

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reinecke

**Entzündliche Mechanismen der Glomerulosklerose und
sekundären interstitiellen Nierenschädigung: Rolle von
Tumornekrosefaktor**



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

vorgelegt von
Anne Mühe
aus Haßfurt

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Wolfgang Neuhofer
PD Dr. med. Michael Schmolke

Dekan: Prof. Dr. med.dent. Reinhard Hickel

Tag der mündliche Prüfung: 10.11.2016

Meiner Familie

Zusammenfassung

Eine chronische Entzündung des Glomerulus in Form von Glomerulonephritiden, aber auch eine direkte Schädigung von Podozyten resultiert in einem narbigen Umbau des Glomerulus. Anfangs betrifft der Schaden nur Teilbereiche einzelner Glomeruli, es entwickelt sich eine fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS). Bei Fortschreiten der Krankheit kommt es allmählich zu einer Verödung vieler Glomeruli mit einer sekundären Inflammation und Fibrosierung des Tubulointerstitiums. Die FSGS führt häufig zu einem nephrotischen Syndrom und letztlich zum Funktionsverlust der Niere bis hin zur dialysepflichtigen Niereninsuffizienz. Die Therapiemöglichkeiten sind stark limitiert und beruhen neben supportiven Therapiemaßnahmen auf Mechanismen der Immunsuppression. Dabei treten nicht selten schwerwiegenden Nebenwirkungen auf. Tumornekrosefaktor (TNF) ist ein klassisches proinflammatorisches Zytokin, welches eine wichtige pathophysiologische Rolle in vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen spielt. Eine Anti-TNF Therapie wird erfolgreich in Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Psoriasis eingesetzt. Dabei ist das Nebenwirkungsprofil der TNF-Blockade deutlich risikoärmer als das der „klassischen“ Immunsuppressiva.

Ob TNF eine pathophysiologische Rolle bei der FSGS spielt, wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Funktion von TNF im murinen Modell der Adriamycin (ADR)-induzierten FSGS charakterisiert. Weiterhin wurden Effekte einer medikamentösen TNF-Blockade mittels des TNFR2-IgG Fusionsproteins Etanercept untersucht.

Zunächst wurde untersucht, ob Adriamycin einen Effekt auf die TNF-Freisetzung von Glomeruli ex vivo und glomerulären Zellen in vitro hat. In Adriamycin-behan-

Zusammenfassung

delten Glomeruli und Zellen zeigte sich eine gesteigerte TNF-Sekretion. Diese wurde durch Etanercept fast auf Mediumniveau gesenkt, während eine Behandlung mit humanem IgG als Kontrolle zur Etanerceptgabe keinen Einfluss auf die TNF-Freisetzung hatte. Ob TNF zu einer vermehrten Chemokinexpression in Podozyten und Mesangialzellen führt, wurde ebenfalls untersucht. Dabei zeigte sich, dass TNF dosisabhängig die Chemokinexpression bis zu 30-fach erhöht. Etanercept-Behandlung reduzierte die Chemokinfreisetzung fast auf Mediumniveau. Diese Beobachtung führte zur Annahme, dass Adriamycin über TNF-Freisetzung zu einer erhöhten glomerulären Chemokinfreisetzung führt. Tatsächlich zeigte sich unter Adriamycin-Stimulation in Glomerula und Mesangialzellen eine deutlich gesteigerte Sekretion des proinflammatorischen Chemokins CCL2, aber kaum von CCL5. Eine zusätzliche TNF-blockierende Etanercept-Behandlung reduzierte die Adriamycin-induzierte CCL2 Sekretion. Podozyten zeigten unter Adriamycin kaum Chemokinfreisetzung, was auf die direkte Zytotoxizität von Adriamycin zurückzuführen sein könnte. Dies wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse der Apoptoserate von Podozyten und Mesangialzellen bestätigt.

Die durch Adriamycin-induzierbare, durch TNF-Blockade mittels Etanercept hemmbare Chemokinsekretion *in vitro* führt möglicherweise im Verlauf der FSGS auch *in vivo* zu glomerulären und sekundär interstitiellen Inflammation und Vernarbung, welche durch Etanercept-Gabe reduziert werden könnte. Diese Hypothese wurde in BALB/c Mäusen mit Adriamycin-Nephropathie untersucht, denen am Tag vor der Induktion, sowie jeden zweiten Tag für vier Wochen Etanercept (ADR + Eta) beziehungsweise humanes Kontroll-IgG (ADR + IgG) intraperitoneal verabreicht wurde. Zum Ausschluss eventueller Effekte des humanen IgG auf die Nierenfunktion, wurde eine Gruppe ohne Adriamycin, nur mit intraperitonealem humanen IgG behandelt (IgG Kontrolle). *In vivo* zeigte sich kein Effekt der TNF-Blockade. Weder strukturell, noch histomorphologisch oder immunologisch fand sich ein Unterschied zwischen Etanercept und IgG-behandelten Tieren mit Adriamycin-Nephropathie. Die nicht Adriamycin-behandelte IgG-Kontrollgruppe zeigte wie erwartet keine Auffälligkeiten. Zusammenfassend konnte somit in der vorliegenden Arbeit *in vitro* eine Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte glomeruläre Sekretion proinflammatorischer Chemokine nachgewiesen werden. Diese konnte durch Etanercept-Gabe reduziert werden. *In vivo* zeigte sich allerdings zwischen den TNF-blockierten und nicht TNF-blockierten Tieren kein Unterschied im Krankheitsverlauf.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vii
Abbildungsverzeichnis	xiii
1 Einleitung	1
1.1 Klinische Aspekte der chronischen Niereninsuffizienz	1
1.2 Physiologie des Glomerulus	2
1.3 Die glomeruläre Filtrationsbarriere	3
1.3.1 Fenestriertes Endothel und glomeruläre Basalmembran	5
1.3.2 Der Podozyt	5
1.3.3 Die Mesangialzelle	7
1.4 Pathophysiologie der Glomerulosklerose	8
1.5 Tumornekrosefaktor (TNF)	10
1.5.1 Wirkungsweise von TNF	11
1.5.2 Expression von TNF und TNF-Rezeptoren in der Niere	14
1.6 Anti-TNF Therapie	15
1.7 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Puffer	23
2.1.4 Lösungen	24

Inhaltsverzeichnis

2.1.5	Materialien und Stimulantien für die Zellkultur	24
2.1.6	Reagenziensätze	25
2.1.7	Antikörper	26
2.1.8	Primer für die real-time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) . .	26
2.1.9	Zelllinien	27
2.1.10	Versuchsmäuse	27
2.2	Zellkultur	28
2.2.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	28
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	28
2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
2.2.4	Gewinnung und Kultivierung primärer Glomerula	29
2.2.5	Podozytenkultur	31
2.2.6	Mesangialzellkultur	33
2.2.7	Stimulationsexperimente	33
2.2.8	Apoptosefärbung	35
2.3	Tierexperimente	35
2.3.1	Tierhaltung	35
2.3.2	Adriamycin-induzierte fokal segmentale Glomerulosklerose . .	36
2.4	Immunologische Methoden	37
2.4.1	Enzym linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
2.4.2	Durchflusszytometrie	38
2.5	Molekularbiologische Methoden	41
2.5.1	RNA-Isolierung	41
2.5.2	Bestimmung des RNA-Gehalts	42
2.5.3	cDNA Synthese	42
2.5.4	Quantitative real-time PCR	42
2.6	Histologische Untersuchungen	44
2.7	Statistik	44
3	Ergebnisse	47
3.1	Effekt von Adriamycin auf die TNF-Sekretion von Glomerula und Nierenzellen in vitro	48
3.2	TNF-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro . . .	53

3.3	Adriamycin-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro	54
3.4	Toxizität von Adriamycin auf Podozyten und Mesangialzellen	65
3.5	Effekt von Etanercept auf die Adriamycin-Nephropathie	69
3.5.1	Gewichtsverlauf	69
3.5.2	Proteinurie	70
3.5.3	Serumchemie	71
3.5.4	Histologische Auswertung	73
3.5.5	Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltration mittels Durchflusszytometrie	76
3.5.6	Expression renaler Entzündungsmediatoren	78
4	Diskussion	81
4.1	Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse	81
4.2	Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	82
4.2.1	Effekte von Adriamycin und TNF auf Nierenzellen in vitro	82
4.2.2	Bedeutung der TNF-Blockade mit Etanercept auf die Adriamycin-Nephropathie in vivo	85
	Abkürzungsverzeichnis	91
	Literaturverzeichnis	93
	Eidesstattliche Versicherung	109

Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau des Glomerulus	3
1.2	Histologischer Schnitt durch einen Glomerulus	4
1.3	Podozyten	7
1.4	Molekularstruktur von TNF und TNF-Rezeptor 1	12
2.1	FACS Analyse	39
3.1	TNF-Sekretion in Glomerula nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin	48
3.2	TNF-Sekretion in Glomerula nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin	49
3.3	TNF-Sekretion in Podozyten und Mesangialzellen nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin	51
3.4	TNF-Sekretion in Podozyten und Mesangialzellen nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin	52
3.5	TNF-induzierte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Podozy- ten und Mesangialzellen	55
3.6	Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Glomerula nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin .	57
3.7	Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Glomerula nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin . .	59
3.8	Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Podozyten nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin .	60
3.9	Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Podozyten nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin . .	61

Abbildungsverzeichnis

3.10	Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Mesangialzellen nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin	63
3.11	Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Mesangialzellen nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin	64
3.12	Bestimmung apoptotischer Podozyten bzw. Mesangialzellen nach Adriamycin-Stimulation mit 0,3 µg/ml	66
3.13	Bestimmung apoptotischer Podozyten bzw. Mesangialzellen nach Adriamycin-Stimulation mit 3 µg/ml	67
3.14	Gewichtsverlauf	70
3.15	Proteinurie	71
3.16	Serumchemie	72
3.17	Gewebeschaden und renale Leukozyteninfiltration der Adriamycin-Nephropathie	74
3.18	Quantifizierung von Geweschaden und renaler Leukozyteninfiltrate der Adriamycin-Nephropathie	75
3.19	Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltration	77
3.20	Expression renaler Entzündungsmediatoren in Kontroll- und Adriamycin-Nephropathie Gruppe mit Etanercept- und Kontroll-IgG- Behandlung	80

Einleitung

1.1 Klinische Aspekte der chronischen Niereninsuffizienz

In Deutschland werden laut dem aktuellsten QuaSi-Niere Bericht von 2006/2007 mehr als 90.000 Patienten mit einer Nierenersatztherapie in Form von Dialyse behandelt. Retrospektive Analysen von 1995 bis 2006 ergaben einen jährlichen Anstieg der dauerhaft dialysepflichtigen Patienten mit einer Inzidenz auf 5,1% als auch der Prävalenz auf 4,4% [1]. Nicht nur in Westeuropa steigen die Inzidenz und Prävalenz von chronischem Nierenversagen. In Nordamerika kam es zwischen 1992 und 2006 zu einer Steigerung der Inzidenz um fast 100% [2].

Dabei ist in 5-20% aller Fälle terminalen Nierenversagens eine chronische Glomerulosklerose die Ursache [3]. Glomerulosklerose als Folge von Glomerulonephritiden ist hinter der diabetischen Nephropathie (35%) und der hypertensiven Nephropathie (25%) die dritthäufigste Ursache für eine terminale Niereninsuffizienz mit fast 15%. Da die Patienten häufig erst dann symptomatisch werden, wenn sich eine chronische Niereninsuffizienz entwickelt hat sind die Therapiemöglichkeiten limitiert. Durch immunsuppressive Therapien kann zum Teil eine Besserung erzielt werden. Dabei sind starke Nebenwirkungen wie Infektionen, Infertilität, Tumorinduktion, sowie die allmähliche Progression der Erkrankung häufig nicht vermeidbar. Bei Er-

1 Einleitung

reichen einer terminalen Niereninsuffizienz ist neben Dialyse eine Nierentransplantation als Therapieoption potentiell geeignet. Dabei kommt es einerseits häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikation wie Toxizität auf Hämatopoese und Organe, andererseits gibt es nur für ein Drittel der Patienten Spenderorgane [4]. In näherer Zeit wird sich an diesem Organmangel nichts ändern, weshalb nach neuen Therapiemöglichkeiten zur Prävention oder zumindest Progressionsverlangsamung der chronischen Niereninsuffizienz geforscht werden muss.

1.2 Physiologie des Glomerulus

Der Mensch besitzt zwei Nieren mit je circa einer Million Nephrone. Ein Nephron ist die funktionelle Einheit der Niere, bestehend aus einem Glomerulum und den dazugehörigen Tubuli. Jedes Glomerulum besteht aus einem zuführenden Gefäß (Vas afferens) und einem ableitenden Gefäß (Vas efferens). Das Vas afferens bildet im Glomerulum ein dichtes Kapillarknäul mit vielen Schlingen. Dieses Knäul ist von der Bowmanschen Kapsel umgeben. Die Bowmansche Kapsel ist von parietalen Epithelzellen ausgekleidet und geht normalerweise direkt gegenüber des Gefäßhilus in den proximalen Tubulus über. Zwischen den Kapillarschlingen liegen Mesangialzellen und geben denselben, aber auch dem gesamten Glomerulus strukturelle Integrität und Stabilität. Die Kapillaren sind auf ihrer Innenseite mit gefenstertem Endothel ausgekleidet. Dieses Endothel liegt einer Basalmembran, der sogenannten glomerulären Basalmembran (GBM) auf. Auf der Außenseite, der Urinseite der GBM liegen viszerale Epithelzellen, auch Podozyten genannt. Sie bilden das Widerlager für die GBM und bilden zwischen ihren interdigitierenden Fortsätzen die Schlitzmembran aus. Fenestriertes Endothel, GBM und Podozyten mit Schlitzmembran bilden die glomeruläre Filtrationsbarriere zwischen Blut und Bowmanscher Kapselraum (Abbildung 1.1). Das Ultrafiltrat, der sogenannte Primärharn wird vom Bowmanschen Raum direkt in die proximalen Tubuli weitergeleitet. Die dort lokalisierten Tubulusepithelzellen bilden an der Luminalseite den Bürstensaum, bestehend aus vielen Mikrovilli. Dieser dient der Rückresorption vor allem von Proteinen, Elektrolyten und Wasser. Weiterhin besteht der Tubulus aus dem auf- und absteigenden Teil der Henleschen Schleife, dem distalen Tubulus und den Sammelrohren. Aus den Sammelrohren fließt der Urin

dann in die Nierenkelche die in dem Nierenbecken münden. Von dort aus gelangt der Urin über die Harnleiter in die Harnblase und wird letztlich ausgeschieden [5].

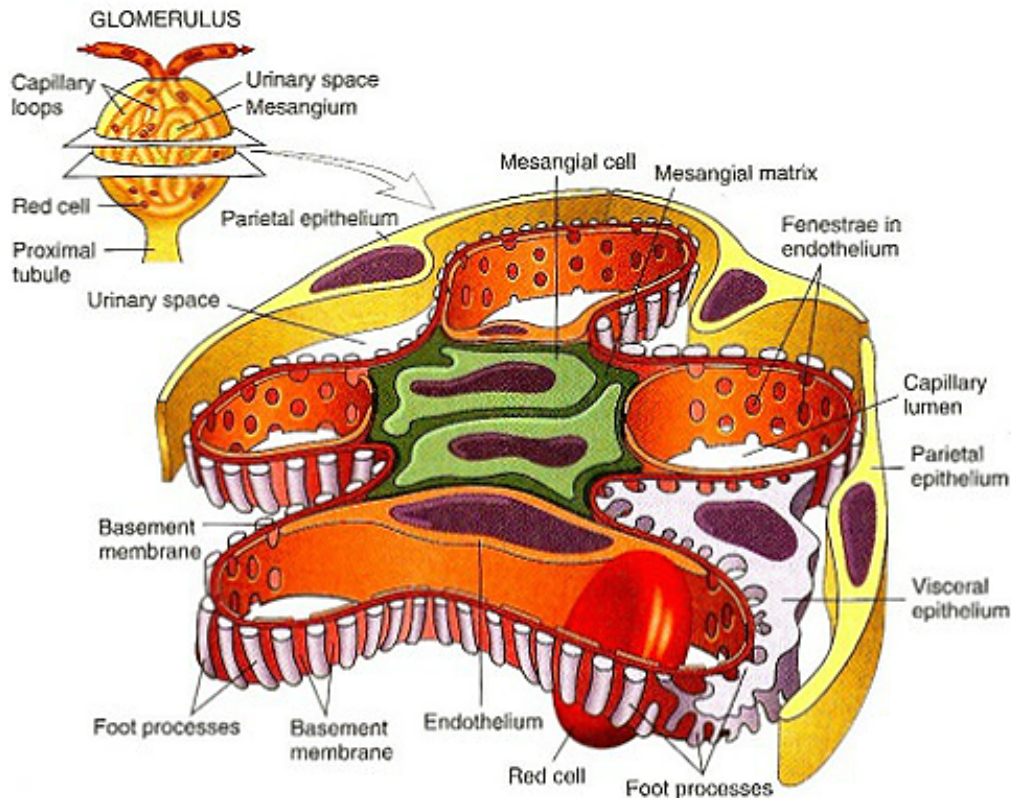


Abbildung 1.1: Aufbau des Glomerulus: Dargestellt ist der Querschnitt durch einen Glomerulus. In der Mitte liegen die Mesangialzellen (hellgrün), sowie die mesangiale Matrix (dunkelgrün). Um die Mesangialzellen liegen Kapillaren, in denen schematisch ein Erythrozyt dargestellt ist. Auf der Innenseite der Kapillaren ist das fenestrierte Endothel dargestellt, welches der glomerulären Basalmembran (dunkelrot) aufliegt. Die Fußfortsätze der Podozyten (hellgrau) liegen an der Außenseite der Kapillaren, auf der Urinseite des Glomerulus. Diese wird durch die parietalen Epithelzellen begrenzt (gelb) [6].

