

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der
Kreislaufkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Peter C. Weber

**Regulation von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen und deren Bedeutung für die
entzündliche Monozytenrekrutierung**

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

Vorgelegt von
Alma Zerneck
aus München
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Weber
2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Walzog

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Wank
Prof. Dr. F. Krombach

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. K.S. Weber

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

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2004

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	6
1. EINLEITUNG	7
1.1. Entzündungsmediatoren und NF-κB	7
1.2. Multistep Modell der Leukozytenrekrutierung	9
1.3. Adhäsionsmoleküle	10
1.4.1. Selektine	10
1.4.2. Integrine	10
1.4.3. Immunoglobulinsuperfamilie	11
1.4.4. Chemokine	12
1.4. Glomerulonephritis	14
1.5. Mesangial- und glomeruläre Endothelzellen	15
1.6. Fragestellungen	15
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1. Zellen und Zelllinien	17
2.1.1. Mesangiale Zellen	17
2.1.2. Humane umbilikale Venenendothelzellen	17
2.1.3. Glomeruläre Endothelzelllinie	17
2.1.4. Mono Mac 6 Zellen	18
2.1.5. Humane Monozyten	18
2.1.6. Ratten Makrophagenzelllinie	18
2.2. Reagentien	18
2.3. Transfektion mit adenoviral kodiertem IkappaB-alpha (rAd.IkappaB-α)	19

2.4. Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	19
2.5. Durchflusszytometrie	20
2.6. Western Blot	20
2.7. Immunofluoreszenz	21
2.8. Enzyme linked immunabsorbent assay	21
2.9. Calcium Mobilisierung	21
2.10. Adhäsionsversuche unter scherresistenten Flussbedingungen	22
2.11. Chemotaxisversuche	22
2.12. Nephrotoxisches Nephritis Rattenmodell	23
2.13. Pathologie	24
2.14. Statistische Auswertung	24
3. ERGEBNISSE	25
3.1. IκB-α Degradation in MC	25
3.2. mRNA Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen	26
3.2.1. Mesangialzellen	26
3.2.2. Glomeruläre Endothelzellen	29
3.3. Adhäsionsmolekül- und Chemokinproteinexpression	30
3.3.1. Mesangiale Zellen	30
3.3.2. Chemokin Expression in GEC	38
3.4. Monozytenadhäsion	39
3.4.1. Monozytenadhäsion auf Mesangialzellen	39
3.4.2. Monozytenadhäsion auf GEC und HUVEC	42

3.5. Transendotheliale Migration	43
3.5.1. Funktionelle Bedeutung der Chemokine	43
3.5.2. Inhibition durch TLCK, MG132, I κ B- α Überexpression	45
3.6. Glomeruläre Makrophagenlokalisation in vivo	45
4. DISKUSSION	48
5. ZUSAMMENFASSUNG	55
6. LITERATURVERZEICHNIS	57
7. ANHANG	64
7.1. Aktuelle weiterführende Arbeiten	64
7.2. Danksagungen	65
7.3. Lebenslauf	66
7.4. Eigene Publikationen	67

Abkürzungen

AP	Apoptosis protein
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celcius
CAM	Cellular adhesion molecules
CD	Cluster of Differentiation
CINC	Cytokin-induced-neutrophil chemoattractant
Da	Dalton
DNA	Desoxyribunecleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylen-Diaminoethylether-Tetraacetat
ERK	Extracellular signal-related kinase
ELISA	Enzyme linked immunabsorbent assay
g	Gramm
GEC	Glomeruläre Endothelzellen
FACS	Fluorescence associated Cell Sorter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanate
FKS	Fetales Kälberserum
G3PDH	Glyceraldehyd-3 Phosphatdehydrogenase
GRO	Growth-related-activity
HBSS	Hanks bufferes salt solution (Hanks gepufferter Salzlösung)
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HUVEC	Humane umbilikale Venenendothelzellen
HSA	Humanes Serumalbumin
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IF	Interferon
IgG	Immunglobulin G
I κ B- α	Inhibitor of NF- κ B
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
L	Liter
LFA	Leukocyte function associated antigen
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m	Meter
Mac	Macrophage antigen
MCP	Monozyte chemoattractant protein
MC	Mesangialzellen
MIP	Macrophage inflammatory protein
mRNA	messenger RNA
NF	Nuclear factor
NTN	Nephrotoxische Nephritis
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PG	Prostaglandine
PTX	Pertussis toxin
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SD	Standard Deviation
TLCK	Tosyl-Lys-chloromethylketone
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA	Very late antigen

1. Einleitung

Entzündliche Prozesse im Körper erfordern das koordinierte Zusammenwirken von Botenstoffen, Leukozyten und der Mikrovaskulatur. Durch einen Schaden des Gewebes werden Signalstoffe freigesetzt, die zu einer Vasodilatation und Verlangsamung des Blutstromes und Akkumulation von Neutrophilen und Monozyten im Gewebe führen. Diese Immunzellen setzen ihrerseits Signalstoffe frei und phagozytieren Zellreste und eingedrungene Mikroorganismen. Auch die Mechanismen und Prozesse des glomerulären Schadens folgen diesen Prinzipien.

1.1. Entzündungsmediatoren und NF- κ B

Die endogenen Mediatoren von Entzündungsprozessen schließen eine Reihe verschiedener Moleküle ein. Komplementfaktoren, Kinine und andere Koagulationsfaktoren, Eicosanoide und Zytokine (Koj 1996) aktivieren über verschiedene molekulare Kaskaden, zum Beispiel über Proteinkinasen (ERK, p38, JNK), die zur Familie der C/EBP, Nuclear factor (NF)- κ B und Apoptosis protein (AP)-1 gehörende Transkriptionsfaktoren. Zytokine als die größte Gruppe der endogenen Entzündungsmediatoren können funktionell in proinflammatorische Zytokine (darunter Interleukine (IL), Interferone (IF) und der Tumor necrosis factor (TNF)), antiinflammatorische Zytokine und die Chemokine (s.u.) eingeteilt werden. Die meisten Zellen des Körpers sind in der Lage Zytokine zu synthetisieren, aber die Produktion durch Leukozyten, vor allem Monozyten und Lymphozyten, kommt die größte Bedeutung zu.

TNF- α hat zahlreiche biologische Wirkungen auf eine Vielzahl von Zellen. Systemisch verursacht es Fieber, die Akut-Phase-Antwort, lokal induziert es die Produktion von Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren, die Sekretion weiterer anti- und proinflammatorischen Zytokine, stimuliert die Lymphozytenproduktion, führt zur Differenzierung von Makrophagen und kann die Apoptose von Zellen auslösen.

Zytokine werden als lösliche Moleküle sezerniert, können aber auch an Proteoglykane und extrazelluläre Matrixproteine binden (Arai 1990, Beutler 1989, Nathan 1991). Über spezifische Zytokinrezeptoren werden Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt, die ihrerseits schließlich Transkriptions-Aktivatorproteine induzieren und die Genexpression kontrollieren.

Die Familie der NF- κ B/Rel Transkriptionsfaktoren spielt für die Aktivierung und Induktion von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auf der Ebene der Gentranskription

eine entscheidende Rolle (Massy 1999). In ruhenden Zellen bildet inaktives NF- κ B einen Komplex mit dem zytoplasmatischen Inhibitor of NF- κ B (I κ B)- α , der die Kernlokalisationssequenz von NF- κ B maskiert und im Zytoplasma retiniert. Nach Aktivierung mit einem entzündlichen Stimulus wie zum Beispiel TNF- α , IL-1 oder Lipopolysacchariden, wird I κ B- α phosphoryliert, ubiquitiniert und darauffolgend im Proteosom abgebaut (Abbildung 1). Der zytoplasmatische 26S Proteosomkomplex beinhaltet in der 20S Untereinheit das enzymatische Zentrum, welches verantwortlich für die Proteolyse und Degradation von Proteinen ist. Sobald NF- κ B von seinem Inhibitor befreit im Zytoplasma vorliegt, transloziert es in den Zellkern und bindet an die Promotoren NF- κ B abhängiger Gene, darunter Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, Vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, Monozyte chemoattractant protein (MCP)-1 und anderer proinflammatorische Moleküle (Henkel 1993, Mercurio 1999, Read 1995, Traenckner 1994). Als möglicher Angriffspunkt für eine Modulation der so vermittelten entzündlichen Antwort und Induktion von für die Leukozytenrekrutierung bedeutenden Adhäsionsmolekülen wurde die Inhibition der NF- κ B Aktivierung nicht nur in vitro sondern auch in verschiedenen Nierenerkrankungen im Tiermodell postuliert (Massy 1999).

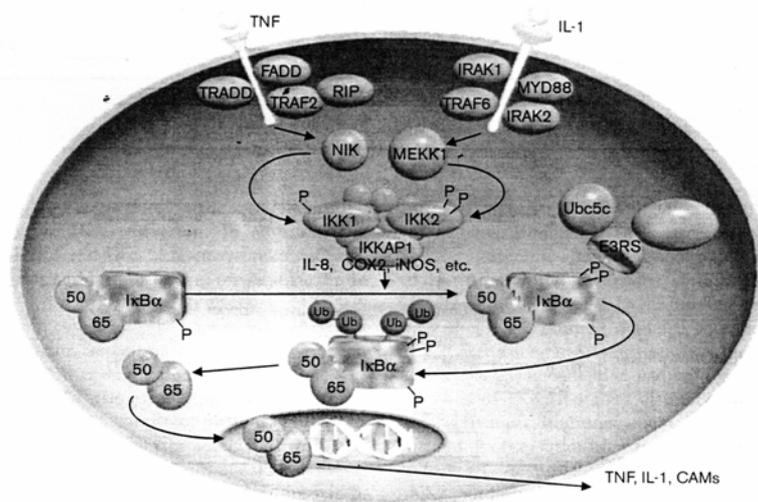


Abb. 1: Der durch TNF aktivierte NF- κ B-Signaltransduktionsweg. Durch TNF oder IL-1 in Gang gesetzte Signalwege führen zur Aktivierung von Mitgliedern der MEKK Familie (darunter NIK und MEKK1), welche wiederum IKK1 und IKK2 aktivieren. Diese Kinasen phosphorylieren (P) I κ B- α an spezifischen Serinen der Aminosäurereste, was schließlich zur Ubiquitination (Ub) und proteosomalen Degradation von I κ B- α führt. Von seinem zytoplasmatischen Inhibitor befreites NF- κ B kann dann in den Zellkern lokalisieren und an Promotoren verschiedener Zielgene binden (Mercurio 1999).

1.2. Multistep Modell der Leukozytenrekrutierung

Die Akkumulation von Leukozyten im Gewebe spielt eine zentrale Rolle bei entzündlichen Prozessen des Körpers. In der akuten Entzündungsphase tritt ein massiver Monozyteneinstrom in das Gewebe auf und die zu Makrophagen differenzierten Zellen übernehmen zahlreiche Funktionen der Phago- und Endozytose und der Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren. Auch für das Abklingen der Entzündung und die Gewebereparatur sind Makrophagen wichtig (Rutherford 1993, Gordon 1986, Leibovich 1975).

Die Monozytenadhäsion und Emigration aus dem Blutstrom ins Gewebe findet vor allem in den postkapillären Venolen statt und wird durch sequentielle und sich überlappende Interaktionen verschiedener Signalmoleküle, sogenannter Adhäsionsmoleküle (s.u.) gesteuert. Dabei wird der initiale Kontakt der Monozyten durch lektinähnliche, kohlenhydratbindende Proteine, den Selektinen und deren endotheliale Rezeptoren, vermittelt und bewirkt ein Rollen der Monozyten entlang der Gefäßwand. Durch diese flüchtigen Interaktionen werden die Leukozyten in die Nähe des Endothels gebracht und aktiviert. Dadurch adhären die Leukozyten fest am Endothel und wandern aus dem Blutstrom in das entzündete Gewebe aus. Für den festen Arrest der Zellen sind vor allem $\beta 1$ und $\beta 2$ Integrine (s.u.) und deren endotheliale Liganden VCAM-1 und ICAM-1 verantwortlich. Die transendotheliale Migration schließlich folgt einem Chemokingradienten (Abbildung 2).

Die Leukozytenrekrutierung kann auf verschiedenen Stufen von Chemokinen kontrolliert werden. Durch die Beeinflussung der Adhäsivität der Leukozyten fördern Chemokine den Übergang des Rollens in den festen Arrest von Monozyten, steuern aber auch die gerichtete Migration von Monozyten (Baggiolini 1998, Campbell 1998, Gerszten 1999, Peled 1999, Springer 1994, Weber, Alon, et al. 1996, Weber, von Hundelshausen, 1999).

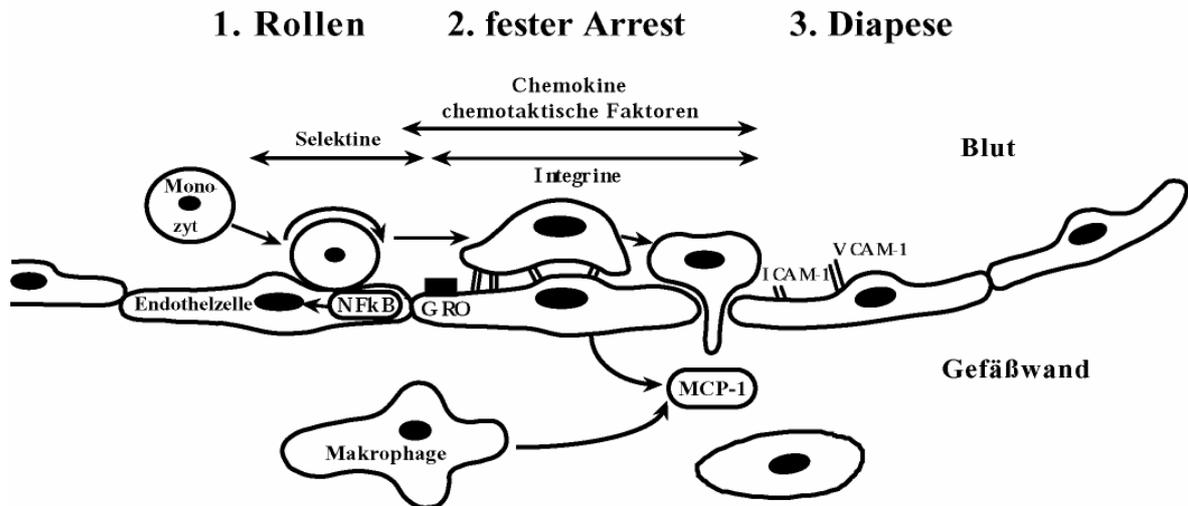


Abb. 2: Multistep-Modell der Leukozytenextravasation. Für die Extravasation von Leukozyten in Entzündungsgebiete gilt ein sequentielles Modell mit sich überlappenden Schritten: Dem initialen, durch Selektine vermittelten Rollen folgt der feste Arrest von Leukozyten durch Integrine und deren Interaktionen mit endothelialen Adhäsionsmolekülen. Chemokine kontrollieren diese Kaskade, indem sie die Integrinaffinität erhöhen und so rollende Leukozyten in eine feste Bindung überführen. Die gerichtete Migration ins Gewebe wird durch einen Chemokingradienten gesteuert.

1.3. Adhäsionsmoleküle

1.3.1. Selektine

Selektine sind eine Gruppe monomerer Proteine, die sowohl von endothelialen als auch leukozytären Zellen exprimiert werden. Benannt nach der Lektin-ähnlichen Bindungsstelle, interagieren sie mit muzinähnlichen Glykoproteinen. Selektine vermitteln den initialen Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel und bewirken ein Rollen der Leukozyten auf dem aktivierten Endothel (Lawrence 1991, McEver 1995). Dies ist eine essentielle aber auch reversible Voraussetzung für die nachfolgenden Schritte der festen Adhäsion und Diapedese von Leukozyten. Zusätzlich zu ihrer Bedeutung für die Leukozytenrekrutierung im Rahmen entzündlicher Prozesse beteiligen sich die Selektine auch bei der Steuerung der Leukozytenrezirkulation und fungieren als sogenannte homing Rezeptoren und Addressine (Dal Canton 1995, Springer 1994).

1.3.2. Integrine

Integrine werden von fast allen Zellen des Körpers exprimiert, auch von Leukozyten. Sie setzen sich nicht-kovalent aus jeweils einer α und einer etwas kleineren β Kette zusammen, welche jeweils aus großen extrazellulären Domänen und einem kurzen intrazellulären

Aminosäurerest (Humphries 2000) bestehen. Da die α Ketten nur mit bestimmten β Ketten assoziieren, werden die Subfamilien nach den β Ketten benannt. Integrine können an extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin und Laminin binden, sind vor allem aber für Zell-Zell-Interaktionen von zentraler Bedeutung. In Entzündungsreaktionen spielen vor allem vier Integrine eine entscheidende Rolle, darunter das hauptsächlich von Monozyten und Eosinophilen exprimierte $\beta 1$ Integrin Very late antigen VLA-4 ($\alpha 4/\beta 1$) und die ausschließlich von Leukozyten exprimierten $\beta 2$ Integrine Leukocyte function antigen (LFA)-1 ($\alpha L/\beta 2$), Macrophage antigen (Mac)-1 ($\alpha M/\beta 2$) sowie p150,95 ($\alpha X/\beta 2$). Das $\beta 2$ Integrin LFA-1 ($\alpha L/\beta 2$) bindet an das Immunglobulinfamilienprotein ICAM-1 (s.u.), das $\beta 1$ Integrin VLA-4 ($\alpha 4/\beta 1$) an VCAM-1 (Dal Canton 1995, Springer 1994). Die entlang der Gefäßwand über Selektine rollenden Leukozyten werden durch die Integrine und deren Interaktionen mit den Zytokin-induzierbaren Mitgliedern der Immunglobulinsuperfamilie in den stabilen endothelialen Arrest überführt und tragen anschließend zur Diapedese der Leukozyten bei. Um eine Bindung mit CAMs eingehen zu können, müssen Integrine aktiviert werden. Diese Integrinaktivierung erfolgt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren durch chemotaktische Faktoren und Chemokine und ist jeweils spezifisch für die unterschiedlichen leukozytären Zellen, den einzelnen Integrinen und den stimulierenden Agentien. Die Integrinfunktion wird dabei über verschiedene Mechanismen sehr fein reguliert. So kann die chemotaktische Aktivierung eine Änderung der Integrinkonformation und des Aktin-Zytoskeletts und dadurch eine Affinitätssteigerung für bestimmte Liganden bewirken. Des Weiteren können Integrine aus Speichergranula auf die Leukozytenoberfläche lokalisieren, hier in Clustern auftreten oder multimerisieren und so über lokale Konzentrationsänderungen die Adhäsivität der Integrine modulieren. Schließlich spielt auch das zeitliche Expressionsmuster (transient oder persistent) für die Integrinfunktion eine Rolle (Diamond 1994, Springer 1994, Weber, Alon, et al. 1996, Springer 1990, Hynes 1992).

1.3.3. Immunglobulinsuperfamilie

Die Moleküle dieser Familie sind Liganden der Integrine und zählen, aufgrund ihrer den Antikörpern ähnlichen Struktur von variablen und konstanten Domänen, zur Gruppe der Immunglobulinsuperfamilie (Williams 1988, Bork 1994, Holness 1994).

Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 und ICAM-2, Gegenrezeptoren der $\beta 2$ Integrine, besitzen 5 und respektive 2 Immunglobulindomänen. ICAM-1 wurde auf

epithelialen, dendritischen Zellen und Fibroblasten detektiert und wird durch entzündliche Stimuli wie IL-1, TNF- α , Lipopolysaccharide und Interferone in seiner Expression induziert, während ICAM-2 konstitutiv auf endothelialen Zellen exprimiert und kaum von entzündlichen Stimuli modifiziert wird (Springer 1990, Pober 1986). Vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 besteht aus 7 Immunglobulin-domänen und wird nicht von unstimulierten endothelialen Zellen exprimiert, durch entzündliche Stimuli jedoch in seiner Expression deutlich hochreguliert. VCAM-1 ist ebenfalls auf einer Reihe nicht vaskulärer Zellen nachweisbar, darunter dendritischen Zellen, Knochenmarkszellen und Synoviozyten (Bevilacqua 1993).

1.3.4. Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe kleiner, 8 bis 14 kDa großer und strukturell verwandter Moleküle. Ungefähr 40 Chemokine konnten bis jetzt identifiziert werden, die über mehr als 17 beschriebene Rezeptoren spezifische Leukozytengruppen wie Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten und Eosinophile aktivieren und an der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse teilnehmen (Baggiolini, Dewald 1997). Sie spielen eine Rolle bei der Regulation der embryonalen Entwicklung und Angiogenese, Homöostase, Hematopoese und Immunabwehr. Zusammen mit Selektinen und Integrinen beteiligen sie sich an der Steuerung der Leukozytenmigration, indem sie zum Beispiel Integrine aktivieren und die Haptotaxis vermitteln (Weber, Alon 1996, Butcher 1996, Baggiolini 1997, Horuk 1996 und 1994, Weber, von Hundelshausen 1999, Baggiolini 1998, Tanabe 1997, Moore 1998). Chemokine werden eingeteilt nach der Lage ihre N-terminalen Zystinreste. Liegen sie benachbart, spricht man von CC Chemokinen, sind diese durch eine weitere Aminosäure von einander getrennt, von CXC Chemokinen (X steht für die intervenierende Aminosäure) (Mackay 1997, Zlotnik 2000, Baggiolini, Dewald 1997, Luster 1998). Diese zwei Chemokin-Hauptgruppen wurden ergänzt durch zwei weitere Klassen: Dem Chemokin Lymphotaktin (C Chemokin) fehlen zwei der vier charakteristischen Zystinreste, in seinem Carboxylende zeigt es aber Homologie mit den CC Chemokinen (Kelner 1994). Bei dem Chemokin Fractalkine (CX₃C) liegen drei Aminosäuren zwischen den Zystinresten. Bis jetzt ist es das einzige Chemokin, welches über eine Muzinkette in der Zellmembran verankert ist und so Eigenschaften eines Chemokines als auch eines Adhäsionsmoleküls übernehmen kann (Bazan 1997).

Eine kürzlich vorgestellte neue Chemokinklassifizierung (Zlotnik 2000) basiert auf der momentan verwendeten Klassifikation der Chemokinrezeptoren CCR, CXCR, CX₃CR (R für Rezeptor), gefolgt von der Nummer des Rezeptors und verwendet den Buchstaben L (für Ligand) mit der bereits gebräuchlichen Unterscheidung nach CC und CXC Chemokinen und Numerierung.

Die zellspezifische Chemokinexpression wird auf verschiedenen Ebenen der Transkription und Translation reguliert (Rovin 1998). Viele der Chemokine, so zum Beispiel MCP-1, IL-8 und RANTES, werden durch entzündliche Zytokine wie Interferon- γ , Interleukin-1 β und TNF- α transkriptionell über eine NF- κ B Aktivierung, CAAT Enhancer binding Proteine, und Aktivator Protein-1 induziert (s.o.) (Sallusto 1997, Yasumoto 1992, Nelson 1996 und 1998).

