

Aus der Medizinischen Poliklinik,  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Arbeitsgruppe Klinische Biochemie  
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef Schlöndorff

**Die späte Blockade von CCR1 mit BX471 verbessert die  
Lupusnephritis bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereiches Humanmedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Emilia Belemzova  
aus Dupnitsa, Bulgarien

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. HJ Anders
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. T. Bosch
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. T. Brocker
	Priv. Doz. Dr. med. A. Lebeau

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
--------	-----------------------------

Tag der mündlichen Prüfung:	23.03.2006
-----------------------------	------------

## Inhaltsverzeichnis

<b>VORBEMERKUNGEN</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>Rechtliche Grundlage der Tierversuche</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>Förderung des Projektes</b> .....	<b>- 5 -</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>- 6 -</b>
<b>1 EINFÜHRUNG</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>1.1 Chronische Niereninsuffizienz</b> .....	<b>- 8 -</b>
<b>1.2 Nephroprotektive Therapie</b> .....	<b>- 10 -</b>
<b>1.3 SLE und Lupusnephritis</b> .....	<b>- 11 -</b>
<b>1.4 Mausmodelle der SLE</b> .....	<b>- 14 -</b>
<b>1.5 Immunologie entzündlicher Nierenerkrankungen</b> .....	<b>- 15 -</b>
<b>1.6 Chemokine</b> .....	<b>- 18 -</b>
<b>1.7 Chemokinrezeptoren</b> .....	<b>- 21 -</b>
<b>1.8 Funktion von Chemokinen und deren Rezeptoren</b> .....	<b>- 22 -</b>
<b>1.9 Chemokine und Niere</b> .....	<b>- 23 -</b>
<b>1.10 Therapeutische Aspekte der Chemokin-Signalkette</b> .....	<b>- 25 -</b>
<b>1.11 Chemokinrezeptor CCR1</b> .....	<b>- 28 -</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1 Tierhaltung und tierexperimentelle Methoden</b> .....	<b>31</b>
2.1.1 Tierhaltung.....	31
2.1.2 Studiendesign.....	31
2.1.3 Blutentnahme.....	31
2.1.4 Gewebeentnahme.....	32
<b>2.2 Herstellung der Injektionslösungen</b> .....	<b>32</b>
2.2.1 Vehikel .....	32
2.2.2 BX471.....	32
<b>2.3 Histologische Auswertung</b> .....	<b>32</b>
2.3.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte.....	32
2.3.2 HE-Färbung .....	32
2.3.3 Immunhistologische Färbungen.....	33
2.3.4 Histopathologische Indizes .....	35
<u><b>Aktivitätsindex</b></u> .....	35
<u><b>Chronizitätsindex</b></u> .....	36
<b>2.4 Zelltransferstudien</b> .....	<b>37</b>
2.4.1 Zellisolation .....	37
2.4.2 Fluoreszenzmarkierung.....	39
2.4.3 Injektionsprotokoll.....	39
2.4.4 Präparation von Gefrierschnitten .....	39
<b>2.5 RNA- Analyse</b> .....	<b>39</b>
2.5.1 RNA- Isolation .....	39
2.5.2 Real-time RT-PCR.....	40
2.5.3 RNase-Protection-Assay .....	42
2.5.4 <i>In situ</i> Hybridisierung .....	43
<b>2.6 Biochemische Analysen</b> .....	<b>43</b>
2.6.1 Serumharnstoff .....	43
2.6.2 Proteinurie .....	43
<b>2.7 Analyse der humoralen Immunität</b> .....	<b>44</b>

2.7.1	DNA- Autoantikörper im Serum .....	44
2.7.2	Glomeruläre Immunkomplex-Ablagerungen .....	44
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>45</b>
<b>2.9</b>	<b>Lösungen und Reagenzien.....</b>	<b>- 46 -</b>
2.9.1	Chemikalien.....	- 46 -
2.9.2	Lösungen .....	- 48 -
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>3.1</b>	<b>Nierenfunktion .....</b>	<b>- 49 -</b>
<b>3.2</b>	<b>Glomeruläre Schädigung.....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>3.3</b>	<b>Tubulointerstitielle Schädigung .....</b>	<b>- 51 -</b>
3.3.1	<u>Tubulointerstitielle Fibrose.....</u>	- 51 -
3.3.2	<u>Leukozyten-Infiltration.....</u>	- 53 -
3.3.3	<u>Renale Expression von Chemokinen .....</u>	- 55 -
3.3.4	<u>Zellumsatz .....</u>	- 56 -
<b>3.4</b>	<b>Mechanismen der Auswirkung der CCR1 Blockade .....</b>	<b>- 57 -</b>
3.4.1	Die renale CCR1 Expression in MRL <sup>lpr/lpr</sup> Mäusen stammt von den infiltrierenden Leukozyten .....	- 57 -
3.4.2	BX471 wirkt über Verminderung der Infiltration zirkulierender Leukozyten ins Tubulointerstitium....	- 58 -
3.4.3	Die Reduktion der interstitiellen Leukozyten-Infiltrate korreliert mit einer verminderten TGFβ1 Expression .....	- 59 -
<b>3.5</b>	<b>Systemische Immunreaktion .....</b>	<b>- 60 -</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>- 62 -</b>
<b>4.1</b>	<b>CCR1 Blockade reduziert die tubulointerstitielle Fibrose mittels Abnahme der interstitiellen Leukozyten-Infiltration .....</b>	<b>- 62 -</b>
<b>4.2</b>	<b>CCR1 Blockade verbessert die Nierenfunktion .....</b>	<b>- 66 -</b>
<b>4.3</b>	<b>BX471 hat keinen Einfluss auf die glomeruläre Schädigung.....</b>	<b>- 69 -</b>
<b>4.4</b>	<b>BX471 beeinflusst die Autoantikörperproduktion beim SLE nicht.....</b>	<b>- 70 -</b>
<b>5</b>	<b>KLINISCHE BEDEUTUNG.....</b>	<b>- 71 -</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>- 72 -</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>- 78 -</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>- 80 -</b>
	<b><u>LEBENS LAUF .....</u></b>	<b>- 80 -</b>

## **Vorbemerkungen**

Die vorliegende Arbeit wurde von August 2002 bis Mai 2004 in den Forschungslabors der Medizinischen Poliklinik unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Detlef Schlöndorff der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

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

## **Rechtliche Grundlage der Tierversuche**

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

Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuchsvorhaben waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

## **Förderung des Projektes**

Diese Arbeit wurde von der Wilhelm-Sander-Stiftung, der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Deutschen Akademischen Austauschdienstes gefördert.

## Zusammenfassung

Die ansteigende Inzidenz und Prävalenz chronischer progressiver Nephropathien stellt weltweit ein gesundheitliches, aber auch sozioökonomisches Problem dar. Entscheidende Rolle für die Persistenz und Progredienz der renalen Schädigung wird den tubulointerstitiellen Veränderungen zugesprochen, charakterisiert durch tubuläre Atrophie, Fibrose und Leukozyten-Infiltrate. Die infiltrierenden Leukozyten sind eine wichtige Quelle proinflammatorischer und profibrotischer Substanzen. Deren Migration ins entzündete Gewebe unterliegt einer feinen Regulation durch lokal freigesetzte **chemotaktische Zytokine** (Chemokine).

Bisherige Daten deuten auf eine wichtige Rolle vom Chemokinrezeptor CCR1 bei der Leukozyten-Infiltration. Daraufhin wurde am Modell einer progressiven Nierenerkrankung die Hypothese untersucht, ob eine Blockade von CCR1 mittels Reduktion der Leukozyten-Infiltration die renale Schädigung lindern könnte.

Die Lupusnephritis ist eine Immunkomplex-Glomerulonephritis. Sie verläuft oft chronisch progredient und weist sekundäre tubulointerstitielle Beteiligung auf. Als Tiermodell dieser Erkrankung wurden MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse verwendet. Infolge einer Mutation im Fas-Gen wird bei diesen Mäusen der Apoptose-Prozess gestört. Daraus resultiert eine lymphoproliferative Störung. Die entwickelten pathologischen Läsionen sind denen, die beim humanen Lupus erythematodes gefunden werden, ähnlich.

Weibliche MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse wurden im Alter von 20 Wochen (d.h. im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung) in 2 Gruppen eingeteilt. Denen wurde über 4 Wochen jeweils:

- das Vehikel (40%-ige Cyclodextrin- Lösung), oder
- der niedermolekulare CCR1 Antagonist BX471 (50mg/kgKG)

alle 8 Stunden subkutan verabreicht.

Bei den mit BX471 behandelten Tieren zeigte die immunhistologische Färbung eine signifikante Abnahme, im Vergleich zur Kontrollgruppe, der Anzahl infiltrierender ERHR3 positiver Makrophagen und CD3 positiver Lymphozyten im Interstitium. Die Verringerung der Leukozyten-Infiltrate war mit einer geringeren Expression der Chemokine CCL2, 4, 5 und deren Rezeptoren in der Niere assoziiert. Um die Ursache für die Reduktion der Infiltrate festzustellen, wurden Zelltransferstudien durchgeführt. Fluoreszenzmarkierte, CD8 positive Lymphozyten oder ERHR3 positive Makrophagen, die entweder mit dem Vehikel oder mit BX471 ex vivo vorbehandelt waren, wurden 20 Wochen alten MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen i.v. injiziert. Die mit BX471 präinkubierten Zellen infiltrierten deutlich weniger in der Niere. Somit konnte die nach CCR1 Blockade verringerte Leukozyten-Infiltration auf eine verminderte Rekrutierung zirkulierender Zellen zurückgeführt werden.

Interessanterweise blieb die Zahl der glomerulären Makrophagen unbeeinflusst von der BX471 Behandlung. Dies lässt auf eine kompartimentspezifische Rolle von CCR1 für die Leukozyten-Infiltration zurückschließen.

Der Rückgang der interstitiellen Infiltrate ging mit einer geringeren Schädigung des tubulointerstitiellen Kompartiments einher. Das Fibrose-Ausmass wurde anhand der Expression von Kollagen I erwiesen. Verminderung des Kollagen I, in der mit BX471 behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, wurde einerseits auf der Proteinebene durch immunhistologische Färbung, andererseits auf der mRNA-Ebene durch quantitative *real time RT-PCR* ausgewiesen. Die SMA Proteinexpression und die TGF $\beta$ -mRNA Expression, als Marker des aktiven Fibrose-Prozesses, waren auch vermindert nach CCR1 Blockade. Der Chronizität-Index, dessen Parameter wichtige Merkmale der tubulointerstitiellen Fibrose sind, war signifikant reduziert in der mit BX471 behandelten Gruppe.

Das Nachlassen der tubulointerstitiellen Strukturveränderungen verbesserte die Nierenfunktion, erkennbar am herabgesetzten Serumharnstoff nach CCR1 Blockade.

Die Proteinurie und die systemische Immunreaktion blieben in beiden Gruppen gleich. Zusammen mit der unveränderten glomerulären Leukozyten-Infiltration akzentuiert dies die entscheidende Bedeutung der tubulointerstitiellen Veränderungen für die Progression der renalen Erkrankung.

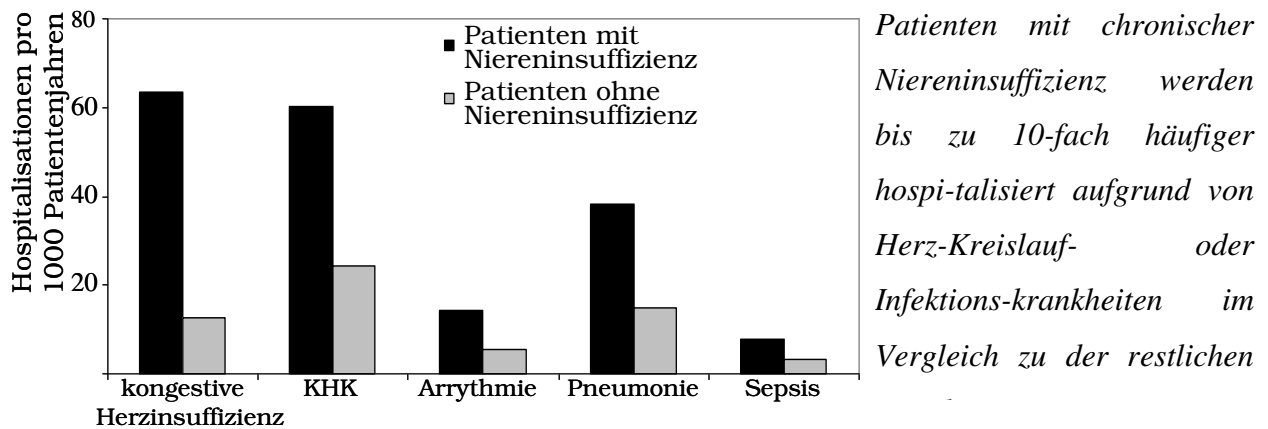
Demnach vermittelt CCR1 selektiv die interstitielle, nicht aber die glomeruläre Leukozyten-Infiltration, bei der Nephritis in MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen. Eine spät begonnene Behandlung mit dem CCR1-Antagonisten BX471 reduziert die renale Schädigung und verbessert die Nierenfunktion bei diesem Modell. Dies geschieht infolge einer eingeschränkten Rekrutierung zirkulierender Leukozyten. Die interstitiellen Infiltrate und die tubulointerstitielle Fibrose sind jedoch ein charakteristisches Merkmal chronischer renaler Erkrankungen und prognostisch wichtiger Parameter fürs Fortschreiten zur terminalen Niereninsuffizienz. Die CCR1 Blockade könnte sich daher bei der Lupusnephritis, aber auch bei anderen progredienten Nierenerkrankungen, als wirksam erweisen.

# 1 Einführung

## 1.1 Chronische Niereninsuffizienz

Die Inzidenz und Prävalenz chronischer Nierenerkrankungen sind in den letzten 20 Jahren weltweit stark angestiegen (117, 154). Epidemiologische Studien zeigen, dass Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion eine bis zu zehnfach höhere Morbidität und Mortalität an Herz-Kreislauf- und Infektionskrankheiten im Vergleich zu der restlichen Population aufweisen (154).

**Abbildung 1.1: Morbidität infolge kardiovaskulärer und infektiöser Erkrankungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz vs Patienten mit normaler Nierenfunktion (154)**

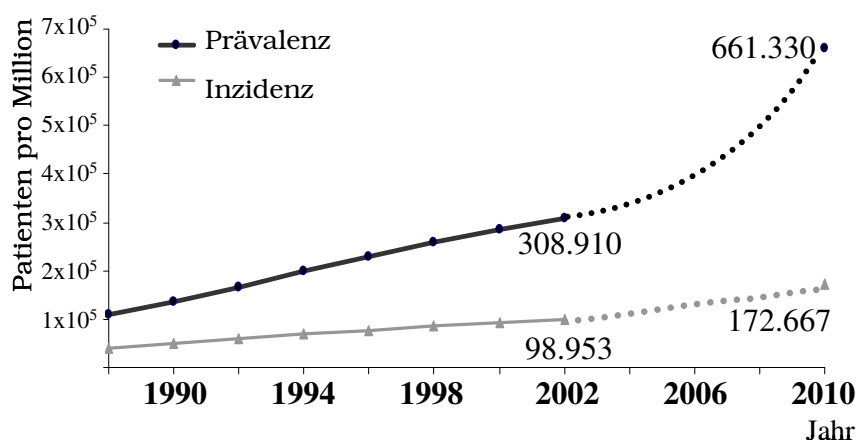


Somit entsteht ein gesellschaftliches Problem mit gewaltigen Dimensionen, verbunden einerseits mit psychosozialer Belastung und Abnahme der Lebensqualität für die Patienten und deren Familien, andererseits aber auch mit erheblichen Kosten. So liegen z.B. die jährlichen Ausgaben für die Nierenersatztherapie eines dialysepflichtigen Patienten bei ca. 44.000€. Kostengünstiger, jedoch nicht beliebig verfügbar, ist die Nierentransplantation mit ca. 18.000€ jährlich (103).

Laut extrapolierte Daten vom *US Renal Data System (USRDS)* wird die Prävalenz der Patienten mit terminalem Nierenversagen in den USA, im Jahre 2010, auf ca. 660 000 / Million ansteigen. Die damit verbundenen Kosten werden sich entsprechend multiplizieren (119). Die Gründe für die ansteigende Zahl dieser Patienten liegen darin, dass der größte Anteil chronischer Nierenerkrankungen derzeit der diabetischen Nephropathie zuzuordnen ist. Infolge weltweiter Alterung der Bevölkerung und ansteigender Anzahl übergewichtiger, körperlich inaktiver Menschen, wird die Anzahl der Diabetes-Patienten zukünftig weiterhin zunehmen (74).



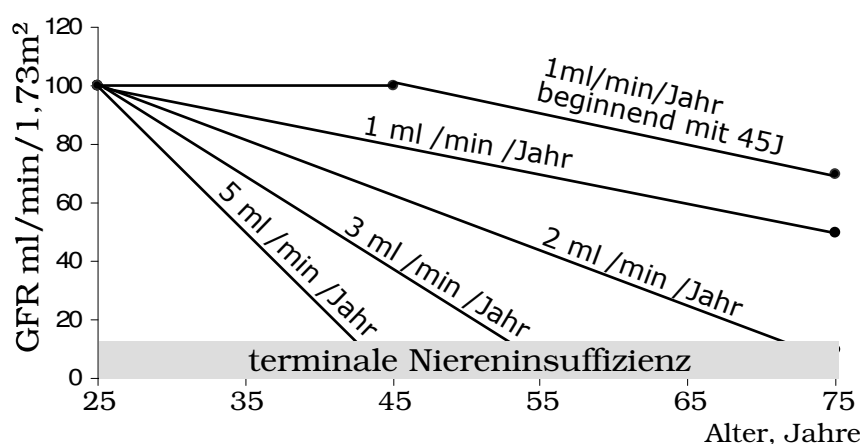
**Abbildung 1.2: Inzidenz und Prävalenz der terminalen Niereninsuffizienz in USA (154)**



Laut extrapolierter Daten vom US Renal Data System, wird die Prävalenz der Patienten mit terminalem Nierenversagen in den USA, im Jahre 2010, auf circa 660.000/Million ansteige; die Inzidenz auf ca. 170.000/Million.

Daher ist die Entwicklung geeigneter Therapiemöglichkeiten zur Erhaltung der Nierenfunktion dringend erforderlich. Die Prämisse dafür sind Erkenntnisse bezüglich der Mechanismen und Faktoren, welche die Progression der primären renalen Schädigung zur terminalen Niereninsuffizienz beeinflussen. Dabei ist hervorzuheben, dass chronische progrediente Nephropathien, ungeachtet derer Ätiologie, einen ähnlichen Verlauf aufweisen und evtl. auch von einer einheitlichen Therapie profitieren könnten. Dazu schreitet der Verlust der Nierenfunktion in der Regel langsam fort, so dass eine vermeintlich geringfügige Verlangsamung der Progredienz zur beträchtlichen Änderung der Langzeitprognose führt (61).

**Abbildung 1.3: Abnahme der GFR bei chronischen Nierenerkrankungen (61)**



Die oberste Kurve zeigt die physiologische Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) im Alter. Ein beschleunigter Funktionsverlust resultiert in terminale Niereninsuffizienz im jüngeren Alter, wobei kleine Unterschiede in der Verlustrate zur beträchtlichen Änderung der Langzeitprognose führen.

## 1.2 Nephroprotektive Therapie

Aufschlussreiche Einsichten in die Mechanismen, die den Nierenfunktionsverlust beschleunigen, sind in den letzten Jahrzehnten gewonnen worden. Daraufhin sind nephroprotektive Therapiestrategien und entsprechende Leitlinien für deren Anwendung entwickelt worden. Diese zielen auf Prävention der negativen Folgen chronischer Nierenleiden ab (insbesondere der terminalen Niereninsuffizienz, der kardiovaskulären Erkrankungen und des vorzeitigen Todes). Als Zielgruppe haben sie nicht nur Patienten, die eine Nierenerkrankung bereits haben (die sog *very high risk* Patienten). Auch Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen oder genetischer Dispositionen einem höheren Risiko der normalen Population gegenüber ausgesetzt sind (*high-risk* Patienten), werden einbezogen (61).

Derzeit haben sich 4 Ansätze als nephroprotektiv bewährt (61):

☞ Gabe von ACE-Inhibitoren oder AT-R-Blocker (Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Blocker) - Angiotensin II kann die renale Schädigung auf verschiedener Weise fördern: durch Induktion einer glomerulären Hypertension und Hypertrophie; durch Hochregulation der Expression mitogener und profibrotischer Substanzen (PDGF, TGF $\beta$ , ET1); durch Aktivierung von NF-kB abhängige proinflammatorische Signalwege in der Zelle; durch einen erhöhten Oxidationsstress (145).

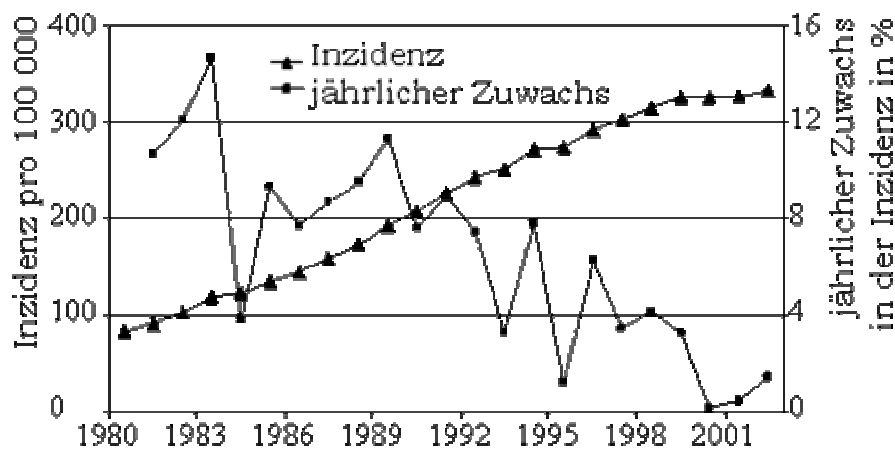
☞ optimale Blutdruckeinstellung, mit systolischem Blutdruck möglichst unter 120mmHg- die systemische Hypertonie wirkt über die Induktion arteriöler Nephrosklerose, Förderung der Proteinurie sowie eine dehnungsinduzierte Gewebefibrosierung.

☞ bestmögliche Blutzuckereinstellung- außer der diabetischen Komplikationen, verursacht die hohe Zuckerkonzentration im Urin gesteigerte Zytokin-Produktion in den Tubulusepithelzellen

☞ Einschränkung der täglichen Eiweißaufnahme unter 0,7-0,8 g/kg Idealkörpergewicht – Maßnahme, die zusammen mit der Gabe von ACE-Inhibitoren, eine Abnahme der Proteinurie verfolgt. Das proteinurische Ultrafiltrat enthält Komplement, inflammatorische Lipoproteine, Eisen-Ionen usw., die toxisch auf die Tubuluszellen wirken und die Produktion proinflammatorischer Substanzen in Gang setzen.

Weniger bewiesen hinsichtlich ihrer renoprotektiven Wirkung, aber auch empfohlen, sind: die Kontrolle der Blutfette, die zu Atherosklerose und Filtration oxidierter aggressiver Lipoproteine im Urin führen; die Therapie der renalen Anämie, verbunden mit lokaler Hypoxie; die Einstellung vom Rauchen, mit Oxidationsstress einhergehend; eine mäßige Flüssigkeitseinnahme, gegen den erhöhten Druck in den Tubuli gerichtet, mit Diurese weniger als 2,0l/24h (61).

Die konsequente Anwendung solcher Therapiemaßnahmen hat dazu geführt, dass der jährliche Zuwachs (jährliche Inzidenz im Vergleich zum jeweils vorausgehenden Jahr) an neuen Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz laut USRDS in den letzten Jahren relativ stabil geblieben ist, im Bereich von 0,4 bis 1,4%,. Im 1983 betrug dieser Wert ca. 15% (154).

**Abbildung 1.4: Inzidenz vs jährlichen Zuwachs der terminalen Niereninsuffizienz (154)**

*Obwohl die Gesamtinzidenz der terminalen Niereninsuffizienz stetig ansteigt, hat sich der jährliche Zuwachs in den letzten Jahren auf einem Niveau von 0,5-2,0% stabilisiert*

Der Nutzen dieser Strategien ist jedoch am besten für frühe Stadien der renalen Schädigung belegt. Diese entziehen sich oft der Diagnose. Die Entwicklung neuer, auch im fortgeschrittenen Stadium wirksamer Therapien ist daher unentbehrlich.

### 1.3 SLE und Lupusnephritis

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung aus dem Formenkreis der entzündlichen Bindegewebserkrankungen. Die Prävalenz wird in der Literatur für Europa mit 50 pro 100.000 Einwohner angegeben, die jährliche Inzidenz mit 5 bis 10 pro 100.000 Einwohnern (64). Die Patienten sind meistens Frauen im gebärfähigen Alter.

Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht genau bekannt (17). Genetische Faktoren (z.B. HLA-DR2, HLA-DR3), Umweltfaktoren und Sexualhormone beeinflussen sowohl das Auftreten der Krankheit als auch den Krankheitsverlauf. Hauptmerkmal ist die polyklonale Autoantikörperproduktion (vor allem gegen Bestandteile des Zellkerns gerichtet). Diese unangebrachte Immunreaktion könnte einer genetischen und/oder einer durch externe Antigene bedingten Hyperaktivität der B-Zellen unterliegen. Auch ein Versagen der Mechanismen der Immuntoleranz, die Autoaggression zu unterdrücken, wird als mögliche Ursache in Betracht gezogen.

Zirkulierende Immunkomplexe lagern sich in die Wand der kleinen Gefäße verschiedener Organe ab und triggern dadurch eine entzündliche Reaktion mit Komplementaktivierung und Leukozyten-Infiltration. Zytotoxische Antikörper vermitteln die autoimmunhämolytische Anämie und Thrombozytopenie. Sie können aber auch die Funktion anderer Zellen beeinträchtigen (bei neuropsychiatrischen SLE Patienten z.B. findet man antineuronale Antikörper).

Eine Besonderheit vom SLE ist der schubweise Verlauf mit unvorhersehbaren Exazerbationen und Remissionen.

Klinisch werden oft Gelenke, Haut, Nieren, Gehirn, Serosa, Lunge und Herz betroffen. Pathologisches Substrat sind ausgedehnte vaskuläre Läsionen mit Immunkomplex-Ablagerungen in der Gefäßwand.

Der Gesundheitszustand der SLE Patienten ist vom Ausmaß der Organbeteiligung und der Medikamentennebenwirkungen abhängig. Zentrale Bedeutung unter den betroffenen Organen hat die renale Schädigung. Diese kommt in ca. 70-100% vor (27, 112) und geht mit einer ungünstigen Prognose bei schwerem Verlauf einher (171, 72).

In letzter Zeit werden die interstitiellen Veränderungen im Rahmen der Lupusnephritis immer mehr beachtet und des Voranschreitens der renalen Schädigung beschuldigt (39). Ein günstiger Verlauf der Nephritis ist laut Studien dann zu erwarten, wenn ein niedriger Chronizität-Index, der hauptsächlich von den interstitiellen Veränderungen abhängig ist, vorliegt (8), oder wenn die Anzahl interstitieller Makrophagen in der Nierenbiopsie gering ist (66). Die neue Klassifikation der Lupusnephritis, vorgeschlagen von der internationalen Gesellschaft für Nephrologie und der Gesellschaft für renale Pathologie, empfiehlt, dass bei der Angabe der Diagnose, zusätzlich zu den glomerulären Veränderungen, auch die Veränderungen im Tubulointerstitium und die vaskulären Läsionen beurteilt werden (167).

**Tabelle 1.1: Klassifikation der Lupusnephritis, Internationale Gesellschaft für Nephrologie und Gesellschaft für renale Pathologie (ISN/RPS) 2003 (167)**

<b>Klasse</b>	<b>Glomeruläre Läsionen</b>	
Klasse I	minimale mesangiale Lupusnephritis	normale Glomeruli in der Lichtmikroskopie mit mesangialen Immunablagerungen in der Immunfluoreszenz
Klasse II	mesangiale proliferative Lupusnephritis	nur mesangiale Hyperzellularität oder mesangiale Matrixexpansion in der Lichtmikroskopie mit mesangialen Immunablagerungen
Klasse III	fokale Lupusnephritis	aktive oder inaktive fokale, (segmentale oder globale) endo- oder extrakapilläre GNF, <50% der Glomeruli betreffend, typischerweise mit subendothelialen Immunablagerungen
Klasse IV	diffuse Lupusnephritis	aktive oder inaktive diffuse, (segmentale oder globale) endo- oder extrakapilläre GNF, >50% der Glomeruli betreffend, mit diffusen subendothelialen Immunablagerungen
Klasse V	membranöse Lupusnephritis	globale oder segmentale subepitheliale Immunablagerungen
Klasse VI	fortgeschrittene sklerosierende Lupusnephritis	>90% der Glomeruli global sklerosiert

Die derzeit zur Verfügung stehenden Möglichkeiten zur Therapie der Lupusnephritis implizieren einerseits die bereits genannten allgemeinen nephroprotektiven Maßnahmen, andererseits die Immunsuppression. Indikation für eine immunsuppressive Therapie bei der Lupusnephritis ergibt sich bei zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion, bei nephritischem Sediment oder zunehmender Proteinurie, bei ansteigendem Titer der Anti-DNA Antikörper oder abfallenden Komplementfaktoren (112).

Zur Immunsuppression werden folgende Medikamente angewandt: Kortikosteroide, Cyclophosphamid, Mycophenolat Mofetil, Azathioprin (14, 112).

Die *Kortikosteroide* haben sich in der Therapie der SLE aufgrund ihrer Effektivität sowohl in der Initialphase als auch zur Remissionserhaltung bewährt. Insbesondere bei der aktiven Nephritis macht man sich den schnellen Wirkungseintritt zunutze, da die Wirkung zytotoxischer Medikamente mit einer Verzögerung von bis zu 3 Monaten einsetzt. Jedoch wird bei langfristiger Monotherapie mit Steroiden häufiger ein Anstieg des Chronizitäts-Index und eine Verschlechterung der Nierenfunktion beobachtet, im Vergleich zu der Kombination Steroid/zytotoxische Therapie. Zu den zahlreichen Nebenwirkungen der Kortisontherapie gehören: erhöhte Infektanfälligkeit, Osteoporose, schwer einstellbarer Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Cushing-Syndrom, ausgeprägte Atherosklerose.

*Cyclophosphamid* ist das wirksamste unter den zytotoxischen Medikamenten. In Kombination mit Steroiden ist dieses Medikament die Therapie der Wahl beim schweren Verlauf der Erkrankung. Knochenmarksuppression, Gonadentoxizität mit Infertilität, Infektanfälligkeit, hämorrhagische Zystitis, Alopezie sind als Nebenwirkungen beschrieben und werden gefürchtet.

*Mycophenolat Mofetil* gilt als Therapieoption für mildere Formen der Lupusnephritis sowie für Remissionserhaltung (46).

*Azathioprin* hat aufgrund eines günstigeren Nebenwirkungsprofils (Übelkeit und Erbrechen, Transaminasen-Anstieg, Zytopenie) seine Bedeutung bei der Remissionserhaltung sowie bei Cyclophosphamid-Unverträglichkeit.

Die *Intravenöse Immunglobulin-Therapie* ist ein experimenteller Ansatz, der eine teure Alternative zur Remissionserhaltung bei Patienten mit Unverträglichkeiten gegen zytotoxische Substanzen sein könnte (22)

Bei Patienten mit therapierefraktärem SLE gibt es in Rahmen von Studien die Möglichkeit für *immunablative Therapie* mit oder ohne autologer Stammzelltransplantation (151).