1.3 Die glomeruläre Filtrationsbarriere

Die Niere filtert täglich rund 180 Liter Plasma, das circa sieben Kilogramm Albumin enthält. Mehr als 99,9% des Albumins werden durch die glomeruläre Filtrationsbarriere zurückgehalten, ein kleinerer filtrierter Anteil im proximalen Tubulus

1 Einleitung

rückresorbiert. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist dabei von der ausreichenden glomerulären Perfusion, dem Filtrationsdruck und der glomerulären Filtrationsbarriere abhängig. Jede Komponente der Filtrationsbarriere - das fenestrierte Endothel auf der inneren Blutseite, die glomeruläre Basalmembran und die Podozyten auf der Urinseite der Glomerula - trägt einen Teil zur Permeabilitätsselektivität bei und ist für die Gesamtfunktion der Filtrationsbarriere wichtig (Abbildung 1.2). Schon der alleinige Ausfall einer Komponente führt zu Proteinurie, häufig zu einem nephrotischen Syndrom [7].

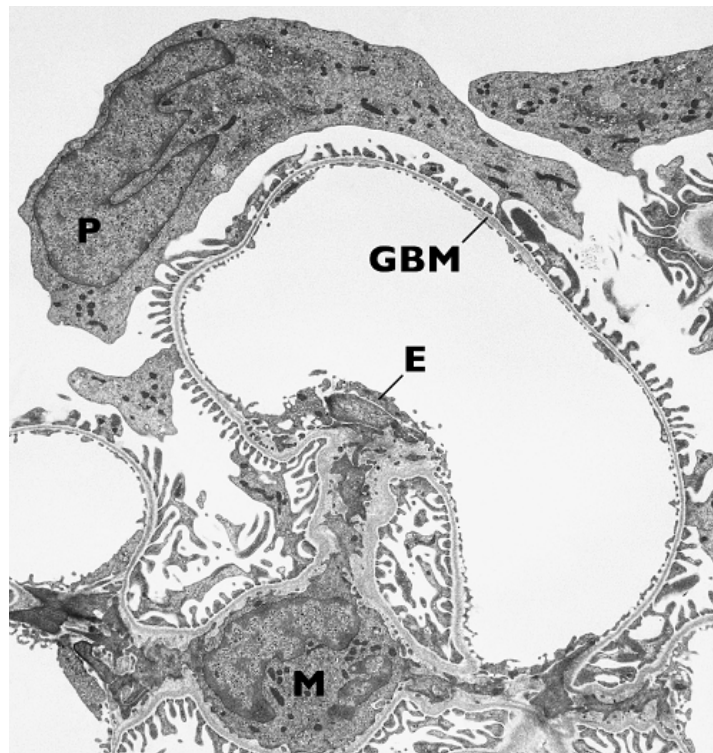


Abbildung 1.2: Histologischer Schnitt durch einen Glomerulus: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme. Glomeruluskapillare mit Mesangium (M), glomerulärer Basalmembran (GBM), Porendothel (E) und Podozyten (P). Der Podozyt liegt frei in der Urinseite und ist nur durch seine Fußfortsätze mit der GBM verbunden [8].

1.3.1 Fenestriertes Endothel und glomeruläre Basalmembran

Die glomerulären Endothelzellen haben eine Vielzahl von Zwischenräumen, die Fenestrae. Diese sind im Durchmesser circa 50-100 nm groß und besitzen keine Membran [5]. Weiterhin reagieren die Endothelzellen mit den von Podozyten sezernierten vascular endothelial growth factor-A und scheinen so eine wichtige Rolle für die Integrität der glomerulären Filtrationsbarriere zu spielen [9].

Die glomeruläre Basalmembran muss einerseits fest und robust wegen des auf sie wirkenden Drucks sein, gleichzeitig aber eine geringe Dicke von circa 350 nm haben. Weiterhin ist eine hohe Permselectivität in Bezug auf die zu filternden Stoffe nötig. Der Aufbau aus speziellen Typ IV Kollagen-Trimeren, nämlich je einer Kette von alpha-3, alpha-4 und alpha-5 Kollagen wird diesen Anforderungen gerecht [10]. Weitere Komponenten wie Laminin, Proteoglykane wie Heparansulfat, Entaktin und Fibronectin führen zu der typisch negativen Ladung der GBM. Gleichfalls sind die Oberflächen der Epithel- und Endothelzellen durch Sialoglykoproteine anionisch geladen. Dadurch kommt es zu einer Ladungselektivität, die den Durchtritt von anionischen Serumproteinen in den Primärharn verhindert und somit wesentlich die Selektivität der glomerulären Funktionsbarriere bestimmt [11].

1.3.2 Der Podozyt

Podozyten sind hochdifferenzierte, polarisierte viszerale Epithelzellen. In ihrem Aufbau ähneln sie Nervenzellen, denn sie besitzen einen großen Zellkörper sowie mehrere Verlängerungen, die sogenannten Primärfortsätze. Diese haben ihrerseits Aufzweigungen, die sekundären Fußfortsätze. Über die Fußfortsätze sind Podozyten durch Integrine und Dystroglykane mit der GBM verbunden, der Zellkörper selbst liegt frei in der Urinseite der Bowmanschen Kapsel und hat keinen direkten Kontakt zur GBM. Das Zytoskelett der Podozyten und der Primärfortsätze besteht aus Actin, zusätzlich enthalten die Primärfortsätze viele Mikrotubuli aus Vimentin. Das Actinnetz der Fußfortsätze ist durch α -Actinin und Synaptopodin spezifisch vernetzt. Die Fußfortsätze benachbarter Podozyten greifen an der Außenseite der glomerulären Kapillarschlinge reißverschlussartig ineinander und bilden feste Verbindungen, die sogenannte Schlitzmembran aus (Abbildung 1.3). Sie liegt über kleinsten mäanderförmigen

1 Einleitung

Schlitzten zwischen den Podozyten und der GBM. Zur Integrität der Schlitzmembran tragen spezielle Bindestellen bei, die strukturell von Proteinen wie Nephrin und CD2-assoziiertem Protein (CD2AP) gebildet werden [8]. Podozyten erfüllen verschiedenste Rollen im Glomerulum. Während der Ontogenese bilden Sie die glomeruläre Basalmembran und sezernieren auch später extrazelluläre Matrixkomponenten für deren Struktur. Gemeinsam mit den Mesangialzellen stützen Podozyten die aufgezweigte Kapillarstruktur und bilden ein Widerlager gegen den intrakapillären Druck. Eine weitere wichtige Aufgabe ist die Rolle als Bestandteil des glomerulären Filters für Makromoleküle wie Plasmaproteine. Da Podozyten ausdifferenzierte Zellen sind, können sie sich nicht durch Zellteilung regenerieren. Das ist der Grund, weshalb Podozytenverlust durch Nekrose oder Apoptose einer der Hauptgründe für die Entwicklung einer vernarbenden Glomerulosklerose ist [12]. Neben dem absoluten Verlust von Podozyten spielt eine Vergrößerung des Glomerulus bei Adipositas, Diabetes mellitus oder endokrinen Ursachen eine Rolle [13]. Hierbei ist der Podozyt relativ zur Oberfläche zu klein, er kann nicht mehr durch Zellhypertrophie die gesamte glomeruläre Basalmembran bedecken und die „nackten“ Oberflächen verkleben leichter mit den parietalen Epithelzellen der Bowmanschen Kapsel. Podozytenalterationen gehen fast immer mit Proteinurie als Folge der Filtrationsbarriereschädigung einher. Proteinurie an sich schädigt den Podozyten in einer krankheitsprogressiven Art. Genauer über den Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Sicher ist, dass der Podozyt einerseits durch proinflammatorische Stimuli wie Zytokine aktiviert, andererseits ein geschädigter Podozyt selbst eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen ausschütten kann. So wurde bei der IgA-Nephritis nachgewiesen, dass Podozyten nach Stimulation massiv Tumornekrosefaktor (TNF) sezernieren und an der Krankheitsprogression beteiligt sind [14]. Auch in anderen Nierenerkrankungen wie der membranösen Glomerulonephritis oder bei der Transplantatabstoßung spielen von Podozyten sezernierte Zytokine, speziell TNF eine wichtige Rolle [15][16]. Die spezifische Rolle von systemischem oder podozytärem TNF bei der Glomerulosklerose wurde noch nicht untersucht.

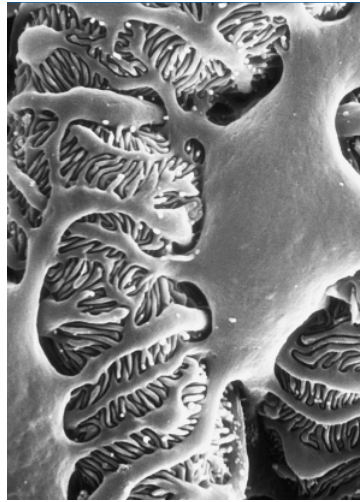


Abbildung 1.3: Podozyten: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme. Podozyten auf der Außenseite der Glomeruluskapillare. Von den Podozytenkörpern entspringen die Primärfortsätze, die sich in die fingerförmigen Fußfortsätze aufspalten. Besonders gut lässt sich hierbei die reissverschlussähnliche Verbindung der Fußfortsätze erkennen. Zwischen den Fußfortsätzen liegen die Filtrationsschlitze [8].

1.3.3 Die Mesangialzelle

Mesangialzellen und die sie umgebende extrazelluläre Matrix bilden zusammen das Mesangium. Dieses liegt in der Mitte des Gefäßknäuls der Kapillarschlingen im Glomerulus (Abbildung 1.1). Morphologisch zeichnen sich Mesangialzellen vor allem durch ihren spindelförmigen Aufbau und ihr unregelmäßiges Zytoplasma aus. Neben den normalen Zellbestandteilen wie Golgi-Apparat, Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum lassen sich im Elektronenmikroskop ähnlich wie bei glatten Muskelzellen kontraktile Elemente wie Myosin und Aktinomyosinfilamente erkennen. Um die Mesangialzellen herum liegt ein dichtes Netzwerk aus Fibronectin und Kollagen, die sogenannte mesangiale Matrix, welches Mesangialzellen selbst sezernieren. Diese Ultrastruktur ermöglicht den Mesangialzellen, mechanische Zugkraft auf die glomeruläre Basalmembran auszuüben und darüber Einfluss auf die Filtration zu nehmen. Andererseits hat die enge Nachbarschaft der Mesangialzellen zur GBM bei mesangialer Expansion durch Entzündung oder Ablagerung die Folge, dass die glomeruläre Filtration direkt beeinträchtigt wird. Neben ihrer Funktion für die Integrität des Glomerulus besitzen Mesangialzellen zahlreiche sekretorische Eigen-

1 Einleitung

schaften für Enzyme wie Proteinase oder Plasminogen Aktivator und ebenfalls für Zytokine wie Interleukin-1 (IL1) und TNF. Außer endokrinen und kontraktile Funktionen besitzen Mesangialzellen die Eigenschaft der Phagozytose. Dadurch können sie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren, welche Schäden an der GBM verursachen [17]. Über „Cross talk“ stehen sie unter anderem mit den Podozyten in enger Verbindung und tragen bei verschiedenen Glomerulopathien durch TNF-Sekretion zur inflammatorischen Aktivierung der Podozyten bei [14].

1.4 Pathophysiologie der Glomerulosklerose

Die Glomerulosklerose ist keine eigenständige Krankheit, sondern vielmehr ein histologisches Schädigungsmuster verschiedenster Ursachen. Dabei gibt es unterschiedliche Versuche zur Einteilung. Anhand der Ursache unterscheidet man die primäre, gleichbedeutend mit idiopathischer Glomerulosklerose von der sekundären Glomerulosklerose, deren Ursachen genetischer, infektiöser, medikamentöser oder hyperfiltrativer Natur sein können [9]. 1957 machte Rich die Beobachtung, dass die Läsionen bei Kindern mit nephrotischem Syndrom am kortikomedullären Übergang beginnen bevor sie weitere Teile des renalen Kortex befallen [18]. Die Läsionen manifestieren sich initial nur an einzelnen Glomeruli, also fokal und gleichzeitig mit partieller Sklerose in den Glomeruli, deshalb segmental. Histologisch sind bei der fokal segmentalen Glomerulosklerose Teile einzelner Glomerula durch extrazelluläre Matrixablagerungen vernarbt, das heißt sklerosiert. Ebenfalls kommt es zum Kollaps der glomerulären Schlingen, zu Hyalinose durch Ansammlung von Plasmaproteinen, elektronenmikroskopischem Verlust von Podozytenfußfortsätzen und gelegentlichen IgM- oder C3-Ablagerungen [19]. Ein fortschreitender Krankheitsprozess führt zu einer sklerosierenden Verödung der Glomeruli und einer auf die ganze Niere ausgedehnten glomerulären Vernarbung. Diese Veränderungen gehen mit sekundärer Entzündung sowie Fibrose des Tubulointerstitiums einher. Eine ausgeprägte Proteinurie, häufig im Bereich eines nephrotischen Syndroms ist ein typisches Resultat des glomerulären Schadens. Bei durchschnittlich 80% der Kinder und 60% der Erwachsenen mit FSGS manifestiert sich die Trias aus Proteinurie über 3,5 Gramm pro Tag, Hypoalbuminämie und peripheren Ödemen, die das nephrotische Syndrom definiert [20]. Bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu verminderter

1.4 Pathophysiologie der Glomerulosklerose

Filtrationsleistung der Niere und letztendlich zu einer terminalen dialysepflichtigen Niereninsuffizienz. Die FSGS lässt sich lichtmikroskopisch in fünf verschiedene Varianten untergliedern. Hierbei hat die kollabierende Variante, die im Zusammenhang mit HIV-Nephropathie auftritt, die schlechteste Prognose im Hinblick auf terminales Nierenversagen hat. Prozentual tritt aber die FSGS, die nicht anders spezifizierbar ist am häufigsten auf [21]. Morphogenetisch spielen Podozyten die Hauptrolle bei der Entwicklung der FSGS. Ursächlich sind zellulärer Stress durch äußere Ursachen, zum Beispiel Permeabilitätsfaktoren oder intrinsische Defekte wie Genmutationen in alpha-Actin-4-, CD2AP- oder anderen Genen, die für Proteine der Schlitzmembran oder des Zytoskeletts der Podozyten kodieren. Alle Ursachen gehen ultrastrukturell mit dem Verlust der Fußfortsätze und so mit einer Veränderung der äußeren Zellform einher. Der Umbau führt letztlich zu einem unwiderruflichen Verlust der Podozyten über der GBM, sodass diese frei in der Bowmanschen Kapsel liegt. Dies führt zu Matrixablagerungen und zu Vernarbungen des darunterliegenden Kapillarnetzes. An den denudierten Stellen der GBM kommt es zu synechialen Verwachsungen mit dem Epithel der Bowmanschen Kapsel. Parietalzellen wandern in das Kapillarknäuel ein und lagern ebenfalls Matrix ab, was zur zunehmenden Sklerosierung des Bowman'schen Kapselraums führt, typischerweise anfangs nur segmental, später im kompletten Glomerulus [20]. Bei persistierender Podozytenschädigung kommt es, zunächst aufgrund des strukturellen Defekts der Filtrationsbarriere und einer örtlichen sekundären Hypertension mit konsekutiver Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate im Einzelnephron zu einem Proteinleck in das Ultrafiltrat. Die Proteinurie ist von einer lokalen Angiotensin-II-Erhöhung, sowie einer vermehrten Chemokinsekretion wie CCL2 begleitet. Proteinurie und glomeruläre Sekretion inflammatorischer Mediatoren führt zu einer sekundären Tubuluszellschädigung und zu einer Akkumulation von mononukleären Zellen im Tubulointerstitium. Dabei werden die initial auftretenden Makrophagen teilweise durch T-Lymphozyten ersetzt. Durch deren Immunantwort bildet sich eine sekundäre interstitielle Nephritis aus. Diese greift dann von einzelnen tubulären Epithelzellen in parakriner Weise auf benachbarte Epithelzellen über und kann eine Transformation von tubulärem Epithel in fibroblastische Mesenchymalzellen zur Folge haben. Diese Fibroblasten produzieren im Tubulointerstitium vermehrt kollagene Matrix, welche langfristig zur Vernarbung und Fibrosierung führt [22]. Das Ausmaß der Fibrose korreliert dabei sehr gut mit dem renalen Funktionsverlust. Dieser Umbauprozess der Glomeruli und des Tubulointerstitiums

1 Einleitung

beruht im Wesentlichen auf immunologischen Effektormechanismen, was in zahlreichen tierexperimentellen Studien bewiesen werden konnte [23][24][25]. Die aktivierten glomerulären Zellen sezernieren proinflammatorische Mediatoren, darunter Chemokine, Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche zur Leukozyteninfiltration führen oder profibrotisch wirken [22].

In einem Modell der diabetischen Nephropathie, die ebenfalls durch eine Sklerosierung in den Glomeruli charakterisiert ist, wurde gezeigt, dass CCL2 in Mesangialzellen zu einer erhöhten Expression des profibrotischen transforming-growth-factor beta (TGF- β)-Gens und somit zu vermehrter Sklerose führt. Eine mutierte, und somit biologisch unwirksame Form von CCL2 führte zu deutlich geringerer Sklerosierung in den Glomeruli [26]. Im Mausmodell einer FSGS, der Adriamycin (ADR)-induzierten Nephropathie sind die Chemokine CCL2, CCL5, sowie TGF- β vermehrt exprimiert [27]. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass CCL2 zu einer Infiltration von Makrophagen und Leukozyten führt [28]. Eine Inhibition der CCL2-Freisetzung führte zu einer Reduktion proinflammatorischer Zellen im Interstitium sowie weniger sklerotischen Läsionen in den Glomeruli [29]. CCL2 scheint im Modell der Adriamycin-Nephropathie eine sehr wesentliche, den Krankheitsverlauf verschlechternde Rolle zu haben. Ob TNF einen Einfluss auf die CCL2-Expression und Sekretion hat, wurde noch nicht untersucht.