Chemokine können als lösliche Moleküle sezerniert, aber auch über Proteoglykane auf der Zelloberfläche immobilisiert werden oder an extrazelluläre Matrix binden (Segeer 2000, Weber, von Hundelshausen 1999).

Die biologische Wirkung der Chemokine wird über Rezeptoren vermittelt, die über sieben Transmembrandomänen verfügen und intrazellulär an G-Proteine gekoppelt sind. Die Rezeptorbindung durch ein Chemokin löst Signaltransduktionskaskaden aus, die zur Aktivierung von Phospholipase C, Phosphokinase C und verschiedenen anderen Serin- und Tyrosinproteinkinasen, zur Bildung von Inositoltriphosphat und Diacylglycerol und einem schnellen, transienten Calciumeinstrom in die Zelle führen (Baggiolini 1998, Schlondorff 1997, Bacon 1995, Neote 1993, Cai 1996).

Chemokine kontrollieren die Leukozytenrekrutierung auf verschiedenen Stufen. So können sie die Adhäsivität der Leukozyten erhöhen und damit den Übergang der rollenden Monozyten in den festen Arrest fördern, aber auch die gerichtete Migration von Monozyten induzieren. Diese funktionelle Spezialisierung der Chemokine könnte mit Unterschieden in ihrer Präsentation zusammenhängen; zum Beispiel ob diese als lösliche Moleküle sezerniert oder auf der Zelloberfläche über Heparanproteoglykane immobilisiert werden aber sind auch von den lokal erreichten Konzentrationen abhängig (Campbell 1998, Weber, Alon 1996, Gerszten 1999, Peled 1999, Weber, von Hundelshausen 1999, Rot 1992, Witt 1994).

1.4. Glomerulonephritis

Als pathogenetisches Modell der entzündlichen Leukozytenrekrutierung dienen Erkrankungen des Glomerulums der Nieren. Glomeruläre Hyperzellularität, häufig eine Kombination aus Mesangialzellproliferation und Infiltration inflammatorischer Zellen, ist ein Zeichen verschiedener Nierenerkrankungen (Veis 1993). Die Infiltration mit Makrophagen tritt schon früh in der Pathogenese glomerulärer Erkrankungen auf und ist häufig assoziiert mit Proteinurie und eingeschränkter Nierenfunktion und es wurde postuliert, dass mononukleäre Immunzellen den Nierenschaden durch Sekretion inflammatorischer Zytokine, reaktiver Sauerstoffradikale und proteolytischer Enzyme initiieren und weiter unterhalten (Hooke 1984, Nolasco 1987, Schreiner 1991, Kashgarian 1992). Im in vivo Nephritis Modell konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von TNF- α unmittelbar nach der Induktion einer Nephritis ansteigt und eine erhöhte glomeruläre und systemische TNF- α Konzentration mit der Perpetuierung des glomerulären Schadens in Verbindung steht. Darüber hinaus zeigte die Verabreichung von Anti-TNF Antikörpern und TNF-Rezeptorblockern protektive Effekte auf die Proteinurie, glomeruläre Zellnekrose und eine reduzierte Expression glomerulärer Adhäsionsmoleküle und Chemokine (Onbe 1994, Tomosugi 1989, Hruby 1991, Mulligan 1993). In zahlreichen Formen von Glomerulonephritiden konnte eine Expression solcher Signalmoleküle gezeigt werden (Segerer 2000, Dal Canton 1995, Lefkowitz 1997). Die Integrinliganden ICAM-1 und VCAM-1 sind im Tiermodell an der Pathogenese der nephrotoxischen Nephritis (NTN), der Immunkomplex- oder Lupusnephritis involviert (Lefkowitz 1997, Janssen 1998). Die CC Chemokine Monozyte chemoattractant protein (MCP)-1 (CCL2), RANTES (CCL5) und das CX₃C Chemokine Fractalkine (CX₃CL1) sind von Bedeutung für die mononukleäre Zellrekrutierung bei der NTN, der Halbmondglomerulonephritis oder der Anti-Thy-1 Nephritis. Während der MCP-1 Rezeptor CCR2 in der frühen Phase der NTN hauptsächlich proinflammatorisch wirkt, scheint ein Fehlen von CCR2 aber auch des RANTES Rezeptors CCR1 in späteren Stadien die Schwere der Erkrankung zu erhöhen und damit potentiell anti-inflammatorisch zu wirken (Mulligan 1993, Feng 1995 und 1999, Cockwell 1999, Topham 1999, Bird 2000, Wu 1997).

Die Expression des CXC Chemokine Growth-related-activity (GRO) konnte während der Immunkomplexglomerulonephritis nachgewiesen werden. Hier verminderte die Blockade von Macrophage inflammatory protein (MIP)-2 oder des GRO Homologes Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) die initiale Neutrophilen Einwanderung der

NTN (Wu 1995 und 1997); Effekte auf die monozytäre Zellinfiltration allerdings bleiben weitgehend unbekannt.

Das CX₃C Chemokin Fractalkine wird während der nephrotoxischen Nephritis und der Halbmondglomerulonephritis exprimiert. Die Neutralisation dieses Chemokines reduzierte die Anzahl der akkumulierten Leukozyten in den entzündlichen Glomeruli und verbesserte die Nierenfunktion (Chen 1998, Furuichi 2001, Feng 1999).

1.5. Mesangial- und glomeruläre Endothelzellen

Sowohl Mesangialzellen (MC) als auch glomeruläre endotheliale Zellen (GEC) scheinen über die Expression solcher Signalmoleküle eine wichtige Rolle bei der Leukozytenrekrutierung zu spielen (Segeer) (Abbildung 3).

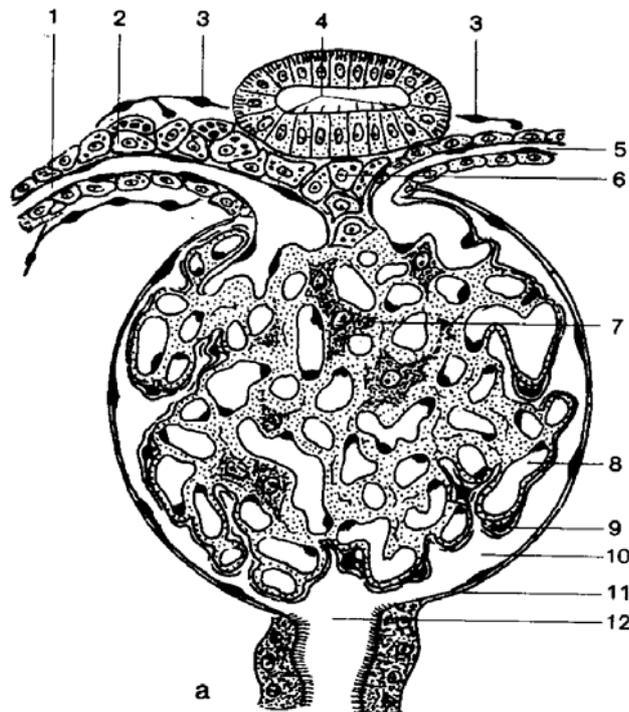


Abb. 3: Glomerulus (Nierenkörperchen). GEC kleiden die glomerulären Kapillarschlingen (Ziffer 8) aus. MC (Ziffer 7) bilden zusammen mit der extrazellulären Matrix das spezialisierte perikapilläre Gewebe im Glomerulus (1 Vas afferens, 2 epitheloide Zellen, 3 adrenerge Nervenfasern, 4 Macula densa, 5 Vas efferens, 6 extraglomeruläres Mesangium, 9 Podozyt, 10 Raum der Bownmanschen Kapsel, 11 Bownmansche Kapsel, 12 Harnpol (Leonhardt 1990)).

MC sind fibroblastenähnliche Zellen, die zusammen mit der extrazellulären Matrix das spezialisierte perikapilläre Gewebe im Glomerulus bilden und hier an der Regulation der Ultrafiltration und Microzirkulation beteiligt sind (Dal Canton 1995, Inkyo-Hayasaka 1996,

Schlondorff 1996, Segerer 2000). Für unterschiedliche entzündliche Stimuli konnte gezeigt werden, dass sie die mesangiale Expression der zur Familie der Immunglobuline gehörenden Gene von ICAM-1 und VCAM-1 (Dal Canton 1995, Khachigian 1995, Pai 1996), die Expression der CC-Chemokine MCP-1 und RANTES (Zoja 1991, Wolf 1993), der CXC-Chemokine Interleukin (IL)-8 (CXCL8) und GRO- α (CXCL1) induzieren (Segerer 2000, Brown 1991, Kusner 1991, Wu 1995).

GEC kleiden die glomerulären Kapillarschlingen aus und zeigen induzierbare Expression von MCP-1 und RANTES (Wolf 1997, Kakizaki 1995). Darüberhinaus konnte mittels Immunfluoreszenz die Expression von Fractalkine in nephritischen aber nicht gesunden Nieren in einem für glomeruläre Endothelzellen typischen nichtlinearen Muster detektiert werden (Feng 1999).

1.6. Fragestellungen

Auch wenn die Leukozytenadhäsion und Rekrutierung im vaskulären System eingehend untersucht wurde, bleiben die spezifischen molekularen Mechanismen der glomerulären Leukozytenrekrutierung weitgehend unbekannt. Wir untersuchten die entzündliche Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen durch MC und GEC in vitro, sowie die mögliche Inhibition dieser Expression auf transkriptioneller Ebene. Des Weiteren wurde die Beteiligung dieser Moleküle bei der Vermittlung einzelner Schritte der Leukozytenrekrutierung dargestellt, und schließlich die funktionelle Bedeutung bestimmter Chemokine in vivo eruiert.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen behandelt:

1.7.1.: ist die entzündliche Aktivierung von MC NF- κ B abhängig und durch Modulation von I κ B- α beeinflussbar?

1.7.2.: erfolgt eine entzündliche, NF- κ B abhängige, transkriptionellen Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in MC und GEC?

1.7.3.: spiegelt sich die transkriptionelle Aktivierung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen auch auf Proteinebene wieder und gibt es Unterschiede in der Präsentation dieser Signalmoleküle?

1.7.4.: wie sind die untersuchten Adhäsionsmoleküle und Chemokine an der Monozytenadhäsion beteiligt?

1.7.5.: wie beeinflussen die Chemokine MCP-1 und GRO- α die monozytäre transendotheliale Monozytenadhäsion?

1.7.6.: sind Chemokinrezeptoren CCR2 und CXCR1 an der glomerulären Monozytenrekrutierung in vivo beteiligt?

2. Material und Methoden

2.1. Zellen und Zelllinien

Für die Zellkultur wurde als Brutschrank ein Sterikult-Inkubator verwendet, der Raumluft bei 37°C auf 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit anreicherte. Um konfluente Zellen zu passagieren, wurden sie nach Waschung mit Phosphat gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Dieses wurde nach 5 Minuten durch Zugabe von fötalem Kälberserum (FKS) neutralisiert und die so abgelösten Zellen nach Zentrifugation und erneutem Waschen mit PBS in Falcon Flaschen ausgesät

2.1.1. Mesangiale Zellen

Primäre humane mesangiale Zellen (MC) (Clonetics) wurden in basalem Mesangialzellmedium (Clonetics) kultiviert, supplementiert mit 5% FKS und 50 mg/ml Gentamicin (Gibco, BRL) und aus den Passagen 3 bis 9 verwendet.

2.1.2. Humane umbilikale Venenendothelzellen

HUVEC wurden wie beschrieben aus Nabelschnüren isoliert. Dazu wurde die Nabelschnurvene nach Reinigung mit PBS mit einer Kanüle sondiert und mit PBS durchspült. Die Vene wurde von intravasal mit α -Chymotrypsin (100mG/100mL) bei 37°C für 20 Minuten inkubiert und der Veneninhalt mit den darin gewonnen HUVEC gesammelt, zentrifugiert und in eine kollagenisierte Falcon Flasche mit PromoCell Medium zur Kultivierung gegeben. Die Kollagenisierung der Falcon Flaschen erfolgte durch Inkubation mit Kollagenlösung bei 37°C für mindestens 20 Minuten. Nach 2 Stunden wurden die adhärennten HUVEC von Erythrozyten und anderen nichtadhärennten Zellbestandteilen durch PBS Spülung gesäubert. Von verschiedenen humanen Spendern gepoolte HUVEC wurden aus den Passagen 2 bis 4 verwendet (Weber 1994).

2.1.3. Glomeruläre Endothelzelllinie

Glomeruläre Endothelzellen von Ratten (GEC) (freundlicherweise von Dr. H. Holthöfer zur Verfügung gestellt) wurden in mit 10% FKS und Penicillin/Steptomycin angereichertem RPMI/1640 Medium kultiviert. Die wie

beschrieben durch einen onkogenen Adenovirus transformierte GEC Zelllinie exprimiert typische endotheliale Zellmarker und zeigt einen sehr proliferativen Phenotyp. Die Zellen wurden aus den Passagen 7 bis 9 verwendet (Laulajainen 1993).

2.1.4. Mono Mac 6 Zellen

Mono Mac 6 Zellen (freundlicherweise von Dr H.W.L. Ziegler-Heitbrock zur Verfügung gestellt) wurden wie beschrieben kultiviert (Weber 1994, Ziegler-Heitbrock 1988). Die Zellen wurden in Falcon Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen (wells) in RPMI-1640 Medium (Sigma, München), angereichert mit 10% FKS (Serva, Heidelberg), 1 mM Oxalacetat, 1mM Pyruvat (Fluka), 1 x nichtessentieller Aminosäurelösung, 2 x Penicillin/Streptomycin-Lösung und 2 mM L-Glutamin (Gibco) kultiviert. Vor Zugabe von FKS wurde das Medium über eine Gambro 2000 Säule (Gambro, Hechingen) ultrafiltriert, um bakterielle Endotoxine zu eliminieren.

2.1.5. Humane Monozyten

Humane Monozyten wurden aus dem Plasma gesunder Spender wie beschrieben isoliert (Weber, von Hundelshausen 1999). Dabei wurde das Serum in hyperosmolarem NycoPrep 1,068 (Nycomed, Norwegen) einer Dichtegradientenzentrifugation unterworfen und von Thrombozyten in mehreren 300 x g Waschungen gereinigt. Durch die Durchführung der Isolation nach diesem Protokoll lagen die Monozyten in einer Reinheit von mehr als 85% vor, mit nur minimaler Kontamination durch Thrombozyten (unter 5%), wie durch die flusszytometrische Expression von CD14 und P-Selektin untersucht wurde.

2.1.6. Ratten Makrophagenzelllinie

Die Rattenmakrophagenzelllinie NR8383 wurde in komplettem Hams F-12 Medium kultiviert, supplementiert mit 10% FCS und Penicillin/ Streptomycin (Kluth 2000).

2.2. Reagentien

Der β 2 monoklonale Antikörper TS1/18 war von Dr. L. Klickstein (Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA), der α 4 monoklonale Antikörper HP1/2

von Dr. R. Lobb (Biogen, Cambridge, MA, USA). Die Peptidanaloga der Chemokine wurden freundlicherweise von Dr. I. Clark-Lewis (University of British Columbia, Vancouver, Canada) zur Verfügung gestellt, Met-RANTES von Dr. A. Proudfoot (Sereno Pharmaceutical Research, Randolph, MA, USA). Die monoklonalen Antikörper gegen humanes MCP-1, GRO- α , IL-8, Fractalkine und die Isotypenkontrollen waren von Serotec (Oxford, U.K.), BioSource (Camarillo, CA, USA) oder R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Die Chemokine wurden von Pepro Tech (Rocky Hill, NJ, USA) erworben.

Alle weiteren Reagentien waren von Sigma Chemical Company (Deisenhofen), wenn nicht weiter spezifiziert.

2.3. Transfektion mit adenoviral kodiertem I κ B- α (rAd.I κ B- α)

Die Konstruktion des I κ B- α kodierenden Adenovirus (rAd.I κ B- α , freundlicherweise von Dr. R. deMartin zur Verfügung gestellt (Internationales Forschungszentrum Wien) und die Zelltransfektionen wurden wie beschrieben durchgeführt (Wrighton 1996). Für die Transfektion wurden subkonfluente MC mit PBS gewaschen und mit dem Adenovirus für 30 Minuten bei 37°C in PBS inkubiert, erneut gewaschen und für 48 Stunden vor den Versuchen in Zellkulturmedium gehalten. Äquivalente Infektionen wurden mit einem für grün fluoreszierendes Protein kodierenden Kontrollvektor (rAd.GFP) bei verschiedenen Multiplizitäten der Infektion (moi) durchgeführt und die GFP Expression wie beschrieben flusszytometrisch analysiert (de Martin 1997). Die effizientesten Transfektionsraten wurden mit einem moi von 300 erreicht, der folglich für alle weiteren Transfektionen verwendet wurde. Da die Überexpression von I κ B- α über die Suppressin des Inhibitor of apoptosis proteins (IAP)-1 zur Apoptose von TNF- α -aktivierten MC führen könnte (Stehlik 1998), wurden Trypanblauzählungen durchgeführt, die Zellviabilität war aber größer als 95% unter allen Bedingungen.

2.4. Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die gesamte RNA wurde mittels der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion isoliert und ausgehend von einer Menge 2 μ g RNA reverse transkribiert. Die PCR wurde in 32 Zyklen bei 95° C (30S), 58°C Abkühlungstemperatur und 72°C Extensionstemperatur (60S) durchgeführt. Für die PCR wurden spezifische Primer mit den folgenden publizierten Sequenzen verwendet: für humanes β -Aktin, ICAM-1 und VCAM-1 (Weber 1995), GRO- α , MCP-1 (Weber, Draude 1999), Fractalkine (Bazan 1997), IL-8 (Zernecke, Weber, Erwig

2001); für Ratten G3PDH, MCP-1 (Ruiz-Ortega, Bustos, et al. 1998 #660}, GRO- α (McTigue 1998) und Fractalkine (Zernecke, Weber, Erwig 2001). Die PCR Produkte wurden anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert und wie beschrieben mittels HPLC Analyse quantifiziert (Weber, Alon 1996, Weber 1995, Weber, Draude 1999, Draude 1999).

2.5. Durchflusszytometrie

Konfluente Zellen wurden trypsiniert, gewaschen und mit sättigenden Mengen an monoklonalen Antikörpern für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit Fluoreszeinisothiocyanate (FITC)-konjugiertem IgG (Boehringer Mannheim, Mannheim) für 30 Minuten auf Eis inkubiert, erneut gewaschen und mittels eines FACScan analysiert (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) (Weber 1995, Weber, Draude 1999). Dabei wurde die Isotypenkontrolle (unspezifisches IgG) als Korrekturkoeffizient von der Fluoreszenzintensität der Proben subtrahiert und so die spezifische mittlere Fluoreszenzintensität ermittelt.

2.6. Western Blot

Für die Durchführung des Western blot wurden die Zellen nach Waschung in PBS in Proteaseninhibitoren enthaltendem Puffer lysiert oder der Zellüberstand steril filtriert und mit Puffer vermischt (Whole Cell Extraction Buffer mit 0,5% Triton X-100, 10% Glycerol, 0,2 $\mu\text{mol/L}$ EDTA, 10 $\mu\text{mol/L}$ *p*-Nitrophenyl-phosphat, 0,3 $\mu\text{mol/L}$ Natriumorthovanadate, 10 $\mu\text{mol/L}$ Benzamidine, 2 $\mu\text{mol/L}$ DTT, 20 mg/mL Aprotinin, 2,3 mg/mL Leupeptin, 1,7 mg/mL Pepstatin und 1 $\mu\text{mol/L}$ PMSF). Die Proteine wurden gelelektrophoretisch in 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Elektroblootting auf Nitrozellulosemembranen (Immobilium Membranen, Millipore, Eschborn) übertragen. Die Membranen wurden über 2 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Trockenmilch und 0.05% Tween 20 (Filka, Buchs, Schweiz) in Tween gepufferter Salzlösung (TBS) blockiert und mit spezifischen monoklonalen Antikörpern jeweils über 30 Minuten inkubiert. Die Western Blotte wurden unter Verwendung eines Chemilumineszenzverfahrens entwickelt (ECL, Amersham, Chalfont, U.K.). Der Western Blot der TNF- α stimulierten HUVEC zur Detektion des Chemokines Fractalkine wurde von Schröppel et al. wie beschrieben durchgeführt (Schröppel 1998).

2.7. Immunofluoreszenz

MC wurden auf Glasdeckgläsern bis zum Erreichen eines konfluenten Wachstums kultiviert. Die Zellen wurden in 2% Formaldehyd fixiert und auf den Deckgläsern für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 10% hitzeinaktiviertem Humanserum in PBS inkubiert um unspezifische Bindungen zu blockieren. Um eine Oberflächen- und die zytoplasmatische Färbung für MCP-1 zu differenzieren, wurden manche Zellen in 0.1% Saponin für 2 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert. Einige Zellen wurden des Weiteren mit Heparitinase (0,5 U/mL) für 1 Stunde bei 37°C in Hanks gepufferter Salzlösung (HBSS) inkubiert, supplementiert mit 10 mM N-(2-hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), 0,5% humanem Serumalbumin und 2 mM Ca²⁺. Die Zellen wurden mit dem primären Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit PBS gewaschen und mit FITC-konjugiertem IgG für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser an der Luft getrocknet und mit Mowiol auf Objektträgern befestigt. Während der Inspektion und Analyse mit einem Leica DMRBE Fluoreszenzmikroskop (Deerfield, IL, USA) unter hundertfacher Vergrößerung mit einem Ölimmersionsobjektiv wurden Bilder auf Kodak 400ASA Film aufgenommen.

2.8. Enzyme linked immunoassay

Der Zellüberstand wurde gesammelt und steril filtriert. Die Konzentration von MCP-1 und GRO- α Protein im Zellüberstand wurde unter Verwendung eines Sandwich ELISA den Anleitungen des Herstellers folgend (R&D Systems) bestimmt. Lösliches IL-8 und Fractalkine aus der löslichen Phase wurden in einem Doppelbindungs-ELISA den Protokollen von R&D Systems entsprechend bestimmt.

2.9. Calciummobilisierung

Die intrazelluläre Calciummobilisierung und die Oberflächenexpression von CD11b, wie sie als Antwort auf einen Kontakt mit Chemokinen in monozytären Zellen beobachtet werden kann (Weber 1993, Weber, Kitayama 1996) wurde wie beschrieben mittels Fura-2-Spektrofluorometrie und Flusszytometrie (siehe dort) gemessen. Um die Kreuzspezies-Reaktivität von Chemokinen und deren Antagonisten zu bestimmen, wurde der Calciumeinstrom und die Mac-1 Oberflächenexpression in den Rattenmakrophagen und in isolierten humanen Blutmonozyten untersucht, die mit GRO- α und MCP-1 der jeweils

anderen Spezies aktiviert und teilweise zusätzlich mit GRO- α_{8-73} und MCP-1 $_{9-76}$ inkubiert waren. In diesen Versuchen zeigte sich eine für unsere Versuchsmodelle ausreichende Kreuzspezies-Reaktivität (Daten nicht gezeigt).

