht. Dabei zeigten sich weder histologische noch funktionelle Veränderungen, sodass ein direkter Effekt auf die gesunde Niere unwahrscheinlich ist. Es fand sich gegenüber den Tieren, die nur mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurden, keine Infiltration immunkompetenter Zellen wie Makrophagen oder T-Lymphozyten. Auch eine mesangiale Proliferation war genauso wenig zu beobachten wie eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen. Die Proteinurie war ebenfalls im Bereich der Gruppe I (NaCl).

Merkmale des in dieser Studie verwendeten Modells sind neben der Auslösung einer antikörpervermittelten Immunantwort des Organismus auch die Ablagerung HAF-spezifischer Immunkomplexe im Mesangium der geschädigten Nieren. Aufgrund der Tatsache, dass die HAF-induzierte Immunkomplex-Glomerulonephritis eben auf einer humoralen Antwort von zu Plasmazellen gereiften B-Lymphozyten beruht, wurde diese genauer untersucht. Der

Einfluß einer veränderten Th1/Th2-Balance auf den Verlauf einer Glomerulonephritis konnte bereits in zwei Nephritismodellen gezeigt werden (Holdsworth 1999, Topham).

Topham et al. konnten im Verlauf der NTS-Nephritis zeigen, dass der Verlust der Funktion des Chemokinrezeptors CCR 1 in Mäusen, zu einem gesteigerten Influx von Makrophagen, zur Verschlechterung der Nierenfunktion und auch zu stärkeren histopathologischen Veränderungen führte. Die CCR 1-defizienten Tiere entwickelten ein größeres Maß an Glomerulosklerose, eine vermehrte Halbmondbildung und auch eine verstärkte glomeruläre Hyperzellularität. Parallel zu diesen histologisch erkennbaren Schäden zeigten diese Tiere Veränderungen der Immunantwort im Sinne einer Verschiebung zugunsten der Th1-Antwort mit erhöhten IgG2a-Titern und einer erhöhten Produktion von TNF- α in kultivierten Splenozyten.

In der vorgelegten Studie zeigten sich in den Tieren, die zusätzlich zu dem Antigen einen der Antagonisten erhalten hatten, weder Veränderungen der HAF-spezifischen IgG-Titer noch eine Verschiebung innerhalb der Subklassen. Auch die Ablagerungen der Immunkomplexe im Mesangium zeigten keinerlei Veränderungen. Die gemessenen Konzentrationen von IFN- γ im Überstand kultivierter Milzzellen im Sinne einer veränderten Th1/Th2-Balance zeigten ebenfalls keine Unterschiede in Abhängigkeit von der Behandlung mit HAF und oder ohne Met-RANTES.

Diese Ergebnisse der durchgeführten Experimente ergeben keine Hinweise auf eine veränderte humorale Antwort als Ursache der beobachteten Veränderungen im Verlauf der HAF-induzierten Immunkomplex-Glomerulonephritis.

Nachdem durch *in vitro* Apoptose Assays ausgeschlossen werden konnte, dass die Antagonisten Apoptose in murinen Mesangialzellen induzieren und sich auch in den Tieren, die nur mit den Antagonisten behandelt wurden, keine toxische Mesangiolyse fand, muß nach anderen Erklärungen für die erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Glomerulus gesucht werden.

Ein protektiver Effekt von *fractalkine* im Verlauf der Apoptose konnte bereits *in vitro* an Mikrogliazellen nachgewiesen werden (Boehme). Dort senkte die Behandlung mit *fractalkine* die durch einen FAS-Antikörper induzierte Apoptose um 80 %. Eine Blockierung dieser Chemokinwirkung durch die Antagonisten könnte zu dem beobachteten Phänomen führen.

Die Ergebnisse der Apoptose *Assays* zeigten aber keinen Einfluß von Met-RANTES auf die Apoptose von murinen Mesangialzellen, so dass in diesem Fall ein gleichsinniger Effekt von *fractalkine* und RANTES ausgeschlossen werden konnte.

4.3. Met-RANTES und AOP-RANTES modulieren die Makrophagenfunktion

Die in dieser Studie beobachtete stärkere glomeruläre Schädigung und die verstärkte Proteinurie bei mit AOP- oder Met-RANTES behandelten Mäusen mit HAF-GN, trotz einer reduzierten Anzahl glomerulärer Makrophagen, könnte auf einer Aktivierung glomerulärer Makrophagen beruhen. Zellen dieser Zelllinie können sowohl in Form eines pro- als auch eines antiinflammatorischen Phänotyps imponieren. In verschiedenen Situationen wie Gewebsdestruktion, Wundheilung, Angiogenesis oder Antigenpräsentation prädominieren verschiedene Phänotypen von Makrophagen (Erwig 1999). Verantwortlich für diese Entwicklung ist das umgebende Milieu. Die Anwesenheit und auch die zeitliche Koordination der Konzentration von Zytokinen, Chemokinen und anderer inflammatorischer Mediatoren spielen beim *programming of macrophages* eine entscheidende Rolle (Erwig 2000).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der Apoferritin-induzierten Glomerulonephritis mit Met-RANTES zu einem proinflammatorischen Phänotyp glomerulärer Makrophagen führte. Diese sind durch eine gesteigerte Expression von iNOS charakterisiert. Bisher konnte lediglich die Fähigkeit von RANTES, die NO-Ausschüttung humaner Makrophagen *in vitro* zu bewirken, gezeigt werden (Dell'Albani). Die Resultate der vorgelegten Studie (siehe Kapitel 3.7.) zeigen eine Aktivierung der iNOS-Expression *in vivo* durch Met-RANTES.

Die Tatsache, dass Met-RANTES in diesem Modell die durch RANTES vermittelte Transmigration von Leukozyten zu verhindern scheint, aber andererseits wie der Chemokinrezeptorligand RANTES die iNOS-Expression glomerulärer Makrophagen hochreguliert, könnte auf sowohl agonistischen als auch antagonistischen Effekten von AOP- und Met-RANTES auf RANTES-Rezeptoren beruhen, die über unterschiedliche Transduktionswege vermittelt werden (Proudfoot 1999). Nach der Bindung von RANTES an den Chemokinrezeptor CCR 5 erfolgten innerhalb der ersten fünf Minuten ein Ca^{2+} -Influx, eine Rezeptordimerisation, eine Aktivierung der Thyrosinkinase und des JAK/STAT-

Signaltransduktionsweges (Mellado). Dagegen spielt bei der späteren Antwort die Freisetzung der $\beta\gamma$ Untereinheit von $G\alpha_i$ und die p^{125} -FAK eine Rolle, die in die Vermittlung der Chemotaxis involviert ist (Neptune).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass AOP-RANTES in der Lage ist, die späte für die Vermittlung der Chemotaxis notwendige Antwort zu blockieren (Rodríguez-Frade). Die schnelle Antwort läßt sich durch AOP-RANTES nicht blockieren. Diese spielt aber wohl beim Einfluß auf die iNOS-Expression eine Rolle, da die Aktivierung des JAK/STAT-*pathways* eine vermehrte iNOS Expression in Makrophagen vermittelt (Dell'Albani).