1.5 Tumornekrosefaktor (TNF)

Carwell machte 1975 erstmals die Beobachtung, dass TNF in soliden Tumoren hämorrhagische Nekrose induziert [30]. Knapp zehn Jahre später, 1984 konnte Aggarwal das Zytokin isolieren und seine regressiven Funktionen auf Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* beweisen [31]. TNF ist ein funktionelles, 26 Kilodalton (kDa) schweres, homotrimeres Typ II-Transmembranprotein (Abbildung 1.4). TNF wird vornehmlich von aktivierten Makrophagen gebildet, aber auch stimulierte T-Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophile und Mastzellen können TNF freisetzen. Eine Vielzahl anderer Zellen im Körper können TNF exprimieren und sezernieren, wenn sie potentiell schädlichen Stimuli wie chemischen, physikalischen oder immunologischen Noxen ausgesetzt sind [32]. TNF hat starke proinflammatorische Eigenschaften und

spielt bei der Aktivierung und Differenzierung sowohl der angeborenen, als auch der erworbenen Immunität eine wichtige Rolle. Studien zur TNF-Blockade bei chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis zeigen einen positiven Effekt auf die Krankheitsaktivität [33]. Jedoch gibt es eine Vielzahl von Experimenten die beweisen, dass TNF nicht nur proinflammatorische, sondern auch immunmodulatorische Wirkungen hat und somit Autoimmunität limitieren kann [34]. Einige Patienten, die eine Anti-TNF Therapie erhalten, zeigen Autoimmunität im Sinne von induzierten Autoantikörpern, Lupus-ähnlichen Syndromen und sogar Immunkomplex-Glomerulonephritiden [35][36][37]. Eine TNF-Blockade bei Vorliegen einer Multiplen Sklerose führt zu einer massiven Krankheitsverschlechterung der Patienten [38].

1.5.1 Wirkungsweise von TNF

Grundsätzlich wird TNF als transmembranes Protein (transmembranes TNF $\hat{=}$ mTNF) sezerniert, und kann durch proteolytische Spaltung der Metalloprotease TNF-alpha converting enzyme (TACE) als lösliche, ebenso biologisch aktive 17 kDa Form (lösliches TNF $\hat{=}$ sTNF) freigesetzt werden [40]. Sowohl membrangebundenes, als auch lösliches TNF trimerisiert und interagiert als Homotrimer mit den beiden TNF-Rezeptoren TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2). TNF ist ein pleiotropes Protein, das je nach situativem Kontext und Umgebungsbedingungen proinflammatorische oder immunsuppressive Wirkung entfaltet. Proinflammatorische Effekte wie Zellaktivierung, Proliferation und Migration werden über die Expressionssteigerung endothelialer Adhäsionsmoleküle wie ICAM oder VCAM, über die Ausschüttung von Chemokinen wie CCL2 und CCL5, sowie vermehrte Sekretion von Zytokinen wie Interleukinen mediiert. Zudem werden Fibroblasten, Leukozyten, Thrombozyten oder Matrix-Metalloproteasen aktiviert und Prostaglandine, Stickstoffoxide (NO), sowie ROS gebildet [41][42]. Für die strukturelle Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe wie Lymphknoten oder Peyersche Plaques ist TNF ebenso wichtig wie für die Apoptose von Leukozyten und Parenchymzellen. TNF besitzt somit auch immunsuppressive Wirkungen. Sowohl T-Zell Proliferation, als auch Zytokinsekretion sind bei chronischer TNF-Exposition *in vitro* und *in vivo* deutlich reduziert. Durch

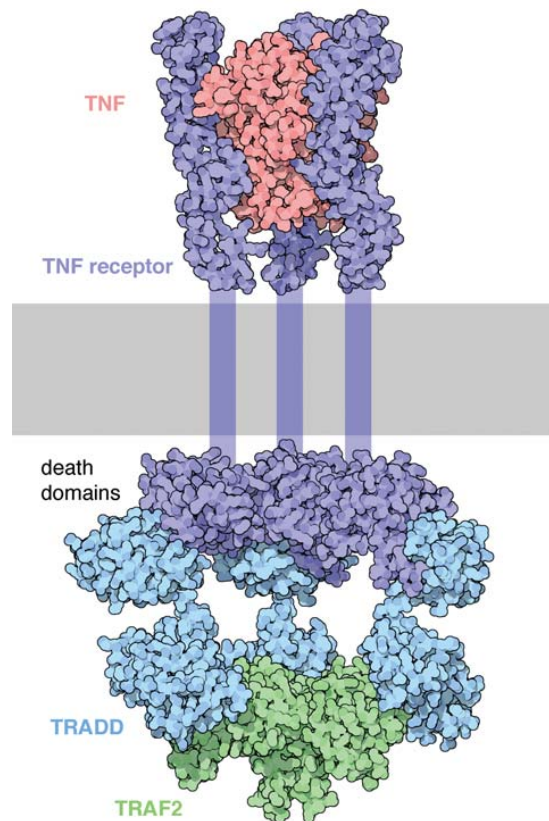


Abbildung 1.4: Molekularstruktur von TNF und TNF-Rezeptor 1: TNF (rot) besteht aus drei identischen Ketten (Homotrimer). Durch seinen Aufbau bindet es drei TNFR1-Rezeptormoleküle (blau), was die intrazelluläre Signaltransduktion initiiert. Der intrazelluläre Teil mit der Todesdomäne („death domain“) interagiert mit weiteren intrazellulären Adapterproteinen und führt so zu Apoptose oder Inflammation [39].

Apoptose von CD8-positiven T-Zellen terminiert TNF die T-Zell Antwort [40]. Dem zu Folge könnte so die Entwicklung von autoreaktiven T-Zellen verhindert werden.

Die gegensätzlichen Wirkungen von TNF werden unter anderem durch die beiden unterschiedlichen TNF-Rezeptoren vermittelt. Mit einer strukturellen Übereinstimmung von nur 28%, ausschließlich in der extrazellulären Domäne, sind die zwei TNF-Rezeptoren zwar strukturell miteinander verwandt, jedoch werden durch die zytoplasmatischen Domänen unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert [40]. Während TNFR1 auf fast allen Zellen exprimiert wird, ist TNFR2 hauptsächlich auf hämatopoetischen Zellen vorhanden [43]. Die zwei Rezeptoren haben unterschiedliche Affinität zu löslichem und membranständigem TNF. Beim Menschen bindet TNFR1 gleich gut an beide TNF-Formen, wobei lösliches TNF mit größerer Affinität und langsamerer Dissoziation an TNFR1 bindet. TNFR2 bindet ebenfalls beide TNF-Formen, hat aber eine größere Affinität zu membranständigem TNF, welches bei Zell-Zell Kontakten eine wichtige Rolle zu spielen scheint [40]. Die biologische Wirkung von membranständigem TNF wird überwiegend durch TNFR2 vermittelt [44]. Interaktionen zwischen mTNF und TNFR2 sind wichtig bei der Aktivierung von Effektor T-Zellen, dem Priming von CD4+ T-Zellen, der Reifung von dendritischen Zellen (DC) und der Apoptose von CD8+ T-Zellen [45][46][47][48][49]. Ein Zusammenspiel beider Rezeptoren als sogenannte Heterokomplexe oder auch beim „ligand passing“, der lokalen Erhöhung der TNF-Konzentration, könnte zelluläre Signalwege verstärken [50]. Genau wie TNF können beide Rezeptoren von Metalloproteasen, ähnlich dem Enzym TACE, in eine lösliche Form abgespalten werden, wenn Zellen aktiviert werden. Dieser Vorgang wird „shedding“ genannt. Die löslichen Rezeptoren spielen bei der begrenzenden Regulation von Entzündungsreaktionen eine maßgebliche Rolle. Sie binden das freigesetzte TNF und mildern so die Wirkung an Zellen ab, indem sie mit den membranständigen Rezeptoren kompetieren [51]. Kontoyiannis et al. konnte in einem Mausmodell des systemischen Lupus erythematoses die immunsuppressive Wirkung des TNFR1 zeigen [52]. Weiterhin zeigen TNFR1-defiziente Tiere eine erhöhte Anfälligkeit für Autoimmunkrankheiten mit erhöhten TNF-Spiegeln, erhöhter Mortalität und der Entwicklung einer Lupusnephritis [53]. Dem gegenüber zeigen Mäuse, die TNFR2 überexprimieren, ein spontan auftretendes, schweres systemisches Inflammationssyndrom. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass TNFR2

1 Einleitung

eine eher proinflammatorische Aufgabe erfüllt, während TNFR1 eher proapoptotisch wirkt [54].

1.5.2 Expression von TNF und TNF-Rezeptoren in der Niere

In einer gesunden Niere ist weder TNF-Messenger-RNA (mRNA), noch TNF Proteinexpression nachweisbar, wobei es hier gegensätzliche Ergebnisse einzelner humaner Nierenbiopsie-Studien gibt [55][56]. Eindeutig ist jedoch, dass TNF direkt an Gewebeschaden und Entzündung in vielen Nierenerkrankungen beteiligt ist. Obwohl Monozyten und Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von TNF spielen, ist das von intrinsischen Nierenzellen wie Mesangialzellen, Podozyten und Tubulusepithelialzellen örtlich gebildete TNF bei Entzündungsprozessen der Niere von größerer Bedeutung [57]. Dabei wird TNF vorwiegend im geschädigten Kompartiment exprimiert und sezerniert. Bei IgA-Nephropathie, Lupus Nephritis und auch bei der Minimal Change-Erkrankung sowie idiopathischer Glomerulonephritis kann hauptsächlich mesangiales TNF detektiert werden [58][59]. Bei der membranösen Glomerulonephritis ist TNF im Bereich der glomerulären Kapillarschlingen und Podozyten nachweisbar [16]. Bei der antineutrophilen zytoplasmatischen Antikörper (ANCA)-vermittelten Glomerulonephritis ist TNF in allen Kompartimenten, den Glomerula, dem Interstitium sowie den Tubuli nachweisbar [60]. Bei Patienten mit glomerulärem Schaden und nephrotischem Syndrom korreliert die interstitielle TNF-Expression mit der Schwere der renalen Fibrose [61].

In tierexperimentellen Studien in Ratten wurde schon in den 1980er Jahren die funktionelle Rolle von TNF im Rahmen der glomerulären Schädigung im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis gezeigt [62]. In einem Modell der diabetischen Nephropathie, welches ebenfalls zu einer chronischen Glomerulosklerose führt, wurde sowohl in Glomeruli als auch in Tubulusepithelzellen von Ratten nach Induktion des Diabetes eine vermehrte TNF-Expression nachgewiesen [63]. Sowohl Nierenzellen, als auch infiltrierende Leukozyten sezernieren TNF [64]. Vordaten aus unserer Arbeitsgruppen in Mäusen, deren Glomeruli in vivo mit TNF exponiert wurden, zeigten eine erhöhte Expression von Chemokinen wie CCL2, CCL5 und CXCL10, sowie eine vermehrte Leukozyteninfiltration [65]. In einem Tiermodell der kollabierenden Variante der FSGS konnte in Podozyten eine erhöhte TNF-Sekretion

nachgewiesen werden. Die Höhe der TNF-Spiegel korrelierte einerseits positiv mit dem Grad der Nierenschädigung, andererseits konnte gezeigt werden, dass es durch TNF-vermittelte Chemokinsekretion zu einer Makrophagenmigration in Transwell-Assays kam [66]. Auch immortalisierte Podozyten *in vitro* zeigten eine vermehrte TNF-Expression und Sekretion nach Stimulation mit rekombinantem humanem Albumin, was dem Modell der chronischen Nierenschädigung durch Albuminurie *in vivo* vergleichbar ist [67]. Mesangialzellen können *in vivo* und *in vitro* nach diversen Stimuli TNF exprimieren und vermehrt sezernieren [68][69]. Eine auto- und parakrine Stimulation von TNF wurde im Modell der IgA-Nephritis zwischen Mesangialzellen und Podozyten gezeigt. Das lokal von Mesangialzellen gebildete TNF stimulierte Podozyten ihrerseits, vermehrt Entzündungsmediatoren einschließlich TNF zu sezernieren [14]. Die Podozytenaktivierung verstärkt somit TNF-abhängig die glomeruläre Entzündungsreaktion und Sklerose. Mesangial und podozytär sezerniertes TNF könnte zudem tubulointerstitielle Zellen, vor allem Tubulusepithelzellen stimulieren, und so zu einer sekundären Entzündung des Interstitiums beitragen [70]. Die genannten Ergebnisse zeigen, dass TNF maßgeblich an der Entwicklung, sowie am Fortbestehen von akuter und chronischer renaler Entzündung und Gewebeschaden beteiligt ist. Bisher ist jedoch die funktionelle Rolle von TNF bei der FSGS wie beispielsweise im Modell der Adriamycin-Nephropathie nicht näher untersucht.

1.6 Anti-TNF Therapie

In Anbetracht der proinflammatorischen Effekte von TNF wurden Strategien entwickelt, um die entzündungsfördernde Wirkung von TNF abzuschwächen. Prinzipiell kann man zwei Möglichkeiten der Anti-TNF Therapie unterscheiden. Einerseits wurden monoklonale Antikörper wie Infliximab oder Adalimumab entwickelt, andererseits das Fusionsprotein Etanercept. Alle Therapien neutralisieren die biologische Wirkung von TNF im Körper. Wie oben diskutiert, vermittelt TNF aber nicht nur proinflammatorische, sondern auch immunsuppressive Effekte und trägt maßgeblich zur Immunhomöostase bei. Deshalb ist es unter Umständen schwierig, die Effekte einer Anti-TNF Therapie vorherzusagen. In zahlreichen chronisch entzündlichen Krankheiten wie der rheumatoiden Arthritis, Psoriasis und Morbus Crohn wird die Anti-TNF Therapie erfolgreich bei Therapieversagen der konventionellen immu-

1 Einleitung

suppressiven Behandlung eingesetzt [33]. Jedoch kann es in manchen Fällen zur Induktion von Autoimmunität durch neu gebildete Antikörper, bis hin zum klinischen Bild eines Lupus erythematoses kommen. Andere Krankheiten, in denen TNF eine wichtige pathophysiologische Rolle spielt, wie zum Beispiel Sepsis oder Multiple Sklerose profitieren in keinster Weise von einer TNF-Blockade. Die medikamentöse Therapie führte zu einer massiven Verschlechterung dieser Krankheitsbilder. Generell muss vor Beginn einer Anti-TNF Therapie auf potentielle Risiken hingewiesen werden. Diese sind eine erhöhte Inzidenz bakterieller Infektionen, eine Reaktivierung einer latenten Tuberkulose, eine höhere Inzidenz von Lymphomen, sowie das Auftreten solider Tumoren [71][72]. Diese Beobachtungen werfen Fragen nach der Sicherheit dieser Medikamente auf. Vergleicht man Anti-TNF Medikamente mit herkömmlichen Immunsuppressiva wie Steroiden oder Ciclosporin, so sind die neuen Therapiemöglichkeiten allerdings als sehr sicher anzusehen, sofern man die potentiellen Nebenwirkungen sorgfältig überwacht.

Etanercept ist ein dimeres Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne zweier humaner TNFR2 und der konstanten Fc-Region der humanen Immunglobulinklasse IgG1 [73]. Etanercept enthält ausschließlich humane Aminosäuresequenzen und ist deshalb, anders als der monoklonale Anti-TNF Antikörper Infliximab kaum immunogen. 1998 wurde Etanercept, Handelsname Enbrel® von Immunex und Wyeth-Ayerst zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis bei Patienten, die nicht adäquat auf disease modifying antirheumatic drugs (DMARD) ansprechen zugelassen. Seitdem ist die Indikation für Etanercept auf juvenile rheumatoide Arthritis, Psoriasis-Arthritis, Spondylitis ankylosans und Plaque-Psoriasis erweitert worden [74][75]. Der biochemische Unterschied in der molekularen Struktur und der Pharmakokinetik erklärt möglicherweise, weshalb sowohl Etanercept als auch Infliximab bei rheumatoider Arthritis den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen, allerdings die Effektivität der monoklonalen Antikörper bei granulomatösen Erkrankungen wie Morbus Crohn deutlich höher ist [76][77]. Anders als Etanercept ist Infliximab ein chimärer, das heisst murin-humaner Anti-TNF monoklonaler Antikörper, mit muriner variabler Region und der konstanten Region von humanem Immunglobulin IgG1. Andere Anti-TNF Antikörper wie Adalimumab sind komplett aus humanen Bausteinen, und somit nicht von humanem IgG1 unterscheidbar [78]. Infliximab bindet sowohl die monomere, als auch die trimere Form von gelöstem TNF. Im Ge-

gensatz dazu bindet Etanercept nur die trimere Form [44]. Alle drei Anti-TNF Medikamente weisen vergleichbare intrinsische Bindungseigenschaften zu löslichem und membranständigem TNF auf, wobei die Affinität zu membranständigem TNF deutlich geringer ist als die zu gelöstem TNF [79][80]. In einem Bioassay der humanen Lungenkrebs-Zelllinie A549 wurde gezeigt, dass beide Anti-TNF Antikörper den durch transmembranes TNF vermittelten Zelltod hemmen, während Etanercept nur etwa 50% der Aktivität zeigt. Ein weiterer Unterschied zwischen Etanercept und Anti-TNF Antikörpern besteht in der Komplement-vermittelten Zytotoxizität (CDC), wobei hier die Anti-TNF Antikörper wesentlich potenter sind als Etanercept [81]. Alle drei Anti-TNF Medikamente haben die Fc-Region von IgG1 gemeinsam. Die CH2-Domäne des IgG1 aktiviert die erste Komponente des Komplementsystems (C1). Etanercept besitzt, anders als die TNF-Antikörper keine CH1-Domäne. Diese ist allerdings essentiell, um den wichtigsten Aktivator des Komplementsystems, C3 zu aktivieren [82]. Dadurch kommt es unter Etanercept-Therapie zu einer wesentlich geringeren Komplement-vermittelten Zytotoxizität im Vergleich zu Infliximab oder Adalimumab. In einer Zelllinie wurde gezeigt, dass Komplement-vermittelte Zytotoxizität in Makrophagen und Monozyten zu vermehrter Zellyse führt [83]. Somit könnte Etanercept im Vergleich zu den Anti-TNF Antikörpern weniger proinflammatorische, TNF-sezernierende Immunzellen lysieren.

In diversen tierexperimentellen Modellen chronischer Nierenerkrankungen konnte die TNF-Blockade mittels Etanercept in vivo die Erkrankung verbessern. Im Modell der experimentellen rapid progressiven Glomerulonephritis zeigte sich eine Verbesserung der funktionellen Parameter wie Serumkreatinin und Albuminurie, sowie eine Reduzierung renaler Makrophageninfiltrate. Tubulointerstitielle Entzündung sowie Fibrosemarker wie Kollagen IV waren deutlich vermindert [84]. Auch in anderen, von Fibrose geprägten Krankheitsmodellen wie der Sklerodermie zeigte die TNF-Blockade mittels Etanercept eine positive Wirkung hinsichtlich der Reduktion von Fibrose. Dies ist wahrscheinlich über eine verminderte Fibroblastenaktivierung und folglich reduzierte TGF- β -Sekretion vermittelt [85]. Etanercept verbesserte den Verlauf der hypertensiven Nierenschädigung [86]. Dass Etanercept auch glomerulär gebildetes TNF blockiert und hierdurch die diffuse Glomerulosklerose der Alport-Nephropathie zeitlich verzögert zeigten Ryu et al. [87]. Etanercept verminderte sklerotische und extrakapilläre proliferative Läsionen. Allerdings hatte Etanercept keinen

1 Einleitung

Einfluss auf die Veränderungen in der glomerulären Basalmembran, auf die Fußfortsatzverschmelzung oder eine Vermehrung der mesangialen Matrix. Etanercept führte auch nicht zu einer Verminderung der renalen Leukozyteninfiltration, was eventuell auf die fehlende Komplement-vermittelte Zellyse zurückzuführen sein könnte.