2.10. Adhäsionsversuche unter scherresistenten Flussbedingungen

Adhäsionsversuche in laminarem Fluss wurden wie beschrieben durchgeführt (Kukreti 1997, Piali 1998, Weber, Alon 1996). MC, GEC oder HUVEC wurden bis zum Erreichen eines konfluenten Wachstums in 35 mm Petrischalen kultiviert. Diese Schalen dienten als unterer Teil einer parallelen Flusskammer und wurden hierfür auf dem inversen Phasenkontrastmikroskop Olympus IMT-2 (New Hyde Park, NY, USA) befestigt. Mono Mac 6 Zellen oder isolierte Monozyten wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ /mL in HBSS suspendiert, welches zusätzlich 10 mmol/L HEPES pH 7,4, 0,5% humanes Serumalbumin und erst kurz vor dem Versuch dazugegebenes 1 mmol/L Mg^{2+} und 1 mmol/L Ca^{2+} enthielten. Die monozytären Zellen wurden während des Versuches in einem Heizblock auf einer Temperatur von 37°C gehalten, und mit einer Geschwindigkeit von $1,5 \text{ dyn/cm}^2$ für 5 Minuten in die Flusskammer perfundiert. Nach 5 Minuten wurde die Anzahl fest adhärenter Zellen in verschiedenen Feldern (mindestens 5 pro Experiment) anhand der mit einer JVC 3CCD Videokamera und JVC SR L 900 E Videorekorders aufgezeichneten Bildern analysiert und als adherenter Zellen/mm² quantifiziert. Dabei wurden nur direkte Interaktionen von Monozyten mit dem Endothelium berücksichtigt. In Versuchen mit einer ähnlichen Flusskammer führte eine sekundäre, über L-Selektine vermittelte Adhäsion von Monozyten an bereits adhärenenten Monozyten, zur Ausbildung linearer Zellketten. Diese Formationen traten spontan bei Scherkräften von 1.5 dyn/cm^2 auf, stellten insgesamt jedoch nur einen sehr kleinen Teil aller beobachteten Interaktionen dar (Alon 1996, Kukreti 1997). Für die Inhibitionsversuche wurden die Zellen mit GRO- α_{8-73} oder MCP-1 $_{9-76}$ (1 $\mu\text{g/mL}$), Fractalkine monoklonalem Antikörper oder IL-8 monoklonalem Antikörper (jeweils 10 $\mu\text{g/mL}$) für 30 Minuten auf Eis oder mit Pertussis Toxin (PTX) (250 ng/mL) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um die Fc-Rezeptoren auf Monozyten zu blockieren, wurden die Monozyten und Mono Mac 6 Zellen mit 5% humanem Serum für 30 Minuten inkubiert.

2.11. Chemotaxisversuche

Chemotaxisversuche wurden wie beschrieben durchgeführt (Weber, Alon 1996, Weber, Kitayama 1996, Carr 1994, Campbell 1996, Weber 1998). HUVEC oder GEC wurden auf

6,5 mm-Filtereinsätzen (8 μ M Porengröße; Costar, Cambridge, MA, USA) kultiviert und blieben sonst unbehandelt. MC wurden bis zur Konfluenz in 24-Zellkulturplatten kultiviert, die den Boden einer unteren Kammer bildeten, manche MC mit den Inhibitoren vorbehandelt und mit TNF- α stimuliert. Die Transwellfilter wurden in die 24-Wellplatten eingesetzt und Monozyten in Versuchsmedium (RPMI-1640 Medium, Medium 199, 0.5% HSA) in die obere Kammer gegeben. Eine Verdünnung der zugegebenen Monozyten diente als Maß des Input. Nach zweistündiger Migrationszeit bei 37°C wurde die Anzahl der in die untere Kammer transmigrierten Monozyten, sowie der Input, flusszytometrisch unter Zuhilfenahme von Light scatter gates bestimmt. In der Flusszytometrie zeigte eine Färbung des Monozytenmarkers CD14, dass es sich bei der gemessenen Zellpopulation der migrierten Zellen bei mehr als 90% um CD14 positive Monozyten handelte (Daten nicht gezeigt).

2.12. Nephrotoxisches Nephritis Rattenmodell

Das akzellerte Modell einer nephrotoxischen Nephritis in Ratten und ein in vivo Transfer von fluoreszenzmarkierten Makrophagen wurde wie beschrieben durchgeführt (Kluth 2000, Erwig 200). Männliche, 190-250 Gramm wiegende Sprague Dawley Ratten (von Harlan, Bicester, U.K. erworben) wurden durch die subkutane Injektion mit 1 mg Hasen IgG präimmunisiert. Nach einer Woche erfolgte dann die Injektion von 5 mL Hasenserum/kg Körpergewicht der Ratte, welches einen hohen Titer an Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran der Ratte enthielt. Die Zellmembranen von NR8383 Makrophagen wurden mit 2 μ M PKH-26GL fluoreszenzmarkiert. Nach Waschung in Hams F12 Medium ruhten die Makrophagen für 24 Stunden vor der Injektion in Kulturmedium. Für den Transfer der Makrophagen wurden die Ratten 24 Stunden nach der Induktion der NTN mit intramuskulär injiziertem Hypnorm (0,3 mL/kg; Janssen, High Wycombe, U.K.) und inhalativem Diazepam (2,5 mg/kg; Phoenix Pharmaceuticals, Gloucester, U.K.) anästhesiert. Die linke Nierenarterie wurde operativ von anterior exponiert und direkt mit einer 27-gauge Nadel kanuliert. Die fluoreszenzmarkierten Makrophagen (5×10^6 Zellen in einem Volumen von 0,4 mL), die ansonsten unbehandelt oder für 30 Minuten auf Eis mit dem CX₃CR monoklonalen Antikörper (20 freundlicherweise von L. Feng zur Verfügung gestellt), GRO- α_{8-73} oder MCP-1₉₋₇₆ (jeweils 3 μ g) vorbehandelt waren, wurden über 1 Minute in die linke Nierenarterie injiziert. Blutungen wurden durch Kompression der Nierenarterie gestoppt, und vor dem Verschluss der abdominalen Wand

wurde auf eine adäquate Perfusion der linken Niere geachtet. Einen Tag nach dieser Operation wurden die Ratten getötet.

2.13. Pathologie

Die Glomeruli wurden aus dem frischen Nierengewebe im Siebverfahren durch Siebe mit 250 µm und 150 µm Porendurchmesser isoliert und auf einem Sieb von 65 µm Porengröße aufgefangen (Kluth 2000) oder die Nieren wurden in OCT eingebettet und in Isopentane gefriergetrocknet. Die Basalmembran der isolierten Glomeruli wurden durch einen Anti-Hasen IgG-FITC zur Darstellung gebracht, und die Lokalisation der Makrophagen in den entzündeten Glomeruli durch Zählen der fluoreszenzmarkierten Makrophagen in 150-200 zufällig ausgewählten Glomeruli analysiert.

2.14. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden mit dem 2-seitigen nicht parametrischen Mann-Whitney-Wilcoxon Test für unverbundene Stichproben ausgewertet. Signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind in den Grafiken mit Sternen markiert.

3. Ergebnisse

3.1. $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Degradation in MC

Verschiedene entzündliche Stimuli, darunter $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und Immunglobuline, regulieren die Transkription von Genen, die für Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Zytokine kodieren. Dabei kommt es zu einer Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ und dessen nukleärer Bindung an κB -Elemente in den entsprechenden Promotoren und Enhancer Regionen verschiedener Gene. Für die Aktivierung und Translokation von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ in den Kern muss der zytoplasmatische Inhibitor $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ durch die $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase phosphoryliert, anschließend ubiquitiniert und im Proteosom degradiert werden (Henkel 1993, Mercurio 1999, Read 1995, Traenckner 1994). Um die Effekte von Proteosominhibitoren auf die $\text{TNF-}\alpha$ -induzierte $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Degradation in MC zu überprüfen, wurde die Menge an $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Protein im Western Blot untersucht. Ruhende MC zeigen eine basale Menge an $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Protein. Die Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ (100 U/mL; 20 Minuten) führte zu einer fast vollständigen Proteolyse des $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Proteins (Abbildung 4A). Wurden die MC mit TLCK (50 μM) (Henkel 1993) oder mit dem Proteosominhibitor MG132 (20 μM) (Read 1995) für zwei Stunden vorbehandelt und anschließend mit $\text{TNF-}\alpha$ (100 U/mL; 20 min) stimuliert, verhinderte dies die vollständige $\text{TNF-}\alpha$ induzierte $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Degradation, wobei TLCK etwas weniger effektiv zu wirken schien als MG132 (Abbildung 4A).

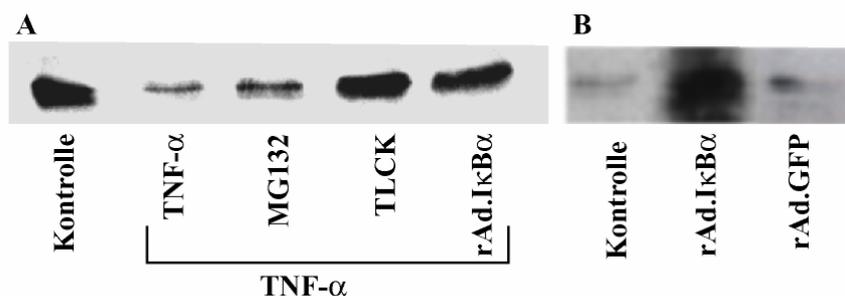


Abb. 4: $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ Expression in MC. MC blieben unbehandelt oder wurden mit TLCK (50 μM) oder MG132 (20 μM) für 2 Stunden vorbehandelt oder mit rAd.I $\kappa\text{B-}\alpha$ oder rAd.GFP (48 Stunden vor der Durchführung der Experimente) transfeziert und/ oder mit $\text{TNF-}\alpha$ (100 U/mL) für 20 Minuten stimuliert (A). MC blieben unbehandelt oder wurden 48 Stunden vor Durchführung des Experimentes mit rAd.I $\kappa\text{B-}\alpha$ oder rAd.GFP transfeziert und die Transfektionseffizienz von rAd.I $\kappa\text{B-}\alpha$ und die Expression von $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ untersucht (B). Die Zelllysate wurden im Western Blot unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ analysiert. Gezeigt sind repräsentative Blots aus einem von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

In HUVEC konnte gezeigt werden, dass die adenovirale Überexpression von I κ B- α die TNF- α vermittelte I κ B- α Degradation inhibierte (Weber, Draude 1999). Die Transfektion von MC mit einem I κ B- α kodierenden Adenovirus führte zu einer Erhöhung der basal exprimierten Menge an I κ B- α im Gegensatz zu der Transfektion mit einem für das grüne Fluoreszenzprotein kodierenden Kontrollvektor (rAd.GFP), der keinen Effekt auf die basal exprimierte Menge an I κ B- α hatte (Abbildung 4B). Die I κ B- α Überexpression verhinderte die vollständige I κ B- α Degradation nach TNF- α Stimulation im Gegensatz zu unbehandelten MC (Abbildung 4A).

3.2. mRNA Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen

3.2.1. Mesangialzellen

3.2.1.1. Adhäsionsmolekül- und Chemokin-mRNA

Um zu untersuchen, ob die TNF- α Stimulation (100 U/mL; 4 Stunden) die Transkription der mRNA von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in MC aktiviert, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die Analyse der PCR Produkte zeigte, dass die mRNA der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie der Chemokine GRO- α , IL-8, und MCP-1 deutlich durch TNF- α hochreguliert wurde, während die mRNA Menge des Chemokins Fractalkine geringfügiger durch TNF- α Stimulation induziert wurde (Abbildung 5). Die Quantifizierung der PCR Proben relativ zu β -Aktin mittels HPLC bestätigte die Hochregulation der untersuchten Adhäsionsmoleküle und Chemokine (Abbildung 6).

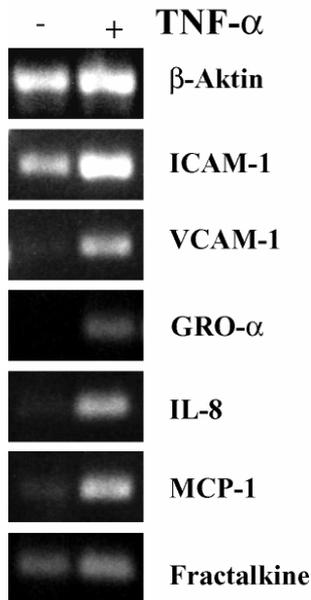


Abb. 5: *TNF- α induziert die transkriptionelle Aktivität der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, der CXC Chemokine GRO- α , IL-8, des CC Chemokines MCP-1 und weniger Fractalkine. MC blieben unbehandelt oder wurden mit TNF- α (100U/ mL) für 4 Stunden stimuliert und eine RT-PCR mit spezifischen Primern für ICAM-1, VCAM-1, GRO- α , MCP-1, IL-8, Fractalkine und β -Aktin durchgeführt. Gezeigt ist ein repräsentatives Agarosegel der PCR Produkte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.*

3.2.1.2. Inhibition durch TLCK, MG132, rAd.I κ B- α

Wie bereits gezeigt, wurde die TNF- α induzierte I κ B- α Degradation in MC durch die Vorbehandlung der MC mit TLCK, MG132 und durch die zytoplasmatische Überexpression von I κ B- α inhibiert. Sobald I κ B- α degradiert und NF- κ B frei im Zytoplasma vorliegt, transloziert dieses in den Zellkern und bindet an die Promotorregionen NF- κ B abhängiger Gene und reguliert die transkriptionelle Aktivität verschiedener Signalmoleküle (Massy 1999). Um die Effekte der inhibierten I κ B- α Degradation auf die transkriptionelle Aktivität von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen zu untersuchen, führten wir eine RT-PCR mit nachfolgender HPLC Quantifizierung durch. Wie bereits gezeigt, resultierte die TNF- α Stimulation (100 U/mL; 4 Stunden) der MC in einer deutlichen Hochregulation der Menge an mRNA der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1, und der Chemokine MCP-1, IL-8, GRO- α , während die mRNA Menge für Fractalkine durch Stimulation mit TNF- α geringfügiger erhöht wurde (Abbildung 5 und 6). Die Vorbehandlung der MC mit TLCK (50 μ M), MG132 (20 μ M) oder die rAd.I κ B- α Überexpression, aber nicht die Infektion mit dem adenoviralen Kontrollvektor rAd.GFP, inhibierte diese Hochregulation der mRNA Transkription (Abbildung 6, Daten nicht gezeigt). MG132, welches die I κ B- α Degradation stärker hemmte als TLCK oder die I κ B- α Überexpression, blockierte auch die transkriptionelle Aktivierung der Adhäsionsmoleküle und Chemokine deutlicher (Abbildung 6).

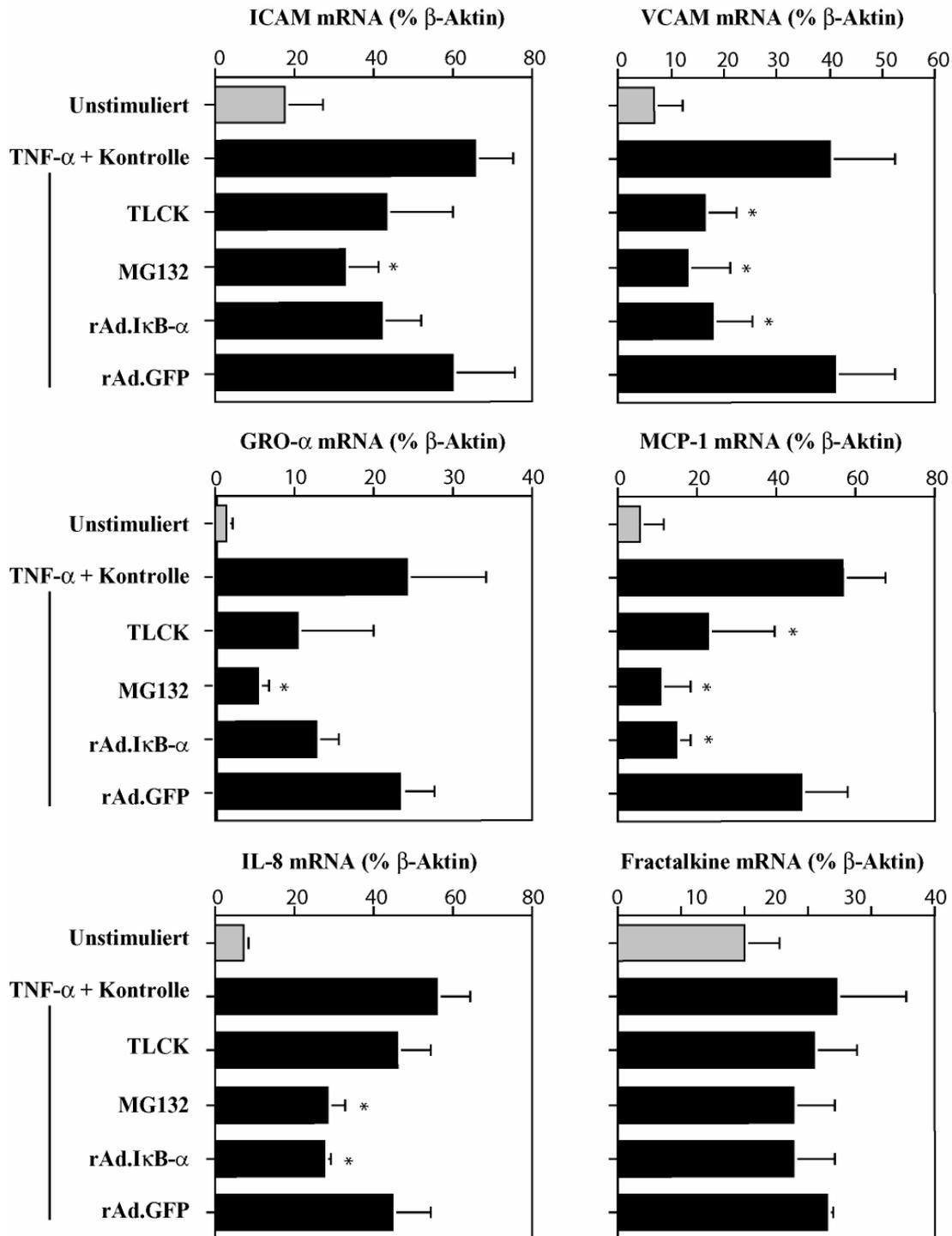


Abb. 6: Die Adhäsionsmolekül- und Chemokin-mRNA Expression wird durch TLCK, MG132 Vorbehandlung oder die Infektion mit rAd.I κ B- α aber nicht rAd.GFP vermindert. MC blieben unbehandelt oder wurden mit TLCK (50 μ M), MG132 (20 μ M) für 2 Stunden vorbehandelt oder mit rAd.I κ B- α oder rAd.GFP 48 Stunden vor Durchführung der Experimente transfiziert und/oder mit TNF- α (100 U/mL) für 4 Stunden stimuliert. Die mRNA wurde isoliert, eine RT-PCR durchgeführt und die PCR Produkte mittels HPLC Analyse quantifiziert. Die Menge der mRNA wurde relativ zu β -Aktin angegeben und die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten an, * $p < 0,05$ versus Kontrolle.

Die Inhibition der TNF- α induzierten I κ B- α Degradation ist also assoziiert mit der verminderten transkriptionellen Hochregulation der Adhäsionsmoleküle und Chemokine.

3.2.2. Glomeruläre Endothelzellen

3.2.2.1. Chemokinexpression

Bei der Halbmondglomerulonephritis scheint Fractalkine für die Leukozytenrekrutierung eine wichtige Rolle zu spielen und konnte auf GEC, welche die Kapillarschlingen in den Glomeruli auskleiden, lokalisiert werden (Feng 1999). Um die transkriptionelle Regulation der Chemokine GRO- α , MCP-1 und Fractalkine in GEC zu untersuchen, wurden die Zellen mit TNF- α (100 U/mL; 4 Stunden) stimuliert und eine RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Die Analyse der PCR Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel zeigte, dass die von unbehandelten GEC exprimierte basale mRNA Menge von GRO- α , MCP-1 und Fractalkine nach TNF- α Stimulation deutlich hochreguliert wurde (Abbildung 7A). Diese transkriptionelle Aktivierung konnte in einer nachfolgenden HPLC-Analyse der PCR Produkte quantitativ bestätigt werden (Abbildung 7B).

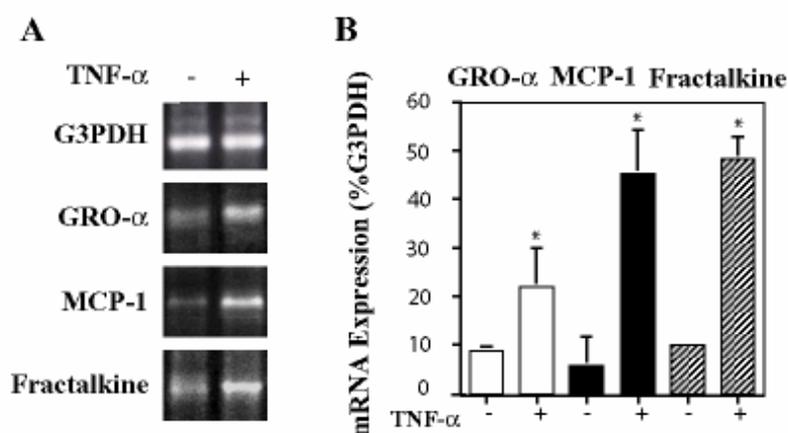


Abb. 7: Die mRNA Transkription von GRO- α , MCP-1 und Fractalkine wird in GEC durch TNF- α induziert. Mit der isolierten mRNA aus unbehandelten oder mit TNF- α (100 U/mL, 4 Stunden) stimulierten GEC wurde eine RT-PCR mit spezifischen Primern durchgeführt, die PCR Produkte im Agarosegel analysiert (A) und in der HPLC relativ zur G3PDH mRNA Expression quantifiziert (B). Gezeigt ist ein repräsentatives Agarosegel aus einem von mindestens drei unabhängigen Experimenten (A). Die HPLC Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten an * $p < 0,05$ versus Kontrolle (B).

