

Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Herr Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die interstitielle Entzündung im Rahmen
des Alport Syndroms**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jan Nepomuk Jedlicka

aus

München-Pasing

Jahr

2011

**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Herr PD Dr. med Stephan Segerer

Mitberichterstatter: Herr PD Dr. med Lutz T. Weber

Frau Prof. Dr.med Elke Holinski-Feder

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. hc. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.2011

*Meiner Mutter, Meinem Vater,
Meiner Schwester und Meiner Sheila*

Inhalt

Abkürzungen	8
Einleitung.....	10
Das Alport-Syndrom	10
Die Erstbeschreibung	10
Klinik und Formen des Alport Syndroms	10
Epidemiologie	15
Genetik.....	15
Morphologie der Alport-Niere	17
Chemokine.....	20
Nomenklatur der Chemokine	20
Typische und atypische Chemokinrezeptoren.....	20
Entzündung und Chemotaxis durch Chemokine.....	21
Die Rolle der Chemokine.....	23
CXCR3 und seine Liganden in der Niere.....	24
Hypothesen und Ziel.....	25
Material und Methoden.....	26
Patientengut	26
Immunhistochemie.....	26
Immunfluoreszenz	27
Doppelimmunfluoreszenz	27
Antigenretrieval mit Autoklaviermaschine und HCL	28
CD3.....	28

CXCR3	29
CD68	29
α 2- und α 3-Kette des Kollagen IV	30
α 5-Kette des Kollagen IV	30
Auswertung der α 5-Kette des Kollagen IV	30
Auswertung der Immunhistochemie CD3 und CXCR3	31
Auswertung Immunhistochemie CD68	32
Auswertung Doppelimmunfluoreszenzen CXCR3/CD3 und CXCR3/CD68	32
Lichtmikroskopische Analyse der Alport-Biopsien	32
Klinische Daten der biopsierten Patienten	33
Statistische Auswertung und Korrelation	35
Ergebnisse	36
Die Darstellung der α 2-Kette des Kollagen IV	36
Die Darstellung der α 3-Kette des Kollagen IV	36
Verlust des Signals der α 5-Kette des Kollagen IV aus der GBM bei AS	36
Eine interstitielle CXCR3/CD3- doppelpositive Lymphozyten-infiltration in der AS-Niere	39
Schaumzellen in der AS-Niere sind CD68-positiv und CXCR3-negativ	44
CXCR3 und morphologische, funktionelle Parameter	46
Diskussion	47
Die interstitielle Entzündung beim Alport Syndrom ist altbekannt	47
Die interstitielle Entzündung als möglicher Teil einer universellen Endstrecke chronischer Nierenerkrankungen	48
Der Ursprung der Schaumzellen und eine mögliche Interaktion mit Lymphozyten	49
Immunsuppression als Therapieoption des Alport Syndroms	50
Die CXCR3-Blockade als entzündungshemmende Therapie des AS	51

Zusammenfassung.....	54
Veröffentlichtes Abstract	55
Danksagung	56
Anhang	57
Protokoll Immunhistochemie	57
Protokoll Immunfluoreszenz	58
Protokoll Doppelimmunfluoreszenz	59
Materialien für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz	61
Primärantikörper.....	61
Sekundärantikörper	61
Isotypkontrollen.....	62
Geräte und Werkzeuge	63
Medien und Reagenzien	64
Software	66
Literaturquellen	67

Abkürzungen

<i>ACEI</i>	ACE-Hemmer
<i>ADAS</i>	autosomal-dominantes AS
<i>Alport-Maus</i>	COL4A3-Defiziente Maus[1]
<i>Aqua dest. (a.d.)</i>	Aqua destillatum
<i>ARAS</i>	autosomal-rezessives AS
<i>ARB</i>	Angiotensin-II-Rezeptor-1-Blocker
<i>AS</i>	Alport Syndrom
<i>AT</i>	Angiotensin
<i>BC</i>	Bowmann'sche Kapsel
<i>CCL</i>	MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein)
<i>CCL, CXCL</i>	Chemokinrezeptorliganden
<i>CCR, CXCR, CX₃C</i>	Chemokinrezeptoren
<i>CCX-CKR</i>	Chemocentryx chemokine receptor
<i>CD</i>	Cluster of differentiation
<i>CD3+</i>	CD3-positive Zellen
<i>CD3+</i>	CD3-positiv
<i>CD45</i>	Pan-Leukozyten-Marker (ohne Plasmazellen)
<i>Col4a(1-6)</i>	$\alpha(1-6)$ -Kette des Kollagen IV
<i>CXCR3+</i>	CXCR3-positive Zellen
<i>CXCR3+</i>	CXCR3-positiv
<i>Cy3</i>	Cyanin mit Exzitationsmaximum bei 550nm
<i>DAPI</i>	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
<i>DARC</i>	Duffy antigen/receptor for chemokines
<i>FITC</i>	Fluorescein isothiocyanat
<i>GBM</i>	Glomeruläre Basalmembran
<i>GF</i>	Gesichtsfeld
<i>Glom</i>	Glomerulus
<i>HE</i>	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
<i>IgA-N</i>	IgA-Nephritis
<i>IgSF-CAM</i>	Immunglobulin-superfamily cell adhesion molecules
<i>KH₂PO₄</i>	Kaliumhydrogenphosphat
<i>min</i>	Minuten
<i>MMP</i>	Matrixmetalloproteinase

<i>mRNA</i>	Messenger-Ribonukleinsäure
<i>MW</i>	Mikrowelle
<i>Na₂HPO₄</i>	Dinatriumhydrogenphosphat
<i>NaCl</i>	Natriumchlorid
<i>PAS</i>	Periodsäure-Leukofuchsin-Färbung
<i>PBS</i>	Phosphate buffered saline
<i>PräTx</i>	Prätransplantationsbiopsie
<i>Protein D6</i>	Chemokinrezeptor
<i>RT</i>	Raumtemperatur
<i>SEM</i>	Durchschnittsfehler der Standardabweichung
<i>TBM</i>	Tubuläre Basalmembran
<i>TRIS</i>	Trishydroxymethylaminomethan
<i>VCAM</i>	Vascular cell adhesion molecule
<i>XLAS</i>	X-chromosomales AS

Einleitung

Das Alport-Syndrom

Die Erstbeschreibung

Im Jahre 1927 veröffentlichte der südafrikanische Arzt Arthur Cecil Alport im *British Medical Journal* einen Fallbericht über eine *hereditäre hämorrhagische Nephritis* [2]. Alport betrachtete retrospektiv Stammbäume von erkrankten Familien, die von Dickinson, Guthrie [3], Hurst [4] und einigen anderen um die Jahrhundertwende erstellt worden waren. Die Erkrankung zeichnete sich dadurch aus, dass sie meist ganze Familien betraf und männliche Familienangehörige wesentlich schwerer erkrankten als weibliche Familienmitglieder. Das Leitsymptom der Patienten war eine Hämaturie, die als Mikrohämaturie persistierte und im Rahmen von Infektionen, nach dem Genuss von schwarzen Johannisbeeren oder bei Schwangeren nach der Geburt zu einer Makrohämaturie exazerbieren konnte. In der Exazerbation konnte eine Proteinurie begleitend sein. Zusätzlich litten fast alle Familienmitglieder unter einer starken Innenohrschwerhörigkeit. Männliche Familienmitglieder starben meist im Alter zwischen 15 und 30 Jahren an den Folgen einer Urämie. Weibliche Familienmitglieder hatten trotz Mikrohämaturie keine eingeschränkte Lebenserwartung [2]. Im Jahr 1961 wurde aus der bis dahin als „Hereditäre Nephritis“ bekannten Erkrankung das Alport Syndrom [5].

Klinik und Formen des Alport Syndroms

Hauptsymptome aus der nephrologischen Sicht

Heute, knapp 50 Jahre nach Namensgebung, ist der Symptomkomplex Alport Syndrom (AS) eindeutig definiert und es wurden genaue Diagnosekriterien erstellt (siehe Tabelle 1) [6-7]. Obwohl es eine autosomale und gonosomale Variante des AS gibt, ist für die klinische Symptomatik ausschlaggebend, ob der Patient homo/hemizygot oder heterozygot für den Gendefekt ist. Da die X-chromosomale Variante mit einem Anteil von ca. 85% die weitaus häufigste Form ist, sind meist Männer vom klinischen Vollbild betroffen [8]. Neben der X-chromosomalen Variante (XLAS) gibt es eine autosomal-rezessive Form (ARAS), die einen Anteil von ca. 15% hat und das äußerst seltene autosomal-dominante AS (ADAS) [8].

Zentraler Bestandteil des klinischen Bildes des AS ist eine persistierende Hämaturie [9]. Erkrankte Männer haben in der Regel eine dauerhafte Mikrohämaturie, die im Rahmen von Infekten der oberen Luftwege zu einer Makrohämaturie exazerbieren kann [10]. Im Kindesalter kann die Makrohämaturie von Flankenschmerzen begleitet sein. Im Erwachsenenalter sind die Episoden von Makrohämaturie, auch weil ein großer Anteil der AS-Patienten im Erwachsenenalter terminal niereninsuffizient ist, selten [11]. Die Mikrohämaturie kann bei betroffenen Knaben meist schon im ersten Lebensjahr nachgewiesen werden [12]. Bleibt der Knabe bis zur Vollendung des ersten Lebensjahrzehnts frei von einer persistierenden Mikrohämaturie, so ist es sehr unwahrscheinlich, dass dieser an einem AS erkrankt ist [13].

Eine Proteinurie wird in den meisten Fällen in den ersten Lebensjahren nicht nachgewiesen. Im Laufe der Erkrankung kann es jedoch zu einer Proteinurie kommen, die bis zum nephrotischen Syndrom gehen kann [9, 14].

Eine Hypertonie kann ebenfalls im Laufe der Erkrankung auftreten [12].

Die progressive Nierenfunktionsverschlechterung im Rahmen des Alport Syndroms mündet fast immer in eine terminale Niereninsuffizienz [15]. In welchem Lebensalter die terminale Niereninsuffizienz erreicht wird, variiert von Gendefekt zu Gendefekt und damit von Familie zu Familie [16]. Im Gegensatz zur ungünstigen Prognose der Männer mit einem XLAS, haben weibliche, meist heterozygote, Trägerinnen des Gendefekts einen wesentlich milderen Krankheitsverlauf zu erwarten [8]. Über 90% werden aber in ihrem Leben eine Mikrohämaturie entwickeln [17]. Eine Makrohämaturie, ein nephrotisches Syndrom und das Auftreten von extrarenalen Begleitsymptomen sind auch bei weiblichen Familienmitgliedern stark-negative Prädiktoren für die Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz [18-19]. Meist ist die Beeinträchtigung der Nierenfunktion jedoch bis in das hohe Alter gering. Im Alter zwischen 40 und 50 werden nur ca. 10-15% der heterozygoten Frauen dialysepflichtig sein, wohingegen in diesem Alter knapp 90% der Männer mit AS an einem terminalen Nierenversagen leiden [19-20]. Das XLAS wird zusätzlich in den juvenilen und den adulten Typ unterteilt. Tritt die terminale Niereninsuffizienz in der XLAS-Familie durchschnittlich vor dem 31ten Lebensjahr

auf, so spricht man von einem juvenilen Typ. Liegt es über dem 31ten Lebensjahr so spricht man vom adulten Typ [9, 21]. Diese Unterscheidung ist vor allem von prognostischer Bedeutung für den neu diagnostizierten XLAS-Patienten. Es ermöglicht dem Patienten das Eintrittsalter in die terminale Niereninsuffizienz auf fünf bis sieben Jahre genau voraus zu sagen [22].

Neben dem X-chromosomalen juvenilen und adulten AS gibt es zwei weitere Formen. Das autosomal-rezessive und das äußerst seltene autosomal-dominante AS [23]. Im Rahmen des ARAS können auch betroffene Frauen das klinische Vollbild zeigen. Das klinische Bild des ARAS ist mit dem des XLAS identisch, jedoch ist der Verlauf meist schwerer [8]. Das terminale Nierenversagen wird meist früh im Leben erreicht [9]. Der Großteil der Patienten hat eine Beeinträchtigung des Gehörs als extrarenale Manifestation des AS, wohingegen Störungen des Sehapparates nicht unbedingt typisch sind [8]. Bei den heterozygoten Trägern eines ARAS ist die Klinik variabel in der Ausprägung. Sie kann von komplett asymptomatisch, über eine intermittierende, bis hin zu einer persistenten Hämaturie reichen [24]. In einigen wenigen Fällen wurde eine terminale Niereninsuffizienz bei heterozygoten Trägern des ARAS berichtet [25].

Das äußerst seltene ADAS wurde bis jetzt nur bei einer Hand voll Familien gefunden [26-27]. Eine Vererbung vom Vater zum Sohn ist möglich, das klinische Bild ist unabhängig vom Geschlecht. Die Komponenten der Klinik sind die gleichen, wie bei einem XLAS. Persistierende Hämaturie mit gleichzeitigem Auftreten eines Hörverlustes kommt vor. Augenveränderungen sind im Zusammenhang mit einem ADAS bis heute nicht berichtet worden. Mit Ausnahme einer Koinzidenz mit einer Katarakt und einem Einzelfall von perimakulären Flecken [28]. Der Verlauf dieser Variante ist langsam und mild [29]. Die terminale Niereninsuffizienz wird meist erst in der sechsten Lebensdekade erreicht und ist nicht zwingend [18].

Tabelle 1: Diagnosekriterien AS übernommen aus [6]

Diagnosekriterien AS		Symptomhäufigkeit	
1	Positive Familienanamnese(Hämaturie) mit/ohne Progression zum terminalen Nierenversagen	Familienanamnese	85%
		Hämaturie	100%
2	Progrediente Innenohrschwerhörigkeit		75%
3	Augenveränderungen (Lenticonus, Fundus albiunpctatus)		20-45%
4	Charakteristische ultrastrukturelle Veränderungen der GBM (Aufsplitterung/ Lamellierung, Verdickung, Verdünnung)		100%
5	Diffuse Leiomyomatose		1-2%
6	COL4A5, COL4A3,4-Mutationen	Nachweisbar in	40-70%

Extrarenale Begleitsymptome

Neben der Nierenfunktionsstörung kann es im Rahmen eines AS zu extrarenalen Begleitsymptomen kommen. Bei deren Auftreten ist mit einem insgesamt ungünstigen Verlauf zu rechnen [18]. Die zwei wichtigsten Zielorgane sind das Innenohr und das Auge [30]. Pathologische Veränderungen an der glatten Muskulatur können im Rahmen eines AS vorhanden sein [31].

Am Innenohr manifestiert sich das AS als progressiver Hörverlust. 55% aller Männer und 45% aller Frauen mit AS leiden an einer Innenohrschwerhörigkeit [32]. Der Zeitpunkt zu dem der Hörverlust symptomatisch wird variiert sehr. Bei Männern mit XLAS wird der Hörverlust meist im späten Jugendalter manifest. Es gibt einige wenige Fälle, bei denen der Hörverlust erst in der sechsten Lebensdekade auftrat [33]. Bei Knaben mit XLAS kann der noch asymptomatische Hörverlust meist schon im ersten Lebensjahrzehnt audiometrisch nachgewiesen werden. Hier zeigt sich eine verringerte Sensitivität im Frequenzbereich zwischen 2 und 8 kHz [34]. Mit Voranschreiten der Erkrankung weitet sich die Schwerhörigkeit auf das Frequenzspektrum der Umgangssprache aus und wird symptomatisch. Bei Frauen mit XLAS kommt ein Hörverlust seltener vor und tritt später auf [9]. Bei den autosomalen Formen des AS gibt es keinen Unterschied bei der Ausprägung des Hörverlustes zwischen Männern und Frauen [22].

Augenveränderungen sind bei AS-Patienten seltener als die Innenohrschwerhörigkeit. Zwischen 15-30% der Patienten mit Alport Syndrom haben nachweisbare Veränderungen am Auge [9]. Die Art der Augenveränderung variiert nicht mit dem Typ des AS [22]. Der Lenticonus anterior, eine konische Vorwölbung des mittleren vorderen Anteiles der Linse in die vordere Augenkammer, ist die AS-pathognomonische Augenveränderung [35]. Er ist Indikator für einen schweren Krankheitsverlauf mit einer frühen terminale Niereninsuffizienz [36]. Ein großer Anteil der männlichen AS-Patienten hat einen Lenticonus anterior. Bei 75% der Patienten ist der Lenticonus anterior bilateral [9]. Er entwickelt sich progressiv [37]. Klinisch verursacht der Lenticonus anterior ein verzerrtes Sehen und Kurzsichtigkeit.

Bei knapp 30% der AS -Patienten findet man gelbe perimakuläre Flecken an der Retina. Diese sind asymptomatisch [8]. Die retinale Veränderung kann kombiniert mit einem Lenticonus anterior auftreten, oder alleine vorliegen.

Die bilaterale Katarakt ist die dritte Augenveränderung die im Rahmen eines AS auftreten kann. Sie ist meist mit einer diffusen Leiomyomatose assoziiert [38].

Bei knapp 20 AS-Familien weltweit gibt es ein gemeinsames Vorkommen des XLAS und einer diffusen Leiomyomatose [22]. Die diffuse Leiomyomatose ist bei männlichen AS-Patienten ein negativer Prädiktor für eine frühzeitige terminale Niereninsuffizienz. Männliche und weibliche Familienmitglieder haben ein diffuse Leiomyomatose des Ösophagus und der oberen Luftwege [39]. Weibliche Familienmitglieder haben zusätzlich eine Uterusleiomyomatose, eine Klitorishypertrophie und Abnormitäten an den großen Schamlippen [40]. Symptomatisch wird die Leiomyomatose meist durch Schluckstörungen, post-prandiales Erbrechen, Brustschmerzen, Husten, Atemnot und Stridor.

In äußerst seltenen Fällen kommt das AS als Teil des sogenannten AMME-Komplexes (**A**lport Syndrom, **M**ental Retardation, **M**id-Face Hypoplasia und **E**lliptocytose) vor [41-42].

Epidemiologie

Die Gesamtzahl der AS-Patienten ist ungeklärt. Man geht von einer Prävalenz von 1/5000 aus, wobei aktuelle Arbeiten von einer niedrigeren Prävalenzrate ausgehen. Ungefähr 0,3-2,3 % der Patienten, die auf Nierenersatzverfahren angewiesen sind, sind an einem AS erkrankt [8, 43]. Die Zahlen der USRD (*United States Renal Database*) geben für das AS als Ursache der terminalen Niereninsuffizienz eine Prävalenz von 6,8 Fällen pro Million Einwohner und eine Inzidenz von 0,5-0,6 Fällen pro Million Einwohner an. Diese Zahlen gelten für die U.S.A. in den Jahren 2004/05 [44].

Genetik

Ein AS entsteht durch funktionszerstörende oder formverändernde Mutationen in den Genen der α -Ketten des Kollagen IV [22]. Derzeit sind sechs verschiedene α -Ketten, die mit $\alpha 1$ bis $\alpha 6$ benannt werden, bekannt [45]. Die Gene für die einzelnen α -Ketten liegen immer paarweise, Kopf an Kopf, auf unterschiedlichen Chromosomen. Jedes Gen-Paar teilt sich eine bidirektionale Promoter-Region [46]. Die Gene für $\alpha 1$ und $\alpha 2$ liegen gemeinsam auf dem langen Arm von Chromosom 13. Die Gene für $\alpha 3$ und $\alpha 4$ sind auf Chromosom 2 abgelegt, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ auf Chromosom X [47].

Jede α -Kette besteht aus sich wiederholenden GLY-X-Y-Triplett-Sequenzen, die immer wieder durch den Einschub anderer Aminosäuren unterbrochen werden. So entsteht eine gewisse Flexibilität des Proteins [48]. An dem 3'-Ende jeder α -Kette befindet sich eine N(on)C(ollageneous)-Domäne und am 5'-Ende eine 7S-Domäne [49]. Immer drei α -Ketten winden sich eng und gleichsinnig bezüglich der 3' und 5'-Ausrichtung umeinander. Der regelmäßige Einbau von Glycin als kleinste Aminosäure ermöglicht, dass die Windung der entstehenden Helix sehr eng ist. Vier α -Ketten-Trimere verbinden sich an der 7S-Domäne miteinander. An der NC-Domäne verbinden sich zwei α -Ketten-Trimere miteinander. So entsteht das äußerst stabile Kollagen-IV-Netzwerk, welches zusätzlich über Disulfid-Brücken stabilisiert wird [8, 49].