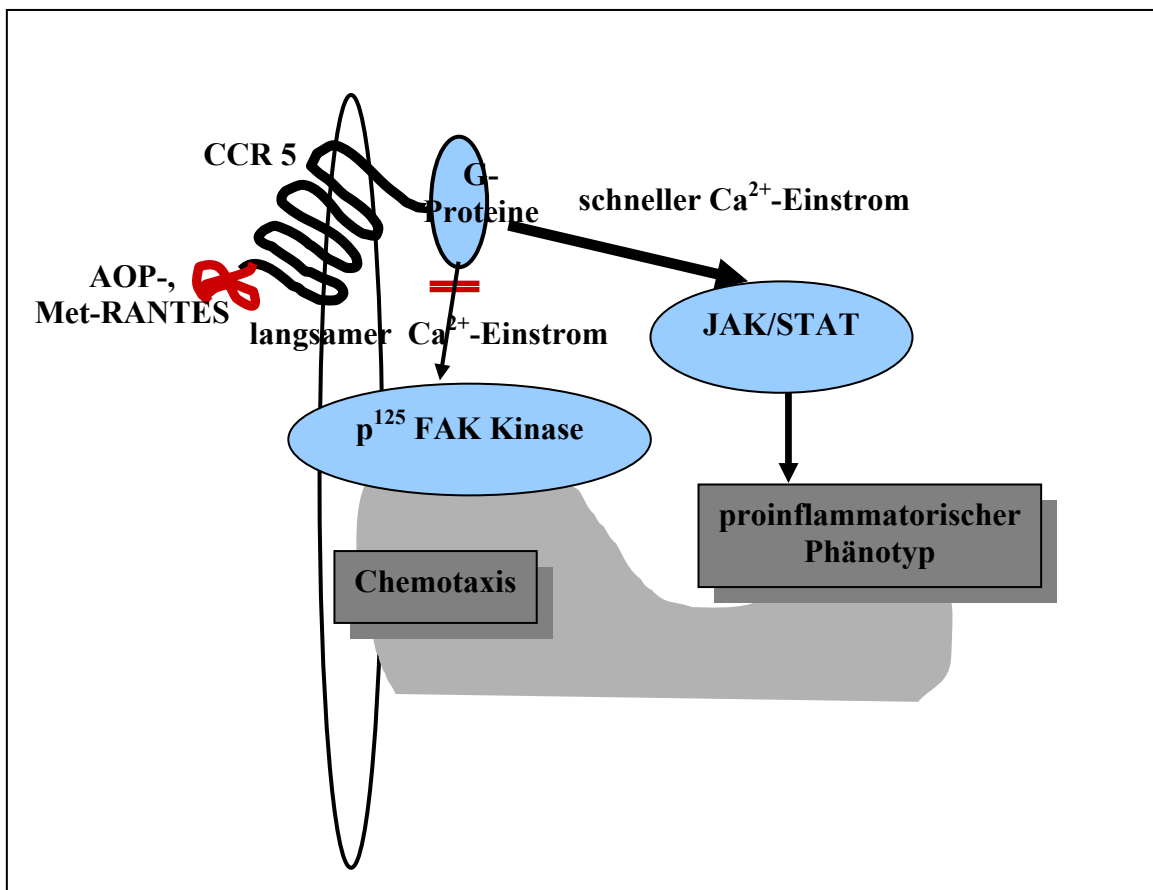


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung des Einflusses von AOP-RANTES und Met-RANTES auf die intrazelluläre Signaltransduktion. Die Chemokinabkömmlinge blockieren den langsamen Ca^{2+} -Einstrom und verhindern die Chemotaxis. Der schnelle Einstrom bleibt unbeeinflusst.

In der Pathophysiologie des in dieser Studie verwendeten Krankheitsmodells spielen offensichtlich beide Mechanismen eine Rolle. Einerseits zeigen sich die Antagonisten für die Reduzierung des Makrophageninfiltrats verantwortlich, andererseits induzieren sie aber auch einen proinflammatorischen Phänotyp bei glomerulären Makrophagen, der durch eine veränderte Morphologie und verstärkte iNOS-Expression gekennzeichnet ist.

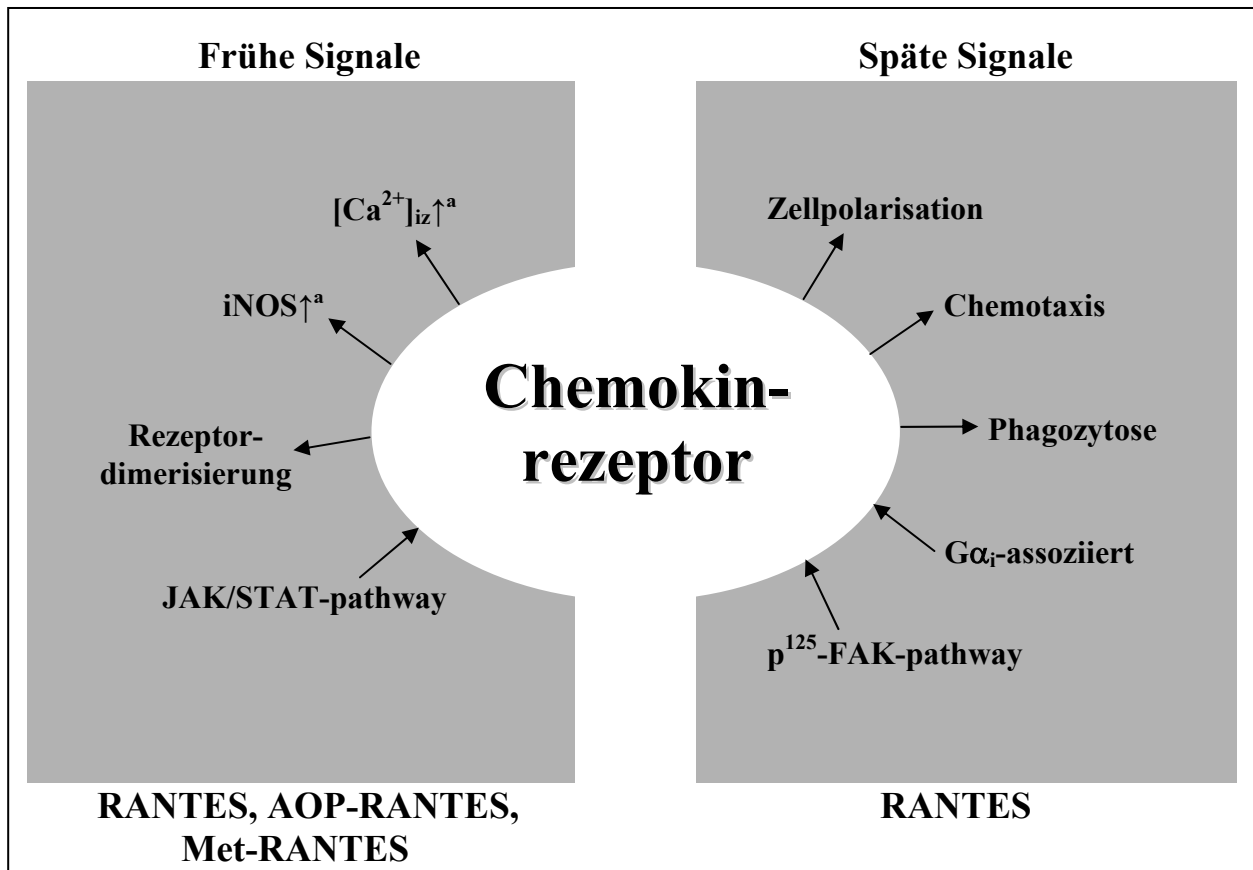


Abbildung 4.2.: Schema der Wirkungen von RANTES, AOP-RANTES und Met-RANTES, modifiziert nach Rodríguez-Frade et al.