3.3. Adhäsionsmolekül- und Chemokinproteinexpression

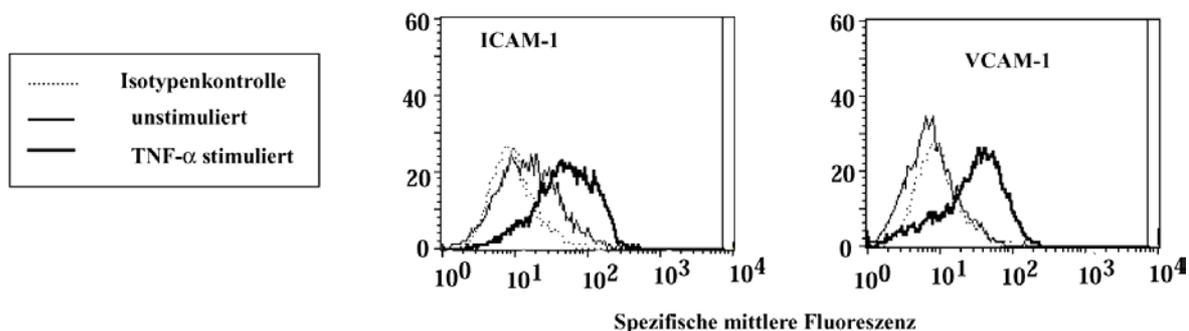
3.3.1. Mesangiale Zellen

3.3.1.1. ICAM-1 und VCAM-1

3.3.1.1.1. Oberflächenexpression

Um zu untersuchen, ob die Zytokin-induzierte Erhöhung der transkriptionellen Aktivität auch von einer vermehrten Proteinmenge für Adhäsionsmoleküle begleitet wird, wurde die Oberflächenexpression von ICAM-1 und VCAM-1 in der Flusszytometrie bestimmt. Auf unstimulierte MC konnte eine basale Oberflächenexpression von ICAM-1 Protein und nur sehr geringe Mengen von VCAM-1 detektiert werden (Abbildung 8A). Diese Expression war bereits nach 4 Stunden der TNF- α Aktivierung (100 U/mL) deutlich erhöht (Abbildung 8A) und stieg nach 12 Stunden Stimulationszeit noch weiter an (siehe auch Abbildung 9, Daten nicht gezeigt). Die Expressionszunahme war nicht nur abhängig von der Zeit der TNF- α Stimulation, sondern auch von den verwendeten Konzentrationen. Schon bei einer Aktivierung mit der Konzentration von 1 U/mL erhöhte TNF- α die Oberflächenexpression von ICAM-1 und VCAM-1, und diese stieg mit steigenden TNF- α Konzentrationen weiter an (Abbildung 8B). Dabei zeigte die Expressionszunahme von VCAM-1 einen linearen Anstieg und blieb insgesamt niedriger als die Expression von ICAM-1, während ICAM-1 bereits bei niedrigeren TNF- α Konzentrationen ein Expressionsmaximum zu erreichen schien (Abbildung 8B). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die zytokininduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen zeit- und konzentrationsabhängig ist.

A



B

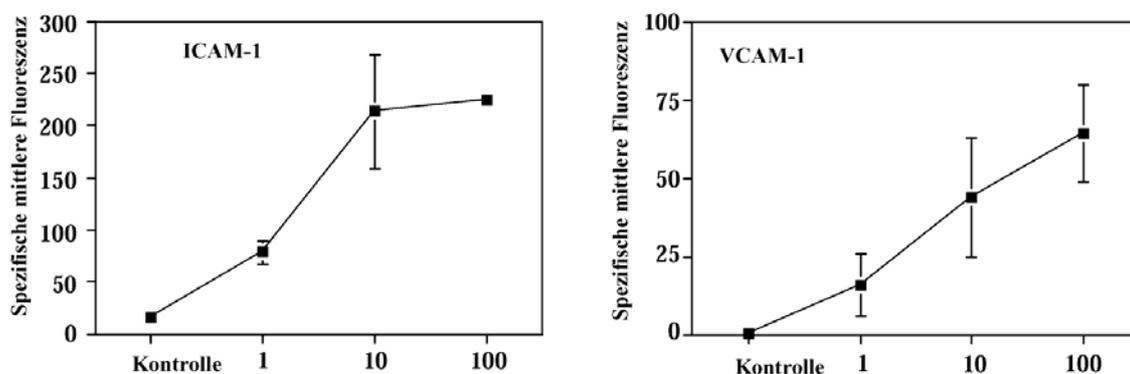


Abb. 8: Die Induktion der Adhäsionsmolekülexpression erfolgt dosisabhängig. MC blieben unbehandelt oder wurden mit TNF- α (100 U/mL) für 4 Stunden stimuliert. In der Flusszytometrie wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle in unbehandelten Zellen (durchgezogene Linie), TNF- α stimulierten MC (fette Linie) gegenüber der Isotypenkontrolle (gepunktete Linie) mit monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 oder VCAM-1 analysiert. Dargestellt sind Histogramme aus einem von mindestens drei repräsentativen Experimenten (A). MC blieben unbehandelt oder wurden mit TNF- α in verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 100 U/mL) für 4 Stunden stimuliert. In der Flusszytometrie wurde die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 analysiert und die spezifische mittlere Fluoreszenz abzüglich der Isotypenkontrolle aus mindestens drei repräsentativen Experimenten dargestellt (B).

3.3.1.1.2. Inhibition durch TLCK, MG132, rAd.I κ B- α

Um zu untersuchen, ob die Inhibition der transkriptionellen Aktivität für ICAM-1 und VCAM-1 sich auch in der verminderten Adhäsionsmolekülexpression auf der MC Zelloberfläche spiegelt, wurden die Effekte der NF- κ B Inhibitoren auf TNF stimulierte MC in der Durchflusszytometrie untersucht. Konsistent mit der Inhibition der transkriptionellen Aktivität wurde auch die TNF- α (100 U/mL; 4 Stunden) induzierte Hochregulation von ICAM-1 und VCAM-1 auf der Zelloberfläche durch die Vorbehandlung mit TLCK und MG132 fast vollständig inhibiert (Abbildung 9A-D). Auch die Transfektion mit rAd.I κ B-

α hemmte die TNF- α induzierte mesangiale Induktion von ICAM-1 und VCAM-1 (Abbildung 9E, F).

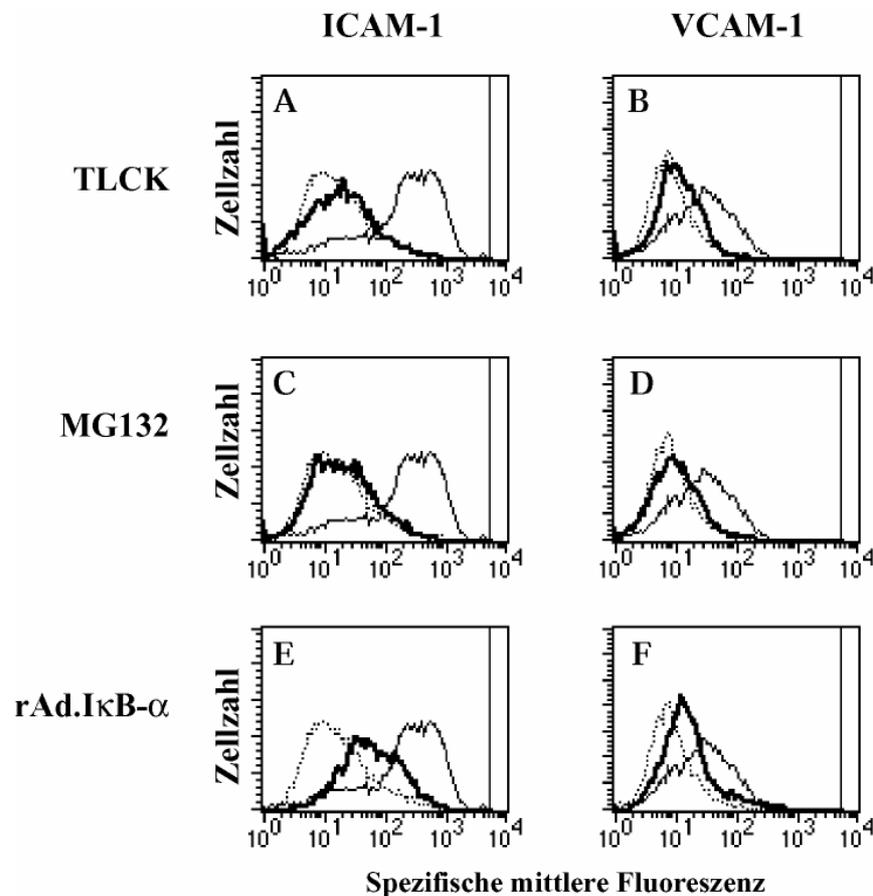


Abb. 9: Die Adhäsionsmolekülexpression wird durch die Vorbehandlung mit TLCK, MG132 oder die Infektion mit rAd.I κ B- α inhibiert. MC blieben unbehandelt oder wurden mit TLCK (50 μ M), MG132 (20 μ M) für 2 Stunden vorbehandelt oder mit rAd.I κ B- α oder rAd.GFP (48 Stunden vor Durchführung der Experimente) transfeziert und/oder mit TNF- α (100 U/ mL) für 4 Stunden stimuliert. In der Flusszytometrie wurde die Expression der Adhäsionsmoleküle in unbehandelten Zellen (gepunktete Linie), TNF- α stimulierten MC (durchgezogene Linie) und in mit TLCK oder MG132 vorbehandelten oder rAd.I κ B- α transfizierten MC (fette Linie) mit monoklonalen Antikörpern gegen ICAM-1 oder VCAM-1 analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme aus jeweils mindestens drei Experimenten.

3.3.1.2. MCP-1, GRO- α und IL-8 Chemokine

3.3.1.2.1. Oberflächenexpression, Inhibition durch TLCK, MG132, rAd.I κ B- α

Chemokine können als lösliche Proteine sezerniert oder auf der Zelloberfläche immobilisiert werden. So konnte für Endothelzellen gezeigt werden, dass die Stimulation mit TNF- α zu einer Immobilisierung von GRO- α auf der

Zelloberfläche führte, und MCP-1 als lösliches Protein sezerniert wurde. Für aktivierte MC ist eine Assoziation des Chemokines IL-8 mit der Zelloberfläche, aber auch dessen Sekretion in die flüssige Phase beschrieben worden. Die transkriptionelle Hochregulation der Chemokine, auch auf Proteinebene und eine mögliche Immobilisierung von GRO- α , IL-8 und MCP-1 auf der MC Oberfläche wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen und der Durchflusszytometrie untersucht. Unbehandelte MC zeigten nur eine marginale Oberflächenexpression für GRO- α in der Immunfluoreszenz und Flusszytometrie. Nach TNF- α Stimulation (100 U/mL; 4 Stunden) der MC war diese GRO- α Oberflächenexpression deutlich hochreguliert (Abbildung 10A und B). Bei der Immobilisierung von Chemokinen auf der Zelloberfläche spielen Heparanproteoglykane eine wichtige Rolle, zum Beispiel bei der GRO- α Bindung auf Endothelzellen. Wurden die TNF- α stimulierten MC vor der Färbung für GRO- α mit Heparitinase behandelt, einem Enzym welches Heparanproteoglykanbindungen spaltet, reduzierte dies die Menge an detektierbarem GRO- α Protein auf der Zelloberfläche (Abbildung 10A). Dies zeigt, dass auch bei der GRO- α Immobilisierung auf MC Heparanproteoglykane eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. In der Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen IL-8 stellte sich ein dem GRO- α ähnliches Expressionsmuster dar (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu konnte MCP-1 weder auf unbehandelten noch auf stimulierten MC nachgewiesen werden. Wurden die Zellen jedoch vor der Färbung mit dem Anti-MCP-1 Antikörper permeabilisiert, konnte MCP-1 im Zytoplasma TNF- α stimulierter MC detektiert werden (Abbildung 10A). Dies zeigt, dass MCP-1 nach TNF- α Stimulation produziert, aber nicht auf der Zelloberfläche immobilisiert wird. Als nächstes wurden die Effekte von TLCK, MG132 und der I κ B- α Überexpression auf die induzierte Oberflächenimmobilisierung der Chemokine untersucht. In Übereinstimmung mit der gehemmten Transkription führte die Vorbehandlung der MC mit TLCK, MG132 und die I κ B- α Überexpression zur Inhibition der TNF- α induzierten Oberflächenexpression der Chemokine GRO- α und IL-8 (Abbildung 10C, Daten nicht gezeigt).

Abb. 10

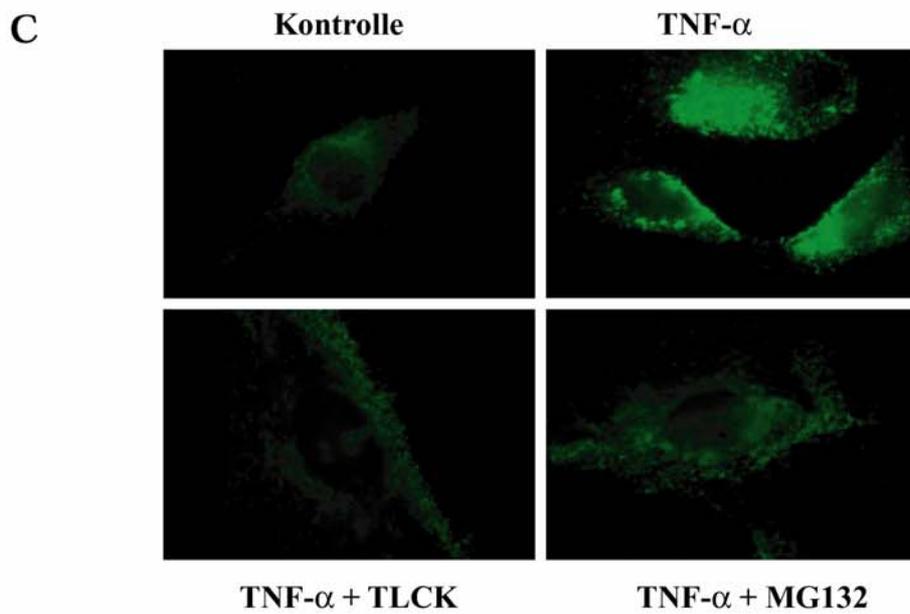
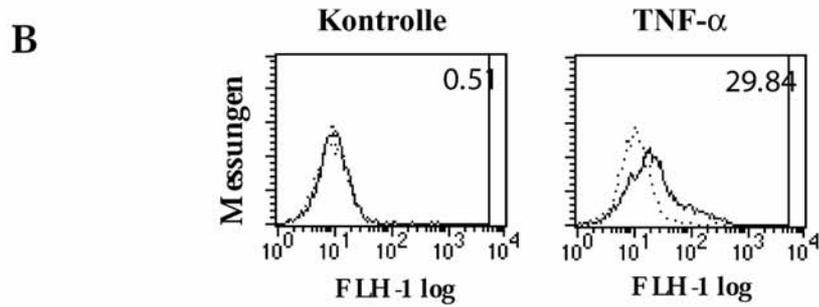
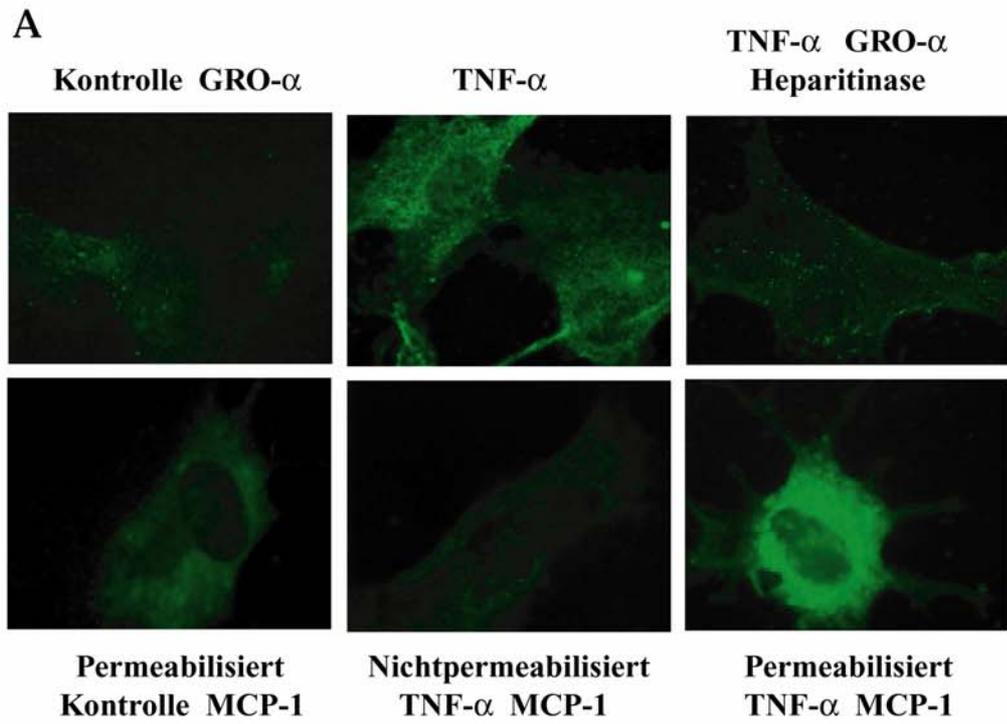


Abb. 10: *TNF- α induziert die Expression von GRO- α nicht aber MCP-1 auf der MC Oberfläche; Inhibition durch TLCK oder MG132 Vorbehandlung. MC blieben unbehandelt oder wurden mit TNF- α stimuliert (100 U/mL, 4 Stunden) und Immunfluoreszenzfärbungen mit monoklonalen Antikörpern gegen GRO- α und MCP-1 durchgeführt. Einige MC wurden mit Heparitinase (0,5 U/mL) behandelt oder einer Permeabilisierung unterworfen. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (A). MC wurden mit TNF- α (100 U/mL) für 12 Stunden behandelt und die Zelloberflächenexpression von GRO- α (durchgezogene Linie) im Vergleich zu Isotypenkontrolle (gepunktete Linie) in der Flusszytometrie analysiert. Die spezifische mittlere Fluoreszenzintensität der GRO- α gegenüber der Isotypenkontrolle ist eingefügt (B) und gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm aus einem von mindestens drei repräsentativen Experimenten. MC blieben unbehandelt oder wurden mit TLCK (50 μ M), MG132 (20 μ M) für 2 Stunden vorbehandelt oder mit rAd.I κ B- α oder rAd.GFP (48 Stunden vor Durchführung der Experimente) transfeziert und/oder mit TNF- α (100 U/mL) für 4 Stunden stimuliert. Immunfluoreszenzfärbungen der MC wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen GRO- α durchgeführt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einem von mindestens drei unabhängigen Experimenten (C).*

3.3.1.2.2. Chemokin Sekretion; Inhibition durch TLCK, MG132, rAd.I κ B- α

Um zu bestimmen, inwieweit die untersuchten Chemokine von MC auch als lösliche Moleküle sezerniert werden, wurde die Proteinmenge von GRO- α , IL-8 und MCP-1 im Überstand mittels ELISA gemessen. In der flüssigen Phase unbehandelter MC zeigte sich eine basale Menge an MCP-1, GRO- α und IL-8 Protein (Abbildung 11). Nach TNF- α Stimulation (100 U/mL; 4 Stunden) war die Proteinsekretion für MCP-1 und IL-8 deutlich erhöht, während die Menge an GRO- α geringfügiger anstieg (Abbildung 11). Wurden die MC mit TLCK und MG132 vorbehandelt oder mit adeoviralem I κ B- α transfeziert wurde diese TNF- α induzierte Sekretion der untersuchten Chemokine inhibiert (Abbildung 11). Konsistent mit der stärkeren Inhibition der transkriptionellen Aktivität war dabei auch die Vorbehandlung mit MG132 stärker wirksam als die Vorbehandlung mit TLCK.

Chemokin Konzentration im Überstand (ng/mL)

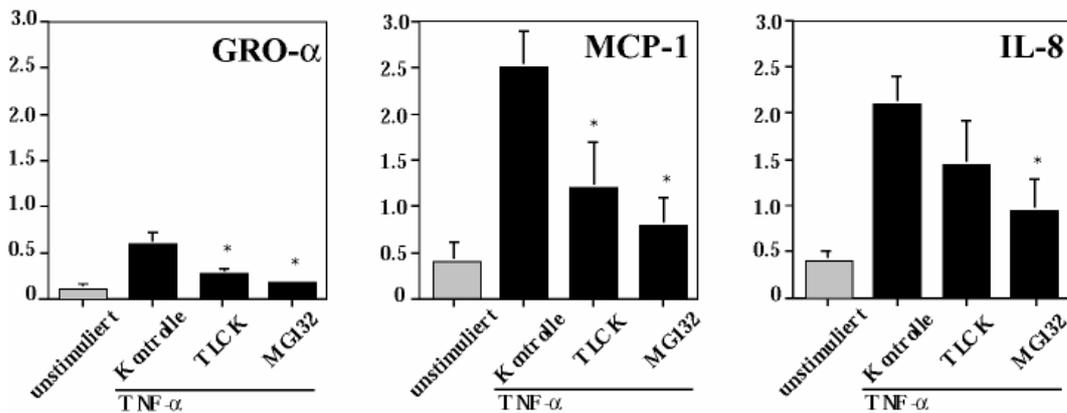


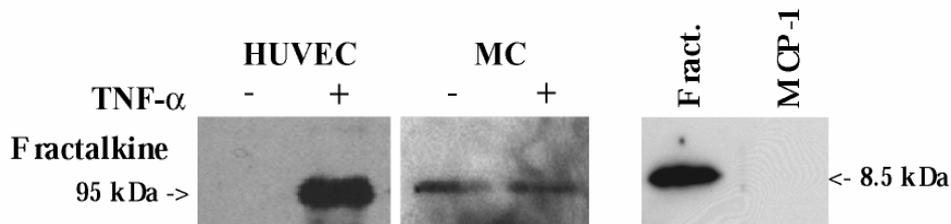
Abb. 11: Die Chemokinesekretion von GRO- α , MCP-1 und IL-8 durch MC wird durch TNF- α induziert und durch die Vorbehandlung mit TLCK oder MG132 inhibiert. MC blieben unbehandelt oder wurden mit TLCK (50 μ M), MG132 (20 μ M) für 2 Stunden vorbehandelt und/oder mit TNF- α (100 U/mL) für 4 Stunden stimuliert. Das MCP-1, IL-8 und GRO- α Protein im Überstand wurde im ELISA quantifiziert. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten an. * $p < 0,05$ versus Kontrolle.

3.3.1.3. Fractalkine Chemokinexpression

Für das Chemokin Fractalkine zeigte sich in MC auch auf Proteinebene, übereinstimmend mit der nur geringfügigen transkriptionellen Hochregulation nach Zytokinstimulation, dass sowohl die Gesamtproteinmenge im Western Blot (Abbildung 12A; TNF- α 100 U/mL; 4 Stunden) als auch die Oberflächenexpression in der Flusszytometrie (Abbildung 12B; TNF- α 100 U/mL; 4 und 12 Stunden) nicht signifikant durch die Stimulation mit TNF- α erhöht wurde. Des Weiteren war Fractalkine als lösliches Protein weder im ELISA noch im Western Blot des Überstands nach TNF- α Stimulation (100 U/mL; 4 Stunden) detektierbar. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in HUVEC, die eine starke Induktion der Gesamtproteinexpression von Fractalkine nach TNF- α Aktivierung (200 U/mL; 12 Stunden) zeigten (Abbildung 12A). Die Spezifität des verwendeten Antikörpers wurde im Western Blot bestätigt, in dem der Antikörper gegen Fractalkine nur die rekombinante Chemokindomäne von Fractalkine, nicht aber lösliches MCP-1 detektierte (Abbildung 12A). Diese Ergebnisse zusammenfassend, induzierte die TNF- α Stimulation der MC die Oberflächenexpression von ICAM-1 und VCAM-1, die Sekretion von MCP-1 und IL-8 als lösliche Proteine in den Zellüberstand, sowie die

Oberflächenimmobilisierung von GRO- α und IL-8, während das Chemokin Fractalkine konstitutiv auf der Membranoberfläche exprimiert, aber in seiner Expression durch Zytokinstimulation nur geringfügig hochreguliert wurde. TLCK, MG132 und die zytoplasmatische I κ B- α Überexpression führten über eine Hemmung der TNF- α induzierten I κ B- α Degradation und NF- κ B abhängigen Transkription zu einer Inhibition der Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, der Chemokinsekretion von GRO- α , MCP-1 und IL-8 sowie der Immobilisierung von GRO- α und IL-8 auf der MC Oberfläche.