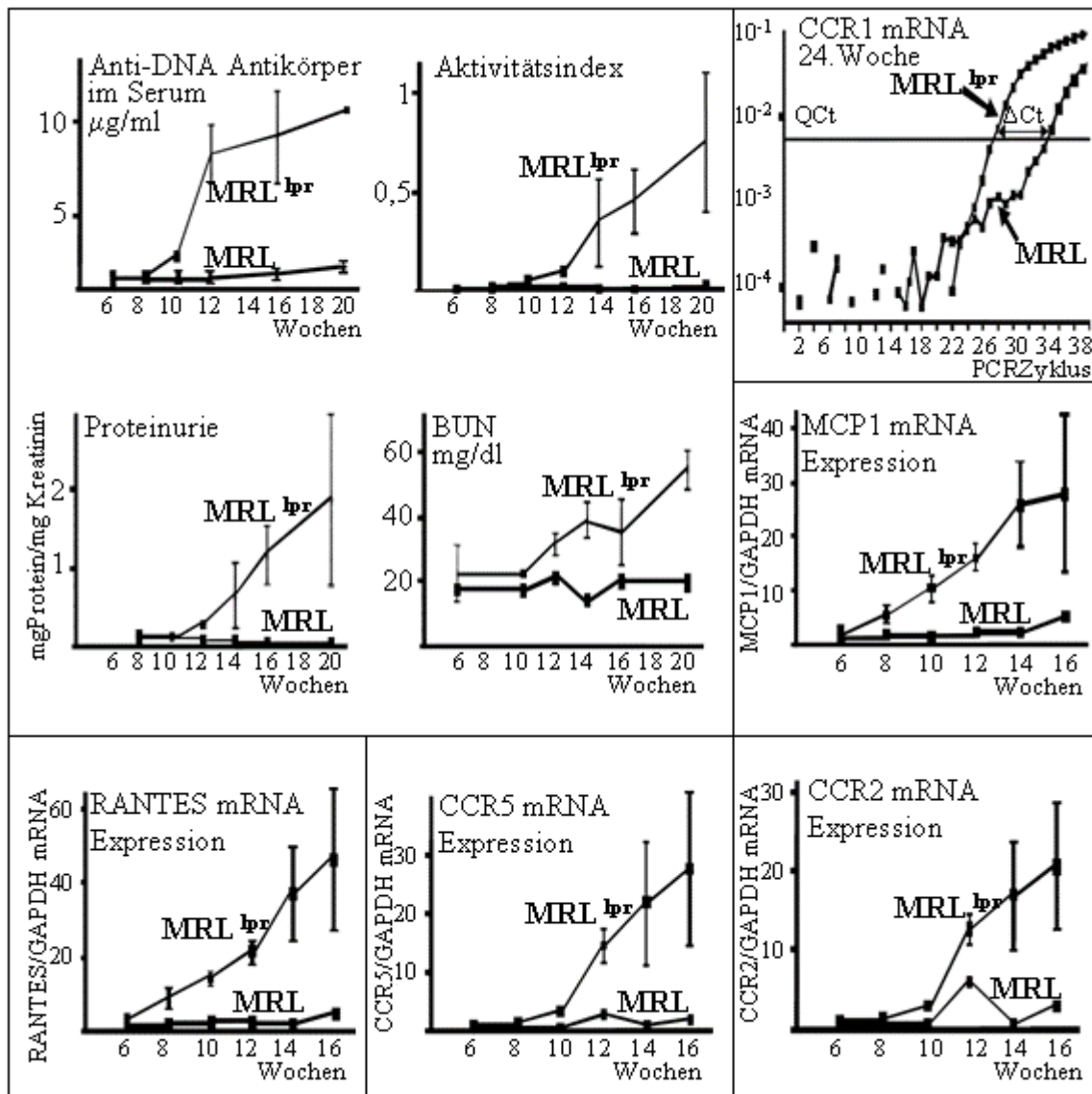
Das nebenwirkungsreiche Profil der Behandlung, insbesondere angesichts der meist jungen Patientinnen, ist unerwünscht und gibt Anlass für die Suche nach neuen Therapieoptionen.

Eingehende Kenntnisse von den subtilen Mechanismen, welche die renale Entzündung dirigieren, ist die Voraussetzung für die zukünftige Entwicklung gut wirksamer und dennoch selektiver und verträglicher Therapieoptionen.

### 1.4 Mausmodelle der SLE

Die am häufigsten benutzten Mausmodelle vom SLE sind die NZB/NZW und die MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse. Der MRL<sup>lpr/lpr</sup> Stamm ist durch Kreuzung von LG/J Mäusen mit AKR/J, C57BL/6 und den C3HdI Mäusen hergeleitet worden (96). Dieser Stamm hat eine Mutation im Fas-Gen (das lpr-Gen), was auf ein defektes Fas-Molekül mit gestörter Fas-mediiertes Apoptose hinausläuft (164).

**Abbildung 1.5: Verlauf der Erkrankung bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen (113)** - MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse entwickeln polyklonale B-Zell Aktivierung mit Hypergammaglobulinämie. Anti-dsDNA-Autoantikörper und Hypokomplementämie sind mit 12-16 Wochen nachweisbar. Klinische Symptome der Arthritis, der massiven Lymphadenopathie, der Splenomegalie, Vaskulitis und Immunkomplex-Glomerulonephritis treten im Alter von 16 Wochen auf. Eine gesteigerte Chemokin Expression (CCL2/MCP1, CCL5/RANTES, CCL4/MIP1 $\beta$ , CXCL10/IP10) ist jedoch noch in der 8. Woche zu finden. Die Chemokinrezeptorexpression (CCR1,2,5), steigt ab der 10-12. Woche an.



Da die Apoptose essentiell für die Beseitigung aktivierter Lymphozyten ist, führt der lpr- Defekt zu einer übermäßigen Lymphozyten-Proliferation, Produktion von IgG gegen viele Autoantigene, inklusive DNA und Kernproteine und folglich zur Immunkomplex-Vaskulitis und Glomerulonephritis. 50% der Mäuse sterben bis zum Alter von 24 Wochen. Der Wildtyp (ohne Fas-Mutation) entwickelt auch Autoimmunsyndrom, jedoch beginnt dieses später im Leben und die Mäuse sterben an Glomerulonephritis erst mit 24 Monaten. Die MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse haben schließlich eine genetische Prädisposition zu Autoimmunreaktionen, die durch die defekte Apoptose wesentlich verstärkt wird. Die Ablagerung von Immunkomplexen bei den MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen beginnt im Alter von 10-12 Wochen. Die histologischen Veränderungen im Sinne einer progredienten Glomerulonephritis mit Nekrosen, interstitieller Leukozyten-Infiltration, Halbmondbildung, Tubulusatrophie und interstitieller Fibrose zeigen sich ab der 12-14-<sup>ten</sup> Woche (113).

## 1.5 Immunologie entzündlicher Nierenerkrankungen

Akute Nierenschädigungen bilden sich in der Regel vollständig zurück. Chronische Nephropathien münden hingegen, nach unterschiedlich intensiv avancierendem Nierenfunktionsverlust, fast immer in die terminale Niereninsuffizienz. Dabei spielen sich die für die Progression ausschlaggebenden immunologischen Interaktionen im tubulointerstitiellen Kompartiment ab. Veranschaulichend wird der Verlauf renaler Erkrankungen in Phasen eingeteilt (4).

Initiationsphase: Die primäre Schädigung renaler Parenchymzellen (z.B. durch Immunkomplexe, Toxine, Hypoxie) stimuliert diese zur Sekretion proinflammatorischer Mediatoren. Folge ist die Infiltration und Aktivierung zirkulierender Leukozyten in der Niere. Dabei ist die Rekrutierung entzündlicher Zellen weitgehend auf das geschädigte Kompartiment begrenzt. Bestimmte Zellsubpopulationen infiltrieren des Weiteren selektiv nur umschriebene Bereiche des Parenchyms: während T-Lymphozyten in interstitiellen Infiltraten üblich sind, sind sie, solange die Bowmann'sche Kapsel intakt ist, kaum in den Glomeruli nachweisbar (138); Makrophagen kommen dagegen oft bei proliferativen Glomerulonephritiden in den Glomeruli vor. Diese Kompartimentsselektivität beruht vermutlich auf einer unterschiedlichen Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in den glomerulären und den peritubulären Kapillaren. Auch kompartimentspezifische Besonderheiten der Mikrozirkulation könnten eines solchen Phänomens zugrunde liegen.

Amplifikationsphase: Die infiltrierenden Leukozyten proliferieren und produzieren weitere proinflammatorische und profibrotische Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren (FGF, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , PDGF) und sezernieren selbst extrazelluläre Matrixkomponente. Sie sondern aber auch Sauerstoffradikale und zelltoxische Moleküle ab (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ). Über eine anhaltende Parenchymschädigung wird somit ein positiver Rückkopplungsmechanismus aufrechterhalten und die primäre Schädigung um das Vielfache verstärkt. Im glomerulären Kompartiment wird dabei die Proliferation mesangialer Zellen und die Expansion der mesangialen Matrix provoziert, die zum charakteristischen Bild der mesangioproliferativen Glomerulonephritis führen (38). Die Aktivierung von

Podozyten geht mit einer Veränderung der Architektur der glomerulären Basalmembran, mit Proteinurie und fokalen Adhäsionen zwischen der Basalmembran und der Bowmann'schen Kapsel einher (4). Interessanterweise führen primäre Glomerulopathien oft zu einer sekundären interstitiellen Leukozyten-Infiltration. Als möglicher Mechanismus dafür wird das Eindringen proinflammatorischer Substanzen ins Ultrafiltrat gesehen. Dadurch werden Verletzungssignale in den Tubuluszellen angeregt (1). In Frage kommt auch das Herankommen von Mediatoren sowohl an die Tubuluszellen als auch an die Endothelzellen über die peritubuläre Zirkulation (139). Bei Verletzung der Bowmann'schen Kapsel kann fehl ins Interstitium geleitetes Ultrafiltrat dort ebenfalls entzündliche Prozesse in Gang setzen (81)

Die stark amplifizierte Entzündungsreaktion löst im Interstitium ausgeprägte Fibroblastenproliferation und gesteigerte Matrixproduktion aus. Die proliferierenden Fibroblasten entstammen unterschiedlichen Zellpopulationen. Einerseits sind dies residierende renale Fibroblasten, andererseits Myofibroblasten, abgeleitet von den renalen Tubuluszellen durch den Prozess der so genannten epithelmesenchymalen Transformation (142). Eine dritte Population könnte Abkömmling der in der Blutbahn zirkulierenden 'Fibrozyten' sein. Denen wird eine Rolle bei der Gewebereparation zugesprochen (25).

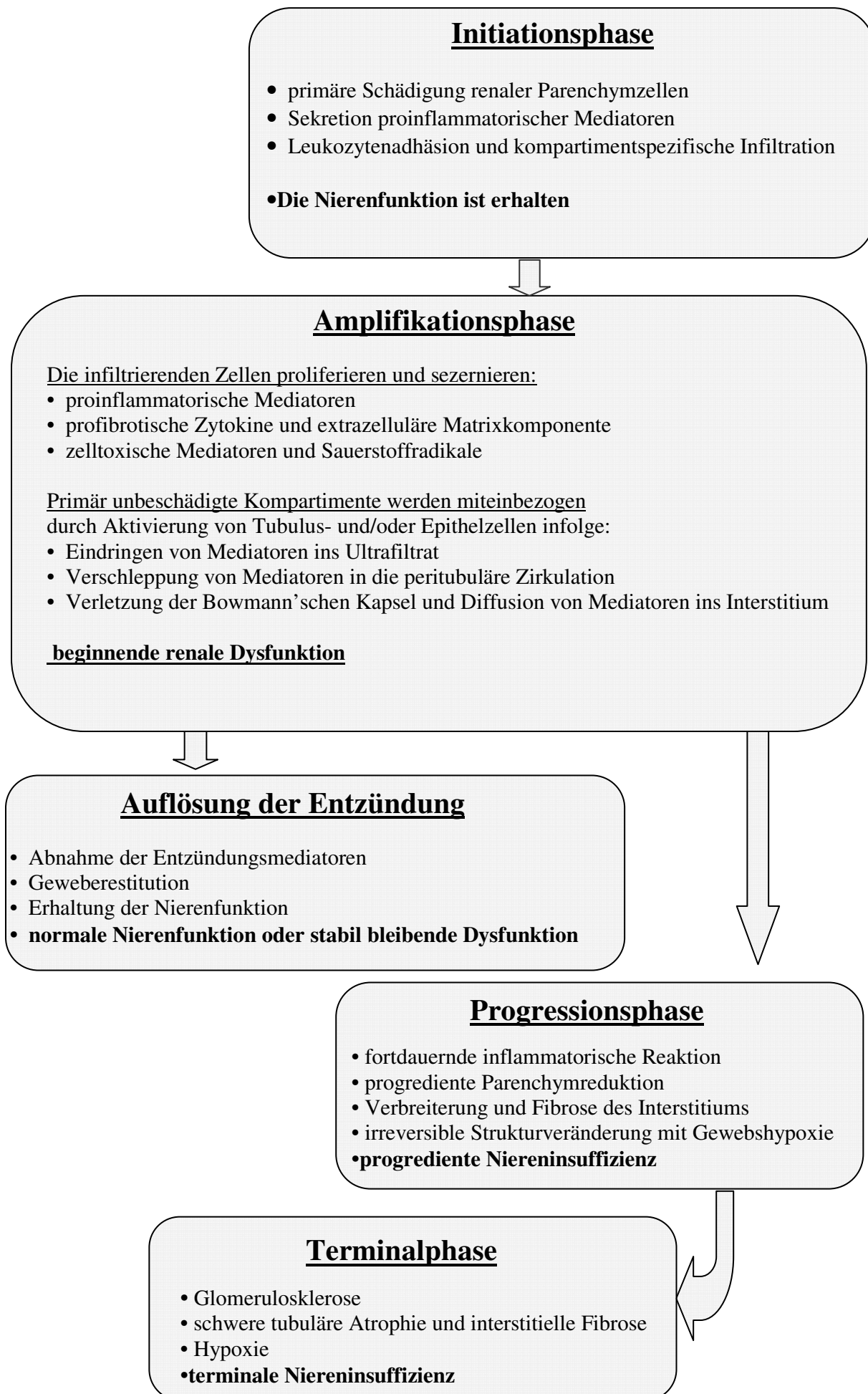
Auflösungsphase: Bei Down-Regulation der proinflammatorischen Signale nach Abklingen der primären Schädigung wird die akute Entzündungsreaktion in Richtung Auflösung gelenkt und die Geweberestitution ermöglicht.

Progressionsphase: Wird jedoch die Entzündung nicht gedämpft, eskaliert sie in eine chronisch progrediente Schädigung. Essentielle prognostische und pathogenetische Bedeutung hat dabei die tubulointerstitielle Schädigung. Die infiltrierenden Leukozyten (hauptsächlich T-Lymphozyten, Makrophagen) setzen proinflammatorische und profibrotische Substanzen, extrazelluläre Matrixbestandteile sowie zelltoxische Moleküle kontinuierlich frei. Die kritische Erweiterung des Interstitiellraumes infolge ausgedehnter Zell-Infiltration und Proliferation sowie massiver Matrixproduktion führt zu einer Gewebeischämie. Dadurch wird wiederum Parenchymschädigung provoziert. Weitere Leukozyten werden aus der Zirkulation angelockt und ein *Circulus vitiosus* geschlossen (76). (Abbildung 1.6) Die Erkrankung nimmt in dieser Phase einen mehr oder weniger vom Primärstimulus unabhängigen Verlauf an. Die überschießende, selbst schädigende Fehlreaktion und Fehlregulation des Immunsystems wird zur treibenden Kraft der progressiven Organschädigung und führt zum progredienten Funktionsverlust.

Terminalphase: Mit dem fortschreitenden Parenchymverlust lösen sich die Leukozyten-Infiltrate nach und nach auf. Die Fibroblasten sezernieren infolge der fortwährenden Hypoxie weiterhin extrazelluläre Matrixkomponente (106, 107). Die Nierenschädigung läuft schließlich auf Glomerulosklerose, komplette tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose hinaus. Klinisch entspricht dies der Phase der terminalen Niereninsuffizienz mit dem makroskopischen Bild der Schrumpfniere.



**Abbildung 1.6: Phasen der renalen Entzündung (4)**



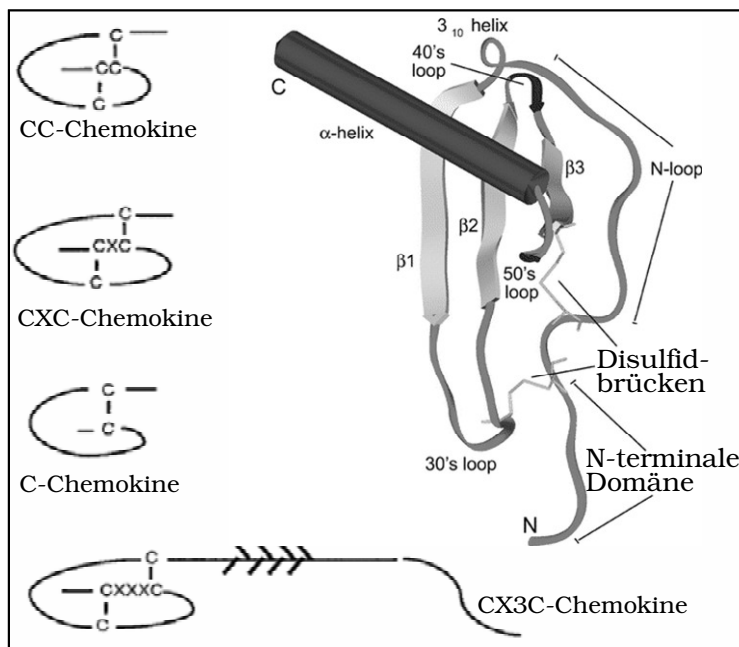
## 1.6 Chemokine

Die Chemokine sind eine große Familie niedermolekularer, **chemotaktischer Zytokine**, mit struktureller Ähnlichkeit, welche die Zellmigration, insbesondere von Lymphoidzellen, induzieren.

Bislang sind mehr als 50 Chemokine bekannt (12). Sie sind 8 bis 10 kDa schwere Moleküle mit einer 20-70%-igen Homologie in der Aminosäuresequenz. Typisch für alle ist die Tertiärstruktur, bestehend aus drei  $\beta$ -Faltblattsträngen, C-terminaler  $\alpha$ -Helix und flexiblem N-Terminus. Diese Struktur wird von Disulfidbrücken stabilisiert, die sich zwischen den vier konservierten Cystein-Resten ausbilden (135). Je nach *Lage der ersten zwei Cystein-Reste* in der Primärstruktur werden die Chemokine in 4 Gruppen eingeteilt: die C-, die CC-, die CXC-, und die CX<sub>3</sub>C- Subfamilien (11).

In der **CC- Gruppe** liegen die ersten zwei Cystein-Reste nebeneinander, während in der **CXC-Gruppe** eine beliebige Aminosäure (X) dazwischen liegt. Die meisten derzeit bekannten Chemokine sind einer diesen Subfamilien zuzuordnen. Die **C-Gruppe** besteht aus 2 Chemokinen- Lymphotactin  $\alpha$ - und  $\beta$ -. Bei denen fehlen zwei der Cystein-Reste. Sie sind aber am C-Terminus den CC-Chemokinen ähnlich (123). Fractalkin ist der einzige **CX<sub>3</sub>C-Chemokin**. Zwischen den ersten zwei Cystein-Resten befinden sich bei ihm 3 Aminosäuren. Die für die Chemokin-Familie typische Domäne ist an einem Muzin-reichen transmembranen Stiel angebunden.

**Abbildung 1.7: Struktur der Chemokine (47,125)**



Die Chemokine sind durch ihre Tertiärstruktur charakterisiert, bestehend aus drei  $\beta$ -Faltblattsträngen, C-terminaler  $\alpha$ -Helix und flexiblem N-Terminus. Diese Struktur wird von Disulfidbrücken stabilisiert, die sich zwischen den vier konservierten Cysteinresten ausbilden. Je nach der Lage der ersten zwei Cysteinreste in der Primärstruktur, werden die Chemokine in 4 Gruppen eingeteilt: die C-, die CC-, die CXC-, und die CX<sub>3</sub>C- Subfamilien

Hinsichtlich ihrer *Funktion und Expressionsmuster* werden zwei Gruppen Chemokine unterschieden: die Inflammatorischen und die Homeostatischen. Die ersten werden durch proinflammatorische Stimuli

hochreguliert und modulieren die Immunantwort. Die letzteren werden konstitutiv exprimiert und sind an der Migration naiver Lymphozyten ins Lymphoidgewebe im Rahmen der Immunüberwachung (*immune surveillance*) beteiligt (121, 37).

Die Regulation der Chemokinexpression findet in allen Schritten ihrer Produktion statt: von der Transkription, über die Translation, bis zu den posttranslationalen Veränderungen der gebildeten Proteine (133). Auf Transkriptionsebene wird die Expression von vielen proinflammatorischen Chemokinen durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, das CAAT Verstärker Bindungsprotein (*CAAT enhancer binding protein*) und das Aktivator-Protein-1 kontrolliert. Die Aktivierung dieser Faktoren wird durch eine Kaskadenreaktion in Gang gesetzt, bei der verschiedene Kinasen und Phosphatasen phosphoryliert und Transkriptioninhibitoren degradiert oder ins Zellkern transloziert werden. Die genauen Signalübermittlungswege variieren je nach Stimulus, Zellumgebung und Zelleigenschaften. Infolge weiterer Interaktion der gebildeten Mediatoren untereinander entsteht ein kompliziertes Netzwerk. Dieses ermöglicht die feine Regulation der Chemokinexpression *in vivo*, erschwert aber gleichzeitig den selektiven Eingriff in die genannten Prozesse (139).

**Tabelle 1.2: Chemokine und Chemokinrezeptoren (49)**

Name	Chromosom	Ligand (beim Menschen)	Ligand (bei der Maus)	Chemokinrezeptor
<b><u>CXC Chemokine</u></b>				
CXCL1	4q21.1	GRO- $\alpha$ /MGSA- $\alpha$	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	4q21.1	GRO- $\beta$ /MGSA- $\beta$	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2
CXCL3	4q21.1	GRO- $\gamma$ /MGSA- $\gamma$	GRO/MIP-2/KC?	CXCR2
CXCL4	4q21.1	PF4	PF4	unbekannt
CXCL5	4q21.1	ENA-78	GCP-2/LIX?	CXCR2
CXCL6	4q21.1	GCP-2	GCP-2/LIX?	CXCR1, CXCR2
CXCL7	4q21.1	NAP-2	unbekannt	CXCR2
CXCL8	4q21.1	IL-8	unbekannt	CXCR1, CXCR2
CXCL9	4q21.1	Mig	Mig	CXCR3/CD138
CXCL10	4q21.1	IP-10	IP-10/CRG-2	CXCR3/CD138
CXCL11	4q21.1	I-TAC	I-TAC	CXCR3/CD138
CXCL12	10q11.21	SDF-1 $\alpha/\beta$	SDF-1/PBSF	CXCR4/CD184
CXCL13	4q21.1	BCA-1	BLC	CXCR5
CXCL14	5q31.1	BRAK/bolekine	BRAK	unbekannt
(CXCL15)		unbekannt	Lungkine/WECHE	unbekannt
CXCL16	17p13			CXCR6
<b><u>CX<sub>3</sub>C-Chemokine</u></b>				
CX <sub>3</sub> CL1	16q13	Fractalkine	Neurotactin	CX3CR1

**Tabelle 1.2: Chemokine und Chemokinrezeptoren (49)**

Name	Chromosom	Ligand (beim Menschen)	Ligand (bei der Maus)	Chemokinrezeptor
<b><u>C-Chemokine</u></b>				
XCL1	1q24.2	Lymphotactin	Lymphotactin	XCR1
XCL2	1q24.2	SCM-1 $\beta$	unbekannt	XCR1
<b><u>CC-Chemokine</u></b>				
CCL1	17q11.2	I-309	TCA-3/P500	CCR8
CCL2	17q11.2	MCP-1/MCAF	JE?	CCR2
CCL3	17q12	MIP-1 $\alpha$ /LD78	MIP-1 $\alpha$	CCR1, CCR5
CCL3L1	17q12	LD78- $\beta$	unbekannt	CCR1, CCR5
CCL4	17q12	MIP-1 $\beta$	MIP-1 $\beta$	CCR5
CCL5	17q12	RANTES	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
(CCL6)		unbekannt	C10/MRP-1	Unbekannt
CCL7	17q11.2	MCP-3	MARC?	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	17q11.2	MCP-2	MCP-2?	CCR3, CCR5
(CCL9/10)		unbekannt	MRP-2/MIP-1 $\chi$	CCR1
CCL11	17q11.2	Eotaxin	Eotaxin	CCR3
(CCL12)		Unknown	MCP-5	CCR2
CCL13	17q11.2	MCP-4	unbekannt	CCR2, CCR3
CCL14	17q12	HCC-1	unbekannt	CCR1, CCR5
CCL15	17q12	HCC-2/Lkn-1	unbekannt	CCR1, CCR3
CCL16	17q12	HCC-4/LEC/LCC-1	unbekannt	CCR1, CCR2
CCL17	16q13	TARC	TARC/ABCD-2	CCR4
CCL18	17q12	DC-CK1/PARC	unbekannt	unbekannt
CCL19	9p13.3	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus-3	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus3	CCR7/CD197
CCL20	2q36.3	MIP-3/LARC/exodus-1	MIP-3/LARC/exodus1	CCR6
CCL21	9p13.3	6Ckine/SLC/exodus-2	6Ckine/SLC/exodus2	CCR7/CD197
CCL22	16q13	MDC/STCP-1	ABCD-1	CCR4
CCL23	17q12	MPIF-1/CK $\beta$ 8/CK $\beta$ 8-1	unbekannt	CCR1
CCL24	7q11.23	Eotaxin-2/MPIF-2	MPIF-2	CCR3
CCL25	19p13.3	TECK	TECK	CCR9
CCL26	7q11.23	Eotaxin-3	unbekannt	CCR3
CCL27	9p13.3	CTACK/ILC	ALP/CTACK/ILC	CCR10
CCL28	5p12	MEC	unbekannt	CCR3/CCR10

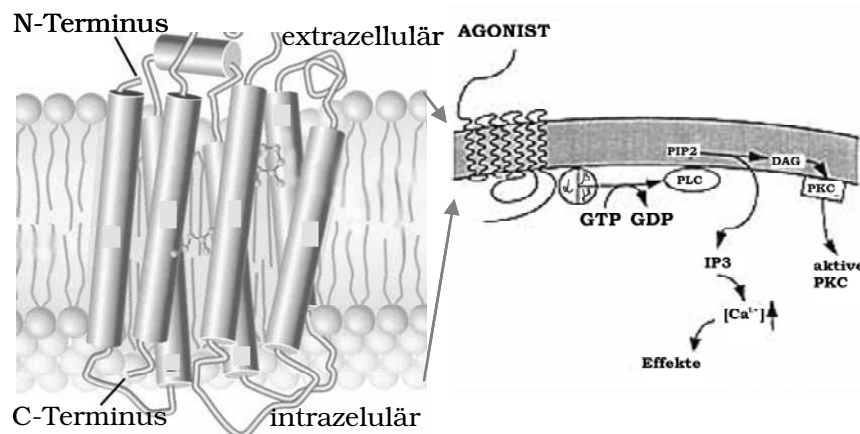
## 1.7 Chemokinrezeptoren

Die Familie der Chemokinrezeptoren ist die größte Subfamilie in der Gruppe der G-Protein gekoppelten, Peptid bindenden Rezeptoren (GPCRs) (109, 129). Die Struktur dieser Rezeptoren ist durch einen extrazellulären N-Terminus, sieben Transmembrandomänen ( $\alpha$  Helices) und einen intrazellulären C-Terminus charakterisiert. (98)

Die biologische Wirkung wird in einem ersten Schritt durch die Dissoziation des heterodimeren G-Proteins in  $\alpha$  und  $\beta\gamma$  Einheiten vermittelt. Anschließend aktivierte Enzyme, inklusive Phospholipase, führen unter anderem zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin Produktion,  $\text{Ca}^{2+}$ -Zustrom und Proteinkinase C-Aktivierung (71). Die damit eingeschaltete Kaskade greift in viele physiologische Prozesse ein wie Leukozytenmigration, Leukozytenaktivierung, Angiogenese usw. (87, 89, 144).

**Abbildung 1.8: Struktur und Funktion der GPCRs** ([www.cmbi.ru.nl/~dlutjehu/pictures.html](http://www.cmbi.ru.nl/~dlutjehu/pictures.html))

*Die Struktur der G-Protein gekoppelten, peptidbindenden Rezeptoren (GPCRs), ist durch einen extrazellulären N-Terminus, sieben Transmembrandomänen ( $\alpha$  Helices) und einen intrazellulären C-Terminus charakterisiert. Die biologische Wirkung wird, in einem ersten Schritt, durch die Dissoziation des heterodimeren G-Proteins in  $\alpha$  und  $\beta\gamma$ -Einheiten vermittelt.*



*Anschließend aktivierte Enzyme, inklusive Phospholipase, führen unter anderem zu Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerin Produktion,  $\text{Ca}^{2+}$ -Zustrom und Proteinkinase C-Aktivierung*

Chemokinrezeptoren werden fast ausschließlich auf Leukozyten exprimiert, finden sich jedoch auch auf anderen Zellen- z.B. auf Mesangialzellen (4). Zudem haben die einzelnen Zellpopulationen spezifische Expressionsmuster (97). Bezüglich der Ligandenspezifität zeigen die proinflammatorischen Chemokinrezeptoren eine breitere Redundanz. Die an der homeostatischen Leukozyten Transmigration beteiligten Rezeptoren reagieren dagegen spezifischer (11).

Den bindenden Liganden entsprechend werden Chemokinrezeptoren in vier Gruppen eingeteilt: CR, CCR, CXCR und CX<sub>3</sub>CR (97, 104).

Der DARC (*Duffy antigen receptor for chemokines*) ist eine rezeptorähnliche Struktur, die mit hoher Affinität viele CC- sowie ELR-CXC-Chemokine bindet. Der wird auf Erythrozyten und auf den Endothelzellen der renalen postkapillaren Venulen exprimiert (137). Diesem Rezeptor fehlt das gekoppelte G-Protein und für ihn ist keine Chemokin induzierte Signaltransduktion nachgewiesen worden. Eine Hypothese teilt ihm die Rolle eines *Scavenger*-Rezeptors zu, der Chemokine von der Zirkulation eliminiert (139). DARC könnte aber auch der Chemokin-Präsentation dienen, die zur Leukozyten-Infiltration am Entzündungsort beiträgt (137).

## 1.8 Funktion von Chemokinen und deren Rezeptoren

Unter den vielfältigen Funktionen der Chemokine ist die **Regulation der Leukozytenmigration und Aktivierung** am wichtigsten für das Verständnis derer Rolle in den entzündlichen Prozessen (173).

Während der embryonalen Entwicklung des Immunsystems und bei der Immunüberwachung (*immune surveillance*) wird die Organverteilung der naiven Immunzellen durch spezifische Chemokinrezeptoren dirigiert (28).

Geschädigtes Gewebe setzt Chemokine und andere Zytokine frei, welche die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche unterstützen. Daraufhin kommt es zu einer lokalen, reversiblen Adhäsion von Leukozyten. Die ausgeschütteten Chemokine werden mittels Heparansulfat enthaltender Proteoglykane auf der Endotheloberfläche fixiert. Somit kommen die auf der Leukozytenoberfläche exprimierten Chemokinrezeptoren im Kontakt mit deren Liganden. Die Expression der Leukozytenintegrine wird daraufhin hochreguliert und der Kontakt mit der Endothelzelle wird fest (86). Durch Modulation der Verteilung endothelialer Tight junctions ermöglichen Chemokine dazu die fokale Öffnung der Zell-Zell Kontakte (110). Durch gesteigerte Matrix-Metalloproteinasen (MMPs)-Expression in den Leukozyten, verursacht z.B. durch CCL5/RANTES, wird die Transmigration zirkulierender Zellen ins Gewebe weiterhin gefördert (79, 82).

Einzelne Chemokinrezeptoren sind spezifisch an unterschiedlichen Schritten beim Prozess der Leukozytenrekrutierung beteiligt (166). Dies ist z.B. für die CCL5/RANTES bindenden Rezeptoren CCR1 und CCR5 gezeigt worden. Studien in vitro lassen eine essentielle Rolle von CCR1 für die Leukozytenadhäsion und von CCR5 für das Zell-Spreading erkennen. Die transendotheliale Migration wird hingegen von beiden Rezeptoren unterstützt (165).