Von Makrophagen ausgeschüttetes Stickstoffoxyd (NO) ist ein wichtiger Faktor bei der Schädigung glomerulärer Zellen in der Immunkomplex-Glomerulonephritis (Hortelano). Es ist *per se* nicht nur in der Lage, die Proliferation von Mesangialzellen zu inhibieren (Duffield), sondern auch deren Apoptose zu induzieren (Brune, Sandau).

Somit werden in dieser Studie erstmals nicht nur die *in vitro* erhobenen Daten bestätigt, sondern auch erstmals ihre funktionelle Bedeutung im Verlauf dieser entzündlichen Erkrankung gezeigt.

Sowohl die Blockierung der protektiven Effekte von Chemokinen auf die Apoptose durch die Antagonisten als auch die Ausschüttung von Stickoxyd durch Makrophagen als ein sekundärer Effekt der Antagonisten sind, wie bereits angedeutet, als Auslöser der erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen denkbar. Eine andere oder auch zusätzliche Möglichkeit wäre ein hemmender Einfluß der RANTES-Antagonisten auf die Phagozytosefähigkeit der infiltrierenden und residenten Makrophagen im Glomerulus der erkrankten Tiere. Diese These wird durch die Daten aus dem *in vivo Assay* gestützt, der die Phagozytosefähigkeit in der Thioglykolat induzierten Peritonitis untersucht.

Toxische Stoffe aus apoptotischen und sekundär nekrotischen Zellen sind in der Lage, eine Entzündungsreaktion in Gang zu setzen und zu unterhalten (Huynh). Aus diesem Grund sind das Erkennen und Eliminieren solcher toter Zellen und ihrer Bestandteile eine wesentliche Aufgabe von Phagozyten. Das Entfernen apoptotischer Zellen im Verlauf einer Glomerulonephritis reduziert den Grad der Aktivierung der Makrophagen (Savill, Stoy). Eine verminderte Abräumung der apoptotischen Zellen in den Glomeruli aufgrund reduzierter Fähigkeit der Makrophagen zur Phagozytose korreliert wiederum mit einer verstärkten Aktivität einer Immunkomplex-Glomerulonephritis (Moxey-Mims).

Durch die verminderte Fähigkeit der Makrophagen, Zellbestandteile und apoptotische Zellen zu eliminieren, könnte bei der HAF-GN ein wesentlicher suppressiver Mechanismus der Entzündung blockiert worden sein. Auf diesem Weg sind Progression und Verschlechterung der durch Apoferritin induzierten Immunkomplex-Glomerulonephritis durch Behandlung mit RANTES -Antagonisten zu erklären.

Dieser Mechanismus wurde bislang in der Literatur noch nicht beschrieben. Diese neue Funktion unterstreicht die in den letzten Jahren gewonnene Erkenntnis, dass die Wirkung der Chemokine im Kontext der Entzündung über die Blockierung der Leukozyteninfiltration hinausgeht und auch weitaus komplexer zu sein scheint als das zunächst angenommen wurde.

Man kann nun über eine mögliche Verbindung zwischen der durch Met-RANTES verstärkten Expression von iNOS einerseits und der reduzierten Phagozytosefähigkeit der Makrophagen andererseits spekulieren. An murinen Mikrogliazellen konnte bereits ein hemmender Effekt von Stickoxid auf die Phagozytose von Makrophagen gezeigt werden (Kopec). Da von Makrophagen ausgeschüttetes NO offensichtlich die Apoptose und die Phagozytose von Makrophagen beeinflusst, besteht wahrscheinlich eine Verbindung zwischen der erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen im Glomerulus und der verstärkten Expression der *inducible nitric oxide synthase* in den Tieren mit HAF-GN, die mit den RANTES-Antagonisten behandelt wurden. Auf jeden Fall können sowohl die gesteigerte iNOS-Expression der Makrophagen als auch die erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen im Glomerulus die Verschlechterung der Apoferritin-induzierten Immunkomplex-Glomerulonephritis durch die Behandlung mit Met-RANTES und AOP-RANTES in ausreichendem Maße erklären.

Nach Berücksichtigung sämtlicher Ergebnisse könnten die Effekte der RANTES-Antagonisten auf den Verlauf der Apoferritin-induzierten Immunkomplex-Glomerulonephritis wie folgt angenommen werden. Eine gesteigerte durch Met-RANTES induzierte glomeruläre Sekretion von Stickoxid (1) führt zu einer gesteigerten Apoptose von Mesangialzellen (2), die von Makrophagen nicht in ausreichendem Maße phagozytiert werden (3). Die erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen bzw. das gesteigerte Vorhandensein entsprechender Zellbestandteile verhindert einen suppressiven Effekt auf die Makrophagenaktivierung (4) und führt damit zu einem „aggressiveren“, funktional und morphologisch veränderten Phänotyp glomerulärer Makrophagen, der sich durch eine erhöhte Expression der iNOS und eine verminderte Phagozytosefähigkeit auszeichnet. Dieser Circulus vitiosus führt trotz einer Reduzierung der Anzahl glomerulärer Makrophagen zu einer vermehrten Schädigung des Glomerulus. Die Resultate dieser Studie deuten auf neue Funktionen von Chemokinen hin wie etwa Einflüsse auf die Expression der iNOS und die Phagozytosefähigkeit von Makrophagen. Auch der durch Chemokinantagonisten veränderte Makrophagenphänotyp scheint bei der Immunmodulation dieses Krankheitsmodells eine Rolle zu spielen.

5. Klinische Bedeutung und Ausblick

Auf die Notwendigkeit, neue Therapieansätze zu entwickeln, die eine frühzeitige und funktionierende Behandlung von Nierenerkrankungen, die in die terminale Niereninsuffizienz münden, ermöglichen, wurde bereits in der Einführung hingewiesen.

Nach Auswertung aller Ergebnisse haben die verwendeten Chemokinrezeptorantagonisten jedoch das Ziel, eine Verbesserung der Erkrankung herbeizuführen, verfehlt. Obwohl die leukozytäre Infiltration reduziert werden konnte, weisen sowohl die histopathologischen Veränderungen als auch die funktionellen Parameter unter Behandlung mit AOP-RANTES und Met-RANTES deutlich auf eine schwerere Erkrankung hin. Dies steht im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen, in denen die in dieser Studie zur Anwendung gekommenen Antagonisten bereits Effekte im therapeutischen Sinne erzielen konnten. Den Nutzen, den diese, aber auch andere Antagonisten z.B. in diversen Nierentransplantationsmodellen (Gröne, Horuk) hatten, zeigten die RANTES-Antagonisten in dem in dieser Studie verwendeten Modell einer IC-GN jedenfalls nicht. Die vorliegende Studie gibt einen Hinweis darauf, dass Zytokine im Verlauf diverser entzündlicher Erkrankungen so unterschiedlich reguliert sind, dass die Verwendung von Chemokinantagonisten sowohl zur Verbesserung, aber auch, wie in diesem Fall, zur Verschlechterung der Erkrankung führen kann.

Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Studien, die die Verwendung von Chemokinantagonisten bei entzündlichen Erkrankungen beschreiben, führt in der Apoferritin-induzierten Immunkomplex-Glomerulonephritis eine systemische Immunreaktion zu einer lokal beschränkten Entzündung. Deswegen ist dieses Modell zur Testung neuer Therapiemethoden besser geeignet als andere, da auch die relevanten humanen renalen Entzündungen wie die IgA-Nephritis, der systemische Lupus erythematosus oder die Post-Streptokokken-Glomerulonephritis auf diesem Mechanismus beruhen. Da aber auch in dem hier verwendeten Krankheitsmodell die systemische inflammatorische Reaktion einen lokalen Effekt erzielt, ist unklar, warum die beobachteten Effekte in den bereits publizierten Studien nicht aufgefallen sind. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass experimentelle Krankheitsmodelle in anderen Studien (Lloyd, Panzer) nur über den relativ kurzen Zeitraum von wenigen Tagen beobachtet wurden und sich die in dieser Studie gezeigten Veränderungen erst später entwickeln.