Diese Vordaten weisen auf eine mögliche pathophysiologische Rolle von TNF auch bei der Glomerulosklerose hin. TNF-Blockade mit Etanercept könnte die glomeruläre Schädigung und den Nierenfunktionsverlust im Verlauf einer FSGS vermindern.

1.7 Fragestellung

Wie oben gezeigt spielt TNF in verschiedenen immunologischen und nichtimmunologischen Nierenerkrankungen eine wichtige funktionelle Rolle und trägt maßgeblich zur Krankheitsprogression bei. Sowohl Podozyten, Mesangialzellen als auch Tubulendothelzellen können TNF sezernieren, wenn sie durch Stimuli aktiviert werden. Zusätzlich werden Nierenzellen in auto- oder parakriner Weise durch infiltrierende Makrophagen und Leukozyten stimuliert. Der genaue Wirkmechanismus von TNF, oder die durch TNF aktivierten Signalwege bei der Glomerulosklerose wurden bisher nicht untersucht. Im Modell der Adriamycin-induzierten, also toxischen fokal segmentalen Glomerulosklerose kommt es infolge einer direkten Podozytenschädigung zu einer glomerulären Vernarbung mit Proteinurie und sekundärer interstitieller Nephritis. Dieses Modell ist gut mit der humanen Form der FSGS vergleichbar. Aus diversen Arbeiten geht hervor, dass die TNF-Blockade mittels Etanercept bei vielen chronisch entzündlichen und fibrotischen Erkrankungen, sowie auch in diversen Nierenerkrankungen gute Erfolge bezüglich der Krankheitsremission zeigt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, durch TNF-Blockade mittels Etanercept die funktionelle Rolle von TNF bei der fokal segmentalen Glomerulosklerose zu beurteilen. Folgende Fragen werden hierbei untersucht:

1. Führt Adriamycin direkt zu einer vermehrten TNF-Freisetzung in Glomerula, Podozyten und Mesangialzellen *in vitro*?
2. Führt TNF zu einer Chemokinfreisetzung in Podozyten und Mesangialzellen und somit zu einem potentiellen glomerulären Schaden?

3. Führt Adriamycin zu einer TNF-vermittelten Chemokinfreisetzung in Glomerula, Podozyten und Mesangialzellen *in vitro*?
4. Vermindert eine TNF-Blockade mit Etanercept die Effekte von Adriamycin auf glomeruläre Nierenzellen *in vitro*?
5. Vermindert eine TNF-Blockade mit Etanercept den Verlauf der Adriamycin--induzierten FSGS *in vivo*?

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Durchflusszytometer:	
FACScalibur	Becton Dickinson, San Jose, USA
ELISA-Reader:	
GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
ELISA-Washer:	
Micorplate- Washer Ex150	Biotek, Bad Friedrichshall, D
Fluoreszenzmikroskop:	
Leica DC 300F	Leica Mycrosystems, Camebridge, UK
Olympus BX50	Olympus Mikroskope, Hamburg, D
Spektrophotometer:	
Beckman DU 530	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Taq Man Sequence Detection System:	
ABI Prism 7700 Sequence Detector	PE Biosystems, Weiterstadt, D
Zellinkubator:	
Typ B5060 EC- CO2	Heraeus Instruments, Osterode, D

2 Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Zentrifugen:	
Heraeus, Minifuge T	VWR International, Darmstadt, D
Heraeus, Biofuge primo	Kendro Laborprodukte GmbH, Hanau, D
Heraeus, Sepatech Biofuge A	Heraeus Sepatech, München, D
sonstige Geräte:	
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen, D
Waage Mettler PJ 3000	Mettler- Toledo, Greifensee, CH

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Albuminstix Teststreifen	Bayer, Leverkusen, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roche, Mannheim, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
DNase Typ III	Sigma, Deisenhofen, D
Ethylen-diamin Tetraessigsäure (EDTA)	Calbiochem, San Diego, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
FACSflow	Beckton Dickinson, Heidelberg, D
Formalin	Merck, Darmstadt, D
HCl (5N)	Merck, Darmstadt, D
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen, D
β- Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen, D
Tween	Sigma, Deisenhofen, D

2.1.3 Puffer

Paris Puffer pH 7,4

20mM Tris-HCl
125mM NaCl
10mM KCl
10mM Na-Acetat
5mM Glucose

FACS Puffer

PBS
0,2% BSA
0,1% Na-Azid

Puffer A (0,1M Phosphatbuffer) pH

8,0

19ml 1M NaH₂PO₄
81ml 1M Na₂HPO₄
ad 1000ml mit Aqua bidest auffüllen

Puffer B (1xPBS) pH 7,4

0,16g NaH₂PO₄ × H₂O
0,98g Na₂HPO₄ × 2 H₂O
ad 1000ml mit Aqua bidest auffüllen

10x HBSS (Hanks blanced saline solution) ohne Ca²⁺, Mg²⁺, für einen Liter

4g KCl
0,6g KH₂PO₄
80 g NaCl
0,621g Na₂HPO₄ × 2H₂O

10x HBSS mit Ca²⁺, Mg²⁺, für einen Liter zusätzlich zu 10x HBSS ohne Ca²⁺, Mg²⁺

3,5g NaHCO₃
1,4g CaCl₂
1,0g MgCl₂ × 6H₂O
1,0g MgSO₄ × 7H₂O
10 g D-Glucose

MACS Puffer pH 7,2

2mM EDTA
0,5% BSA

2.1.4 Lösungen

Kollagenase-Lösung/DNase-Lösung

1mg/ml Kollagenase
0,1mg/ml DNase
in 1x HBSS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}

Blockierlösung (Beads)

Puffer A
0,5% BSA

Stocklösung (Beads)

1M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MW 137,99)
1M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (MW 177,99)
ad 1000ml Aqua bidest.

2.1.5 Materialien und Stimulantien für die Zellkultur

Material	Hersteller
DMEM- Medium	GIBCO/ Invitrogen, Paisley, UK
RPMI- 1640- Medium	GIBCO/ Invitrogen, Paisley, UK
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, D
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Hepes	Mediatech Inc., Manassas, USA
Insulin B Rapid (40 IE/ml)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Interferon gamma	Invitrogen, Karlsruhe, D
Kollagen A	Roche Diagnostic, Mannheim, D
Penicillin /Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Zellkulturschalen:	
Cell Strainer 70 μm	BD Biosciences, Erembodegem, Belgium
Cell Strainer 100 μm	BD Biosciences, Erembodegem, Belgium
Stimulantien:	
IFN-gamma	Pepro Tech, Rocky Hill, USA
TNF	Pepro Tech, Rocky Hill, USA

Material	Hersteller
Etanercept	Wyeth Pharmaceuticals AG, Zug, CH
humanes IgG1 Kappa	Sigma, St.Louis, USA
humanes IgG	Sigma, St.Louis, USA
Doxorubicin	Pharmacia & Upjohn, Erlangen, D

2.1.6 Reagenziensätze

Material	Hersteller
ELISA- Kits:	
Albumin	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
MCP-1/CCL2 mouse	BD, San Diego, USA
RANTES/CCL5 mouse	R&D, Abigdon, UK
TNF	Invitrogen, Karlsruhe, D
Kreatinin FS	DiaSys GmbH, Holzheim, D
RNA Isolation:	
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden, D
Beads:	
Dynabeads M-450 Epoxy	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.7 Antikörper

Material	Hersteller
Hisologie:	
Smooth Muscel Actin	Dako Biotechnology, Santa Cruz, USA
WT-1	Dako Biotechnology, Santa Cruz, USA
CD3	Abd Serotec, UK
F4/80	Abd Serotec, UK
FACS:	
CD4-APC	BD/ Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD8-PE- Cy5	BD/ Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD3-FITC	BD/ Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD45-PE	BD/ Becton Dickinson, Heidelberg, D
F4/80-APC	BD/ Becton Dickinson, Heidelberg, D
CD11c-FITC	BD/ Becton Dickinson, Heidelberg, D
Annexin V-FITC	BD/ Becton Dickinson, Heidelberg, D

2.1.8 Primer für die real-time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Primer für die real-time PCR wurden von der Firma Metabion International AG, Martinsried in Deutschland bezogen. In der Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer aufgeführt, mit 18S-RNA als Referenzgen.

Gen	Sequenz
18S r-RNA	Forward: 5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3' Reverse: 5'-AGGGCCCTCACTAAACCATCC-3'
CCL2	Forward:5'-CCTGCTGTTACAGTTGCC-3' Reverse: 5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'
CCL5	Forward:5'-CCACTTCTTCTCTGGGTTGG-3' Reverse: 5'-GTGCCACGTCAAGGAGTAT-3'
GATA3	Forward:5'-GCCTGCGGACTCTACCATAA-3' Reverse:5'-AGGATGTCCCTGCTCTCCTT-3'
T-bet	Forward:5'-TCAACCAGCACCAGACAGAG-3' Reverse:5'-ATCTGTAATGGCTTGTGGG-3'
TGF- β	Forward:5'-GGAGAGCCCTGGATACCAAC-3' Reverse:5'-CAACCCAGGTCCTTCCTAAA-3'
TNF	Forward:5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' Reverse:5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'
VCAM1	Forward:5'-CCGGCATATACGAGTGTGAA-3' Reverse:5'-TCGGGCGAAAAATAGTCCTT-3'

2.1.9 Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Referenz
mMC	murine Mesangialzellen	Satriano et al.
mPC	murine Podozyten	Mundel et al.

2.1.10 Versuchsmäuse

Mausstamm	Referenz
BALB/c	Charles River, Sulzfeld, D

2.2 Zellkultur

2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Glomerula und der Zelllinien erfolgte im Brutschrank unter konstanten Bedingungen von 37°C und einer CO₂-Begasung von 5%. Die Passage von Zellen oder Stimulationsexperimente erfolgten stets unter einer Sterilbank. In dieser sorgten ein Filter, sowie ein laminarer Luftstrom für eine keimfreie Umgebung. Darüber hinaus wurden vor jeder Benutzung die Oberflächen der Sterilbank sowie alle Gebrauchsgeräte wie z.B. Mediumflaschen, Pipetten, etc. mit Desinfektionsmittel behandelt.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Mittels einer Neubauer-Zählkammer und einer Trypanblau-Färbung wurden Zellzahl und Vitalität bestimmt. Der Vitalitätstest mit Trypanblau färbt selektiv das Zytoplasma toter Zellen an. Der Farbstoff Trypanblau diffundiert auf Grund der erhöhten Membrandurchlässigkeit der toten Zellen ungehindert ins Zellinnere. Unter dem Mikroskop erscheinen die toten Zellen daher tiefblau, im Gegensatz zu den hellen, vitalen Zellen. Mittels der Neubauer-Zählkammer lässt sich nun die Zellzahl der vitalen Zellen bestimmen. Die Formel dazu lautet:

$$\text{Zellzahl (MW aus vier Großquadranten)} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren: Die Zellen wurden mittels EDTA abgelöst. Anschließend wurde das EDTA mit dem gleichen Volumen an Medium inaktiviert und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO bei Mesangialzellen bzw. 6% DMSO bei Podozyten) resuspendiert. Anschließend erfolgt die Überführung von 1 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von circa einer Million Zellen/ml in beschriftete Kryoröhrchen. Zum Gefrieren kamen die Kryoröhrchen in einer speziellen Box in den Gefrierschrank bei -80°C für 24 Stunden. Am

folgenden Tag wurden die Röhren in Flüssigstickstoff gelagert.

Auftauen: Die gefrorenen Kryoröhren wurden im Wasserbad bei 37°C schnellstmöglich aufgetaut. Unter sterilen Bedingungen wurde die Zellsuspension in ein Zellkulturgefäß mit vorgewärmtem Medium überführt und im Brutschrank inkubiert. Nach spätestens 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.4 Gewinnung und Kultivierung primärer Glomerula

Die Glomerula wurden aus sieben bis neun Wochen alten, männlichen BALB/c Mäusen extrahiert. Die Technik der Gewinnung mittels paramagnetischer Teilchen, sogenannter Beads erfolgte analog der Erstbeschreibung durch Takemoto et al. [88].

Vorbereitung der Beads: Paramagnetische Beads wurden im Liefergefäß mit einer Pipette gründlich resuspendiert und 1 ml in ein Eppendorftube überführt. Dieses wurde bei geöffnetem Deckel für 60 Sekunden an einen speziellen Magneten gestellt. Mittels einer Pasteurpipette wurde der Überstand vorsichtig abgenommen ohne dabei die Beads zu berühren. Die Beads wurden mit 1 ml Puffer A bedeckt und für 30 Sekunden auf dem Vortexgerät durchmischt bevor das Eppendorftube wieder für 60 Sekunden an den Magneten gestellt wurde. Dieser Waschvorgang wurde drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Waschgang wurde 1 ml BSA-Lösung sowie 1 ml Puffer A zu den Beads pipettiert und alles für 24 Stunden bei 30°C im Thermomixer inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Vorgang mit Puffer B wiederholt.

Glomerulaisolation: An der tiefnarkotisierten Maus erfolgte eine mediane Laparotomie und Sternotomie mit Fixierung der aufgeklappten Thoraxwand durch Injektionsnadeln. Nach Durchtrennung der Vena cava inferior mit einer Präparierschere folgte die Perfusion des linken Ventrikels mittels Perfusorapparatur. Der Perfusionsdruck betrug anfangs 60 mmHg und wurde auf 80 mmHg erhöht. Insgesamt wurden 200 µl Beads gelöst in 40 ml vorgewärmten PBS perfundiert. Bei erfolgreicher Perfusion entfärbten sich sowohl Leber als auch Nieren. Die Nieren wurden nacheinander polnah von den versorgenden Gefäßen disloziert und durch einen kleinen Schnitt von ihrer Kapsel befreit. Jede Niere wurde separat auf einer autoklavierten Glasplatte in etwa 1 mm² große Stücke mit einem Skalpell zerschnitten. Die zerkleinerten Nie-

2 Material und Methoden

renstücke wurden in ein 2 ml Eppendorftube mit rundem Boden überführt und mit 1 ml HBSS/Kollagenase A (1 mg/ml) für 30 Minuten bei 37°C verdaut. Die folgenden Arbeitsschritte des Siebens erfolgten stets auf Eis. Ein 100 µm Zellsieb wurde mit eisgekühltem PBS befeuchtet und auf einen 50 ml Falconröhrchen gesetzt. Das kollagenaseverdaute Nierengewebe wurde unter Zuhilfenahme eines Pistills einer 5 ml Spritze ohne Dichtung in der Mitte des Zellsiebs durchgedrückt. Mit 1 ml PBS wurde das Eppendorftube ausgespült und der Inhalt durch das gleiche Zellsieb gesiebt. Das Sieb wurde abschließend mit 2 ml PBS gespült, so dass das Endvolumen im Falconröhrchen 4 ml betrug. Nun folgte für die zweite Niere ein neues 100 µm Zellsieb auf den gleichen Falconröhrchen und der Vorgang wiederholte sich mit der zweiten Niere der gleichen Maus. Das Filtrat wurde vom 50 ml Falconröhrchen in einen 15 ml Falconröhrchen mit rundem Boden überführt und nach mehrmaligem Schwenken bei offenem Deckel am Magnet fixiert. Nach 7 Minuten wurde der Überstand ebenfalls via Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Das Falconröhrchen wurde aus dem Magnetfeld entfernt und mit 10 ml eisgekühltem PBS gespült. Durch sanftes Schwenken wurden die am Rand des Falconröhrchens liegenden Glomerula mit PBS vermischt. Das Falconröhrchen wurde danach für 5 Minuten an den Magnet gestellt, der Überstand gleichfalls abgenommen und anschließend mit 4 ml PBS gespült. Ein zweites Sieben durch ein 100 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Falconröhrchen folgte. Das 15 ml Falconröhrchen wurde mit 6 ml PBS ausgespült, so dass das Endvolumen im 50 ml Falconröhrchen 10 ml betrug. Diese wurden in eine neues 15 ml Falconröhrchen überführt und erneut 5 Minuten an den Magnet gestellt. Zum Waschen wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Sediment mit 10 ml PBS resuspendiert. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt. Abschließend wurde das Sediment in 3 ml angewärmten Kulturmedium gelöst. Zur Glomerula-Quantifizierung wurden 50 µl des Resuspendats auf den Deckel einer 3 cm Petrischale, die in vier Quadranten unterteilt war pipettiert. Unter dem Binokular wurde jeder der vier Quadranten zweimal ausgezählt, anhand der Mittelwerte die Summe gebildet und das in Kultur zu nehmende Volumen berechnet. Es wurden in jede 6 cm Petrischale exakt 5000 Glomerula in Kultur genommen.

Glomerulakultur: Die Glomerula wurden für 24 Stunden in Medium (RPMI-1640, 15mM HEPES, 0,66 U/ml Insulin, 1% Penicillin/Streptomycin) mit FCS im Brutschrank inkubiert. Die teils adhärennten, teils gelösten Glomerula wurden mit einem

Pipettus in eine 15 ml Falconröhrchen überführt. Die Falconröhrchen wurden bei 800 rpm, 250 g, 4°C für 3 Minuten zentrifugiert und der Überstand unter der Sterilbank abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde in 3 ml frischem, angewärmten Medium (RPMI-1640, 15mM HEPES, 0,66 U/ml Insulin, 1% Penicillin/Streptomycin) ohne FCS (Serumentzug) resuspendiert und in die jeweilige Petrischale zurückgeführt. Es folgte eine erneute Inkubation für 24 Stunden bevor die Stimulation der Glomerula erfolgte.