Die Zell-Infiltrate unterliegen weiterhin der Chemokinwirkung. CCL5/RANTES wirkt kostimulatorisch bei der T-Zell Proliferation (9). Unter dem Einfluss von CXCL8/IL8 und CCL5/RANTES setzen Makrophagen und Granulozyten inflammatorische Mediatoren, zelltoxische Proteasen und Radikale frei (10, 172). CCL2/MCP1 induziert die Histaminfreisetzung von basophilen Granulozyten (155)

Die Differenzierung der T-Lymphozyten in Richtung Th1 oder Th2 hängt auch mit dem Chemokinrezeptor-Expressionsmuster zusammen. Th1 Lymphozyten sind an der zellulären Immunreaktion und der Hypersensitivität vom Spättyp beteiligt. Sie exprimieren CCR1, CXCR3 und

CCR5 und sezernieren IFN- $\gamma$  und IL-2. Th2 Zellen rufen die Typ I Allergie hervor, exprimieren CCR4 und CCR8, und produzieren IL-4,5 und 10 (42).

Die Verteilung der Chemokinrezeptoren und damit der Einfluss einzelner Chemokine auf verschiedenen Leukozytensubpopulationen sind mehr oder weniger definiert. Im Allgemeinen stehen Monozyten und Lymphozyten größtenteils sowie in verschiedenem Ausmaß Eosinophilen, Basophilen und NK-Zellen, unter dem Einfluss von CC-Chemokinen. ELR-CXC Chemokine sind Neutrophilen gegenüber aktiv (127).

Die Funktionen der Chemokine und deren Rezeptoren gehen jedoch über die Kontrolle der Leukozyten-Transmigration und Aktivierung hinaus.

Das Chemokin CXCL1/GRO- $\alpha$  (*growth related oncogen- $\alpha$* ) ist ursprünglich aufgrund seiner Eigenschaft, das **Wachstum** von malignen Melanomazellen zu **stimulieren**, beschrieben worden (13). CXCL10/IP10 (Interferon inducible protein 10) induziert die **Proliferation von Mesangialzellen** (122). Die Subfamilie der CXC-Chemokine mit E-L-R-Sequenz (Glutamat-Leucin-Arginin) am C-Terminus stimuliert die **Angiogenese**, während die restlichen Vertreter dieser Familie **angiostatisch** wirken (94). Chemokine beeinflussen auch die **Hämatopoese** (116) und die **Embryogenese** (37). Zudem dienen Chemokinrezeptoren als Korezeptoren für die **HIV- Infektion** (40).

## 1.9 Chemokine und Niere

Chemokine haben vielfältige Auswirkungen auf die Leukozyten Rekrutierung und Aktivierung. Dies berechtigt die Annahme, dass Chemokin-Signalwege eine wichtige Rolle bei den entzündlichen renalen Erkrankungen spielen (41).

Alle intrinsischen renalen Zellen (Endothelzellen, Podozyten, Mesangialzellen, Tubuluszellen und interstitielle Fibroblasten) sind in der Lage nach entsprechender Stimulation, Chemokine zu produzieren. Proinflammatorische Stimuli wie TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , reaktive Sauerstoffradikale und LPS führen innerhalb von Stunden zu einer gesteigerten Expression von CCL2/MCP1, CXCL8/IL8, CXCL10/IP10, CCL5/RANTES (4). Kultivierte Mesangialzellen werden außerdem durch IgG und IgA Immunkomplexe oder aktiviertes Komplement stimuliert. Vasoaktive Substanzen (wie z.B. Angiotensin II) setzen einen entsprechenden Reiz für die glomerulären Endothelzellen. Die Proteinurie aktiviert die proximalen Tubuluszellen (139).

Die somit freigesetzten Chemokine üben mehrere Effekte aus. Einerseits locken diese Leukozyten aus der Zirkulation zum Entzündungsherd an. Diese Zellen sind eine essentielle Quelle für weitere Chemokin-Produktion in der Niere. Chemokinrezeptor exprimierende renale Zellen stehen aber auch unter der Chemokinwirkung. CXCL10/IP10 induziert z.B. Mesangialzell-Proliferation durch den CXCR3 (15). Nach CCL2/MCP1 Gabe steigt die Kollagen-mRNA Expression in kultivierten Fibroblasten (53). Ob letzteres auch *in vivo* relevant ist, bleibt dennoch unklar.

Der Verlauf der renalen Schädigung steht im Ausmaß, aber auch zeitlich und örtlich, eng mit der Chemokinexpression in Zusammenhang. Bei akuten glomerulären oder tubulointerstitiellen

Erkrankungen wird eine Hoch-Regulation der Expression proinflammatorischer Chemokine (vor allem CCL2/MCP1, CCL5/RANTES, CCL3/MIP1 $\alpha$ , CCL4/MIP1 $\beta$ ) beobachtet. Am Anfang ist diese auf das betroffene Kompartiment beschränkt und wird vom lokalen Anstieg der Leukozyten-Infiltration begleitet (4). Nach Auflösung der Infiltrate nimmt sie wieder ab. Bleibt jedoch die Suppression der proinflammatorischen Stimuli nach Überwinden des primären Traumas aus, dehnen sich Leukozyten-Infiltration und Chemokin Produktion auf primär `gesunde` Bezirke weiter aus. Die Ausheilung der entzündlichen Reaktion setzt folglich eine Down-Regulation der Chemokinexpression voraus.

Expressionsanstieg und pathophysiologische Bedeutung von verschiedenen Chemokinen und deren Rezeptoren ist bei fast allen renalen Erkrankungen festgestellt worden (42). Bei der akuten Abstoßungsreaktion nach Nierentransplantation sind CXCL8/IL8, CCL2/MCP1, CCL3/MIP1 $\alpha$ , CCL4/MIP1 $\beta$  sowie CCL5/RANTES beteiligt (36, 57, 139). CXCL8/IL8 Anstieg im Urin begleitet die Akutphase und die Exazerbation inflammatorischer Nierenerkrankungen (IgA-Nephritis, akute Glomerulonephritis, Lupusnephritis, Rapid progressive Glomerulonephritis). Sie korreliert mit dem Ausmaß der Hämaturie und der endokapillären Proliferation im Glomerulus und lässt bei Glukokortikoid induzierter Remission nach (159, 170). Berichte verweisen auf eine zentrale Bedeutung von CCL3/MIP1 $\alpha$  für die Pathogenese der Rapid progressiven Glomerulonephritis mittels Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen und Förderung einer Th1-Typ Immunreaktion (130, 158).

Von besonderem Interesse sind die Effekte und die Bedeutung der Chemokine bei der chronisch progredienten Nierenerkrankung. Kritische Bedeutung für die Progression haben dabei die interstitiellen Leukozyten, die den *Circulus vitiosus* der fortwährenden Gewebedestruktion unterstützen (42). Der Versuch einer Chemokin-Blockade bei der chronischen renalen Schädigung würde daher darauf abzielen, diesen fehlerhaften Kreis zu durchbrechen und somit die Auflösung der Entzündungsreaktion zu ermöglichen. Anerkennung als obligate Mitspieler in der Progressionsphase der renalen Schädigung haben bislang vor allem CCR1 und CCL2/CCR2 gefunden. CCL2/MCP1 ist in größeren Mengen im Urin bei Patienten mit fortgeschrittenen proliferativen Glomerulonephritiden (IgA Nephritis, Lupusnephritis und anderen chronisch-entzündlichen renalen Erkrankungen) vorhanden. Der CCL2/MCP1 Urinspiegel korreliert mit prognostisch ungünstigen pathologischen Parametern: der mesangialen Proliferation, der Halbmondbildung und der interstitiellen Makrophagen-Infiltration (158, 160, 170). Bei der Rapid progressiven Glomerulonephritis, aber auch bei nicht proliferativen, primär nicht entzündlichen, progressiven Glomerulopathien (FSGS, membranöser Glomerulonephritis, diabetischer Nephropathie, hypertensiver Nephropathie) scheint die MCP1-Expression mit der interstitiellen Beteiligung zu korrelieren. Letztere wird wiederum für die unaufhörliche Progression bis zur terminalen Insuffizienz beschuldigt (127, 161). Interventionelle Studien am Modell der obstruktiven Nephropathie (78), bei proteinurischen Nephropathien (141), aber auch bei der Lupusnephritis (60) geben weitere Anhaltspunkte für die Bedeutung von CCL2/CCR2 in der chronisch progredienten renalen Krankheit. Erwähnenswert kann eine Blockade von CCR2, begonnen im fortgeschrittenen Stadium der renalen Schädigung, Leukozytenpopulationen mit antiinflammatorischen Eigenschaften beeinträchtigen und somit die Nephropathie exazerbieren statt verbessern (155).



**Chemokine bei der Lupusnephritis:** Führende Rolle bei dieser Nephritis wird bislang dem Paar CCL2/CCR2 zugeteilt. Bei beiden Mauslupusmodellen (NZB/NZW und MRL-Fas(lpr)) wird eine im Verlauf ansteigende CCL2/MCP1-Expression beobachtet (147, 174). Biopsien von Patienten mit Lupusnephritis zeigen CCL2/ MCP1 Expression in Endothelzellen, mononukleären Zellen und kortikalen Tubulusepithelzellen (126, 160). Zudem ist der CCL2/MCP1 Spiegel im Urin signifikant höher, wenn aktive Läsionen beim Patienten bestehen, im Vergleich zur inaktiven Erkrankung (75, 160, 174). Der CCL2/MCP1 Urinspiegel wird sogar als Parameter zur Abschätzung der Krankheitsaktivität in Betracht gezogen (31). CCL2/MCP1 defiziente MRL-Fas(lpr) Mäuse weisen reduzierte Leukozyten-Infiltrate und Proteinurie, verbesserte Nierenpathologie und Überlebensrate auf (147). Menschen mit dem A/G oder G/G Phenotyp eines Polymorphismus im CCL2/MCP1 Gen (Basenaustausch A/G in der Position 2518, der mit einer gesteigerten Expression von CCL2/MCP1 in mononukleären Zellen im Peripherblut einhergeht- *high-MCP1 producer*) entwickeln häufiger im Verlauf einer Lupuserkrankung eine Nephritis, die dann auch einen schweren Verlauf aufweist (153). Behandlung mit einem MCP1-Antagonisten (60), oder anti-MCP1-Gentherapie (140) verbessern die Erkrankung. Dennoch exazerbiert die CCR2 Blockade sowohl die glomerulären Veränderungen als auch die interstitielle Schädigung (88). Bei Lupus-Patienten sind auch erhöhte Spiegel anderer Chemokine (CCL17/TARC, CXCL10/IP10) gefunden worden, deren pathogenetische Bedeutung noch unklar ist (100, 108).

### 1.10 Therapeutische Aspekte der Chemokin-Signalkette

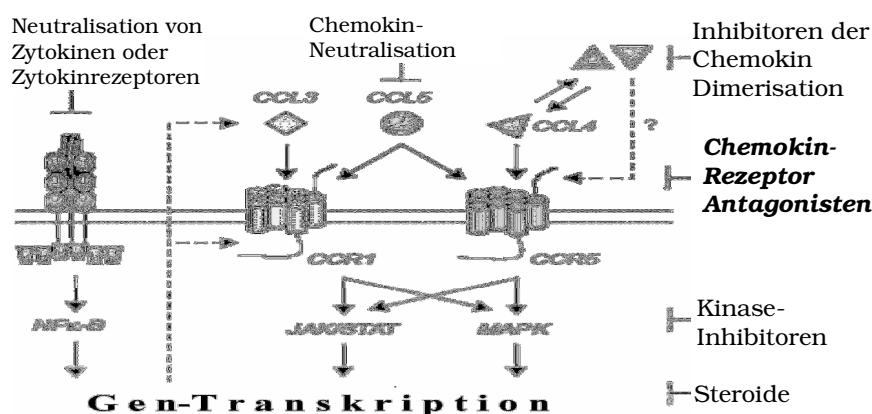
Die in der Klinik momentan zur Verfügung stehenden antiinflammatorischen Medikamente (Kortikosteroide, Cyclosporin) greifen in fundamentale Zellprozesse ein. Sie rufen eine systemische Immunsuppression hervor mit allen damit verbundenen Risiken und Nebenwirkungen (Infektanfälligkeit, Knochenmarksuppression, Infertilität usw.)(29). Symptomatisch (antiinflammatorisch und analgetisch) wirkende Pharmaka inhibieren die Bildung vor allem von Schmerzmediatoren (COX Inhibitoren) und können gelegentlich nachteilig für den Krankheitsverlauf sein (127). Proinflammatorische Chemokine werden nur am Ort der Entzündung gebildet. Die Blockade derer Wirkung scheint daher eine selektive und gut wirksame Therapieoption zu bieten.

Mit der Stimulation der Chemokingen-Transkription beginnend, über die Produktion und Freisetzung des fertigen Peptids, die Rezeptorbindung und Aktivierung, bis zur Signaltransduktion in der Chemokinrezeptor exprimierenden Zelle, sind theoretisch alle Etappen der Chemokinproduktion und -wirkung therapeutisch beeinflussbar.

Der Transkriptionsfaktor NF-kB ist an der Induktion mehrerer proinflammatorischer Chemokine beteiligt. Eine Blockade der Chemokin-Produktion kann folglich durch NF-kB Inhibition, erreicht werden. Kortikosteroid-Therapie führt vermutlich unter anderem zur Down-Regulation von NF-kB und somit zur Abnahme der Chemokinexpression (62, 101, 169). Auch der für die ACE-Hemmer bekannte renoprotektive Effekt ist zum Teil auf NF-kB Interaktion zurückzuführen (128, 134). Medikamente, die den zellulären cAMP Spiegel beeinflussen (z.B. Pentoxifyllin), können sekundär die NF-kB Funktion

unterdrücken und somit wiederum antiinflammatorisch wirken (131). Auch Kinasen (z.B. p38), die in der zur Chemokinexpression führenden Kaskadenreaktion nachgeschaltet sind, können als Therapietarget dienen.

**Abbildung 1.9: Ansätze zur Blockade der Chemokinwirkung (29)**



*Mit der Stimulation der Chemokinproduktion beginnend, über die Produktion und Freisetzung des fertigen Proteins, die Rezeptorbindung und Aktivierung, bis zur Signaltransduktion in der Zelle sind theoretisch alle Etappen therapeutisch beeinflussbar.*

Bei der Chemokin-Neutralisation werden bereits freigesetzte Chemokin-Moleküle eingefangen und inaktiviert. Dies kann z.B. mittels Anti-Chemokin-Antikörper erreicht werden (139, 140). Einige virale Proteine vermögen, Chemokine zu neutralisieren (4). Somit hindern die Viren die Entwicklung einer spezifischen Immunreaktion. Auch Heparin oder heparinähnliche Moleküle interagieren mit Chemokinen und beeinträchtigen somit deren chemotaktischen Eigenschaften (3, 33).

Derzeit steht die Entwicklung von Chemokinrezeptorantagonisten im Mittelpunkt der Bemühungen um eine lokale Modulation der Chemokinwirkung. Dies lässt sich damit erklären, dass eine Vielzahl Antagonisten von G-Protein gekoppelten Rezeptoren sich schon jahrelang als gut wirksame Medikamente erwiesen hat (Antihistaminika, Antipsychotika, Antidepressiva, Antagonisten der Muskarin- und Adreno-Rezeptoren) (109). Zudem neutralisiert die Blockade eines Rezeptors gleichzeitig den Effekt mehrerer Chemokine, was effizienter sein könnte (33). Auch bleiben die an der intrazellulären Chemokinsignal-Übertragung beteiligten Kinasen für weitere Zellvorgänge verfügbar, was eine relativ selektive Wirkung erwarten lässt (29).

*Die N-terminale Modifizierung von Chemokinen (CCL2/MCP1, CCL5/RANTES, CXCL1/GRO-α) ist eine der Möglichkeiten zur Herstellung von Chemokinrezeptorantagonisten (56, 115). Auf dieser Weise konnte eine verminderte Leukozyten-Infiltration und Proteinurie bei der anti-GBM-Glomerulonephritis (85) sowie eine Abnahme der Leukozyten-Infiltration und die Kollagen IV Ablagerung bei der mesangioproliferativen Glomerulonephritis (111) erzielt werden.*

Mit *Chemokinen beziehungsweise mit Chemokin-Analoga beladene, zelltoxische Substanzen* werden untersucht, um die Zerstörung von Zellen zu erreichen, die bestimmte Chemokinrezeptoren exprimieren, (23).

Auch *Antikörper gegen Chemokinrezeptoren* haben sich in interventionellen Tierexperimenten als wirksam erwiesen. Versuche einer Depletion bestimmter Zellpopulationen mittels Antikörper gegen deren Chemokinrezeptoren werden berichtet (23). Dennoch sind Antikörper schlechter zur Therapie beim Menschen geeignet, da als hochmolekulare fremde Proteine, diese stark immunogen sind und potentielle Allergene darstellen.

Die *synthetischen, niedermolekularen Verbindungen* sind potente und spezifische Antagonisten der Chemokinrezeptoren, die keine Peptide sind. Daher sind sie auch weniger immunogen und pharmakokinetisch besser verfügbar. Diese Substanzen sind strukturell den Antagonisten der anderen Rezeptoren der GPCRs-Familie sehr ähnlich. Diese Ähnlichkeit liegt zum Teil daran, dass gemeinsame chemische Bibliotheken für die Identifizierung dieser Pharmaka benutzt worden sind. Andererseits deutet es daraufhin, dass GPCRs über eine konservierte Bindungstasche verfügen, die beim Rhodopsin-Rezeptor umfangreich untersucht und beschrieben worden ist. Diese strukturelle Ähnlichkeit zwischen Antagonisten unterschiedlicher Rezeptoren stellt aber auch die Frage von der Kreuzreaktivität der Substanzen und den damit verbundenen Nebenwirkungen (29). Ein weiteres Problem für die Entwicklung von Chemokinrezeptorantagonisten und die Validierung derer Wirkung entsteht aus den Unterschieden im Chemokin-System zwischen dem Menschen und den untersuchten Tiermodellen. Manche humane Chemokine oder Rezeptoren haben kein Analogon in der Maus und die Rezeptor-Ligand Spezifität stimmt nicht immer überein. Auch vermögen manche Rezeptorantagonisten, zwischen humanen und Mausrezeptoren zu unterscheiden. Kritischer Punkt für die Antagonist-Rezeptor Affinität und Spezifität ist ferner die Konformation der Chemokinrezeptoren, die von der Zelllinie, der G-Protein Kopplung des Rezeptors und dem Lipidgehalt der Zellmembran abhängig ist (155).

Trotz all dieser Schwierigkeiten wird die Pharmaindustrie der Herausforderung, Substanzen mit dem gewünschten Chemokinrezeptor-Wirksamkeitsspektrum zu entwickeln, sicher bald nachkommen. Vor deren klinischen Einsatz ist jedoch eine eindeutige Validierung der therapeutischen Wirksamkeit geboten. Hilfreich dafür sind Nachweise einer gesteigerten Chemokinexpression bei der entsprechenden Erkrankung oder in ihrem Tiermodell. Interventionelle Studien an geeigneten Tiermodellen sollten zudem belegen können, dass die externe Blockade der jeweiligen Chemokinen und/oder deren Rezeptoren den Krankheitsverlauf günstig beeinflusst.

## 1.11 Chemokinrezeptor CCR1

CCR1 ist als erster CC-Chemokinrezeptor beschrieben worden. Das Gen ist in einem Cluster mit CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CCR9, CXCR1, CX3CR1 lokalisiert. CCR1 bindet mit hoher Affinität CCL3/MIP1 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CCL7/MCP3, CCL23/MPIF1 und CCL14/HCC1, und weniger effektiv CCL2/MCP1 und CCL4/MIP1 $\beta$ . CCR1 wird vor allem auf Leukozyten, aber auch auf anderen Zellen exprimiert. In Monozyten, T-Lymphozyten (stärker exprimiert auf CD45RO1 positiven Gedächtniszellen), Neutrophilen und Eosinophilen vermittelt er die Infiltration in den Entzündungsherd. Erwähnenswert ist ein Unterschied zwischen Menschen und Mäusen in der Zellverteilung des Rezeptors. Bei der Maus ist CCR1 stark auf Neutrophilen exprimiert und CCL3/MIP1 $\alpha$  ist daraufhin sehr potent diesen Zellen gegenüber. Beim Menschen werden Neutrophile mittels CXCR1 rekrutiert, so dass CCL3 kaum eine Wirkung auf diese Zellpopulation hat. Bei der Maus wird folglich der fehlende CXCR1 durch CCR1 funktionell ersetzt (97). CCR1 beeinflusst weiter die T-Zell Polarisation, da CCR1 Knock-out Mäuse im Vergleich zum Wildtypieren eine Neigung zu Th1-Reaktionen aufweisen (52). Proinflammatorische Chemokine rekrutieren über CCR1 naive dendritische Zellen ins entzündete Gewebe, die da eine hohe Antigen aufnehmende Aktivität zeigen. Daraufhin wird die CCR1 Expression down-reguliert. Über aktivierte Expression von *Homing*-Rezeptoren (CCR7) besiedeln die maturierten dendritischen Zellen dann T-Zell-reiche Regionen der sekundären Lymphorgane und gewähren die Antigenpräsentation (48). CCR1 exprimierende dendritische Zellen könnten daher eine Rolle bei der Unterhaltung der chronischen Entzündung spielen, da sie Chemoattraktantien für aktivierte T-Zellen (CCL17/TARC, CCL22/MDC, CCL19/ELC) produzieren (149). Mesangialzellen exprimieren in vitro nach Zytokin-Stimulation CCR1 und migrieren daraufhin gegen einen CCL5/RANTES Gradienten (15). Die funktionelle Bedeutung dieser Expression ist bislang jedoch unklar. Untersuchungen an CCR1 Knock-out Mäusen lassen eine CCR1 abhängige Besiedlung der Milz mit myeloiden Progenitorzellen vermuten (52). CCL3/MIP1 $\alpha$  und seine Agonisten inhibieren die Proliferation hämatopoetischer Zellen, was auch CCR1 vermittelt zu sein scheint und das Interesse für diesen Rezeptor im Bereich der Onkologie erklärt (120). Bei der Alzheimer-Krankheit wird von dystrophischen, Neurofilament-positiven, Synaptophysin-negativen, CCR1 exprimierenden Neuriten berichtet, die mit den Abeta42 (Amyloid beta Peptide, Typ 1-42) enthaltenden senilen Plaques assoziiert sind. Letzteres liegt Bemühungen zugrunde, eine frühe Diagnose dieser Erkrankung in der bildgebenden Diagnostik zu ermöglichen, mittels markierten, CCR1 bindenden Signalmolekülen (19).

**Tabelle 1.3: CCR1-Liganden exprimierende Zellen, relevante Erkrankungen, Besonderheiten des CCR1 Knock-out Phenotyps**

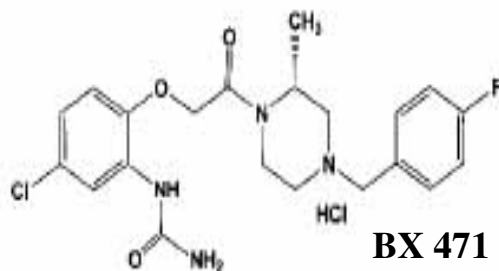
Liganden:	Expression:	Erkrankungen:	Phenotyp der Knock-Out Mäusen:
CCL3/MIP1 $\alpha$	Monozyten	Multiple Sklerose	ungestörte Entwicklung
CCL5/RANTES	T Zellen	Psoriasis	veränderte Myelopoese
CCL7/MCP3	naive dendritische Zellen	Niere/ Herz Tx	Neigung zu Immunreaktionen
CCL14/HCC1	PMN	Rheumatoide Arthritis	vom Th1-Typ
CCL23/MPIF1	Eosinophile	Lungenfibrose	
	NK Zellen	Nephropathien	
	Mesangialzellen	? Alzheimer (Marker)	
	?Neurone		

Eine Validierung der Relevanz von CCR1 bei Entzündungsreaktionen *in vivo* ist in mehreren Richtungen und bei verschiedenen Erkrankungen durchgeführt worden: bei chronischen Nierenerkrankungen [bei der obstruktiven Nephropathie (156), bei proteinurischen Nierenerkrankungen (157), bei der Nierentransplantatabstoßung (69)], aber auch bei Tiermodellen extrarenaler fibrotisch-entzündlicher Erkrankungen [bei der experimentellen Enzephalomyelitis (Modell der multiplen Sklerose) (54), der Herztransplantation (70), der rheumatoiden Arthritis (16,59), der Psoriasis (118), der Lungenfibrose (149)]. All diese potentiell günstige Auswirkungen bei einer Vielzahl fibrotisch-entzündlicher Prozessen machen den Chemokinrezeptor-1 ein beliebtes Therapietarget. Mehrere Hersteller (Takeda Chemical Industries, Banyu Pharmaceutical, Merck etc) haben Verbindungen mit Anti-CCR1-Aktivität beschrieben (77, 92, ). Die potenteste Substanz ist von der Firma Berlex entwickelt worden und gehört zu der Familie der 4-hydroxypiperidine. Das ist der niedermolekulare Antagonist BX471 mit dem chemischen Namen: **R-N-[5-chloro-2- [2-[4- [(4-fluorophenyl) methyl]-2-methyl-1 piperazinyl]2 oxoethoxy] phenyl] urea HCl.**

Im *Ligand-Binding-Assay* zeigt diese Substanz hohe Affinität dem menschlichen CCR1 gegenüber und verdrängt seine Liganden (CCL3, CCL5, CCL7) mit einer  $K_i$  von 1 nM bis 5,5 nM. Die funktionellen Tests zeigen dosisabhängige Abnahme der von den genannten Liganden hervorgerufenen intrazellulären  $Ca^{2+}$  Mobilisation, extrazellulären Azidifikation, CD11b Expression und Leukozyten Migration. Der Rezeptorantagonismus ist kompetitiv: reversibel und überwindbar. Es besteht eine 10000-fach höhere Selektivität für CCR1 als für die restlichen getesteten GPCRs und keine intrinsische Aktivität. Toxizitätsstudien haben keine schweren Erscheinungen festgestellt. Bei Hunden hat BX471 einen Verteilungskoeffizient, der circa dem extrazellulären Flüssigkeitsvolumen entspricht. Es besteht eine orale Verfügbarkeit von ca.60% (65)

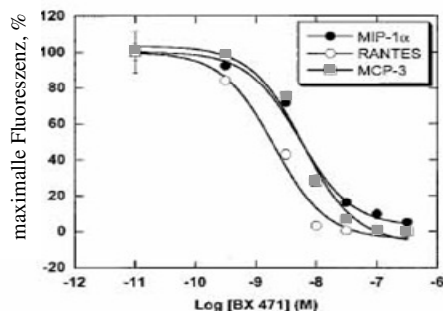
### Abbildung 1.10: Chemische Struktur, Affinität und Spezifität vom BX471 (65)

Der potenteste CCR1 Antagonist, ist von der Firma Berlex entwickelt worden und gehört zu der Familie der 4-hydroxy-piperidine



R-N-[5-chloro-2-[2-[4-[(4-fluorophenyl)methyl]-2-methyl-1 piperazinyl]-2-oxoethoxy] phenyl]urea HCl

BX471 inhibiert den durch CCL3/MIP1 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CCL7/MCP3 induzierten Ca<sup>2+</sup> Anstieg in humanen CCR1 exprimierenden HEK293 Zellen



BX471 zeigt eine 10 000-fach höhere Selektivität für CCR1 als für andere GPCRs

Rezeptor	% Inhibition		
	10 $\mu$ M	1 $\mu$ M	Selektivität
Adenosine	38	-6	>10,000
Adrenergische $\alpha_{1a}$	-7	5	>10,000
Adrenergische $\alpha_{2a}$	24	-8	>10,000
Adrenergische $\alpha_{2b}$	22	21	>10,000
Adrenergische $\beta_1$	1	2	>10,000
Bradykinin B <sub>1</sub>	-11	-9	>10,000
Cannabinoid	13	23	>10,000
Cholecystokinin	16	-14	>10,000
Dopamin D <sub>1</sub>	13	-2	>10,000
Dopamin D <sub>2</sub>	9	6	>10,000
Dopamin D <sub>3</sub>	17	21	>10,000
Dopamin D <sub>4</sub>	21	2	>10,000
Dopamin D <sub>5</sub>	23	29	>10,000
Endothelin B	8	-15	>10,000
Leukotrien B <sub>4</sub>	14	-13	>10,000
Muskarinische M <sub>1</sub>	-7	-9	>10,000
Muskarinische M <sub>2</sub>	21	12	>10,000
Muskarinische M <sub>3</sub>	-8	7	>10,000
Muskarinische M <sub>4</sub>	15	15	>10,000
Muskarinische M <sub>5</sub>	18	11	>10,000
Neurokinin	2	5	>10,000
Neuropeptid Y	19	12	>10,000
Serotonin 5-HT <sub>1A</sub>	8	4	>10,000
Serotonin 5-HT <sub>1B</sub>	19	19	>10,000
CXCR2	-4	-2	>10,000
CXCR4	5	1	>10,000
CCR5	2	3	>10,000
DARC	6	-3	>10,000

Versuche mit BX471 am Tiermodell haben eine verzögerte Abstoßungsreaktion nach Nieren- oder Herztransplantation demonstriert (69, 70). Auch bei der Psoriasis und der experimentellen Enzephalomyelitis führt BX471 zu einem milderem Verlauf (135). Die daraufhin eingeleiteten Phase I klinischen Studien durch die Firma *Schering AD* haben eine gute Verträglichkeit dieser Substanz ergeben. Seit 2003 laufen auch Phase II Studien für Psoriasis und Multiple Sklerose (132, 152).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierhaltung und tierexperimentelle Methoden

#### 2.1.1 Tierhaltung

Für die Experimente wurden weibliche MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse vom Jackson Laboratorium, Bar Harbor, ME verwendet. Je maximal 5 Tiere wurden in Macrolone Typ III Käfige, bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter (mouse diet, Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gehalten.

Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und waren durch die Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

#### 2.1.2 Studiendesign

Im Alter von 20 Wochen wurden die Mäuse in zwei Gruppen eingeteilt:

- **BX471-Gruppe (n=8):** Diesen Tieren wurde der niedermolekulare CCR1-Antagonist (BX471) in einer Dosierung von 50mg/kgKG in einem Volumen von ca.60µl über 4 Wochen alle 8 Stunden subkutan verabreicht
- **Kontrollgruppe (n=10):** Diese Tiere bekamen in den 4 Wochen 60µl Vehikel (40% Cyclodextrin) subkutan gespritzt

Beide Gruppen hatten vergleichbare Proteinurie und Körpergewicht in der 20. Woche von jeweils:

BX471 Gruppe: Proteinurie  $4,29 \pm 5,89$  mg Eiweiß/ml, Gewicht  $36,6 \pm 3,4$ g

Kontrollgruppe: Proteinurie  $4,22 \pm 5,46$  mg Eiweiß/ml, Gewicht  $37 \pm 2,75$ g

Die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von BX471 bei der Maus sind in einer früheren Arbeit untersucht worden (157). Es wurde eine ca. 200-fach niedrigere Affinität von BX471 zu dem Maus-CCR1-Rezeptor festgestellt, im Vergleich zu der von Liang.M et al gemessenen Affinität bei den Humanrezeptor-exprimierenden HEK293 Zellen (84). Auch die Halbwertszeit ist bei der Maus (bei C57BL/6 Mäusen  $t_{1/2} < 2$ h), verglichen mit der bei der Ratte (84), relativ kurz. Demzufolge ist theoretisch eine verhältnismäßig höhere Plasmakonzentration für Wirksamkeit *in vivo* notwendig. Die Selektivität von BX471 für CCR1 gegenüber anderen Chemokinrezeptoren (CCR2, CCR5 und CXCR4) bleibt im Bereich von bis zu 50µM ca. 250-fach höher.

#### 2.1.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme vor der Tötung erfolgte in Allgemeinnarkose mit inhalativem Äther.