Bisher wurden drei verschiedene Trimer-Varianten beschrieben. Das $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ -Trimer, das $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ -Trimer und das $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ -Trimer [45-46]. Das $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ -Trimer-

Netzwerk ist die ontogenetisch früheste und ubiquitäre Variante des Kollagen-IV-Netzwerkes. In der Niere, dem Auge und dem Innenohr wird es in allen Basalmembranen und der mesangialen Matrix des Glomerulus exprimiert. Die Expression der $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Variante ist restriktiver. Im Auge kommt sie in den Basalmembranen der Bruch-Membran, Descemet-Membran, Membrana limitans interna und der Linsenkapsel vor. Im Innenohr im Limbus spiralis, der Prominentia spiralis und der Basalmembran. In der Niere ist die Expression auf die Basalmembranen des Glomerulus, der Bowmann'schen Kapsel und die distalen Tubuli limitiert. Das $\alpha5\alpha5\alpha6$ -Trimer kommt im Auge und Innenohr nicht vor. In der Niere findet man diese Variante des Kollagen IV nur in der Basalmembran der Bowmann'schen Kapsel und in den distalen Tubuli [12]. Diese Variante wird zusätzlich in der Epidermis und in glatten Muskelzellen exprimiert[46].

Bei Patienten mit einem AS liegt eine die Funktion zerstörende Mutation einer der α -Ketten des $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Trimers vor. In der Niere sind als Resultat die Basalmembranen des glomerulären Konvoluts und wahrscheinlich auch die der distalen Tubuli in ihrer Funktion beeinträchtigt. Mutationen der Gene der $\alpha3$ oder der $\alpha4$ -Kette verursachen ein ARAS oder ADAS, Mutationen des Gens der $\alpha5$ -Kette verursachen ein XLAS [50]. Eine Zahl von 300 verschiedenen XLAS-auslösenden Mutationen konnten bis heute identifiziert werden [16]. Jede XLAS-Familie hat ihre eigene Mutation. Der Anteil an de-novo-Mutationen wird auf 10-15% geschätzt. Mit 40% haben Glycin-Missense-Mutationen den größten Anteil [8]. 20% der XLAS-Patienten haben eine Frameshift-Mutation. Große Rearrangements findet man bei 5-15% der XLAS-Familien [22]. 15% haben Splice-Site-Mutationen. Knapp 7% tragen Nonsense-Mutationen [33]. Es besteht eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad der Mutation und der Klinik. Rearrangements oder Frameshift-Mutationen sind mit einem juvenilen AS assoziiert. Missense-Mutationen können beide Formen des XLAS auslösen [8]. Schädigt die XLAS-auslösende Mutation des Gens der $\alpha5$ -Kette zusätzlich das Gen der $\alpha6$ -Kette, kommt es zur Leiomyomatose als Begleiterscheinung. Als Auslöser für ein ARAS sind Non-Sense-, Splice-Site-, Missense- und Frameshift-Mutationen identifiziert worden [22]. Für das ADAS sind Splice-Site- und Glycin/Cystein-Missense-Mutationen als Auslöser beschrieben [26, 29].

Morphologie der Alport-Niere

Lichtmikroskopie der Niere

Das lichtmikroskopische Bild der Nierenveränderung bei AS ist unspezifisch und trägt kaum zur Diagnosefindung bei. Für die Diagnostik ist die Elektronenmikroskopie entscheidender. Die Qualität der Nierenveränderungen ist unabhängig vom Hörverlust und von den Augenveränderungen [51].

Bis zum fünften Lebensjahr erscheint das Nierengewebe eines an AS Erkrankten in der Regel unauffällig. Minimalen Veränderungen an den Glomeruli, in Form einer verringerten Anzahl an glomerulären Kapillarschlingen oder einer glomerulären Hyperzellularität, können vorhanden sein. Dies gibt den Glomeruli des AS-Patienten einen fetalen Aspekt [9, 52].

Im Verlauf kommt es zu einer segmentalen bis diffusen Erweiterung des Mesangiums und einer Verdickung der Kapillarwände mit einer Zunahme der Matrix. Ein fokaler tubulointerstitieller Schaden, gekennzeichnet durch Verdickungen der tubulären Basalmembran, interstitieller Fibrose, tubulärer Ektasie und Atrophie, wird sichtbar. Im Verlauf weitet sich der fokale Schaden zu einer diffusen tubulären Atrophie mit begleitender interstitieller Fibrose aus. Eine chronische interstitielle Entzündung begleitet diesen Prozess. Erythrozytenzylinder können lokalisiert werden. Gelegentlich findet man Halbmonde oder Synechien [8, 51]. Schaumzellen liegen in knapp zwei Drittel der Fälle vor und treten meist zusammen mit den Anzeichen eines chronischen Schadens auf [51, 53]. Obwohl diese Schaumzellen nicht pathognomonisch für das Alport Syndrom sind, sondern auch bei anderen Erkrankungen mit Proteinurie auftreten, kann das Vorliegen von Schaumzellen hinweisend auf ein Alport Syndrom sein [54-55].

Elektronenmikroskopie des Glomerulus

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der glomerulären Basalmembran (GBM) kann bei der Diagnostik des AS wegweisend sein. Die klassische Veränderung ist die aufgesplitterte, unregelmäßig verdickte und ausgedünnte GBM. Die Kontinuität der GBM kann unterbrochen sein [51]. Die Basalmembran weist

unregelmäßige Außen- und Innenkonturen auf. Die Lamina densa ist korbgeflechtartig aufgelockert und zeigt elektronendichte Einschlusskörperchen [12]. Die Podozyten können vergrößert sein. In Nachbarschaft zu besonders dünnen, rupturierten oder verdickten Abschnitten der GBM sind die Fußfortsätze der Podozyten verschmolzen. Die mesangiale Matrix ist vermehrt und die Zellen des Mesangiums vergrößert [34]. Die Basalmembran kann auf 800-1200nm im Querschnitt verdickt sein [8]. Die normale GBM weist eine Dicke von ungefähr 350nm auf [14]. Bei kleinen Kindern mit Alport Syndrom ist nicht die unregelmäßig verdickte und aufgesplitterte GBM das Hauptmerkmal, sondern die Ausdünnung der GBM [34]. In dieser Phase ist das Syndrom der dünnen Basalmembran eine wesentliche Differentialdiagnose.

Die im Elektronenmikroskop sichtbaren Veränderungen sind klassisch für ein AS, jedoch nicht pathognomonisch. Die Veränderungen an der GBM treten nicht immer alle gemeinsam auf und die Ausprägung der Veränderungen kann sogar innerhalb einer AS-Familie variieren [56].

Immunhistologische Untersuchungen

Die immunhistologische Untersuchung des Nierengewebes zum Nachweis von IgA, IgM, IgG und C3 sind meist komplett negativ und dienen der Ausschlussdiagnostik anderer Entitäten [10]. Die Darstellung der einzelnen α -Ketten des Kollagen IV mittels Immunhistochemie oder Immunfluoreszenz kann bei der Diagnostik des AS wertvolle Hinweise auf das Vorliegen eines AS liefern [14, 57-58]. Bei Beachtung der Klinik kann die elektronenmikroskopische Betrachtung der GBM zusammen mit einer selektiven Darstellung der einzelnen α -Ketten des Kollagen IV 90% der XLAS als solche richtig identifizieren [56].

Im Rahmen eines AS ist immer die Funktionalität $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Trimers des Kollagen IV gestört [6]. Eine selektive Darstellung dieser einzelnen Ketten kann deshalb sinnvoll sein. Ein Gesunder zeigt ein lineares Signal aller drei Ketten in den Basalmembranen des Glomerulus und der Bowmann'schen Kapsel. Zusätzlich erscheint die $\alpha5$ -Kette als lineares Basalmembran-Signal in den distalen Tubuli (siehe Abbildung 1 A-C) [13]. Bei einem männlichen XLAS-Patienten verschwindet das Signal aller drei Ketten aus allen Basalmembranen. Eine XLAS-Konduktorin zeigt keinen kompletten

Verlust des Signals aller drei Ketten, sondern nur einen Verlust der Linearität des Signals. Das Signal aller drei Ketten ist in allen Kompartimenten löchrig [59].

Bei einem ADAS und ARAS verschwindet das Signal der Col4a3 und Col4a4 komplett aus allen Kompartimenten. Das Signal der Col4a5 verliert sich hier nur aus der GBM, ein lineares Signal bleibt in der TBM und der BC erhalten. Dies entsteht durch die zusätzliche Expression des $\alpha5\alpha5\alpha6$ -Trimers in der BC und der TBM. Dieses Trimer wird durch Mutationen der Col4a3 oder Col4a4 nicht geschädigt [57]. Diese Konstellation kann richtungsweisend für die weiterführende Diagnostik sein. So macht es Sinn bei einem totalen Verlust des Signals von Col4a5 zuerst nach Mutationen im $\alpha5$ -Ketten-Gen zu suchen und die Analyse der Gene der $\alpha3$ - und $\alpha4$ -Kette hinten an zu stellen.

Tabelle 2 *modifiziert nach [56]*: Verteilung der einzelnen α -Ketten des Kollagen IV bei verschiedenen Formen des AS in den Basalmembranen der Niere: Lineares Signal (+); Verlust des Signals (-); Löchriges Signal (#)

	$\alpha5$ -Kette			$\alpha3/4$ -Kette		
	GBM	BC	TBM	GBM	BC	TBM
XLAS (Mann)	-	-	-	-	-	-
XLAS (Frau)	#	#	#	#	#	#
A(D/R)AS	-	+	+	-	-	-

Das $\alpha5\alpha5\alpha6$ -Trimer wird im Gegensatz zum $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Trimer auch in den epidermalen Basalmembranen exprimiert, so dass auch eine Hautbiopsie die Darstellung der $\alpha5$ -Kette erlaubt [46]. Bei einem männlichen XLAS-Patientin kommt es auch hier zu einem vollständigen Verlust des Signals der Col4a5, bei der Konduktorin verbleibt ein löchriges Muster [60]. Die Hautbiopsie kann die Möglichkeit bieten, auf die invasive und potentiell gefährliche Nierenbiopsie zu verzichten, wenn keine andere Indikation zur Nierenbiopsie besteht und trotzdem die Genanalysen in ihrer Abfolge zu ordnen. Allerdings muss beachtet werden, dass bei einem ADAS oder ARAS die epidermale Basalmembran wie die eines Gesunden erscheint [14]. Auch die Nierenbiopsie und die selektive immunhistologische Darstellung des $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Trimers ist nicht immer diagnostisch, da es vereinzelte Fälle eines via Klinik und Genanalyse gesicherten XLAS bei Männern gibt, die trotzdem ein normales Col4a5-Muster in der Niere zeigen [13].

Chemokine

Chemokine gehören zu einer großen Familie von **chemotaktisch** wirkenden Cytokinen [61]. Sie binden an einen oder mehrere der etwa 22 korrespondierenden Chemokinrezeptoren [62]. Chemokine stellen ein Kommunikationssystem zwischen einzelnen Zellen und Zellsystemen dar und regulieren die Leukozytenmigration sowohl im homöostatischen Sinne, als auch im Zuge einer Entzündung. Zusätzlich sind Chemokine an der Organisation von lymphatischem Gewebe und der lymphatischen Organogenese beteiligt [63].

Auch an der Rekrutierung von Leukozyten in geschädigtes Nierengewebe und der darauf folgenden Entzündungsreaktion sind Chemokine beteiligt [64].

Nomenklatur der Chemokine

Typische und atypische Chemokinrezeptoren

Die Nomenklatur der Chemokine ist inzwischen vereinheitlicht worden, da viele der Liganden und Rezeptoren ursprünglich andere Namen hatten und so die Zugehörigkeit zur Gruppe der Chemokine nicht offensichtlich war. Nach dieser Nomenklatur werden die Chemokine in vier Untergruppen eingeteilt [65].

Anhand der Konstellation von vier konservierten Cysteinresten im N-terminalen Ende der Proteine, werden die CC, CXC, CX₃C und die XC Chemokine unterschieden [66].

Das erste Cystein bindet kovalent an das dritte Cystein und das Zweite an das Vierte. Für die Nomenklatur ist die Position der ersten zwei Cysteine zueinander entscheidend. CC bedeutet, dass die ersten zwei Cysteinreste direkt nebeneinander liegen, CXC bedeutet dass zwischen den beiden ersten Cysteinen eine andere Aminosäure liegt und bei CX₃C sind es drei Aminosäuren. Bei der XC-Familie gibt es nur einen singulären Cysteinrest und insgesamt auch nur zwei der vier Cysteine im N-terminalen Ende. [66-69] Bis zum heutigen Tage sind insgesamt 48 verschiedene Chemokine identifiziert worden. 28 von diesen gehören zur CC-Familie, 16 zur CXC-Familie und zwei zur XC-Familie. Die CX₃C-Familie hat nur ein Mitglied [70]. Die Benennung eines Chemokins ergibt sich aus der Familienzugehörigkeit, gefolgt von einem L für Ligand und einer chronologisch vergebenen Nummer. So heißt das erste

Chemokin aus der CC-Familie CCL1. Typische Chemokinrezeptoren binden Chemokine aus einer Untergruppe. Sie werden entsprechend dieser Untergruppe benannt, gefolgt von einem R für Rezeptor und einer chronologischen Nummer. So wird der dritte Rezeptor für Chemokine aus der CXC-Familie, CXCR3 genannt [67-68]. In der Regel binden Chemokinrezeptoren nur Chemokine aus ihrer eigenen Untergruppe. Der CXC-Chemokinrezeptor3 (CXCR3) bindet nur die Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11, die alle zur CXC-Familie gehören [62]. Durch diese Bindung wird ein G-Protein mit sieben Transmembran-Domänen aktiviert [71].

Die Rezeptoren DARC und CCX-CKR bilden hier Ausnahmen. Diese atypischen Chemokinrezeptoren können Chemokine aus der CC- und der CXC-Familie binden. Beiden ist mit dem dritten atypischen (stummen) Chemokinrezeptor D6 gemeinsam, dass sie nach Bindung der Chemokine keine G-Protein-gekoppelte intrazelluläre Signalkaskade aktivieren können [72-74]. Man nimmt an, dass dies durch das Fehlen der DRYLAIVHA-Sequenz in der zweiten intrazellulären Domäne des G-Proteins bedingt ist [68, 75]. Trotzdem scheinen diese drei atypischen Chemokinrezeptoren eine Funktion zu haben. D6 scheint eine regulatorische Rolle in der Entzündungsreaktion zu spielen, da über D6 inflammatorische Chemokine internalisiert und abgebaut werden können [76]. CCX-CKR bindet CCL19,21,25 und CXCL13[61]. Die Internalisierung von CCL19 führt zu dessen intrazellulärem Abbau [77]. Die Funktion von DARC scheint proinflammatorische und entzündungshemmende Komponenten zugleich zu haben [78-79].

Entzündung und Chemotaxis durch Chemokine

Die Pathophysiologie der Entzündung beinhaltet unter anderem ein komplexes Zusammenspiel aus Veränderungen der Hämodynamik, der Interaktion von Leukozyten mit Gefäßendothelzellen und der daraus resultierenden Leukozytenadhäsion, Aktivierung und Diapedese [80-81]. Chemokine sind an vielen Zwischenschritten des Entzündungsprozesses beteiligt [82-83]. Während einer Entzündung kommt es zu einer Aktivierung des Gefäßendothels. Es werden vermehrt Strukturen exprimiert, die Chemokine präsentieren können, wie zum Beispiel spezielle Glykosaminoglykane (GAG), Adressine (Selektinliganden) und die Ig-Partnern von Leukozyten-Integrinen [84-85]. Endothelzellen und subendotheliales

Gewebe produzieren im Rahmen einer Entzündung Chemokine. Auch bei der Aktivierung von Thrombozyten werden Chemokine freigesetzt. Die freigesetzten Chemokine werden durch das aktivierte Endothel mit seiner nun vergrößerten Chemokinbindungskapazität gebunden und präsentiert. Sie markieren so im Gefäß den Zugang zum Ort der Entzündung [83, 86]. Die Integrine der im Gefäß *rollenden* Leukozyten können durch die auf dem Endothel präsentierten Chemokine aktiviert werden. Es kommt zur Leukozytenadhäsion durch die Interaktion von Selektinen, Integrinen und Mitgliedern der IgSF-CAM, wie z.B. VCAM-1 [87]. Der Leukozyt wird so am Zugang des Ortes der Entzündung festgehalten. Im nächsten Schritt kommt es zur Diapedese. Nach der Diapedese wandern die Leukozyten entlang eines Matrix-gebundenen Chemokin-Gradienten zum Ort der Gewebsverletzung [88].

Tabelle 3 *modifiziert nach [62]*: Übersicht über die heute bekannten Chemokinrezeptoren mit ihren korrespondierenden Liganden. Einige Liganden können an verschiedenen Rezeptoren binden.

CCR-Familie		CXCR-Familie		Stumme Chemokinrezeptoren	
CCR1	CCL3,4,5,7,14	CXCR1	CXCL6,8	DARC	CCL2,5,11,13,14
	CCL15,16,23				CXCL1,2,3,7,8
CCR2	CCL2,7,8,12,13	CXCR2	CXCL1,2,3,5 CXCL6,7,8	CCX-CKR	CCL19,21,25 CXCL13
CCR3	CCL5,7,11,13, CCL15,24,26,28	CXCR3	CXCL9,10,11, (13)	D6	CCL,2,3,4,5 CCL7,8,12,13 CCL14,17,22
CCR4	CCL2,3,5,7,22	CXCR4	CXCL12	CX3CR1-Familie	
CCR5	CCL3,4,5,8	CXCR5	CXCL13	CX3CR1	CX3CL1
CCR6	CCL20	CXCR6	CXCL16	XCR1-Familie	
CCR7	CCL19,21	CXCR7	CXCL11,12	XCR1	XCL1
CCR8	CCL1,4,17				
CCR9	CCL25				
CCR10	CCL27,28				

Die Rolle der Chemokine

Funktionell unterteilt man die Chemokine grob in inflammatorische und homöostatische Chemokine [68]. Die inflammatorischen Chemokine werden durch Zellstress und pro-inflammatorische Zytokine am Ort des Gewebeschadens schnell hochreguliert und freigesetzt [80]. Die homöostatischen Chemokine fungieren als Mediatoren der Leukozytenrezirkulation und der Zell-Zell-Interaktion unter homöostatischen Bedingungen [89].

Neben diesen beiden grundlegenden Funktionsbereichen, Homöostase und Entzündung, kommt Chemokinen in der Pathophysiologie diverser Erkrankungen eine Rolle zu. So scheinen Chemokine in der Pathophysiologie der Osteoporose, der Insulin-Resistenz oder z.B. bei der Rekrutierung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark eine Rolle zu spielen [90-92]. Das Wachstum von Karzinomen, die Tumorigenese und die Metastasierung von Karzinomen scheint zum Teil über Chemokine vermittelt zu sein [93-95]. Auch die physiologische Angiogenese ist zum Teil abhängig von Chemokinen [96-98]. Das Chemokine so vielfältige Funktionen ausüben können, liegt unter anderem an der Dynamik des Chemokin-Chemokinrezeptor-Systems. So kann die Aktivierung eines Chemokinrezeptors zur Internalisierung desselben führen und zur Expression eines anderen Rezeptormusters. Dies ermöglicht der Zelle auf einen anderen chemotaktischen Reiz zu reagieren [99-100]. Die gleichzeitige Expression von demselben Chemokinrezeptor auf zwei verschiedenen Zellsorten erlaubt deren Rendezvous und deren Interaktion [99].

Auch ändert sich das Chemokinrezeptormuster auf der Oberfläche der einzelnen Zellarten im Zuge des Reifungsprozesses. So ist es zum Beispiel möglich über inflammatorische Chemokinrezeptoren eine naive Antigen-Präsentierende Zelle zum Ort der Entzündung zu leiten. Nach ihrem Reifungsprozess am Ort der Entzündung ändert diese Zelle ihr Chemokinrezeptormuster und kann nun vom Ort der Entzündung in den regionären Lymphknoten oder ein anderes lymphatisches Organ wandern, um dort das erworbene Antigen naiven Zellen und anderen Zelllinien zu präsentieren [99, 101].

CXCR3 und seine Liganden in der Niere

Der Chemokinrezeptor CXCR3 ist auch unter dem Namen CD183 bekannt. Seine drei bekannten Liganden sind die von Interferon- γ induzierten Chemokine CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10) und CXCL11 (I-TAC) [62]. Auch CXCL13, die Eotaxine (CCL11, 24 und 26) und CCL13 haben die Fähigkeit mit geringer Affinität an CXCR3 zu binden. Von diesen Chemokinen kann nur das *Familienmitglied* CXCL13 den Rezeptor aktivieren [68, 102]. CXCR3-B, eine Splice-Variante von CXCR3, kann CXCL4 binden und von diesem aktiviert werden [103]. Wie alle typischen Chemokinrezeptoren ist auch CXCR3 ein sieben Transmembrandomänen umspannender, G-Protein-gekoppelter Rezeptor [104]. Über ein G-Protein der G α i-Klasse vermittelt CXCR3 nach Aktivierung Chemotaxis, Calcium-Einstrom und die Aktivierung von Kinasen [104].

CXCR3 wird vornehmlich auf aktivierten Th₁-Zellen exprimiert. Zusätzlich findet man eine CXCR3-Expression auch auf T-Zellen im Blut, auf natürlichen Killerzellen und einer Subpopulation von B-Lymphozyten [105]. Im Tiermodell konnten kleine Subpopulationen von CXCR3-positiven Makrophagen gefunden werden [106].