2.2.5 Podozytenkultur

Für die Podozytenkultur wurde eine immortalisierte murine Podozytenzelllinie verwendet. Diese stellte Dr. Jun Oh, Universitätsklinik Düsseldorf freundlicherweise zur Verfügung. Die Kultur erfolgte nach Angaben von Mundel et al. [89].

Immortalisierte Podozyten werden aus Glomeruli der Immorto-Mouse (Charles River, USA) gewonnen und tragen eine mutierte, Temperatur-sensitive Form des SV40-large-T-antigen (SV40-TAg) Vektor in sich, welcher unter Kontrolle eines Interferon- γ (IFN- γ)-induzierten Promotors steht. Entdifferenzierte Podozyten können sich nicht mehr teilen, weshalb die Podozyten, die zur Zellexpansion verwendet werden mit einem proonkogenen Vektor transfiziert sein müssen. IFN- γ induziert die Aktivierung des SV40-TAg Vektors, welcher zur Zellteilung in den undifferenzierten Podozyten führt. Zur Differenzierung der Podozyten erfolgt ein Temperaturshift von 33°C auf 37°C, der den temperatur-sensitiven SV40-TAg Vektor inaktiviert und so zur Ausdifferenzierung der Podozyten führt [89].

Auftauen: Zum besseren Wachstum der Podozyten empfiehlt es sich, die Zellkulturflasche mit Kollagen zu beschichten. Hier wurde circa 1 ml Kollagen A je 25 cm² Flasche und 3 ml Kollagen A je 75 cm² Flasche verwendet. War der Boden bedeckt, erfolgte eine 45-minütige Inkubationszeit bei 37°C. Das überschüssige Kollagen A wurde mit 10 ml PBS abgewaschen. Die bei -80°C gelagerten und auf Trockeneis gelieferten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, bis sich die Eiskristalle vollständig aufgelöst hatten. Anschließend wurde die Zellsuspension in 5 ml vorgewärmten Medium (RPMI-1640 mit Glutamin, 10% FCS, 2% Penicillin/Streptomycin) gelöst und 10 U/ml IFN- γ zugegeben, bevor die Suspension in

2 Material und Methoden

eine mit Kollagen A beschichtete 25 cm² Greinerzellkulturflasche überführt wurde. Es folgte eine Bebrütung im 33°C Inkubator. Am nächsten Tag, spätestens nach 24 Stunden folgte der erste Mediumwechsel. Dazu wurde der Überstand abgesaugt, die Podozyten mit raumtemperierten PBS gewaschen und frisches, auf 37°C temperiertes Medium sowie 10 U/ml IFN- γ hinzugegeben. Täglich erfolgte eine optische Wachstumskontrolle unter dem Mikroskop. Nach etwa drei Tagen waren die Podozyten 70-80% konfluent und somit zum Splitten bereit.

Splitten: Zunächst erfolgte, gleich dem Mediumwechsel, das Absaugen des Überstands sowie ein Waschgang mit PBS. Nachdem das PBS entfernt wurde folgte nun die Ablösung der adhärenen Podozyten mittels 5 ml Trypsin/EDTA pro Flasche für 4 Minuten im Brutschrank bei 37°C. Um die Lyse zu stoppen erfolgte die Zugabe einer äquivalenten Menge an Medium zum Trypsin/EDTA. Die Suspension wurde mittels Pipettus in 15 ml Falconröhrchen pipettiert und bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert. Mit einer Pasteurpipette wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, ohne das Pellet zu berühren und insgesamt 5 ml frisches, vorgewärmtes Medium in jedes Falconröhrchen zugefügt. Mit einer 1 ml Pipette wurde das Pellet gut resuspendiert, so dass eine Einzelzellsuspension entstand. Diese wurde im Verhältnis 1:5, also etwa 250 000 Zellen/ml in kollagenbeschichtete 75 cm² Flaschen mit je 9 ml vorgewärmtem Medium und 10 U/ml IFN- γ verteilt und bei 33°C inkubiert.

Temperaturshift: Es erfolgte ein Temperaturshift von 33°C auf 37°C, da die Podozyten wie oben beschrieben bei 37°Celsius die Wachstumseigenschaft durch Inaktivierung des SV40-TAg Vektors verlieren und ausdifferenzieren. Dazu wurden die Podozyten gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Anschließend folgte die Zentrifugierung bei 250 g für 5 Minuten. Pro Falconröhrchen folgten je nach Pelletgröße die Zugabe von 3 bis 4 ml Medium (RPMI-1640 mit Glutamin, 10% FCS, 2% Penicillin/Streptomycin) und alle Falconröhrchen wurden nach ausreichender Resuspension in eine großes 50 ml Falconröhrchen überführt. Von diesem wurden 50 μ l entnommen und mit 50 μ l Trypanblau gemischt. Anschließend erfolgte eine Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer, wie oben beschrieben. Die Verteilung der Podozyten in 6-well Zellkulturschalen erfolgte nach Berechnung der exakten Zellzahl, sodass in jede Kammer 250.000 Zellen pipettiert wurden und diese mit 2 ml vorgewärmtem Medium (RPMI-1640 mit Glutamin, 10% FCS, 2% Penicillin/Streptomycin) bedeckt wurden. Es folgte eine 14-tägige Inkubation der Podozy-

ten bei 37°C, bis diese vollständig ausdifferenziert waren. Zweitägig wurden die Zellen gewaschen und das Medium gewechselt. Nach vollendeter Ausdifferenzierung folgten Stimulationsversuche, beziehungsweise zytologische Färbung.

2.2.6 Mesangialzellkultur

Eine immortalisierte Mesangialzelllinie wurde nach den Angaben von Satriano et al. kultiviert [90].

Auftauen: Die tiefgefroren gelagerten Mesangialzellen wurde im Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis die Eiskristalle gelöst waren. Die Suspension wurde in eine 10 cm Petrischale mit 9 ml vorgewärmtem Medium (DMEM, 2,5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) überführt und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Bei 80-90% Konfluenz wurden die Mesangialzellen gesplittet.

Splitten: Bei den konfluierenden Zellen wurde der Überstand abgesaugt, diese mit raumtemperiertem PBS gewaschen und die adhärenen Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA für 5 Minuten im 37°C Inkubator abgelöst. Die Reaktion wurde mit 5 ml Medium gestoppt. Anschließend folgte die Überführung der Suspension in 15 ml Falcons. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 400 g wurde der Überstand abgesaugt und in jedes Falconröhrchen 3 ml frisches, vorgewärmtes Medium pipettiert und resuspendiert. Anschließend folgte die Verteilung 1:3 in 10 cm Petrischalen zur weiteren Kultivierung, oder 300.00 Zellen pro Schale beziehungsweise 5000-10.000/cm² in 6 cm Petrischalen für Stimulationsexperimente.

2.2.7 Stimulationsexperimente

Allgemeine Bedingungen: Ein Stimulationsexperiment verlief bei den Glomerula beziehungsweise allen Zelllinien identisch, lediglich die Kulturgefäße wurden den Zellen angepasst. Glomerula und immortalisierte Mesangialzellen wurden in 6 cm Petrischalen, Podozyten in kollagenbeschichteten 6-well Platten stimuliert. Am Tag vor Stimulation wurden alle Zellen gewaschen und in Kulturmedium ohne FCS zum Serumentzugs inkubiert. Das Kriterium für die Stimulationsfähigkeit war bei Glomeru-

2 Material und Methoden

la sofort nach deren Gewinnung gegeben, Mesangialzellen mussten eine 80-90%-ige Konfluenz erreicht haben und Podozyten wurden im ausdifferenzierten Zustand 14 Tage nach dem Temperaturshift auf 37°C stimuliert.

Adriamycin-Stimulation

Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. In 15 ml Falconröhrchen wurden 4 ml Medium ohne FCS als Mediumkontrolle, Medium mit je 10 µg/ml Etanercept oder 10 µg/ml humanem IgG als Kontrolle zu Etanercept angesetzt. In die 4 ml Medium folgte nun die Zugabe von Adriamycin in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml bzw. 3 µg/ml und anschließender Verteilung auf die Zellen. Insgesamt wurden Mediumkontrolle, ADR, ADR+IgG und ADR+Eta untersucht. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C folgte die Zellernte. Dazu wurde der Überstand abpipettiert und bei -20°C eingefroren, um später ELISA durchführen zu können. Zur RNA-Gewinnung wurden die Zellen mit 600 µl RLT-Buffer mit 1% β-Mercaptoethanol lysiert, mit einem Schaber gelöst, durch kurzes vortexen gut resuspendiert und ebenfalls bei -20°C gelagert.

TNF-Stimulation

Vergleichbar zur Adriamycin-Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Im jeweiligen zellspezifischem Medium ohne FCS wurde TNF in den Konzentrationen 5 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml zugegeben. Zur Blockade von TNF wurde in einigen Experimenten zusätzlich Etanercept in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben. Die Proben wurden bei 37°C für 24 Stunden inkubiert und identisch zur Adriamycin-Stimulation geerntet. Überstand wurde für weitere Immunassays bei -20°C aufbewahrt. Zur RNA Gewinnung wurden die Zellen mit 600 µl RLT-Buffer mit 1% β-Mercaptoethanol lysiert, vom Kulturgefäß mit einem Spatel abgelöst, durch vortexen gut resuspendiert und ebenfalls bei 20°C aufbewahrt.

2.2.8 Apoptosefärbung

Zur Bestimmung der Apoptoserate unter Adriamycin-Stimulation wurden die Zellen wie oben beschrieben mit Adriamycin stimuliert und nach 24 Stunden geerntet. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert. Auf das Zellpellet wurde 1 ml PBS pipettiert und die adhärennten Zellen mit einem Zellkulturspatel vorsichtig abgelöst. Diese Suspension wurde in eine 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 4°C bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet erneut in 2 ml PBS resuspendiert. Nach nochmaligem Zentrifugieren und Verwerfung des Überstands wurden die Pellets mit je 100 μl Binding Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen pipettiert. In jedes FACS-Röhrchen wurden zu den 100 μl Probe 5 μl Annexin-FITC pipettiert und nach gründlichem vortexen bei Raumtemperatur für 25 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden 400 μl Binding Puffer hinzugegeben und direkt vor der Durchflussanalyse der Probe 5 μl Propidiumiodid (PI) zu pipettiert. Dabei war eine Unterscheidung der lebenden (Annexin V- und PI- negativ), von den (früh)apoptotischen (Annexin V-positiv, PI-negativ) und den spätapoptotischen, beziehungsweise nekrotischen (Annexin V- und PI-positiv) Zellen möglich.

2.3 Tierexperimente

2.3.1 Tierhaltung

Für die Tierexperimente wurden maximal fünf Mäuse in einem autoklavierten Filter-Top Käfig unter spezifisch-pathogenfreien (SPF-) Bedingungen in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel Rhythmus gehalten. Jederzeit bestand für die Tiere freier Zugang zu Wasser und Futter. Bei allen experimentellen Verfahren wurden stets die Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes beachtet. Die Tierexperimente wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.3.2 **Adriamycin-induzierte fokal segmentale Glomerulosklerose**

Die Adriamycin-Nephropathie ist ein etabliertes Modell einer FSGS. Adriamycin, auch als Doxorubicin-Hydrochlorid bezeichnet, ist ein Zytostatikum aus der Gruppe der Anthrazykline. Adriamycin interkaliert mit der DNA, was zu Strangbrüchen und somit zu einer gestörten DNA-Synthese führt. Im der Maus wirkt Adriamycin direkt toxisch auf Podozyten. Die resultierenden Pathologien in der Mausniere entsprechen dabei der FSGS beim Menschen [91]. Für das Modell der progressiven Nephropathie infolge der FSGS wurden männliche BALB/c Mäuse im Alter von 8 Wochen verwendet. Die Mäuse wurden in drei Gruppen aufgeteilt. Bei zwei Gruppen wurde eine Adriamycin-Nephropathie induziert. Eine Gruppe erhielt über die gesamte Zeit das TNF-blockierende humane Fusionsprotein Etanercept (Gruppe ADR+Eta), die andere wurde mit humanem IgG als Kontrolle zu Etanercept behandelt (Gruppe ADR+IgG). Die dritte Gruppe diente zur Kontrolle von möglichen Wirkungen des humanen IgG und erhielt kein Adriamycin (IgG-Kontrolle). Durch die zweimalige Injektion von Adriamycin am Tag 0 und Tag 14 entwickelte sich ein progredienter Nierenschaden, der sich funktionell durch Proteinurie und histologisch durch Glomerulosklerose manifestierte. Alle Injektionen, Urinentnahmen und Gewichtsbestimmungen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Nach vier Wochen wurden die Tiere euthanasiert. Nierengewebe für Histologie, RNA-Isolation sowie zur FACS-Analyse wurde gewonnen. Ebenfalls wurden Urin sowie Blut für laborchemische Diagnostik abgenommen.

Vorbereitung und Induktion der Glomerulopathie: Eine Gruppe erhielt am Tag vor der Adriamycin-Injektion und anschließend alternierend in zweitägigem Rhythmus 100 µg des TNF-blockierenden Medikaments Etanercept intraperitoneal injiziert. Dass Etanercept in der genannten Dosis in der Maus TNF effektiv blockiert wurde in diversen Vorarbeiten beschrieben [85][87][92]. Der Kontrollgruppe zu Etanercept wurde ebenfalls zum Zeitpunkt Tag -1 und dann zweitägig 100 µg humanes IgG intraperitoneal gespritzt. Der IgG-Kontrollgruppe, die kein Adriamycin erhielt, wurde ebenfalls am Tag -1 und dann jeden zweiten Tag 100 µg humanes IgG intraperitoneal appliziert. Zum Zeitpunkt null und am 14.Tag wurde gewichtsadaptiert 11,5 mg/kg Körpergewicht Adriamycin in einer Konzentration von 2 mg/ml appliziert. Bei einem Gewicht von 20 g bis 25 g wurden entsprechend zwischen 0,13 und 0,16

ml Lösung pro Tier appliziert. Die Applikation erfolgte über die Schwanzvene der Maus mit einer Butterfly-Nadel [91][93]. Im wöchentlichen Abstand (Tag 0, 7, 14, 21, 28) erfolgte eine Gewichtsbestimmung, sowie eine Entnahme von Spontanurin der Tiere. Am Tag 28 wurden die Tiere narkotisiert. Durch retrobulbäre Punktion mit einer Kapillare erfolgte eine Blutentnahme. Nach Euthanasie wurden die Nieren der Mäuse durch Perfusion mit PBS vom restlichen Blut befreit, aus der Maus entfernt und anschließend entkapselt. Von der entkapselten Niere wurde Ober- und Unterpol zur FACS-Analyse bzw. RNA-Isolation verwendet, der mittlere Teil wurde in Histologiekassetten über Nacht in 10% Formalin fixiert, in Paraffin gebettet und für histologische Analysen weiterverwendet.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Enzym linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur quantitativen Bestimmung von Proteinen in Überständen wurden Enzym linked Immunosorbent Assays (ELISA) durchgeführt. Generell wurde ein monoklonaler Antikörper, der das gesuchte Antigen bindet auf einer 96-well Platte gebunden (gecoatet). Proben, sowie Standardkonzentrationen des Antigens und Negativ-Kontrollen wurden in einzelne Wells einpipettiert. Während der ersten Inkubationsphase bindet das gesuchte Antigen an den festgebundenen Antikörper. Nach mehreren Waschschritten wurden freie Antikörper von den gebundenen Antikörpern getrennt. In der hier verwendeten Sandwichtechnik wurde mit einem zweiten Detektions-Antikörper, konjugiert mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase, der ebenfalls an das Antigen bindet inkubiert. In einem zweiten Waschschriff wurde überschüssiger Antikörper, der kein Antigen gebunden hat entfernt. Danach wurde eine 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratmischung, die durch die Meerrettich-Peroxidase in einer Farbreaktion umgesetzt wird zugegeben und für 20-30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Schwefelsäure als Stopplösung beendet und unmittelbar im Anschluss wurde mit Hilfe des ELISA-Readers das Ausmaß der Farbreaktion gemessen. Durch die bekannte Konzentration der Standardproben konnte nun die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt werden.

2 Material und Methoden

TNF, CCL2, CCL5: TNF, sowie die Chemokine CCL2 und CCL5 wurden in den Überständen stimulierter Glomerula oder Zellen nachgewiesen. Die jeweiligen Assays wurden stets nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Waschschriffe wurden vom ELISA-Plate-Washer durchgeführt. Die Absorption wurde bei 450 nm vom Tecan ELISA-Reader bestimmt und die Proteinkonzentration in Microsoft Excel berechnet.

Albumin: Zur Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin der Mäuse wurde ein konventioneller Kit nach Herstellerangaben verwendet. Der Urin wurde je nach Ausmaß der Proteinurie von 10^2 - 10^7 verdünnt. Um das Ausmaß der Proteinurie zu bestimmen wurde auf einen Urinalbumin-Teststreifen 5 μ l Mausurin pipettiert. An Hand der optischen Farbveränderung wurde bei schwacher bis mäßiger (+/++) Proteinurie die Probe in der Verdünnung 10^2 - 10^5 , bei starker bis sehr starker (+++/++++) Proteinurie die Verdünnungen 10^4 - 10^7 ausgewertet. Neben Leerwert und Standard wurden auch die Proben in dreifacher Ausführung bestimmt. Aus den drei Messungen wurde der Mittelwert gebildet.

Kreatinin: Der Urinkreatininwert wurde quantitativ via photometrischem System mit einem konventionellen Kit bestimmt. Das Prinzip des Tests basiert darauf, dass Kreatinin in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen orangen Farbkomplex bildet. Die Extinktionsdifferenz dieses Komplexes ist zu bestimmten Zeitpunkten proportional zur Kreatininkonzentration. Zur Messung wurden Urinproben 1:10 mit Aqua ad injectabilia in eine 96 well Platte einpipettiert. Anschließend wurden 200 μ l Reagenzienmischung von vier Teilen R1 (Natriumhydroxid) und einem Teil R2 (Pikrinsäure) hinzugefügt und bei 492 nm im Tecan Reader gemessen. Über den Standard lässt sich nun die Kreatininkonzentration wie folgt berechnen:

$$\text{Kreatinin}[\text{mg}/\text{dl}] = \frac{\Delta E\text{-Probe}}{\Delta E\text{-Standard} / \text{Kal}} \times \text{Konz. Standard/Kal} [\text{mg}/\text{dl}] \times 50$$

2.4.2 Durchflusszytometrie

Die Bestimmung von zellulären Oberflächenantigenen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting $\hat{=}$ FACS) durchgeführt. Das Gerät FACSkalibur und das Computerprogramm Cell Quest wurden dazu verwendet.