Vom Vollblut wurde das Serum durch Zentrifugieren (3000xg, 5min, Heraeus Biofüge 15) gewonnenen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.1.4 Gewebeentnahme

Am Ende der 24. Woche wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Nieren wurden nach einer medianen Laparotomie entnommen. Die Bauchdecke wurde auf einer Länge von 2,5 cm eröffnet. Zur besseren Übersicht wurden beide Hautlappen beidseits mittels Klebestreifen an die Unterlage fixiert. Die Nieren wurden nacheinander dargestellt, mobilisiert und vom Gefäßstumpf abgesetzt. Ein Teil wurde zur histologischen Untersuchung abgeschnitten und in 4%-ige, PBS gepufferte, Formalinlösung eingetaucht. Der Rest wurde zur RNA-Isolation und Anfertigung von Gefrierschnitten in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.2 Herstellung der Injektionslösungen

### 2.2.1 Vehikel

Zu 40 g Cyclodextrin wurden ca. 50 ml 0,9% NaCl gegeben und über Nacht gemischt. Die Lösung wurde dann bis zu einem Endvolumen von 100 ml mit 0,9% NaCl verdünnt und mittels einem  $0,22\mu\text{m}$  Filter sterilisiert. Die Aufbewahrung erfolgte bei  $+5^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.2 BX471

Die hergestellte Lösung hatte eine Konzentration von 25 mg/ml. Dazu wurden 1,25 g BX471 zu 50 ml der 40%-igen Cyclodextrin-Lösung gegeben. Mittels  $250\mu\text{l}$  konzentrierter Salzsäure unter ständigem Mischen wurde die vollständige Lösung der trockenen Substanz erreicht. Im Anschluss wurde der pH-Wert bis auf 4,5 mittels KOH gehoben. Die erneute Sterilisation erfolgte durch Filtrierung. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

## 2.3 Histologische Auswertung

### 2.3.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte

Das entnommene Gewebe wurde in 4%-igem PBS-gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.  $2\mu\text{m}$  dicke Schnitte wurden mit einem Schneidegerät (Jung CM 3000, Leica, Bensheim, Deutschland) angefertigt, auf mit APES vorbehandelten Objektträgern aufgetragen und für 12 h in einem Trockenschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Als erster Schritt bei jeder Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50%) entparaffiniert und in wässrige Lösung gebracht.

### 2.3.2 HE-Färbung

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 5 min in Mayer's Hämalaun eingetaucht und daraufhin für 5 min in Wasser gebläut. Mit 2%-iger Eosin-Lösung wurden die Schnitte über 5 min behandelt und im



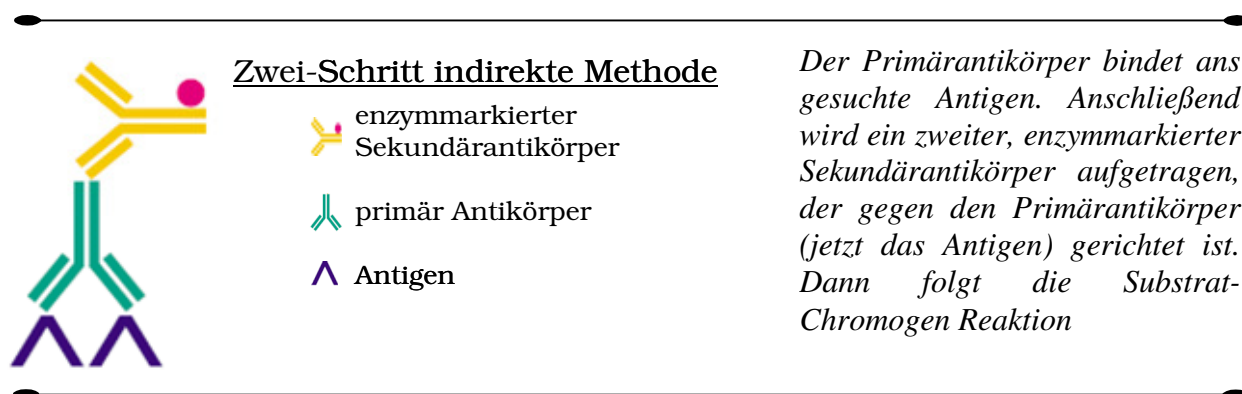
Anschluss mit Wasser abgespült. Nach Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und Xylol erfolgte die Eindeckung.

### 2.3.3 Immunhistologische Färbungen

Diese wurden mittels der 2-Schritt-indirekten Methode durchgeführt.

Bei dieser Methode bindet zuerst ein unkonjugierter (unmarkierter) Primärantikörper an das Antigen. Anschließend wird ein zweiter, enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen, der gegen den Primärantikörper (jetzt das Antigen) gerichtet ist. Danach folgt die Substrat-Chromogen-Reaktion.

#### **Abbildung 2.1: Prinzip der immunhistologischen Färbung**



Die Paraffinschnitte wurden wie beschrieben (2.3.1) entparaffiniert.

Die Antigenfreilegung erfolgte je nach zu visualisierendem Antigen (Tabelle 2.1) mittels 3 Methoden:

- (1) -3-maligen Erhitzen, je 2,5 min in Citratpuffer, in einer Mikrowelle bei 600Watt und anschließender Abkühlung über 10 min in PBS
- (2) -Autoklavieren über 30 min, bei 2bar, in Citratpuffer, Abkühlen für 30 min im Gerät und 15 min in PBS
- (3) - Autoklavieren über 30 min, bei 2bar, in *Antigen Unmasking Solution*, Abkühlen für 30 min im Gerät und 15 min in PBS
- (4) -10-minütiger Behandlung mit einer Protease und anschließender Spulung in PBS für 10 min

Im nächsten Schritt wurden Blockaden von endogenen Substanzen durchgeführt, die sonst mit der Färbemethode interferieren und somit die Auswertung stören:

- **Peroxidase-Blockade:** 20-minütige Inkubation mit 3%-igem Wasserstoffperoxid
- **Avidin und Biotin-Blockade:** 15-minütige Inkubation mit einem handelsüblichen Kit
- **Blockade von unspezifisch hydrophob mit dem Antikörper reagierenden Molekülen:** 20-minütige Inkubation mit 4%-iger Magermilch

Die Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 2.1) erfolgte über 1 Stunde. Nach Spülen im PBS wurden der Biotin-konjugierte Sekundärantikörper (Tabelle 2.2) sowie der Peroxidase-konjugierte Avidin-Biotin-Komplex (Label) für jeweils 30 min aufgetragen.

Nach einer weiteren Spülung in PBS wurde das Präparat unter visueller Kontrolle mit AEC entwickelt, das von der Peroxidase in ein unlösliches Chromogen umgesetzt wird.

Bis auf die Ki-67- Färbung wurden alle Schnitte anschließend mit Hämalaun gegengefärbt. Eingeschlossen wurden die Schnitte mit Aquatex.

**Tabelle 2.1: Primärantikörper am paraffineingebetteten Gewebe**

<b>Primär-antikörper</b>	<b>Zielantigen</b>	<b>Blockierung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Antigen-Freilegung</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-CD3	T Lymphozyten	Peroxidase, Avidin, Biotin	Serotec, Eching, Deutschland	2	1:50
anti-ERHR3	Monozyten Makrophagen	Peroxidase, Avidin, Biotin	Biomedicals, Augst, Switzerland	2	1:50
anti-Ki-67	Zellproliferation assoziiertes Antigen	Peroxidase, Avidin, Biotin, Magermilch	Dianova, Hamburg, Deutschland	1	1:25
anti-SMA	Smooth muscle actin Myofibroblasten	Peroxidase, Avidin, Biotin,	Dako Carpinteria Deutschland	3	1:100
anti-LF-67	Kollagen I	Peroxidase, Avidin, Biotin,	National Institute of Health, Bethesda	3	1:50
anti-ssDNA	apoptotische Zellen	Peroxidase, Avidin, Biotin, Magermilch	Chemicon Hofheim Deutschland	4	1:50
anti-CCL2	CCL2/MCP1	Peroxidase, Avidin, Biotin	Santa Cruz	3	1:50
anti-CCL5	CCL5/RANTES	Peroxidase, Avidin, Biotin	Peprtech, Rocky Hill, USA	1	1:50

Die Anzahl positiver ER-HR3, CD3, Ki-67 oder ssDNA Zellen wurde getrennt in jeweils 20 Glomeruli oder im Tubulointerstitium in 10 *high-power-fields* bestimmt. Die interstitielle Kollagen I Deposition und die SMA Expression wurden digital quantifiziert. 10 Gesichtsfelder wurden mit der digitalen Kamera (DC 300F; Leica Microsystems, Cambridge, UK) bei einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die positiv gefärbte Fläche wurde mittels Bildanalyse Software ermittelt und als prozentueller Anteil der Gesamtfläche ausgerechnet.

**Tabelle 2.2: Biotin-konjugierte Sekundärantikörper**

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti Ratte-IgG	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, US
Anti Hase-IgG	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti Ziege-IgG	1:100	Vector Laboratories, Burlingame, USA

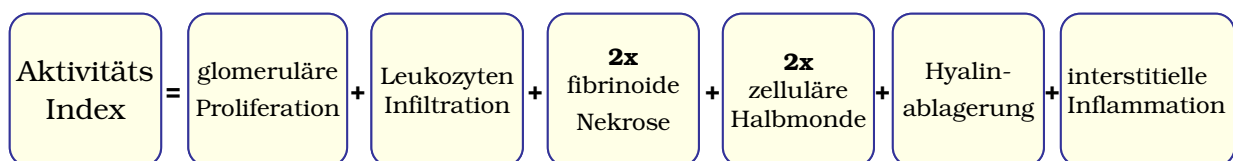
### 2.3.4 Histopathologische Indizes

Zur Beurteilung der humanen Lupusnephritis wurden komplexe histopathologische Parameter beschrieben, die besser mit der Prognose der renalen Schädigung als die darin enthaltenen Größen zu korrelieren erscheinen (8).

Diese Indizes wurden anhand der HE-Färbung ermittelt.

#### **Aktivitätsindex**

Der Aktivitätsindex ergibt sich aus der Summe folgender Einzelparameter (8):



Aus diesen ergibt sich ein Maximalwert von 24 Punkten. (Tabelle 2.3)

**Tabelle 2.3: Parameter des Aktivitätsindexes**

Parameter		Score
Glomeruläre Proliferation	beschreibt das Ausmaß der glomerulären endokapillaren Hyperzellularität (Mesangialzellen, Endothelzellen und eventuell infiltrierende Makrophagen), die zu einer Reduktion des im Glomerulus zirkulierenden Blutvolumens führt	Je nach Anzahl und Schweregrad der betroffenen Glomeruli < 25% - <b>1</b> 25-50% - <b>2</b> > 50% - <b>3</b>
Leukozyten-Infiltration	das Vorhandensein von mehr als 2 polymorphonukleären Leukozyten im Glomerulus wird als abnorm betrachtet	Je nach Anzahl infiltrierender Zellen: mild - <b>1</b> mäßig - <b>2</b> stark - <b>3</b>
Karyorrhexis & fibrinoide Nekrose	Karyorrhexis beschreibt das Vorhandensein von pyknotischen und fragmentierten Nuklei Als fibrinoide Nekrose werden Ablagerungen in den Glomeruli bezeichnet, die sich stark eosinophil färben	Je nach Anzahl und Schweregrad der betroffenen Glomeruli < 25% - <b>1</b> 25-50% - <b>2</b> > 50% - <b>3</b>
zelluläre Halbmonde	als solche werden extrakapillär proliferierende Zellen beschrieben, die mehr als ¼ der glomerulären Zirkumferenz umfassen.	Je nach Anzahl betroffener Glomeruli < 25% - <b>1</b> 25-50% - <b>2</b> > 50% - <b>3</b>
Hyalin-Ablagerung	homogenes eosinophiles Material (wahrscheinlich Immunkomplexablagerungen) entweder entlang der luminalen Oberfläche der glomerulären Kapillaren (klassische <i>wire loop</i> Läsionen) oder das Lumen okkludierend (hyaline Thrombi)	Je nach Ausmaß: mild - <b>1</b> mäßig - <b>2</b> stark - <b>3</b>
interstitielle Inflammation	Infiltration von mononukleären Zellen ins Interstitium -Lymphozyten, plasmatische Zellen, Makrophagen	Je nach Ausmaß: mild - <b>1</b> mäßig - <b>2</b> stark - <b>3</b>

**Chronizitätsindex**

Der Chronizitätsindex ergibt sich aus der Summe folgender Einzelparameter (8):

$$\text{Chronizitäts-Index} = \text{glomeruläre Sklerose} + \text{tubuläre Atrophie} + \text{fibrose Halbmonde} + \text{interstitielle Fibrose}$$

Aus diesen ergibt sich ein Maximalwert von 12 Punkten. (Tabelle 2.4)

**Tabelle 2.4: Parameter des Chronizitätsindexes**

Parameter		Score
glomeruläre Sklerose	beschreibt das Ausmaß des glomerulären Kollapses, gefolgt von Expansion der mesangialen Matrix mit endgültiger Kapillarlumenobliteration	Je nach Ausmaß und Ausbreitungsmuster: segmental oder in < 25% Glomeruli - <b>1</b> global in 25-50% - <b>2</b> global in > 50% - <b>3</b>
tubuläre Atrophie	beinhaltet eine Verdickung der tubulären Basalmembran, mit oder ohne Tubuluszelldegeneration	Je nach Ausprägungsgrad: mild - <b>1</b> mäßig - <b>2</b> stark - <b>3</b>
interstitielle Fibrose	beurteilt die Ablagerung vom fibrotischen Gewebe periglomerulär und peritubulär	Je nach Ausprägungsgrad: mild - <b>1</b> mäßig - <b>2</b> stark - <b>3</b>
fibrinöse Halbmonde	als solche werden fibrinreiche zirkuläre Ablagerungen innerhalb der Bowman'schen Kapsel bezeichnet	Je nach Anzahl betroffener Glomeruli < 25% - <b>1</b> 25-50% - <b>2</b> > 50% - <b>3</b>

## 2.4 Zelltransferstudien

### 2.4.1 Zellisolation

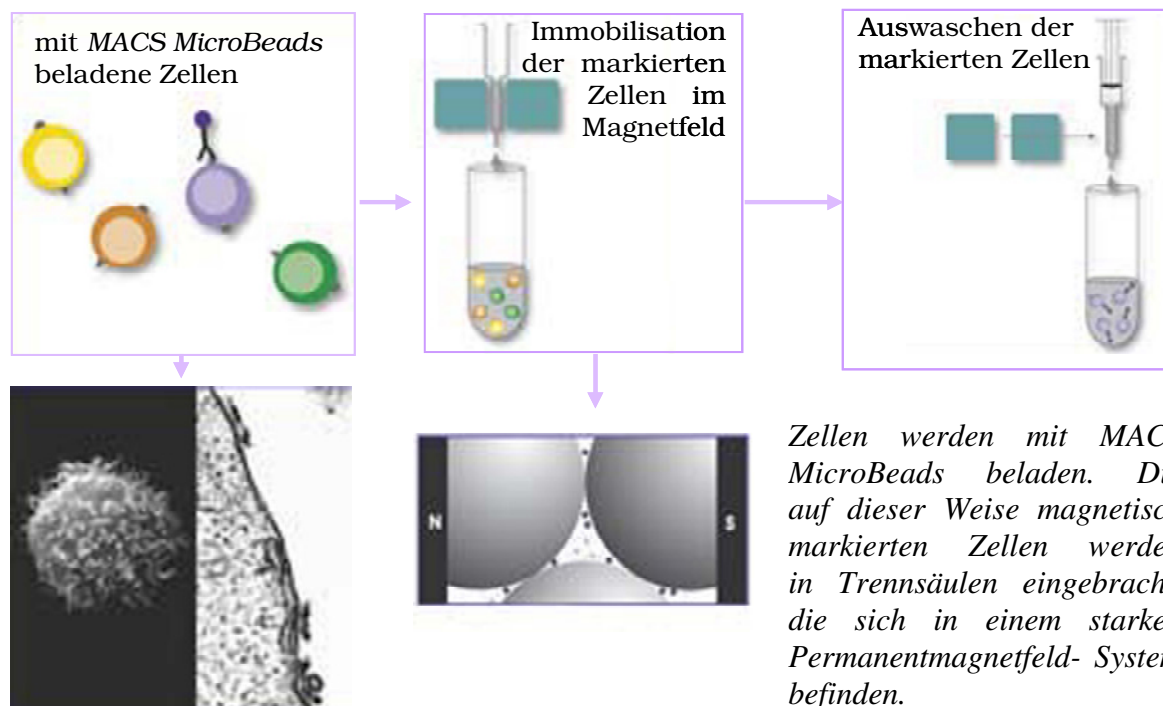
Im ersten Schritt wurde eine Zellsuspension aus Milzen von MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen folgendermaßen hergestellt: nach der Organentnahme wurden die Milzen in einer mit RPMI-Medium gefüllten Petrischale auf Eis mit Hilfe von Pinzetten zerkleinert und in ein Greiner-Röhrchen überpipettiert; nach Absetzen der festen Bestandteile wurde der Überstand zentrifugiert (5min, 300xg, 4°C, Heraeus Minifuge T, VWR International, Darmstadt, Deutschland) und das Pellet in 1ml PBS resuspendiert; nach dem Auszählen in einer Neubauer'schen Zählkammer und erneutem Zentrifugieren wurde das Pellet in 90µl MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert.

Im zweiten Schritt wurden aus der Zellsuspension CD8 T-Zellen und ERHR3 positive Makrophagen mittels MACS- Technologie isoliert.

Bei der MACS- Technologie (magnetische Zellisolierung) werden die Zellen mit *MACS MicroBeads* beladen. Die *MACS MicroBeads* sind circa 50nm durchmessende, bei Lichtmikroskopie unsichtbare, biodegradable (Eisen und Polysacchariden enthaltende), zellfreundliche magnetische Partikel, die an hoch

spezifische monoklonale Antikörper gebunden sind. Die auf dieser Weise magnetisch markierten Zellen werden in Trennsäulen eingebracht, die sich in einem starken Permanentmagnetfeld- System befinden. Das magnetische Feld ermöglicht eine Immobilisation und Trennung der positiven Zellen vom Rest des Gewebes. Somit können sowohl eine positive als auch eine negative Selektion, d.h. eine Depletion, erzielt werden. Die isolierten Zellen bleiben dabei vital und funktionsfähig, und stellen eine homogene Population dar. (90)

### **Abbildung 2.2: Prinzip der MACS MicroBeads Technologie (90)**



*Das magnetische Feld ermöglicht eine Immobilisation und Trennung der positiven Zellen vom Rest des Gewebes. Die isolierten Zellen bleiben dabei vital und funktionsfähig und stellen eine homogene Population dar*

Die CD8 T-Zellen wurden durch direkte Markierung mit CD8a (Ly-2) *MicroBeads* isoliert. Nach 15-minütiger Inkubation mit den *MicroBeads* (10µl pro  $10^7$  Zellen) bei  $10^0\text{C}$  wurden die ungebundenen *MicroBeads* mit dem 15-fachen des markierenden Volumens Puffer und 10-minütigem Zentrifugieren bei  $300\times g$  ausgewaschen und das Pellet in 500µl Puffer pro  $10^8$  Zellen resuspendiert. Die ERHR3 positive Makrophagen wurden zuerst mit *rat Anti-ERHR3*-Antikörper beladen (1h Inkubation bei Antikörperverdünnung von 1:50 in PBS) und nachher indirekt mit *goat Anti-Rat IgG MicroBeads* markiert. Nach Vorwaschen der sich im Magnetfeld des MACS-Separators befindenden LS-Trennsäulen mit 3ml Puffer wurden die Zellsuspensionen appliziert. Durch 3-maliges Waschen mit je 3ml Puffer wurden die negativen Zellen entfernt und daraufhin, außerhalb des Magnetfeldes, die selektierten Zellen mit 5ml Puffer ausgewaschen.

Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels FACS- Analyse geprüft.

## 2.4.2 Fluoreszenzmarkierung

Die Fluoreszenzmarkierung der Zellisolate erfolgte mit PKH26-GL (PKH26-GL red fluorescent cell linker kit, Exzitationsmaximum bei 551nm und Emissionsmaximum bei 567nm). Dazu wurden  $2 \times 10^7$  Zellen pro Probe in 25µl Restsupernatante und 1ml Diluent C resuspendiert. Nach Beifügen von 1ml frisch vorbereiteter  $4 \times 10^{-6}$ M PKH Lösung und 3 Minuten Inkubation wurde die Markierungsreaktion mit 1ml Serum gestoppt. Noch 1 Minute später wurden auch 3ml RPMI-Medium mit 10%-igem FCS dazugegeben. Die Suspension wurde im Anschluss über 10 Minuten bei 400xg zentrifugiert, 3-malig mit RPMI-Medium mit 10%-igem FCS gewaschen und lichtgeschützt bis Gebrauch auf Eis gelagert.

Die Anzahl lebender Zellen wurde mit Hilfe der Trypan-Blau-Exklusions-Methode festgestellt. Diese beruht auf der Durchlässigkeit der Zellmembran abgestorbener Zellen für Trypan-Blau. Nach Dilution eines kleinen Volumens der hergestellten Zellsuspension mit 0,4%-iger Lösung von Trypan-Blau wurde der Anteil gefärbter (d.h. gestorbener) Zellen bestimmt.

## 2.4.3 Injektionsprotokoll

Die isolierten und fluoreszenzmarkierten Zellen wurden über 30 Minuten entweder mit dem Vehikel (der 40%-igen Cyclodextrin-Lösung), oder mit 600µM BX471 Lösung inkubiert. Nach entsprechender Verdünnung wurden jeweils  $3,5 \times 10^5$  Zellen in 200µl isotonischer NaCl-Lösung MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Alter von 20 Wochen i.v. injiziert. Die Tiere, welche die mit BX471 vorbehandelten Zellen bekamen, wurden einmalig mit BX471 (50mg/kgKG) subkutan injiziert um einen Plasmaspiegel von BX471 zu erreichen. Nach 3 Stunden wurden die Mäuse getötet, die Nieren wurden im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.4.4 Präparation von Gefrierschnitten

Das eingefrorene Gewebe wurde in *Tissue Freezing Medium* (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) eingebettet. Auf einer Kryoschneidemaschine (RM2155, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden 5µm dicke histologische Schnitte gefertigt. Die Objektträger (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) wurden für 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, gefärbt, anschließend eingedeckt und mikroskopiert.

## 2.5 RNA- Analyse

### 2.5.1 RNA- Isolation

Für die getrennte Untersuchung von CCR1 mRNA in unterschiedlichen Zellpopulationen wurden Leukozyten aus der Milz sowie Tubuluszellen und Fibroblasten aus der Niere gewonnen. Die Isolation von Milz-Leukozyten erfolgte, wie bereits beschrieben (Kapitel 2.4.1), mittels der magnetischen *Micro Beads*. Die Tubulusepithelzellen wurden mittels Mikrodissektion, nach früher für humane Biopsien beschriebenem Protokoll, entnommen (35). Für die Isolation von renalen Fibroblasten wurden kleine

Gewebestücke von der Niere in DMEM, supplementiert mit 10%-igem FCS, Penicillin und Streptomycin, über 16 Tage inkubiert. Die adhärennten Zellen wurden dann mit Hilfe von 1,5mM EDTA gesammelt, und von Leukozyten mittels FITC-anti-mCD45 und anti-FITC MicroBeads gereinigt. Gesamt-Niere RNA wurde aus den schockgefrorenen Gewebestückchen Niere gewonnen.

RNA wurde nach der Chomczynski Methode isoliert. (34).

Die Nieren/isolierten Zellen wurden in Rundbodentuben mit 3ml einer Mercaptoethanol-enthaltenden zelllysierenden Lösung D gegeben und mit Hilfe eines Ultra-Turrax (IKA-Werke, Staufen, Deutschland) zerkleinert. Nach Zugabe von 300µl 2M Natriumacetat (pH4), 3ml Roti-Aqua-Phenol und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Mischung (49:1) wurde die Probe gemischt, 3min bei Raumtemperatur und 15min auf Eis aufbewahrt. Die Phasen der auf dieser Weise entstandenen Emulsion wurden durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 4<sup>0</sup>C und 3500xg getrennt und die wässrige, obere, RNA-enthaltende Phase (ca.3ml) in eine neue Falcon-Tube überpipettiert. Die RNA wurde durch Inkubation über 30min bei -30<sup>0</sup>C mit 3ml Isopropanol gefällt, der Überstand verworfen und das Pellet wieder in Lösung D im Wasserbad bei 56<sup>0</sup>C vollständig gelöst. Nach erneuter Fällung mit Isopropanol wurde das Pellet mit 80%-igem Ethanol (verdünnt mit DEPC-behandeltem Wasser) gewaschen, getrocknet und anschließend in 100µl DEPC-Wasser gelöst und bei -80<sup>0</sup>C aufbewahrt.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch gemessen. Die RNA wurde bei 56<sup>0</sup>C aufgetaut, in DEPC-Wasser verdünnt und die Extinktion wurde am Precision Microplate Reader (Emax, Molecular Devices) bei 260nm gemessen und mit dem Programm SOFTmax Pro Ver 1,2 ausgewertet.

## 2.5.2 Real-time RT-PCR

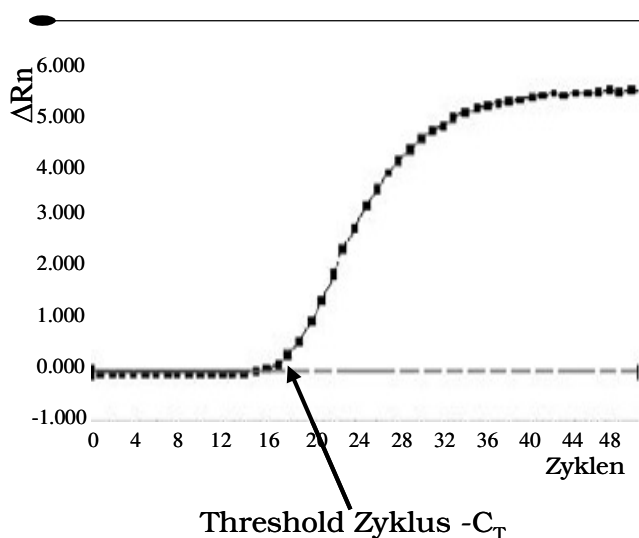
- Prinzip

Die real-time RT-PCR ist eine sensitive Methode für die quantitative mRNA- Analyse. Während bei der konventionellen PCR die Kopienmenge erst am Ende einer bestimmten Anzahl Amplifikationszyklen mit Hilfe elektrophoretischer Separation ermittelt wird, basiert die real-time RT-PCR auf fortlaufender Ermittlung der Reaktion mittels Fluoreszenzmarkierung und photometrischer Messung (Abbildung 2.3). Die gemessene Fluoreszenz zu jedem Zeitpunkt entspricht dabei der Menge des amplifizierten Produktes (162).

Maßgebend für die genaue Quantifizierung ist der so genannte Threshold Zyklus ( $C_T$ ), d.h. der erste Zyklus in dem sich die gemessene Fluoreszenz deutlich von dem Hintergrund-Signal unterscheidet. Je mehr Substrat am Anfang besteht, desto weniger Zyklen sind notwendig um eine signifikante Fluoreszenz zu messen (26).

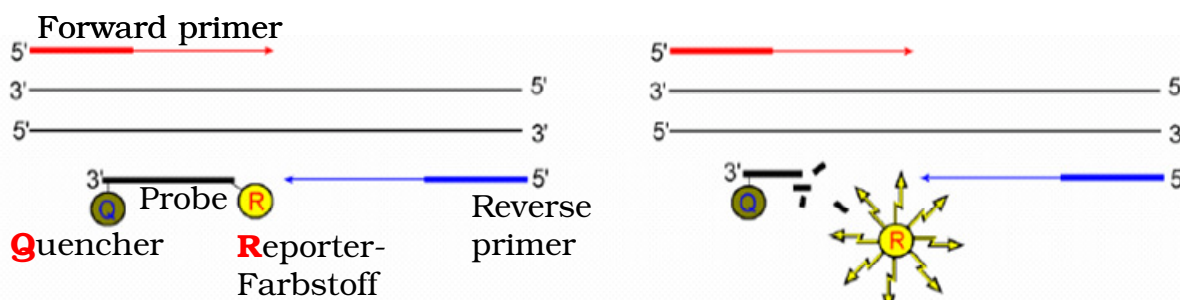
Somit hat die für die konventionelle Methode nachteilige Limitierung der Reaktion durch verbrauchte Reaktionskomponenten in der Plateauphase keinen Einfluss auf die Quantifizierung.



**Abbildung 2.3:** Linearer Amplifikations-Plot bei der *real time RT-PCR* Analyse

Die *real-time RT-PCR* basiert auf fortlaufender Überwachung der Amplifikationsreaktion, mittels Fluoreszenzmarkierung und photometrischer Messung. Die gemessene Fluoreszenz entspricht dabei der Menge des amplifizierten Produktes. Maßgebend für die genaue Quantifizierung ist der so genannte Threshold Zyklus ( $C_T$ ), d.h. der erste Zyklus in dem sich die gemessene Fluoreszenz deutlich vom Hintergrund-Signal unterscheidet. Je mehr Substrat am Anfang besteht, desto weniger Zyklen sind notwendig um eine signifikante Fluoreszenz zu messen

Die Fluoreszenz-Markierung des Produktes kann auf diverser Weise erfolgen. Eine spezifische, jedoch teure Methode ist die TaqMan PCR. Dabei werden neben beiden *Primern* auch sequenzspezifische *Proben* verwendet, die mit einem *Reporter Farbstoff* und *Quencher* konjugiert sind. Solange der *Reporter-* Farbstoff mit dem *Quencher* verbunden ist, wird die Fluoreszenz blockiert (*quenching*). Wird während der PCR das Konjugat durch die *Taq* DNA Polymerase gespalten, wird der *Reporter-Farbstoff* freigesetzt und es entsteht eine entsprechende Fluoreszenz. (Abbildung 2.4)

**Abbildung 2.4:** Prinzip der TaqMan-PCR

Neben den beiden *Primern* werden auch sequenzspezifische *Proben* verwendet, die mit einem *Reporter Farbstoff* und *Quencher* konjugiert sind. Solange der *Reporter-* Farbstoff mit dem *Quencher* verbunden ist, wird die Fluoreszenz blockiert (*quenching*). Wird während der PCR der Konjugat durch die *Taq* DNA Polymerase gespalten, wird der *Reporter-Farbstoff* freigesetzt und eine entsprechende Fluoreszenz entsteht.

- **Verwendete Proben(100nM) und Primer(300nM)**

- CCR1:** *Forward primer:* 5'-TTAGCTTCCATGCCTGCCTTATA-3'  
*Reverse primer:* 5'-TCCACTGCTTCAGGCTCTTGT-3'  
*Fluoreszenzmarkierte Probe (FAM):* 5'-ACTCACCGTACCTGTA-GCCCTCATTTCCC-3'
- CCR2:** *Forward primer:* 5'-CCTTGG-GAATGAGTAACTGTGTGA-3'  
*Reverse primer:* 5'-ACAAAGGCATAAATGACAGGATTAATG-3'  
*Fluoreszenzmarkierte Probe (FAM):* 5'-TGACAAGCACTTAGACCAGGCCATGCA-3'
- CCR5:** *Forward primer:* 5'-CAAGACAATCCTGATCGTGCAA-3'  
*Reverse primer:* 5'-TCCTACTCCCAAGCTGCATAGAA-3'  
*Fluoreszenzmarkierte Probe(FAM):*5'-TCTATACCCGATCCACAGGAGAACATGAAGTTT-3'
- Kollagen I:** *Forward primer:* 5'- TGCTTTCTGCCCGGAAG A-3'  
*Reverse primer:* 5'- GGGATGCCATCTCGTCCA-3'  
*Fluoreszenzmarkierte Probe (FAM):* 5'- CCAGGGTCTCCCTTGGGTCCTACATCT -3'
- TGFβ1:** *Forward primer:* 5'- CACAGTACAGCAAGGTCCTTGC-3'  
*Reverse primer:* 5'- AGTAGACGATGGGCAGTGGCT-3'  
*Fluoreszenzmarkierte Probe (FAM):* 5'- GCTTCGGCGTCACCGTGCT -3'
- GAPDH:** *Forward primer:* 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCTTA-3'  
*Reverse primer:* 5'-ATGCCTGCTTACCACCTTCT-3'  
*Fluoreszenzmarkierte Probe (VIC):* 5'-CCCAATGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'

- **Verwendete Geräte und Software**

TaqMan ABI 7700 Sequence Detection System (PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland)

Sequence Detection Systems 1.7-

### 2.5.3 RNase-Protection-Assay

- **Prinzip**

Die *ribonuclease protection assay* ist eine sehr sensible Methode für quantitative spezifische RNA-Analyse (44). Zuerst wird mit Hilfe von DNA-abhängigen RNA Polymerasen eine spezifische Radionuklid- oder Biotin-markierte RNA-Probe synthetisiert. Diese wird dann in vitro mit der isolierten RNA hybridisiert. Die nicht hybridisierten Einzelstrang-RNAs werden enzymatisch mittels RNA-sen gespalten und die in der Lösung gebliebenen Hybride elektrophoretisch getrennt und quantifiziert. Bei Überschuss an markierter Probe-RNA ist die Menge an gebildeten Hybriden der Target-RNA proportional.