Bis heute werden noch immer nicht nur neue Chemokinrezeptoren entdeckt, sondern auch über bisher unbekannt Funktionen bekannter Chemokine bei vielen Abläufen im Organismus publiziert. Das komplizierte Netzwerk der Zytokine erschließt sich uns noch nicht in ausreichendem Maße, um die Therapieindikation für Chemokinrezeptorantagonisten bei diversen entzündlichen Erkrankungen sicher stellen zu können.

Trotzdem oder gerade deshalb sind Studien zu diesem Thema notwendig, um profunde und umfassende Kenntnisse über diesen Teil des Immunsystems zu erhalten. Bevor die Funktionen und Effekte von Chemokinen und ihren Rezeptoren nicht genauer bekannt sind, könne sie nicht als therapeutische Option entzündlicher Erkrankungen in Betracht gezogen werden.

6. Abkürzungen und Begriffe

ABTS	2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt crystals
ACE	angiotensin converting enzyme
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AOP-RANTES	Aminooxypentan-RANTES
APES	3-Aminopropyltriethoxy-silan
BSA	bovines Serum-Albumin
C3	Komplementfaktor 3
°C	Grad Celsius
CCR	Chemokinrezeptor
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Ditriotenitol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
ESRD	end-stage renal disease
FAK	focal adhesion kinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GN	Glomerulonephritis
GRO- α	Growth-related-Oncogene- α

HAF	horse spleen apoferritin
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
HIV	human immunodeficiency virus
HMG-CoA-Reduktase	β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese)
HRP	horseradish peroxidase
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IC-GN	Immunkomplex-Glomerulonephritis
IgG	Immunglobulin G
IL-8	Interleukin-8
INF- γ	Interferon- γ
IP-10	interferon-induced protein-10
JAK	Janus associated kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	10 ³ Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
l	Liter
μ l	Mikroliter

M	molar
Met-RANTES	N-terminal mit Methionin modifiziertes RANTES
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1	macrophage inflammatory protein-1
ml	Milliliter
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	nuclear factor- κ B
Na ₂ EDTA	Dinatrium-Ethyldiamintetraacetat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NTS	nephrotoxic serum
PDGF	platelet derived growth factor
PBS	phosphate buffered saline
PIPES	1,4-Piperazinediethanesulfonic acid
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	R-phycoerythrin
TAMRA	6-Carboxytetramethylrhodamin
TGF- β	tumor growth factor- β
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF- α	tumor necrosis factor- α
vs.	versus

7. Literaturverzeichnis

Abbate M, Zoja C, Corna D, Capitanio M, Bertani T, Remuzzi G: In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Jul; 9(7):1213-1224.

Alcami A, Symons JA, Collins PD, Williams TJ, Smith GL: Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from Vaccinia virus. *J Immunol*. 1998; 160(2):624-633.

Anders HJ, Vielhauer V, Cohen DC, Kretzler M, Segerer S, Luckow B, Weller L, Gröne HJ, Schlöndorff D: Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2001; 12(5):919-931.

Anders HJ, Vielhauer V, Frink M, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Gröne HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlöndorff D: A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter obstruction. *J Clin Invest*. 2002 Jan; 109(2):251-259.

Anders HJ, Vielhauer V, Schlöndorff D: Chemokine and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*. 2003 Feb; 63(2):401-415.

Atkins RC: Macrophages in renal injury. *Am J Kidney Dis*. 1998 Jan; 31(1):95-97.

Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, Shiraishi M, Aramaki Y, Okonogi K, Ogawa Y, Meguro K, Fujino M: A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 May 11; 96(10):5698-5703.

Baggiolini M: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*. 1998 Apr 9; 392(6676):565-568.

Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ: A new class of membrane-bound chemokine with CX₃C motif. *Nature*. 1997 Feb 13; 385(6617):640-644.

Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM: CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000; 68(1):1-8.

Bird JE, Giancarli MR, Kurihara T, Kowala MC, Valentine MT, Gitlitz PH, Pandya DG, French MH, Durham SK: Increased severity of glomerulonephritis in CC chemokine receptor 2 knockout mice. *Kidney Int*. 2000 Jan; 57(1):129-136.

Boehme SA, Lio FM, Maciejewski-Lenoir D, Bacon KB, Conlon PJ: The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol*. 2000 Jul 1; 165(1):397-403.

Bohle A, Wehrmann M, Bogenschutz O, Batz C, Vogl W, Schmitt H, Muller CA, Muller GA: The long-term prognosis of the primary glomerulonephritides: A morphological and clinical analysis of 1747 cases. *Pathol Res Pract*. 1992 Oct; 188(7):908-924.

Boshoff C, Endo Y, Collins PD, Takeuchi Y, Reeves JD, Schweickart VL, Siani MA, Sasaki T, Williams TJ, Gray PW, Moore PS, Chang Y, Weiß RA: Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines. *Science*. 1997 Oct 10; 278(5336):290-294

Brady HR: Leukocyte adhesion molecules and kidney disease. *Kidney Int*. 1994 May; 45(5):1285-1300.

Brune B. Nitric oxide and apoptosis in mesangial cells. *Kidney Int*. 2002 Mar; 61(3):786-789.

Budde K, Waiser J, Ceska M, Katalinic A, Kurzdorfer M, Neumayer HH: Interleukin-8 expression in patients after renal transplantation. *Am J Kidney Dis*. 1997 Jun; 29(6):871-880.

Butcher EC, Picker LJ: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996 Apr 5; 272(5258):60-66.

Carfi A, Smith CA, Smolak PJ, McGrew J, Wiley DC: Structure of a soluble secreted chemokine inhibitor vCCI (p35) from cowpox virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 Oct 26; 96(22):12379-12383.

Chen S, Bacon KB, Li L, Garcia GE, Xia Y, Lo D, Thompson DA, Siani MA, Yamamoto T, Harrison JK, Feng L: In vivo inhibition of CC and CX₃C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto (WKY) rats by vMIP-II. *J Exp Med*. 1998 Jul 6; 188(1):193-198.

Chomczynski P and Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol-chloroform extraction: *Anal Biochem*. 1987 Apr 16; 162(1):156-159.

Cockwell P, Howie AJ, Adu D, Savage CO: In situ analysis of C-C chemokines mRNA in human glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1998 Sep; 54(3):827-836.

Collins AJ et al.: Excerpts from the United States Renal Data System 2001 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States. *Am J Kidney Dis*. 2001 Oct; 38(4 Suppl 3):37-52.

Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I: Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J*. 1997 Sep 1; 16(23):6996-7007.

Daha MR: Mechanisms of mesangial injury in glomerular diseases. *J Nephrol*. 2000 Nov-Dec; 13 Suppl 3:89-S95.

Dell'Albani P, Santangelo R, Torrisi L, Nicoletti VG, de Vellis J, Giuffrida Stella AM: JAK/STAT signaling pathway mediates cytokine-induced iNOS expression in primary astroglial cell cultures. *J Neurosci Res*. 2001 Sep 1;65(5):417-424.

Douglas MS, Ali S, Rix DA, Zhang JG, Kirby JA: Endothelial production of MCP-1: modulation by heparin and consequences for mononuclear cell activation. *Immunology*. 1997 Dec; 92(4):512-518.