Bei einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen kann die Infiltration des entzündeten Organs durch CXCR3-positive Zellen beobachtet werden. Die Anzahl der CXCR3-positiven Zellen spiegelt häufig die Krankheitsaktivität in einer direkten Proportionalität wieder. Die Anzahl der CXCR3-positiven Zellen in Nierenbiopsien von Patienten mit Glomerulonephritis bei systemischem Lupus erythemathodes, IgA-Nephritis und membranoproliferativer Glomerulonephritis korrelierte signifikant direkt mit dem Grad der Proteinurie, dem Serum-Kreatinin und dem Blutharnstoff. Die infiltrierenden Zellen waren zum größten Anteil CXCR3/CD3-positive Lymphozyten [107]. In Nierenbiopsien von Patienten mit einer akuten Nierentransplantatabstossung oder chronischer Transplantatglomerulopathie konnten erhöhte Level an CXCR3-positiven Zellen gefunden werden [108]. Des Weiteren spielt CXCR3 in der Pathophysiologie von entzündlichen Hauterkrankungen, Darmerkrankungen, Multipler Sklerose, Sarkoidose, chronischer Hepatitis C und rheumatoider Arthritis eine Schlüsselrolle [109-114]. Neben der Transplantatabstossung in der Niere konnte CXCR3 eine Rolle in der

Transplantatabstossung bei Herz- und Lungentransplantation sowohl im Tiermodell, als auch im Menschen zugewiesen werden [108, 115-116].

Hypothesen und Ziel

Für diese Arbeit formulierten wir die Hypothese, dass das menschliche AS als glomeruläre Erkrankung nicht-entzündlichen Ursprungs zu einer interstitiellen Entzündung führen könnte. Diese interstitielle Entzündung könnte für den voranschreitenden Nierenfunktionsverlust wichtig sein und sie könnte CXCR3-positiv sein. Es könnte sein, dass das Entzündungsmuster dem von primär entzündlichen glomerulären Erkrankungen gleicht und deswegen als Teil einer gemeinsamen Endstrecke jedweder glomerulären Schädigung anzusehen ist. Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der interstitiellen lymphozytären Infiltration und der Nachweis des Chemokinrezeptors CXCR3 bei Patienten mit AS. Weiterhin sollte die immunhistochemische Darstellung der $\alpha 2$, $\alpha 3$ und der $\alpha 5$ -Kette des Kollagen IV etabliert werden, um die Patientenpopulation zu charakterisieren. Letztlich sollten die eventuell vorhandenen Schaumzellen bezüglich einer CD68-Expression charakterisiert werden um den Makrophagenursprung zu untersuchen.

Material und Methoden

Patientengut

Insgesamt wurden 38 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Nierenbiopsien in die Studie eingeschlossen. Alle Präparate stammten aus dem Archiv des Pathologischen Instituts der Universität Wien. Die Studienpopulation bestand aus drei Gruppen. Verglichen wurden Biopsien von 17 Patienten mit einer morphologisch (elektronenmikroskopisch) gesicherten Diagnose des Alport-Syndroms (bzw. mit dieser Diagnose vereinbaren Veränderungen) mit einer Gruppe von 10 Patienten mit gesicherter IgA-Nephritis. Eine Gruppe bestehend aus 11 Lebendspendern, die vor der Nierentransplantation biopsiert worden waren, diente als Kontrollgruppe. Die österreichische Rechtsprechung sieht nicht vor, dass die Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, diesem zustimmen müssen.

Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wurde nach bereits beschriebenem Protokoll durchgeführt [117]. Das exakte Protokoll befindet sich im Anhang. Die in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden in Xylen entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Blockade der endogenen Peroxidase erfolgt durch Inkubation in 3% Wasserstoffperoxid. Das Antigenretrieval erfolgte durch eine Hitzebehandlung in einer Autoklaviermaschine. Hierbei standen die Schnitte in der Antigen Unmasking Solution von Vector Laboratories. Endogenes Biotin wurde mit dem Avidin/Biotin-Blocking-Kit von Vector Laboratories blockiert. Die primären Antikörper wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer zweiten, halbstündigen Inkubation mit einem biotinylierten Antikörper. Eventuell wurde ein dritter biotinylierter Antikörper ebenfalls eine halbe Stunde inkubiert (um das Signal zu verstärken). Abschließend wurde eine Avidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase in Form des ABC-Kits von Vector Laboratories auf die Schnitte aufgebracht und für eine halbe Stunde inkubiert. Das Chromogen in der abschließenden Peroxidasereaktion war 3'-3'-Diaminobenzidine von Sigma Aldrich. Zur Erzeugung eines schwarzen Signals wurde hier $NiCl_3$ hinzugegeben. Abschließend wurden die Schnitte mit Methylgrün gegengefärbt und mit

VectaMount von Vector Laboratories eingedeckelt. Zwischen jedem einzelnen Schritt wurden die Präparate in PBS (Phosphate buffered Saline) gewaschen.

Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde nach dem gleichen Prinzip wie die Immunhistochemie ausgeführt. Eine Blockade der endogenen Peroxidase erfolgte hier nicht. Die Blockade des endogenen Biotins wurde nur dann durchgeführt, wenn ein biotinylierter sekundärer Antikörper zum Einsatz kam. Nach der ersten einstündigen Inkubation mit dem primären Antikörper folgte eine halbstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der entweder direkt an das Chromogen (Cy3), konjugiert war oder selbst mit einem biotinylierten war. Wurde ein biotinylierter sekundärer Antikörper verwendet, wurde im dritten Schritt ein an Streptavidin gebundenes FITC als Chromogen für eine halbe Stunde inkubiert. Auch hier wurden die Schnitte nach jedem Arbeitsschritt in PBS gewaschen. Alle Inkubationen und Waschschrte wurden bei Raumtemperatur und im Dunkeln ausgeführt. Abschließend wurden die Präparate mit Vecta Shield Hard Set eingedeckelt. Vecta Shield Hard Set enthält das Zellkernfärbende DAPI, welches uns hier als Gegenfärbung diente. Die einfachen Immunfluoreszenzen dienten nur als Vorarbeit für die Doppelimmunfluoreszenzen und wurden nicht im Rahmen der Studie durchgeführt.

Doppelimmunfluoreszenz

Bei der Durchführung der Doppelfluoreszenz wurden fünf Inkubationsschritte aus zwei Modulen bestehend hintereinander gestellt. Es wurde zunächst ein primärer Antikörper für eine Stunde inkubiert, dann ein sekundärer Cy3-konjugierter Antikörper als erstes Chromogen für dreißig Minuten. Danach wurde der zweite Primäantikörper für eine Stunde inkubiert, gefolgt von einer halbstündigen Inkubation eines biotinylierten Sekundärantikörpers. Als zweites Chromogen kam das Streptavidin-konjugierte FITC zum Einsatz. Die Inkubation dauerte ebenfalls eine halbe Stunde. Wenn während der Etablierung Kreuzreaktionen auftrat, wurde nach der Inkubation des ersten sekundären Antikörpers ein Mikrowellen-Antigen-Retrieval zwischengeschaltet. Bei einem Mikrowellen-basierten Antigen-Retrieval werden die Schnitte vier Mal für zweieinhalb Minuten in der Mikrowelle in einem

Bad aus Antigen Unmasking Solution bei 1000 Watt gekocht. Diese Hitzefixierung eliminiert die Kreuzreaktionen. Die Wasch- und Inkubationsschritte wurden wie bei der einfachen Immunfluoreszenz ausgeführt. Die Reihenfolge der Module konnte bei Bedarf oder vorhersehbarer Kreuzreaktion getauscht werden.

Antigenretrieval mit Autoklaviermaschine und HCL

Bei der Etablierung der immunhistochemische Darstellung der α -Ketten der Kollagen IV stellten wir fest, dass wir mit unseren drei standardisierten Antigenretrievals (Hitzebehandlung mit der Autoklave oder Mikrowelle. Alternativ Andauung durch die Proteinase K) kein zufriedenstellendes Ergebnis erreichen konnten. Aus diesem Grund etablierten wir ein weiteres, viertes Antigen-Retrieval auf *HCl*-Basis in Anlehnung an das von Ichiro Naito beschriebene Protokoll [59]. Hierbei werden die Schnitte in Salzsäure (pH=0,9) über 10 Minuten in einer Autoklaviermaschine auf 121 °C bei 1 bar Druck erhitzt. Es ist wichtig, dass die zehn Minuten so exakt wie möglich eingehalten werden. Bei einer Überschreitung der 10 Minuten beginnt das Signal wieder zu verschwinden und eine Erhitzung der Präparate über 20 Minuten Dauer zerstört die Präparate komplett. Eine, mindestens dreißig Minuten dauernde Abkühlungsphase folgt. Eine Verkürzung dieser Zeitspanne verursacht unspezifische Hintergrundprobleme. Da die Salzsäure das Zytoplasma aus den Schnitten komplett auswäscht, kann auf eine abschließende Gegenfärbung mit Methylgrün verzichtet werden.

CD3

CD 3 ist ein Oberflächenmarker, der in erster Linie auf T-Lymphozyten exprimiert wird [118]. Für die immunhistochemische Darstellung des Oberflächenantigens CD3 benutzten wir einen monoklonalen Ratten-Anti-Human-CD3-Antikörper (IgG₁, Klon CD3-12; Katalog-Nr.: MCA 1477, AbD Serotec, Planegg/Martinsried, Germany) als Primärmarker. Er wurde auf 1:100 in PBS verdünnt und 60 Minuten auf den Schnitten inkubiert. Als sekundärer Antikörper fungierte der biotinylierte Anti-Ratten-IgG(H+L)-Antikörper der in Hasen hergestellt wurde (Katalog-Nr.: BA-4000; Vector Laboratories). Er wurde auf 1:300 in PBS verdünnt und 30 Minuten auf den Schnitten inkubiert. Für die rot leuchtende Darstellung von CD3 in der Immunfluoreszenz wurde als sekundärer Antikörper ein auf 1:100 verdünntes Cy3-

konjugiertes Anti-Ratten-IgG für 30 Minuten auf den Präparaten inkubiert (Katalog-Nr.: Jackson Immunoresearch). Als Negativ-Kontrolle fungierte jeweils ein aufgereinigter Ratten-IgG_{1κ} Isotyp (Katalog-Nr.: 559072; BD Biosciences Pharmingen).

CXCR3

CXCR3 ist ein Oberflächenmarker der in erster Linie auf aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird [119]. Für die immunhistochemische Darstellung des Chemokinrezeptors CXCR3 benutzten wir einen monoklonalen Maus-Anti-human-CXCR3-Antikörper (IgG_{1κ}, Klon 1C6/CXCR3; Katalog-Nr.: 557183, BD Biosciences Pharmingen) als Primärmarker. Die Verdünnung war 1:100 in PBS. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Anti-Maus-IgG(H+L)-Antikörper aus der Ziege (Katalog-Nr.: BA-9200; Vector Laboratories) verwendet. Die Verdünnung war 1:300 in PBS. Für die grün leuchtende Darstellung von CXCR3 in der Immunfluoreszenz wurde zunächst ein auf 1/100 verdünntes biotinyliertes Anti-Maus-IgG₁-IgG für 30 Minuten inkubiert. Abschließend wurde ein auf 1/100 verdünntes Streptavidin-konjugiertes FITC für 30 Minuten auf den Schnitten inkubiert. Ein aufgereinigter Maus-IgG_{1κ}-Isotyp (Klon MOPC 21; Katalog-Nr.: M9269-1MG, Sigma-Aldrich) fungierte jeweils als Negativkontrolle.

CD68

CD68 ist ein Oberflächenmarker repräsentativ für Monozyten und Makrophagen [120]. Für die immunhistochemische Darstellung des Oberflächenantigens CD68 benutzten wir einen monoklonalen Maus-Anti-Human-CD68-Antikörper (Maus-IgG_{3κ}, Klon PG-M1 Katalog-Nr.: M0876, Dako Deutschland GmbH) als Primärmarker. Er wurde auf 1:100 in PBS verdünnt und 60 Minuten auf den Präparaten inkubiert. Als sekundärer Antikörper fungierte der biotinylierte Anti-Maus-IgG(H+L)-Antikörper der in der Spezies Ziege hergestellt wurde (Katalog-Nr.: BA-9200; Vector Laboratories). Er wurde auf 1:300 in PBS verdünnt und 30 Minuten inkubiert. Für die rot leuchtende Darstellung von CD68 in der Immunfluoreszenz wurde als sekundärer Antikörper ein auf 1:100 verdünntes Cy3-konjugiertes Anti-Maus-IgG für 30 Minuten inkubiert (Katalog-Nr.: Jackson Immunoresearch). Als Negativ-Kontrolle

fungierte jeweils ein aufgereinigter Maus-IgG3 Isotyp (Katalog-Nr.: SC-3880; Santa Cruz Biotechnology Inc.).

α 2- und α 3-Kette des Kollagen IV

Um die α 2-Kette des Kollagen IV darzustellen benutzten wir einen nicht-kommerziellen monoklonalen Ratten-Anti-Human- α 2-KollagenIV-Antikörper(H22) der uns freundlicherweise vom Shigei Medical Research Center in Okayama, Japan zur Verfügung gestellt wurde. Für die Darstellung der α 3-Kette des Kollagen IV verwendeten wir einen monoklonalen Ratten-Anti-Human- α 3-KollagenIV-Antikörper(H31) [121]. Wir verdünnten beide Antikörper auf 1:50 in einer Mischung aus 10% Milchpulver in PBS und inkubierten beide Antikörper für 60 Minuten auf den Schnitten. Als sekundärer Antikörper fungierte in beiden Ansätzen der biotinylierte Anti-Ratten-IgG(H+L)-Antikörper der in Hasen hergestellt wurde (Katalog-Nr.: BA-4000; Vector Laboratories). Er wurde auf 1:300 PBS verdünnt und 30 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle fungierte eine Ratten IgG_{2A} Isotyp Kontrolle (R&D Systems Katalog-Nr.: MAB006).

α 5-Kette des Kollagen IV

Um die α 5-Kette des Kollagen IV darzustellen benutzten wir ebenfalls einen nicht-kommerziellen monoklonalen Ratten-Anti-Human- α 5-KollagenIV-Antikörper(H53) [60]. Wir verdünnten den Antikörper auf 1:200 in 10% Milchlösung und inkubierten ihn für 60 Minuten. Als sekundärer Antikörper fungierte hier der biotinylierte Anti-Ratten-IgG(H+L)-Antikörper der in Hasen hergestellt wurde (Katalog-Nr.: BA-4000; Vector Laboratories). Hier kam zusätzlich noch ein monoklonaler biotinylierter Anti-Hasen-IgG-Antikörper (Catalogue No. BA-1000; Vector Laboratories) als Tertiärmarker zum Einsatz. Sowohl der sekundäre als auch der tertiäre Antikörper wurden auf 1:300 in PBS verdünnt und 30 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle fungierte in diesem Ansatz ebenfalls eine Ratten IgG_{2A} Isotyp Kontrolle (R&D Systems Katalog-Nr.: MAB006).

Auswertung der α 5-Kette des Kollagen IV

Die Immunhistochemie zur Darstellung der α 5-Kette des Kollagen IV wurde semiquantitativ ausgewertet. Die drei Auswertenden waren bezüglich der Diagnose

AS, IgA-N oder PräTx geblindet. In jedem Präparat wurde die Expression der Col4a5 in der GBM und der BC auf Vorhandensein und Linearität überprüft. Ein Punktesystem wurde eingeführt, um eine Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Auswertern gewährleisten zu können. Eine 0 in diesem Punktesystem stand für den kompletten Verlust des Signals aus dem jeweiligen Kompartiment. Eine 1 bedeutete, dass ein nicht-lineares Signal vorliegt und eine 2, dass ein lineares Signal der Col4a5 vorhanden war. Ein als normal (lineares Signal in GBM und BC) anzusehendes Präparat erhielt in diesem Punktesystem eine 2/2. Die erste Zahl stand immer für die GBM. Für die Verdachtsäußerung AS war in der Auswertung der komplette Verlust des Signals der Col4a5 aus der GBM das entscheidende Kriterium. Das Signal der Col4a5 in der BC konnte fehlen, linear oder nicht-linear sein (0,2 oder 1 im Score), es spielte für die Verdachtsäußerung AS keine Rolle. Nachdem alle drei Auswerter ihre Evaluation beendet hatten, wurden die unterschiedlichen Auswertungen verglichen und nach Auflösung der Verblindung jede Auswertung bezüglich der Gütekriterien eines Diagnostischen Tests ausgewertet. Eine Vier-Felder-Tafel wurde erstellt und die Sensitivität und Spezifität der Färbung in dieser Studie berechnet.

Auswertung der Immunhistochemie CD3 und CXCR3

Die Immunhistochemien zur Darstellung von CD3 und CXCR3 wurden ebenfalls durch einen verblindeten Betrachter ausgewertet. Es wurde quantitativ und qualitativ ausgewertet. Zuerst wurden die Präparate auf die Art der Infiltration untersucht. Es wurde überprüft welche Strukturen von den gefundenen Zellen infiltriert werden und welche nicht. Die Form (diffus, nodulär etc.) der Infiltrate wurde beschrieben. Da die Immunhistochemien für CXCR3 und CD3 auf seriellen Schnitten durchgeführt wurde, konnten die Infiltrationsmuster verglichen werden. In der quantitativen Auswertung wurde die Anzahl der CD3-positiven und CXCR3-positiven Zellen pro Gesichtsfeld und pro Glomerulus ausgezählt. Wenn möglich, wurden 15 Gesichtsfelder und 10 Glomeruli pro Präparat ausgezählt. Ein Gesichtsfeld war als die sichtbare Fläche im Mikroskop bei X400 Vergrößerung definiert. Das Gesichtsfeld hatte eine Größe von $0,0743 \text{ mm}^2$. Gezählt wurde in jedem Präparat immer von der rechten oberen Ecke aus der langen Kante des Präparates folgend. Gezählt wurde mit Hilfe eines Handzählers. Für jedes Präparat

wurde ein Mittelwert der positiven Zellen pro Gesichtsfeld und pro Glomerulus berechnet. Nach Auflösung der Verblindung wurden die Gruppen AS, PräTx und IgA-N gebildet und der jeweilige Gesamtmittelwert mit dem zugehörigen Durchschnittsfehler der Standardabweichung (SEM) errechnet. Photographien der Ergebnisse wurden mit Hilfe von Leica Qwin erstellt.

Auswertung Immunhistochemie CD68

Die Immunhistochemie für CD68 wurde nur qualitativ ausgewertet. Sie wurde nur auf einigen wenigen ausgewählten Schnitten aus der AS- und der PräTx-Gruppe durchgeführt, da das Material der AS-Patienten limitiert war. Die Auswertung von CD68 zielte auf die Fragestellung welche Zellarten CD68-positiv sind.

Auswertung Doppelimmunfluoreszenzen CXCR3/CD3 und CXCR3/CD68

Die Doppelimmunfluoreszenzen für CXCR3/CD3 und CXCR3/CD68 wurden qualitativ ausgewertet. In beiden Immunfluoreszenzen wurde CXCR3 als grün (FITC) leuchtend dargestellt. CD3 und CD68 wurden jeweils als rot leuchtend (Cy3) dargestellt. Eine doppelt-positive Zelle leuchtete in der Bildüberlagerung beider Immunfluoreszenzen nicht mehr rot oder grün, sondern gelb. Für die Immunfluoreszenz wurde ein Leica LX-Fluoreszenz-Mikroskop genutzt. Die Fotos und die Bildüberlagerung wurden mit der zum Mikroskop gehörigen Software erstellt.

Lichtmikroskopische Analyse der Alport-Biopsien

Die AS-Biopsien wurden zusätzlich auch konventionell (HE, PAS) gefärbt und es wurde lichtmikroskopisch nach pathologischen Veränderungen des Nierengewebes gesucht. Die gesuchten Kriterien waren Interstitielle Fibrose, tubuläre Atrophie, globale glomeruläre Sklerose, Kapillarsklerose, Synechien im Glomerulus, Schaumzellakkumulation, Intimafibrose, Intimahyalinisierung, mesangiale Zellularität und mesangiale Sklerose. Die pathologischen Nierengewebsveränderungen wurden von einem bezüglich der Ergebnisse der CD3 und CXCR3-Immunhistochemie verblindeten Auswerter semiquantitativ in einem Punktesystem ausgewertet. Das Punktesystem reichte von 0 bis 4, je nach Schweregrad der Veränderungen. Die Auswertung geschah durch einen ärztlichen

Mitarbeiter der Pathologie der Universität Wien. Abschliessend wurden die Ergebnisse dieser Auswertung mit der durchschnittlichen Anzahl an CXCR3-positiven Zellen pro Gesichtsfeld der korrespondierenden Schnitte korreliert. Es galt festzustellen ob ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grad der CXCR3-positiven Infiltration und der lichtmikroskopisch sichtbaren Nierengewebsschädigung besteht.