Die Vorteile der RNase-Protection Assay gegenüber des *Northern blots* betreffen hauptsächlich die Detektion von relativ schwach exprimierten Genen. Im Vergleich zur quantitativen RT-PCR ist die Durchführung einer Multi-probe Assay möglich, bei vergleichbarer Sensitivität beider Methoden (d.h. mehrere Gen-Expressionen werden gleichzeitig untersucht).

---

- **Verwendete Proben, Geräte und Software**

Zur Synthese von spezifischen radiomarkierten RNA-Proben wurde das Multiprobe Template Set von Maus-CC-Chemokinen verwendet. Nach Hybridisierung der markierten Proben mit der isolierten Gesamt-Niere-RNA erfolgte eine Quantifizierung am Storm 840 PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) mit Hilfe des Image Quant Software (Molecular Dynamics).

#### 2.5.4 *In situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung (ISH) ist ein Verfahren mit dem einerseits spezifische Nukleinsäuren (DNA, RNA) am Gewebeschnitt nachgewiesen werden können, andererseits aber ist auch eine morphologische Lokalisierung der Expression möglich.

Zur ISH für TGF $\beta$  wurde paraffineingebettetes Gewebe benutzt. Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe rehydriert. Nach einem Waschschrift mit 0.5x SSC wurde das Gewebe mit Proteinase K für 30 min bei 37°C behandelt. Die Schnitte wurden dann 3-malig in 0,5xSSC gewaschen, dehydriert und Luft getrocknet. Die somit vorbereiteten Schnitten wurden über 2 Stunden mit Prähybridisierungspuffer bei 50°C inkubiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 500,000-700,000 cpm <sup>35</sup>S-markierte Riboprobe/Schnitt (TGF $\beta$ 1- Department of Cell Biology, Vanderbilt University, Nashville, TN) in 50 $\mu$ l Prähybridisierungspuffer, bei 50°C, über Nacht. Mit RNase wurde für 30 min bei 37°C die ungebundene Probe gespalten. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (versetzt mit 0.3 M Ammonium Acetate) dehydriert und Luft getrocknet. Die Exposition erfolgte nach Behandlung mit NTB2 Emulsion in einer dunklen Kammer bei 4°C für 2 bis 8 Wochen. Die Schnitte wurden dann mit Hämalaun/Eosin gegengefärbt, dehydriert und mit Histomount eingedeckt (136).

## 2.6 *Biochemische Analysen*

### 2.6.1 Serumharnstoff

Die Serumkonzentration vom Harnstoff wurde nach einer 1:2 Verdünnung mittels der Urease/Glutamat-Dehydrogenase-Methode mit Hilfe eines Hitachi Autoanalyzers bestimmt.

### 2.6.2 Proteinurie

Die Proteinkonzentration im Urin wurde mittels einer **Bradford Analyse** vor Beginn und nach Abschluss der BX471 Behandlung bestimmt.

Dazu wurde vor jeder Bestimmung eine Standardreihe von BSA-Lösungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 1 / 2,5 / 5 / 10 / 15 / 20 und 25  $\mu$ g/ml. Die Urinproben wurden jeweils 1:500 und 1:1000 verdünnt. 200 $\mu$ l je Lösung wurden auf eine 96-well Platte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) aufgetragen, 50 $\mu$ l Bio-Rad-Reagenz dazugegeben und über 10 min inkubiert. Die

Extinktion wurde mit einem Precision Microplate Reader (Emax, Molecular Devices) bei 600nm gemessen und mit dem Programm SOFTmax Pro Ver 1,2 ausgewertet.

Die Kreatinin-Konzentration im Urin in der 24. Woche wurde nach einer Verdünnung von 1:20 am Hitachi Autoanalyzers gemessen und die Proteinurie als mg Eiweiß pro mg Kreatinin ausgerechnet.

## 2.7 Analyse der humoralen Immunität

### 2.7.1 DNA- Autoantikörper im Serum

Zur Abschätzung der humoralen Immunität beim SLE wurde der Titer von Anti- DNA IgG Antikörpern sowie deren IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>2a</sub>-Subfraktionen im Serum mittels ELISA bestimmt. Eine 96-well Platte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) wurde mit DNA Proben beschichtet (200µl pro Well, 1:10000 Verdünnung mit SSC, Inkubation über Nacht bei 4<sup>0</sup>C). Nach Waschen mit 0,05% Tween in PBS wurden Serum Verdünnungen in Titerstufen (1:512; 1:1024; 1:2048; 1:3072; 1:4096; 1:6144; 1:8192; 1:16384) aufgetragen und 60 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen folgte eine 30-minütige Inkubation mit den Biotin- konjugierten, gegen IgG, IgG<sub>1</sub> oder IgG<sub>2a</sub> gerichteten Detektionsantikörpern (Tabelle 2.5). Im Anschluss, nach je einem Waschschrift, wurde eine Streptavidin-Markierung der gebildeten Immunkomplexe und darauf folgender ABTS-Entwicklung durchgeführt. Die Extinktion wurde mit einem Precision Microplate Reader (Emax, Molecular Devices) bei 450nm gemessen und mit dem Programm SOFTmax Pro Ver 1,2 ausgewertet.

### 2.7.2 Glomeruläre Immunkomplex-Ablagerungen

Am Kryotom (RM2155, Leica, Bensheim, Deutschland) wurden 5µm dicke Schnitte vom in *Tissue Freezing Medium* (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) eingebetteten Gewebe gefertigt. Die Objektträger wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, dann in kaltem Aceton 10min bei – 20<sup>0</sup>C fixiert und anschließend für weitere 20 Minuten luftgetrocknet. Die übliche Blockade des endogenen Avidin und Biotin und der Peroxidaseaktivität wurde (wie in Kapitel 2.3.4. beschrieben) durchgeführt. Nach 60 Minuten Einwirkzeit des biotinierten Primäantikörpers (Tabelle 2.5), gerichtet jeweils gegen IgG<sub>1</sub> oder IgG<sub>2a</sub> und in einer Verdünnung von 1:50 aufgetragen, wurden die immobilisierten Antikörper mittels Streptavidin-Peroxidase markiert und mit AEC entwickelt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun.

**Tabelle 2.5: Primärantikörper an Gefrierschnitten:**

<b>Antigen</b>	<b>Blockierung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
anti-IgG	Peroxidase Avidin Biotin	1:200	Ratte	DAKO, Hamburg, Deutschland
anti-IgG <sub>1</sub>	Peroxidase Avidin Biotin	1:50	Ratte	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
anti-IgG <sub>2a</sub>	Peroxidase Avidin Biotin	1:50	Ratte	Pharmingen, Hamburg, Deutschland

Die Auswertung der glomerulären Signale erfolgte semiquantitativ als durchschnittlicher Index ermittelt von jeweils 15 Glomeruli pro Schnitt mit den folgenden Kriterien:

- |                     |                   |
|---------------------|-------------------|
| 0- kein Signal      | 2- mäßiges Signal |
| 1- schwaches Signal | 3- starkes Signal |

## 2.8 Statistische Auswertung

Es wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Mittels der univariaten Varianzanalyse wurden die Gruppen gegeneinander untersucht. Statistische Signifikanz wurde ab einem p-Wert kleiner 0,05 definiert.

---

## 2.9 Lösungen und Reagenzien

### 2.9.1 Chemikalien

ABTS	Boehringer Mannheim, Deutschland
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
AEC Substrat Packung	Biogenex, San Ramon, USA
Äther	Merck, Darmstadt, Deutschland
Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, USA
APES	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
Avidin-Biotin-Blocking-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Bio-Rad-Reagenz	Bio-Rad Laboratories, California, USA
Bovines Serum Albumin	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
BX471	Berlex Biosciences, Richmond, USA
Cyclodextrin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DEPC	Fluka, Buchs, Switzerland
Diluent C für PKH26-GL	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM	Gibco/BRL, Paisley, UK
EDTA	Calbiochem, SanDiego, USA
Eosin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Formalin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämalaun, Mayers	Merck, Darmstadt, Deutschland
Histomount	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Label	Biogenex, San Ramon, USA
Magermilch	Merck, Darmstadt, Deutschland
MACS-MicroBeads- CD8a; Anti-Rat; anti-FITC IgG	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS-Puffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Merkaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

---

Multiprobe Template Set von Maus-CC-Chemokinen	Pharmingen, San Diego, CA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
NTB2 Emulsion	Eastman Kodak, Rochester, USA
Penicillin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Primer für real time RT-PCR	Metabion, Planegg-Martinsried, Deutschland
Protease	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
PKH26 Red Fluorescent Cell Linker (Kit for General Cell Membrane Labelling)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Roti-Aqua-Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Phenol/Chloroform (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol = 25:24:1)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-Medium	Gibco/BRL, Paisley, UK
Salzsäure 5N	Merck, Darmstadt, Deutschland
SSC (Saline-sodium citrate Puffer)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tissue Freezing Medium	Leica, Nussloch, Deutschland
Trypan Blue	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Tween	Fluka, Buchs, Switzerland
Wasserstoffperoxid	DAKO, Hamburg, Deutschland
Xylol	Merck, Darmstadt, Deutschland

## 2.9.2 Lösungen

### APES-Lösung

5 ml APES  
in 245 ml Aceton

### 10x Citratpuffer

110 mM Natriumcitrat  
in ddH<sub>2</sub>O  
mit 2N NaOH auf pH 6 einstellen

### 20x PBS

2,74 M NaCl  
54 mM KCl  
30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
130 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
in ddH<sub>2</sub>O  
mit HCl auf pH 7,5 einstellen

### Lösung D

4M Guanidinium Thiocyanat  
25mM Natriumcitrat, pH 7  
0.5% Sarcosyl  
0.1M  $\beta$ -Mercaptoethanol



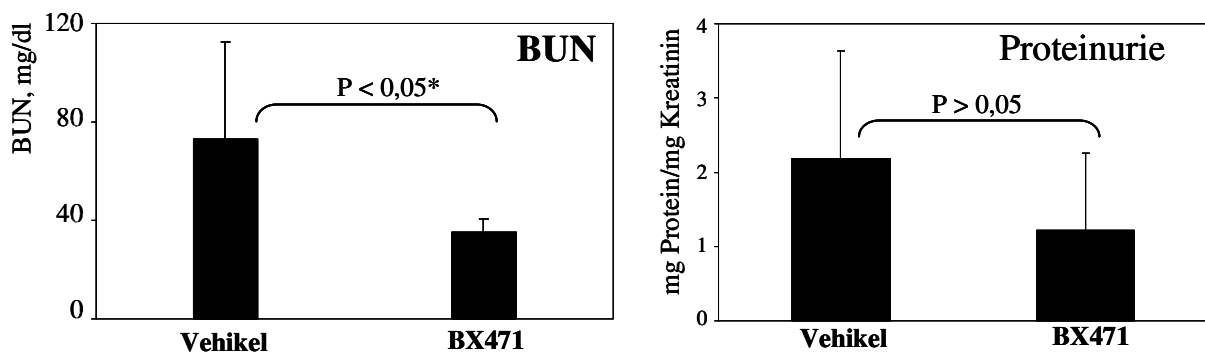
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nierenfunktion

Der Studie lag die Hypothese zugrunde, dass eine spät begonnene Blockade von Chemokinrezeptor CCR1 die renale Schädigung beim Maus-Lupusmodell reduzieren könnte. Als Marker der renalen Funktion wurde bei den untersuchten Tieren die Harnstoff-Konzentration im Serum gemessen. Die glomeruläre Schädigung wurde an Hand der Proteinurie funktionell beurteilt. Die mit Vehikel behandelten MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse zeigten im Alter von 24 Wochen eine eingeschränkte Nierenfunktion mit erhöhtem Serumharnstoff (BUN=73,1mg/dl±39,6). Als Marker der glomerulären Schädigung ließ sich eine Proteinurie von 2,1±1,5 mg/mg Kreatinin feststellen.

Die 4-wöchige Behandlung mit dem CCR1 Antagonisten BX471, begonnen in der 20.Woche, bewirkte eine Verbesserung der Nierenfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe, ablesbar am signifikant niedrigeren Serumharnstoff (BUN=35,1mg/dl±5,3). Die Proteinurie blieb dagegen unbeeinflusst von der BX471 Gabe (1,2±1,0mg Eiweiß/mg Kreatinin). Aus diesen Befunden geht hervor, dass die späte CCR1 Blockade die Nierenfunktion bei diesem Modell der Lupusnephritis verbessert. Die glomeruläre Schädigung wird dagegen nicht beeinflusst.

**Abbildung 3.1: Nierenfunktion in der 24. Woche: BUN und Proteinurie**



Die 4-wöchige Behandlung mit dem CCR1 Antagonisten BX471 begonnen in der 20.Woche bewirkte eine Verbesserung der Nierenfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe, ablesbar am signifikant niedrigeren Serumharnstoffwert: Vehikel-73,1mg/dl±39,6 vs BX471-35,1mg/dl±5,3). Die Proteinurie blieb dagegen unbeeinflusst von der BX471 Gabe: Vehikel-2,1±1,5 vs BX471- 1,2±1,0mg Eiweiß/mg Kreatinin).

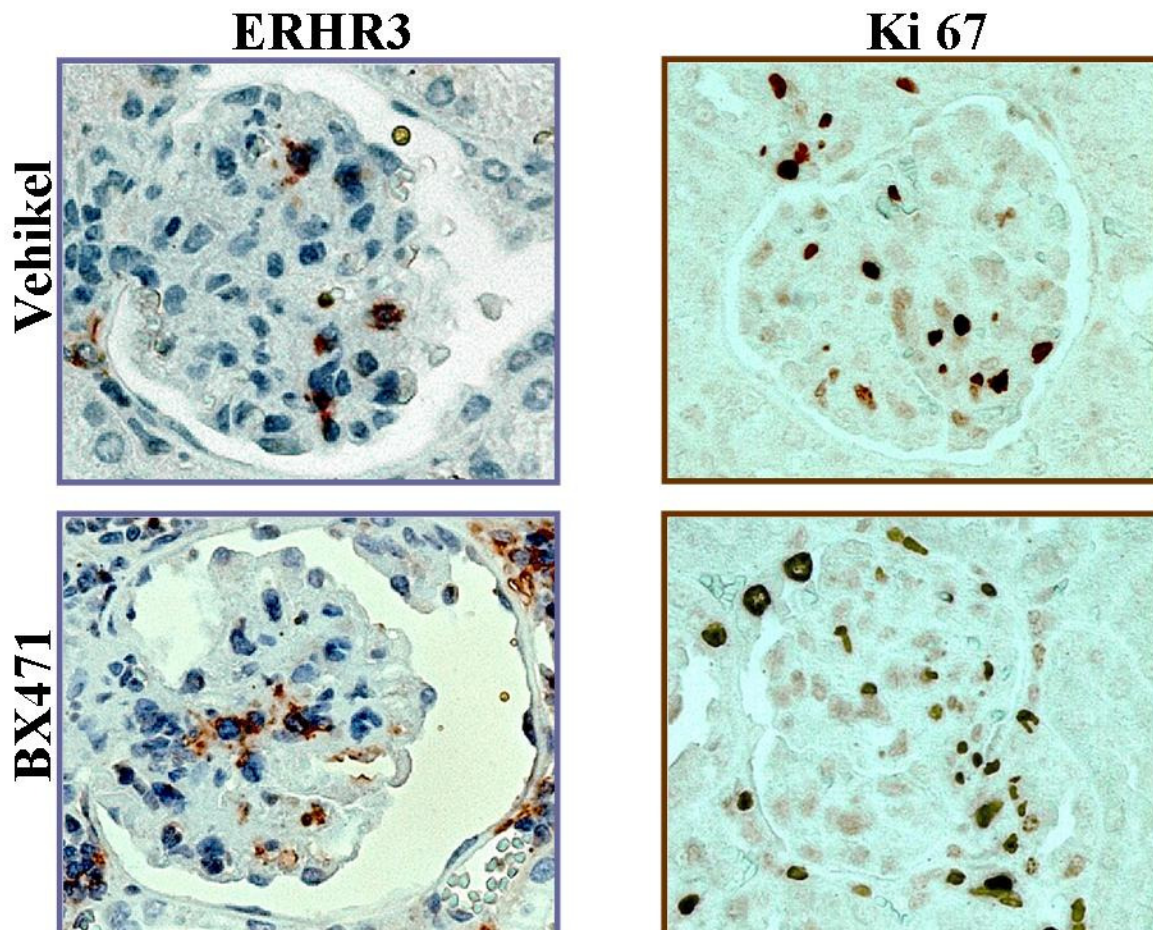
### 3.2 Glomeruläre Schädigung

Die trotz BX471 Gabe gebliebene funktionelle glomeruläre Dysfunktion wurde daraufhin mit den morphologischen Veränderungen im Glomerulus verglichen.

#### Abbildung 3.2: Marker der glomerulären Schädigung

Marker der glomerulären Erkrankung	Vehikel Gruppe	BX471 Gruppe
Makrophagen, <i>ERHR3</i> , Zellen/Glom	1,2 ± 1,2	1,1 ± 0,3
T-Lymphozyten, <i>CD3</i> , Zellen/Glom	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1
proliferierende Zellen, <i>Ki67</i> , Zellen/Glom	5,8 ± 1,4	5,8 ± 1,1
Aktivitätsindex. Punkte	8,0 ± 4,6	4,0 ± 0,9

*Trotz BX471-Behandlung waren die glomerulären Veränderungen in beiden Gruppen gleich. Es fand sich eine Makrophagen Infiltration. T-Lymphozyten waren nur selten in den Glomeruli nachweisbar. Im Sinne eines gesteigerten Zell-Umsatzes war die Anzahl proliferierender (Ki-67 positiver) Zellen in den Glomeruli hoch. Da diese Parameter bei der Ermittlung des Aktivitätsindex beachtet werden, ergab sich auch da kein signifikanter Unterschied.*



Bei den mit Vehikel behandelten MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen wurde im Alter von 24 Wochen eine diffuse mesangioproliferative Glomerulonephritis mit Halbmondbildung und einem hohen Aktivitätsindex festgestellt (ausgerechnet anhand des Vorhandenseins und des Ausprägungsgrades der glomerulären Proliferation und Leukozyten-Infiltration, der glomerulären Karyorrhexis und fibrinoide Nekrose, der zellulären Halbmonde, der Hyalin-Ablagerungen in den Glomeruli sowie der interstitiellen Inflammation). Zur Beurteilung der Leukozyten-Infiltration wurden immunhistologische Färbungen gefertigt, die jeweils ERHR3 positive Makrophagen oder CD3 positive T-Lymphozyten darstellten. Es fand sich eine glomeruläre Makrophagen-Infiltration ( $1,2 \pm 1,2$  Zellen/Glom). T-Lymphozyten waren hauptsächlich periglomerulär im Bereich von Halbmonden lokalisiert. Im Sinne eines gesteigerten Zellumsatzes war die Anzahl proliferierender (Ki-67 positiver) Zellen in den Glomeruli hoch.

Bei den mit BX471 behandelten Tieren wurde histologisch auch das Bild der diffusen mesangioproliferativen Glomerulonephritis festgestellt. Der Aktivitätsindex war etwas niedriger, der Unterschied zur Vehikelgruppe jedoch nicht signifikant. Die Leukozyten-Infiltrate sowie die Proliferationsrate in den Glomeruli blieben unverändert zur Kontrollgruppe (Abb.3.2).

Apoptotische (ssDNA positive) Zellen ließen sich immunhistologisch in beiden Gruppen kaum nachweisen.

Somit waren die morphologischen glomerulären Merkmale mit den funktionellen Befunden konsistent. Daraus kann ein fehlender Effekt von BX471 für die glomeruläre Erkrankung abgeleitet werden.

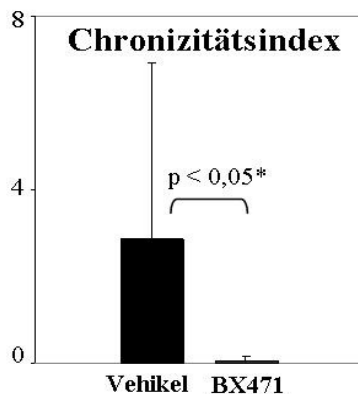
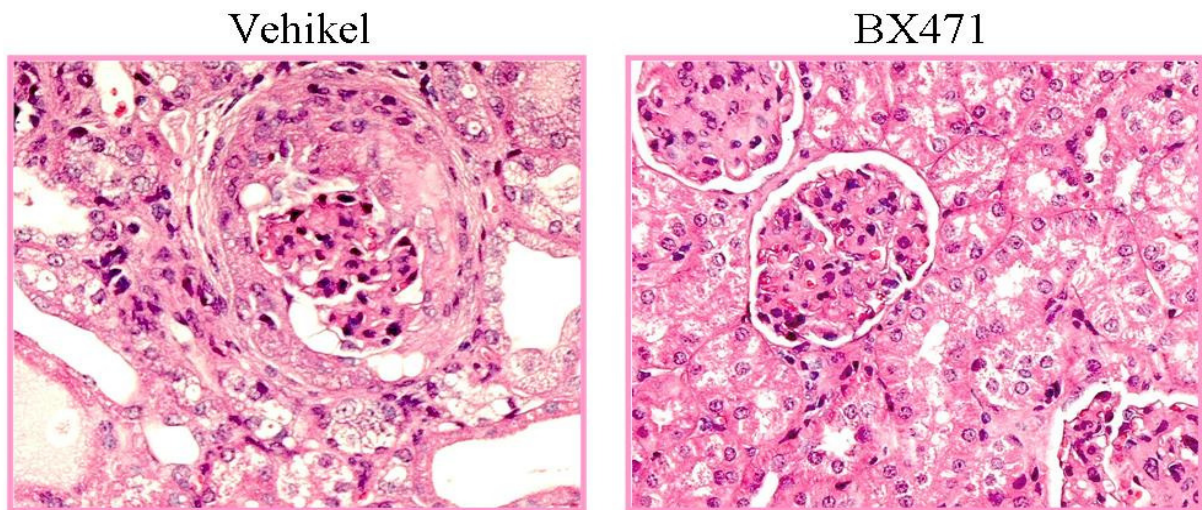
### **3.3 Tubulointerstitielle Schädigung**

Die tubulointerstitielle Schädigung wird für den progredienten Nierenfunktionsverlust chronischer Nierenerkrankungen verantwortlich gemacht. Auf dieser Grundlage wurde das Interstitium in beiden Gruppen hinsichtlich Fibrose-Ausmass und Leukozyten-Infiltration untersucht. Bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen der Kontrollgruppe war das histopathologische Bild im Alter von 24 Wochen von diffuser tubulointerstitieller Schädigung mit tubulärer Atrophie, mononukleären Leukozyten-Infiltraten und konfluierenden Arealen tubulointerstitieller Fibrose geprägt. In der mit BX471 behandelten Gruppe dagegen blieb die renale Gewebestruktur weitgehend erhalten.

#### **3.3.1 Tubulointerstitielle Fibrose**

Bei den mit BX471 behandelten Tieren fand sich in der routinemäßigen HE Färbung im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Abnahme der renalen Fibrose ohne ausgeprägte tubuläre Atrophie oder konfluierende Areale interstitieller Fibrose. Dementsprechend erreichte bei dieser Gruppe der auf die interstitiellen Veränderungen bezogene Chronizität-Index (ausgerechnet anhand der glomerulären Sklerose, der fibrösen Halbmonden, der tubulären Atrophie und der interstitiellen Fibrose) kaum Werte größer 0 (bei einem Maximalwert von 12), wohingegen die Kontrolltiere im Durchschnitt 30-mal höhere Punktzahl erhielten.

**Abbildung 3.3: HE Färbung und Chronizitätsindex**



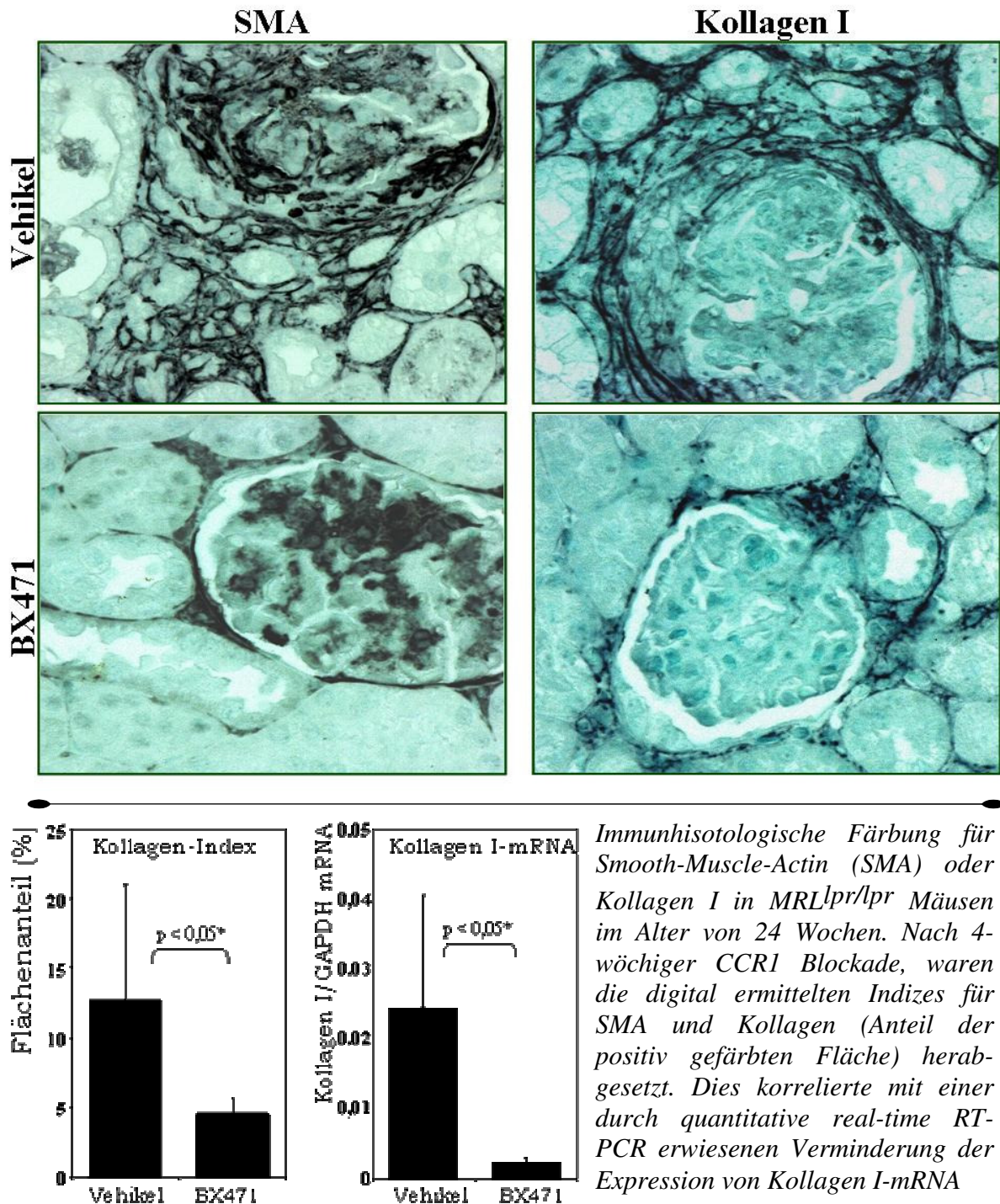
*Hämalaun-Eosin Färbung bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Alter von 24 Wochen. Bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen der Kontrollgruppe war das histopathologische Bild im Alter von 24 Wochen von diffuser tubulointerstitieller Schädigung mit tubulärer Atrophie, mononukleären Leukozyten Infiltraten und konfluierenden Arealen tubulointerstitieller Fibrose geprägt. In der mit BX471 behandelten Gruppe dagegen blieb die renale Gewebestruktur weitgehend erhalten und der Chronizitätsindex wurde dadurch signifikant gesenkt.*

Da die tubulointerstitielle Fibrose mit einer gesteigerten interstitiellen Matrixablagerung einhergeht, wurde mittels immunhistologischer Färbung die Deposition von Kollagen I in beiden Gruppen verglichen. Der digital ermittelte Index, der den prozentualen Anteil der positiv gefärbten Fläche angibt, war wesentlich vermindert in den mit dem CCR1-Antagonisten behandelten Mäusen (Vehikel-  $12,78 \pm 8,2$  vs BX471-  $4,58 \pm 1,11$ ). Für Kollagen I wurde eine ca.10-fach verminderte Expression mittels quantitativer real-time RT-PCR auch auf der mRNA-Ebene nachgewiesen

Aktivierte Fibroblasten zeigen dazu einen gemischten Fibroblast-Glattmuskellzell-Genexpressionsmuster. Diese so genannten Myofibroblasten exprimieren *smooth-muscle-actin* (SMA) und tragen somit zur Schrumpfung des Gewebes bei. Die interstitielle Expression von SMA wurde daraufhin digital mit Hilfe einer Bildanalyse-Software anhand der immunhistologischen Färbung ermittelt. Als Marker einer herabgesetzten Aktivität des Fibrose-Prozesses in den mit BX471 behandelten Tieren war der SMA Index in dieser Gruppe vermindert (Vehikel  $15,87 \pm 8,2$  vs BX471  $10,31 \pm 2,8$ ).

Diese Ergebnisse implizieren eine positive Auswirkung der CCR1 Blockade hinsichtlich der tubulointerstitiellen Schädigung, der Einschränkung der interstitiellen Matrixablagerung und der Fibroseaktivität in der Niere.