Funktionsprinzip: Man kann Zellen auf Grund ihrer Größe, Struktur, sowie intra- und extrazellulären Bestandteilen wie beispielsweise Oberflächenantigenen differenzieren. Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, viele tausend Zellen in einem laminaren Strom einzeln an einem Laser passieren zu lassen. Aussagen zur Zellgröße lassen sich über das Vorwärtsstreulicht (Forward-Scatter, FSC) machen, die Granularität wird über das im 90° Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (Sideward-Scatter, SSC) bestimmt. Zur Detektion von Oberflächenantigenen werden Antikörper verwendet, die entweder selbst mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) gekoppelt sind oder von einem zweiten Fluoreszenz-markierten Detektionsantikörper gebunden werden können. Der Laserstrahl trifft die Antikörpermarkierten Zellen und regt so die Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission an. Das emittierte Licht wird vom FACS-Gerät detektiert. Jeder Farbstoff emittiert in einem spezifischen Spektrum, was eine Unterscheidung ermöglicht. Wenn mehrere Fluorochrome gleichzeitig gemessen werden, kann es zu Überschneidungen der Emissionswellenlänge kommen. Um dieses Phänomen zu korrigieren ist eine Kompensation notwendig. Als Kontrolle verwendet man einfach gefärbte Zellen und subtrahiert den Teil, der in die anderen Kanäle einstrahlt. Folgende Fluorochrome wurden in dieser Arbeit verwendet: Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Phycoerythrin-Cyanine 5 (PE-Cy5).

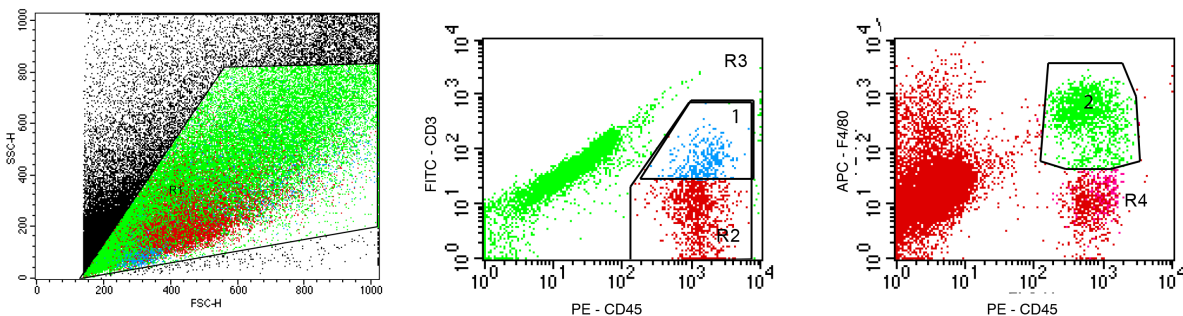


Abbildung 2.1: FACS Analyse: Mittels FACSskalibur wurden Niereneinzelzell-suspensionen analysiert. Hier sind von links nach rechts die Rohdaten mit Forward-Scatter und Sideward-Scatter dargestellt. Über die verschiedenen Fluorochromkanäle wurden einzelne Oberflächenmerkmale betrachtet. In der mittleren Abbildung ist die Detektion renaler CD45-positiver, CD3-positiver T-Lymphozyten (1) dargestellt, in der rechten Abbildung CD45-positiv, F4/80-positiv Phagozyten (2).

2 Material und Methoden

Oberflächenantigenbestimmung von Nierenzellen: Zur Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltration wurde pro Maus eine Niere entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurde nach der oben beschriebenen Methode die Niere blutleer gespült. Anschließend wurde diese entnommen, entkapselt und in eine sterile Petrischale, deren Boden mit Paris-Puffer bedeckt war gegeben. Mit einem Skalpell wurde die Niere in circa 0,5 mm² Stücke zertrennt. Nach einem Waschgang mit 10 ml eisgekühltem HBSS mit Ca²⁺, Mg²⁺ erfolgte der Verdau mit 5 ml vorgewärmter Kollagenase/DNase-Lösung für 20 Minuten im 37°C Wasserbad. Anschließend folgte erneut ein Waschgang mit HBSS mit Ca²⁺, Mg²⁺, und ein weiterer Verdauungsschritt mit 2mM EDTA für 20 Minuten im Wasserbad. Anschließend wurde der Überstand in ein 15 ml Falconröhrchen auf Eis gestellt und das Zellpellet ein letztes Mal für 20 Minuten im Wasserbad mit Kollagenase verdaut. Nach Rückführung des Überstands zum Pellet wurde die Suspension zuerst durch eine 26 G dann durch eine 30 G Kanüle in eine Petrischale gespritzt, um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Nach zwei weiteren Waschschritten des Pellets mit eisgekühltem PBS wurde die Zellsuspension bei 250 g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde das Pellet nun in 1 ml FACS-Puffer gelöst und durch einen 70 µm Cell-Strainer gefiltert. Anschließend wurde dieser mit 10 ml eisgekühltem DPBS gespült. Nach erneutem Zentrifugieren bei 250 g für 5 Minuten wurde das Zellpellet in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und Aliquots zur durchflusszytometrischen Färbung verwendet. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde in jedes FACS-Röhrchen 10 µl 1:1 gemischtem Rattenserums und Mausserums pipettiert. Es folgten 100 µl der Zellsuspension in jedes FACS-Röhrchen und eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 1,4 µl jedes Fluorochrom-markierten Antikörpers zupipettiert und die Röhrchen für eine Stunde im Dunkeln auf Eis inkubiert. Es folgte noch ein Waschschriff mit DPBS und erneutes Zentrifugieren für 5 Minuten bei 250 g. Anschließend wurde 2 ml FACS-Puffer auf die Proben gegeben, gevortext und mit der Durchflussanalyse begonnen (Abbildung 2.1). Bei großer Zellzahl wurde die Probe mit DPBS verdünnt. Die Niereinzelsuspension wurden mit 4-fach Färbung:

CD45-PE (alle Leukozyten), CD3-FITC (alle T-Zellen), CD8- PE-Cy5 (zytotoxische T-Zellen), CD4-APC (T-Helfer-Zellen)

und 3-fach Färbung:

CD45-PE (Leukozyten), CD11c-FITC (dendritische Zellen), F4/80-APC (Makropha-

gen/Phagozyten)

gefärbt. Zu jeder Färbung wurde eine Isotypkontrolle gefärbt. Die renale Infiltration von Leukozyten und Leukozytensubpopulationen wurde als Anteil Leukozyten an Gesamtnierenzellen quantifiziert.

Nachweis von apoptotischen oder nekrotischen Zellen: Um apoptotische und nekrotische Zellen darzustellen, wurde das Annexin V Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die mit Adriamycin stimulierten Podozyten und Mesangialzellen wurden mit Annexin V und PI angefärbt und im FACS ausgewertet.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte bei sämtlichen Zelllinien, sowie den Glomerula durch das RNeasy-Kit nach Herstellerangaben. Die reifen Zellen wurden mit sterilem PBS gewaschen und anschließend mit 600 µl RLT-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol resuspendiert. Da sowohl Podozyten als auch Mesangialzellen und Glomerula adhärenente Zellen sind wurden die Zellen zusätzlich mit einem flexiblen Zellschaber vom Kulturgefäß gelöst. Bis zur eigentlichen Aufarbeitung konnte die RNA bei -20°C gelagert werden. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und für 20 Minuten bei Raumtemperatur in den Thermomixer gestellt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Nun wurden 600 µl 70%-iger Ethanol einpipettiert und das Lysat in eine Säule mit einem 2 ml Auffangröhrchen gegeben und bei 8000 G für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss im Auffanggefäß wurde verworfen. Es folgte die Zugabe von 350 µl RW-Puffer auf jede Säule. Die Säulen wurden ebenfalls für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zum DNA-Verdau wurde je Probe 80 µl DNase Lösung (10 µl DNase mit 70 µl RDD Puffer) pipettiert, die Proben vom Eis genommen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl RW-Puffer wurden die Proben wieder für 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert. Das Auffangröhrchen wurde nun gewechselt. Anschließend wurden 500 µl RPE- Puffer zupipettiert, 15 Sekunden bei 8000 g zentrifugiert und nochmals 500 µl RPE-Puffer zugegeben. Nach 2 minütigem Zentrifugieren bei 8000 g wurde ein fri-

2 Material und Methoden

sches Auffangröhrchen verwendet und für 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 35 µl RNase-freiem Wasser in jedes Reaktionsgefäß bevor diese ein letztes Mal für 1 Minute bei 8000 g zentrifugiert wurden. Die Auffanggefäße waren nun RNasefreie Reaktionsgefäße, die anschließend sofort bei -20°C gelagert wurden.

2.5.2 Bestimmung des RNA-Gehalts

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde mit einem Spektrometer durchgeführt. Dazu wurden 2 µl RNA-Lösung 1:50 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und die optische Dichte im Spektrometer bei 260 bzw. 280 nm gemessen. Die RNA-Konzentration einer Probe in µg/ml wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Extinktion} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Probe wurde als rein angesehen, wenn das Verhältnis (260/280) $\geq 1,8$ betrug.

2.5.3 cDNA Synthese

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Amplifizierung DNA benötigt, weshalb die aufgereinigte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden muss. Dazu wurden die RNA-Proben zuerst auf 1 µg/20 µl mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser verdünnt. Ein Mastermix wurde aus 9 µl Fünffach-Puffer, 1 µl 25mM dNTP Mischung, 2 µl 0,1M TTP, 1 µl 40Uµl RNasin, 0,5 µl Acrylamid [15 µg/ml], 0,5 µl Hexanukleotide und 1 µl Superskript hergestellt. Zur Kontrolle von Amplifizierung genomischer DNA wurde anstelle des Enzyms Superskript RNase freies Wasser verwendet (sogenannte RT-minus Probe). 15 µl Mastermix wurden zu den 1 µg/20 µl RNA Proben pipettiert und in einem Schüttler bei 42°C für eine Stunde inkubiert. Bis zur Weiterverwendung wurden die cDNA Proben bei -20°C gelagert.

2.5.4 Quantitative real-time PCR

Um die mRNA-Expression zu quantifizieren, wurde die quantitative real-time PCR durchgeführt. Diese erfolgte mit dem Gerät TaqMan ABI Prism 7700 Sequence De-

tection System. Das Prinzip der RT-PCR besteht darin, dass im Gegensatz zur regulären PCR die Amplifikationsreaktion fortlaufend mittels Fluoreszenzmarkierung photometrisch gemessen wird. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist dabei in jedem Zyklus direkt proportional zur Menge des amplifizierten DNA Produkts. Dies wiederum erlaubt einen Rückschluss auf die eingesetzte Nukleinsäuremenge. Je Probe wird ein Cycle Threshold (CT)- Wert aufgezeichnet. Dieser ist gleich der Zyklusanzahl, welche einen festgesetzten Schwellenwert überschreitet, und sich so vom Hintergrundsignal unterscheidet. Je mehr Substrat am Anfang vorhanden ist, desto weniger Zyklen sind nötig um eine signifikante Fluoreszenz zu detektieren. Man setzt eine relative Quantifizierung ein, welche das zahlenmäßige Verhältnis der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz bestimmt. Diese endogenen Referenzsequenzen nennt man Housekeeper Gen (18S-RNA oder GAPDH), sie sind in allen Proben gleichermaßen enthalten.

Zur Fluoreszenzmarkierung verwendet man beim TaqMan sequenzspezifische Primer, die mit einem Reporterfarbstoff und einem Quencher konjugiert sind. Dabei wird, solange Farbstoff und Quencher verbunden sind, die Fluoreszenz blockiert. Wird während der PCR das Konjugat durch die TaqMan DNA-Polymerase gespalten kommt es zur Freisetzung des Reporterfarbstoffs und zur entsprechenden Fluoreszenz.

Zur Durchführung der PCR wurden die Proben 1:10 verdünnt. Der TaqMan universal PCR Mastermix enthält PCR-Puffer, dNTP und die DNA-Polymerase AmpliTaqGold. Forward und Reverse Primer wurden bei einer Endkonzentration von 300 nM und die Proben bei einer Endkonzentration von 100 nM verwendet. Je 18 µl Mastermix und 2 µl der verdünnten cDNA-Probe wurden in Wells einer 96-well Platte pipettiert. Die Platte wurde gut verschlossen und bei 280 G zentrifugiert, bevor die TaqMan Analyse gestartet wurde. Die Temperatureinstellung für Proben und Housekeeper Gene wurden wie folgt gewählt: 2 Minuten auf 50°C, 10 Minuten auf 95°C, 40 Zyklen je 15 Sekunden bei 95°C gefolgt von einer einminütigen Inkubation auf 60°C. Die CT-Werte wurden mit der ABI PRISM Sequence Detection Software aufgezeichnet und im Verhältnis zu den Housekeeper Genen quantifiziert. Die Kontrollläufe (RT-minus Proben) zeigten weder für die Proben, noch für die Housekeeper Gen eine Amplifikationsreaktion, sodass eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen ist.

2.6 Histologische Untersuchungen

Aufbereitung und Analyse von Nierengewebe: Die histologische Aufbereitung wurde freundlicherweise unter Assistenz von Dan Draganovici und Jana Mandelbaum durchgeführt. Die entnommenen Nieren wurden in Histologiekassetten überführt, mit 10% Formalin in PBS über Nacht fixiert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet. Auf einem mit APES vorbehandeltem Objektträger wurden 2 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt und für 12 Stunden im Trockenschrank bei 37°C gelagert. Im ersten Schritt jeder Färbung wurden die Schnitte in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50%) entparaffiniert und mit PBS gespült. Für die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung wurden die entparaffinierten Nierenschnitte für 5 Minuten in Mayer's Hämalaun getaucht und anschließend in Wasser gebläut. Die Eosin-Färbung erfolgte mit 2% Eosin-Lösung für 5 Minuten. Mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol wurden die Schnitte dehydriert und schließlich eingedeckt.

Die semiquantitative Evaluation der glomerulären Sklerose an Periodic acid Schiff (PAS)-gefärbten Gewebeschnitten durchgeführt. Dabei wurde unter dem Mikroskop der prozentuale Anteil der sklerosierten Fläche in Glomerulus beurteilt. Eine sklerosierte Fläche kleiner 25% wurde mit einem Wert von 0 angegeben, 25-50% ein Wert von 1, 50-75% Wert von 2, und größer 75% Sklerosierung mit einem Wert von 3. Pro Tier wurden 50 Glomerula (25 pro Niere) ausgewertet. Dabei wurden Werte von 1 einzeln, 2 doppelt und 3 dreifach gewertet und durch die gesamte Glomerulaanzahl (50) geteilt.

Für die immunhistologischen Färbungen wurden folgende Antikörper und Antikörperkonzentrationen verwendet: Ratte Anti-F4/80 (Makrophagen, 1:50) und Ratte Anti-CD3 (T-Lymphozyten, 1:50). Zur Identifikation von Fibroblasten wurde alpha-Smooth Muscle Actin (SMA) verwendet.

2.7 Statistik

Für die *in vitro* Ergebnisse sind Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchen angegeben. Bei den Tierexperimenten wurden bei Adriamycin-Behandlung

eine Gruppengröße von 14 Tieren pro Gruppe gewählt, bei der IgG-Kontrolle eine Gruppengröße von fünf Tieren. Bei den Daten wurden Mittelwert (MW) mit Standardfehler (SEM) bestimmt. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde beim Vergleich zweier Gruppen der Student t-Test beziehungsweise bei mehr als zwei Gruppen ANOVA sowie Dunns Comparison post-hoc Test angewandt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen und mit „*“ gekennzeichnet. Die statistische Berechnung und graphische Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism 5.0.

Ergebnisse

Wie in der Einleitung erwähnt, spielt TNF bei einer Vielzahl von Nierenerkrankungen eine wichtige Rolle als Mediator einer inflammatorischen Nierenschädigung. Sowohl Podozyten als auch Mesangialzellen sind in der Lage, nach Stress oder Kontakt mit exogenen Stimuli TNF zu sezernieren [94]. Bisher wurde die Rolle von TNF bei der Adriamycin-Nephropathie nicht genauer charakterisiert. Effekte einer TNF-Blockade als potentielle Therapie der Glomerulosklerose ist in diesem Modell ebenfalls noch nicht untersucht worden, obwohl eine Blockade von TNF in anderen, nicht entzündlichen Nierenerkrankungen, positive Ergebnisse zeigte [86]. Aus diesem Grund erfolgten in der vorliegenden Arbeit zunächst *in vitro* Untersuchungen einer möglichen Adriamycin-induzierten Sekretion von TNF und inflammatorischen Chemokinen in glomerulären Zellen. Hierfür wurden primäre Glomerula *ex vivo*, immortalisierte Podozyten sowie immortalisierte Mesangialzellen mit Adriamycin stimuliert. Es wurde die TNF-Freisetzung untersucht und die Effekte einer medikamentösen TNF-Blockade mit dem TNFR2-IgG1 Fusionsprotein Etanercept auf die Chemokinsekretion und Apoptoserate *in vitro* evaluiert. Nachdem diese Untersuchungen auf eine mögliche TNF-vermittelte CCL2-Sekretion in Adriamycin-exponierten Mesangialzellen hinwiesen, erfolgten anschließend *in vivo* Experimente, die Effekte einer TNF-blockierenden Therapie mit Etanercept im FSGS-Modell der Adriamycin-Nephropathie charakterisierten.

3.1 Effekt von Adriamycin auf die TNF-Sekretion von Glomerula und Nierenzellen in vitro

Um mögliche Effekte von Adriamycin auf die TNF-Sekretion im Glomerulum bei der Adriamycin-induzierten Nephropathie zu evaluieren, wurden primäre Glomerula in Kultur genommen und mit Adriamycin in der Konzentration 0,3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich wurde je eine Gruppe mit TNF-blockierendem Etanercept 10 µg/ml (ADR+Eta) oder, als Kontrolle zu Etanercept, mit humanem IgG 10 µg/ml (ADR+IgG) stimuliert. Die Konzentration des sezernierten TNF im Überstand wurde mittels ELISA gemessen. In Glomerula führte die Adriamycin-Stimulation mit 0,3 µg/ml zu keiner signifikant erhöhten TNF-Freisetzung. Etanercept-Behandlung in Adriamycin-stimulierten Glomerula führte zu einer Erniedrigung der TNF-Konzentrationen im Überstand, die allerdings nicht signifikant war (Abbildung 3.1 Medium 2,78 ± 0,27 pg/ml; ADR 3,38 ± 0,37 pg/ml; ADR+IgG 4,08 ± 1,15 pg/ml; ADR+Eta 2,16 ± 0,56 pg/ml).