Klinische Daten der biopsierten Patienten

Für die Patientengruppen AS und IgA-N wurden klinische Daten in Form von Alter, Geschlecht, Serum-Kreatinin zum Zeitpunkt der Biopsie und die Proteinausscheidung in g/24h zum Zeitpunkt der Biopsie erhoben (siehe Tabellen 4 und 5). Es wurde überprüft ob zwischen der durchschnittlichen Anzahl an CXCR3-positiven Zellen pro Gesichtsfeld und dem Serum-Kreatinin bei Biopsienahme und dem Grad der Proteinurie ein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht.

Tabelle 4: *Klinische Parameter der AS-Patienten*

	Geschlecht	Alter (Jahre)	Kreatinin (mg/dl)	Proteinurie (g/24 h)
1	m	5	0,4	n.v
2	m	41	1,2	n.v
3	m	20	1,9	9
4	m	26	2,7	n.v
5	m	18	1,3	12
6	m	18	0,9	4,8
7	m	9	0,6	n.v
8	m	14	0,6	n.v
9	m	23	n.v	n.v
10	m	16	2,9	3,3
11	m	22	1,7	2,4
12	w	20	0,8	2,2
13	w	22	0,9	5
14	w	24	2	2,5
15	w	22	2,0	n.v
16	w	21	0,5	5
17	w	21	1,3	3
		20	1,8	4,9
		(5-41)	(0,4-2,9)	(2,2-12)

n.v.: nicht verfügbar, m: männlich, f: weiblich, Kreatinin in mg/dl kann durch Multiplikation mit 88.4 in $\mu\text{mol/l}$ umgerechnet werden

Tabelle 5: *Klinische Parameter der IgA-N-Patienten*

	Geschlecht	Alter (Jahre)	Kreatinin (mg/dl)	Proteinurie (g/24 h)
1	m	10	0,5	4
2	w	53	6,4	n.v.
3	m	39	2	0,4
4	m	62	n.v.	10
5	w	59	1,3	0,5
6	w	20	0,7	2
7	m	56	1,7	0,5
8	m	49	1,4	5
9	m	56	3,5	3,3
10	m	53	5,3	n.v.
		46	2,5	3,2
		(10-62)	(0,5-6,4)	(0,4-10)

n.v.: nicht verfügbar, m: männlich, f: weiblich, Kreatinin in mg/dl kann durch Multiplikation mit 88.4 in $\mu\text{mol/l}$ umgerechnet werden

Statistische Auswertung und Korrelation

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse als Mittelwerte und zusätzlich der korrespondierende Durchschnittsfehler der Standardabweichung (SEM) angegeben. Für Korrelationen wurde der nicht-parametrische *Spearman Rangkorrelationskoeffizient* angewendet. Für den Vergleich der Mittelwerte wurde der nicht-parametrische *Kruskal-Wallis-Test* (H-Test) verwendet. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Mittelwerte und der SEM wurden mit Hilfe von Excel 2007 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) berechnet. Um komplexere statistische Berechnungen durchführen zu können wurde GraphPad *InStat* (Version 3.05 for Windows, GraphPad-Intuitive Software for Science, San Diego, CA) genutzt.

Ergebnisse

Die Darstellung der α 2-Kette des Kollagen IV

Die Immunhistochemie für Col4a2 zeigte das in der Literatur vorbeschriebene Verteilungsmuster. Das Signal der Col4a2 war in der Niere nahezu ubiquitär vorhanden. Ein Signal kommend aus der GBM, der BC, der mesangialen Matrix und allen Sorten von Tubuli konnte generiert werden (Siehe Abbildung 1.A). Die Etablierung erfolgte auf Allograftnephrektomien. Die Darstellung der Col4a2 diente als Hilfe während der Etablierung der Immunhistochemie für die anderen beiden Alphaketten. Da das α 1 α 1 α 2-Trimer schon bei weniger aggressiven Antigen-Retrievals ein zufriedenstellendes Signal liefert, konnten wir mit diesem Protokoll eine zuverlässige Positivkontrolle etablieren [59]. Im Zuge der eigentlichen Studie kam diese Färbung dann aus Mangel an Schnittmaterial nicht mehr zum Einsatz.

Die Darstellung der α 3-Kette des Kollagen IV

Die Immunhistochemie für Col4a3 zeigte ein wesentlich restriktiveres Verteilungsmuster als die Col4a2. Das Signal war, ebenfalls literaturkonform, auf die GBM, die BC und die distale TBM beschränkt [59]. Andere Tubulusabschnitte oder Gefäße lieferten kein Signal (siehe Abbildung 1.B). Auch diese Immunhistochemie wurde, nachdem die Etablierung abgeschlossen war im Zuge der eigentlichen Studie nicht in großer Serie durchgeführt Die Etablierung fand auch hier auf den bereits erwähnten Allograft-Nephrektomien statt.

Verlust des Signals der α 5-Kette des Kollagen IV aus der GBM bei AS

Bei der Etablierung der Immunhistochemie für Col4a5 auf den PräTx-Biopsien zeigte sich ebenfalls ein literaturkonformes Signal [59]. Es war ein im Vergleich zu Col4a2 restriktiveres Verteilungsmuster mit einem Signal aus der GBM, der BC und der distalen TBM. Ebenso wie bei der Immunhistochemie für Col4a3 blieben die mesangiale Matrix und alle anderen Tubulusabschnitte signalfrei (siehe Abbildung A.3).

Im Rahmen der Studie wurden die 11 PräTx-Biopsien und die 17 Biopsien aus der AS-Gruppe bezüglich der Col4a5-Kettenexpression untersucht. Vor Auflösung der Verblindung wurden zuerst die Daten der drei Befundenden untereinander auf

etwaige Unterschiede verglichen. Die Ergebnisse der drei Befundenden waren komplett identisch. Insgesamt zeigten 11 der 28 Biopsien ein lineares Muster der Col4a5 in der GBM (siehe Abbildung 1.D,E), der BC und der distalen TBM (2/2 im Score). Diese 11 Biopsien waren nach den angelegten Kriterien nicht als AS zu klassifizieren. Die verbliebenen Schnitte zeigten alle einen kompletten Verlust des Col4a5-Signals aus der GBM (0/X im Score). Damit erfüllten diese Schnitte das entscheidende Kriterium um in die Gruppe AS eingegliedert zu werden. Bei dieser Gruppe gab es bezüglich dem Col4a5-Signal aus der BC eine Heterogenität. Das Signal konnte komplett fehlen, dies war bei insgesamt 5 der 17 Biopsien der Fall (siehe Abbildung 1.F). Bei 10 der 17 Schnitte war das Signal in der Bowmann'schen Kapsel noch rudimentär erhalten. (siehe Abbildung 1.G) Bei den übrigen zwei Biopsien lag ein komplett lineares Signal der Col4a5 in der BC vor. Nach Auflösung der Verblindung stellten wir fest, dass die 11 Biopsien, welche wir als normal klassifiziert hatten, die PräTx waren und die 17 Biopsien, welche als AS-Verdächtig eingestuft worden waren, die Gruppe AS widerspiegelten. Damit wurden alle Biopsien über die immunhistochemische Darstellung der Col4a5 richtig eingeordnet. Es ergibt sich in dieser sehr kleinen Serie eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100%. Dieses gute Ergebnis ist mit Sicherheit durch die Vortestwahrscheinlichkeit von 50% beeinflusst.

Tabelle 6 Auswertung der Immunhistochemie für Col4a5

	AS	PräTx	
V.a. AS	17	0	17
0/0	5	0	
0/1	10	0	
0/2	2	0	
V.a. PräTx	0	11	11
1/2	0	0	
2/2	0	11	
	17	11	28
Sensitivität 100%		Spezifität 100%	

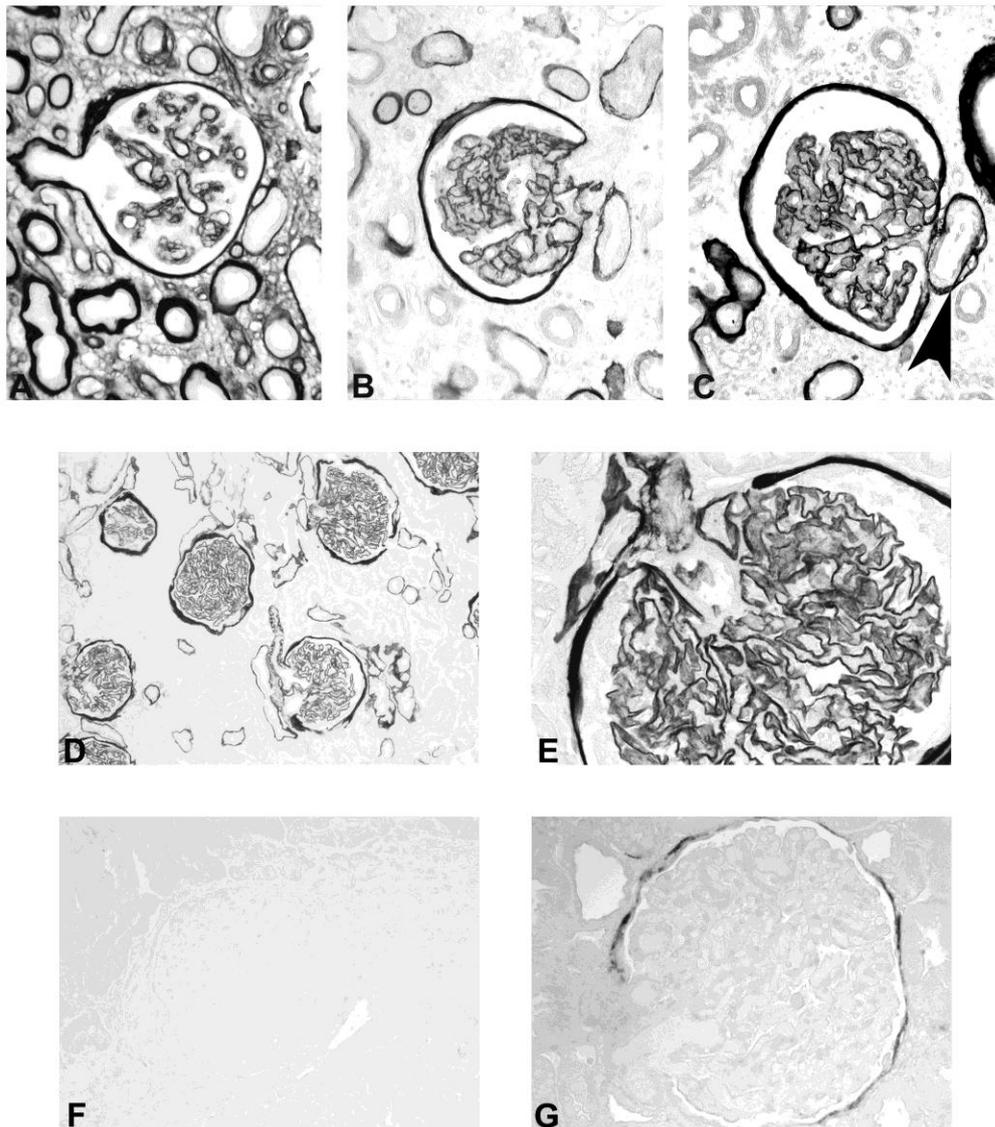


Abbildung 1 Verteilung der α -Ketten des Kollagen IV in der menschlichen Niere. Immunhistochemie zur Darstellung der $\alpha 2$ - (A), der $\alpha 3$ - (B) und der $\alpha 5$ - Kette (C) des Kollagen IV in einer Allograft Nephrektomie (A-C), einer PräTx-Biopsie (D,E) und in Nierenbiopsien von AS-Patienten (F,G). (Originalvergrößerung von A-C ist x200, von D x100 und von E-G x400) A-C zeigen die unterschiedliche Verteilung der $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Kette im gesunden Nierengewebe. In Abbildung C ist das Signal der tubulären Basalmembran deutlich zu sehen (Pfeil in C). D und E zeigen das lineare $\alpha 5$ -Ketten-Signal in der Bowman'schen Kapsel und dem glomerulären Konvolut in einer Prätransplantationsbiopsie. F und G demonstrieren den totalen Verlust des $\alpha 5$ -Ketten-Signals aus dem Glomerulus. Ein rudimentäres Signal der $\alpha 5$ -Kette in der Bowman'schen Kapsel kann bestehen bleiben (G).

Eine interstitielle CXCR3/CD3- doppelpositive Lymphozyten-infiltration in der AS-Niere

Die qualitative Auswertung der CXCR3-Immunhistochemie zeigte eine interstitielle Infiltration des Nierengewebes in den Gruppen AS und IgA-N, die diffus oder nodulär akzentuiert sein konnte (Abb. 3.F; 2.H). Die Quantifizierung ist in Abbildung 4 dargestellt. Zum Teil fanden sich auch prominente Zellakkumulationen (Abb. 2.G). Die infiltrierenden Zellen sparten das Glomerulus meist vollständig aus, legten sich diesem aber oft Corona-artig an (Abb. 2.E,F). Die drei Charakteristika -diffuse Infiltration, Nodusbildung und periglomeruläres Infiltrat waren typisch für das von uns gefundene Infiltrat.

Zusätzlich sahen wir regelmäßig, dass CXCR3-positive Zellen Tubuluszellen infiltrierten (Abb. 3.A,B). Die Präparate aus der Gruppe PräTx waren weitestgehend frei von einer zellulären Infiltration (Abb. 2.A,B). Die CXCR3-positiven Zellen selbst waren von uniformem Aussehen. Es waren kleine runde Zellen, die das Signal ringförmig auf der Oberfläche trugen. Die Form der Zellen war typisch für Lymphozyten. Bei der Betrachtung der CD3-Immunhistochemie fiel zuerst auf, dass die signaltragenden Zellen morphologisch identisch zu den CXCR3-positiven Zellen waren (Abb. 2.C,D). Hier bot sich ebenfalls ein uniformes Bild von kleinen runden Zellen mit einem ringförmigen Signal auf der Zelloberfläche. Auch war das Infiltrationsmuster ähnlich. Wir fanden diffus infiltrierte Areale, CD3-positive Noduli, periglomeruläre Infiltrate und CD3-positive Zellen, die Tubuli infiltrierten. Im direkten Vergleich von auf CXCR3 und CD3 gefärbten seriellen Schnitten in den Gruppen AS, IgA-N und PräTx zeigte sich eine fast identische Verteilung der Zellen. Die Felder der diffusen Infiltration, der Noduli und der periglomerulären Infiltrate, welche in der CXCR3-Immunhistochemie sichtbar waren, konnten in der CD3-Immunhistochemie im seriellen Schnitt des Präparats jederzeit bestätigt werden (Abb. 2.C,D). Die geringen Abweichungen in den Infiltrationsmustern können durch die seriellen Schnitte erklärt werden. Die CXCR3/CD3 Doppel-immunfluoreszenz zeigte, dass fast alle infiltrierenden Zellen CXCR3/CD3 doppelpositiv waren (Abb. 5.A-C). Vereinzelt zeigten sich CXCR3-negative/CD3-positive Zellen. CXCR3-positive/CD3-negative Zellen waren nicht nachweisbar. Die qualitative Auswertung der CXCR3- und CD3-Immunhistochemie und Doppelimmunfluoreszenz erlaubte die

Aussage, dass das CXCR3-positive Infiltrat vornehmlich aus CXCR3/CD3-positiven Zellen und deshalb mit höchster Wahrscheinlichkeit aus aktivierten T-Lymphozyten bestand. Die Quantität der Infiltration betreffend, bestanden zwischen den einzelnen Präparaten große Unterschiede. In einigen Präparaten waren nur vereinzelt CXCR3 oder CD3 positive Zellen zu finden, andere Präparate wiesen eine dichte Infiltration mit CXCR3- und CD3-positiven Zellen auf.

Durchschnittlich wiesen die Präparate der PräTx-Gruppe 17,1 CXCR3-positive Zellen(CXCR3+)/GF und 10,8 CD3+ /GF auf. Im Glomerulus waren in der Prä-Tx-Gruppe durchschnittlich 0,22 CXCR3+ /Glomerulus (Glom) und 0,69 CD3+/Glom vorhanden. In der Alport-Gruppe lagen die Mittelwerte für die Anzahl positiver Zellen/AF deutlich höher. So konnten hier 59,2 CXCR3+/GF und 54,6 CD3+/GF gefunden werden. Im Glomerulus lagen bei der Alport-Gruppe 0,11 CXCR3+/GF und 0,43 CD3+/GF vor. Die Anzahl der interstitiellen CXCR3-positiven Zellen in der Gruppe Alport-Syndrom ist bei einem $p < 0,01$ gegenüber der Gruppe PräTx hochsignifikant erhöht (Abb.4.A). Die interstitielle CD3-Erhöhung ist ebenfalls signifikant bei einem $p < 0,05$ (Abb.4.B). Nicht-signifikant sind die Unterschiede zwischen der Gruppen AS, IgA-N und PräTx bei der Anzahl der positiven Zellen pro Glomerulus (Abb. 4.C,D). Die Anzahl der CXCR3+ und CD3+ interstitiellen Zellen war nicht signifikant unterschiedlich beim Vergleich der Gruppen AS und IgA-N (Abb. 4A,B). Konkret zeigte die IgA-Nephritis Gruppe 51,8 CXCR+/GF und 59,0 CD3+/GF. Auch bei der Anzahl positiver Zellen/Glomerulus zeigte die Gruppe IgA-N keine signifikante Abweichung. Hier waren es 0,53 CXCR+/Glomerulus und 2,3 CD3+/Glomerulus. In der quantitativen Auswertung der Immunhistochemien für CXCR3 und CD3 zeigte sich, dass die interstitielle Anzahl der CXCR3+ und CD3+ Zellen in den Gruppen AS und IgA-N signifikant höher liegt, als in der Gruppe Prä-Tx. Die signalpositive Zellzahl ist um den Faktor 3 bis Faktor 5 erhöht. Die Anzahl der interstitiellen infiltrierenden Zellen bei den Gruppen AS und IgA-N ist auf einem vergleichbaren, nicht-signifikant unterschiedlichen, hohen Niveau. Zusätzlich ist die CXCR3/CD3-positive zelluläre Infiltration auf das Interstitium beschränkt. Die Glomeruli bleiben von der Infiltration ausgespart. Die Anzahl der positiven Zellen im Glomerulus steigt nicht mit der Anzahl positiver Zellen im Interstitium an, sondern bleibt konstant

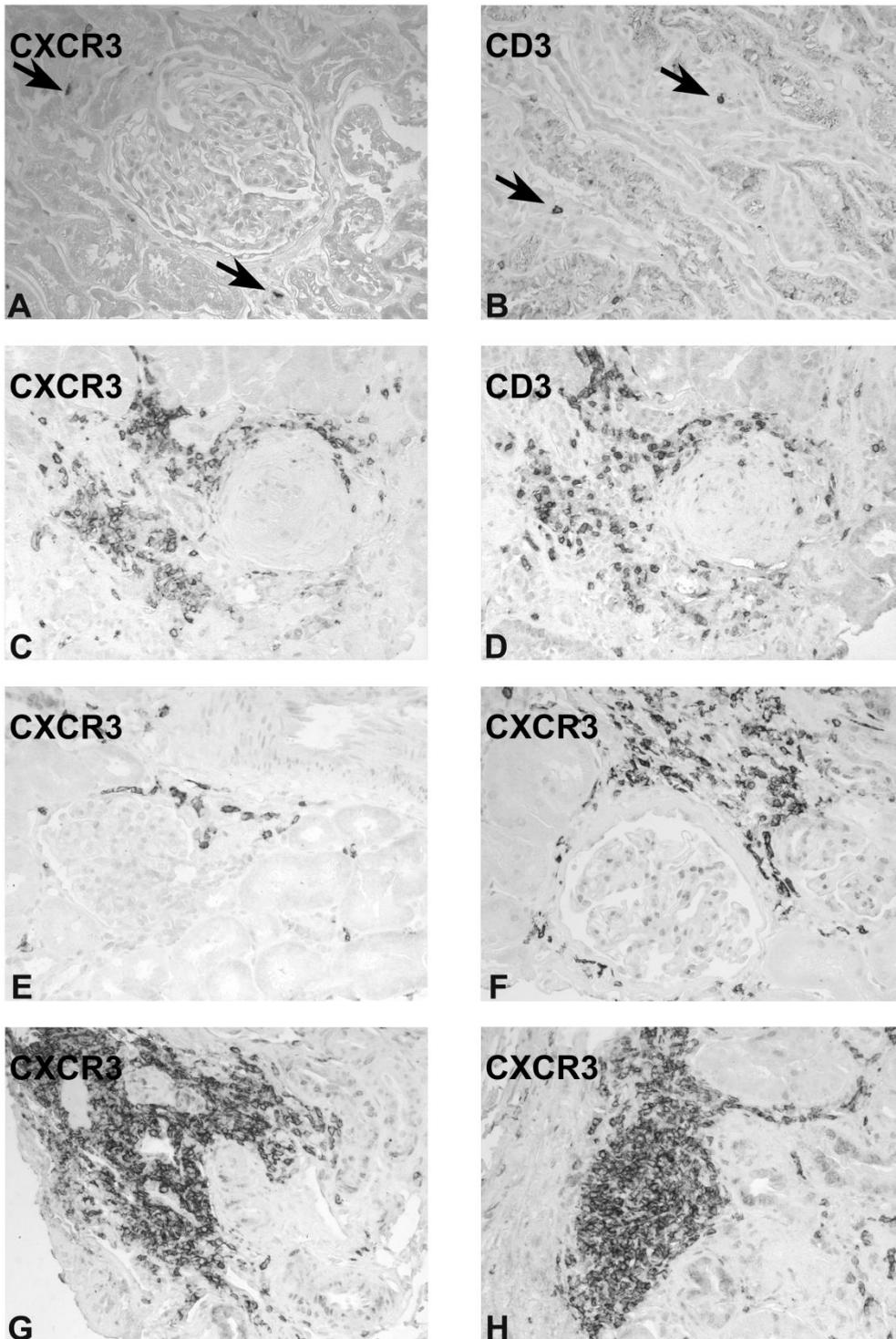


Abbildung 2 CXCR3- und CD3-positive Zellen in der Studienpopulation. Immunhistochemie zur Darstellung von CXCR3- (**A,C und E-H**) und CD3-positiven Zellen (**B,D**) in PräTx-Biopsien (**A,B**) und in Biopsien von AS-Patienten (**C-H**). (Originalvergrößerung in **A,B** und **E-G** x250, und x200 in **C,D**) In den PräTx-Biopsien gab es vereinzelte positive Zellen (**Pfeile in A, B**). **C** und **D** zeigen ein sehr ähnliches Infiltrationsmuster für CXCR3- und CD3-positive Zellen in einer entzündlich veränderten AS-Biopsie. Die Art der Infiltration der AS-Biopsien durch CXCR3-positive Zellen variierte von geringen periglomerulären Infiltraten (**E**) über prominente Zellansammlungen (**F, G**) hin zu Infiltraten mit nodulärem Muster (**H**).