D'Souza MJ, Oettinger CW, Shah A, Tipping PG, Huang XR, Milton GV: Macrophage depletion by albumin microencapsulated clodronate: attenuation of cytokine release in macrophage-dependent glomerulonephritis. *Drug Dev Ind Pharm*. 1999 May; 25(5):591-596.

Duffield JS, Erwig LP, Wei X, Liew FY, Rees AJ, Savill JS: Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells. *J Immunol*. 2000 Feb 15; 164(4):2110-2119.

Eddy AA: Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*. 2000 Dec; 15(3-4): 290-301.

Erwig LP, Kluth DC, Walsh GM, Rees AJ: Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J Immunol*. 1998 Aug 15; 161(4):1983-1988.

Erwig LP, Rees AJ: Macrophage activation and programming and its role for macrophage function in glomerular inflammation: *Kidney Blood Press Res*. 1999; 22(1-2):21-25.

Erwig LP, Stewart K, Rees AJ: Macrophages from inflamed but not normal glomeruli are unresponsive to anti-inflammatory cytokines. *Am J Pathol*. 2000 Jan; 156(1):295-301.

Frei U, Schober-Halstenberg HJ: Nierenersatztherapie in Deutschland – Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2001/2002. *QuASi Niere* 2002.

Goebeler M, Kilian K, Gillitzer R, Kunz M, Yoshimura T, Brocker E-B, Rapp UR, Ludwig S: The MKK6/p38 stress kinase cascade is critical for tumor necrosis factor- α -induced expression of monocyte-chemoattractant-protein-1 in endothelial cells. *Blood*. 1999 Feb 1; 93(3):857-865.

Gomez-Chiarri M, Ortiz A, Gonzalez-Cuadrado S, Seron D, Emancipator SN, Hamilton TA, Barat A, Plaza JJ, Gonzalez E, Egido J: Interferon-inducible protein-10 is highly expressed in rats with experimental nephrosis. *Am J Pathol.* 1996 Jan; 148(1):301-311.

Gong JH, Clark-Lewis I: Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH₂-terminal residues. *J Exp Med.* 1995 Feb 1; 181(2): 631-640.

Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Montinaro V, Marra F, Schena FP: Monocyte chemotactic peptide-1 expression in acute and chronic human nephritides: A pathogenic role in interstitial monocytes recruitment. *J Am Soc Nephrol.* 1996 Jun; 7(6):906-913.

Grone HJ, Weber C, Weber KS, Grone EF, Rabelink T, Klier CM, Wells TN, Proudfoot AE, Schlondorff D, Nelson PJ: Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment. *FASEB J.* 1999 Aug 1; 13(11):1371-1383.

Hall BM: Cells mediating allograft rejection. *Transplantation.* 1991 Jun; 51(6):1141-1151.

Heeg K, Reimann J, Kabelitz D, Hardt C, Wagner H: A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2-producing helper T cell frequencies. *J Immunol Methods.* 1985 Mar 18; 77(2):237-246.

Hesselgesser J, Ng HP, Liang M, Zheng W, May K, Bauman JG, Monahan S, Islam I, Wei GP, Ghannam A, Taub DD, Rosser M, Snider RM, Morrissey MM, Perez HD, Horuk R: Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor. *J Biol Chem.* 1998 Jun 19; 273(25):15687-15692.

Hisada Y, Sugaya T, Ymanouchi M, Uchida H, Fujimura H, Sakurai H, Fukamizu A, Murakami K: Angiotensin II plays a pathogenic role in immune-mediated renal injury in mice. *J Clin Invest.* 1999 Mar; 103(5):627-635.

Ho MK, Springer TA: Mac-2, a novel 32,000 Mr mouse macrophage subpopulation-specific antigen defined by monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1982 Mar; 128(3):1221-1228.

Ho MK, Springer TA: Tissue distribution, structural characterization, and biosynthesis of Mac-3, a macrophage surface glycoprotein exhibiting molecular weight heterogeneity. *J Biol Chem.* 1983 Jun 10; 258(1):636-642.

Holdsworth SR. Fc dependence of macrophage accumulation and subsequent injury in experimental glomerulonephritis. *J Immunol.* 1983 Feb; 130(2):735-739.

Holdsworth SR., Kitching AR, Tipping PG: Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1999 Apr; 55(4):1198-1216.

Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI: Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science.* 1991 Sep 13; 253(5025):1278-1280.

Hoover RL, Karnovsky MJ, Austen KF, Corey AJ, Lewis RA: Leukotriene B4 action on endothelium mediates augmented neutrophil/endothelial adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984 Apr; 81(7):2191-2193.

Hora K, Satriano JA, Santiago A, Mori T, Stanley ER, Shan Z, Schlondorff D: Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide-1 and colony stimulating factor-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Mar 1; 89(5):1745-1749.

Hortelano S, Diaz-Guerra MJ, Gonzalez-Garcia A, Leonardo E, Gamallo C, Bosca L, Martinez-A C: Linomide administration to mice attenuates the induction of nitric oxide synthase elicited by lipopolysaccharide-activated macrophages and prevents nephritis in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Immunol.* 1997 Feb 1; 158(3):1402-1408.

Horuk R, Shurey S, NG HP, May K, Bauman JG, Islam I, Ghannam A, Buckman B, Wei GP, Xu W, Liang M, Rosser M, Dunning L, Hesselgesser J, Snider RM, Morrissey MM, Perez HD, Green C: CCR1-specific non-peptide antagonist: efficacy in a rabbit allograft rejection model. *Immunol Let.* 2001 Apr 2; 76(3):193-201.

Howard OMZ, Benbaruch A, Oppenheim JJ: Chemokines: Progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotech.* 1996 Feb; 14(2):46-51.

Huber AR, Kunkel SL, Todd RF, Weiss SJ: Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science.* 1991 Oct 4; 254(5028):99-102.

von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C: RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation.* 2001 Apr 3; 103(13):1772-1777.

Huynh ML, Fadok VA, Henson PM: Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 2002 Jan; 109(1):41-50.

Ishikawa Y, Sugiyama H, Stylianou E, Kitamura M: Bioflavonoid quercetin inhibits interleukin-1-induced transcriptional expression of monocyte chemoattractant protein-1 in glomerular cells via suppression of nuclear-factor- κ B. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Nov; 10(11):2290-2296.

Jocks T, Zahner G, Freudenberg J, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RAK: Prostaglandin E1 reduces the glomerular mRNA-Expression of monocyte-chemoattractant protein 1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerular injury. *J Am Soc Nephrol.* 1996 Jun; 7(6):897-905.

Johnatty RN, Taub DD, Reeder SP, Turcovski-Corrales SM, Cottam DW, Stephenson TJ, Rees RC: Cytokine and chemokine regulation of proMMP-9 and TIMP-1 production by human peripheral blood lymphocytes. *J Immunol.* 1997 Mar 1; 158(5):2327-2333.

Kang DH, Kanellis J, Hugo C, Truong L, Anderson S, Kerjaschi D, Schreiner GF, Johnson RJ: Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002 Mar; 13(3):806-816.

Kaufmann A, Salentin R, Gemsa D, Sprenger H. Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1 alpha during differentiation of human monocytes to macrophages. *J Leukoc Biol.* 2001; 69(2):248-252.

Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, Zlotnik A: Lymphotactin: A cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.* 1994 Nov 25; 266(5198):1395-1399.

Klier CM, Nelson PJ: Chemokine-induced extravasation of MonoMac 6 cells: chemotaxis and MMP activity. *Ann N Y Acad Sci.* 1999 Jun 30; 878:575-577.