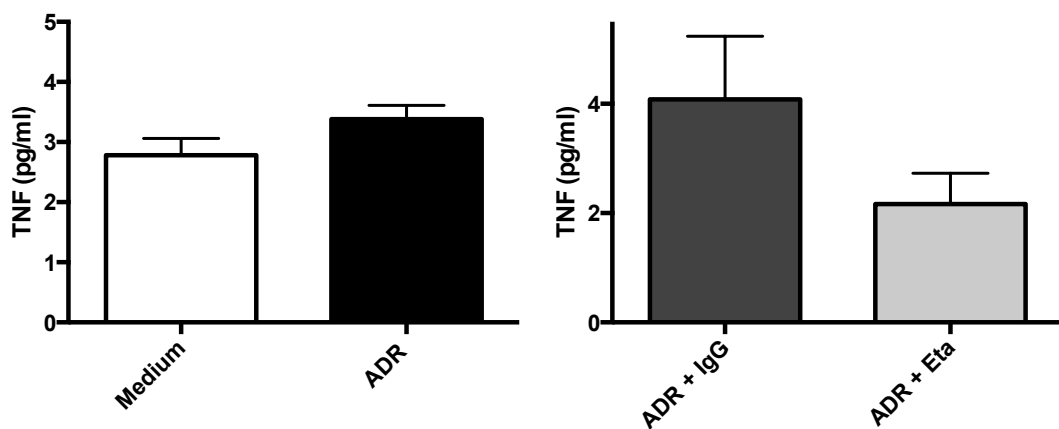


Abbildung 3.1: TNF-Sekretion in Glomerula nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin: Primäre Glomerula ex vivo wurden mittels Beads-Technik gewonnen und für 24 Stunden mit Adriamycin in einer Konzentration von 0,3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich wurde je eine Gruppe mit 10 µg/ml IgG (ADR + IgG) bzw. 10 µg/ml Etanercept (ADR + Eta) stimuliert. Mittels ELISA wurde die TNF-Konzentration im Überstand bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3

3.1 Effekt von Adriamycin auf die TNF-Sekretion von Glomerula und Nierenzellen in vitro

Im Folgenden wurde die Adriamycin-Stimulation mit einer zehnfach höheren, wie in der Literatur beschrieben, Adriamycin-Konzentration von 3 µg/ml durchgeführt [94]. In den Glomerula führte die Adriamycin-Stimulation zu einer signifikanten, doppelt so hohen TNF-Freisetzung wie in der Mediumkontrolle. Eine TNF-Blockade durch Etanercept führte im Vergleich zur IgG-Kontrollbehandlung zu einer tendenziellen, allerdings nicht signifikanten Verminderung der TNF-Spiegel nach Adriamycin-Stimulation (Abbildung 3.2 Medium 2.65 ± 0.28 pg/ml; ADR 4.96 ± 0.65 pg/ml; ADR+IgG 3.93 ± 0.69 pg/ml; ADR+Eta 2.31 ± 0.83 pg/ml).

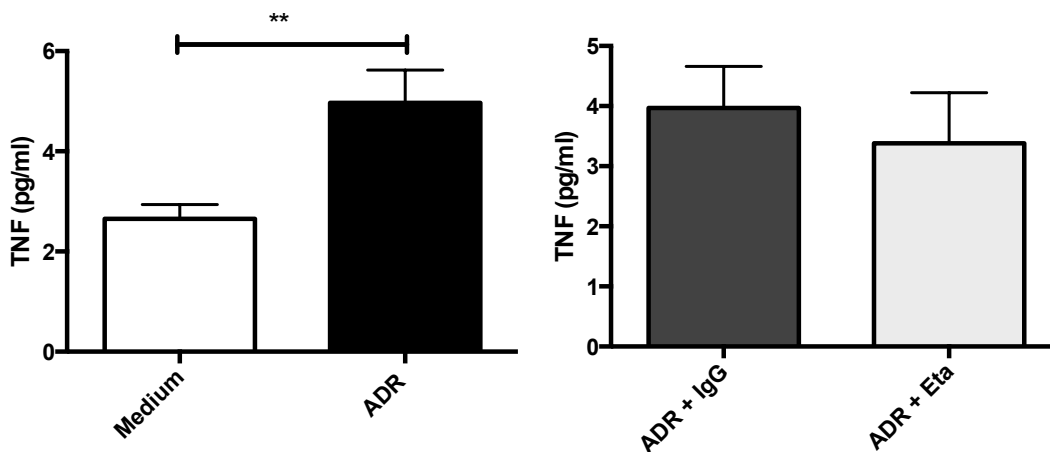


Abbildung 3.2: TNF-Sekretion in Glomerula nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin: Primäre Glomerula ex vivo wurden mittels Beads-Technik gewonnen und für 24 Stunden mit Adriamycin in einer Konzentration von 3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich wurde je eine Gruppe mit 10 µg/ml IgG (ADR + IgG) bzw. 10 µg/ml Etanercept (ADR + Eta) stimuliert. Mittels ELISA wurde die TNF-Konzentration im Überstand bestimmt. Dargestellt sind MW \pm SEM. n=3. ** $p \leq 0,01$

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Adriamycin-Stimulation eine glomeruläre Freisetzung von TNF ex vivo, unabhängig von infiltrierenden Leukozyten induziert. Außerdem kam es unter Adriamycin-Stimulation zu einer verminderten Verfügbarkeit von TNF unter Etanercept-Behandlung im Vergleich zur IgG-Kontrolle.

Um zu evaluieren, ob eine einzelne Zellpopulation besonders stark auf Adriamycin reagiert, oder der alleinige Ursprung des TNF ist, wurden immortalisierte Podozyten und immortalisierte Mesangialzellen mit 0,3 µg/ml Adriamycin stimuliert. Bei

3 Ergebnisse

Podozyten zeigte sich keine signifikante Veränderung der TNF-Konzentration nach Adriamycin-Stimulation oder Etanercept-Gabe (Abbildung 3.3A Medium $2,44 \pm 0,34$ pg/ml; ADR $2,54 \pm 1,08$ pg/ml; 3.3B ADR+IgG $3,09 \pm 0,62$ pg/ml; ADR+Eta $2,38 \pm 0,65$ pg/ml). Dagegen trat bei Mesangialzellen eine signifikante Steigerung der TNF-Sekretion nach Adriamycin-Stimulation auf. Eine Etanercept-Behandlung reduzierte signifikant die TNF-Konzentration im Überstand im Vergleich zur Gruppe mit Kontroll-IgG (Abbildung 3.3C Medium $2,15 \pm 0,06$ pg/ml; ADR $3,66 \pm 0,15$ pg/ml; 3.3D ADR+IgG $4,15 \pm 0,58$ pg/ml; ADR+Eta $2,26 \pm 0,41$ pg/ml).

Auch nach Stimulation der Podozyten mit erhöhter Adriamycin-Konzentration ($3 \mu\text{g/ml}$) zeigte sich keine vermehrte Sekretion von TNF. Die TNF-Spiegel waren tendenziell niedriger als die der Mediumkontrolle. Etanercept hatte keinen Einfluss auf die TNF-Sekretion (Abbildung 3.4A Medium $2,51 \pm 0,39$ pg/ml; ADR $1,46 \pm 0,34$ pg/ml; 3.4B ADR+IgG $1,65 \pm 0,23$ pg/ml; ADR+Eta $1,68 \pm 0,54$ pg/ml). Dies ist möglicherweise durch Zytotoxizität der höheren Adriamycin-Konzentration erklärbar. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine signifikant erhöhte TNF-Sekretion unter Adriamycin-Stimulation der Mesangialzellen mit $3 \mu\text{g/ml}$ im Vergleich zur Mediumkontrolle. Etanercept-Behandlung hatte allerdings keinen signifikanten Effekt auf die TNF-Sekretion in Adriamycin-behandelten Mesangialzellen im Vergleich zu IgG-behandelten Mesangialzellen (Abbildung 3.4C Medium $2,29 \pm 0,08$ pg/ml; ADR $3,26 \pm 0,36$ pg/ml; 3.4D ADR+IgG $3,74 \pm 0,16$ pg/ml; ADR+Eta $3,29 \pm 0,21$ pg/ml).

Die Ergebnisse zeigen, dass Adriamycin *in vitro* direkt eine erhöhte Freisetzung von TNF in Glomerula und immortalisierten Mesangialzellen bewirkt. Somit können intrinsische glomeruläre Zellen eine Quelle von TNF bei der Schädigung durch Adriamycin sein. Darüberhinaus reduziert eine TNF-blockierende Behandlung mit Etanercept TNF-Konzentrationen im Überstand von Adriamycin-stimulierten Glomerula und Mesangialzellen, und damit die parakrine Verfügbarkeit von biologisch aktivem TNF. Zudem scheint eine Adriamycin-Dosis von $3 \mu\text{g/ml}$ Podozyten zu schädigen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Adriamycin-induzierte glomeruläre TNF-Sekretion zur glomerulären Schädigung bei der Adriamycin-Nephropathie beitragen könnte. Nachdem für proinflammatorische Chemokine wie CCL2 und CCL5 eine pathophysiologische Rolle in der Adriamycin-Nephropathie beschrieben wurde, wurde im Folgenden eine TNF-induzierte Chemokinsekretion in glomerulären Zellen untersucht.

3.1 Effekt von Adriamycin auf die TNF-Sekretion von Glomerula und Nierenzellen in vitro

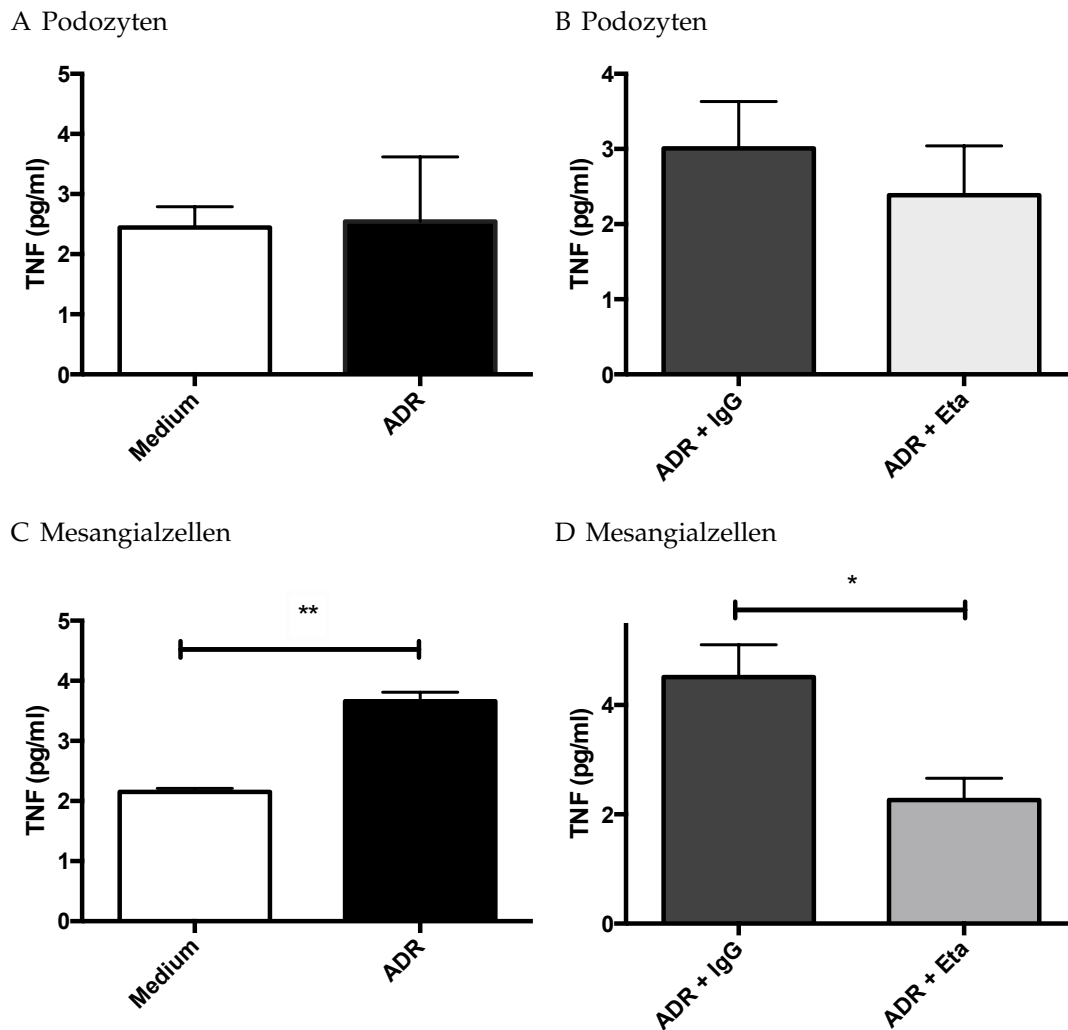


Abbildung 3.3: Stimulation von Podozyten und Mesangialzellen mit 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Adriamycin: Immortalisierte Podozyten und Mesangialzellen wurden für 24 Stunden mit 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Adriamycin stimuliert. Zusätzlich wurde je eine Gruppe mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG (ADR + IgG) bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Etanercept (ADR + Eta) stimuliert. Im Überstand wurde mittels ELISA die TNF-Konzentration bestimmt. Dargestellt sind MW \pm SEM. n=3. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

3 Ergebnisse

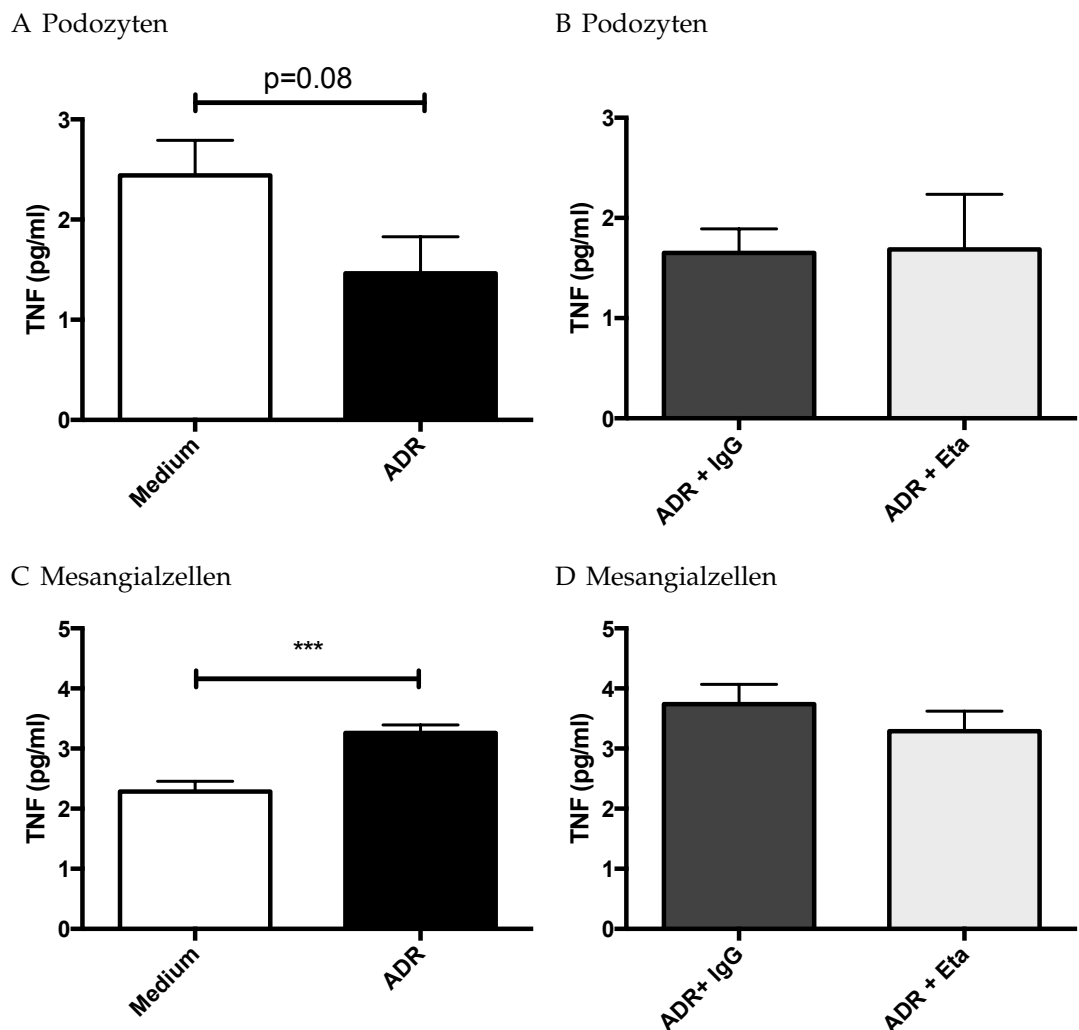


Abbildung 3.4: TNF-Sekretion in Podozyten und Mesangialzellen nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin: Immortalisierte Podozyten bzw. Mesangialzellen wurden für 24 Stunden mit 3 µg/ml Adriamycin stimuliert. Zusätzlich wurde je eine Gruppe mit 10 µg/ml IgG (ADR + IgG) bzw. 10 µg/ml Etanercept (ADR + Eta) stimuliert. Im Überstand wurde mittels ELISA die TNF-Konzentration bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3. *** p ≤ 0,001

3.2 TNF-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro

Chemokine sind bei entzündlichen und nicht-entzündlichen Nierenerkrankungen maßgeblich an der Krankheitsprogression beteiligt [95]. Sowohl CCL2, als auch CCL5 spielen im Modell der Adriamycin-Nephropathie eine wichtige Rolle [27][96]. CCL2 rekrutiert inflammatorische Zellen wie Makrophagen und unreife dendritische Zellen in das entzündete Gewebe und vermittelt so renalen Schaden. Makrophagen selbst, Mesangialzellen und tubuläre Epithelzellen exprimieren CCL2 und CCL5 [97]. In unserer Gruppe wurde gezeigt, dass die medikamentöse Blockade des CCL5-Rezeptors CCR1 zu einer deutlich geringeren Fibrose des Interstitiums im Adriamycin-Modell führt [93]. Auch andere Arbeiten zeigten, dass beide Chemokine zusammen maßgeblich an interstitieller Fibrose beteiligt sind. Eine Impfung gegen CCL2 und CCL5, nicht aber isoliert gegen CCL2, führt zu einer deutlich abgeschwächten Fibrose im Modell der Adriamycin-Nephropathie [97]. Ob TNF die Sekretion von CCL2 oder CCL5 fördert wurde im Adriamycin-Modell noch nicht untersucht. Da sich bei den Adriamycin-Stimulationen eine vermehrte Freisetzung von TNF in glomerulären Zellen zeigte, wurde der Effekt von TNF auf die Chemokinproduktion in diesen Zellen evaluiert.