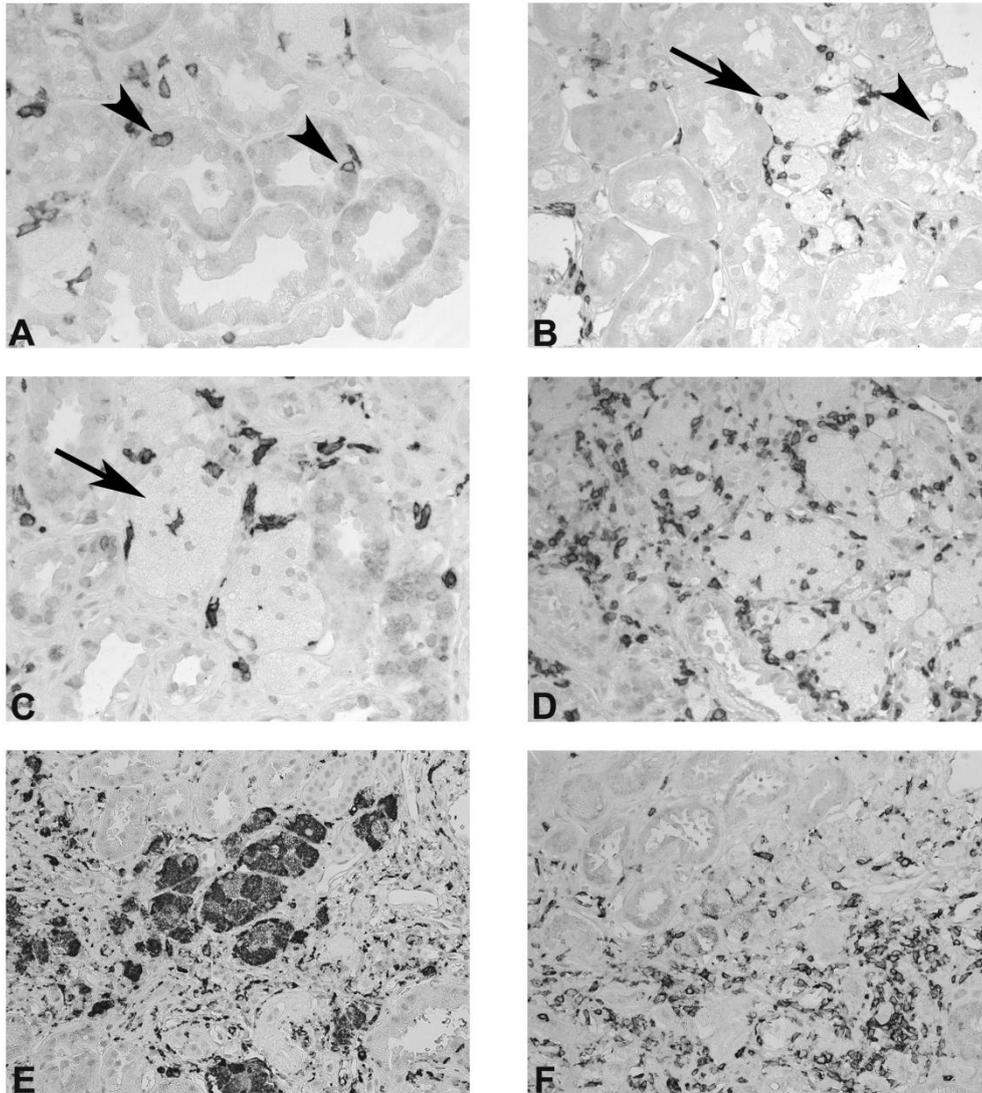
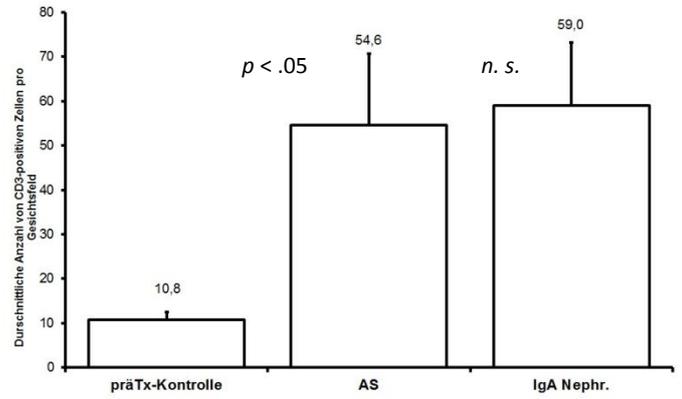
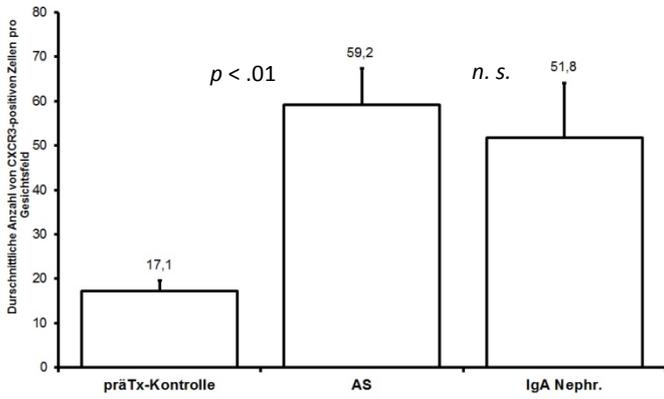
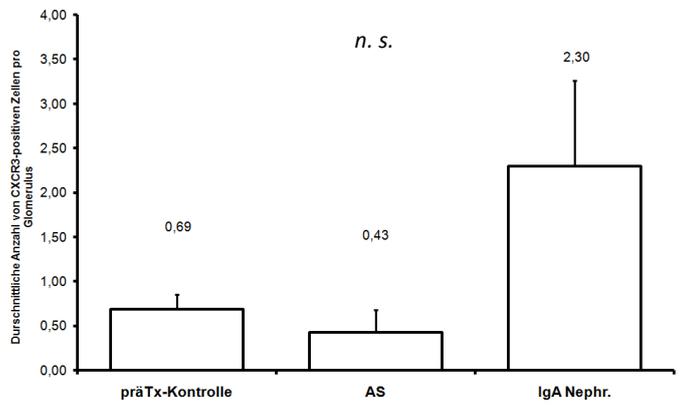
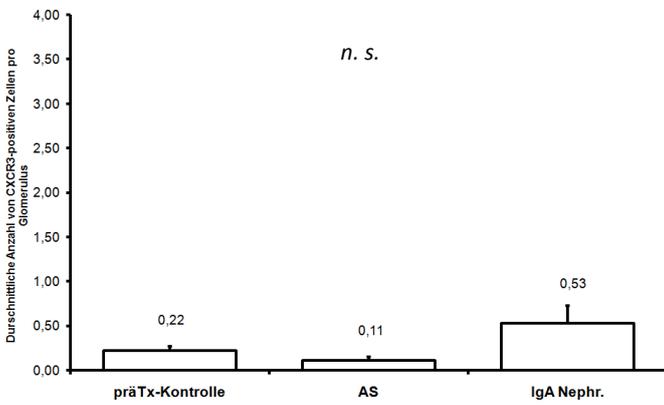


Abbildung 3 CXCR3, CD68 und Schaumzellen bei AS. Immunhistochemie zur Darstellung von CXCR3 (**A-D und F**) und CD68 (**E**) in Biopsien von AS-Patienten. (Originalvergrößerung x400 **A und C**, x250 in **B, D-F**) CXCR3-positive Zellen infiltrieren tubuläres Epithel (**Pfeilspitzen in A,B**) Die Ansammlungen von Schaumzellen (**Pfeile in B,C**) reichte von kleinen Schaumzellgruppen (**B,C**) hin zu massiven Ansammlungen (**D**). CXCR3-positive Zellen waren den Schaumzellen angelagert oder lagen zwischen diesen. Die Schaumzellen waren CD68-positiv (**E**) und CXCR3-negativ (**F**).



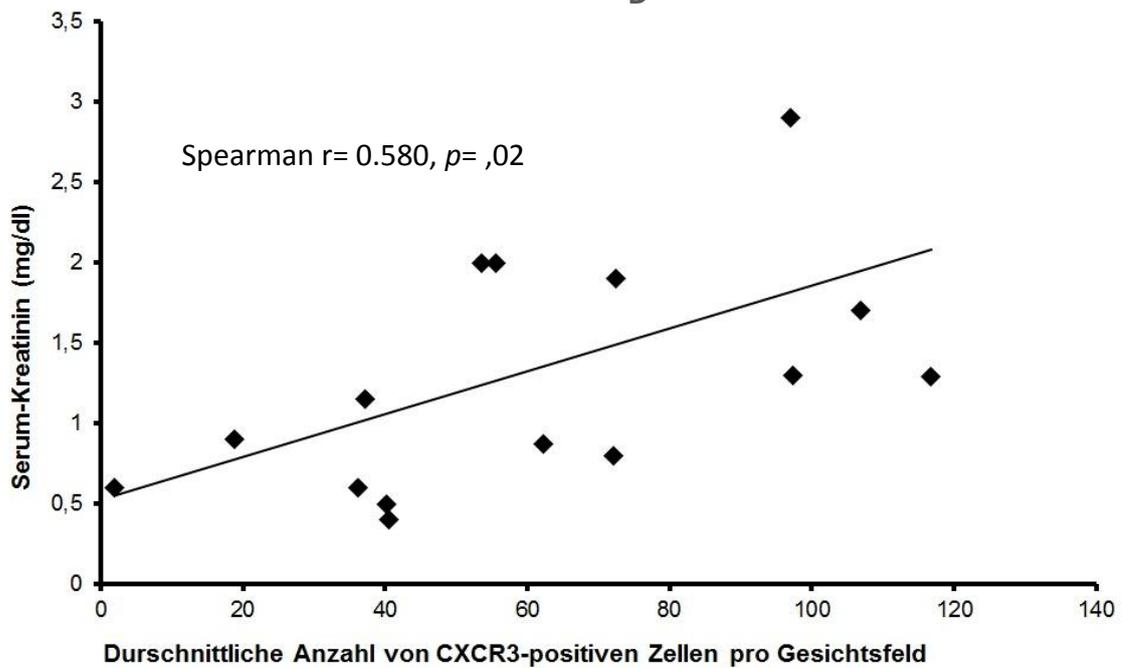
A

B



C

D



E

Abbildung 4 Quantifizierung der Entzündungszellen. Quantifizierung der CXCR3- (A,C) und CD3-positiven Zellen (B,D) pro Gesichtsfeld (A,B) und pro Glomerulus (C,D; keine Signifikanz) in PräTx-Biospien und Biopsien von Patienten mit AS oder IgA-N. Biopsien von AS-Patienten hatten eine signifikant höhere CXCR3- oder CD3-positive Zellzahl pro Gesichtsfeld als die PräTx-Gruppe (A, B). Kein signifikanter Unterschied bei der Zellzahl pro Gesichtsfeld im Vergleich zwischen AS und IgA-N. Es besteht eine signifikante Korrelation zwischen der Höhe des Serum-Kreatinin und der Anzahl der CXCR3-positiven Zellen pro Gesichtsfeld (E).

Schaumzellen in der AS-Niere sind CD68-positiv und CXCR3-negativ

Die CD68-positiven Zellen konnten in zwei Untergruppen unterteilt werden. Die eine Gruppe bestand aus kleineren Zellen, welche sternförmige Ausläufer aufwiesen und bezüglich ihrer Außenkontur sehr heterogen waren. Das Signal füllte anders als bei CXCR3 und CD3 die komplette Zelle gleichmäßig aus. Die zweite Gruppe bestand aus großen runden Zellen, welche äußerlich glatt begrenzt waren und keine Ausläufer aufwiesen. Hier füllte das Signal nicht flächig die komplette Zelle aus, sondern war fleckig (Abb. 3.E). Bei der ersten Gruppe handelte es sich um Makrophagen und bei der zweiten Gruppe um Schaumzellen. Es gab keine CD68-negativen Schaumzellen. In den seriellen auf CXCR3 gefärbten Schnitten war kein Hinweis auf eine eventuelle CD68/CXCR3-Doppelpositivität zu finden. Allerdings lagen regelmäßig kleine Ansammlungen runder CXCR3-positiver Zellen in enger Nachbarschaft zu den großen Schaumzellen (Abb. 3.F). Zum Teil lagen die CXCR3+ Zellen innerhalb der Begrenzung der Schaumzellen. In der angefertigten Doppelimmunfluoreszenz bestätigten sich die Ergebnisse der Immunhistochemien. Die CD68-positiven Schaumzellen und Makrophagen erschienen leuchtend rot, die CXCR3-positiven Lymphozyten leuchtend grün (Abb.5 D,E,F) Gelbe, doppelt-positive Zellen waren nicht auffindbar. Bei der Betrachtung der Schnitte in einem konfokalen Mikroskop sahen wir, dass die CXCR3-positiven Zellen von außen auf den Schaumzellen aufgelagert waren (Abb.5 .G, H).

Die im Nierengewebe von Alport-Patienten residenten Schaumzellen sind CD68+ und CXCR3-negativ. Die Schaumzellen liegen in enger Nachbarschaft zu CXCR3+, CD68-negativen Lymphozyten.

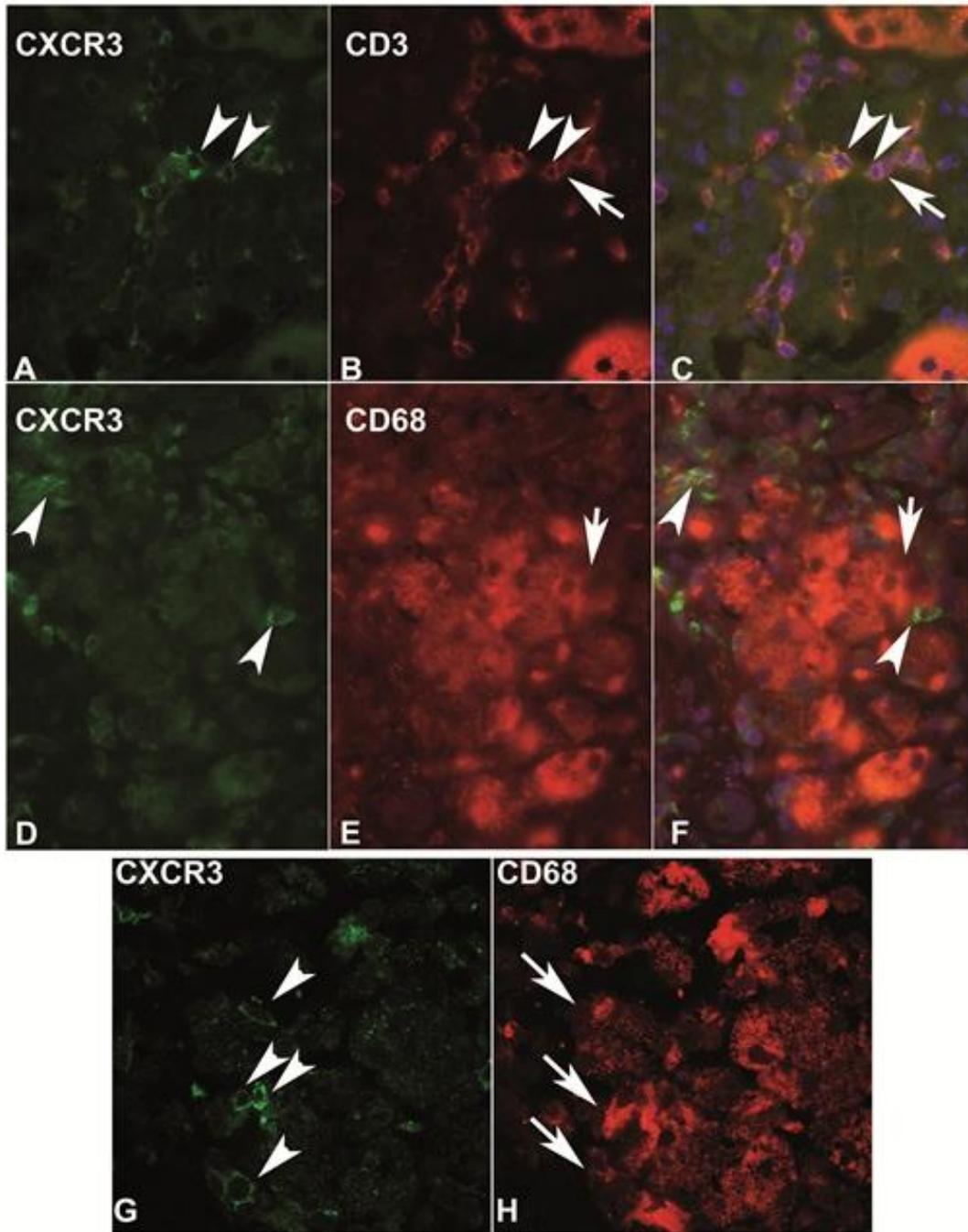


Abbildung 5 Doppelimmunfluoreszenzen für CXCR3/CD3 und CD68. Doppelimmunfluoreszenzen zur Darstellung von CXCR3/CD3 (A,B und die Überlagerung in C) und CXCR3/CD68 (D,E und die Überlagerung in F) in Biopsien von AS-Patienten. (Originalvergrößerungen in A-F x630). Die meisten CXCR3-positiven Zellen waren auch CD3-positiv (Pfeilspitzen in A-C). Vereinzelt gab es CD3-positive Zellen die CXCR3-negativ waren (Pfeil in B, C). Die überwiegende Mehrheit der CD68-positiven Zellen war CXCR3-negativ. Die CD68-positiven Schaumzellen (Pfeile in E, F) waren CXCR3-negativ, jedoch lagen CXCR3-positiven Zellen stets in enger Nachbarschaft zu den Schaumzellen (Pfeilspitzen in D, F). Die konfokalen Aufnahmen in G und H verdeutlichen die Assoziation von CXCR3-positiven Zellen (Pfeilspitzen in G) und CD68-positiven Schaumzellen (Pfeile in H).