Kopec KK., Carroll RT. Phagocytosis is regulated by nitric oxide in murine microglia. *Nitric Oxide.* 2000 Apr; 4(2):103-111.

Kriz W, Kretzler M, Nagata M, Provoost AP, Shirato I, Uiker S, Sakai T, Lemley KV: A frequent pathway to glomerulosclerosis: deterioration of tuft architecture-podocyte damage-segmental sclerosis. *Kidney Blood Press Res.* 1996; 19: 245-253.

Kriz W, Hartmann I, Hosser H, Hahnel B, Kranzlin B, Provoost A, Gretz N: Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Mar; 12(3):496-506.

Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, Rucinski D, Viksman MJ, Kaplan AP: RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophiles. *J Immunol.* 1992 Jul 15; 149(2):636-642.

Lalani AS, Ness TL, Singh R, Harrison JK, Seet BT, Kelvin DJ, McFadden, G Moyer RW: Functional comparisons among members of the poxvirus T1/35kDa family of soluble CC-chemokine inhibitor glycoproteins. *Virology.* 1998 Oct 10; 250(1):173-184.

Ljungquist A: The intrarenal arterial pattern in the normal and diseased human kidney. *Acta Med Scand.* 1963: 174 Suppl 401: 5-34.

Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC: RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med*. 1997 Apr 7; 185(7): 1371-1380.

Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM: CCR5 is characteristic for Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998 Jan 22; 391(6665):344-345.

von Luettichau I, Nelson PJ, Pattison JM, van de Rijn M, Huie P, Warnke R, Wiedermann CJ, Stahl RA, Sibley RK, Krensky AM: RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissue. *Cytokine*. 1996 Jan; 8(1):89-98.

Luther SA, Cyster JG: Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*. 2001 Feb; 2(2):102-107.

Mack M, Pfirstinger J, Weber C, Weber KS, Nelson PJ, Rupp T, Maletz K, Bruhl H, Schlondorff D: Chondroitin sulfate A released from platelets blocks RANTES presentation on cell surfaces and RANTES-dependent firm adhesion of leukocytes. *Eur J Immunol*. 2002 Apr; 32(4):1012-1020.

Mackay CR: Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol*. 2001 Feb; 2(2):95-101.

Mangan DF, Mergenhagen SE, Wahl SM: Apoptosis in human monocytes: Possible role in chronic inflammatory diseases. *J Periodontol*. 1993; 64(5 Suppl):461-466.

Marcussen N: Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression. *Nephrol Dial Transplant*. 2000; 15 Suppl 6:74-75.

Marsh CB, Lowe MP, Rovin BH, Parker JM, Liao Z, Knoell DL, Wewers MD: Lymphocytes produce IL-1-beta in response to Fc-gamma receptor cross-linking: Effects on parenchymal cell IL-8 release. *J Immunol*. 1998 Apr 15; 160(8):3942-3948.

McColl SR, Clark-Lewis I: Inhibition of murine neutrophil recruitment in vivo by CXC chemokine receptor antagonists. *J Immunol*. 1999 Sep; 163(5):2829-2835.

Mellado M, Rodríguez-Frade JM, Mañes S, Martínez-A C: Chemokine signaling and functional responses: The role of receptor dimerization and TK pathway activation. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:397-421.

Morita T, Yamamoto T, Churg J: Mesangiolytic: an update. *Am J Kidney Dis*. 1998 Apr; 31(4):559-73.

Moxey-Mims MM, Noble B: Glomerular macrophage phagocytic activity in experimental immune complex nephritis. *Kidney Int*. 1994 May; 45(5):1326-1332.

Murphy PM, Tiffany HL: Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991 Sep 13; 253(5025):1280-1283.

Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S et al: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996 Aug 15; 382(6592):635-638.

Nebel M: Behandlungskosten der Nierenersatztherapie in Deutschland 1999. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten*. 2002; 31(3):85-92.

Neubauer G: Kosten der Nierenersatztherapie – Entwicklung und Wirtschaftlichkeitspotentiale. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten*. 2002; 31(3):93-100.

Neptune ER, Bourne HR: Receptors induce chemotaxis by releasing the $\beta\gamma$ subunit of G_i , not by activating G_q or G_s . *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Dec 23; 94(26):14489-14494.

Norman JT, Orphanides C, Garcia P, Fine LG: Hypoxia-induced changes in extracellular matrix metabolism in renal cells. *Exp Nephrol*. 1999 Sep-Dec; 7(5-6):463-469.

Norman JT, Clark IM, Garcia PL: Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int.* 2000 Dec; 58(6): 2351-2366.

Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Dias C, Hernandez G, Egido J: Atorvastatin reduces NF- κ B activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis.* 1999 Dec; 147(2):253-261.

Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolish S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D: Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature.* 1997 Jun 5; 387(6633):611-617.

Panzer U, Schneider A, Wilken J, Thompson DA, Kent SB, Stahl RA: The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1999 Dec; 56(6):2107-2115.

Parry CM, Simas JP, Smith VP, Stewart CA, Minson AC, Efstathiou S, Alami A: A broad spectrum secreted chemokine binding protein encoded by a herpesvirus. *J Exp Med.* 2000 Feb 7; 191(3):573-578.

Pattison J, Nelson PJ, Huie P, von Leutichau I, Farshid G, Sibley RK, Krensky AM: RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet.* 1994 Jan; 343(8891):209-211.

Pawluczyk IZ, Harris KP: Macrophages promote pro-sclerotic responses in cultured rat mesangial cells: a mechanism for the initiation of glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 1997 Oct; 8(10):1525-1536,

Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlondorff D: Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Jul; 12(7):1369-1382.

Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M: A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1988 May 1; 167(5):1547-1559.

Prodjosudjadi W, Gerritsma JSJ, Klar-Mohamad N, Gerritsen AF, Bruijn JA, Daha MR, van Es LA: Production and cytokine mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 1995 Nov; 48(5):1477-1486.

Proudfoot AE, Power CA, Hoogewerf AJ, Montjovent MO, Borlat F, Offord RE, Wells TNC: Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem.* 1996 Feb 2; 271(5):2599-2603.

Proudfoot AE, Buser R, Borlat F, Alouani S, Soler D, Offord RE, Schroder JM, Power CA, Wells TN: Amino-terminally modified RANTES analogues demonstrate differential effects on RANTES receptors. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5; 274(45):32478-32485.

QuaSi Niere: Qualitätssicherung Niere. www.quasi-niere.de.

Radeke HH, Gessner JE, Uciechowski P, Magert HJ, Schmidt RE, Resch K: Intrinsic human glomerular mesangial cells can express receptors for IgG complexes (hFc gamma RIII-A) and the associated Fc epsilon RI gamma-chain. *J Immunol.* 1994 Aug 1; 153(3):1281-1292.

Randolph GJ, Furie MB: A soluble gradient of endogenous monocyte chemoattractant protein-1 promotes the transendothelial migration of monocytes in vitro. *J Immunol.* 1995 Oct 1; 155(7): 3610-3618.

Richmond A, Balentien E, Thomas HG, Flaggs G, Barton DE, Spiess J, Bordoni R, Francke U, Derynck R: Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to beta-thromboglobulin. *EMBO J.* 1988 Jul; 7(7):2025-2033.

Robertson H, Wheeler J, Morley AR, Booth TA, Talbot D, Kirby JA: Beta-chemokine expression and distribution in paraffin-embedded transplant renal biopsy sections: Analysis by scanning laser confocal microscopy. *Histochem Cell Biol.* 1998 Aug; 110(2):207-213.

Rodríguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, Martín A, Nieto M, Sánchez-Madrid F, Proudfoot AE, Wells TN, Martínez-A C, Mellado M. Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J Cell Biol.* 1999 Feb 22; 144(4):755-765.

Rot A: Neutrophil attractant/activation protein-1 (interleukin-8) induces in vitro neutrophil migration by haptotactic mechanism. *Eur J Immunol.* 1993 Jan; 23(1):303-306.

Rovin BH, Yoshimura T, Tan L: Cytokine induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J Immunol.* 1992 Apr 1; 148(7):2148-2153.

Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J: Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest.* 1994 Oct; 71(4):536-542.

Rovin BH, Doe N, Tan LC: Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *Am J Kidney Dis.* 1996 May; 27(5):640-646.

Rovin BH: Chemokine blockade as a therapy for renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2000 May, 9(3):225-232.

Rubin E & Farber JL: Pathology. Lippincott-Raven Publishers, 3rd Edition, 1999.

Ruiz-Ortega M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Lorenzo O, Plaza JJ, Egido J: Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor- κ B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis. *J Immunol.* 1998 Jul 1; 161(1):430-439.

Sandau K, Pfeilschifter J, Brüne B: The balance between nitric oxide and superoxide determines apoptotic and necrotic death of rat mesangial cells. *J Immunol.* 1997 May 15; 158(10):4938-4946.

Satriano JA, Hora K, Shan Z, Stanley ER, Mori T, Schlondorff D: Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma tumor necrosis factor- α , IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol*. 1993 Mar 1; 150(5):1971-1978.

Savill J: Phagocyte clearance of cells dying by apoptosis and the regulation of glomerular inflammation. *Adv Nephrol Necker Hosp*. 2001; 31:21-28.

Schadde E, Kretzler M, Banas B, Luckow B, Assmann K, Schlöndorff D: Expression of chemokines and their receptors in nephrotoxic serum nephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 2000 Jul; 15(7):1046-53.

Schena FP: Survey of the Italian Registry of Renal Biopsies. Frequency of the renal diseases for 7 consecutive years. The Italian Group of Renal Immunopathology. *Nephrol Dial Transplant*. 1997 Mar; 12(3):418-426.

Schmouder RL, Strieter RM, Wiggins RC, Chensue SW, Kunkel SL: In vitro and in vivo interleukin-8 production in human renal cortical epithelia. *Kidney Int*. 1992 Jan; 41(1):191-198.

Segerer S, Mack M, Regele H, Kerjaschki D, Schlondorff D: Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int*. 1999 Jul; 56(1): 52-64.

Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Jan; 11(1):152-76.

Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Eitner F, Mack M, Schlondorff D, Alpers CE: Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Dec; 11(2):2231-2242.

Shoskes DA, Jones E, Garras N, Satyanarayana K: Effect of the lazaroïd U-74389G on chemokine gene expression and apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc.* 1998 Jun; 30(4):974-975.

Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TN, Proudfoot AE: Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science.* 1997 Apr 11; 276(5310):276-279.

Song E, Zou H, Yao Y, Proudfoot A, Antus B, Liu S, Jens L, Heemann U: Early application of Met-RANTES ameliorates chronic allograft nephropathy. *Kidney Int.* 2002 Feb; 61(2):676-685.

Sozzani S, Luini W, Bianchi G, Allavena P, Wells TN, Napolitano M, Bernardini G, Vecchi A, D'Ambrosio D, Mazzeo D, Sinigaglia F, Santoni A, Maggi E, Romagnani S, Mantovani A: The viral chemokine macrophage inflammatory protein-II is a selective Th2 chemoattractant. *Blood.* 1998 Dec 1; 92(11):4036-4039

Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994 Jan 28; 76(2):301-314.

Springer TA: Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57:827-872.

Stahl RA, Thaiss F, Disser M, Helmchen U, Hora K, Schlondorff D: Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1993 Nov; 44(5):1036-1047.

Stine JT, Wood C, Hill M, Epp A, Raport CJ, Schweickart VL, Endo Y, Sasaki T, Simmons G, Boshoff C, Clapham P, Chang Y, Moore P, Gray PW, Chantry D: KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood.* 2000 Feb 15;95(4):1151-1157.

Stoy N: Macrophage biology and pathobiology in the evolution of immune responses: a functional analysis. *Pathobiology*. 2001; 69(4):179-211.

Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA, Neilson EG: Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int*. 2002 May; 61(5):1714-1728.

Szekanecz Z, Koch AE: Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol*. 2001 May; 13(3):202-208.

Takemura T, Yoshioka K, Murakami K, Akano N, Okada M, Aya N, Maki S: Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis. *Virchows Arch*. 1994; 424(5):459-464.

Tam FWK, Smith J, Cashman SJ, Wang Y, Thompso EM, Rees AJ: Glomerular expression of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 genes in antibody-mediated glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 1994 Jul; 145(1):126-136.

Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S: T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature*. 1993 Jan 7; 361(6407):79-82.

Tang WW, Qi M, Warren JS: Monocyte chemoattractant protein-1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM antibody GN. *Kidney Int*. 1996 Aug; 50(2):665-671.

Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HT, Andrews M, Carrol MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ: A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med*. 2000 Aug 7; 192(3):3359-3366.

Topham PS, Csizmadia V, Soler D, Hines D, Gerard CJ, Salant DJ, Hancock WW: Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest*. 1999 Dec; 104(11):1549-1557.

USRDS: United States Renal Data System. www.usrds.org

Vaddi K, Newton RC: Regulation of monocyte integrin expression by beta-family chemokines. *J Immunol.* 1994 Nov 15; 153(10):4721-4732.

Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Grone HJ, Schlondorff D: Obstructive nephropathy in the mouse: Progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2 and 5 positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Jun; 12(6):1173-1187.

Wada T, Furuichi K, Segawa-Takaeda C, Shimizu M, Sakai N, Takeda SI, Takasawa K, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsushima K, Yokoyama H: MIP-1 alpha and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1999 Sep; 56(3):995-1003.

Weber C, Weber KS, Klier C, Gu S, Wank R, Horuk R, Nelson PJ: Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T_H1-like/CD45RO⁺ T cells. *Blood.* 2001 Feb 15; 97(4):1144-1146.

Weber M, Marx M: Editorial: Wird die Dialyse unbezahlbar? Netzwerkstrategien zur Verbesserung der Frühdiagnostik von Nierenerkrankungen. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten.* 2002; 31(3):83-84.

Wiedermann CJ, Kowald E, Reinish N, Kaehler CM, von Luetlichau I, Pattison JM, Huie P, Sibley RK, Nelson PJ, Krensky AM: Monocyte haptotaxis induced by the RANTES chemokine. *Curr Biol.* 1993; 3:735-739.

Wolf G, Aberle S, Thaiss F, Nelson PJ, Krensky AM, Neilson EG, Stahl RAK: TNF alpha induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int.* 1993 Oct; 44(4):795-804.

Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA: Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells: Role of the angiotensin type II receptor. *J Clin Invest.* 1997 Sep 1; 100(5): 1047-1058.

Wu X, Dolecki GJ, Sherry B, Zagorski J, Lefkowitz JB: Chemokines are expressed in a myeloid cell-dependent fashion and mediate distinct functions in immune complex glomerulonephritis in rat. *J Immunol.* 1997 Apr 15; 158(8):3917-3924.

Xia M, Leppert D, Hauser SL, Sreedharan SP, Nelson PJ, Krensky AM, Goetzl EJ: Stimulus specificity of matrix metalloproteinase dependence of human T cell migration through a model basement membrane. *J Immunol.* 1996 Jan 1; 156(1):160-167.