A



B

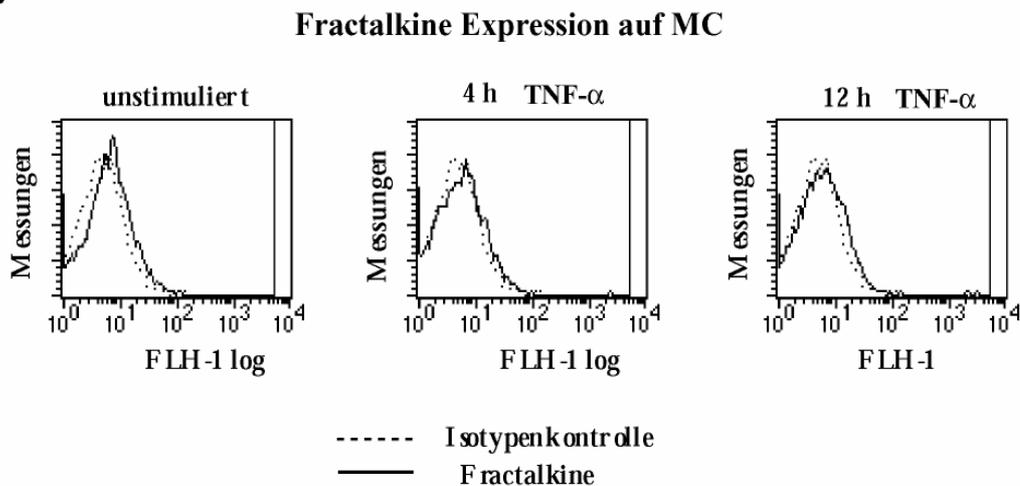


Abb. 12: Die Fractalkine Chemokin Expression in MC wird nur geringfügig durch TNF- α induziert. HUVEC wurden mit TNF- α (200 U/mL) für 12 Stunden und MC mit TNF- α (100 U/mL) für 4 Stunden stimuliert und die Zellysate im Western Blot mit einem polyklonalem Antikörper gegen Fractalkine analysiert. Die Spezifität des Antikörpers wurde im Vergleich der Detektion von löslichem Fractalkine und MCP-1 bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Blots aus einem von mindestens drei unabhängigen Experimenten (A). MC wurden mit TNF- α (100 U/ mL) für 4 und 12 Stunden behandelt und die Zelloberflächenexpression von Fractalkine (durchgezogene Linie) im Vergleich zur Isotypenkontrolle (gepunktete Linie) in der Flusszytometrie analysiert (B). Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm aus einem von mindestens drei repräsentativen Experimenten.

3.3.2. Chemokin Expression in GEC

Auf transkriptioneller Ebene wurden die Chemokine MCP-1, GRO- α und Fractalkine durch Zytokinstimulation hochreguliert. Wie für endotheliale Zellen gezeigt werden konnte, wird die Expression des CX₃C Chemokin Fractalkine durch Zytokinaktivierung deutlich erhöht (siehe auch Abbildung 13) (Bazan 1997). In der Flußzytometrie wurde untersucht, ob die mRNA Aktivierung auch zu einer Induktion der Fractalkine Expression auf Proteinebene in GEC führt. Auf der Zelloberfläche stimulierter GEC zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Fractalkine Proteinmenge gegenüber unstimulierten Zellen (Abbildung 13). Übereinstimmend mit den für HUVEC gezeigten Ergebnissen (Bazan 1997) wird die Fractalkineexpression in GEC durch Zytokine induziert. Die verschiedenen Expressionsmuster für Fractalkine in MC, GEC und HUVEC zeigen möglicherweise zellspezifische Unterschiede auf.

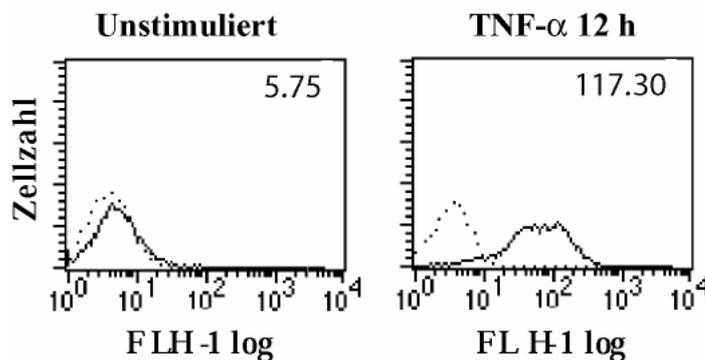


Abb. 13: Die Fractalkine Oberflächenexpression wird durch TNF- α induziert. Die GEC wurden mit TNF- α (100 U/mL; 12 Stunden) stimuliert und die Oberflächenexpression von Fractalkine (durchgezogene Linie) im Vergleich zur Isotypenkontrolle (gepunktete Linie) bestimmt. Gezeigt ist ein repräsentatives Histogramm aus einem von mindestens drei repräsentativen Experimenten. Eingefügt ist die spezifische mittlere Fluoreszenzintensität der Fractalkineexpression abzüglich der Isotypenkontrolle.

3.4. Monozytenadhäsion

3.4.1 Monozytenadhäsion auf Mesangialzellen

3.4.1.1. Funktionelle Bedeutung von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen

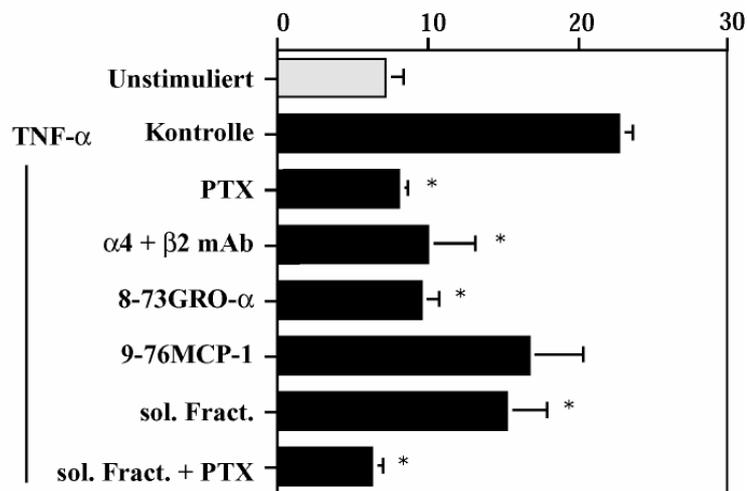
Die glomeruläre Monozyteninfiltration findet während der Pathogenese zahlreicher Nierenerkrankungen statt und die mesangiale Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Dal Canton 1995, Hooke 1984, Nolasco 1987, Pai 1996, Schlöndorff 1996, Segerer 2000). Wie einleitend diskutiert, wird die feste Monozytenadhäsion auf aktiviertem Endothel unter Flussbedingungen durch die $G\alpha_i$ -Protein-gekoppelten α_4 und β_2 Integrine vermittelt, die mit ICAM-1 und VCAM-1 aus der Immunglobulinsuperfamilie interagieren (Gerszten 1999, Kukreti 1997, Lawrence 1991). Auch Chemokine spielen eine Rolle bei der Regulation des Monozytenarrestes. So konnte gezeigt werden, dass das oberflächengebundene GRO- α über den CXCR2 Rezeptor den induzierten Monozytenarrest unterstützt (Weber, von Hundelshausen 1999) und das Chemokin Fractalkine die Leukozytenadhäsion auf aktivierten Endothelzellen integrin- und PTX-unabhängig vermittelt (Fong 1998).

Wir untersuchten die Bedeutung einzelner Integrine und Chemokine für die Adhäsion von Monozyten auf aktivierten MC. Dabei dienten die Scherkräfte unter Flussbedingungen als sensitives Maß der wirkenden Adhäsionskräfte. Im Gegensatz zu unbehandelten Zellen unterstützen MC nach TNF- α Stimulation (100 U/mL; 4 Stunden) die spontane Adhäsion von Monozyten (Abbildung 14A), wenn auch weniger effektiv und in geringerer Anzahl als stimulierte Endothelzellen (Weber, von Hundelshausen 1999).

Dieser Zytokin-induzierte Arrest wurde nach Vorbehandlung der Monozyten mit PTX, welches G-Protein gekoppelte Signalwege blockiert, oder nach Inkubation mit einem Antikörpergemisch gegen die monozytären α_4 und β_2 Integrinketten deutlich inhibiert (Abbildung 14A). Dies bestätigt, dass der induzierte Monozytenarrest auf MC integrinabhängig ist und G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden.

Um die Rolle von Chemokinen und deren Rezeptoren für die Monozytenadhäsion zu untersuchen, wurden die Monozyten mit Chemokineanaloga vorbehandelt, die selektiv an Chemokinrezeptoren binden, diese aber nicht aktivieren. So konkurriert das GRO- α_{8-73}

A Zahl adhärenter Monozyten auf MC (Zellen/mm²)



B Zahl adhärenter Mono Mac 6 Zellen auf MC (Zellen/mm²)

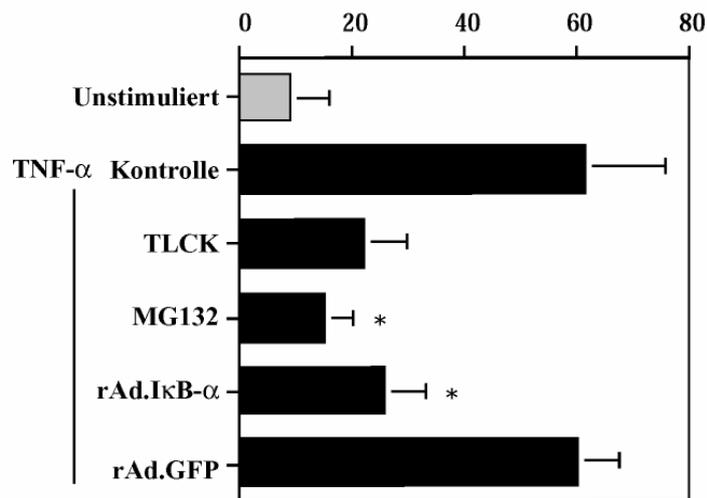


Abb. 14: Adhäsionsmoleküle und Chemokine vermitteln die feste Adhäsion monozytärer Zellen. Inhibition von Monozyten durch TLCK, MG132 oder rAd.IκB-α. MC wurden für 4 Stunden mit TNF-α (100 U/mL) stimuliert. Monzyten blieben unbehandelt oder wurden vorbehandelt mit einem Gemisch aus Antikörpern gegen β2 und α4 Integrine (30 Minuten), PTX (250 ng/mL; 1 Stunde), GRO-α₈₋₇₃, MCP-1₉₋₇₆ (jeweils 1 µg/mL; 30 Minuten) oder löslichem Fractalkine (100 nM) und mit konstanter Geschwindigkeit von 1,5 dyn/cm² über die aktivierten MC perfundiert. Nach 4 Minuten wurde die Anzahl der adhärenen Zellen in multiplen Feldern bestimmt und als Zellen/mm² angegeben. Die Daten geben den Mean ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten an (A). MC blieben unbehandelt oder wurden mit TLCK (50µM), MG132 (20µM) für 2 Stunden vorbehandelt oder mit rAd.IκB-α oder rAd.GFP (48 Stunden vor Durchführung der Experimente) transfeziert und/oder mit TNF-α (100 U/mL) für 4 Stunden stimuliert. MM6 Zellen wurden mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1,5 dyn/cm² über die MC perfundiert. Nach 5 Minuten wurde die Anzahl der adherenten Zellen in multiplen Feldern bestimmt und als Zellen/mm² angegeben. Die Daten geben den Mittelwert± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten an (B). * p < 0,05 versus Kontrolle.

Peptidanalogue mit GRO- α und IL-8 um die Bindung an den CXCR2 Rezeptor, MCP-1₉₋₇₆ um den CCR2 Rezeptor (Jones 1997, Gong 1995). Die Vorbehandlung der Monozyten mit GRO- α_{8-73} inhibierte die induzierte Adhäsion auf den durch TNF- α aktivierten MC (Abbildung 14A). MCP-1₉₋₇₆ und ein RANTES Rezeptorantagonist hingegen führten zu keiner signifikanten Hemmung des Arrestes (Abbildung 14A, Daten nicht gezeigt). Wurde der Fractalkine Rezeptor CX₃CR durch Zugabe der löslichen Fractalkine-Chemokindomäne desensibilisiert, zeigten sich leicht inhibitorische Effekte auf die induzierte Monozytenadhäsion. In Kombination mit einer Vorbehandlung der Monozyten mit PTX, wirkte lösliches Fractalkine stärker inhibitorisch als jede der Substanzen alleine (Abbildung 14A). Dies weist darauf hin, dass Fractalkine und CX₃CR auch über PTX-unabhängige Signalwege an der Vermittlung des induzierten Monozytenarrestes beteiligt zu sein scheinen. Auch eine Vorbehandlung der MC mit Antikörpern gegen IL-8 und weniger ausgeprägt auch durch Antikörper gegen Fractalkine verminderte den induzierten Arrest der Monozyten auf MC (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten zeigen, dass die Monozytenadhäsion auf aktivierten MC Integrin-abhängig ist, aber auch von den Chemokinen GRO- α und möglicherweise IL-8 über den CXCR2 Rezeptor und in geringerem Maße auch durch Fractalkine vermittelt wird, während der MCP-1 Rezeptor CCR2 keine Rolle für den festen Monozytenarrest auf MC zu spielen scheint.

3.4.1.2. Inhibition durch TLCK, MG132, I κ B- α Überexpression

Die Effekte von TLCK, MG132 und der I κ B- α Überexpression auf den induzierten Arrest wurden in Adhäsionsversuchen mit einer monozytären Mono Mac 6 Zelllinie untersucht. Diese Zelllinie exprimiert auf ihrer Zelloberfläche eine ähnliche Reihe von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren wie Monozyten (Ziegler-Heitbrock 1988). Nach TNF- α Behandlung der MC (100 U/mL; 4 Stunden) war die Anzahl der fest adhärenen Mono Mac 6 Zellen im Gegensatz zum Arrest auf nicht stimulierten MC deutlich erhöht (Abbildung 14B). Waren die MC mit TLCK oder MG132 vorbehandelt oder mit dem I κ B- α kodierenden Adenovirus transfiziert, inhibierte dies den induzierten Mono Mac 6 Zellarrest fast bis auf das Hintergrundniveau unstimulierter MC (Abbildung 14B).

3.4.2. Monozytenadhäsion auf GEC und HUVEC

Auch der Monozytenarrest auf aktivierten GEC wurde in Adhäsionsversuchen unter physiologischen Flussbedingungen untersucht. Nach Stimulation der GEC mit TNF- α war die Anzahl der adhärenen Monozyten im Gegensatz zur Adhäsion auf unstimulierten GEC deutlich erhöht (20.8 ± 2.0 Zellen/mm²). Dieser durch TNF- α induzierte Monozytenarrest wurde inhibiert durch die Vorbehandlung der Monozyten mit GRO- α_{8-73} , nicht aber durch die Inkubation mit MCP-1₉₋₇₆. Die Zugabe der löslichen Fractalkine-Chemokindomäne verminderte den induzierten Monozytenarrest und in Kombination mit der Vorbehandlung der Monozyten mit PTX stellte sich eine leicht additive, stärkere Inhibition ein als durch jede der Substanzen allein (Abbildung 15, Daten nicht gezeigt). Die durch TNF- α induzierte Monozytenadhäsion auf HUVEC ($92,8 \pm 10,8$ Zellen/mm²) wurde dagegen stärker durch die Vorbehandlung der Monozyten mit PTX oder GRO- α_{8-73} als durch lösliches Fraktalkin inhibiert, wobei auch auf diesen Zellen die Kombination aus der Vorbehandlung der Monozyten mit PTX und löslichem Fractalkine einen leicht additiven inhibitorischen Effekt auf die Monozyteadhäsion hatte (Abbildung 15). Für den Monozytenarrest auf stimulierten GEC und HUVEC waren somit hauptsächlich der Rezeptor CXCR2, aber auch das Chemokin Fractalkine von großer Bedeutung. Diese Daten vermitteln einen eindrucksvollen Unterschied in der Regulation und funktionellen Bedeutung von Chemokinen aus unterschiedlichen vaskulären Gefäßbetten. Es sei allerdings angemerkt, dass nicht ganz ausgeschlossen werden kann, dass diese Unterschiede möglicherweise auch in Speziesdifferenzen begründet liegen.

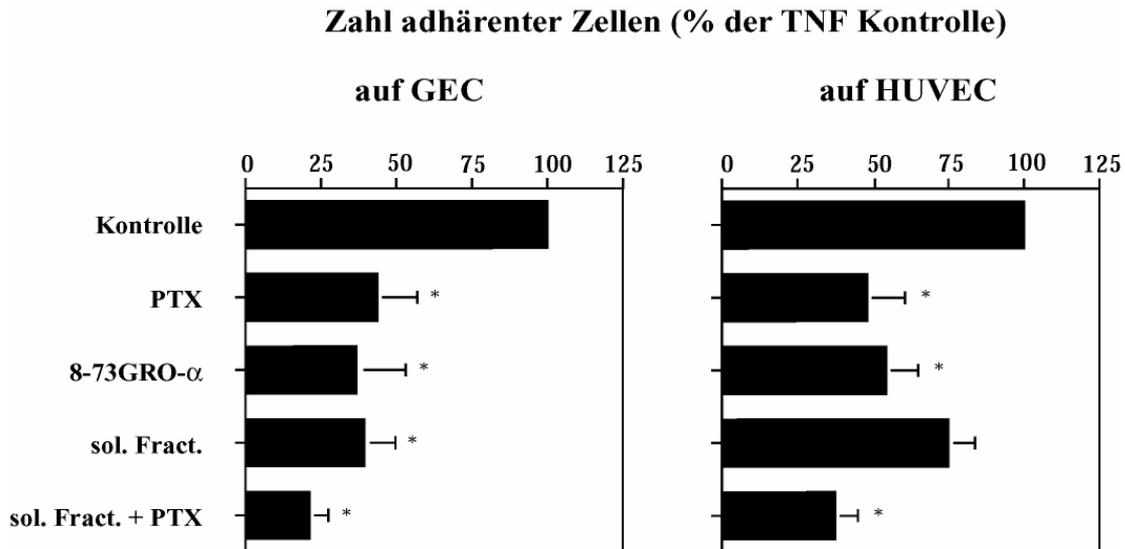


Abb. 15: Chemokine vermitteln die feste Adhäsion von Monozyten auf aktivierten GEC und HUVEC. GEC oder HUVEC wurden mit TNF- α (100 U/mL; 4 Stunden) stimuliert. Die Monozyten wurden teilweise mit PTX (250 ng/mL) für 1 Stunde, GRO- α_{8-73} (1 μ g/mL) oder löslichem Fractalkine (100 nM) für 30 Minuten vorbehandelt und mit konstanter Geschwindigkeit von 1,5 dyn/cm² über die aktivierten GEC (A) oder HUVEC (B) perfundiert. Nach 5 Minuten wurde die Anzahl der adherenten Zellen in multiplen Feldern bestimmt und als Zellen/mm² angegeben. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten an. * $p < 0,05$ versus Kontrolle.

3.5. Transendotheliale Migration

3.5.1. Funktionelle Bedeutung der Chemokine

Die transendotheliale Migration von Monozyten wurde in Chemotaxisversuchen untersucht. Das hierfür verwendete Zweikammersystem trug den strukturellen Gegebenheiten im Glomerulus Rechnung. Dabei konnten die in die obere Kammer gegebenen Monozyten durch eine Einzelzellschicht aus GEC oder HUVEC auf Filtereinsätzen den in der unteren Kammer kultivierten MC entgegen migrieren. Die MC blieben entweder unbehandelt oder wurden vor dem Zusammenfügen mit den Filtereinsätzen mit TNF- α stimuliert (100 U/mL; 4 Stunden). Die endothelialen Zellen auf den Filtereinsätzen blieben unbehandelt. Die Monozyten wurden zum Teil mit den Chemokinrezeptorantagonisten vorbehandelt. Nach einer Transmigrationszeit von zwei Stunden wurde die Anzahl der in die untere Kammer migrierten Monozyten flusszytometrisch bestimmt.

Nach TNF- α Stimulation der MC verdoppelte sich die Zahl der in die untere Kammer migrierten Monozyten gegenüber der Migration auf unstimulierte MC zu (Abbildung 16A). Diese durch TNF- α induzierte Migration wurde durch die

Vorbehandlung der Monozyten mit dem MCP-1 Rezeptorantagonisten MCP-1₉₋₇₆ vollständig inhibiert, weniger effektiv auch durch GRO- α_{8-73} gehemmt (Abbildung 16A). Die Migration der Monozyten unstimulierten MC entgegen wurde durch die Vorbehandlung mit keinem der beiden Chemokinanaloga wesentlich beeinflusst (Abbildung 16A) und weist darauf hin, dass unter diesen Bedingungen ungerichtete Spontanmigrationen vorherrschen. Die von aktivierten MC hervorgerufene transendotheliale Migration von Monozyten wird zusammenfassend vor allem durch den CCR2 Rezeptor, weniger ausgeprägt auch durch den CXCR2 Rezeptor, vermittelt.