Tabelle 7: Korrelation der lichtmikroskopisch sichtbaren Nierenveränderungen und der Anzahl CXCR3-positiver Zellen pro Gesichtsfeld

Morphologischer Grad der Schädigung	Spearman r (95% Konfidenz-Intervall)	Signifikanz niveau
Interstitielle Fibrose	r=0.66 (0.21-0.87)	p<0.01
Tubulusatrophie	r=0.71 (0.32-0.90)	p<0.01
Globale glomerulären Sklerose	r=0.78 (0.32-0.94)	p<0.01
Kapillarsklerose	r=0.65 (0.21-0.87)	p<0,01
Synechienformation	r=0.58 (0.10-0.84)	p<0,05
Schaumzellakkumulation	r=0.52 (0.02-0.82)	p<0,05
Intimafibrose	r=0.30 (-0.24-0.70)	p>0,05
Intimahyalinose	r=0.47 (0.04-0.79)	p>0.05
Mesangiale Hyperzellularität	r=0.33 (0.21-0.72)	p>0.05
Mesangiale Sklerose	r = 0.34 (-0.21-0.72)	p>0.05

CXCR3 und morphologische, funktionelle Parameter

Die Anzahl der interstitiellen CXCR3-positiven Zellen in der Alport-Gruppe korrelierte signifikant positiv mit einigen morphologischen Kriterien der progressiven Nierenschädigung. Eine positive hochsignifikante Korrelation bei einem $p < 0.01$ bestand für die interstitielle Fibrose, die tubuläre Atrophie, die globale glomeruläre Sklerose und die Kapillarsklerose. Für die Formation von Synechien und die Schaumzellakkumulation zeigte sich eine positive signifikante Korrelation bei einem $p < 0,05$ mit der Anzahl interstitieller CXCR3+ Zellen. Keine signifikante Korrelation war für die Parameter Intimafibrose, Intimahyalinisierung, mesangiale Zellularität und mesangiale Sklerose nachweisbar. Das Serum-Kreatinin (mg/dl) gemessen zum Zeitpunkt der Biopsienahme korrelierte positiv mit der Anzahl der interstitiellen CXCR3+ Zellen in der AS-Gruppe (Abb.4.E). Diese Korrelation war bei einem $p = 0,02$ signifikant. Es gab keine signifikante Korrelation zwischen CXCR3+ Zellen und der Proteinurie (g/24h).

Diskussion

Die interstitielle Entzündung beim Alport Syndrom ist altbekannt

Im Jahre 1968 veröffentlicht Joshi einen histopathologischen Fallbericht über drei Brüder die alle an einer hereditären Nephritis erkrankt waren [122]. Zusätzlich trug er die Arbeiten der 60er Jahre, die sich mit der Nierenhistopathologie der hereditären Nephritis beschäftigt hatten, zusammen [123-126]. Er beschrieb, dass die pathologischen Veränderungen neben dem Vorliegen von Schaumzellen Charakteristika der chronischen Glomerulonephritis (Halbmonde, Hyalinisierung), der interstitiellen Nephritis und der Pyelonephritis (periglomeruläre Fibrose, interstitielles Infiltrat und Fibrose) beinhalteten. Da Charakteristika jeder dieser drei Entitäten vorhanden waren, jedoch nie das Vollbild der jeweiligen Erkrankung vorlag, bezeichnete er die Nierenmorphologie bei Hereditärer Nephritis als *mixed nephritis*. Er bestätigte damit seine Vorgängerarbeiten bezüglich der Nierenmorphologie bei Hereditärer Nephritis. Es ist erstaunlich, dass es bei einer Literaturrecherche 41 Jahre nach der Veröffentlichung Joshis sehr schwer ist aktuellere Beschreibungen der interstitiellen Entzündung zu finden. So findet sich in einer großen Übersicht über hereditäre Nephritiden von der Alport-Forscherin Claire Marie Gubler die glomeruläre Morphologie des Alport Syndroms mit all seinen Facetten, jedoch nicht das interstitielle Infiltrat. [8] Auch in der aktuellen Arbeit *The renal lesions of Alport syndrome* von Heidet et al. findet sich nicht ein Satz über eine interstitielle Entzündung beim AS [10]. Eine genauere Charakterisierung des Infiltrats, neben der Arbeit von Lebleu et al. [127], sucht man vergebens. In den etwas älteren Arbeiten zur Morphologie der Niere bei Alport Syndrom von Noel aus dem Jahre 2000 und von Kashtan aus den Jahren 1996, 1993 und 2000 bleiben Joshis Beobachtungen ebenfalls außen vor [12, 22, 128-129]. Das AS wird im Bereich der Molekulargenetik momentan intensiv beforscht wohingegen konventionelle histopathologische Betrachtungen des AS in den Hintergrund gerückt sind.

Die interstitielle Entzündung als möglicher Teil einer universellen Endstrecke chronischer Nierenerkrankungen

Eine Erkrankung, die auf einem genetisch determinierten Strukturdefekt der glomerulären Basalmembran beruht, führt zu einer interstitiellen Entzündung. Diese ist in ihrer Qualität und Quantität vergleichbar mit der interstitiellen Entzündung einer immunologisch vermittelten glomerulären Erkrankung, die sich im benachbarten glomerulären Mesangium abspielt. Derartige Ergebnisse lassen vermuten, dass das lymphozytäre Infiltrat nicht spezifisch ist für das AS, sondern vielmehr Ausdruck einer gemeinsamen Endstrecke der Nierenschädigung. Das tubulointerstitielle Infiltrat ist ein Charakteristikum der progressiven Nierenerkrankungen [107, 130]. Die Anzahl der T-Lymphozyten und CD68-positiven Makrophagen korreliert invers mit der Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie [107, 131-132]. Man nimmt an, dass die tubulointerstitielle Entzündung ein Teil einer gemeinsamen Endstrecke diverser Nierenerkrankungen ist. Diese Arbeit bestätigt die frühen Beschreibungen des mononukleären Infiltrates und zeigt zusätzlich, dass es mit einer CXCR3-positiven Lymphozyteninfiltration und begleitender Schaumzellakkumulation assoziiert ist. In dieser Arbeit wurde das Alport Syndrom als primär nicht-entzündliches „Modell“ einer glomerulären Schädigung verwendet, um den Zusammenhang mit der tubulointerstitiellen Infiltration genauer zu untersuchen. Während der Studiauswertung stellte sich dann die Frage, ob die interstitielle Entzündung nicht auch durch einen interstitiellen Kollagenkettenverlust mitbedingt sein könnte. Diese Frage konnte in dieser Arbeit nicht mit letzter Sicherheit beantwortet werden. Das $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Trimer des Kollagen IV wird nicht exklusiv in den Basalmembranen des Glomerulus und der Bowmann'schen Kapsel exprimiert sondern auch in den Basalmembranen der distalen Tubuli. Im Rahmen des AS kommt es zu einem Verlust des $\alpha3\alpha4\alpha5$ -Trimers aus dem Glomerulus und auch aus den distalen Tubuli. Fisher et al. demonstrierte, dass die Fragmentierung der Kollagenketten in der gealterten Haut zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses und der Hochregulation von Matrixmetalloproteinasen (hier konkret die MMP-1) führt und so die Gewebsschädigung voran treibt [133]. Rao et al demonstrierte im AS-Maus-Modell die glomeruläre Hochregulation der MMP-12. Weiterhin konnte er im Tiermodell

zeigen, dass durch die Gabe des MMP-12-Inhibitors MMI270 oder die Blockade des CCR2 mit Propagermanium die Ultrastruktur der glomerulären Basalmembran wieder hergestellt werden konnte, bzw. der Schaden erst gar nicht entstand. Zusätzlich verringerte die Blockade von CCR2 auch die Expression von MMP-12-mRNA signifikant. Ein Überlebensvorteil der Tiere unter dieser Therapie konnte gezeigt werden [134]. Es könnte sein, dass sich ein ähnlicher über die CCL2/CCR2-Achse vermittelter Pathomechanismus auch im Interstitium abspielt und auch hier zu einer Rekrutierung von Makrophagen und einer erhöhten Aktivität der MMP-12 führt.

Patienten mit IgA-Nephropathie zeigten eine vergleichbare CXCR3/CD3-positive interstitielle Entzündung, weshalb es wahrscheinlicher ist, dass die beim AS gesehene interstitielle Entzündung Teil einer gemeinsamen Endstrecke ist. Um weiter der Frage nachgehen zu können, ob es beim AS eine vom glomerulären Schaden unabhängige interstitielle Entzündung gibt, müsste ein komplexes Modell gestaltet werden. In diesem müsste der Kollagenkettenverlust auf die tubulären Basalmembran limitiert sein, die Integrität der glomerulären Basalmembranen müsste zudem gewährleistet sein.

Der Ursprung der Schaumzellen und eine mögliche Interaktion mit Lymphozyten

Schaumzellen werden bei zwei Dritteln der Patienten mit Alport Syndrom in der Nierenbiopsie beschrieben. Schaumzellen sind meist im Tubulointerstitium resident, können gelegentlich aber auch im Glomerulus oder innerhalb von Tubuli gefunden werden [123, 126]. Sie sind nicht pathognomonisch für ein AS, da Schaumzellen auch bei diversen anderen Nierenerkrankungen beschrieben worden sind, jedoch sind sie in knapp 70% aller Fälle vorhanden [53]. Franco et al. untersuchten in einer Studie die Nierenbiopsien von acht nephrologischen Patienten, unter anderem auch die Biopsie eines AS-Patienten auf das Vorhandensein von Schaumzellen und deren Eigenschaften. Die von ihm gefundenen Schaumzellen waren allesamt positiv für den Makrophagen-Marker HAM56. Er schloss hieraus, dass Schaumzellen Makrophagen sind [54]. Kurihara et al untersuchten in einer Studie mit insgesamt 51 Biopsien von Patienten mit membranöser Nephritis Schaumzellen. Er fand

heraus, dass Schaumzellen neben CD68 auch 25F9 exprimieren, welches ein Marker für ausgereifte Makrophagen ist. Zusätzlich waren die Schaumzellen positiv für CD11_{a,b} und _c und ICAM-1. Zusätzlich fand er heraus, dass das Vorkommen von Schaumzellen nicht mit dem Grad der Proteinurie assoziiert ist [55], wie es oft angenommen wird [54]. Wir können in dieser Arbeit bestätigen, dass die von uns gefundenen Schaumzellen allesamt CD68-positiv und CXCR3-negativ sind. Dies ist als Hinweis auf einen makrophagozytären Ursprung der Schaumzellen zu werten. Die örtliche Nähe der Schaumzellen zu CXCR3-positiven Lymphozyten lässt vermuten, dass diese beiden Zellgruppen miteinander interagieren. Eine Studie im Bereich der Lungentransplantation fand CXCL10-sezernierende Makrophagen in Lungentransplantaten. CXCL10 ist ein chemotaktisch wirksamer Ligand für CXCR3-tragende Leukozyten. Die Studie illustrierte, dass CXCL10-sezernierende Makrophagen die Infiltration von CXCR3-positiven Lymphozyten in das Lungengewebe mediierten [115]. Dieses Phänomen konnte auch in einer Studie zur juvenilen idiopathischen Arthritis dargestellt werden. Hier werden Lymphozyten über den gleichen Mechanismus in das Synoviagewebe rekrutiert [135]. Auch in der Pathophysiologie der Sarkoidose findet sich dieser Rekrutierungsmechanismus wieder [111]. Da die Schaumzellen beim AS mit hoher Wahrscheinlichkeit makrophagozytären Ursprungs sind könnte es sein, dass die Interaktion zwischen den Schaumzellen und den CXCR3-positiven Lymphozyten zumindest zum Teil über den CXCR3/CXCL10-Weg abläuft. Es war im Rahmen dieser Studie nicht möglich, eine zuverlässige Immunhistochemie für CXCL10 zu etablieren.

Immunsuppression als Therapieoption des Alport Syndroms

Die Ergebnisse zeigen, dass in der Pathophysiologie des AS die tubulointerstitielle Entzündung sehr wahrscheinlich eine Rolle spielt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Nierenfunktion, den pathologischen Veränderungen im Nierengewebe und der interstitiellen Entzündung. Die Idee liegt nahe, einen entzündungshemmenden Therapieansatz bei der Behandlung des AS zu verfolgen. Aus der Reihe der konventionellen Immunsuppressiva, die auch in der Transplantationsmedizin eingesetzt werden, gibt es nur für Ciclosporin A Daten und diese nur in geringem Umfang. Callis et al, veröffentlichten 1999 eine

achtjährige follow-up-Untersuchung. Hier zeigte sich, dass sich unter Ciclosporin-Gabe die Nierenfunktion der AS-Patienten stabilisiert hatte und der Grad der Proteinurie stabil geblieben war. Sie konnten in den genommen Biopsien keine wesentlichen pathologischen Veränderungen finden. Hinweise auf eine Ciclosporin-vermittelte Nephrotoxizität lagen nicht vor [136]. Chen et al versuchten diese guten Ergebnisse in einem Tierversuch mit einem AS-Hundemodell (Samojedenhunde) nachzuvollziehen. Er kam zu dem Ergebnis, dass, anders als es die Arbeit von Callis suggerierte, die Gabe von Ciclosporin A den Krankheitsverlauf nur verlangsamte und nicht komplett aufhielt [137]. Charbit et al griffen die Idee erneut auf und begannen eine kleine Gruppe AS-Patienten mit Ciclosporin A zu behandeln. Auch hier konnte eine Reduzierung der Proteinurie gezeigt werden, allerdings wurde die Ciclosporin-Nephrotoxizität zum gravierenden Problem, so dass die Therapie beendet wurde. Warum Charbit im Gegensatz zu Callis diese drastischen Probleme mit der Ciclosporin-Toxizität hatte und ob es eventuell an der höheren Zieldosis lag (Callis zielte auf 82 ± 13 ng/ml, Charbit auf 100-125 ng/ml), wird nicht geklärt, so dass Charbit et al empfehlen, das AS nicht mit Ciclosporin zu behandeln [138]. Es ist generell fraglich, ob eine immunsuppressive Therapie mit Ciclosporin A beim AS vertretbar ist. Bedenkt man, dass die Therapie wahrscheinlich ein ganzes Leben lang durchgeführt werden muss und der Einfluss von Ciclosporin A in der Langzeitbehandlung auf Hauttumore und lymphoproliferative Erkrankungen nicht abschließend geklärt ist, macht den Einsatz ethisch fragwürdig [139]. Vielleicht ist hier ein spezifischerer immunmodulatorischer Ansatz notwendig. Eine selektive Chemokinrezeptorblockade könnte eine solche Möglichkeit sein. Auch deswegen, weil dieses Therapieprinzip inzwischen seinen Weg in den klinischen Alltag gefunden hat. Mit dem CCR5-Antagonisten Maraviroc (Celsentri®) ist das erste Medikament dieser Art in Deutschland zugelassen. Derzeit wird es als Reservetherapeutikum bei der HIV-Therapie eingesetzt.

Die CXCR3-Blockade als entzündungshemmende Therapie des AS

Aus Studien mit dem Alport-Mausmodell ($\alpha 3$ -Knock-out-Maus), weiß man, dass eine immunmodulatorische Therapie auf der Basis einer Chemokinrezeptor-Blockade für die Tiere von Vorteil sein kann. So konnte Ninichuk et al. zeigen, dass eine Blockade

von CCR1 in der α 3-Knock-out-Maus durch BX471 zu einer Verringerung der Anzahl apoptotischer Tubuluszellen, der Glomerulosklerose und der Proteinurie führte. Der nephroprotektive Effekt der CCR1-Blockade führte zu einem Überlebensvorteil der Versuchstiere [140]. Aus den Ergebnissen unserer und anderer Arbeiten lässt sich ableiten, dass ein immunmodulatorischer Ansatz durch eine CXCR3-Blockade beim AS vorteilhaft sein könnte. Zu einer CXCR3-Modulation im Rahmen des AS gibt es noch keine Studien, wohl aber zu anderen nephrologischen Entitäten im Stadium eines Tierversuchs. So zeigten Panzer et al, dass im Mausmodell der nephrotoxischen Nephritis die CXCR3-defiziente Maus gegenüber dem Wildtyp einen klinischen Vorteil hatte. Die Anzahl der das Nierengewebe infiltrierenden T-Lymphozyten war in der CXCR3-defizienten Gruppe signifikant niedriger, als in der Wildtyp-Gruppe. Sowohl der Grad der Albuminurie als auch die Anzahl der Halbmonde waren in der CXCR3-defizienten Gruppe niedriger, die Nierenfunktion besser [141]. In der sequentiellen Arbeit von Steinmetz et al., in der die CXCR3-Defizienz in ein Lupus-Nephritis-Mausmodell eingekreuzt wurde, zeigten sich vergleichbare Ergebnisse. Auch hier verbesserten sich die klinischen Parameter der Niereninsuffizienz durch die CXCR3-Defizienz. Der Grad der lymphozytären Infiltration war ebenfalls niedriger. Es gelang weiterhin die Rolle von CXCR3 als chemotaktischer Faktor näher zu charakterisieren [142]. Eine Arbeit von Menke et al, die sich mehr auf die CXCR3-Liganden CXCL9 und CXCL10 im gleichen Tiermodell konzentrierte, stützt die Ergebnisse von Panzer und Steinmetz. Sie zeigt, dass nicht nur die CXCR3-Defizienz, sondern auch der alleinige Verlust von CXCL9 bei bestehendem CXCR3 eine klinische Verbesserung herbeiführen kann. Alleinige CXCL10-Defizienz hatte in diesem Zusammenhang keinen protektiven Effekt [143]. Zusammenfassend sieht man, dass bei den Tiermodellen der Lupusnephritis und der nephrotoxischen Nephritis sowohl die CXCR3-Defizienz, als auch die fehlende Aktivierung von CXCR3 durch CXCL9 den Grad der interstitiellen Entzündung senkt und die Nierenfunktion verbessert bzw. stabilisiert. Um die Rolle von CXCR3 und seiner Liganden im Rahmen des AS zu überprüfen, könnte man CXCR3, CXCL9 und CXCL10-knock-outs in das AS-Mausmodell einkreuzen und überprüfen, ob man ähnlich positive Ergebnisse wie bei den anderen Entitäten erzielt. Alternativ könnte auch eine Rezeptorblockade getestet werden, da gezeigt wurde, dass die fehlende

Aktivierung des Rezeptors ausreichend ist um einen protektiven Effekt zu erzielen. Bis heute wurde in keinem Tiermodell für nephrologische Erkrankungen eine CXCR3-Blockade durchgeführt. Aus anderen Forschungsbereichen können aber erste Erfolge mit dieser Methode vermeldet werden. So gelang es Bastani et al. in einem Mausmodell für Transplantatvaskulopathie nach Herztransplantation mit dem CXCR3/CCR5-Antagonisten TAK-779 die Rekrutierung von Lymphozyten in das Transplantat zu verringern. Die Anzahl der Intimaläsionen wurde dadurch gesenkt und generell der Verlauf der Transplantatvaskulopathie abgemildert [144]. TAK-779 zeigte auch in einem Mausmodell für allergisches Asthma gute Wirksamkeit. Hier verhinderte es die Rekrutierung von CXCR3/CCR5-positiven Lymphozyten in das Lungengewebe und verbesserte so die respiratorische Funktion und den Schweregrad des Asthmas der Versuchstiere [145]. Auch bei einem Tiermodell für Kolitis konnte TAK-779 erfolgreich über einen ähnlichen Mechanismus wirken [146]. Nicht nur die kombinierte Hemmung von CXCR3 und CCR5 scheint vielversprechend zu sein. So konnte die Rekrutierung von Lymphozyten in das Synovialgewebe eines Rattenmodells für Rheumatoide Arthritis durch den Einsatz eines gegen CXCR3 gerichteten monoklonalen Antikörpers erfolgreich verhindert werden. Das Resultat war eine Milderung der Aktivität der Arthritis und ein besserer Erhalt des Knorpelgewebes [112].

Trotz dieser vielversprechend erscheinenden ersten Ergebnisse, die durch eine Chemokinrezeptorblockade erzielt werden konnten, ist Vorsicht geboten. Die Anzahl der Ergebnisse ist noch nicht ausreichend um verlässliche Aussagen über das Schaden/Nutzen-Verhältnis für einen menschlichen Patienten formulieren zu können. Bis jetzt ist die einzige Aussage, die man bezüglich CXCR3 treffen kann, dass die CXCR3-Blockade oder der knock-out des zugehörigen Gens einer Labormaus (meist mit Black6-Hintergrund) einen Vorteil bietet ein entzündliches Geschehen zu bewältigen. Antworten auf wichtige Fragen, wie zum Beispiel die Sicherheit der Methode in der Langzeitanwendung stehen noch völlig aus. Allerdings geben andere Studien Hinweise, dass zum Beispiel ACE-Hemmer vergleichbar gute Ergebnisse liefern können [147]. Ein Teil der positiven Wirkung dieser Substanzen wird wahrscheinlich über die Entzündungshemmung erzielt.