Xue JL, Ma JZ, Louis TA, Collins AJ: Forecast of the Number of Patients with End-Stage Renal Disease in the United States to the Year 2010. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Dec; 12(12):2753-2758.

Yamauchi F, Kashem A, Endoh M, Nomoto Y, Sakai H: Detection of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and its receptors in mesangial proliferative glomerulonephritis. *Nephrology.* 1996; 2:93-99.

Yang N, Isbel NM, Nikolic-Paterson DJ, Li Y, Ye R, Atkins RC, Lan HY. Local macrophage proliferation in human glomerulonephritis. *Kidney Int.* 1998; 54:143-151.

Yang X-D, Corvalan JRF, Wang P, Roy C, Davis CG: Fully human anti-interleukin-8 monoclonal antibodies: potential therapeutics for treatment of inflammatory disease states. *J Leuko Biol.* 1999 Sep; 66(3):401-410.

Yokoyama H, Wada T, Furuichi K, Segawa C, Shimizu M, Kobayashi K, Su S, Mukaida N, Matsushima K: Urinary levels of chemokines (MCAF/MCP-1, IL-8) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy. *J Leuko Biol.* 1998 Apr; 63(4):493-499.

Zoja C, Wang JM, Bettoni S, Sironi M, Renzi D, Chiaffarino F, Abboud HE, Van Damme J, Mantovani A, Remuzzi G, Rambaldi A: Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha induce gene expression and production of leukocyte chemotactic factors, colony stimulating factors, and interleukin-6 in human mesangial cells. *Am J Pathol.* 1991 Apr; 138(4):991-1003.

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littmann DR: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 1998 Jun 11; 393(6685):595-599.

8. Anhang

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Michael Frink
Anschrift: Voßstraße 27, 30161 Hannover
Geboren: 22. März 1977 in Mainz
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983-1986 Martinusschule, Mainz
1986/87 Grundschule, Eschhofen
1987-1996 Tilemannschule, Limburg
20.06.1996 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife (Note: 1,7)

Wehrdienst:

07/1996 - 05/1997 Wehrdienst, hauptsächlich im PiBtl 320, Lahnstein

Universitäre Ausbildung:

04/1997 – 05/2003 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
23.03.1999 Ärztliche Vorprüfung (Noten: schriftl.: 2; mündl.: 4; gesamt: 2,67)
13.04.2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
10.04.2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Noten: schriftl.: 2; mündl.: 1; gesamt: 1,67)
07.05.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 3)

Promotion:

04.12.2003 Promotion zum Dr. med. mit „summa cum laude“

Beruf:

Seit Juli 2003 Arzt im Praktikum in der Klinik für Unfallchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover

Sonstige medizinische Tätigkeit:

01/2000 – 11/2002 ständige Arbeit in der Abteilung für Sitz- und Sonderwachen des Klinikums der LMU München

02-03/2001 Tropenmedizinischer Lehrgang der Universität Leipzig (Note 1,0)

Wissenschaftliche Tätigkeit:

05/1999 – 05/2003 wissenschaftliche Mitarbeit in der Arbeitsgruppe „Klinische Biochemie“ der Medizinischen Poliklinik der LMU München unter Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff

seit Juli 2003 wissenschaftliche Mitarbeit in der Arbeitsgruppe „Polytrauma“ der Klinik für Unfallchirurgie der Medizinischen Hochschule Hannover unter Prof. Dr. Christian Krettek und Prof. Dr. med. Hans-Christoph Pape

Wissenschaftliche Preise:

25.07.2000 Preis bei der „fellow´s night“ des Nephrologischen Forums München
„Der Chemokinantagonist Met-RANTES verstärkt die Apoferritin-induzierte Glomerulonephritis trotz Reduktion des Makrophageninfiltrats.“

Publikationen:

Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AE, Plachy J, Bruhl H, **Frink M**, Anders HJ, Vielhauer V, Pfirstinger J, Stangassinger M, Schlöndorff D: Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol.* 2001; 166(7):4697-704.

Anders HJ, Vielhauer V, **Frink M**, Linde Y, Cohen CD, Blattner SM, Kretzler M, Strutz F, Mack M, Grone HJ, Onuffer J, Horuk R, Nelson PJ, Schlondorff D: A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest.* 2002; 109(2):251-259.

Anders HJ & **Frink M**, Linde Y, Banas B, Wörnle M, Cohen CD, Vielhauer V, Proudfoot AE, Nelson PJ, Grone HJ, Schlondorff D: CCL5/RANTES Chemokine Antagonists aggravate Glomerulonephritis despite Reduction of Glomerular Leukocyte Infiltration. *J Immunol.* 2003 Jun 1; 170(11):5658-5666.

Abstracts:

Frink M, Anders HJ, Linde Y, Nelson PJ, Proudfoot AE, Gröne HJ, Schlöndorff D: RANTES Antagonists Induce Mesangiolytic and Massive Proteinuria in Immune Complex Glomerulonephritis. Role of Macrophage Function and TH1/TH2-Balance. *Kidney Blood Press Res.* 2001; 24(4-6):331.

Anders HJ, Vielhauer V, **Frink M**, Cohen C, Simone Blattner, Gröne HJ, Horuk R, Nelson PJ, Schlöndorff D: BX471 a Small Molecule Chemokine Receptor-1 Antagonist Reduces Leukocyte Infiltration and Renal Fibrosis after Unilateral Ureter Obstruction in Mice. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:A3265.

Frink M, Anders HJ, Linde Y, Nelson PJ, Proudfoot AE, Gröne HJ, Schlöndorff D: RANTES Antagonists Induce Mesangiolytic and Nephrotic Range Albuminuria in Murine Immune Complex Glomerulonephritis. Role of TH1/TH2-Balance and Macrophage Function. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12:A3390.

München, 04. Dezember 2003

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Zur Funktion des CC-Chemokins CCL5/RANTES bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis

in der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff selbständig durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Zitierungen anderer wissenschaftlicher Arbeiten sind unter Angabe der Quelle als solche kenntlich gemacht.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde nach Genehmigung durch den Promotionsausschuss vom 03. Juli 2001 teilweise in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Kidney Blood Press Res. 2001; 24(4-6):331.

J Am Soc Nephrol. 2001; 12:A3390.

J Immunol. 2003 Jun 1; 170(11):5658-5666.

München, 04. Dezember 2003

Danksagung

Mein Dank gilt:

Meinen Eltern, ohne deren Liebe, moralische und finanzielle Unterstützung ich zu dieser Arbeit nie in der Lage gewesen wäre.

Meinen Freunden, die stets an mich geglaubt und mir auch in schwierigen Phasen zur Seite gestanden und mir Mut gemacht haben.

Herrn Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in seinem Labor durchführen zu können. Ihm danke ich auch für die erfahrene Förderung, sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit und seine ständige Gesprächsbereitschaft.

Herrn PD Dr. med. Hans-Joachim Anders für die vielen fruchtbaren und motivierenden Diskussionen und die exzellente Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Frau Yvonne Linde für ihre fachliche Kompetenz, ihre Hilfe und ihre Freundschaft.

Frau Tamara Rupp für ihren persönlichen Einsatz und ihre Geduld, die mir beim FACS-Gerät zur Seite standen.

Herrn Dr. med. Bernhard Banas für die Hilfe bei den *Proliferations Assays*.

Herrn Prof. Dr. med. Hermann-Josef Gröne für die Paraffineinbettungen und die Elektronenmikroskopien.

Den nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie für ihre Hilfsbereitschaft.