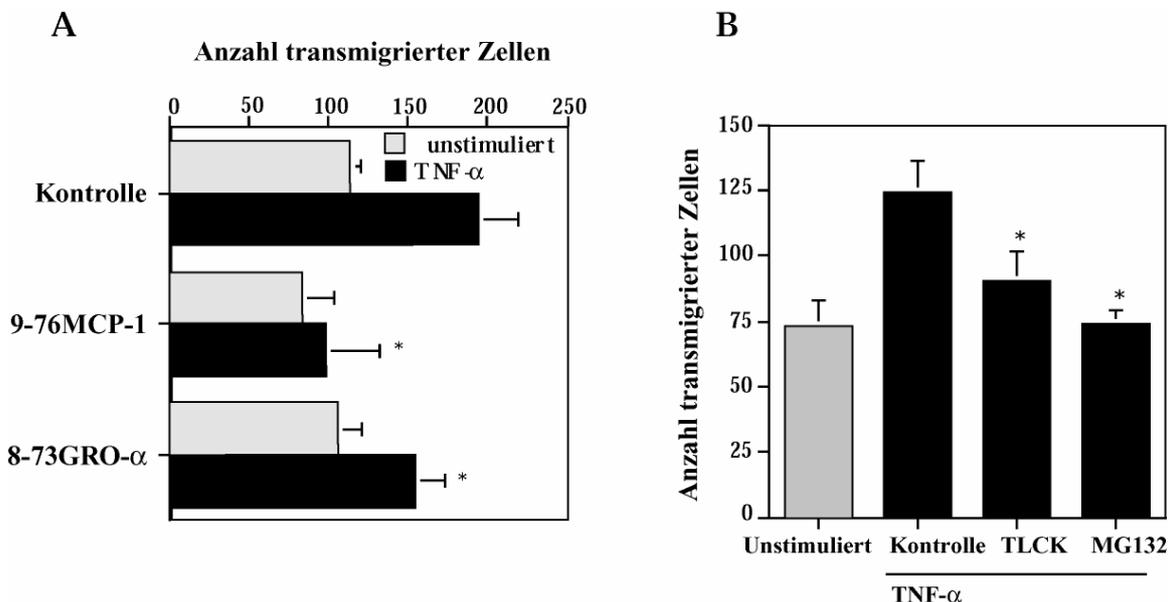


Abb. 16: Transendotheliale Migration monozytärer Zellen MC entgegen. PBMC konnten für 2 Stunden über die mit konfluenten HUVEC kultivierten Filtereinsätze den unbehandelten oder mit TLCK (50 μ M) oder MG132 (20 μ M) vorbehandelten und/ oder mit TNF- α stimulierten (100U/mL, 4 Stunden) MC in der unteren Kammer entgegen migrieren. Die Anzahl der migrierten Monozyten wurde in der Flusszytometrie bestimmt (B). Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten an. * $p < 0,05$ versus Kontrolle (A). PBMC blieben unbehandelt oder wurden mit GRO- α_{8-73} oder MCP-1₉₋₇₆ (jeweils 1 μ g/mL; 30 Minuten) vorbehandelt. In die obere Kammer eines Zweikammerchemotaxisversuches gegeben, konnten die PBMC für 2 Stunden durch die mit HUVEC kultivierten Filtereinsätze den in der unteren Kammer kultivierten MC entgegen migrieren. MC waren unbehandelt oder mit TNF- α (100 U/mL; 4 Stunden) stimuliert. Die Anzahl der migrierten Monozyten in der unteren Kammer wurde in der Flußzytometrie bestimmt. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten an (B). * $p < 0,05$ versus Kontrolle.

3.5.2. Inhibition durch TLCK, MG132, I κ B- α Überexpression

Die Effekte der NF- κ B Inhibitoren auf die Monozytentransmigration wurden in Transmigrationsversuchen in dem Zweikammerchemotaxissystem untersucht. Dafür wurden die MC in der unteren Kammer vor TNF- α Stimulation mit TLCK oder MG132 vorbehandelt oder mit I κ B- α transfeziert. Während die spontane Transmigration unbehandelten MC entgegen unbeeinflusst blieb, inhibierte die Vorbehandlung mit TLCK, MG132 und die I κ B- α Überexpression die TNF- α induzierten Transmigration deutlich (Abbildung 16B, Daten nicht gezeigt).

Die Vorbehandlung mit TLCK, MG132 und die I κ B- α Überexpression führen also, möglicherweise über die Inhibition der Chemokinsekretion, zu einer Abnahme des festen monozytären Arrestes auf stimulierten MC.

3.6. Glomeruläre Makrophagenlokalisierung in vivo

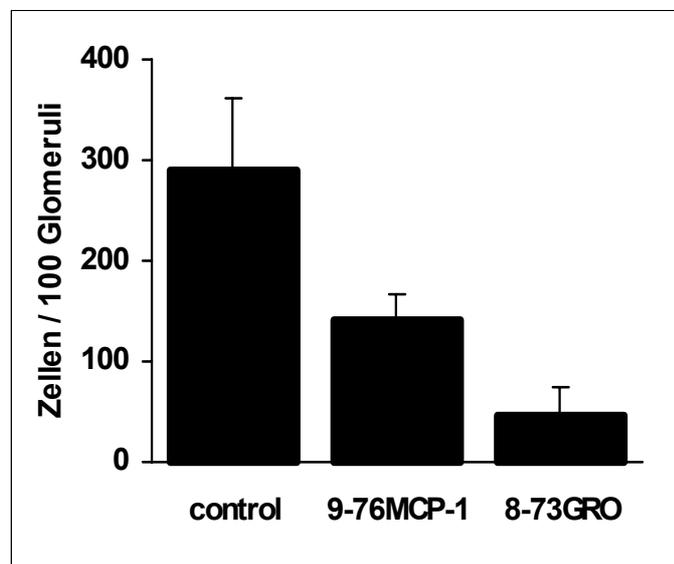
Um die Relevanz einer Beteiligung der Rezeptoren CXCR2 und CCR2 an der glomerulären Leukozytenrekrutierung in vivo zu überprüfen, wurde die Makrophagenrekrutierung im Rattenmodell untersucht. Hierfür wurde in männlichen Sprague-Dawley Ratten eine nephrotoxische Nephritis (NTN) durch die Gabe von Anti-Basalmembran (BM)-Antikörpern ausgelöst und fluoreszenzmarkierte Rattenmakrophagen (NR8383 Zelllinie) operativ in die linke Nierenarterie injiziert. Dabei blieben die Makrophagen außer der roten Fluoreszenzmarkierung entweder unbehandelt, oder waren mit GRO- α_{8-73} oder MCP-1 $_{9-76}$ vorbehandelt. Einen Tag nach Injektion der Makrophagen wurden die Nieren der getöteten Tiere präpariert, die Glomeruli im Siebverfahren isoliert und durch grün fluoreszierende Anti-BM-Antikörper zur Darstellung gebracht und die Lokalisation der Makrophagen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. In der Kontrollgruppe akkumulierten die injizierten Makrophagen in großer Anzahl in den entzündeten Glomeruli der Ratten. Diese Infiltration war deutlich durch die Vorbehandlung der Makrophagen mit MCP-1 $_{9-76}$ vermindert, und fast vollständig inhibiert nach Vorinkubation mit GRO- α_{8-73} (Abbildung 17A, B). Wie von Feng et al. beschrieben, führte die Vorbehandlung mit einem Fractalkine Antikörper zu diesem frühen Zeitpunkt einer NTN zu einer nur wenig effektiven Inhibition der Makrophagenrekrutierung (Feng 1999), in Übereinstimmung mit

der im Gegensatz zu GRO- α und MCP-1 zeitlich späteren glomerulären Expression von Fractalkine (Wu 1997).

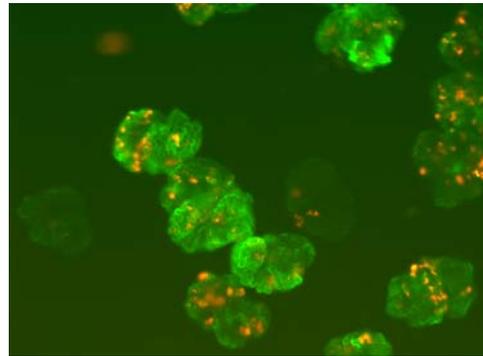
Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der CCR2 und CXCR2 Rezeptoren für die glomeruläre Leukozyteninfiltration. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die transendotheliale Migration der Monozyten ins glomeruläre Kompartiment äußerst effektiv durch Antagonisierung von CXCR2 inhibiert wurde, welches in den in vitro Versuchen vor allem den festen Monozytenarrest vermittelte. Dies könnte darauf hindeuten, dass der initiale feste Arrest der Monozyten auf endothelialen Zellen möglicherweise die Voraussetzung für alle nachfolgenden Schritte der Monozytenextravasation darstellt.

Abb. 17

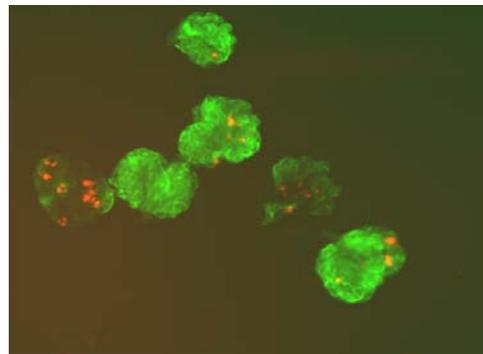
A



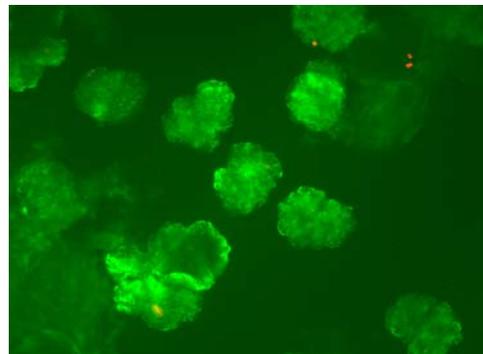
B



Kontrolle



9-76MCP-1



8-73GRO-α

Abb. 17: *CCR2 und CXCR2 Antagonisten inhibieren die Rekrutierung von Makrophagen in entzündete Glomeruli der Niere in vivo. Die Anzahl der fluoreszenzmarkierten Makrophagen in den Glomeruli wurde in zufällig ausgewählten Glomeruli quantifiziert. Die Daten geben den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten an (A). Die Lokalisation der mit PKH26-GL fluoreszenzmarkierten Makrophagen in den isolierten Glomeruli wurde einen Tag nach Induktion der NTN in Ratten analysiert. Die injizierten Makrophagen waren teilweise mit GRO- α_{8-73} oder MCP-1 $_{9-76}$ vorinkubiert und erscheinen in der Immunfluoreszenz rot. Die Basalmembran der isolierten Glomeruli kommt durch Ani-Hasen-IgG-FITC-Antikörper grün zur Darstellung (B). Gezeigt sind repräsentative Bilder aus einem von drei unabhängigen Experimenten.*

4. Diskussion

Die Infiltration mit leukozytären Zellen tritt schon sehr früh in der Pathogenese glomerulärer Erkrankungen auf und geht häufig funktionellen und strukturellen Veränderungen voraus (Hooke 1984, Nolasco 1987). Die Adhäsion, Diapedese und schließlich Akkumulation von mononukleären Phagozyten in der Niere ist häufig assoziiert mit Proteinurie und eingeschränkter Nierenfunktion, und es wurde postuliert, dass mononukleäre Immunzellen den Nierenschaden durch Sekretion inflammatorischer Zytokine, reaktiver Sauerstoffradikale und proteolytischer Enzyme initiieren und weiter unterhalten (Schreiner 1991, Kashgarian 1992). In vivo Studien konnten zum Beispiel verdeutlichen, dass erhöhte glomeruläre wie auch systemische TNF- α Konzentrationen in direkter Verbindung stehen mit der Perpetuierung des glomerulären Schadens (Tomosugi 1989, Hruby 1991). Die genauen lokalen zellulären und molekularen Mechanismen, die diese glomeruläre Monozytenrekrutierung als Antwort auf inflammatorische Stimuli regulieren, sind noch nicht genau geklärt.

Die Leukozytenemigration wird, wie bereits im ‚Multistep‘ Modell einleitend beschrieben, durch sequentielle und sich überlappende Interaktionen von Signalmolekülen vermittelt und reguliert. Für eine Vielzahl dieser Moleküle konnte bereits demonstriert werden, dass sie während verschiedener Glomerulopathien exprimiert werden und durch TNF- α induzierbar sind (Segeer 2000, Lefkowitz 1997, Janssen 1998, Mulligan 1993, Feng 1999, Cockwell 1999, Topham 1999, Bird 2000, Wu 1997, Feng 1995, Zoja 1991, Wolf 1993, Brown 1991, Kusner 1991, Wu 1995, Wolf 1997, Kakizaki 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt und weiterführend gezeigt werden, dass die Expression der Chemokine GRO- α , IL-8 und MCP-1 sowie der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 durch TNF- α Stimulation von MC hochreguliert werden. Die Induktion dieser Signalmoleküle war assoziiert mit einer vermehrten Monozytenadhäsion auf TNF- α stimulierten MC unter Flussbedingungen. Die Leukozytenadhäsion involviert β 2 und α 4 Integrine, die mit ICAM-1 und VCAM-1 respektive interagieren (Kukreti 1997, Springer 1994). Entsprechend wurde auch die Monozytenadhäsion auf stimulierten MC unter Flussbedingungen durch eine Kombination blockierender monoklonaler Antikörpern gegen die α 4 und die β 2 Integrinkette inhibiert. Der monozytäre Arrest wurde darüberhinaus durch PTX inhibiert, was darauf hinweist, dass die Integrinaktivierung über G α_i -gekoppelte Rezeptoren an der Vermittlung dieser Adhäsion beteiligt ist, ähnlich der Lymphozytenadhäsion auf endothelialen Venolen (Bargatze 1993).

Chemokine können auf der Zelloberfläche über Heparane und verwandte Glykoproteine immobilisiert werden oder als lösliche Moleküle sezerniert werden (Weber, von Hundelshausen 1999, Rot 1992, Witt 1994). Mittels Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass die TNF- α Stimulation der MC zur Bindung von GRO- α und IL-8 nicht aber von MCP-1 auf der Zelloberfläche über Heparanproteoglykane führte, und MCP-1 und IL-8 auch als lösliche Moleküle sezerniert wurden. Diese unterschiedlichen Präsentationsmuster waren mit verschiedenen funktionellen Aufgaben der Chemokine assoziiert. Wie durch Antagonisierung der spezifischen Chemokinrezeptoren durch analoge Peptide demonstriert werden konnte, spielte der GRO Rezeptor CXCR2 im Gegensatz zum MCP-1 Rezeptor CCR2 und dem RANTES Rezeptor eine große Rolle bei der Vermittlung des monozytären Arrestes auf stimulierten MC. Eine Blockade von monozytärem IL-8 auf den MC durch Antikörper inhibierte die Monozytenadhäsion in geringerem Maße als die Antagonisierung von CXCR2 und könnte damit in Verbindung stehen, dass sowohl GRO- α als auch IL-8 über den CXCR2 Rezeptor wirken. Auch auf aktivierten GEC verminderte die Antagonisierung von CXCR2 den induzierten Monozytenarrest. Dass hauptsächlich der Chemokinrezeptor CXCR2 für den monozytären Arrest verantwortlich zu sein scheint, wird außerdem unterstützt durch die Beobachtung, dass Monozyten auf ihrer Oberfläche mehr CXCR2 als CXCR1 exprimieren (Chuntharapai 1994). Die immobilisierten Chemokine GRO- α und IL-8 und deren Rezeptor CXCR2 sind also von zentraler Bedeutung für den festen Arrest von Monozyten, nicht aber das lösliche Chemokin MCP-1. Wie auf aktivierten HUVEC (Gerszten 1999, Weber, von Hundelshausen 1999) war auch die gerichtete transendotheliale Chemotaxis auf stimulierte MC zu vor allem durch den CCR2 Rezeptor vermittelt, und weist auf die Involvierung von löslichem MCP-1 bei diesem Prozess hin. Im Gegensatz dazu war der CXCR2 Rezeptor wenig bedeutend für die transendotheliale Transmigration in diesem System und zeigt möglicherweise, dass lösliches IL-8 und GRO- α hier eine geringere Rolle spielen. Auch wenn Chemokine die Leukozytenadhäsivität sowohl in löslicher Form, als auch auf der Oberfläche gebunden aktivieren können, abhängig auch von den lokal vorherrschenden Konzentrationen (Gerszten 1999, Weber, von Hundelshausen 1999, Peled 1999), weisen die Ergebnisse dem Chemokin MCP-1 eine entscheidende Bedeutung für die Regulation der monozytären Chemotaxis zu, während und das auf der Zelloberfläche gebundene GRO- α und IL-8 die Sequestration der Monozyten auf den MC vermitteln.

Die Fractalkine Chemokindomäne sitzt auf einer Muzinkette, die in der Zellmembran verankert ist und vermittelt sehr effektiv eine Chemotaxis von Leukozyten. Auf der Zelloberfläche

präsentiert, vermittelt es aber auch den von Ca^{2+} und Integrinen unabhängigen (PTX insensitiven) monozytären Arrest (Bazan 1997, Fong 2000, Haskell 1999, Imai 1997), kann also Eigenschaften eines Chemokines als auch eines Adhäsionsmoleküls übernehmen.

In MC wurde weder die transkriptionelle Regulation von Fractalkine, noch seine Oberflächenproteinexpression deutlich durch $\text{TNF-}\alpha$ Stimulation induziert. Die Aktivierung von GEC und, wie bereits beschrieben, auch von stimulierten HUVEC (Bazan 1997) führte zu einer signifikanten Hochregulation der Fractalkineexpression.

Fractalkine und dessen Rezeptor CX_3CR waren an der Monozytensequestration auf stimulierten MC und noch deutlicher auf aktivierten GEC beteiligt. Der Monozytenarrest auf stimulierten MC und GEC wurde durch eine Kombination aus CX_3CR Desensitivierung durch die lösliche Chemokindomäne und PTX additiv inhibiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass Fractalkine den Monozytenarrest sowohl über G-Protein unabhängige, zusätzlich auch über G-Protein abhängige Signalwege vermittelt, zum Beispiel synergistisch mit anderen Chemokinen wie $\text{GRO-}\alpha$. So wäre denkbar, dass Fractalkine mit seiner auf der Muzinkette sitzenden Chemokindomäne leukozytäre Zellen aus dem weniger marginalen Blutstrom in die Nähe der Endothelzellen bindet, wo dann induzierbare und immobilisierte Chemokine über CXCR2 die für den Arrest ausschlaggebenden Signalwege aktivieren.

Zusammenfassend könnte also Fractalkine auf den MC als ein den monozytären Arrest unterstützendes Signalmolekül fungieren, während es über eine Interaktion mit CX_3CR von integraler Bedeutung für die Monozytenadhäsion auf GEC unter Flussbedingungen ist.

Die nukleären Faktoren (NF)- κB sind eine Familie von dimerischen Proteinen, die zur Rel Familie gehören. Die Rel Homologiedomäne ist gekennzeichnet durch Dimerisation, einer nukleärer Lokalisation und der Bindung an κB -Elemente in Promotoren und Enhancer Regionen verschiedener Zielgene (Mercurio 1999). Diese schließen Gene ein, die für Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Zytokine kodieren, die bei inflammatorischen und proliferativen Prozessen beteiligt sind. Die NF- κB Aktivierung wurde bereits eingehend untersucht und erfolgt *in vitro* als Antwort auf verschiedene Stimuli, darunter $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und Immunoglobule. In mehreren Tiermodellen von Nierenerkrankungen, zum Beispiel der Antibasalmembran- und der Immunkomplexnephritis, konnte eine NF- κB Aktivierung *in vivo* beschrieben werden (Massy 1999). Weiter wurde für PDTC, Kortikoide, Antioxidantien und ACE gezeigt, dass diese Substanzen über eine Inhibition der NF- κB Aktivierung die nachfolgende mRNA Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen beeinflussen

(Auwardt 1998, Khachigian 1997, Massy 1999, Sakurai 1997, Segerer 2000). Die verminderte Adhäsionsmolekül- und Chemokinexpression in Endothelzellen schließlich führte dazu, Inhibitoren der NF- κ B Aktivierung als ein Ziel therapeutischer Interventionen zu erforschen (Read 1995).

Wir untersuchten die Effekte von TLCK, MG132 und die zytoplasmatische I κ B- α Überexpression auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokine in MC und weiterführend deren funktionelle Bedeutung für die mesangiale Monozytenrekrutierung und Transmigration.

TLCK wirkt als irreversibler Serinproteaseninhibitor hemmend auf die I κ B- α Degradation und die nachfolgende NF- κ B Aktivierung in Endothelzellen (Henkel 1993). MG132 inhibiert die I κ B- α Degradation und Akkumulation von NF- κ B im Nukleus, indem es die proteolytische Aktivität der 20S und 26S Komplexe des Proteosoms hemmt (Sakurai 1997). Um mit den durch Zytokinstimulation in Gang gesetzten, frühen zellulären Signalwegen intervenieren zu können, müssen Zellen entweder vor oder simultan zur TNF- α Aktivierung mit den Inhibitoren exponiert werden, wie dies für MG132 und die E-Selektin Expression in endothelialen Zellen gezeigt wurde (Read 1995). Entsprechend wurden für alle Versuche mit den Inhibitoren die MC über 2 Stunden vor der Stimulation mit TNF- α mit den zu untersuchenden Substanzen vorbehandelt und blieben weiter auch während der Zytokinaktivierung präsent. Die Vorbehandlung der MC mit TLCK verhinderte wirkungsvoll die TNF- α induzierte I κ B- α Degradation, war aber etwas weniger effektiv als MG132, und in ähnlicher Weise wurde auch die Adhäsionsmoleküle und Chemokinexpression deutlicher durch MG132 inhibiert.

Die Transfektion von Endothelzellen mit einem für I κ B- α kodierenden rekombinanten Adenovirus führte zur endothelialen Überexpression von ektopem I κ B- α und verhinderte die Aktivierung von NF- κ B und die durch entzündliche Stimuli induzierte Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in den Endothelzellen. Darüber hinaus war die Monozytenrekrutierung durch mit I κ B- α transfiziertem, aktivierten Endothel gehemmt (Weber, Draude 1999). Obwohl der adenovirale Gentransfer selbst zu einer inflammatorischen Antwort und Antigenizität führt (Khachigian 1997), erwies sich die lokale Applikation des adenoviralen Transfers in der Niere und in glomerulären Zellen als möglich (Benigni 2000, Zhu 1996, Heikkila 1996) und wird als potentiell wirksame Möglichkeit gesehen, eine inflammatorische Antwort der Niere zu modulieren.

In den mit adenoviral kodiertem I κ B- α transfizierten MC verminderte die TNF- α Stimulation die I κ B- α Proteinmenge, diese blieb aber deutlich höher als in den mit TNF- α behandelten

Kontrollzellen und führte darüberhinaus auch zu einer reduzierten Adhäsionsmolekül- und Chemokinexpression. Es wurde beschrieben, dass das durch den adenoviralen Gentransfer exprimierte I κ B- α phosphoryliert und nachfolgend degradiert werden kann. Wie nach LPS Stimulation demonstriert, wird der Großteil des exprimierten I κ B- α jedoch nicht prozessiert (Wrighton 1996).

Wie bereits eingangs diskutiert, sind Integrine und deren endothelialen Liganden sowie Chemokine an der Regulation der Leukozytenadhäsion und Chemotaxis beteiligt und werden durch Zytokine in ihrer Expression hochreguliert. TLCK, MG132 und die adenovirale Transfektion mit dem zytoplasmatischen NF- κ B Inhibitor I κ B- α inhibierte die TNF- α induzierte Degradation von I κ B- α . Über die folglich inhibierte NF- κ B Aktivierung wurde auch die durch Zytokinstimulation induzierte transkriptionelle Hochregulation der Oberflächenexpression und Sekretion der Adhäsionsmoleküle und Chemokine gehemmt. Die durch TNF- α Stimulation induzierte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf der MC Zelloberfläche wurde durch MG132, TLCK und durch I κ B- α Überexpression deutlich inhibiert. Die TNF-induzierte Immobilisierung von GRO- α und IL-8 auf der MC Oberfläche war nach Vorbehandlung der MC mit TLCK, MG132 oder der I κ B- α Überexpression fast komplett inhibiert. Über eine reduzierte Expression dieser für die Leukozytenadhäsion bedeutenden Signalmoleküle, hemmte die Vorbehandlung mit NF- κ B - Inhibitoren auch die TNF- α induzierte Monozytenadhäsion auf stimulierten MC. So könnte neben der reduzierten Adhäsionsmolekülexpression von ICAM-1 und VCAM-1 auch die verminderte GRO- α und IL-8 Oberflächenassoziation für die Inhibition des Monozytenarrestes verantwortlich sein. Darüberhinaus war auch die verminderte Sekretion der Chemokine MCP-1 und IL-8 mit einer verminderten Transmigration von Monozyten auf stimulierte MC zu vermindert.