Zusammenfassung

Das Alport Syndrom (AS) ist eine seltene glomeruläre Erkrankung, die durch Alterationen an der Ultrastruktur der Alpha-Ketten des Kollagen Typ IV ausgelöst wird. In einem Maus-Modell des Alport Syndroms spielt die interstitielle Infiltration des Nierengewebes durch Lymphozyten eine entscheidende Rolle bezüglich des Voranschreitens der Erkrankung. CXCR3 ist ein Chemokinrezeptor der an der Rekrutierung von T-Lymphozyten in das Nierengewebe beteiligt ist. Wir stellten die Hypothese auf, dass es möglich sein könnte, dass CXCR3-positive T-Lymphozyten auch beim menschlichen Alport Syndrom eine Rolle spielen. Immunhistochemische Ansätze wurden auf 17 Biopsien von Patienten mit Alport Syndrom, 10 Biopsien von Patienten mit IgA-Nephritis und 11 Biopsien von gesunden Nierenspendern durchgeführt. Wir untersuchten die Expression der $\alpha 5$ -Kette des Kollagen IV um die morphologisch-basierte Diagnose Alport Syndrom zu bestätigen, sowie die Expression von CXCR3 und CD3. Auf ausgesuchten Biopsien wurde eine Immunhistochemie zur Darstellung von CD68 und Doppelimmunfluoreszenzen zur Darstellung von CXCR3/CD3 und CXCR3/CD68 durchgeführt. In allen AS-Biopsien zeigte sich ein kompletter Verlust der $\alpha 5$ -Kette aus dem glomerulären Konvolut, was mit den Ergebnissen der Elektronenmikroskopie vereinbar war. Eine beträchtliche Anzahl an CXCR3-positiven Zellen konnte im Interstitium der AS Biopsien nachgewiesen werden. Der größte Anteil der CXCR3-positiven Zellen war zudem CD3-positiv, was in einer entsprechenden Doppelimmunfluoreszenz gezeigt werden konnte. Die Anzahl der CXCR3-positiven Zellen korrelierte signifikant mit dem Serum-Kreatinin-Level bei Biopsienahme und diversen morphologischen Parametern einer progressiven Nierenerkrankung (z.B. interstitielle Fibrose, Glomerulosklerose und tubuläre Atrophie). Der Schweregrad der CXCR3-positiven Infiltration in Biopsien mit Alport Syndrom und IgA-Nephritis war vergleichbar bzw. nicht signifikant unterschiedlich. Die von uns gefundenen Schaumzellen in den Biopsien mit Alport Syndrom waren durchweg CD68-positiv, was auf einem Monozytären/Makrophagen-Ursprung hinweist.

Die ursprünglich nicht-inflammatorische glomeruläre Läsion des Alport Syndroms führt zu einer interstitiellen Akkumulation von CXCR3/CD3-positiven T-Lymphozyten. Der Grad der Infiltration korrelierte mit der Nierenfunktion. Da diese

der interstitiellen Entzündung der IgA-Nephropathie entspricht handelt es sich am ehesten um eine Manifestation der chronischen Nierenerkrankung. Wir schlussfolgerten, dass der Therapieansatz der Modulation der T-Lymphozyten-Aktivität (z.B. durch eine CXCR3-Blockade) hilfreich sein könnte, um das Voranschreiten der Erkrankung zumindest zu verlangsamen. Diese Hypothese kann nun im Tierversuch getestet werden.

Veröffentlichtes Abstract

The Alport syndrome (AS) is a hereditary glomerular disease linked to structural abnormalities of collagen IV. In a mouse model of AS, the interstitial lymphocyte influx was important for disease progression. CXCR3 is a chemokine receptor involved in lymphocyte recruitment to the kidney. We hypothesized that CXCR3 positive T cells might be involved in human AS. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies from 17 patients with AS, 10 with IgA nephropathy, and 11 normal donor kidneys. We investigated the expression of the $\alpha 5$ -chain of collagen IV to confirm the morphological diagnosis, the chemokine receptor CXCR3 and CD3 positive T cells. AS biopsies demonstrated a complete loss of the $\alpha 5$ -chain of collagen IV from the glomerular basement membrane and the morphological features consistent with AS on electron microscopy. A prominent number of CXCR3 positive cells was found in the tubulointerstitium. The majority of CXCR3 positive cells were CD3 positive T cells, demonstrated by double-labelling in selected biopsies. The number of CXCR3 positive cells in kidneys with AS correlated with serum-creatinine ($p < 0.05$) and with morphological features of a progressive disease (e.g. interstitial fibrosis, glomerulosclerosis and tubular atrophy). The severity of interstitial CXCR3 positive cell influx was similar in AS as compared to IgA nephropathy. The non-inflammatory glomerular lesion of AS is associated with prominent interstitial accumulation of CD3 and CXCR3 positive lymphocytes. The degree of infiltration correlated inverse with renal function. We speculate that targeting T lymphocytes, e.g. by CXCR3 blocking agents might be a novel approach to inhibit disease progression in patients with AS.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herr PD Dr. med. Stephan Seegerer, der mir immer, wenn es notwendig war, mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich danke ihm auch für seine Gelassenheit und Geduld während der Entstehung dieser Arbeit. Ich danke ihm dafür, dass er mir die Freude und Faszination am wissenschaftlichen Arbeiten näher gebracht hat. Und ich danke ihm für all das Wissen, welches er mir als großartiger Lehrer vermittelt hat.

Ich bedanke mich bei Frau Jana Mandelbaum, Herrn Dan Draganovici und Frau Ilka Edenhofer, dafür, dass sie mir die Technik der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz beigebracht haben und für die große Hilfe bei der Bewältigung der Studie. Außerdem möchte ich mich für die schöne und harmonische gemeinsame Zeit im Labor bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Heinz Regele und Herrn Dr.med. Afschin Soleiman vom Klinischen Institut für Pathologie der medizinischen Universität Wien für die Bereitstellung der Nierenbiopsien und die Erhebung der klinischen Daten des Patientenkollektivs.

Ich danke unbekannterweise allen Patienten und Organ Spendern deren Nierenbiopsien ich für diese Studie verwenden durfte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Martin Reincke dafür, daß ich diese Arbeit in seinen Kliniken anfertigen durfte.

Ich danke meinem Vater, Herrn Dr.med Jakub Jedlicka, dafür, dass er neben all der ständigen und bedingungslosen Unterstützung auch immer ein fachlich offenes Ohr für mich hatte. Dafür, dass er mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite steht und dafür, dass er mein ärztlicher Mentor ist.

Ich danke meiner Familie und Sheila für all die Unterstützung, das Vertrauen und all die Zuwendung.

Anhang

Protokoll Immunhistochemie

- 1) Xylen 5-5-5 min
- 2) Alkohol 100% 3-3-3 min
- 3) Alkohol 96% 3-3 min
- 4) Alkohol 70% 3-3 min
- 5) PBS schwenken+7 min
- 6) Methanol 180ml +20 ml H₂O₂ 30% 20 min **bei RT abgedunkelt**
- 7) PBS schwenken+7 min
- 8) Antigen Retrieval (entweder a,b oder c)
 - a. Autoklave: 300ml Aqua dest + 3 ml *Antigen Unmasking solution* für 20 min bei 1 bar und 121 °C. Aqua dest vorher in MW zum Kochen bringen. Auskühlen 30min
 - b. Mikrowelle: 300ml Aqua dest + 3 ml *Antigen Unmasking solution* für 2,5-2,5-2,5-2,5 min kochen. Aqua dest vorher schon zum Kochen bringen Auskühlen 20 min
 - c. Proteinase 1:20 in Aqua dest für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 9) PBS schwenken+7 min + Mit Fettstift umkreisen
- 10) Avidin 15 min
- 11) PBS schwenken+7 min
- 12) Biotin 15min
- 13) PBS schwenken+7 min
- 14) Superblock
- 15) PBS schwenken+7 min
- 16) Primärer AK 60min
- 17) PBS schwenken+7 min
- 18) Sekundärer AK 30 min
- 19) PBS schwenken+7 min
- 20) Tertiärer AK 30 min
- 21) PBS schwenken+7 min
- 22) ABC: 1ml Aqua dest + 15µl A +15 µl B für 30 Minuten
- 23) PBS schwenken+5 min
- 24) TRIS 5min
- 25) 1 Küvette DAB+ 1ml NiCl + 0,5 ml H₂O₂ in 200ml TRIS 37°C Wasserbad für 3-10 Minuten dann
- 26) Methylgrün für 3-10 Minuten
- 27) Rasch durch Alkoholreihe 96%-96%-100%-100%-100%-Xylen
- 28) Eindeckeln

Optionale Schritte sind blau markiert.

Zu 14): nur wenn primärer Antikörper in Milch verdünnt ist

Zu 20): nur wenn das Protokoll tertiären AK vorschreibt, sonst von 19 direkt zu 22

Protokoll Immunfluoreszenz

- 1) Xylen 5-5-5 min
- 2) Alkohol 100% 3-3-3 min
- 3) Alkohol 96% 3-3 min
- 4) Alkohol 70% 3-3 min
- 5) PBS schwenken+7 min
- 6) Antigen Retrieval (entweder a,b oder c)
 - a. Autoklave: 300ml Aqua dest + 3 ml *Antigen Unmasking solution* für 20 min bei 1 bar und 121 °C. Aqua dest vorher in MW zum Kochen bringen. Auskühlen 30min
 - b. Mikrowelle: 300ml Aqua dest + 3 ml *Antigen Unmasking solution* für 2,5-2,5-2,5-2,5 min kochen. Aqua dest vorher schon zum Kochen bringen Auskühlen 20 min
 - c. Proteinase 1:20 in Aqua dest für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 7) PBS schwenken+7 min + Mit Fettstift umkreisen
- 8) Avidin 15 min
- 9) PBS schwenken+7 min
- 10) Biotin 15min
- 11) PBS schwenken+7 min
- 12) Superblock bei primärer AK in Milch 5 min
- 13) PBS schwenken+7 min
- 14) Primärer AK 60min
- 15) PBS schwenken+7 min
- 16) Sekundärer AK 30 min
- 17) PBS schwenken+7 min
- 18) FITC 30min
- 19) PBS schwenken+7 min
- 20) Eindeckeln mit Vectashield (mit DAPI)

Zu 16): Der sekundäre Antikörper kann schon Chromogen-konjugiert sein. Wenn das der Fall ist direkt von 17) nach 20). Wenn der sekundäre Antikörper biotinyliert ist, muss das Chromogen Streptavidin-konjugiertes FITC abschließend inkubiert werden. Wenn ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet wird müssen die

Schritte 7)-10) durchgeführt werden. Avidin/Biotin-Blockade kann bei einer einfachen Fluoreszenz nur mit einem direkt Chromgen-konjugierten Sekundärantikörper weggelassen werden.

Alle Inkubationen und Waschschritte müssen im Dunkeln erfolgen →Lichtdichte Behälter verwenden!

Protokoll Doppelimmunfluoreszenz

- 1) Xylen 5-5-5 min
- 2) Alkohol 100% 3-3-3 min
- 3) Alkohol 96% 3-3 min
- 4) Alkohol 70% 3-3 min
- 5) PBS schwenken+7 min
- 6) Antigen Retrieval (entweder a,b oder c)
 - a. Autoklave 300ml Aqua dest + 3 ml *Antigen Unmasking solution* für 20 min bei 1 bar und 121 °C. Aqua dest vorher in MW zum Kochen bringen. Auskühlen 30min
 - b. Mikrowelle 300ml Aqua dest + 3 ml *Antigen Unmasking solution* für 2,5-2,5-2,5-2,5 min kochen. Aqua dest vorher schon zum Kochen bringen Auskühlen 20 min
 - c. Proteinase 1:20 in Aqua dest für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
- 7) PBS schwenken+7 min+ Mit Fettstift umkreisen
- 8) Avidin 15 min
- 9) PBS schwenken+7 min
- 10) Biotin 15min
- 11) PBS schwenken+7 min
- 12) Superblock
- 13) PBS schwenken+7 min
- 14) Erster Primärer AK 60min
- 15) PBS schwenken+7 min
- 16) Sekundärer AK 30 min
- 17) PBS schwenken+7 min
- 18) FITC 30 min
- 19) PBS schwenken+7 min
- 20) Hitzefixierung mit Mikrowelle 2,5-2,5-2,5-2,5min
- 21) PBS 7 min
- 22) Zweiter Primärer AK 60min
- 23) PBS schwenken+7 min
- 24) Sekundärer AK 30 min

- 25) PBS schwenken+7 min
- 26) FITC 30 min
- 27) PBS schwenken+7 min
- 28) Eindeckeln mit Vectashield (mit DAPI)

Zu 16)-19) : Wenn sekundärer Antikörper Chromogen-konjugiert direkt weiter von 17) zu 20) bzw. 22) .Wenn sekundärer Antikörper biotinyliert ist, weiter zu 18).

Zu 24)-27): Nach gleichem Prinzip, wie in 16)-19) erklärt, verfahren

Alle Inkubationen und Waschschritte müssen im Dunkeln erfolgen →Lichtdichte Behälter verwenden!

Zu 20): Wird nur bei erwarteter Kreuzreaktion prophylaktisch oder bei nachgewiesener Kreuzreaktion eingesetzt.

Materialien für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Primärantikörper

1. **Anti-Human-CD3**; Ratten-IgG₁, Klon CD3-12;
Katalog-Nr.: MCA 1477,
AbD Serotec,
Lena-Christ-Strasse 48 ,
82152 Planegg/Martinsried, Deutschland
2. **Anti-Human-CXCR3**; Maus-IgG_{1,κ}, Klon 1C6/CXCR3;
Katalog-Nr.: 557183,
BD Biosciences Pharmingen
Tullastrasse 8-16
9126 Heidelberg, Deutschland
3. **Anti-Human-α2-Kollagen IV**; Ratten-IgG_{2a}, Klon H22
Shigei Medical Research Institute
2117 Yamada,
Okayama 701-0202, Japan
4. **Anti-Human-α3-Kollagen IV**; Ratten-IgG_{2a}, Klon H31
Shigei Medical Research Institute
2117 Yamada,
Okayama 701-0202, Japan
5. **Anti-Human-α5-Kollagen IV**; Ratten-IgG_{2a}, Klon H53
Shigei Medical Research Institute
2117 Yamada,
Okayama 701-0202, Japan
6. **Anti-Human-CD68**; Maus-IgG_{3,κ} Klon PG-M1
Katalog-Nr.: M0876
Dako Deutschland GmbH
Neue Flora
Stresemannstraße 161
22769 Hamburg, Deutschland

Sekundärantikörper

1. **Biotinyliertes Anti-Ratten-IgG (H+L)**;
Katalog-Nr.: BA-4000
Vector Laboratories, Inc.
30 Ingold Road,
Burlingame, CA 94010 U.S.A

- 2. Biotinyliertes Anti-Maus-IgG (H+L);**
Katalog-Nr.: BA-9200
Vector Laboratories, Inc.
30 Ingold Road,
Burlingame, CA 94010 U.S.A
- 3. Biotinyliertes Anti-Maus-IgG₁**
Katalog-Nr.:
Hersteller
Adresse
Stadt, Land
- 4. Cy3-konjugiertes Anti-Maus-IgG**
Katalog-Nr.:
Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc
P.O. Box 9
872 West Baltimore Pike
West Grove, PA 19390 U.S.A
- 5. Cy3-konjugiertes Anti-Ratten-IgG**
Katalog-Nr.:
Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc
P.O. Box 9
872 West Baltimore Pike
West Grove, PA 19390 U.S.A
- 6. Streptavidin-konjugiertes FITC**
Katalog-Nr.: SA-5001
Vector Laboratories, Inc.
30 Ingold Road,
Burlingame, CA 94010 U.S.A

Isotypkontrollen

- 1. Maus-IgG1k-Isotyp; Klon MOPC 21**
Katalog-Nr.: M9269-1MG
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland
- 2. Ratten-IgG_{2A}-Isotyp; Klon 54447**
Katalog-Nr.: MAB006
R&D Systems Inc.
614 McKinley Place NE
Minneapolis, MN 55413, U.S.A.

3. Maus-IgG₃-Isotyp

Katalog-Nr.: sc-3880
Santa Cruz Biotechnology Inc.
Bergheimerstrasse 89-2
69115 Heidelberg, Deutschland

Geräte und Werkzeuge

1. Melag Autoklav Typ 23 Sterilisator

Melag oHG Medizintechnik
Geneststrasse 9-10
10829 Berlin

2. Mikrowelle MCD 1825 Duo

Bauknecht Hausgeräte GmbH
Industriestrasse 48
70565 Stuttgart, Deutschland

3. Wasserbad Thermomix BM-P

Braun Biotech International GmbH
Schwarzenberger Weg 73-79
34202 Melsungen

Braun Biotech international GmbH wurde im Jahr 2000 von der **Sartorius AG** aquiriert.

Sartorius AG
Weender Landstrasse 94-108
37075 Göttingen, Deutschland

4. Pipette Research plus 0,5-10µl

Katalog-Nr. : 3120 000.020
Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Peter-Heinlein-Str. 2
50389 Wesselin-Berzdorf

5. Pipette Research plus 10-100µl

Katalog-Nr. : 3120 000.046
Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Peter-Heinlein-Str. 2
50389 Wesselin-Berzdorf

6. Pipette Research plus 100-1000µl

Katalog-Nr.: 3120 000.062
Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Peter-Heinlein-Str. 2
50389 Wesselin-Berzdorf

7. Eppendorf-Reaktionsgefäß safeseal 2,0ml

Katalog-Nr.: 72.695
Sarstedt AG & Co
Rommelsdorfer Strasse
51582 Nürnberg, Deutschland

8. Superfrost® Plus Objektträger

Katalog-Nr.: J1800AMNZ
Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG
Saarbrückenerstrasse 248
38116 Braunschweig, Deutschland

9. Deckgläser 24x50mm

Katalog-Nr.: BB024050A1
Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG
Saarbrückenerstrasse 248
38116 Braunschweig, Deutschland

Medien und Reagenzien

1. NaCl (für PBS und Tris)

Katalog-Nr.: 71381
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland

2. Na₂HPO₄ (für PBS)

Katalog-Nr.: S5136
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland

3. KH₂PO₄ (für PBS)

Katalog-Nr.: P5655
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland

4. TRIS

Katalog-Nr.: 200923
Biosolve b.v.
Leenderweg 78
5555 CE Valkenswaard, Niederlande

5. Fluka Skim Milk Powder for Microbiology

Katalog-Nr.: 70166
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland

6. DAB

Katalog-Nr.: D8001
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland

7. $NiCl_2$

Katalog-Nr.: N6136
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland

8. Ethanol 70%

Wird aus 140ml Ethanol absolut und 60ml Aqua dest. selbst gemischt.

9. Ethanol 96%

Katalog-Nr.: 16368
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland

10. Ethanol absolut

Katalog-Nr.: 15727
Sigma-Aldrich Co.
Eschenstrasse 5
82024 Taufkirchen, Deutschland

11. Methanol pro analysi

Katalog-Nr.: 1069002500
Merck KGaA
Frankfurterstrasse 250
64293 Darmstadt, Deutschland

12. Shandon Xylene Substitutue

Katalog-Nr.: 9990505
Thermo Fisher Scientific
81 Wyman Street
Waltham
MA 02454 USA

13. Vectamount Permanent Mounting Medium

Katalog-Nr.: H-500
Vector Laboratories, Inc.
30 Ingold Road,
Burlingame, CA 94010 U.S.A

14. Vectashield HardSet Mounting Medium with DAPI

Katalog-Nr.: H-1500
Vector Laboratories, Inc.
30 Ingold Road,
Burlingame, CA 94010 U.S.A

15. Avidin/Biotin-Blocking-Kit

Katalog-Nr.: SP-2001
Vector Laboratories, Inc.
30 Ingold Road,
Burlingame, CA 94010 U.S.A

16. ABC-Kit

Katalog-Nr.: PK-4000
Vector Laboratories, Inc.
30 Ingold Road,
Burlingame, CA 94010 U.S.A

17. Super Block

Katalog-Nr.: BP2224
ID Labs™ Inc.
Head Office
University Research Park
100 Collip Circle, Unit 117
London, ON, Canada
N6G 4X8

Software

1. Microsoft Office 2007 Home and Student

Microsoft Deutschland GmbH
Konrad-Zuse-Straße 1
85716 Unterschleißheim

2. GraphPad InStat v 3.05 for Windows

GraphPad Software, Inc.
2236 Avenida de la Playa
La Jolla, CA 92037, USA

Literaturquellen

Anmerkung: Die Zitate [3-5, 31] sind zitiert worden um den historisch korrekten Zusammenhang wiederzugeben. Die Arbeiten waren nicht erhältlich, bzw. Aufgrund von Sprachbarrieren nicht lesbar.