**Abbildung 3.4: Tubulointerstitielle Fibrose**

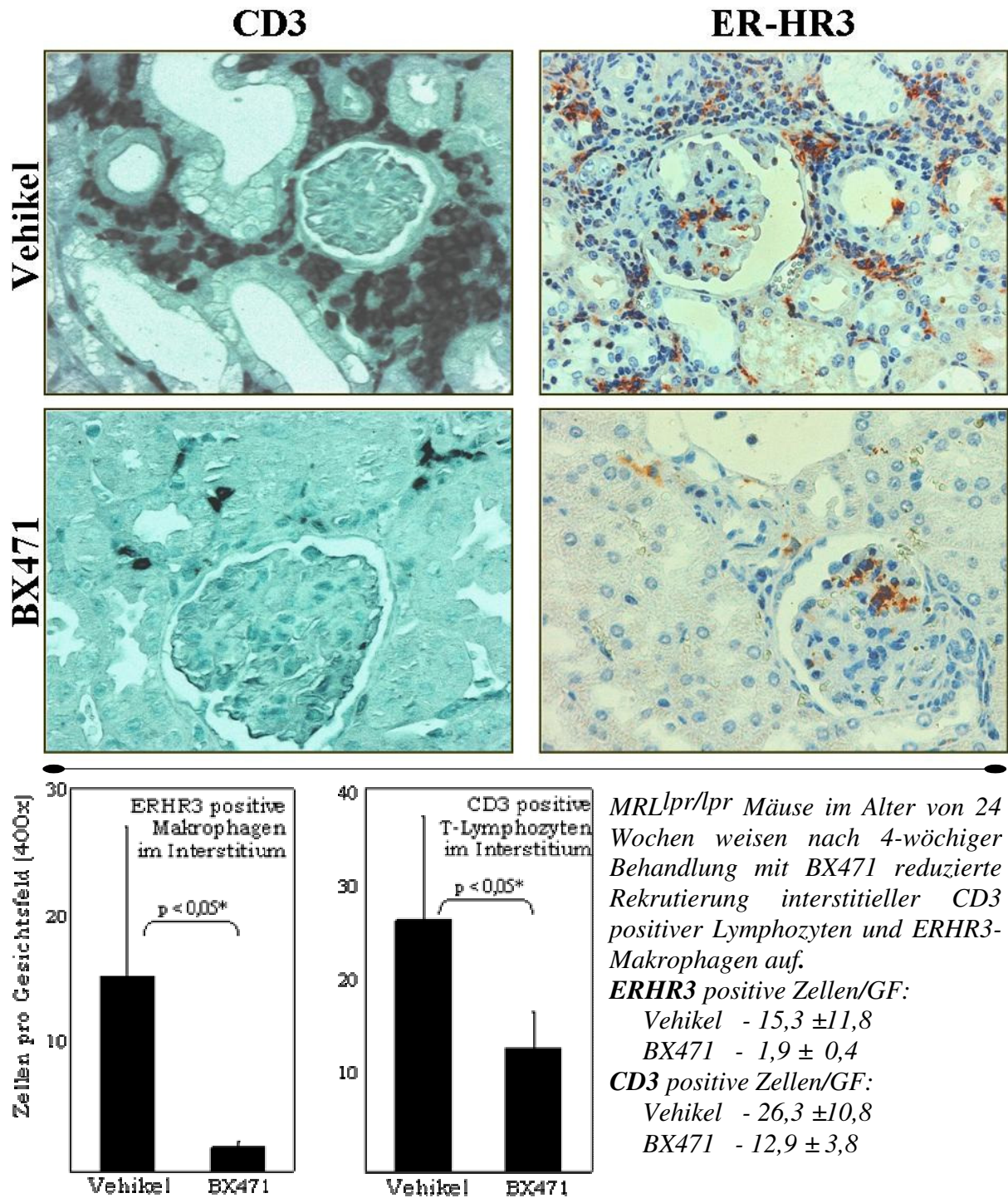


### 3.3.2 Leukozyten-Infiltration

Den interstitiellen Leukozyten-Infiltraten wird eine wichtige Rolle für die Progression der renalen Erkrankung zugesprochen. Daraufhin wurden die infiltrierenden Zellen nach der 4-wöchigen Behandlung mit Vehikel oder BX471 mittels immunhistochemischer Färbung quantifiziert. Die Anzahl ERHR3 positiver Makrophagen (Vehikel 15,3±11,8 vs BX471 1,9±0,4 Zellen/GF) und CD3 positiver Lymphozyten (Vehikel 26,3±10,8 vs BX471 12,9±3,8 Zellen/GF) im interstitiellen Kompartiment war bei

den mit BX471 behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger. Demzufolge ist von einer entscheidenden Rolle von CCR1 für die interstitielle Leukozyten-Infiltration in der Niere auszugehen.

**Abbildung 3.5: Tubulointerstitielle Leukozyten- Infiltration**



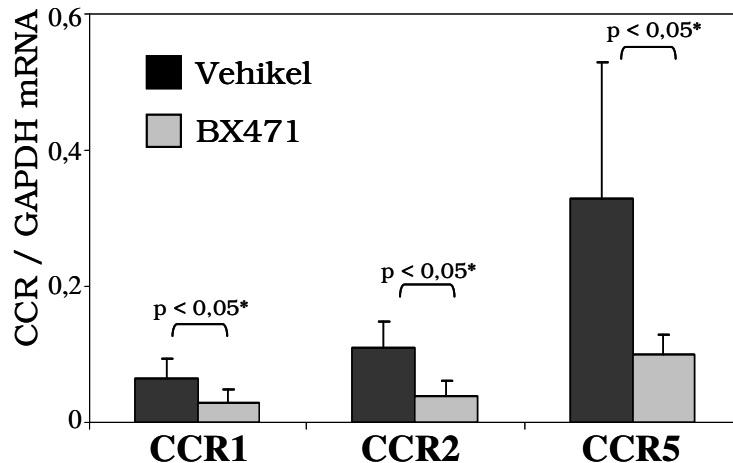
*MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse im Alter von 24 Wochen weisen nach 4-wöchiger Behandlung mit BX471 reduzierte Rekrutierung interstitieller CD3 positiver Lymphozyten und ERHR3-Makrophagen auf.*

**ERHR3 positive Zellen/GF:**  
Vehikel - 15,3 ± 11,8  
BX471 - 1,9 ± 0,4  
**CD3 positive Zellen/GF:**  
Vehikel - 26,3 ± 10,8  
BX471 - 12,9 ± 3,8

Weiterhin sind Leukozyten bekanntermaßen Hauptträger der Chemokinrezeptor-Expression in der Niere (139). Für Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 war in der Gesamtniere-RNA bei der mit

Vehikel behandelten Gruppe eine starke Expression mittels *real-time* RT-PCR festzustellen. In der BX471 Gruppe hingegen hatte sie parallel zur eingeschränkten Leukozyten-Infiltration signifikant nachgelassen.

**Abbildung 3.6: Chemokinrezeptor-Expression**



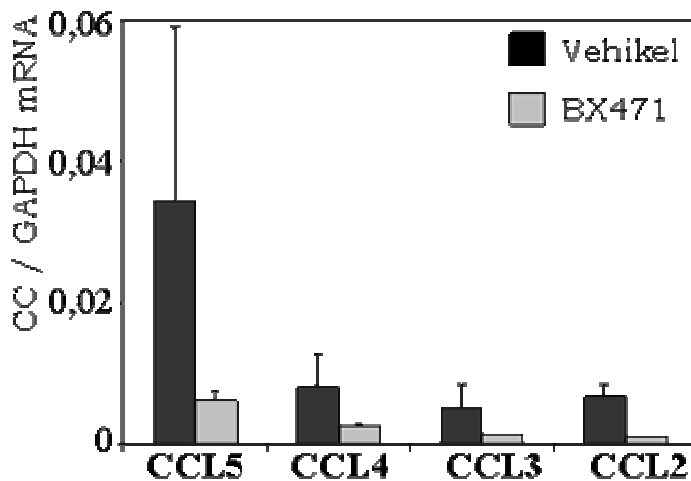
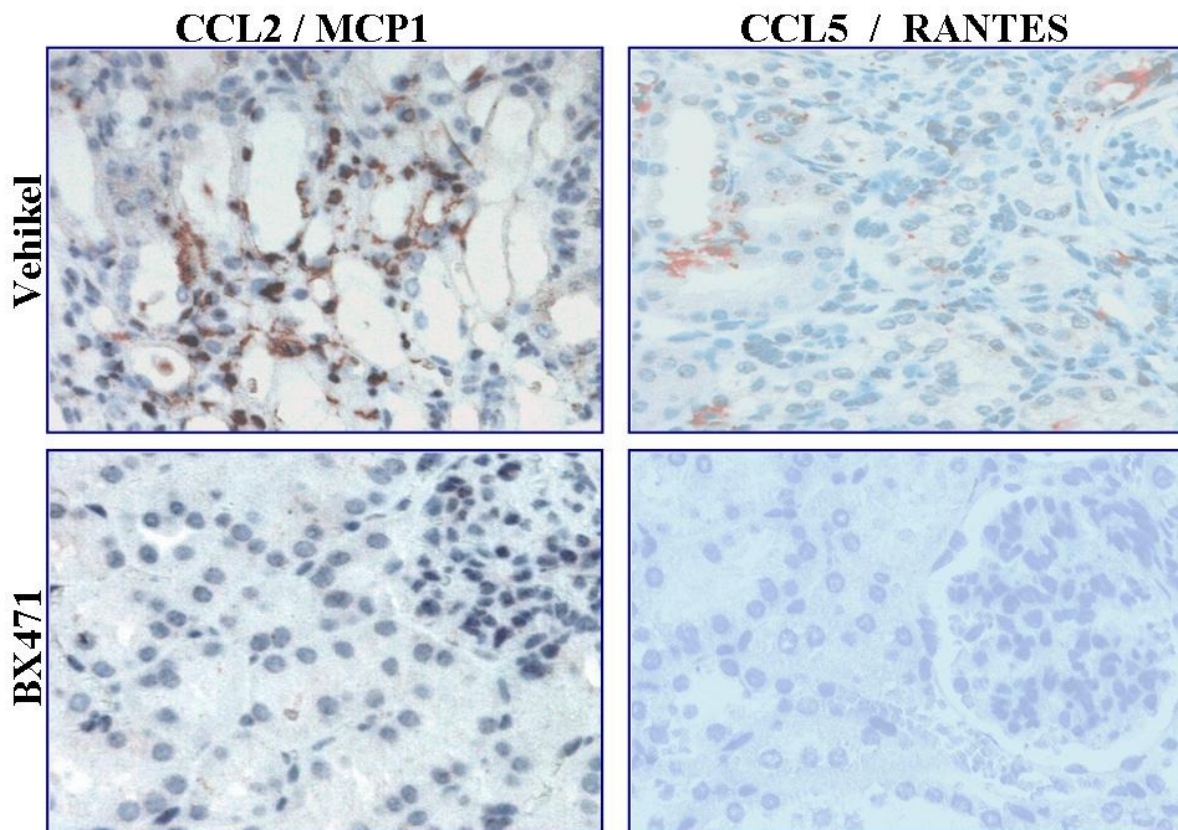
*Die Expression von Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 wurde mittels real-time RT-PCR quantifiziert. In der Gesamtniere RNA war bei der mit Vehikel behandelten Gruppe eine starke Expression festzustellen. In der BX471 Gruppe hingegen hatte sie parallel zur eingeschränkten Leukozyten Infiltration signifikant nachgelassen.*

### 3.3.3 Renale Expression von Chemokinen

Die fortschreitende renale Schädigung ist mit einer fortwährenden entzündlichen Reaktion verbunden. Daraufhin wurde die Intensität der proinflammatorischen Signale in beiden Gruppen anhand der Chemokinexpression in der Niere untersucht. Diese war in der BX471 Gruppe parallel zur verbesserten Nierenmorphologie, mit Abnahme der Leukozyten-Infiltrate und der Parenchymschädigung, infolge der CCR1 Blockade signifikant reduziert.

Die Chemokinexpression wurde sowohl auf der mRNA Ebene als auch auf der Protein Ebene untersucht. Mittels *Multi-Probe RNase-Protection* Analyse für CC-Chemokine konnte gezeigt werden, dass die BX471 Behandlung den Expressionsanstieg mehrerer CC-Chemokine, inklusive CCL5, CCL2, CCL4 und des CCR1 Liganden CCL3, weitgehend verhindern konnte. Zur Lokalisation der Chemokinexpression in der Niere wurde eine immunhistologische Färbung für CCL2 und CCL5 gefertigt. Die positiven Zellen kolokalisierten mit den Leukozyten-Infiltraten und waren deutlich geringer bei den mit BX471 behandelten Tieren. Diese Befunde unterstützen das Konzept, dass eine Linderung der renalen Schädigung von einer Down-Regulation der proinflammatorischen Stimuli abhängig ist.

**Abbildung 3.7: Renale Expression von Chemokinen**

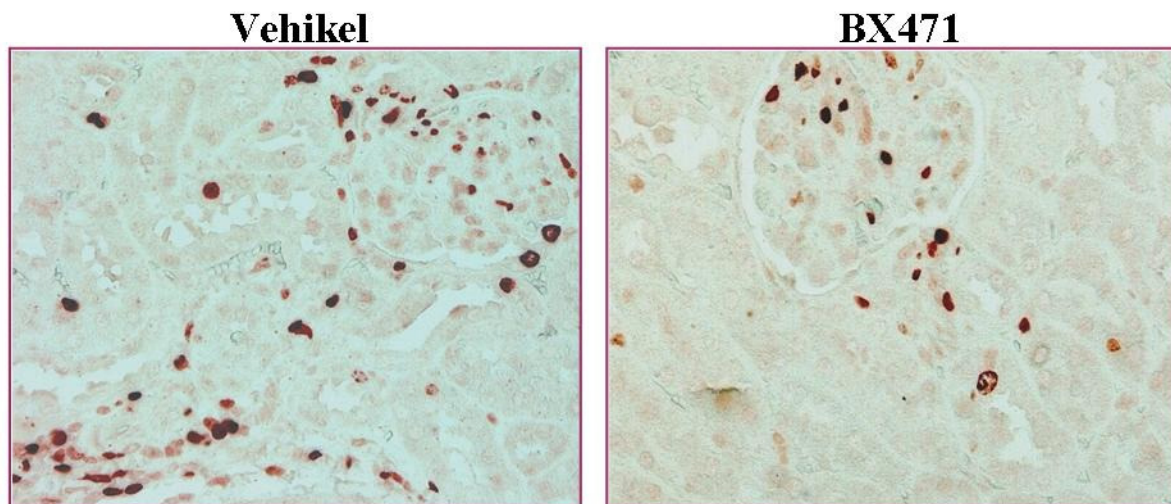


*Die infolge der CCR1-Blockade verbesserte Nierenfunktion wurde von einer Abnahme der Intensität proinflammatorischer Signale in der Niere begleitet. Die Chemokinexpression wurde sowohl auf der mRNA -Ebene (mittels Multi-Probe RNase-Protection Assay), als auch auf der Protein-Ebene (mit immunhistologischer Färbung) untersucht*

### 3.3.4 Zellumsatz

Die Ermittlung der Proliferationsaktivität wird zusätzlich zu den üblichen histologischen Parametern zur Beurteilung der Krankheitsaktivität verwendet und korreliert mit der Fibroseaktivität (99). Bei der Kontrollgruppe bestand eine hohe Proliferations- und Apoptoserate im tubulointerstitiellen Kompartiment. Nach 4-wöchiger Behandlung mit dem CCR1 Antagonisten, parallel zur Abnahme der Fibrose, konnte die Anzahl Ki-67 positiver proliferierender Zellen sowie ssDNA-positiver apoptotischer Zellen im Tubulointerstitium, signifikant reduziert werden.



**Abbildung 3.8: Apoptose und Proliferationsrate**

**Ki67 Zellen/GF tubulär:**

Vehikel -  $6,5 \pm 1,0$

BX471 -  $3,3 \pm 1$

**ssDNA Zellen/GF tubulär:**

Vehikel -  $1,0 \pm 0,6$

BX471 -  $0,3 \pm 0,3$

**Ki67 Zellen/GF interstitiell:**

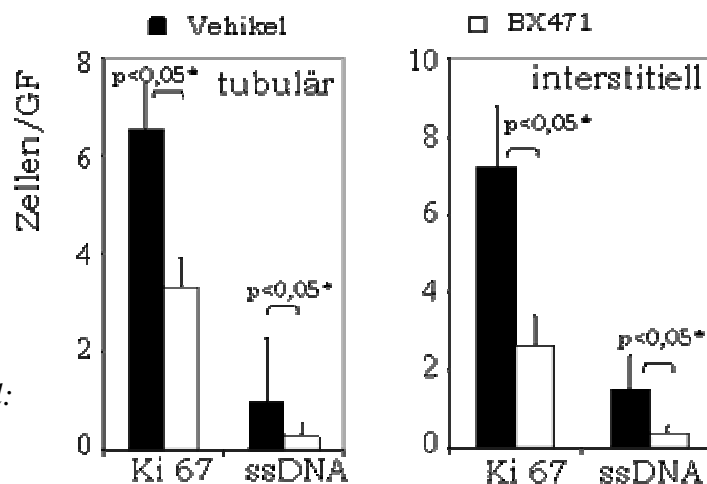
Vehikel -  $7,2 \pm 1,6$

BX471 -  $2,6 \pm 0,9$

**ssDNA Zellen/GF interstitiell:**

Vehikel -  $1,5 \pm 0,8$

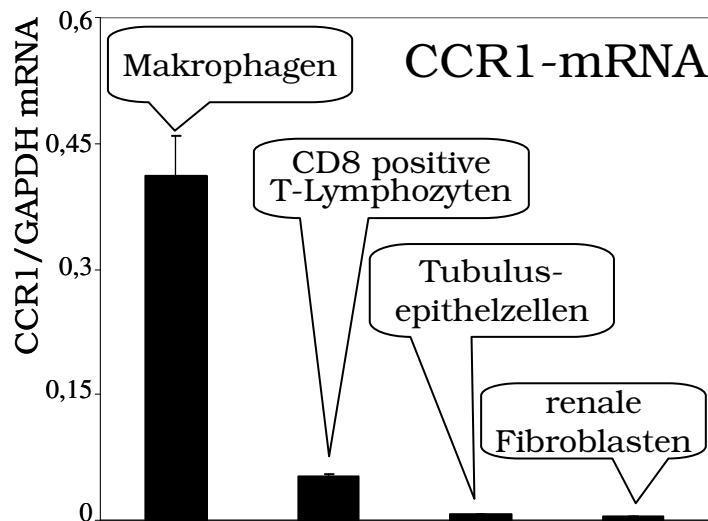
BX471 -  $0,4 \pm 0,2$



### 3.4 Mechanismen der Auswirkung der CCR1 Blockade

#### 3.4.1 Die renale CCR1 Expression in MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen stammt von den infiltrierenden Leukozyten

Um die genauen Mechanismen der mittels CCR1 Blockade herbeigeführten Effekte abzuklären, wurde in einem ersten Schritt die renale Expression von CCR1 bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen charakterisiert. Aus der Milz wurden CD8 positive T-Lymphozyten und ERHR3 positive Makrophagen mittels *Micro-Beads* isoliert. Renale Tubuluszellen wurden mittels Mikrodissektion und Fibroblasten mittels Zellselektion in Kultur und anschließender Leukozyten Depletion gewonnen. Eine getrennte *real-time* RT-PCR Analyse der RNA, isoliert aus dem jeweiligen Zelltyp, wurde vorgenommen. CCR1-mRNA wurde in keinem der untersuchten intrinsischen renalen Zelltypen nachgewiesen, sondern war nur in den Leukozyten vorhanden. Dies berechtigt die Annahme, dass der Effekt der BX471 Behandlung über eine Modulation der Leukozyten-Rekrutierung und/oder deren Auswirkungen in der Niere vermittelt wird.

**Abbildung 3.9: CCR1 Expression in der Niere von MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen**

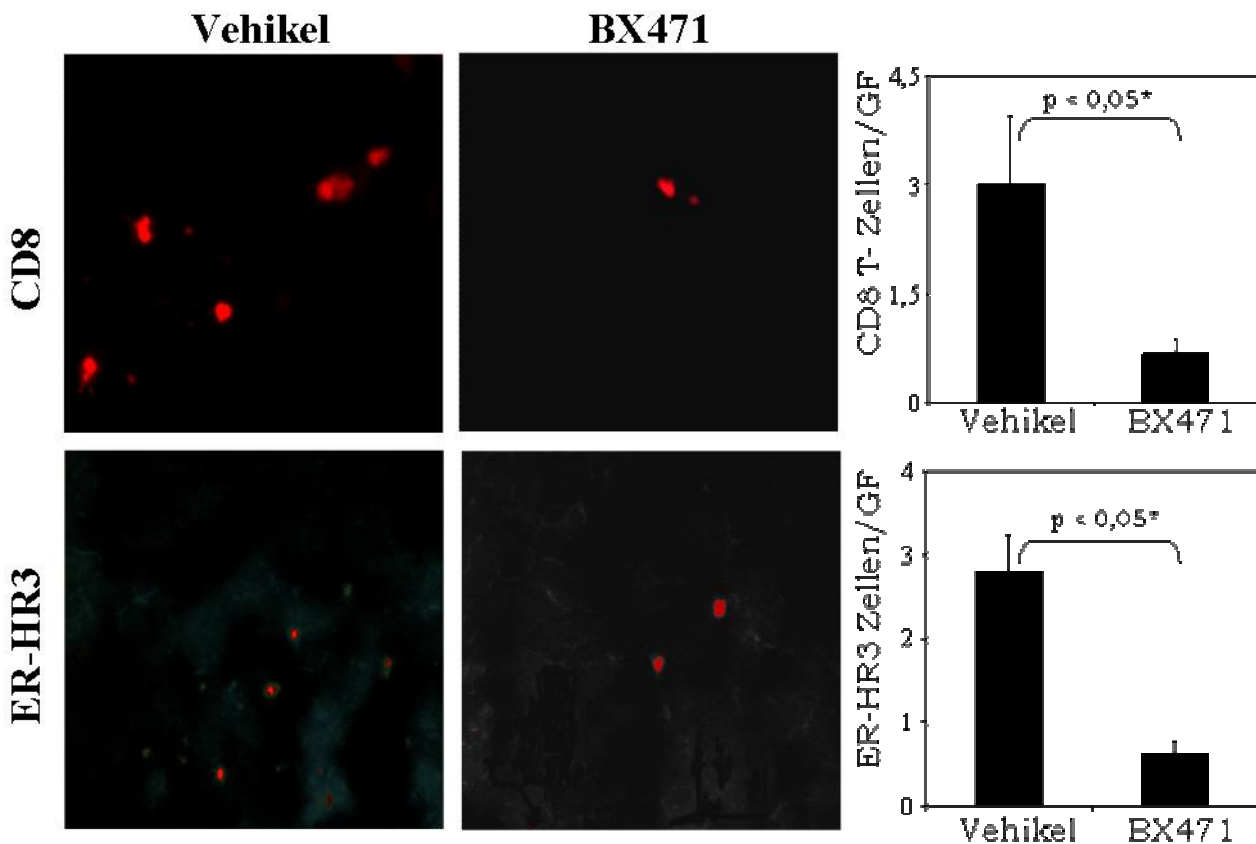
Die getrennte Untersuchung von RNA, isoliert jeweils aus Leukozyten und aus renalen Parenchymzellen (Fibroblasten und Tubuluszellen), konnte CCR1-mRNA in keinem der untersuchten renalen Zelltypen nachweisen. Eine direkte Wirkung von BX471 auf intrinsische renale Zellen kann daher als Ursache für seine Effekte weitgehend ausgeschlossen werden. BX471 wirkt folglich über eine Modulation der Leukozyten Migration und/oder Aktivierung.

### 3.4.2 BX471 wirkt über Verminderung der Infiltration zirkulierender Leukozyten ins Tubulointerstitium

Die BX471 Behandlung verminderte, wie oben gezeigt, die Anzahl der Leukozyten im tubulointerstitiellen Kompartiment. Außerdem ist von in vitro Versuchen bekannt, dass CCR1 eine wichtige Rolle beim Prozess der Leukozyten Adhäsion und Transmigration spielt.

Es wurde daraufhin untersucht, ob die Abnahme der Infiltrate auf eine beeinträchtigte Rekrutierung zirkulierender Leukozyten zurückzuführen ist. Dazu wurden CCR1 positive, fluoreszenzmarkierte (mit PKH26) Makrophagen (ERHR3 positive Zellen) und T-Lymphozyten (CD8 positive Zellen) aus der Milz von MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen isoliert. Diese Zellen wurden dann 30 Minuten mit BX471 oder Vehikel inkubiert und daraufhin MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen i.v. verabreicht. Die Organe wurden nach 3 Stunden entnommen und Gefrierschnitten wurden zur direkten Fluoreszenzmikroskopie angefertigt. Die injizierten Zellen waren in beiden Gruppen nur im renalen Interstitium lokalisiert, während in den Glomeruli sich keine fluoreszierenden Zellen nachweisen ließen. Die mit BX471 präinkubierten Zellen waren in deutlich geringerer Anzahl in der Niere vorhanden. Die Reduktion der Leukozyten-Infiltrate nach BX471 Gabe beruht daher auf einer eingeschränkten Transmigration von Immunzellen in der Niere.

**Abbildung 3.10:** Leukozyten-Infiltration in der Niere nach i.v. Verabreichung von fluoreszenzmarkierten und mit Vehikel / BX471 vorbehandelten Zellen



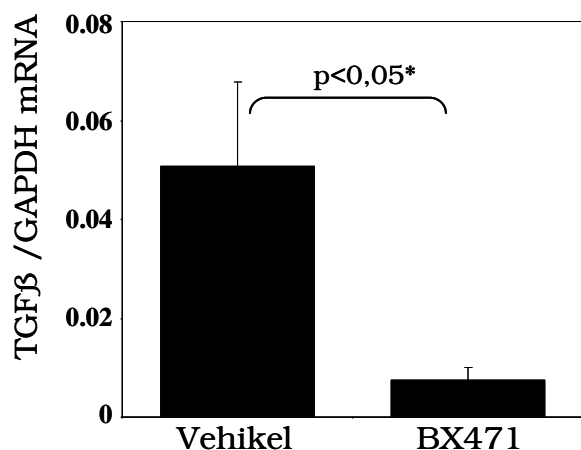
*ERHR3 oder CD8 exprimierende Zellen wurden mittels magnetischer Zellseparation (MACS MicroBeads Technology) aus der Milz isoliert. Nach Fluoreszenzmarkierung mit PKH26 und 30min Inkubation, entweder mit BX471 oder dem Vehikel, wurden jeweils  $3,5 \times 10^5$  Zellen MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen im Alter von 20 Wochen i.v. injiziert. Die mit BX471 vorbehandelten Zellen infiltrieren 3 Stunden später deutlich weniger in die Niere.*

### 3.4.3 Die Reduktion der interstitiellen Leukozyten-Infiltrate korreliert mit einer verminderten TGF $\beta$ 1 Expression

Die Korrelation zwischen der eingeschränkten Leukozyten-Infiltration und der Reduktion der tubulointerstitiellen Fibrose ist, bei fehlender CCR1 Expression in den intrinsischen renalen Zellen, am ehesten mit einer verminderten Sekretion profibrotischer Zytokine zu erklären. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Expression des TGF $\beta$  untersucht. Dieses Zytokin stimuliert die Fibroblasten-Proliferation und die Sekretion extrazellulärer Matrixbestandteile, aber auch die epithelmesenchymale Transformation. In gesamt Nieren RNA konnte mittels *real-time RT-PCR* Analyse eine 85%-ige Reduktion der TGF $\beta$ -mRNA Expression in den mit BX471 behandelten Mäusen im Vergleich zur

Kontrollgruppe festgestellt werden. Eine in situ Hybridisierung erfolgte daraufhin, um die TGF $\beta$  Produktion zu lokalisieren. Letztere konnte, bei schlechter Auflösung, nicht eindeutig einem Zelltyp zugewiesen werden, war jedoch im Bereich interstitieller Leukozyten-Infiltrate am stärksten. Tubulär war dazu keine Positivität sichtbar.

### **Abbildung 3.11: TGF $\beta$ Expression in der Niere**



*Mittels real-time RT-PCR Analyse wurde eine 85%-ige Reduktion der TGF $\beta$ -mRNA Expression in den mit BX471 behandelten Mäusen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, festgestellt.*

Daher sind Leukozyten wahrscheinlich eine wichtige Quelle dieses profibrotischen Zytokins und die Abnahme der renalen Fibrose bei Einschränkung der Leukozyten Rekrutierung ist, zumindest partiell, auf eine verminderte Sekretion proinflammatorischer Zytokine zurückzuführen.

### **3.5 Systemische Immunreaktion**

Das Überwiegen von Th1 oder Th2 typischen Mechanismen in der systemischen Immunreaktion beeinflusst den SLE Verlauf (68). Es liegen andererseits Berichte vor, dass CCR1 Knock-out Mäuse zur Entwicklung von Th1-Reaktionen neigen (52). Daraufhin wurde untersucht, ob die Blockade von CCR1 mittels eines niedermolekularen Antagonisten in das Gleichgewicht dieser Immunprozesse eingreift und damit den Krankheitsverlauf beeinflusst.

Die Messung der IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> Isotypen der anti-dsDNA Antikörper im Serum dient als indirekter Marker für das Th1/Th2 Gleichgewicht, wobei ein Überwiegen von IgG<sub>2a</sub>-Antikörper, als Hinweis auf einen Th1-Shift zu bewerten ist, während ein Überwiegen von IgG<sub>1</sub> auf einen Th2-Shift hindeutet. Die ELISA Messung der anti-dsDNA Antikörper im Serum zeigte keine wesentliche Änderung infolge der Behandlung mit BX471. Sowohl der Gesamttiter der anti-dsDNA-Antikörper als auch die Ratio der Subtypen waren in beiden Gruppen vergleichbar.

Gefrierschnitten wurden zudem immunhistologisch mit Antikörpern gegen jeweils IgG<sub>1</sub> oder IgG<sub>2a</sub> gefärbt. Semiquantitativ wurden daraufhin die renalen IgG<sub>1</sub> und IgG<sub>2a</sub> Immunkomplex-Ablagerungen in beiden Gruppen ausgewertet. In der BX471 Gruppe ließ sich dabei kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe feststellen.

Die Blockade von CCR1 mittels des niedermolekularen Antagonisten BX471 führt folglich zu keinem Th1/Th2 Shift bei diesem Modell.

**Tabelle 3.1: Parameter der humoralen Immunantwort in der 24. Woche**

<b>Parameter der humoralen Immunantwort</b>	<b>Vehikel (n=10)</b>	<b>BX471 (n=8)</b>
<u>Titer der Antikörper im Serum:</u>		
• Anti-DNA IgG <sub>1</sub>	1:6963 ± 1:4751	1:6162 ± 1:3611
• Anti-DNA IgG <sub>2a</sub>	1:5325 ± 1:2621	1:6349 ± 1:4014
• IgG <sub>1</sub> / IgG <sub>2a</sub> Ratio	0,7 ± 0,6	1,0 ± 1,1
<u>glomeruläre Antikörper-Deposition:</u> semiquantitativer Score		
• IgG <sub>1</sub>	1,3 ± 0,4	1,2 ± 0,5
• IgG <sub>2a</sub>	0,8 ± 0,3	0,9 ± 0,4
• IgG <sub>1</sub> / IgG <sub>2a</sub> Ratio	0,6 ± 0,7	0,7 ± 0,7

## 4 Diskussion

Ziel der Studie war es festzustellen, ob eine Blockade von CCR1 mit dem niedermolekularen Antagonisten BX471, begonnen bei bereits klinisch und pathologisch bestehender Lupusnephritis, durch Verminderung der Leukozyten Rekrutierung die renale Erkrankung bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen verbessern kann.

Eine Abnahme der Leukozyten-Infiltration in der Niere infolge der Behandlung mit BX471 wurde anhand immunhistologischer Auswertung und Zelltransferstudien mit fluoreszenzmarkierten Leukozyten für das tubulointerstitielle Kompartiment belegt. Die Verminderung der Leukozyten-Infiltrate führte zur deutlichen Reduktion der renalen Fibrose und Verbesserung der Nierenfunktion. Die glomeruläre Schädigung blieb sowohl histologisch (Leukozyten-Infiltration, Immunkomplex-Ablagerung) als auch klinisch (Proteinurie) unbeeinflusst von der BX471 Gabe. In der systemischen Immunreaktion wurde kein Th1/Th2 Shift infolge der CCR1 Blockade beobachtet.

Demzufolge führt CCR1 Blockade, begonnen in der progressiven Phase der Lupusnephritis von MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen, zur Verbesserung der Nierenfunktion mittels selektiver Reduktion der tubulointerstitiellen Entzündung.