Die glomeruläre Monozytenrekrutierung kann also auf verschiedenen Stufen über eine NF- κ B Inhibition beeinflusst werden.

Für verschiedene NTN Modelle ist die erhöhte Expression der Chemokine MCP-1, MIP-1, CINC, RANTES und Fractalkine beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die leukozytäre Infiltration und Proteinurie durch eine Immunneutralisation von CX₃CR, MIP-1 oder CINC in den frühen Phasen der NTN inhibiert wird (Segeer 2000, Mulligan 1993, Feng 1995 und 1999, Wu 1995).

Die in vivo Versuche dieser Arbeit an einem akzelerierten Rattenmodell der NTN bestätigten die kombinierte Beteiligung von Chemokinrezeptoren bei der glomerulären Rekrutierung von Monozyten/ Makrophagen. So wurde in der Frühphase der NTN die glomeruläre Makrophageninfiltration durch die Antagonisierung von CCR2 durch MCP-1₉₋₇₆ und noch wesentlicher durch die Antagonisierung von dem auf aktivierten Makrophagen exprimierten CXCR2 (Bonecchi 2000) durch GRO- α_{8-73} inhibiert. Ähnlich wie für die Makrophageninfiltration in atherosklerotische Läsionen (Boisvert 1998) scheint CXCR2 also auch für die inflammatorische Zellrekrutierung in die Glomeruli bei Glomerulonephritiden von entscheidender Bedeutung zu sein.

Die Induktion eines Ca²⁺-Signals in den Rattenmakrophagen als Zeichen der Rezeptoraktivierung, konnte durch humanes GRO- α ausgelöst und mit GRO- α_{8-73} inhibiert werden, sodass von einer für die Experimente ausreichenden Homologie und Kreuzreaktivität zwischen den verschiedenen Spezies ausgegangen werden kann. Auch der humane RANTES Rezeptorantagonist Met-RANTES hemmt effektiv, über verschiedene Spezies hinweg, die renale Transplantabstoßung in einem Rattenmodell (Grone 1999, Boisvert 1998). Zusammen mit den in vitro Versuchen implizieren diese Ergebnisse eine sequentielle Beteiligung von Chemokinrezeptoren. Dabei stellt der durch CXCR2 vermittelte initiale Arrest auf dem entzündlich aktivierten Endothel den initialen und limitierenden Schritt für die nachfolgende Migration dar. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die glomeruläre Makrophagenrekrutierung in vivo stärker durch GRO- α_{8-73} Antagonisierung als durch die Blockade von $\beta 2$ Inegrinen oder deren Liganden inhibiert wurde. Übereinstimmend zeigte sich ein additiver hemmender Effekt von PTX und GRO- α Antagonisierung auf den Monozytenarrest (D.C. Kluth, noch nicht publiziert). Dies könnte bedeuten, dass GRO- α über PTX sensitive Integrinaktivierung und möglicherweise auch über den Aufbau einer direkten adhäsiven Verbindung die Monozytenadhäsion vermittelt, wie dies für Fractalkine demonstriert werden konnte.

Wie bereits beschrieben, schwächt ein MCP-1 Antikörper die Leukozyteninfiltration und Proteinurie in den frühen Phasen der murinen NTN ab (Mulligan 1993) und der CCR2 Knockout hatte protektive Effekte am ersten Tag einer akzellerierten murinen NTN. Beachtenswert ist, dass der Knockout von CCR1 oder CCR2 am dritten Tag jedoch zu einer Verschlechterung der NTN in den Mausmodellen führte (Topham 1999, Bird 2000). Übereinstimmend inhibierte der CCR2 Antagonist MCP-1₉₋₇₆ die Makrophagenrekrutierung bereits einen Tag nach Induktion der NTN im Rattenmodell.

Das CX₃C Chemokin Fractalkine wurde kürzlich in nephritischen Rattenglomeruli detektiert und dessen Beteiligung bei der Leukozytenrekrutierung während der Halbmondglomerulonephritis impliziert. So führte die Immunneutralisation von CX₃CR zur Prävention der Halbmondglomerulonephritis (Feng 1999). In eigenen Versuchen in dem NTN Modell der Ratte war die Behandlung mit CX₃CR Antikörpern am ersten Tag weniger effektiv als zu späteren Zeitpunkten (D.C. Kluth, nicht publiziert).

Verschiedene Chemokine scheinen also während ganz bestimmter Erkrankungsphasen sehr unterschiedliche Bedeutung zu haben. Es ist denkbar, dass ein spezifischer Rezeptor in einzelnen Krankheitsstadien pro- oder aber anti-inflammatorische Wirkung besitzt. In dieser Arbeit wurde eine Bedeutung von GRO- α und MCP-1 für die Makrophagenakkumulation in der frühen Phase der NTN gezeigt, während Fractalkine erst zu späteren Zeitpunkten relevant zu werden scheint.

Die glomeruläre Monozytenrekrutierung wird also von einer Reihe kombinierter Interaktionsmechanismen von Chemokinen und deren Rezeptoren gesteuert und folgendes Modell ist vorstellbar: Während Fractalkine und GRO- α synergistisch den initialen festen Arrest auf den GEC vermitteln, regulieren die von MC sezernierten löslichen Gradienten von MCP-1 und möglicherweise IL-8 die gerichtete transendotheliale Diapedese von Monozyten. Im glomerulären Kompartiment unterstützen dann das auf MC immobilisierte GRO- α und IL-8 die Lokalisierung und Sequestration der Monozyten.

In dieser Arbeit erschließt sich das Konzept eines mehrstufig regulierten Modells funktionell spezialisierter Chemokine für die inflammatorische Monozytenrekrutierung. Dieses Modell könnte in Zukunft dabei helfen, abgestimmte Applikationen von Chemokine(rezeptor)-Antagonisten zu entwickeln, um spezifischer in inflammatorische Prozesse der Niere einzugreifen.

5. Zusammenfassung

Die Infiltration mit leukozytären Zellen spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese glomerulärer Erkrankungen der Niere und wird durch sequentielle und sich überschneidende Interaktionen verschiedener Signalmoleküle gesteuert. MC und auch GEC beteiligen sich an der Kontrolle der Ultrafiltration und Mikrozirkulation, unter anderem auch durch die transkriptionelle Regulation der Expression solcher Signalmoleküle. In dieser Arbeit wurde die Adhäsionsmolekül- und Chemokinexpression von MC und GEC untersucht und deren Regulation durch verschiedene NF- κ B Inhibitoren bestimmt. Die funktionelle Bedeutung dieser Moleküle für die Adhäsion und Transmigration wurde *in vitro*, die glomeruläre Monozytenrekrutierung *in vivo* im Rattenmodell untersucht.

Die Zytokinstimulation der MC mit TNF- α induzierte die Transkription und Proteinexpression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sowie der Chemokine GRO- α , IL-8, MCP-1, aber nicht Fractalkine. GRO- α und IL-8 wurden auf der MC Oberfläche über Heparanproteoglykane immobilisiert, MCP-1 und auch IL-8 als lösliche Moleküle sezerniert. Fractalkine hingegen war nur geringfügig induzierbar konstitutiv auf der MC Oberfläche exprimiert. Diese Induktion der Adhäsionsmoleküle und Chemokine durch Zytokinstimulation der MC was assoziiert mit einer vermehrten Monozytenadhäsion und Transmigration. Dabei vermittelte ICAM-1 und VCAM-1, der GRO- α Rezeptor CXCR2 und in geringerem Maß auch Fractalkine den festen monozytären Arrest, während der MCP-1 Rezeptor CCR2 die transendotheliale Chemotaxis von Monozyten auf aktivierte MC zu steuerte.

Die transkriptionelle Hochregulation der untersuchten Moleküle wurde über eine Inhibition der I κ B- α Degradation durch den Proteaseninhibitor TLCK, den Proteosomeninhibitor MG132 und durch die adenovirale I κ B- α Überexpression gehemmt. Dies war assoziiert mit der Inhibition der monozytären Adhäsion auf aktivierten MC sowie der transendothelialen Migration auf stimulierte MC zu.

Im Gegensatz zu MC wurde Fractalkine auf mRNA wie Proteinebene in transformierten GEC (und auch HUVEC) deutlich induziert, und sowohl CXCR2 also auch CX₃CR vermittelten den Monozytenarrest auf aktivierten GEC unter Flussbedingungen.

Die Relevanz dieser Ergebnisse konnte in einem akzelerierten NTN Modell an der Ratte bestätigt werden, in dem die Blockade von CCR2 deutlich, und die Blockade von CXCR2

fast komplett die akute glomeruläre Makrophagenrekrutierung inhibierte. Dies unterstreicht die Bedeutung von CXCR2 für die Makrophageninfiltration in den frühen Phasen der NTN.

Zusammenfassend erschließt sich ein mehrstufiges Modell, das die inflammatorische Monozytenrekrutierung durch funktionell spezialisierte Adhäsionsmoleküle und Chemokine zeigt.

6. Literaturverzeichnis

1. Alon, R.; Fuhlbrigge, R. C.; Finger, E. B., und Springer, T. A. *Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow.* J Cell Biol. 1996 Nov; 135(3):849-65.
2. Arai, K. I.; Lee, F.; Miyajima, A.; Miyatake, S.; Arai, N., und Yokota, T. *Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses.* Annu Rev Biochem. 1990; 59:783-836.
3. Auwardt, R. B.; Mudge, S. J.; Chen, C. G., und Power, D. A. *Regulation of nuclear factor kappaB by corticosteroids in rat mesangial cells.* J Am Soc Nephrol. 1998 Sep; 9(9):1620-8.
4. Bacon, K. B.; Premack, B. A.; Gardner, P., und Schall, T. J. *Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES.* Science. 1995 Sep 22; 269(5231):1727-30.
5. Baggiolini, M. *Chemokines and leukocyte traffic.* Nature. 1998 Apr 9; 392(6676):565-8.
6. Baggiolini, M.; Dewald, B., und Moser, B. *Human chemokines: an update.* Annu Rev Immunol. 1997; 15:675-705.
7. Baggiolini, M. und Moser, B. *Blocking chemokine receptors.* J Exp Med. 1997 Oct 20; 186(8):1189-91.
8. Bargatze, R. F. und Butcher, E. C. *Rapid G protein-regulated activation event involved in lymphocyte binding to high endothelial venules.* J Exp Med. 1993 Jul 1; 178(1):367-72.
9. Bazan, J. F.; Bacon, K. B.; Hardiman, G.; Wang, W.; Soo, K.; Rossi, D.; Greaves, D. R.; Zlotnik, A., und Schall, T. J. *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif.* Nature. 1997 Feb 13; 385(6617):640-4.
10. Benigni, A.; Tomasoni, S.; Lutz, J.; Amuchastegui, S.; Capogrossi, M. C., und Remuzzi, G. *Nonviral and viral gene transfer to the kidney in the context of transplantation.* Nephron. 2000 Aug; 85(4):307-16.
11. Beutler, B. und Cerami, A. *The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response.* Annu Rev Immunol. 1989; 7:625-55.
12. Bevilacqua, M. P. *Endothelial-leukocyte adhesion molecules.* Annu Rev Immunol. 1993; 11:767-804.
13. Bird, J. E.; Giancarli, M. R.; Kurihara, T.; Kowala, M. C.; Valentine, M. T.; Gitlitz, P. H.; Pandya, D. G.; French, M. H., und Durham, S. K. *Increased severity of glomerulonephritis in C-C chemokine receptor 2 knockout mice.* Kidney Int. 2000 Jan; 57(1):129-36.
14. Boisvert, W. A.; Santiago, R.; Curtiss, L. K., und Terkeltaub, R. A. *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor- deficient mice.* J Clin Invest. 1998 Jan 15; 101(2):353-63.
15. Bonecchi, R.; Facchetti, F.; Dusi, S.; Luini, W.; Lissandrini, D.; Simmelink, M.; Locati, M.; Bernasconi, S.; Allavena, P.; Brandt, E.; Rossi, F.; Mantovani, A., und Sozzani, S. *Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes.* J Immunol. 2000 Apr 1; 164(7):3862-9.
16. Bork, P.; Holm, L., und Sander, C. *The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core.* J Mol Biol. 1994 Sep 30; 242(4):309-20.
17. Brown, Z.; Strieter, R. M.; Chensue, S. W.; Ceska, M.; Lindley, I.; Neild, G. H.; Kunkel, S. L., und Westwick, J. *Cytokine-activated human mesangial cells generate the neutrophil chemoattractant, interleukin 8.* Kidney Int. 1991 Jul; 40(1):86-90.
18. Butcher, E. C. and Picker, L. J. *Lymphocyte homing and homeostasis.* Science. 1996 Apr 5; 272(5258):60-6.
19. Cai, J. P.; Hudson, S.; Ye, M. W., und Chin, Y. H. *The intracellular signaling pathways involved in MCP-1-stimulated T cell migration across microvascular endothelium.* Cell Immunol. 1996 Feb 1; 167(2):269-75.
20. Campbell, J. J.; Hedrick, J.; Zlotnik, A.; Siani, M. A.; Thompson, D. A., und Butcher, E. C. *Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions.* Science. 1998 Jan 16; 279(5349):381-4.

21. Campbell, J. J.; Qin, S.; Bacon, K. B.; Mackay, C. R., und Butcher, E. C. *Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells*. J Cell Biol. 1996 Jul; 134(1):255-66.
22. Carr, M. W.; Roth, S. J.; Luther, E.; Rose, S. S., und Springer, T. A. *Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 26; 91(9):3652-6.
23. Chen, S.; Bacon, K. B.; Li, L.; Garcia, G. E.; Xia, Y.; Lo, D.; Thompson, D. A.; Siani, M. A.; Yamamoto, T.; Harrison, J. K., und 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):193-8.
24. Chuntharapai, A.; Lee, J.; Hebert, C. A., und Kim, K. J. *Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes*. J Immunol. 1994 Dec 15; 153(12):5682-8.
25. Clark, K.; Newham, P.; Burrows, L.; Askari, J. A., und Humphries, M. J. *Production of recombinant soluble human integrin alpha4beta1*. FEBS Lett. 2000 Apr 14; 471(2-3):182-6.
26. Cockwell, P.; Brooks, C. J.; Adu, D., und Savage, C. O. *Interleukin-8: A pathogenetic role in antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis*. Kidney Int. 1999 Mar; 55(3):852-63.
27. Dal Canton, A. *Adhesion molecules in renal disease*. Kidney Int. 1995 Dec; 48(6):1687-96.
28. de Martin, R.; Raidl, M.; Hofer, E., und Binder, B. R. *Adenovirus-mediated expression of green fluorescent protein*. Gene Ther. 1997 May; 4(5):493-5.
29. Diamond, M. S. und Springer, T. A. *The dynamic regulation of integrin adhesiveness*. Curr Biol. 1994 Jun 1; 4(6):506-17.
30. Draude, G.; von Hundelshausen, P.; Frankenberger, M.; Ziegler-Heitbrock, H. W., und Weber, C. *Distinct scavenger receptor expression and function in the human CD14(+)/CD16(+) monocyte subset*. Am J Physiol. 1999 Apr; 276(4 Pt 2):H1144-9.
31. Erwig, L. P.; Stewart, K., und Rees, A. J. *Macrophages from inflamed but not normal glomeruli are unresponsive to anti-inflammatory cytokines*. Am J Pathol. 2000 Jan; 156(1):295-301.
32. Erl, W.; Weber, C.; Zerneck, A., und Weber, P.C. *Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of PPAR-γ*. Im Druck in Eur J Immunol. 2004
33. Feng, L.; Chen, S.; Garcia, G. E.; Xia, Y.; Siani, M. A.; Botti, P.; Wilson, C. B.; Harrison, J. K., und Bacon, K. B. *Prevention of crescentic glomerulonephritis by immunoneutralization of the fractalkine receptor CX3CR1 rapid communication*. Kidney Int. 1999 Aug; 56(2):612-20.
34. Feng, L.; Xia, Y.; Yoshimura, T., und Wilson, C. B. *Modulation of neutrophil influx in glomerulonephritis in the rat with anti-macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) antibody*. J Clin Invest. 1995 Mar; 95(3):1009-17.
35. Fong, A. M.; Erickson, H. P.; Zachariah, J. P.; Poon, S.; Schamberg, N. J.; Imai, T., und Patel, D. D. *Ultrastructure and function of the fractalkine mucin domain in CX(3)C chemokine domain presentation*. J Biol Chem. 2000 Feb 11; 275(6):3781-6.
36. Fong, A. M.; Robinson, L. A.; Steeber, D. A.; Tedder, T. F.; Yoshie, O.; Imai, T., und Patel, D. D. *Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow*. J Exp Med. 1998 Oct 19; 188(8):1413-9.
37. Furuichi, K.; Wada, T.; Iwata, Y.; Sakai, N.; Yoshimoto, K.; Shimizu, M.; Kobayashi, K.; Takasawa, K.; Kida, H.; Takeda, S.; Matsushima, K., und Yokoyama, H. *Upregulation of fractalkine in human crescentic glomerulonephritis*. Nephron. 2001 Apr; 87(4):314-20.
38. Gerszten, R. E.; Garcia-Zepeda, E. A.; Lim, Y. C.; Yoshida, M.; Ding, H. A.; Gimbrone, M. A. Jr; Luster, A. D.; Luscinskas, F. W., und Rosenzweig, A. *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. Nature. 1999 Apr 22; 398(6729):718-23.
39. Gong, J. H. und 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):631-40.
40. Gordon, S. *Biology of the macrophage*. J Cell Sci Suppl. 1986; 4:267-86.

41. Grone, H. J.; Weber, C.; Weber, K. S.; Grone, E. F.; Rabelink, T.; Klier, C. M.; Wells, T. N.; Proudfoot, A. E.; Schlondorff, D., und Nelson, P. J. *Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment.* FASEB J. 1999 Aug; 13(11):1371-83.
42. Haskell, C. A.; Cleary, M. D., und Charo, I. F. *Molecular uncoupling of fractalkine-mediated cell adhesion and signal transduction. Rapid flow arrest of CX3CR1-expressing cells is independent of G-protein activation.* J Biol Chem. 1999 Apr 9; 274(15):10053-8.
43. Heikkila, P.; Parpala, T.; Lukkarinen, O.; Weber, M., und Tryggvason, K. *Adenovirus-mediated gene transfer into kidney glomeruli using an ex vivo and in vivo kidney perfusion system - first steps towards gene therapy of Alport syndrome.* Gene Ther. 1996 Jan; 3(1):21-7.
44. Henkel, T.; Machleidt, T.; Alkalay, I.; Kronke, M.; Ben-Neriah, Y., und Baeuerle, P. A. *Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B.* Nature. 1993 Sep 9; 365(6442):182-5.
45. Holness, C. L. und Simmons, D. L. *Structural motifs for recognition and adhesion in members of the immunoglobulin superfamily.* J Cell Sci. 1994 Aug; 107 (Pt 8):2065-70.
46. Hooke, D. H.; Hancock, W. W.; Gee, D. C.; Kraft, N., und Atkins, R. C. *Monoclonal antibody analysis of glomerular hypercellularity in human glomerulonephritis.* Clin Nephrol. 1984 Oct; 22(4):163-8.
47. Horuk, R. *Molecular properties of the chemokine receptor family.* Trends Pharmacol Sci. 1994 May; 15(5):159-65.
48. Horuk, R. und Peiper, S. C. *Chemokines: molecular double agents.* Curr Biol. 1996 Dec 1; 6(12):1581-2.
49. Hruby, Z. W.; Shirota, K.; Jothy, S., und Lowry, R. P. *Antiserum against tumor necrosis factor-alpha and a protease inhibitor reduce immune glomerular injury.* Kidney Int. 1991 Jul; 40(1):43-51.
50. Humphries, J. D.; Askari, J. A.; Zhang, X. P.; Takada, Y.; Humphries, M. J., und Mould, A. P. *Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha5beta 1. II. Specificity of arg-gly-Asp binding is determined by Trp157 OF THE alpha subunit.* J Biol Chem. 2000 Jul 7; 275(27):20337-45.
51. Humphries, M. J. *Integrin structure.* Biochem Soc Trans. 2000; 28(4):311-39
52. Humphries, M. J. *Integrin cell adhesion receptors and the concept of agonism.* Trends Pharmacol Sci. 2000 Jan; 21(1):29-32.
53. Hynes, R. O. *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.* Cell. 1992 Apr 3; 69(1):11-25.
54. Imai, T.; Hieshima, K.; Haskell, C.; Baba, M.; Nagira, M.; Nishimura, M.; Kakizaki, M.; Takagi, S.; Nomiya, H.; Schall, T. J., und Yoshie, O. *Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion.* Cell. 1997 Nov 14; 91(4):521-30.
55. Inkyo-Hayasaka, K.; Sakai, T.; Kobayashi, N.; Shirato, I., und Tomino, Y. *Three-dimensional analysis of the whole mesangium in the rat.* Kidney Int. 1996 Aug; 50(2):672-83.
56. Jackson, T.; Blakemore, W.; Newman, J. W.; Knowles, N. J.; Mould, A. P.; Humphries, M. J., und King, A. M. *Foot-and-mouth disease virus is a ligand for the high-affinity binding conformation of integrin alpha5beta1: influence of the leucine residue within the RGD motif on selectivity of integrin binding.* J Gen Virol. 2000 May; 81(Pt 5):1383-91.
57. Janssen, U.; Ostendorf, T.; Gaertner, S.; Eitner, F.; Hedrich, H. J.; Assmann, K. J., und Floege, J. *Improved survival and amelioration of nephrotoxic nephritis in intercellular adhesion molecule-1 knockout mice.* J Am Soc Nephrol. 1998 Oct; 9(10):1805-14.
58. Jones, S. A.; Dewald, B.; Clark-Lewis, I., und Baggiolini, M. *Chemokine antagonists that discriminate between interleukin-8 receptors. Selective blockers of CXCR2.* J Biol Chem. 1997 Jun 27; 272(26):16166-9.
59. Kelner, G. S.; Kennedy, J.; Bacon, K. B.; Kleyensteuber, S.; Largaespada, D. A.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Bazan, J. F.; Moore, K. W.; Schall, T. J., und et, a. I. *Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine.* Science. 1994 Nov 25; 266(5189):1395-9.