1. Cosgrove, D., et al., *Collagen COL4A3 knockout: a mouse model for autosomal Alport syndrome*. Genes Dev, 1996. **10**(23): p. 2981-92.
2. Alport, A., *Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis*. BR Med J, 1927. **1**(3454): p. 504-506.
3. Guthrie, "*Idiopathic" or congenital, hereditary and familial hematuria*. Lancet, 1902. **1**: p. 1243-1246.
4. Hurst, *Hereditary familial congenital haemorrhagic nephritis occurring in 16 individuals in three generations*. Guys Hosp Rec, 1923. **3**: p. 368-370.
5. Williamson, D.A., *Alport's syndrome of hereditary nephritis with deafness*. Lancet, 1961. **2**(7216): p. 1321-3.
6. Gross, O., *Hereditäre Erkrankungen der glomerulären Basalmembran*, in *Facharzt Nephrologie*, R. T., Editor. 2008, Elsevier: Tübingen, Karlsruhe. p. 725-741.
7. Gregory, M.C., et al., *Alport syndrome--clinical phenotypes, incidence, and pathology*. Contrib Nephrol, 1996. **117**: p. 1-28.
8. Gubler, M.C., *Inherited diseases of the glomerular basement membrane*. Nat Clin Pract Nephrol, 2008. **4**(1): p. 24-37.
9. Kashtan, C.E., *Alport Syndrome*, in *Textbook of Nephrology* Massry&Glassock, Editor. 1995, Williams&Wilkins. p. 869-873.
10. Heidet, L. and M.C. Gubler, *The renal lesions of Alport syndrome*. J Am Soc Nephrol, 2009. **20**(6): p. 1210-5.
11. Brenner, *Hereditary Nephritis including Alport syndrome*, in *Brenner & Rector's The Kidney*. 2000. p. 1396-1398.
12. Kashtan, C.E. and A.F. Michael, *Alport syndrome*. Kidney Int, 1996. **50**(5): p. 1445-63.
13. Kashtan, C.E., *Alport syndrome and thin glomerular basement membrane disease*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(9): p. 1736-50.
14. Pirson, Y., *Making the diagnosis of Alport's syndrome*. Kidney Int, 1999. **56**(2): p. 760-75.
15. Gross, O. and C.E. Kashtan, *Treatment of Alport syndrome: beyond animal models*. Kidney Int, 2009.
16. Gross, O., et al., *Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(7): p. 1218-27.
17. Kashtan, C.E., *Women with Alport syndrome: risks and rewards of kidney donation*. Nephrol Dial Transplant, 2009. **24**(5): p. 1369-70.
18. Pochet, J.M., et al., *Renal prognosis in Alport's and related syndromes: influence of the mode of inheritance*. Nephrol Dial Transplant, 1989. **4**(12): p. 1016-21.
19. Jais, J.P., et al., *X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a*

- "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol*, 2003. **14**(10): p. 2603-10.
20. Grunfeld, J.P., et al., *Renal prognosis in women with hereditary nephritis*. *Clin Nephrol*, 1985. **23**(6): p. 267-71.
 21. Hasstedt, S.J., C.L. Atkin, and A.C. San Juan, Jr., *Genetic heterogeneity among kindreds with Alport syndrome*. *Am J Hum Genet*, 1986. **38**(6): p. 940-53.
 22. Kashtan, C.E., *Alport syndromes: phenotypic heterogeneity of progressive hereditary nephritis*. *Pediatr Nephrol*, 2000. **14**(6): p. 502-12.
 23. Longo, I., et al., *COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome*. *Kidney Int*, 2002. **61**(6): p. 1947-56.
 24. Heidet, L., et al., *Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome*. *J Am Soc Nephrol*, 2001. **12**(1): p. 97-106.
 25. Longo, I., et al., *Autosomal recessive Alport syndrome: an in-depth clinical and molecular analysis of five families*. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. **21**(3): p. 665-71.
 26. Pescucci, C., et al., *Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene*. *Kidney Int*, 2004. **65**(5): p. 1598-603.
 27. Feingold, J., et al., *Genetic heterogeneity of Alport syndrome*. *Kidney Int*, 1985. **27**(4): p. 672-7.
 28. Colville, D.J. and J. Savige, *Alport syndrome. A review of the ocular manifestations*. *Ophthalmic Genet*, 1997. **18**(4): p. 161-73.
 29. van der Loop, F.T., et al., *Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation*. *Kidney Int*, 2000. **58**(5): p. 1870-5.
 30. Flinter, F.A., et al., *Genetics of classic Alport's syndrome*. *Lancet*, 1988. **2**(8618): p. 1005-7.
 31. Torres, G., *Leiomiomatosis del esophago, traqueo bronquial y genital asociada con nefropatia hereditaria tipo Alport: Un nuevo sindrome*. *Rev Gastroenterol Mex* 1983. **48**: p. 163-170.
 32. Wester, D.C., C.L. Atkin, and M.C. Gregory, *Alport syndrome: clinical update*. *J Am Acad Audiol*, 1995. **6**(1): p. 73-9.
 33. Jais, J.P., et al., *X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype- phenotype correlations in males*. *J Am Soc Nephrol*, 2000. **11**(4): p. 649-57.
 34. Gubler, M., et al., *Alport's syndrome. A report of 58 cases and a review of the literature*. *Am J Med*, 1981. **70**(3): p. 493-505.
 35. Arnott, E.J., M.D. Crawford, and P.J. Toghil, *Anterior lenticonus and Alport's syndrome*. *Br J Ophthalmol*, 1966. **50**(7): p. 390-403.
 36. Nielsen, C.E., *Lenticonus anterior and Alport's syndrome*. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 1978. **56**(4): p. 518-30.
 37. Vanderschueren, A., et al., *Ocular abnormalities in patients with Alport's syndrome*. *Nephrol Dial Transplant*, 1996. **11**(11): p. 2355-8.
 38. Anker, M.C., et al., *Alport syndrome with diffuse leiomyomatosis*. *Am J Med Genet A*, 2003. **119A**(3): p. 381-5.

39. Mothes, H., et al., *Alport syndrome associated with diffuse leiomyomatosis: COL4A5-COL4A6 deletion associated with a mild form of Alport nephropathy*. Nephrol Dial Transplant, 2002. **17**(1): p. 70-4.
40. Cochat, P., et al., *Diffuse leiomyomatosis in Alport syndrome*. J Pediatr, 1988. **113**(2): p. 339-43.
41. Vitelli, F., et al., *Identification and characterization of a highly conserved protein absent in the Alport syndrome (A), mental retardation (M), midface hypoplasia (M), and elliptocytosis (E) contiguous gene deletion syndrome (AMME)*. Genomics, 1999. **55**(3): p. 335-40.
42. Vitelli, F., et al., *Identification and characterization of mouse orthologs of the AMMECR1 and FAFL4 genes deleted in AMME syndrome: orthology of Xq22.3 and MmuXF1-F3*. Cytogenet Cell Genet, 2000. **88**(3-4): p. 259-63.
43. Pajari, H., et al., *Alport's syndrome in 78 patients: epidemiological and clinical study*. Acta Paediatr, 1996. **85**(11): p. 1300-6.
44. USRD. *ESRD Incidence & Prevalence*. 2007; Available from: http://www.usrds.org/2007/pdf/02_incid_prev_07.pdf.
45. Hudson, B.G., et al., *Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen*. N Engl J Med, 2003. **348**(25): p. 2543-56.
46. Khoshnoodi, J., V. Pedchenko, and B.G. Hudson, *Mammalian collagen IV*. Microsc Res Tech, 2008. **71**(5): p. 357-70.
47. Sugimoto, M., T. Oohashi, and Y. Ninomiya, *The genes COL4A5 and COL4A6, coding for basement membrane collagen chains alpha 5(IV) and alpha 6(IV), are located head-to-head in close proximity on human chromosome Xq22 and COL4A6 is transcribed from two alternative promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(24): p. 11679-83.
48. Sado, Y., et al., *Organization and expression of basement membrane collagen IV genes and their roles in human disorders*. J Biochem, 1998. **123**(5): p. 767-76.
49. Hudson, B.G., S.T. Reenders, and K. Tryggvason, *Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis*. J Biol Chem, 1993. **268**(35): p. 26033-6.
50. Jefferson, J.A., et al., *Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collagen alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4)*. Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(8): p. 1595-9.
51. Kashtan, C.E., Michael, A., Sibley R., Vernier R., *Hereditary Nephritis: Alport Syndrome and Thin Glomerular Basement Membrane Disease*, in *Renal Pathology* 1994, J.B. Lippincot Company. p. 1239-1258.
52. Antonovych, T.T., et al., *Hereditary nephritis. Early clinical, functional, and morphological studies*. Pediatr Res, 1969. **3**(6): p. 545-56.
53. White, R.H., et al., *The Alport nephropathy: clinicopathological correlations*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(7): p. 897-903.
54. Franco, M., et al., *Renal interstitial foam cells are macrophages*. Histopathology, 1992. **20**(2): p. 173-6.
55. Kurihara, I., et al., *Clinicopathological characteristics of interstitial foam cells in membranous nephropathy*. Kidney Int Suppl, 1999. **71**: p. S144-6.
56. Mazzucco, G., et al., *Ultrastructural and immunohistochemical findings in Alport's syndrome: a study of 108 patients from 97 Italian families with*

- particular emphasis on COL4A5 gene mutation correlations.* J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(6): p. 1023-31.
57. Haas, M., *Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis.* Arch Pathol Lab Med, 2009. **133**(2): p. 224-32.
 58. Nakanishi, K., et al., *Immunohistochemical study of alpha 1-5 chains of type IV collagen in hereditary nephritis.* Kidney Int, 1994. **46**(5): p. 1413-21.
 59. Naito, I., Y. Ninomiya, and S. Nomura, *Immunohistochemical diagnosis of Alport's syndrome in paraffin-embedded renal sections: antigen retrieval with autoclave heating.* Med Electron Microsc, 2003. **36**(1): p. 1-7.
 60. Kagawa, M., et al., *Epitope-defined monoclonal antibodies against type-IV collagen for diagnosis of Alport's syndrome.* Nephrol Dial Transplant, 1997. **12**(6): p. 1238-41.
 61. Segerer, S., J. Jedlicka, and R.P. Wuthrich, *Atypical Chemokine Receptors in Renal Inflammation.* Nephron Exp Nephrol, 2010. **115**(4): p. e89-e95.
 62. Lazennec, G. and A. Richmond, *Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation.* Trends Mol Med, 2010. **16**(3): p. 133-44.
 63. Baggiolini, M., *Chemokines and leukocyte traffic.* Nature, 1998. **392**(6676): p. 565-8.
 64. Segerer, S. and D. Schlondorff, *Role of chemokines for the localization of leukocyte subsets in the kidney.* Semin Nephrol, 2007. **27**(3): p. 260-74.
 65. Bacon, K., et al., *Chemokine/chemokine receptor nomenclature.* J Interferon Cytokine Res, 2002. **22**(10): p. 1067-8.
 66. Mackay, C.R., *Chemokines: what chemokine is that?* Curr Biol, 1997. **7**(6): p. R384-6.
 67. Murphy, P.M., *International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature.* Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 227-9.
 68. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors.* Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
 69. Fernandez, E.J. and E. Lolis, *Structure, function, and inhibition of chemokines.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 469-99.
 70. Murphy, K., *Janeway's Immunobiology.* 2008. p. 802-803.
 71. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 129-34.
 72. Haraldsen, G. and A. Rot, *Coy decoy with a new ploy: interceptor controls the levels of homeostatic chemokines.* Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1659-61.
 73. Rot, A., *Contribution of Duffy antigen to chemokine function.* Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(6): p. 687-94.
 74. Comerford, I., et al., *Regulation of chemotactic networks by 'atypical' receptors.* Bioessays, 2007. **29**(3): p. 237-47.
 75. Hadley, T.J. and S.C. Peiper, *From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen.* Blood, 1997. **89**(9): p. 3077-91.
 76. Weber, M., et al., *The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines.* Mol Biol Cell, 2004. **15**(5): p. 2492-508.

77. Comerford, I., et al., *The chemokine receptor CCX-CKR mediates effective scavenging of CCL19 in vitro*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1904-16.
78. Pruenster, M., et al., *The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 101-8.
79. Vielhauer, V., et al., *Efficient renal recruitment of macrophages and T cells in mice lacking the duffy antigen/receptor for chemokines*. Am J Pathol, 2009. **175**(1): p. 119-31.
80. Segerer, S., P.J. Nelson, and D. Schlondorff, *Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(1): p. 152-76.
81. Emery, P. and M. Salmon, *The immune response. 2. Systemic mediators of Entzündung*. Br J Hosp Med, 1991. **45**(3): p. 164-8.
82. Weber, C., et al., *Sequential regulation of alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrin avidity by CC chemokines in monocytes: implications for transendothelial chemotaxis*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 1063-73.
83. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
84. Weber, K.S., et al., *Differential immobilization and hierarchical involvement of chemokines in monocyte arrest and transmigration on inflamed endothelium in shear flow*. Eur J Immunol, 1999. **29**(2): p. 700-12.
85. Grone, H.J., et al., *Met-RANTES reduces vascular and tubular damage during acute renal transplant rejection: blocking monocyte arrest and recruitment*. FASEB J, 1999. **13**(11): p. 1371-83.
86. Weber, C. and T.A. Springer, *Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration*. J Immunol, 1998. **161**(12): p. 6825-34.
87. Brady, H.R., *Leukocyte adhesion molecules and kidney diseases*. Kidney Int, 1994. **45**(5): p. 1285-300.
88. Thelen, M. and J.V. Stein, *How chemokines invite leukocytes to dance*. Nat Immunol, 2008. **9**(9): p. 953-9.
89. Weber, C. and R.R. Koenen, *Fine-tuning leukocyte responses: towards a chemokine 'interactome'*. Trends Immunol, 2006. **27**(6): p. 268-73.
90. Binder, N.B., et al., *Estrogen-dependent and C-C chemokine receptor-2-dependent pathways determine osteoclast behavior in osteoporosis*. Nat Med, 2009. **15**(4): p. 417-24.
91. Chavey, C., et al., *CXC ligand 5 is an adipose-tissue derived factor that links obesity to insulin resistance*. Cell Metab, 2009. **9**(4): p. 339-49.
92. Pitchford, S.C., et al., *Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(1): p. 62-72.
93. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
94. Acosta, J.C., et al., *Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1006-18.
95. Ben-Baruch, A., *Organ selectivity in metastasis: regulation by chemokines and their receptors*. Clin Exp Metastasis, 2008. **25**(4): p. 345-56.

96. Volin, M.V., et al., *Fractalkine: a novel angiogenic chemokine in rheumatoid arthritis*. Am J Pathol, 2001. **159**(4): p. 1521-30.
97. Volin, M.V., et al., *Chemokine receptor CXCR4 expression in endothelium*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **242**(1): p. 46-53.
98. Strieter, R.M., et al., *The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis*. Shock, 1995. **4**(3): p. 155-60.
99. Luster, A.D., *The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(1): p. 129-35.
100. Mack, M., et al., *Aminoxy-pentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1215-24.
101. Forster, R., et al., *A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen*. Cell, 1996. **87**(6): p. 1037-47.
102. Jenh, C.H., et al., *Human B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1; CXCL13) is an agonist for the human CXCR3 receptor*. Cytokine, 2001. **15**(3): p. 113-21.
103. Romagnani, P., et al., *CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production*. J Allergy Clin Immunol, 2005. **116**(6): p. 1372-9.
104. Wijtmans, M., et al., *Towards small-molecule CXCR3 ligands with clinical potential*. ChemMedChem, 2008. **3**(6): p. 861-72.
105. Clark-Lewis, I., et al., *Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 289-95.
106. Janatpour, M.J., et al., *Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment*. J Exp Med, 2001. **194**(9): p. 1375-84.
107. Segerer, S., et al., *CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis*. Am J Pathol, 2004. **164**(2): p. 635-49.
108. Segerer, S., et al., *Role of CXCR3 in cellular but not humoral renal allograft rejection*. Transpl Int, 2005. **18**(6): p. 676-80.
109. Chen, S.C., et al., *Expression of chemokine receptor CXCR3 by lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells in human psoriatic lesions*. Arch Dermatol Res, 2010. **302**(2): p. 113-23.
110. Balashov, K.E., et al., *CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6873-8.
111. Agostini, C., et al., *Involvement of the IP-10 chemokine in sarcoid granulomatous reactions*. J Immunol, 1998. **161**(11): p. 6413-20.
112. Mohan, K. and T.B. Issekutz, *Blockade of chemokine receptor CXCR3 inhibits T cell recruitment to inflamed joints and decreases the severity of adjuvant arthritis*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8463-9.
113. Singh, U.P., et al., *CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication*. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2007. **7**(2): p. 111-23.

114. Oo, Y.H., et al., *Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 2886-98.
115. Agostini, C., et al., *Cxcr3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection*. Am J Pathol, 2001. **158**(5): p. 1703-11.
116. Melter, M., et al., *Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection*. Circulation, 2001. **104**(21): p. 2558-64.
117. Segerer, S., et al., *Expression of the fractalkine receptor (CX3CR1) in human kidney diseases*. Kidney Int, 2002. **62**(2): p. 488-95.
118. Georgopoulos, K., D. Galson, and C. Terhorst, *Tissue-specific nuclear factors mediate expression of the CD3 delta gene during T cell development*. EMBO J, 1990. **9**(1): p. 109-15.
119. Loetscher, M., et al., *Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 963-9.
120. Holness, C.L. and D.L. Simmons, *Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins*. Blood, 1993. **81**(6): p. 1607-13.
121. Sado, Y., et al., *Establishment by the rat lymph node method of epitope-defined monoclonal antibodies recognizing the six different alpha chains of human type IV collagen*. Histochem Cell Biol, 1995. **104**(4): p. 267-75.
122. Joshi, V.V., *Pathology of hereditary nephritis*. J Clin Pathol, 1968. **21**(6): p. 744-7.
123. Krickstein, H.I., F.J. Gloor, and K. Balogh, Jr., *Renal pathology in hereditary nephritis with nerve deafness*. Arch Pathol, 1966. **82**(6): p. 506-17.
124. Goldbloom, R.B., et al., *Hereditary renal disease associated with nerve deafness and ocular lesions*. Pediatrics, 1957. **20**(2): p. 241-52.
125. Perkoff, G.T., et al., *A clinical study of hereditary interstitial pyelonephritis*. AMA Arch Intern Med, 1951. **88**(2): p. 191-200.
126. Whalen, R.E., et al., *Hereditary nephropathy, deafness and renal foam cells*. Am J Med, 1961. **31**: p. 171-86.
127. Lebleu, V.S., et al., *Lymphocytes are dispensable for glomerulonephritis but required for renal interstitial fibrosis in matrix defect-induced Alport renal disease*. Lab Invest, 2008. **88**(3): p. 284-92.
128. Noel, L.H., *Renal pathology and ultrastructural findings in Alport's syndrome*. Ren Fail, 2000. **22**(6): p. 751-8.
129. Kashtan, C.E. and A.F. Michael, *Alport syndrome: from bedside to genome to bedside*. Am J Kidney Dis, 1993. **22**(5): p. 627-40.
130. Bohle, A., et al., *The consequences of tubulo-interstitial changes for renal function in glomerulopathies. A morphometric and cytological analysis*. Pathol Res Pract, 1990. **186**(1): p. 135-44.
131. Sean Eardley, K. and P. Cockwell, *Macrophages and progressive tubulointerstitial disease*. Kidney Int, 2005. **68**(2): p. 437-55.
132. Eardley, K.S., et al., *The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease*. Kidney Int, 2006. **69**(7): p. 1189-97.

133. Fisher, G.J., et al., *Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin*. Am J Pathol, 2009. **174**(1): p. 101-14.
134. Rao, V.H., et al., *Role for macrophage metalloelastase in glomerular basement membrane damage associated with alport syndrome*. Am J Pathol, 2006. **169**(1): p. 32-46.
135. Martini, G., et al., *CXCR3/CXCL10 expression in the synovium of children with juvenile idiopathic arthritis*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(2): p. R241-9.
136. Callis, L., et al., *Long-term effects of cyclosporine A in Alport's syndrome*. Kidney Int, 1999. **55**(3): p. 1051-6.
137. Chen, D., et al., *Cyclosporine a slows the progressive renal disease of alport syndrome (X-linked hereditary nephritis): results from a canine model*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(3): p. 690-8.
138. Charbit, M., et al., *Cyclosporin therapy in patients with Alport syndrome*. Pediatr Nephrol, 2007. **22**(1): p. 57-63.
139. Rupperecht H., B.C., Mistry-Burchardi N., Fischereder M, Weidner s. , *Ciclosporin A*, in *Immunsuppression*. 2005, Elsevier. p. 16-19.
140. Ninichuk, V., et al., *Delayed chemokine receptor 1 blockade prolongs survival in collagen 4A3-deficient mice with Alport disease*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(4): p. 977-85.
141. Panzer, U., et al., *Chemokine receptor CXCR3 mediates T cell recruitment and tissue injury in nephrotoxic nephritis in mice*. J Am Soc Nephrol, 2007. **18**(7): p. 2071-84.
142. Steinmetz, O.M., et al., *CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis*. J Immunol, 2009. **183**(7): p. 4693-704.
143. Menke, J., et al., *CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(6): p. 1177-89.
144. Bastani, S., et al., *Chemokine receptor blockade with a synthetic nonpeptide compound attenuates cardiac allograft vasculopathy*. Transplantation, 2009. **88**(8): p. 995-1001.
145. Suzuki, Y., et al., *A small-molecule compound targeting CCR5 and CXCR3 prevents airway hyperresponsiveness and Entzündung*. Eur Respir J, 2008. **31**(4): p. 783-9.
146. Tokuyama, H., et al., *The simultaneous blockade of chemokine receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 by a non-peptide chemokine receptor antagonist protects mice from dextran sodium sulfate-mediated colitis*. Int Immunol, 2005. **17**(8): p. 1023-34.
147. Gross, O., et al., *Preemptive ramipril therapy delays renal failure and reduces renal fibrosis in COL4A3-knockout mice with Alport syndrome*. Kidney Int, 2003. **63**(2): p. 438-46.