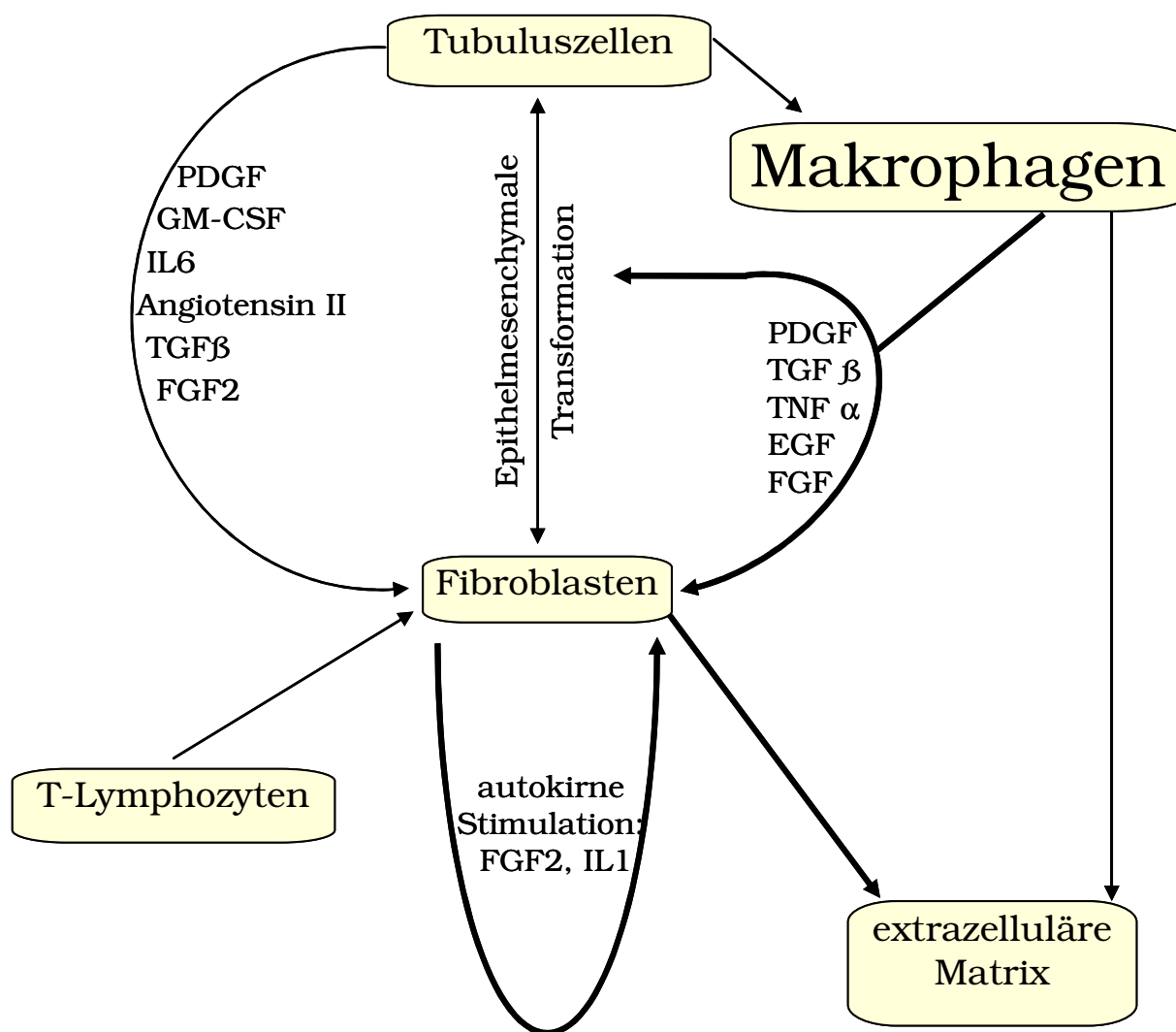
### 4.1 CCR1 Blockade reduziert die tubulointerstitielle Fibrose mittels Abnahme der interstitiellen Leukozyten-Infiltration

Die Leukozyten Migration ins entzündete Gewebe unterliegt dem Zusammenspiel von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (4). Eine Arbeit von Perez de Lema et al. zeigt, dass eine gesteigerte Chemokinexpression bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen bereits in der 8. Woche zu finden ist. Die Proteinurie, die typischen histologischen Veränderungen der mesangioproliferativen Glomerulonephritis mit Halbmondbildung und begleitender interstitieller Beteiligung mit mononukleärer Infiltration sind erst ab der 10-12. Woche festzustellen (113). Dieser Befund ist als Hinweis darauf zu werten, dass die Chemokin-Produktion bei diesem Modell ursächlich für die Leukozyten-Infiltration und die darauf folgende renale Schädigung ist.

Übereinstimmend damit konnte in dieser Studie mittels CCR1 Blockade mit BX471 eine Abnahme der interstitiellen T-Lymphozyten und Makrophagen-Infiltrate erreicht werden. Anhand der Ergebnisse der Zelltransferstudien konnte der beobachtete Effekt auf eine verminderte Rekrutierung zirkulierender Leukozyten zurückgeführt werden. Daraus lässt sich eine wichtige Bedeutung von CCR1 für die Leukozyten-Infiltration im interstitiellen Kompartiment der Niere ableiten. Die eingeschränkte Leukozyten Rekrutierung in der BX471 Gruppe war von einer Abnahme der renalen Fibroseaktivität (anhand der SMA-Färbung und der TGF $\beta$  Expression), der interstitiellen Matrixablagerung sowie der Verbreiterung des Interstitiellraumes (Kollagen I Expression, Chronizität-Index) gefolgt. Auch die tubuläre Schädigung war vermindert in der BX471 Gruppe (Chronizität-Index, Apoptoserate). Daraufhin wurde untersucht, ob die Einschränkung der Leukozyten-Infiltration nach CCR1 Blockade ursächlich für

die Abnahme der tubulointerstitiellen Schädigung sein könnte. Um das Target der BX471 Wirkung zu identifizieren, wurde zuerst eine Analyse der CCR1 Expression in der Niere durchgeführt. In *real-time* RT-PCR mit RNA, isoliert von Tubuluszellen oder renalen Fibroblasten, fand keine Amplifikation von CCR1-mRNA statt. Eine direkte Wirkung von BX471 auf intrinsische renale Zellen kann daher mit großer Wahrscheinlichkeit als Ursache für die genannten Effekte ausgeschlossen werden. Demgegenüber exprimierten sowohl T-Lymphozyten als auch Makrophagen CCR1. Die Blockade der Infiltration aggressiver Zellen in der Niere, erreicht mit BX471, kann daher als Grundlage der verminderten renalen Schädigung betrachtet werden. Ausgeprägte interstitielle Leukozyten-Infiltrate sind laut bisherigen Studien bei chronischen Nephropathien regelmäßig nachweisbar und zeigen eine starke Korrelation zu der Prognose der Erkrankung (21, 66). Diese Zellen setzen eine Vielzahl zelltoxischer, proinflammatorischer und profibrotischer Substanzen, aber auch extrazelluläre Matrixkomponente frei (95, 105, 142, 143).

**Abbildung 4.1: Renale Fibrogenese(143)**



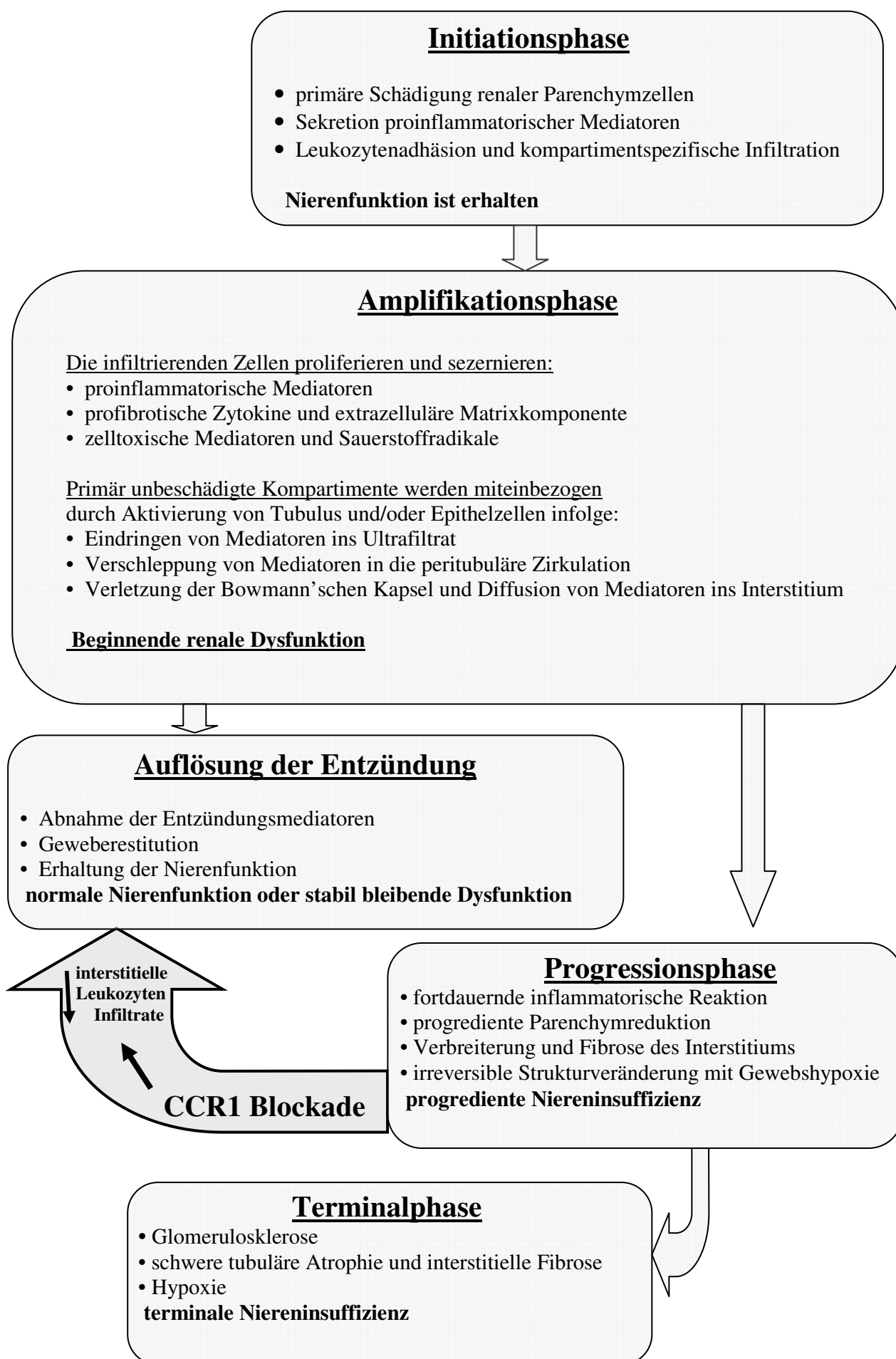
Die Reduktion der Anzahl infiltrierender Makrophagen führt deshalb zu einer herabgesetzten Gewebedestruktion. Diese bewirkt eine Abnahme der Sekretion proinflammatorischer Zytokine in der Niere, veranschaulicht in dieser Studie anhand der Chemokinexpression. Daraus resultiert eine verminderte chemotaktische Aktivität des Gewebes mit einer weiteren Reduktion der Leukozyten-Infiltration. Da Makrophagen zudem extrazelluläre Matrixbestandteile produzieren, ist die Abnahme der Leukozyten-Infiltration auch an der verminderten Matrixexpansion beteiligt.

In dieser Studie wurde eine verminderte TGF $\beta$ -mRNA Expression parallel zur Abnahme der interstitiellen Leukozyten Rekrutierung in den mit BX471 behandelten Mäusen gefunden. TGF $\beta$  ist ein profibrotisches Zytokin, welches die Proliferation und die Matrixproduktion der Fibroblasten, aber auch die Epithelmesenchymale Transformation der Tubulusepithelzellen stimuliert. Obwohl es abweichende Daten in der Literatur gibt (80, 168) bezüglich der Quelle seiner Produktion, zeigte die *in situ* Hybridisierung in dieser Studie einen positiven Signal nur im Bereich der Leukozyten-Infiltrate bei fehlender tubulärer Positivität. Leukozyten sind daher eine wichtige Quelle profibrotischer Zytokine und die Abnahme der interstitiellen Infiltration geht erwartungsgemäß mit einer verminderten Fibroseaktivität einher. Erwähnenswert berichten manche Autoren von einer immunsuppressiven Rolle von TGF $\beta$ , der ggf. auch eine antiinflammatorische Rolle haben könnte (83). In dieser Studie ließ sich in der BX471 Gruppe trotz Abnahme der TGF $\beta$  Expression keine Änderung der systemischen Immunreaktion nachweisen. Eine solche regulatorische Rolle scheint folglich in diesem Modell nicht relevant zu sein.

BX471 führt schließlich über eine Blockade der interstitiellen Leukozyten Rekrutierung zu einer Unterbrechung des Circulus vitiosus der progredienten renalen Schädigung und könnte daraufhin die Auflösung der Entzündungsreaktion ermöglichen.



**Abbildung 4.2: Rolle von CCR1 bei der chronischen renalen Entzündung**



**Der günstige Effekt der CCR1 Blockade in dieser Studie korreliert mit den Ergebnissen einer Reihe von Studien bei renalen Erkrankungen.** Eine erhöhte Expression von CCR1 und seinen Liganden findet sich bei einer Reihe akuter und chronischer renaler Erkrankungen (6, 85, 113, 156). Bei Lupus-Patienten wird von einer erhöhten Expression von CCR1 und dessen Liganden im Blut, insbesondere bei aktiver Erkrankung, berichtet (45). Furuichi et al. zeigten an humanen Biopsien, dass die Anzahl CCR1 positiver Zellen im Interstitium mit dem Ausmaß der renalen Fibrose und der tubulären Atrophie korreliert (51). CCR1-Blockade nach Ureter-Ligatur bei der Maus (Modell der tubulointerstitiellen Fibrose) geht mit einer Verminderung der Leukozyten-Infiltration und der tubulointerstitiellen Fibrose einher (7). Beim selben Modell entwickeln CCR1 Knock-out-Mäuse weniger ausgeprägte Fibrose (43) im Vergleich zu Wildtyp Tieren. Auch bei proteinurischen Nephropathien und nach Nierentransplantation bewirkt die CCR1 Blockade eine Verbesserung der interstitiellen Erkrankung (69, 157).

**Pathogenetische Bedeutung von CCR1 bzw. seine Liganden und günstige Effekte derer Blockade sind auch bei extrarenalen fibrotisch-entzündlichen Erkrankungen berichtet worden.** Erhöhte Expression von CCR1 und seinen Liganden findet man bei der experimentellen Enzephalomyelitis (Tiermodell der multiplen Sklerose) (54, 55). Genetische CCR1-Deletion sowie interventionelle CCL3/CCR1 Blockade mittels anti-CCL3/MIP1 $\alpha$ -Antikörper oder CCR1-Antagonisten lindert die Entzündung (124, 125). Die Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation wird günstig von einer CCR1 Blockade beeinflusst (70). Bei der Rheumatoiden Arthritis reduzieren Ligand-neutralisierende Antikörper (gegen CCL3/MIP1 $\alpha$  oder CCL5/RANTES) und Rezeptorantagonisten sowohl die chemotaktische Aktivität der synovialen Flüssigkeit in vitro als auch die klinischen Symptome und die Gelenkdestruktion in vivo (16, 59). In der Bronchiallavage oder in Lungenbiopsien bei Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose, aber auch im Tiermodell dieser Erkrankung ist die Expression von CCR1-Liganden (CCL3/MIP1 $\alpha$ , CCL5/RANTES und CCL2/MCP1) gesteigert und Behandlung mit anti-CCL3/MIP1 $\alpha$ - oder anti-CCR1-Antikörpern reduziert die Kollagen Deposition und bessert die Lungenfibrose (149).

All diese Daten belegen die wichtige Rolle von CCR1 im Prozess der Leukozyten-Rekrutierung bei entzündlich-fibrotischen Erkrankungen unterschiedlicher Lokalisation. Die verminderten Infiltrate bewirken dazu regelmäßig eine Abnahme der chronisch-progredienten Parenchymschädigung und der Fibrose.

Die Anwendung von CCR1 Antagonisten könnte folglich nicht nur bei der Lupusnephritis, sondern auch bei anderen chronischen progredienten Nierenerkrankungen günstige Wirkung auf die interstitiellen Veränderungen und die progressive Schädigung haben. CCR1 Blockade scheint daher eine aussichtsreiche Möglichkeit zur Prävention der Progression unterschiedlicher chronischer Nephropathien zu sein.

## **4.2 CCR1 Blockade verbessert die Nierenfunktion**

Der Rückgang der tubulointerstitiellen Schädigung und der Leukozyten-Infiltration in den mit BX471-behandelten Tieren führte zu einer Verbesserung der Nierenfunktion, erkennbar am signifikant

herabgesetzten Serumharnstoff. Dieser Befund unterstreicht den engen Zusammenhang zwischen den Veränderungen im Tubulointerstitium und der renalen Leistung, der tierexperimentell bereits vielfach belegt worden ist (21). So ist es z.B. bekannt, dass die Proteinurie zur Produktion proinflammatorischer Substanzen (z.B. Endothelin1) in den Tubuluszellen führt. Diese rekrutieren Makrophagen ins Interstitium. Die auf dieser Grundlage versuchte Blockade des ET1 Rezeptors hat in Tiermodellen unterschiedlicher proteinurischer Erkrankungen, inklusive der Lupusnephritis, die Leukozyten-Infiltration und die renale Fibrose reduzieren und trotz weiter bestehender Proteinurie die Nierenfunktion verbessern können (18). IFN $\gamma$  defiziente MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäuse entwickeln verzögert eine Nierenfunktionseinschränkung, da IFN $\gamma$  essentiell für die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) und für die Makrophagen Rekrutierung in der Niere ist (30). Auch die Anwendung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (bekannt vor allem im Bereich der Onkologie), Inhibitoren der p38 MAPKinase (Mitogen-aktivierte-Proteinkinase) und Retinsäure hat eine Verbesserung der Nierenerkrankung bei der Lupusnephritis gebracht (73, 93, 114). All diese Substanzen interferieren auf unterschiedlicher Weise mit der Produktion proinflammatorischer, chemoattraktiver Substanzen und reduzieren somit die renale Leukozyten Rekrutierung.

Der progrediente Funktionsverlust im Verlauf chronischer Nephropathien ist folglich an der voranschreitenden interstitiellen Leukozyten-Infiltration und der Parenchymatrophie mit Umstrukturierung und Vernarbung des Organs gebunden (143). Wie bereits diskutiert, unterstützen Leukozyten eine fortdauernde Gewebeschädigung. Die tubulointerstitielle Fibrose führt zu einer Vergrößerung des Gefäß-Tubulus-Abstandes. Daraufhin wird sowohl die Sauerstoffversorgung der Tubuli kompromittiert als auch der tubuläre Transport. Als Resultat geht das funktionsfähige Parenchym allmählich verloren.

Durch Modulation dieser pathogenetischen Faktoren konnte die CCR1 Blockade in dieser Studie die Nierenfunktion in den MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen verbessern.

Besonderer Beachtung bedarf der Erfolg einer Blockade von CCR1, begonnen erst nach entstandener Nierenerkrankung. Laut der bereits erwähnten Studie vom Perez de Lema et al. wird CCR1 bei der Lupusnephritis in MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen konstitutiv exprimiert mit einem deutlichen Anstieg erst in der 14. Woche. Dagegen steigen die Leukozyten-Infiltration und die Expression proinflammatorischer Chemokine, der Chemokinrezeptoren CCR2 und CCR5 früher an. Die Autoren diskutieren dies im Sinne einer möglichen antiinflammatorischen, protektiven Funktion von CCR1. Zum selben Zeitpunkt wurde in der genannten Studie auch ein Anstieg des IFN $\gamma$  Spiegels gemessen. Dieses Zytokin könnte eine gesteigerte CCR1 Expression in den Mesangialzellen hervorrufen (113). Es ist aber auch denkbar, dass CCR1 erst in diesem späten Zeitpunkt für die Leukozyten-Infiltration pathogenetisch bedeutsam wird. Übereinstimmend hat beim Modell der obstruktiven Nephropathie die früh begonnene CCR1-Blockade kaum Vorteil im Vergleich zu der späten und eine Behandlung lediglich am Anfang der Erkrankung hat keine Wirkung auf die renale Fibrose (7). Analoge Überlegungen sind bezüglich der Funktion von CCR3/CXCR4 berichtet worden. CCR3 Knock-out Mäuse sind von der Entwicklung einer

Hypersensitivität und Eosinophilen-Infiltration der Atemwege nach einmaliger Ovalbumin Stimulation geschützt, wohingegen bei chronischer Ovalbumin-Exposition die protektive Wirkung verloren geht. CXCR4 und C3a werden dann für die Entstehung und Unterhaltung der Hyperreagibilität essentiell (29).

Bemerkenswert zeigten Thopham et al. eine Verschlechterung der Nierenerkrankung bei CCR1-Knock-out Mäusen nach Induktion einer nephrotoxischen Nephritis. Kontroverse Ergebnisse bezüglich des Nutzens eines Eingriffs ins Chemokin-Netz werden jedoch häufig bei Experimenten mit Chemokin-neutralisierenden Antikörpern, Chemokinrezeptorantagonisten oder Knock-out Tieren berichtet. Am Modell der nephrotoxischen Serumnephritis nehmen unter Behandlung mit anti-CCL2/MCP1 Antikörpern Proteinurie, Kollagen-Deposition, interstitielle und glomeruläre Makrophagen-Infiltrate ab (50, 146). Wird hingegen CCL2/MCP1 genetisch deletiert (MCP1-knock-out Mäuse), wird nur die tubulointerstitielle Schädigung gelindert (148). Fehlt der CCL2/MCP1-Rezeptor (CCR2-knock-out-Mäuse), verschlechtert sich die Erkrankung sogar (20). Analog reduziert der CCL5/RANTES-Antagonist AOP-RANTES die glomeruläre Makrophagen-Infiltration und die Kollagen IV Deposition beim anti-Thy-1,1 Modell in der Ratte. Met-RANTES (auch CCL5/RANTES-Antagonist) reduziert die Proteinurie und die glomeruläre und interstitielle Leukozyten-Infiltration bei der nephrotoxischen Serumnephritis in der Maus. Dennoch nimmt am Modell der akuten Immunkomplex-Glomerulonephritis unter beiden Antagonisten trotz verminderter Makrophagen-Infiltration die glomeruläre Schädigung zu. (5).

Solchen Widersprüchen könnten eine Reihe Ursachen zugrunde liegen. Einerseits gibt es sicher immunologische Unterschiede sowohl unter den verschiedenen Spezies als auch innerhalb einer Tierart, die den Krankheitsverlauf beeinflussen. Dazu sind die künstlich provozierten Krankheiten nicht ohne weiteres vergleichbar und verwertbar. Jedoch sind diese Unstimmigkeiten gleichzeitig Ausdruck der komplexen Regulation der Leukozyten-Infiltration und den vielseitigen Chemokinwirkungen. Innerhalb des Chemokin-Netzes sind oft mehrere Chemokine am selben Prozess beteiligt. Angeborene Abwesenheit bestimmter Chemokine oder Rezeptoren kann zu einer Fehlanlage des Immunsystems führen. Diese beeinflusst dann sekundär den Krankheitsverlauf, ohne ansonsten pathogenetisch bedeutsam zu sein (29). Zudem besteht die Möglichkeit, dass infolge der Redundanz des Systems sich kompensatorische Mechanismen entwickeln. Auch kann die Relevanz einzelner Faktoren im Verlauf der Erkrankung variieren und somit eine „zu frühe“ Depletion, wie sie bei den Knock-out Tieren beobachtet wird, das Ergebnis verfälschen (24, 155). Eine Chemokin-bedingte Umprogrammierung der systemischen Immunreaktion in Richtung Th1 oder Th2 kann auch den allgemeinen Krankheitsverlauf ändern (150). Einflüsse auf die Differenzierung regulatorischer T-Lymphozyten [berichtet bei CCR2 Blockade-(24)] oder auf den Phänotyp der infiltrierenden Zellen [z.B. bei Met-RANTES-(5)] können genauso zu unvorhersehbaren Effekten führen. Kontroverse Ergebnisse sollten daher nur Anlass geben, dem pathogenetischen Hintergrund nachzugehen. Somit könnten relevante Nebenwirkungen und Kontraindikationen ggf. vermieden und das therapeutische Potential ausgenutzt werden (155).

---

### 4.3 BX471 hat keinen Einfluss auf die glomeruläre Schädigung

Interessanterweise blieb die glomeruläre Schädigung in dieser Studie unverändert nach CCR1 Blockade. Immunhistologisch waren die glomerulären Makrophagen-Infiltrate in beiden Gruppen vergleichbar. Dies bestätigt die am Modell der obstruktiven Nephropathie festgestellte, kompartimentspezifische Rolle von CCR1 für die interstitielle und nicht für die glomeruläre Leukozyten-Infiltration (43). Kompartimentspezifische Wirkung wird auch bezüglich anderer Chemokinrezeptoren diskutiert. Nach Induktion einer nephrotoxischen Serumnephritis bei CCL2 Knock-out Mäusen wird nur die tubulointerstitielle Schädigung verhindert, bei bleibender glomerulärer Beteiligung (148). Analog scheint CCR5 nur die glomeruläre Leukozyten-Infiltration zu vermitteln. So reduziert der CCR5 Antagonist Met-RANTES am Modell der Apoferritin-induzierten Immunkomplex-Glomerulonephritis die glomeruläre Makrophagen-Infiltration um ca.50%. Die interstitielle Leukozyten-Rekrutierung bei diesem Modell, oder bei CCR5-defizienten Mäusen mit obstruktiver Nephropathie bleibt demgegenüber bestehen (5, 43). Diese Kompartiment-Spezifität könnte z.B. auf einer unterschiedlichen Expression von Adhäsionsmolekülen in den glomerulären und den peritubulären Kapillaren beruhen, welche die Chemokin-medierte Leukozyten-Rekrutierung kompartimentspezifisch dirigiert (51).

Ein interessanter Befund dieser Studie ist die fehlende glomeruläre Infiltration von fluoreszenzmarkierten ERHR3 positiven Makrophagen bei der Zelltransferstudie, da bei der Lupusnephritis in den Glomeruli Makrophagen üblicherweise nachweisbar sind. Ein zeitlich unterschiedlicher Verlauf der interstitiellen und glomerulären Leukozyten-Infiltration könnte eine Erklärung dafür liefern, widerspricht der kompartimentspezifischen Rolle von CCR1 dennoch nicht.

Trotz verbesserter Nierenfunktion in den mit BX471 behandelten Tieren blieb auch die Proteinurie (als Marker der glomerulären Funktion) nach CCR1 Blockade bestehen. Das Ausmaß der kontinuierlichen Proteinurie gilt als klassisch ungünstiger prognostischer Faktor für das Fortschreiten einer chronischen renalen Erkrankung zur terminalen Niereninsuffizienz. Laut der geltenden Leitlinien für nephroprotektive Therapie soll die Proteinurie gezielt mit Hilfe von ACE-Inhibitoren, proteinarmer Diät und ggf. Calcium-Kanal-Blockern auf Werte unter 1g/24h gesenkt werden. Außer klinischen Beobachtungen liegen dieser Empfehlung pathophysiologische Überlegungen zugrunde, die das proteinreiche Ultrafiltrat als toxisch für die Tubuluszellen betrachten. Die dadurch geschädigten und gereizten Zellen setzen proinflammatorische Substanzen frei (ET1, Osteopontin, CCL5/RANTES, CCL2/MCP1) und tragen somit zur Aufrechterhaltung und Chronifizierung der Entzündungsreaktion bei (175). Dennoch gibt es mehrere Berichte von gleich bleibender Proteinurie bei interventionell reduzierter interstitieller Schädigung und verbesserter Nierenfunktion (148, 157). Dies gibt einen starken Hinweis darauf, dass die Proteinurie im Gegensatz zu früheren Berichten (163) in Abwesenheit der kostimulatorischen und/oder effektorischen Wirkung der Leukozyten-Infiltrate unzureichend für die Unterstützung einer progredienten renalen Schädigung sein kann.

#### 4.4 BX471 beeinflusst die Autoantikörperproduktion beim SLE nicht

Die Lupusnephritis entwickelt sich im Rahmen einer Autoimmunerkrankung. Obwohl die Bedeutung der Th1 /Th2 Reaktionen nicht eindeutig zu definieren ist, könnte die systemische Immunreaktionslage von Bedeutung für den SLE Verlauf sein. So weisen Lupus Patienten mit Arthritis höhere intrazelluläre IFN $\gamma$  Spiegel (Th1), während die Serositis mit einem Anstieg von IL4 (Th2) einhergeht (32). Akahoshi et al berichten von höheren Th1 Zytokinspiegeln bei SLE mit renaler Beteiligung (2). Auf der anderen Seite besteht kein Unterschied in der IFN $\gamma$  oder IL4 Expression zwischen SLE Patienten und gesunden Kontrollen.

Bei CCR1 Knock-out Mäusen wird von einem Th1-Shift berichtet (52), der für den schweren Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis bei diesen Mäusen verantwortlich gemacht wird (150). Bei der im Rahmen der aktuellen Studie durchgeführten späten Blockade von CCR1 mit BX471 bei den MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen ließ sich dennoch keine Veränderung in der Th1/Th2 Balance feststellen. Dies könnte mit dem unterschiedlichen Pathomechanismus der beiden Erkrankungen zusammenhängen. Bei der nephrotoxischen Nephritis ist die Immunreaktion gegen ein spezifisches Antigen gerichtet (das Antigen, verabreicht zur Induktion der Krankheit). Beim SLE findet dagegen eine polyklonale Antikörperproduktion statt. Des Weiteren fehlt der CCR1 bei den Knock-out Tieren verwendet von Topham et al (150) noch während der Entstehung der Immunreaktion, wohingegen die Behandlung mit dem Rezeptorantagonisten in dieser Studie bei bereits bestehenden Autoantikörpern begonnen wird. Auch kompensatorische Vorgänge, oder Fehler in der Grundentwicklung des Immunsystems der Knock-out Mäuse könnten diese Diskrepanz erklären (150).

Beachtenswert ist dazu, dass die Behandlung mit dem niedermolekularen CCR1 Antagonisten in dieser Studie trotz verbesserter Nierenfunktion keine Veränderung der Autoantikörper-Titer im Serum oder der Immunkomplex Ablagerungen in der Niere bewirkte. Fehlende Korrelation zwischen der Nierenschädigung und der Immunkomplex Deposition bei der Lupusnephritis ist bereits bei Tiermodellen sowie an Nierenbiopsien beim Menschen berichtet worden. IL4 transgene Mäuse (die zu Lupus neigen, aber unfähig sind, Immunoglobuline zu produzieren) entwickeln trotz fehlender Immunkomplexbildung eine Glomerulosklerose mit interstitieller Nephritis vermutlich über B-Zell abhängige T-Zell Stimulation. Die Anwendung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren oder G-CSF bei der Lupusnephritis verbessert die Nierenerkrankung bei bleibender Immunkomplex Ablagerung. Das Ausmaß der Immunoglobulin Deposition in Humanbiopsien hat sich auch als schlechter prognostischer Parameter erwiesen (67, 93, 147). Ein Fortschreiten bzw. eine Linderung der Nierenerkrankung kann daher auch unabhängig vom Verschwinden bzw. Persistenz des primären Stimulus (im Falle der Lupusnephritis- die Immunkomplex-Ablagerung) stattfinden, wenn andere pathophysiologisch bedeutsame Mechanismen modifiziert werden.

## 5 Klinische Bedeutung

Die progressive renale Erkrankung stellt ein tendenziell zunehmendes gesundheitliches und sozioökonomisches Problem dar.

Noch im Jahre 1844 beobachteten Henle J et al (63) eine Korrelation zwischen der Progression der renalen Schädigung und den Veränderungen im tubulointerstitiellen Kompartiment (Leukozyten-Infiltration, tubuläre Atrophie und Fibrose). Den ersten zuverlässigen Beweis dieses Zusammenhangs liefern jedoch Bohle A et al (21) erst im Jahre 1994 anhand der systematischen Untersuchung von Nierenbiopsien bei der mesangioproliferativen, membranösen, fokalsklerosierenden und membranoproliferativen Glomerulonephritis(143). Erkenntnisse, gewonnen in den letzten Jahren, beschuldigen die interstitiellen Leukozyten-Infiltrate für die histologisch beobachtete progrediente Atrophie des Parenchyms und interstitielle Fibrose,. Da die Leukozyten-Migration ins entzündete Gewebe der Chemokin Kontrolle unterliegt, befinden sich derzeit diese niedermolekularen *chemotaktischen Zytokine* und deren Rezeptoren im Zentrum der Bemühungen, spezifische und besser verträgliche Therapie der chronisch-entzündlichen Erkrankungen zu finden. Viele dieser Ansätze, die das Chemokin-System bewirken, haben sich in der Tat als wirksam unter experimentellen Bedingungen erwiesen.

In dieser Studie konnte die Blockade von CCR1 mit dem niedermolekularen Antagonisten BX471 eine Verbesserung der progredienten Immunkomplex-Glomerulonephritis bei MRL<sup>lpr/lpr</sup> Mäusen erreichen. Diese Wirkung wurde auf eine selektive Reduktion der Rekrutierung von Leukozyten ins Interstitium zurückgeführt. Interstitielle Leukozyten-Infiltrate sind jedoch bei chronischen renalen Erkrankungen, ungeachtet derer Ätiologie, regelmäßig nachweisbar. CCR1-Antagonisten könnten daher eine günstige Therapieoption dieser Erkrankungen darstellen.