60. Khachigian, L. M.; Collins, T., und Fries, J. W. *N-acetyl cysteine blocks mesangial VCAM-1 and NF-kappa B expression in vivo*. Am J Pathol. 1997 Nov; 151(5):1225-9.
61. Khachigian LM, Collins T, Fries JW. *Nuclear factor-kappa B mediates induction of vascular cell adhesion molecule-1 in glomerular mesangial cells*. Biochem Biophys Res Commun. 1995 Jan 17; 206(2):462-7.
62. Kashgarian M, Sterzel RB. *The pathobiology of the mesangium*. Kidney Int. 1992 Mar;41(3):524-9.
63. Kluth, D. C.; Erwig, L. P.; Pearce, W. P., und Rees, A. J. *Gene transfer into inflamed glomeruli using macrophages transfected with adenovirus*. Gene Ther. 2000 Feb; 7(3):263-70.
64. Koj, A. *Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines*. Biochim Biophys Acta. 1996 Nov 15; 1317(2):84-94.
65. Kukreti, S.; Konstantopoulos, K.; Smith, C. W., und McIntire, L. V. *Molecular mechanisms of monocyte adhesion to interleukin-1beta- stimulated endothelial cells under physiologic flow conditions*. Blood. 1997 Jun 1; 89(11):4104-11.
66. Kusner, D. J.; Luebbers, E. L.; Nowinski, R. J.; Konieczkowski, M.; King, C. H., und Sedor, J. R. *Cytokine- and LPS-induced synthesis of interleukin-8 from human mesangial cells*. Kidney Int. 1991 Jun; 39(6):1240-8.
67. Laulajainen, T.; Julkunen, I.; Haltia, A.; Knuutila, S.; Miettinen, A., und Holthofer, H. *Establishment and characterization of a rat glomerular endothelial cell line*. Lab Invest. 1993 Aug; 69(2):183-92.
68. Lawrence, M. B. und Springer, T. A. *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins*. Cell. 1991 May 31; 65(5):859-73.
69. Lefkowitz, J. B. *Leukocyte migration in immune complex glomerulonephritis: role of adhesion receptors*. Kidney Int. 1997 May; 51(5):1469-75.
70. Leibovich, S. J. und Ross, R. *The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum*. Am J Pathol. 1975 Jan; 78(1):71-100.
71. Leonhardt, H. *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme Verlag, 8. Auflage 1990, S. 469
72. Luster, A. D. *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med. 1998 Feb 12; 338(7):436-45.
73. Mackay, C. R. *Chemokines: what chemokine is that?* Curr Biol. 1997 Jun 1; 7(6):R384-6.
74. Massy, Z. A.; Guijarro, C.; O'Donnell, M. P.; Kim, Y.; Kashtan, C. E.; Egido, J.; Kasiske, B. L., und Keane, W. F. *The central role of nuclear factor-kappa B in mesangial cell activation*. Kidney Int Suppl. 1999 Jul; 71:S76-9.
75. McEver, R. P.; Moore, K. L., und Cummings, R. D. *Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions*. J Biol Chem. 1995 May 12; 270(19):11025-8.
76. McTigue, D. M.; Tani, M.; Krivacic, K.; Chernosky, A.; Kelner, G. S.; Maciejewski, D.; Maki, R.; Ransohoff, R. M., und Stokes, B. T. *Selective chemokine mRNA accumulation in the rat spinal cord after contusion injury*. J Neurosci Res. 1998 Aug 1; 53(3):368-76.
77. Mercurio, F. und Manning, A. M. *Multiple signals converging on NF-kappaB*. Curr Opin Cell Biol. 1999 Apr; 11(2):226-32.
78. Moore, B. B.; Keane, M. P.; Addison, C. L.; Arenberg, D. A., und Strieter, R. M. *CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family*. J Investig Med. 1998 Apr; 46(4):113-20.
79. Mould, A. P.; Askari, J. A., und Humphries, M. J. *Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha 5beta 1. I. Specificity of ligand binding is determined by amino acid sequences in the second and third NH2-terminal repeats of the alpha subunit*. J Biol Chem. 2000 Jul 7; 275(27):20324-36.
80. Mulligan, M. S.; Johnson, K. J.; Todd, R. F. 3rd; Issekutz, T. B.; Miyasaka, M.; Tamatani, T.; Smith, C. W.; Anderson, D. C., und Ward, P. A. *Requirements for leukocyte adhesion molecules in nephrotoxic nephritis*. J Clin Invest. 1993 Feb; 91(2):577-87.
81. Nathan, C. und Sporn, M. *Cytokines in context*. J Cell Biol. 1991 Jun; 113(5):981-6.

82. Nelson, P. J. und Krensky, A. M. *Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around, comes around.* Curr Opin Immunol. 1998 Jun; 10(3):265-70.
83. Nelson, P. J.; Ortiz, B. D.; Pattison, J. M., und Krensky, A. M. *Identification of a novel regulatory region critical for expression of the RANTES chemokine in activated T lymphocytes.* J Immunol. 1996 Aug 1; 157(3):1139-48.
84. Neote, K.; DiGregorio, D.; Mak, J. Y.; Horuk, R., und Schall, T. J. *Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor.* Cell. 1993 Feb 12; 72(3):415-25.
85. Newman, K. D.; Dunn, P. F.; Owens, J. W.; Schulick, A. H.; Virmani, R.; Sukhova, G.; Libby, P., und Dichek, D. A. *Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia.* J Clin Invest. 1995 Dec; 96(6):2955-65.
86. Nolasco, F. E.; Cameron, J. S.; Hartley, B.; Coelho, A.; Hildreth, G., und Reuben, R. *Intraglomerular T cells and monocytes in nephritis: study with monoclonal antibodies.* Kidney Int. 1987 May; 31(5):1160-6.
87. Onbe, T.; Kashihara, N.; Yamasaki, Y.; Makino, H., und Ota, Z. *Expression of mRNA's of cytokines and growth factors in experimental glomerulonephritis.* Res Commun Mol Pathol Pharmacol. 1994 Nov; 86(2):131-8.
88. Pai, R.; Bassa, B.; Kirschenbaum, M. A., und Kamanna, V. S. *TNF-alpha stimulates monocyte adhesion to glomerular mesangial cells. The role of intercellular adhesion molecule-1 gene expression and protein kinases.* J Immunol. 1996 Apr 1; 156(7):2571-9.
89. Peled, A.; Grabovsky, V.; Habler, L.; Sandbank, J.; Arenzana-Seisdedos, F.; Petit, I.; Ben-Hur, H.; Lapidot, T., und Alon, R. *The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow.* J Clin Invest. 1999 Nov; 104(9):1199-211.
90. Piali, L.; Weber, C.; LaRosa, G.; Mackay, C. R.; Springer, T. A.; Clark-Lewis, I., und Moser, B. *The chemokine receptor CXCR3 mediates rapid and shear-resistant adhesion-induction of effector T lymphocytes by the chemokines IP10 and Mig.* Eur J Immunol. 1998 Mar; 28(3):961-72.
91. Pober, J. S.; Gimbrone, M. A. Jr; Lapierre, L. A.; Mendrick, D. L.; Fiers, W.; Rothlein, R., und Springer, T. A. *Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon.* J Immunol. 1986 Sep 15; 137(6):1893-6.
92. Read, M. A.; Neish, A. S.; Luscinskas, F. W.; Palombella, V. J.; Maniatis, T., und Collins, T. *The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial- leukocyte adhesion molecule expression.* Immunity. 1995 May; 2(5):493-506.
93. Rot, A. *Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration.* Immunol Today. 1992 Aug; 13(8):291-4.
94. Rovin, B. H. und Phan, L. T. *Chemotactic factors and renal inflammation.* Am J Kidney Dis. 1998 Jun; 31(6):1065-84.
95. Ruiz-Ortega, M.; Bustos, C.; Hernandez-Presa, M. A.; Lorenzo, O.; Plaza, J. J., und Egido, J. *Angiotensin II participates in mononuclear cell recruitment in experimental immune complex nephritis through nuclear factor-kappa B activation and monocyte chemoattractant protein-1 synthesis.* J Immunol. 1998 Jul 1; 161(1):430-9.
96. Rutherford, M. S.; Witsell, A., und Schook, L. B. *Mechanisms generating functionally heterogeneous macrophages: chaos revisited.* J Leukoc Biol. 1993 May; 53(5):602-18.
97. Sakurai, H.; Shigemori, N.; Hisada, Y.; Ishizuka, T.; Kawashima, K., und Sugita, T. *Suppression of NF-kappa B and AP-1 activation by glucocorticoids in experimental glomerulonephritis in rats: molecular mechanisms of anti- nephritic action.* Biochim Biophys Acta. 1997 Dec 31; 1362(2-3):252-62.
98. Sallusto, F.; Mackay, C. R., und Lanzavecchia, A. *Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells.* Science. 1997 Sep 26; 277(5334):2005-7.
99. Schlondorff, D. *Roles of the mesangium in glomerular function.* Kidney Int. 1996 Jun; 49(6):1583-5.

100. Schlondorff, D.; Nelson, P. J.; Luckow, B., und Banas, B. *Chemokines and renal disease*. *Kidney Int.* 1997 Mar; 51(3):610-21.
101. Schreiner, G. F. *The role of the macrophage in glomerular injury*. *Semin Nephrol.* 1991 May; 11(3):268-75.
102. Schroppe, B.; Fischereder, M.; Wiese, P.; Segerer, S.; Huber, S.; Kretzler, M.; Heiss, P.; Sitter, T., und Schlondorff, D. *Expression of glucose transporters in human peritoneal mesothelial cells*. *Kidney Int.* 1998 May; 53(5):1278-87.
103. Segerer, S.; Nelson, P. J., und 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.
104. Springer, T. A. *Adhesion receptors of the immune system*. *Nature.* 1990 Aug 2; 346(6283):425-34.
105. Springer, T. A. *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. *Cell.* 1994 Jan 28; 76(2):301-14.
106. Stehlik, C.; de Martin, R.; Kumabashiri, I.; Schmid, J. A.; Binder, B. R., und Lipp, J. *Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha- induced apoptosis*. *J Exp Med.* 1998 Jul 6; 188(1):211-6.
107. Tanabe, S.; Lu, Z.; Luo, Y.; Quackenbush, E. J.; Berman, M. A.; Collins-Racie, L. A.; Mi, S.; Reilly, C.; Lo, D.; Jacobs, K. A., und Dorf, M. E. *Identification of a new mouse beta-chemokine, thymus-derived chemotactic agent 4, with activity on T lymphocytes and mesangial cells*. *J Immunol.* 1997 Dec 1; 159(11):5671-9.
108. Tomosugi, N. I.; Cashman, S. J.; Hay, H.; Pusey, C. D.; Evans, D. J.; Shaw, A., und Rees, A. J. *Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by bacterial lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and IL-1*. *J Immunol.* 1989 May 1; 142(9):3083-90.
109. Topham, P. S.; Csizmadia, V.; Soler, D.; Hines, D.; Gerard, C. J.; Salant, D. J., und Hancock, W. W. *Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis*. *J Clin Invest.* 1999 Dec; 104(11):1549-57.
110. Traenckner, E. B.; Wilk, S., und Baeuerle, P. A. *A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B*. *EMBO J.* 1994 Nov 15; 13(22):5433-41.
111. Tuckwell, D. S.; Smith, L.; Korda, M.; Askari, J. A.; Santoso, S.; Barnes, M. J.; Farndale, R. W., und Humphries, M. J. *Monoclonal antibodies identify residues 199-216 of the integrin alpha2 vWFA domain as a functionally important region within alpha2beta1*. *Biochem J.* 2000 Sep 1; 350 Pt 2:485-93.
112. Veis, J. H. *An overview of mesangial cell biology*. *Contrib Nephrol.* 1993; 104:115-26.
113. Weber, C.; Aepfelbacher, M.; Haag, H.; Ziegler-Heitbrock, H. W., und Weber, P. C. *Tumor necrosis factor induces enhanced responses to platelet-activating factor and differentiation in human monocytic Mono Mac 6 cells*. *Eur J Immunol.* 1993 Apr; 23(4):852-9.
114. Weber, C.; Alon, R.; Moser, B., und Springer, T. A. *Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis*. *J Cell Biol.* 1996 Aug; 134(4):1063-73.
115. Weber, C.; Erl, W.; Pietsch, A.; Strobel, M.; Ziegler-Heitbrock, H. W., und Weber, P. C. *Antioxidants inhibit monocyte adhesion by suppressing nuclear factor-kappa B mobilization and induction of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells stimulated to generate radicals*. *Arterioscler Thromb.* 1994 Oct; 14(10):1665-73.
116. Weber, C.; Erl, W.; Pietsch, A., und Weber, P. C. *Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells*. *Circulation.* 1995 Apr 1; 91(7):1914-7.
117. Weber, C.; Kitayama, J., und Springer, T. A. *Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 1; 93(20):10939-44.
118. Weber, C. und Springer, T. A. *Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration*. *J Immunol.* 1998 Dec 15; 161(12):6825-34.

119. Weber, K. S.; Draude, G.; Erl, W.; de Martin, R., und Weber, C. *Monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow is inhibited by adenovirus-mediated gene transfer of IkappaB-alpha*. Blood. 1999 Jun 1; 93(11):3685-93.
120. Weber, K. S.; von Hundelshausen, P.; Clark-Lewis, I.; Weber, P. C., und Weber, C. *Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow*. Eur J Immunol. 1999 Feb; 29(2):700-12.
121. Williams, A. F. und Barclay, A. N. *The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition*. Annu Rev Immunol. 1988; 6:381-405.
122. Witt, D. P. und Lander, A. D. *Differential binding of chemokines to glycosaminoglycan subpopulations*. Curr Biol. 1994 May 1; 4(5):394-400.
123. Wolf, G.; Aberle, S.; Thaiss, F.; Nelson, P. J.; Krensky, A. M.; Neilson, E. G., und Stahl, R. A. *TNF alpha induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells*. Kidney Int. 1993 Oct; 44(4):795-804.
124. Wolf, G.; Ziyadeh, F. N.; Thaiss, F.; Tomaszewski, J.; Caron, R. J.; Wenzel, U.; Zahner, G.; Helmchen, U., und Stahl, R. A. *Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor*. J Clin Invest. 1997 Sep 1; 100(5):1047-58.
125. Wrighton, C. J.; Hofer-Warbinek, R.; Moll, T.; Eytner, R.; Bach, F. H., und de Martin, R. *Inhibition of endothelial cell activation by adenovirus-mediated expression of I kappa B alpha, an inhibitor of the transcription factor NF-kappa B*. J Exp Med. 1996 Mar 1; 183(3):1013-22.
126. Wu, X.; Dolecki, G. J., und Lefkowitz, J. B. *GRO chemokines: a transduction, integration, and amplification mechanism in acute renal inflammation*. Am J Physiol. 1995 Aug; 269(2 Pt 2):F248-56.
127. Wu, X.; Dolecki, G. J.; Sherry, B.; Zagorski, J., und Lefkowitz, J. B. *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):3917-24.
128. Yasumoto, K.; Okamoto, S.; Mukaida, N.; Murakami, S.; Mai, M., und Matsushima, K. *Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene*. J Biol Chem. 1992 Nov 5; 267(31):22506-11.
129. Zernecke A, Erl W, Fraemohs L, Lietz M, Weber C. *Suppression of endothelial adhesion molecule up-regulation with cyclopentenone prostaglandins is dissociated from IkappaB-alpha kinase inhibition and cell death induction*. FASEB J. 2003;17:1099-101.
130. Zernecke, A.; Weber, K. S.; Erwig, L. P.; Kluth, D. C.; Schroppel, B.; Rees, A. J., und Weber, C. *Combinatorial model of chemokine involvement in glomerular monocyte recruitment: role of CXC chemokine receptor 2 in infiltration during nephrotoxic nephritis*. J Immunol. 2001 May 1; 166(9):5755-62.
131. Zernecke, A.; Weber, K. S., und Weber, C. *Combined modulation of the mesangial machinery for monocyte recruitment by inhibition of NF-kappaB*. Am J Physiol Cell Physiol. 2001 Dec; 281(6):C1881-8.
132. Zhu, G.; Nicolson, A. G.; Cowley, B. D.; Rosen, S., und Sukhatme, V. P. *In vivo adenovirus-mediated gene transfer into normal and cystic rat kidneys*. Gene Ther. 1996 Apr; 3(4):298-304.
133. Ziegler-Heitbrock, H. W.; Thiel, E.; Futterer, A.; Herzog, V.; Wirtz, A., und Riethmuller, G. *Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes*. Int J Cancer. 1988 Mar 15; 41(3):456-61.
134. Zlotnik, A. und Yoshie, O. *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity. 2000 Feb; 12(2):121-7.
135. Zoja, C.; Wang, J. M.; Bettoni, S.; Sironi, M.; Renzi, D.; Chiaffarino, F.; Abboud, H. E.; Van Damme, J.; Mantovani, A.; Remuzzi, G., und et al. *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.

7. Anhang

7.1. Aktuelle weiterführende Arbeiten

Inhibition der endothelialen Adhäsionsmolekülexpression durch cyclopentenone Prostaglandine

Die zyklopentenone Prostaglandine (cPG) 15-deoxy-Delta^{12,14}-Prostaglandin J₂ (dPGJ₂) und PGA₁ können NF-κB Signalwege auf verschiedenen Stufen inhibieren und die Apoptose von Zellen induzieren. In einer Weiterentwicklung der in der Diskussion dargestellten Thematik wurde der Einfluss von dPGJ₂ und PGA₁ auf die inflammatorische Induktion der endothelialen Adhäsionsmoleküle untersucht. Die Vorbehandlung der endothelialen Zellen mit dPGJ₂ oder PGA₁ inhibierte in niedrigen Konzentrationen dosisabhängig die durch TNF-α induzierte Hochregulation der ICAM-1 und VCAM-1 Expression sowie den monozytären Arrest, aber nicht die Expression des Inhibitor of apoptosis proteins (AP)-1. Nur in hoher Konzentration führten die cPG zu einer Verstärkung des TNF-α induzierten Zelltodes und inhibierten die TNF-α-induzierte IκB-α Kinase (IKK) Aktivierung, die IκB-α Degradation und die NF-κB/ p65 Translokation in den Nukleus. In hoher Konzentration führten cPG weiter zu einer Phosphorylierung von AP-1/c-jun. Die Expression einer IKK-β Mutante (C179A), die nicht mit den cPG interagieren kann, verminderte zwar die Induktion des Zelltodes, inhibierte aber nicht die Hochregulation der CAMs durch cPG. Eine Gelshift- und Reporter-gen-Analyse zeigte, dass cPG in niedriger Konzentration direkt die DNA Bindung von NF-κB und die NF-κB-abhängige Transaktivierung beeinträchtigte. Ein synthetisches Analog von dPGA₁ oder dPGA₂ jedoch war ineffektiv und weist auf die strukturelle Spezifität der cPG hin. Über einer Schwellendosis ist die Suppression der endothelialen CAM Hochregulation durch cPG dissoziiert von der Sensitivierung für den Zelltod und der IKK Inhibition und steht in Verbindung mit der beeinträchtigten NF-κB Bindung. Diese Ergebnisse zeigen Wirkmechanismen der cPG auf, über die die anti-inflammatorischen und proapoptotischen Effekte in endothelialen Zellen vermittelt werden (Zernecke 2003, Erl 2004).

7.2. Danksagungen

Die Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (WE1913/1-2 und GRK 438) unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. med. P. C. Weber für die vielfältigen Arbeitsmöglichkeiten, anregenden Diskussionen im Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten und langjährige Unterstützung.

Prof. Dr. med. C. Weber für die grundlegenden Ideen und Anregungen für diese Arbeit und die umfangreiche Unterstützung und Förderung, die weit über eine Doktorarbeit hinausgingen. Vielen Dank!

Dr. med. K. Weber für die methodische wie technische Betreuung und zahlreichen Ideen bei der Planung und Durchführung der Arbeit, sowie die langjährige persönliche Freundschaft.

Dr. rer. nat. W. Erl für anregende Diskussionen, methodische wie thematische Unterstützung. Vielen Dank auch G. Ostermann, Dr. Jiri Neuzil und A. Schröder.

B. Zimmer, N. Gellert und für umfangreiche technische Hilfestellung.

Meinen Eltern und Geschwistern, M. Witt, P. Weinert, M. Hristov.

7.3 Lebenslauf

Geburtsdaten	7.11.1976, München
Universität	1996, Herbst: Immatrikulation im Fach Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität , München 1998, August: Vorärztliche Prüfung 1999, August: Erstes Staatsexamen 2002, März: Zweites Staatsexamen 2003, April: Drittes Staatsexamen
Famulaturen	Medizinische Poliklinik der LMU München Paracelsus Klinik München
Praktisches Jahr	Harvard Medical School, Boston, USA 2002 (Stipendium der Ludwig-Maximilians-Universität, Harvard-Munich-Alliance for Medical Education). University of Toronto, Toronto, Canada Weill Medical College of Cornell University, New York, USA LMU, München
Wissenschaft	2000: Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, LMU München (Vorstand Prof. Dr. P. C. Weber) 2000, Juni: Forschungsaufenthalt an der University of Aberdeen, Schottland (Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. A. Rees) 2000-2001: Graduiertenkolleg „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft (GRK 438)
Arzt im Praktikum	2003, August: Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum der RWTH, Aachen

7.4 Eigene Publikationen

- Zerneck A, Weber KS, Weber C. *Combined modulation of the mesangial machinery for monocyte recruitment by inhibition of NF-kappaB.* Am J Physiol Cell Physiol. 2001;281:C1881-8.
- Zerneck A, Weber KS, Erwig LP, Kluth DC, Schroppel B, Rees AJ, Weber C. *Combinatorial model of chemokine involvement in glomerular monocyte recruitment: role of CXC chemokine receptor 2 in infiltration during nephrotoxic nephritis.* J Immunol. 2001;166:5755-62.
- Zerneck A, Weber C. *Glomeruläre Verkehrskontrolle - sequentielle Regulation der glomerulären Infiltration mit Monozyten durch spezialisierte Chemokine.* Immunologie Aktuell 2001;2:30-31 (auf Einladung)
- Weber KS, Ostermann G, Zerneck A, Schroder A, Klickstein LB, Weber C. *Dual role of H-Ras in regulation of lymphocyte function antigen-1 activity by stromal cell-derived factor-1alpha: implications for leukocyte transmigration.* Mol Biol Cell. 2001;12:3074-86.
- Neuzil J, Schroder A, von Hundelshausen P, Zerneck A, Weber T, Gellert N, Weber C. *Inhibition of inflammatory endothelial responses by a pathway involving caspase activation and p65 cleavage.* Biochemistry. 2001;40:4686-92.
- Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C. *JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes.* Nat Immunol. 2002;3:151-8.
- Zerneck A, Erl W, Fraemohs L, Lietz M, Weber C. *Suppression of endothelial adhesion molecule up-regulation with cyclopentenone prostaglandins is dissociated from IkappaB-alpha kinase inhibition and cell death induction.* FASEB J. 2003;17:1099-101.
- Erl W, Weber C, Zerneck A, Weber PC. *Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma.* Eur J Immunol. 2004;34:241-50