Noch attraktiver wird die Ermittlung des therapeutischen Potentials von CCR1 Antagonisten angesichts ihrer nachgewiesenen Wirksamkeit bei der multiplen Sklerose und der Psoriasis. BX471 hat zudem gute Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe, welche insbesondere für die Patienten vom enormen Vorteil wäre.

An der renalen Fibrose sind eine Vielzahl Faktoren beteiligt. Die alleinige Reduktion der Leukozyten könnte daher insuffizient sein, den Fibrose-Vorgang zu durchbrechen. Vielmehr wäre die kombinierte Therapie, die gleichzeitig mehrere pathogenetisch wirksame Mechanismen beeinflusst, Erfolg versprechend.

## 6 Literaturverzeichnis

1. **Abbate M** et al, In progressive nephropathies, overload of tubular cells with filtered proteins translates glomerular permeability dysfunction into cellular signals of interstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol* 9: 11213-1224, 1998
2. **Akahoshi M** et al, Th1/Th2 balance of peripheral T helper cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 42:1644-1648, 1999
3. **Alcami A** et al, Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from Vaccina virus. *J Immunol* 160: 624-633, 1998
4. **Anders HJ** et al, Chemokines and Chemokine Receptors are involved in the Resolution or Progression of Renal Disease. *Kidney Int* 63(2):401-15, 2003
5. **Anders HJ** et al, CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J Immunol.* 170:5658-5666, 2003
6. **Anders HJ** et al, Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 12:919-931, 2001
7. **Anders HJ** et al, A chemokine receptor CCR-1 antagonist reduces renal fibrosis after unilateral ureter ligation. *J Clin Invest* 109(2):251-9, 2002
8. **Austin HA, Balow J**, Diffuse proliferative lupus nephritis: Identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kid Int* 25:689-695, 1984
9. **Bacon KB** et al, Activation of dual T cell signalling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 269: 1727-1730, 1995
10. **Baggiolini M** et al, Turning on the respiratory burst. *Trends Biochem Sci* 15: 69-72, 1990
11. **Baggiolini M** et al, Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392:565-568, 1998
12. **Baggiolini M** et al, Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med* 250: 91-104, 2001
13. **Baggiolini M** et al, Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 55:97-179, 1994
14. **Balow, J. E., Austin, H. A.** 3rd: Progress in the treatment of proliferative lupus nephritis. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 9: 107-115, 2000
15. **Banas B** et al, Chemokine and chemokine receptor expression in a novel human mesangial cell line. *J Am Soc Nephrol* 10:2314-2322, 1999
16. **Barnes DA** et al, Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. *J Clin Invest* 101:2910-2919, 1998
17. **Belmont M**, Lupus Clinical Overview. Dr. Belmont's Homepage ([www.cerebel.com/lupus](http://www.cerebel.com/lupus)), 1998
18. **Benigni A** et al, Endothelin antagonists and renal protection. *J Cardiovasc Pharmacol.* 35(4 Suppl 2):75-78, 2000
19. **Berlex Pharmaceuticals**, Berlex Pharmaceuticals Identifies Potential Brain Biologic Marker Specific for the Diagnosis of Alzheimer's Disease, [www.berlex.com/html/press/articles](http://www.berlex.com/html/press/articles) October 2003
20. **Bird JE** et al, Increased severity of glomerulonephritis in C-C chemokine receptor-2 knockout mice. *Kidney Int* 57:129-136, 2000
21. **Bohle A** et al, On the pathogenesis of chronic renal failure in primary glomerulopathies: a view from the interstitium. *Exp Nephrol.* 2(4):205-10, 1994
22. **Bono L** et al, The very long-term prognosis and complications of lupus nephritis and its treatment. *QJM.* 92:211-218, 1999
23. **Bruhl H** et al, Depletion of CCR5-expressing cells with bispecific antibodies and chemokine toxins: a new strategy in the treatment of chronic inflammatory diseases and HIV. *J Immunol.* 166(4):2420-2426, 2001
24. **Bruhl H** et al, Dual Role of CCR2 during Initiation and Progression of Collagen-Induced Arthritis: Evidence for Regulatory Activity of CCR2<sup>+</sup> T Cells *J Immun* 172: 890-898, 2004
25. **Bucala R** et al, Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1:71-81, 1994
26. **Bustin S A**, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193, 2000
27. **Cameron J. S**, Lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 10: 413-424, 1999
28. **Campbell D** et al, Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev* 195:58-71, 2003
29. **Carter P**, Chemokine receptor antagonism as an approach to anti-inflammatory therapy: 'just right' or plain wrong? *Curr Opin Chem Biol* 6:510-525, 2002
30. **Carvalho-Pinto E** et al, Autocrine Production of IFN- $\gamma$  by Macrophages Controls Their Recruitment to Kidney and the Development of Glomerulonephritis in MRL/lpr Mice. *Journal Immun* 169: 1058-1067, 2002



31. **Chan RW** et al, Expression of chemokine and fibrosing factor messenger RNA in the urinary sediment of patients with lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 50(9):2882-90, 2004
32. **Chang DM** et al, The expression and significance of intracellular T helper cytokines in systemic lupus erythematosus. *Immunol Invest* 31:1-12, 2002
33. **Chen S** et al, In vivo inhibition of CC and CX3C chemokine-induced leukocyte infiltration and attenuation of glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats by vMIP-II. *J Exp Med* 188:193-198, 1998
34. **Chomczynski P & Sacchi N**, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-9, 1987
35. **Cohen CD** et al, Quantitative gene expression analysis in renal biopsies: A novel protocol for a high-throughput multicenter application. *Kidney Int* 62:133-140, 2002
36. **Corsi MM** et al, RANTES and MCP-1 chemokine plasma levels in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure. *Clin Biochem.* 32(6):455-60, 1999
37. **Cyster JG** et al, Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286:2098-2102, 1999
38. **Daha MR** et al, Mechanisms of mesangial injury in glomerular diseases. *J Nephrol* 13 Suppl 3:89-95, 2000
39. **Daniel L** et al, Tubular lesions and tubular cell adhesion molecules for the prognosis of lupus nephritis. *Kidney Int* 60: 2215-2221, 2001
40. **Dragic T** et al: HIV-entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667-673, 1996
41. **Eddy AA** et al, Molecular Basis of renal fibrosis. *Paediatr Nephrol* 15:290-301, 2000
42. **Eis V** et al, Targeting the chemokine network in renal inflammation. *Arch Immunol Ther Exp* 52:164 –172, 2004
43. **Eis V** et al, Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction, *J Am Soc Nephrol* 15(2):337-47, 2004
44. **Ekenberg S, Hudson G**, RNase Protection Assay System: A Versatile Technique for the Analysis of RNA. *Promega Notes Magazine* 46:14, 1994
45. **Eriksson C** et al, Abnormal expression of chemokine receptors on T-cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 12(10):766-74, 2003
46. **Falk, R.J.** Treatment of lupus nephritis-a work in progress. *N. Engl. J. Med.* 343: 1182-1183, 2000
47. **Fernandez E, Lolis E**, Structure, Function, And Inhibition Of Chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469-499, 2002
48. **Foti M** et al, Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *International Immunology*, 11(6): 979-986, 1999
49. **Frink M**, Zur Funktion des CC-Chemokins CCL5/RANTES bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät, 2003
50. **Fujinaka H** et al, Suppression of anti-glomerular basement membrane nephritis by administration of anti-monocyte chemoattractant protein-1 antibody in WKY rats. *Jam Soc Nephrol* 8:1174-1178, 1997
51. **Furuichi K** et al, Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. *Am J Nephrol.* 20(4):291-9, 2000
52. **Gao JL** et al, Impaired Host Defence, Haematopoiesis, Granulomatous Inflammation and Type 1-Type 2 Cytokine Balance in Mice Lacking CC Chemokine Receptor 1. *J. Exp. Med.* 185(11):1959-1968, 1997
53. **Gharaee-Kermani M** et al, Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta 1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem* 271:17779-17784, 1996
54. **Glabinski AR** et al, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: CC Chemokine Receptor Expression by Trafficking Cells. *J Autoimmun* 19(4):175-81, 2002
55. **Glabinski AR** et al, Synchronous synthesis of  $\alpha$ - and  $\beta$ - chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 150:617-630, 1997
56. **Gong J-H** et al, Antagonists of monocyte chemoattractant protein-1 identified by modification of functionally critical NH<sub>2</sub>-terminal residues. *J Exp Med* 181:631-640, 1995
57. **Grandaliano G** et al, Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplant* 63:414-420, 1997
58. **Halks-Miller M** et al, CCR1 is an early and specific marker of Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 54(5):638-46, 2003
59. **Haringman J; Tak P**, Chemokine blockade: a new era in the treatment of rheumatoid arthritis? *Arthritis Res Ther* 6:93-97, 2004
60. **Hasegawa H** et al, Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum.* 48(9):2555-66, 2003

61. **Hebert LA** et al, Renoprotection: One or many therapies? *Kidney Int* 59:1211-1223, 2001
62. **Heck S** et al, I $\kappa$ B alpha independent downregulation of NF- $\kappa$ B activity by glucocorticoid receptor. *EMBO J* 16: 4698-4707, 1997
63. **Henle J** et al, Morbus Bright, klinische Mitteilungen. *Z Rationelle Med.* 1, 1844
64. **Herold G**, Innere Medizin, Gerd Herold, Köln, Auflage 2005
65. **Hesselgesser J** et al, Identification and characterisation of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor. *J Biol Chem* 273:15687-15692, 1998
66. **Hill G** et al, Predictive power of the second renal biopsy in lupus nephritis: significance of macrophages. *Kidney Int.* 59: 304-316, 2001
67. **Hill G** et al, Outcome of relapse in lupus nephritis: Roles of reversal of renal fibrosis and response of inflammation to therapy. *Kidney Int* 61: 2176-2186, 2002
68. **Holdsworth SR** et al, Th1 and Th2 T helper cell subsets affect patterns of injury and outcomes in glomerulonephritis. *Kidney Int.* 55(4):1198-216, 1999
69. **Horuk R** et al, CCR1-specific nonpeptide antagonist: efficacy in rabbit allograft rejection model. *Immunol Lett* 76:193-201, 2001
70. **Horuk R** et al, A non-peptide functional antagonist of the CCR1 chemokine receptor is effective in rat heart transplant rejection. *J Biol Chem* 276:4199-4204, 2001
71. **Horuk R, Howard P**, Chemokine receptor antagonists. *Med Res Rev* 20:155-168, 2000
72. **Huong DL** et al, Renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Medicine* 78: 148-166, 1999
73. **Iwata Y** et al, p38 Mitogen-activated protein kinase contributes to autoimmune renal injury in MRL-Fas lpr mice. *J Am Soc Nephrol.* 14(1):57-67, 2003
74. **Janka HU** et al, Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland. In: Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG. Deutsche Diabetes-Gesellschaft 2000
75. **Kaneko H** et al, Circulating levels of beta-chemokines in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 26:568 -573, 1999
76. **Kang DH** et al, Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13:806-816, 2002
77. **Kato K** et al, Use of heterocyclic derivatives as MIP-1 $\alpha$ /RANTES antagonists useful for treating e.g. inflammatory and allergic diseases, arteriosclerosis, asthma and multiple sclerosis. World (PCT) Patent WO-9724325, 1997
78. **Kitagawa K** et al, Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol.* 165(1):237-46, 2004
79. **Klier CM** et al, Chemokine-induced secretion of gelatinase B in primary human monocytes. *Biol Chem* 382: 1405-14110, 2001
80. **Kreft B** et al, Dysregulated transforming growth factor beta in neonatal and adult autoimmune MRL<sup>lpr/lpr</sup> mice. *J Autoimmun* 9:463-472, 1996
81. **Kriz W** et al, Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 12:496-506, 2001
82. **Leppert D** et al, T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 154: 4379-4389, 1995
83. **Letterio JJ** et al, Autoimmunity associated with TGF $\beta$  deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *Nature* 359:693-699, 1992
84. **Liang M** et al, Identification and Characterization of a Potent, Selective, and Orally Active Antagonist of the CC Chemokine Receptor-1. *J Biol Chem* 275(25):19000-19008, 2000
85. **Lloyd CM** et al, RANTES und MCP-1 play important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med* 185:1371-1380, 1997
86. **Luster AD** et al, Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Eng J Med* 338:436-445, 1998
87. **Luther SA** et al, Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2:102-107, 2001
88. **Mack M** et al, Blockade of the chemokine receptor CCR2 aggravates lupus nephritis in MRL-lpr mice- Evidence for involvement of regulatory T cells (abstract). *J Am Soc Nephrol* 14:174A, 2003
89. **Mackay CR**, Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol.* 2(2):95-101, 2001
90. **MACS<sup>®</sup>** Technology: Gold standard in cell separation, <http://www.miltenyibiotec.com/>
91. **Marcussen N** et al, Tubulointerstitial damage leads to atubular glomeruli: significance and possible role in progression. *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 6:74-75, 2000
92. **Mills SG** et al, Spiro-substituted azacycles as modulators of chemokine receptor activity. World (PCT) Patent WO-9825605, 1998
93. **Mishra N** et al, Histone deacetylase inhibitors modulate renal disease in the MRL-lpr/lpr mouse. *J Clin Invest.* 111(4):539-52, 2003

94. **Moore BB** et al, CXC chemokine modulation of angiogenesis: The importance of balance between angiogenic and angiostatic members of the family. *J Invest Med* 46:113-120, 1998
95. **Muller GA** et al, The role of interstitial cells in the progression of renal diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2(10 Suppl):198-205, 1992
96. **Murphy ED**, A single gene for massive lymphoproliferation with immune complex disease in a new mouse strain MRL. 16ter internationaler Kongreß in Hämatologie Excerpta Medica, Amsterdam: 69-80, 1976
97. **Murphy PM** et al, International union of pharmacology. XXII Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52:145-176, 2000
98. **Murphy PM**, The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Ann Rev Immunol* 12:593-633, 1994
99. **Nabokov A** et al, Demonstration of the proliferation marker Ki-67 in renal biopsies: correlation to clinical findings. *Am J Kidney Dis*. 30(1):87-97, 1997
100. **Narumi S** et al, Serum levels of IFN-inducible protein-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 12(10):1561-5, 2000
101. **Natori Y** et al, Production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured glomerular epithelial cells: Inhibition by dexamethasone. *Exp Nephrol* 5:318-322, 1977
102. **Naya A** et al, New fused compounds are chemokine antagonists-useful for the treatment and prevention of acute and chronic inflammatory disorders, AIDS, cancer, ischemic reflow disorders and arteriosclerosis. World (PTC) Patent WO-9804554, 1998
103. **Nebel M** , Dialysebehandlung. Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie, [www.nephrologie.de/Statement\\_PDF/Nebel%20Berlin.pdf](http://www.nephrologie.de/Statement_PDF/Nebel%20Berlin.pdf); Kongress 2004
104. **Nelson PJ** et al, Chemokines, chemokine receptors, and allograft rejection. *Immunity* 14:377-386, 2001
105. **Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC**, The role of macrophages in glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 16 Suppl 5:3-7, 2001
106. **Norman JT** et al, Hypoxia-induced changes in extracellular matrix metabolism in renal cells. *Exp Nephrol* 7:463-469, 1999
107. **Norman JT** et al, Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int* 58:2351-2366, 2000
108. **Okamoto H** et al, A role for TARC/CCL17, a CC chemokine, in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*. 30(11):2369-2373, 2003
109. **Onuffer J, Horuk R**, Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments. *Trends in Pharm Sci* 23:439-467, 2002
110. **Ostermann G et al**, JAM-1 is a ligand of the beta (2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat.Immunol* 3:151-158, 2002
111. **Panzer U** et al, The chemokine receptor antagonist AOP-RANTES reduces monocyte infiltration in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 56:2107-2115, 1999
112. **Pavenstädt H**, Die Lupusnephritis, Universitätsklinik Freiburg, [www.nephrologie.de](http://www.nephrologie.de), 2003
113. **Perez de Lema G** et al, Chemokine Expression Precedes Inflammatory Cell Infiltration and Chemokine Receptor and Cytokine Expression during the Initiation of Murine Lupus Nephritis, *J Am Soc Nephrol* 12: 1369-1382, 2001
114. **Perez de Lema G** et al, Retinoic acid treatment protects MRL/lpr lupus mice from the development of glomerular disease. *Kidney Int*. 66(3):1018-28, 2004
115. **Proudfoot AEI** et al, Extension of recombinant human RANTES by the retention of the initiating methionine produces a potent antagonist. *J Biol Chem* 271:2599-2603, 1996
116. **Quackenbush EJ** et al, Eotaxin influences the development of embryonic haematopoietic progenitors in the mouse. *J Leukocyte Biol* 62:661-666, 1997
117. **QUASI Niere**, Qualitätssicherung in der chronischen Nierenersatztherapie (Dialyse und Nierentransplantation), Bericht 2002/2003
118. **Raychaudhuri SP** et al, Up regulation of RANTES in psoriatic keratinocytes: a possible pathogenic mechanism for psoriasis. *Acta Derm Venereol* 79:9-11, 1999
119. **Ritz E** et al, End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis*. 34:795-808, 1999
120. **Robinson SC et al**, A chemokine receptor antagonist inhibits experimental breast tumor growth. *Cancer Res*. 63(23):8360-8365, 2003
121. **Rollins BJ** et al, Chemokines. *Blood* 90:909-928, 1997
122. **Romagnani P** et al, Role for interactions between IP-10/NIG and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 10:2518-2526, 1999
123. **Rossi** et al, The biology of Chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18:217-242, 2000

124. **Rottman JB** et al, Leukocyte recruitment during onset of experimental allergic encephalomyelitis is CCR1 dependent. *Eur J Immunol.* 30(8):2372-7, 2000
125. **Rottman JB**, Key Role of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation, Immunity, Neoplasia, and Infectious Disease. *Vet Pathol* 36:357–367, 1999
126. **Rovin BH** et al: Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest* 71:536-542, 1994
127. **Rovin B**, Chemokine blockade as a therapy for renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypert* 13:225-232, 2000
128. **Ruiz-Ortega M** et al, Angiotensin II regulates the synthesis of proinflammatory cytokines and chemokines in the kidney. *Kidney Int Suppl.* (82):12-22, 2002
129. **Sallusto F** et al, The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Ann Rev Immunol* 18: 593-620, 2000
130. **Sallusto F** et al, Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 19:568-574, 1998
131. **Satriano JA** et al, Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN- $\gamma$ , tumor necrosis factor-  $\alpha$ , IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol* 150:1971-1978, 1993
132. **Schering** Gruppe, Entwicklungsprojekte Spezial-Therapeutika, [www.schering.de/scripts/de](http://www.schering.de/scripts/de), 2004
133. **Schlondorff D** et al, Chemokines and renal disease. *Kidney Int* 51:610-621, 1997
134. **Schmeisser A** et al, ACE inhibition lowers angiotensin II-induced chemokine expression by reduction of NF-kappaB activity and AT1 receptor expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 10;325(2):532-540, 2004
135. **Schwarz M** et al, Recent developments in modulating chemokine networks. *Expert Opin. Ther. Patents* 9: 1471-1490, 1999
136. **Segerer S et al**, Expression of the Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Its Receptor Chemokine Receptor 2 in Human Crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 11:2231-2242, 2000
137. **Segerer S** et al, The Duffy antigen receptor for chemokines is up-regulated during acute renal trasplant rejection and crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 58:1546-1556, 2000
138. **Segerer S** et al, Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney disease; *Kidney Int* 56: 52-64, 1999
139. **Segerer S** et al, Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: From basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol* 11: 152-176, 2000
140. **Shimizu S**, et al, Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates nephritis in MRL/lpr mice. *Rheumatology* 43(9):1121-1128, 2004
141. **Shimizu H** et al, Anti-Monocyte Chemoattractant Protein-1 Gene Therapy Attenuates Renal Injury Induced by Protein Overload Proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 14:1496–1505, 2003
142. **Strutz F** et al, Role of basic FGF-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61:1714-1728, 2002
143. **Strutz F** et al, Interstitial pathomechanisms underlying progressive tubulointerstitial damage. *Kidney Blood Press Res.* 22(1-2):71-80, 1999
144. **Szekanecz Z, Koch AE**, Chemokines and angiogenesis. *Curr Opin Rheumatol.* 13(3):202-208, 2001
145. **Taal MW** et al, Renoprotective benefits of RAS inhibitors: From ACEi to angiotensin II antagonists. *Kidney Int* 57:1803-1817, 2000
146. **Tang WW** et al, Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM Ab GNF. *Kidney Int* 50:665-671, 1996
147. **Tesch GH** et al, Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocyte infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp Med* 190:1813-1824, 1999
148. **Tesch GH** et al, Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J Clin Invest.* 103(1):73-80, 1999
149. **Tokuda A** et al, Pivotal Role of CCR1-Positive Leukocytes in Bleomycin- Induced Lung Fibrosis in Mice. *J Immun* 164: 2745-2751, 2000
150. **Topham P** et al, Lack of chemokine receptor CCR1 enhances Th1 responses and glomerular injury during nephrotoxic nephritis. *J Clin Invest* December 104(11):1549-1557 1999
151. **Traynor, A. E** et al, Treatment of severe systemic lupus erythematosus with high-dose chemotherapy and haematopoietic stem cell transplantation: a phase 1 study. *Lancet* 356: 701-707, 2000
152. **Trebst C** et al, Chemokines—possible new options for the treatment of multiple sclerosis *Nervenerzt* 74:850-857, 2003
153. **Tucci M** et al, Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis. *Arthritis Rheum.* 50(6):1842-1849, 2004

- 
- 154.** **U.S. Renal Data System**, USRDS 2004 Annual Data Report: Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2004
- 155.** **Vielhauer V** et al, Identifying Chemokines as Therapeutic Targets in Renal Disease: Lessons from Antagonist Studies and Knockout Mice. *Kidney Blood Press Res* 27:226–238, 2004
- 156.** **Vielhauer V** et al, Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC-chemokine receptor-2 and –5 positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 12:1173-1187, 2001
- 157.** **Vielhauer V** et al, CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 66(6):2264-78, 2004
- 158.** **Wada T** et al, MIP-1alpha and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56(3):995-1003, 1999
- 159.** **Wada T** et al, Detection of urinary IL-8 in glomerular diseases. *Kidney Int.* 46: 455-460, 1994
- 160.** **Wada T** et al, Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. *Kidney Int* 49:761-767, 1996
- 161.** **Wada T** et al, Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney Int* 58:1492-1499, 2000
- 162.** **Walker N**, Real time and quantitative PCR, <http://dir.niehs.nih.gov/pcr/home.htm>
- 163.** **Walls J**, Relationship between proteinuria and progressive renal disease. *Am J Kidney Dis.* 37(1 Suppl 2):S13-6, 2001
- 164.** **Watanabe-Fukunaga R**: Lymphoproliferation disorder in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317, 1992
- 165.** **Weber C** et al, Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and Th1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood* 97:1144-1146, 2001
- 166.** **Weber KS** et al, Differential immobilisation and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow. *Eur J Immunol* 29:700-712, 1999
- 167.** **Weening JJ** et al, The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol.* 15(2):501-3, 2004
- 168.** **Yamamoto K** et al, Expression of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha in the plasma and tissues of mice with lupus nephritis. *Lab Invest* 80:1561-1570, 2000
- 169.** **Yamamoto-Shuda Y** et al, Therapeutic effect of glucocorticoid on experimental crescentic glomerulonephritis. *J Lab Clin Med* 134:410-418, 1999
- 170.** **Yokoyama H** et al, Urinary levels of chemokines (MCP1, IL8) reflect distinct disease activities and phases of human IgA nephropathy. *J Leukoc Biol* 63:493-499, 1998
- 171.** **Yoo CW** et al, Predictors of renal outcome in diffuse proliferative lupus nephropathy: data from repeat renal biopsy. *Nephrol Dial Transpl* 15:1604-1608, 2000
- 172.** **Yoshimura T** et al, Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defence cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9233-9237, 1987
- 173.** **Zlotnik A** et al, Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2):121-7, 2000
- 174.** **Zoja C** et al, Renal expression of monocyte chemoattractant protein-1 in lupus autoimmune mice. *J Am Soc Nephrol* 8:720 -729, 1997
- 175.** **Zoja C** et al, Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF- $\kappa$ B activation. *Kidney Int* 53:1608–1615, 1998

## 7 Abkürzungen

ABTS	2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt crystals
ACE	angiotensin converting enzyme
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazole
AOP-RANTES	Aminooxypentan- CCL5/RANTES
APES	3-Aminopropyltriethoxy-silan
AT-R-Blocker	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Blocker
BSA	bovines Serum-Albumin
BUN	Serumharnstoff (blood urea nitrogen)
BX471	niedermolekularer CCR1 Antagonist, R-N-[5-chloro-2- [2-[4- [(4-fluorophenyl) methyl]-2-methyl-1 piperazinyl]2 oxoethoxy] phenyl] urea HCl
C3a	Komplementfaktor 3a
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
COX-2	Cyclooxygenase-2
cpm	counts per minute
DAG	Diacylglycerin
DARC	Duffy antigen receptor for chemokines
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dsDNA	Doppelstrang DNS (double stranded DNA)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle Allergische Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiaminetetraaceticacid
EGF	epidermal growth factor
ELC	EBI1 (CCR7) ligand chemokine
ELISA	enzyme-linked-immunosorbent-assay
E-L-R-Sequenz	Glutamat-Leucin-Arginin
ESRD	end-stage renal disease
ET1	Endothelin 1
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAM	fluoreszenter Farbstoff
FCS	fetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FSGS	fokal-segmentale Glomerulosklerose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GF	Gesichtsfeld
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte/monocyte- colony stimulating factor)
GPCRs	G Protein-gekoppelte Rezeptoren (G-protein coupled receptors)
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (Granulocyte colony stimulating factor)
Glom	Glomerulus
GNF	Glomerulonephritis
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GRO- $\alpha$	Growth-related-Oncogene- $\alpha$
HCC-1	Human Hepatocellular Carcinoma-1
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
Hpf	Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung (high-power-field)
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IgG,IgA	Immunoglobulin G, A
IL	Interleukin
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$

---

IP-10	interferon-induced protein-10
IP <sub>3</sub>	inositol-1,4,5-trisphosphate
ISH	in situ Hybridisierung
i.v.	intravenös
JAK/STAT	Janus kinase / signal transducer and activator of transcription
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
Ki	inhibitorische Konstante
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	mitogen-activated-protein kinase
Met-RANTES	N-terminal mit Methionin modifiziertes CCL5/RANTES
MCP1	monocyte chemoattractant protein-1
MDC	macrophage derived chemokine
MIP-1	macrophage inflammatory protein-1
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MPIF-1	Myeloid Progenitor Inhibitory Factor-1
mRNA	messenger -Ribonukleinsäure
NF-κB	nuclear factor-κB
NK Zellen	natural killer cells
PDGF	platelet derived growth factor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PIP2	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PLC	Proteinlipase C
PMN	polymorphonukleäre Zellen
RANTES	regulated upon activation normal T cell expressed and secreted, CCL5
Real-time RT-PCR	Real-time reverse transcription-polymerase chain reactio
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
Rnase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI Medium	Zellkultur-Medium zur Anzucht humaner Leukozyten, entwickelt von <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SMA	smooth muscle actin
SSC	saline-sodium citrate Puffer
ssDNA	Einzelstrang DNS (single-stranded DNA)
TARC	Thymus and activation-regulated chemokine
TGF-β	tumor growth factor-β
TNF-α	tumor necrosis factor-α
Tx	Transplantation
USRDS	US-Renal Data System
UUO	unilateral ureteral obstruction
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VIC	fluoreszenter Farbstoff
vs.	versus
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)

## 8 Anhang

### Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

Name:	<b>Belemezova</b>
Vorname:	<b>Emilia</b>
Geburtsdatum	6. Januar 1978
Geburtsort:	Dupnitsa, Bulgarien
Staatsangehörigkeit:	bulgarisch
Anschrift:	Neutorstraße 1 90403 Nürnberg

#### Schulbildung:

1984 – 1991	Grundschule in Blagoevgrad, Bulgarien
1991 – 1996	Naturwissenschaftlich-Mathematisches Gymnasium, Fachrichtung Mathematik, Blagoevgrad, Bulgarien
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

#### Hochschulausbildung:

1996 – 2001	Medizinische Universität Sofia, Bulgarien
2001 – 2003	Ludwig Maximilian Universität München: Studiengang Humanmedizin
2003 September	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)
2004 Oktober	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

#### Berufliche Nebentätigkeiten und Fortbildungen:

1995 Juli	Teilnahme an der 27. Internationalen Chemie Olympiade, Peking, China
1999 Oktober	FEBS Advanced Course: `PCR-based methods in the detection and characterisation of inherited, infectious and malignant diseases.`, Skopje
2001 - 2004	Aushilfe: Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes
2002 - 2004	experimentelle Doktorarbeit am Nephrologischen Zentrum, Medizinische Poliklinik, Direktor: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff, Gruppenleiter: PD Dr. med. HJ Anders Promotion 23.3.2006
2003 Juni	Teilnahme am Satellitsymposium zum ISN-ERA/EDTA-



---

	Weltkongress der Nephrologie: `Glomerulonephritis and progression to renal insufficiency`, Kloster Seeon, Deutschland
2004 März	Teilnahme am 38. Workshop Fortschritte der Nephrologie, Stromberg
2004 April	Teilnahme mit Poster am 110. Internistenkongress der DGIM, für den Young Investigators' Award
seit Januar 2005	Wissenschaftliche Mitarbeiterin/ Ass. Ärztin an der Universität Erlangen, Medizinische Klinik IV

**Preise:**

Forum- Preis 2003, Nephrologisches Forum München

Young Investigators' Award 2004, 3. Posterpreis der DGIM

**Publikationen:**

Anders HJ, Belemezova E, Eis V, Segerer S, Vielhauer V, Perez de Lema G, Kretzler M, Cohen CD, Frink M, Horuk R, Hudkins KL, Alpers CE, Mampaso F, Schlondorff D: Late onset of treatment with a chemokine receptor CCR1 antagonist prevents progression of lupus nephritis in MRL-Fas(lpr) mice. J Am Soc Nephrol. 2004 Jun;15(6):1504-13

Ninichuk V, Gross O, Reichel C, Khandoga A, Pawar RD, Ciubar R, Segerer S, Belemezova E, Radomska E, Luckow B, de Lema GP, Murphy PM, Gao JL, Henger A, Kretzler M, Horuk R, Weber M, Krombach F, Schlondorff D, Anders HJ: Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease. J Am Soc Nephrol. 2005 Apr;16(4):977-85.

Patole PS, Grone HJ, Segerer S, Ciubar R, Belemezova E, Henger A, Kretzler M, Schlondorff D, Anders HJ: Viral Double-Stranded RNA Aggravates Lupus Nephritis through Toll-Like Receptor 3 on Glomerular Mesangial Cells and Antigen-Presenting Cells. J Am Soc Nephrol. 2005 May;16(5):1326-38

Nürnberg, 2.4.2006

---

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas, für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung in jeder Hinsicht, für die Einführung in die spannende Welt der Forschung möchte ich mich sehr herzlich beim Herrn PD Dr. med. Hans-Joachim Anders bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern für die wunderschöne Familie die sie mir und meiner Schwester erschaffen haben, sowie für deren finanzielle Hilfe und Glauben an mich. Ganz besonders möchte auch ich meiner Schwester für die liebevolle Unterstützung danken.

Herzlichen Dank an meinen bulgarischen Freunden in München, die mir ununterbrochen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Frau Yvonne Linde danke ich für die geduldige und kompetente Einführung in vielen Labortechniken. Herrn Vaclav Eis danke ich für die Durchführung der FACS Analysen und Zell Transfer Versuche und insbesondere für seine freundliche Unterstützung und das sehr angenehme Arbeitsklima im Labor.

Herrn Prof. Dr. med. Hermann-Josef Gröne danke ich für die histopathologische Auswertung des Nierengewebes.

Dank auch an Prof. Dr. med. D.Schlöndorff für die Möglichkeit in einer seinen Arbeitsgruppen forschen zu dürfen. Dank an allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Klinische Biochemie, ohne deren Hilfe die Ausführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.