Sowohl Podozyten als auch Mesangialzellen wurden mit rekombinantem murinen TNF stimuliert. Ob die Höhe der TNF-Konzentration eine Rolle auf die Chemokinsekretion spielt wurde evaluiert, indem die Zellen mit den TNF-Konzentrationen 5 pg/ml, 25 pg/ml, 50 pg/ml stimuliert wurden. Mittels ELISA wurde die Chemokinsekretion von CCL2 und CCL5 bestimmt. Hier zeigte sich ein dosisabhängiger Anstieg der Chemokinsekretion unter TNF-Stimulation. TNF-Konzentrationen von 5 pg/ml führten in Podozyten bereits zu einer signifikant erhöhten CCL2-Sekretion im Vergleich zur Mediumkontrolle (Medium 996 ± 62 pg/ml; TNF5 1518 ± 101 pg/ml). Bei Mesangialzellen kam es dagegen zu keiner vermehrten CCL2-Sekretion (Medium 350 ± 47 pg/ml; TNF5 355 ± 98 pg/ml). Hinsichtlich der CCL5-Sekretion kam es weder bei Podozyten, noch bei Mesangialzellen zu einer Steigerung nach 5 pg/ml TNF (Podozyten: Medium 317 ± 51 pg/ml; TNF5 355 ± 39 pg/ml Mesangialzellen: Medium 538 ± 109 pg/ml; TNF5 744 ± 289 pg/ml). Nach Stimulation mit einer TNF-

3 Ergebnisse

Konzentration von 25 pg/ml beziehungsweise 50 pg/ml steigerte sich die Chemokinfreisetzung je nach Chemokin und Zellart um das sechs bis 30-fache (Podozyten: CCL2 TNF25 6653 ± 565 pg/ml; TNF50 8047 ± 1064 pg/ml CCL5 TNF25 8717 ± 3020 pg/ml; TNF50 10436 ± 3831 pg/ml; Mesangialzellen: CCL2 TNF25 13204 ± 1070 pg/ml; TNF50 13800 ± 711 pg/ml; CCL5 TNF25 4913 ± 2008 pg/ml; TNF50 7347 ± 2408 pg/ml). Um den Effekt der TNF-Blockade auf die Chemokinsekretion in vitro zu zeigen, wurden Podozyten und Mesangialzellen mit einer TNF-Konzentration von 50 pg/ml unter Zugabe von 10 µg/ml Etanercept stimuliert. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der Chemokinsekretion fast auf Mediumkontrollwerte. Dieses Ergebnis zeigte sich in Podozyten und Mesangialzellen, sowohl hinsichtlich von CCL2, als auch CCL5 (Abbildungen 3.5A Podozyten CCL2 T50+Eta 994 ± 142 pg/ml; 3.5B Mesangialzellen CCL2 T50+Eta 595 ± 108 pg/ml; 3.5C Podozyten CCL5 T50+Eta 323 ± 87 pg/ml; 3.5D Mesangialzellen CCL5 T50+Eta 1260 ± 343 pg/ml).

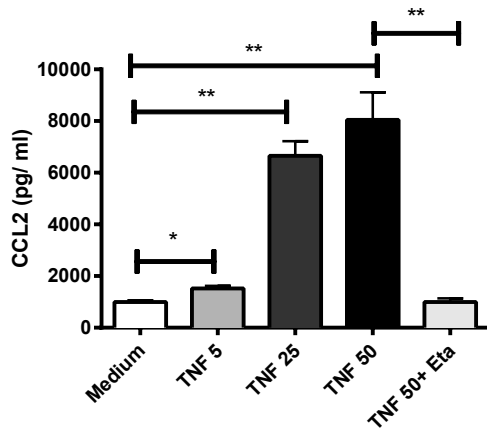
Die Ergebnisse der TNF-Stimulation zeigen, dass es durch TNF zu einem dosisabhängigen Sekretionsanstieg der Chemokine CCL2 und CCL5 in Podozyten und Mesangialzellen kommt. Ebenfalls zeigen die Versuche, dass die TNF-Blockade mittels Etanercept zu einer signifikanten Reduktion der Chemokinsekretion fast auf Mediumniveau führt. Adriamycin-Exposition könnte daher über eine TNF-Induktion zur Freisetzung der profibrotischen und proinflammatorischen Chemokine CCL2 und CCL5 führen. Diese ist durch Etanercept fast vollständig reversibel. Ob nun Adriamycin in vitro zu einer TNF-vermittelten Chemokinsekretion führt, die durch Etanercept blockiert werden kann, wurde in den nächsten Experimenten untersucht.

3.3 Adriamycin-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro

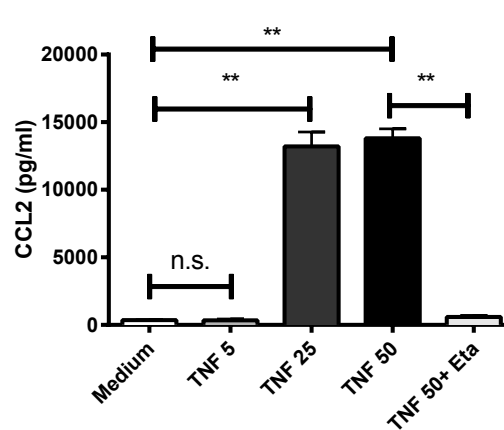
Die bisherigen Versuche zeigten, dass Adriamycin-Stimulation eine vermehrte Sekretion von TNF in Nierenzellen induziert. Ebenfalls wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit TNF zur vermehrten Ausschüttung der Chemokine CCL2 und CCL5 in Podozyten und Mesangialzellen führt. Folglich könnte die Stimulation mit Adriamycin über erhöhte TNF-Freisetzung zu einer gesteigerten Expression und Sekretion von

3.3 Adriamycin-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro

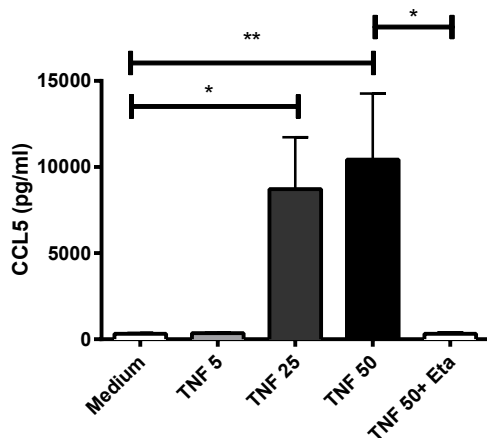
A Podozyten



B Mesangialzellen



C Podozyten



D Mesangialzellen

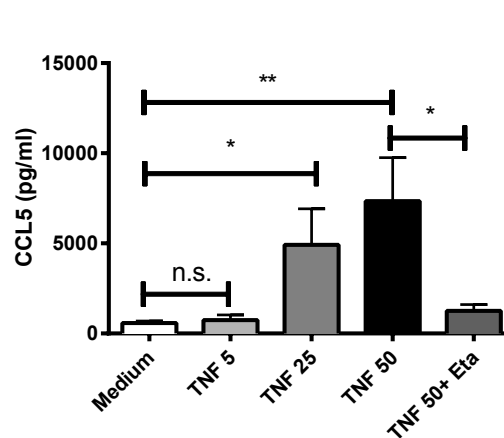


Abbildung 3.5: TNF-induzierte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Podozyten und Mesangialzellen Podozyten und Mesangialzellen wurden für 24 Stunden mit TNF in aufsteigender Konzentration von 5 pg/ml, 25 pg/ml, 50 pg/ml stimuliert. Zudem erfolgte eine TNF-Blockade mittels Etanercept (TNF 50 pg/ml + Eta 10 µg/ml). Die Sekretion der Chemokine CCL2 (A,B) und CCL5 (C,D) wurde anschließend mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3 * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

3 Ergebnisse

Chemokinen in Nierenzellen führen. Somit könnte TNF als ein maßgeblicher Faktor an der Adriamycin-Nephropathie beteiligt sein. Um den direkten Effekt von Adriamycin auf Glomeruli und intrinsische Nierenzellen hinsichtlich der Chemokinsekretion zu bestimmen, wurde die Adriamycin-induzierte Chemokinsekretion *in vitro* untersucht.

Glomerulastimulation:

Primäre Glomerula wurden mittels DynaBeads-Technik isoliert, in Kultur genommen und mit Adriamycin in der Konzentration 0,3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich wurde je eine Gruppe mit Adriamycin und TNF-blockierendem Etanercept 10 µg/ml oder Adriamycin und humanem IgG 10 µg/ml stimuliert und die induzierte Chemokinsekretion von CCL2 und CCL5 im Überstand mittels ELISA gemessen.

Es zeigte sich, dass die CCL2-Freisetzung nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin im Vergleich zur Mediumkontrolle hochsignifikant anstieg (Abbildung 3.6A Medium 404 ± 117 pg/ml; ADR 929 ± 73 pg/ml). Eine signifikante Verminderung der CCL2-Sekretion unter ADR+Eta-behandelten Glomerula gegenüber der IgG-Kontrolle bestätigte, dass TNF zu einer Chemokinsekretion führt und die TNF-Blockade mittels Etanercept *ex vivo* die glomeruläre CCL2-Sekretion vermindern kann (Abbildung 3.6B ADR+IgG 711 ± 46 pg/ml; ADR+Eta 294 ± 61 pg/ml).

Hinsichtlich der CCL5-Freisetzung zeigte sich eine Verminderung in Adriamycin-exponierten Glomerula, die durch TNF-Blockade mit Etanercept nicht beeinflusst wurde (Abbildung 3.6C Medium 181 ± 9 pg/ml; ADR 145 ± 1 pg/ml; 3.6D ADR+IgG 153 ± 2 pg/ml; ADR+Eta 137 ± 2 pg/ml). Im Gegensatz zu CCL2 induziert Adriamycin in dem 24-stündigen Beobachtungszeitraum keine CCL5-Sekretion.

Nach Stimulation der Glomerula mit der höheren Adriamycin-Konzentration von 3 µg/ml war im Vergleich zur Mediumkontrolle die CCL2-Sekretion signifikant reduziert (Abbildung 3.7A Medium 241 ± 13 pg/ml; ADR 77 ± 14.9 pg/ml). Die Etanercept-Behandlung verminderte die CCL2-Sekretion nochmals signifikant im Vergleich zu ADR+IgG 3.7B ADR+IgG 56 ± 4 pg/ml; ADR+Eta 36 ± 3 pg/ml). Die CCL5-Freisetzung wurde durch die Adriamycin-Exposition mit 3 µg/ml nicht beeinflusst (Abbildung 3.7C Medium 181 ± 9 pg/ml; ADR 157 ± 5 pg/ml; 3.7D ADR+IgG 150 ± 2 pg/ml; ADR+Eta 149 ± 9 pg/ml). Die verminderte CCL2-Sekretion könnte

3.3 Adriamycin-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro

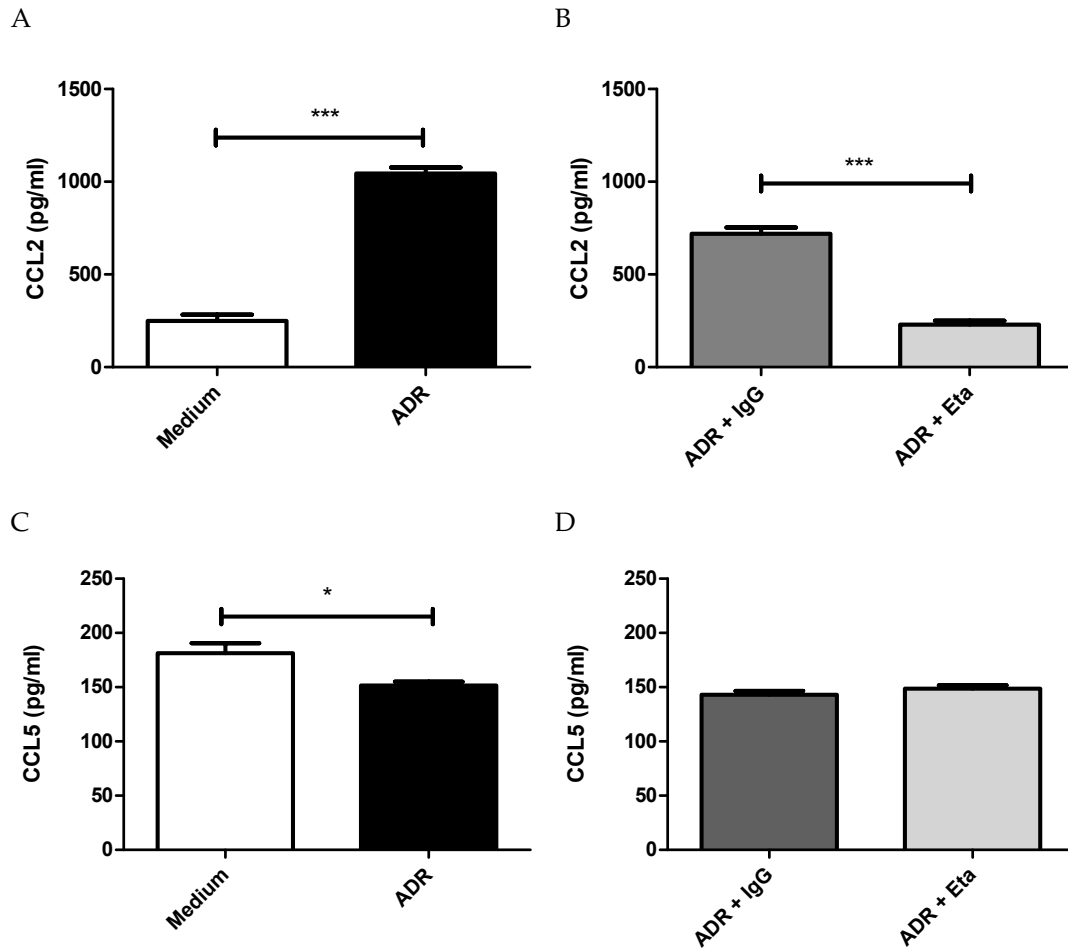


Abbildung 3.6: Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Glomerula nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin: Primäre Glomerula ex vivo wurden für 24 Stunden mit Adriamycin in einer Konzentration von 0,3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit ADR+Eta 10 µg/ml oder ADR+IgG 10 µg/ml. Mittels ELISA wurde die Konzentration von CCL2 (A,B) und CCL5 (C,D) bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3. * p ≤ 0,05, *** p ≤ 0,001

3 Ergebnisse

vorwiegend durch zytotoxische Effekte einer Adriamycin-Stimulation mit 3 µg/ml bedingt sein.

Insgesamt zeigen die Versuche, dass eine Adriamycin-Stimulation mit 0,3 µg/ml zu einer vermehrten Freisetzung von CCL2 führt. Eine TNF-Blockade mit Etanercept in Adriamycin-stimulierten Glomeruli reduziert im Vergleich zu IgG-Kontrolle die CCL2-Sekretion. Dies belegt, dass die Adriamycin-induzierte glomeruläre CCL2-Sekretion TNF-vermittelt abläuft. Der Grund für die fehlende Steigerung der CCL5-Sekretion in Adriamycin-exponierten Glomeruli könnte darin liegen, dass CCL5 hauptsächlich in Tubulusepithelzellen gebildet wird, und Adriamycin keinen wichtigen Schlüsselreiz für die CCL5-Expression im Glomerulus darstellt [98]. Welche glomerulären Zellen hauptsächlich durch Adriamycin zur TNF-vermittelten CCL2-Produktion angeregt werden, sollte im Folgenden untersucht werden.

Podozytenstimulation:

Zur Evaluation, ob Podozyten an der CCL2- oder CCL5-Sekretion nach Adriamycin-Stimulation beteiligt sind, wurden ausdifferenzierte Podozyten mit Adriamycin in einer Konzentration von 0,3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich wurden Adriamycin-exponierte Podozyten mit Etanercept oder Kontroll-IgG behandelt. Dabei blieb ein Anstieg der CCL2-Freisetzung bei allen Adriamycin-exponierten Gruppen im Vergleich zur Mediumkontrolle aus (Abbildung 3.8A Medium 996 ± 62 pg/ml; ADR 818 ± 79 pg/ml). Etanercept-Behandlung zeigte keinen Einfluss auf die CCL2-Sekretion (Abbildung 3.8B ADR+IgG 702 ± 54 pg/ml; ADR+Eta 630 ± 31 pg/ml). Für die CCL5-Freisetzung zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis (Abbildung 3.8C Medium 317 ± 51 pg/ml; ADR 250 ± 48 pg/ml; 3.8D ADR+IgG 291 ± 39 pg/ml; ADR+Eta 277 ± 38 pg/ml).

In der zehnfach höheren Dosis von 3 µg/ml führte Adriamycin, ähnlich wie in Glomerula zu einer signifikant verminderten CCL2-Sekretion, die durch Etanercept-Gabe nicht beeinflusst wurde (Abbildung 3.9A Medium 996 ± 62 pg/ml; ADR 334 ± 25 pg/ml; 3.9B ADR+IgG 335 ± 36 pg/ml; ADR+Eta 329 ± 13 pg/ml). Hinsichtlich der CCL5-Sekretion zeigte sich kein Unterschied zwischen den mit Adriamycin-stimulierten Gruppen. Etanercept beeinflusste die CCL5-Sekretion nicht (Abbildung

3.3 Adriamycin-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro

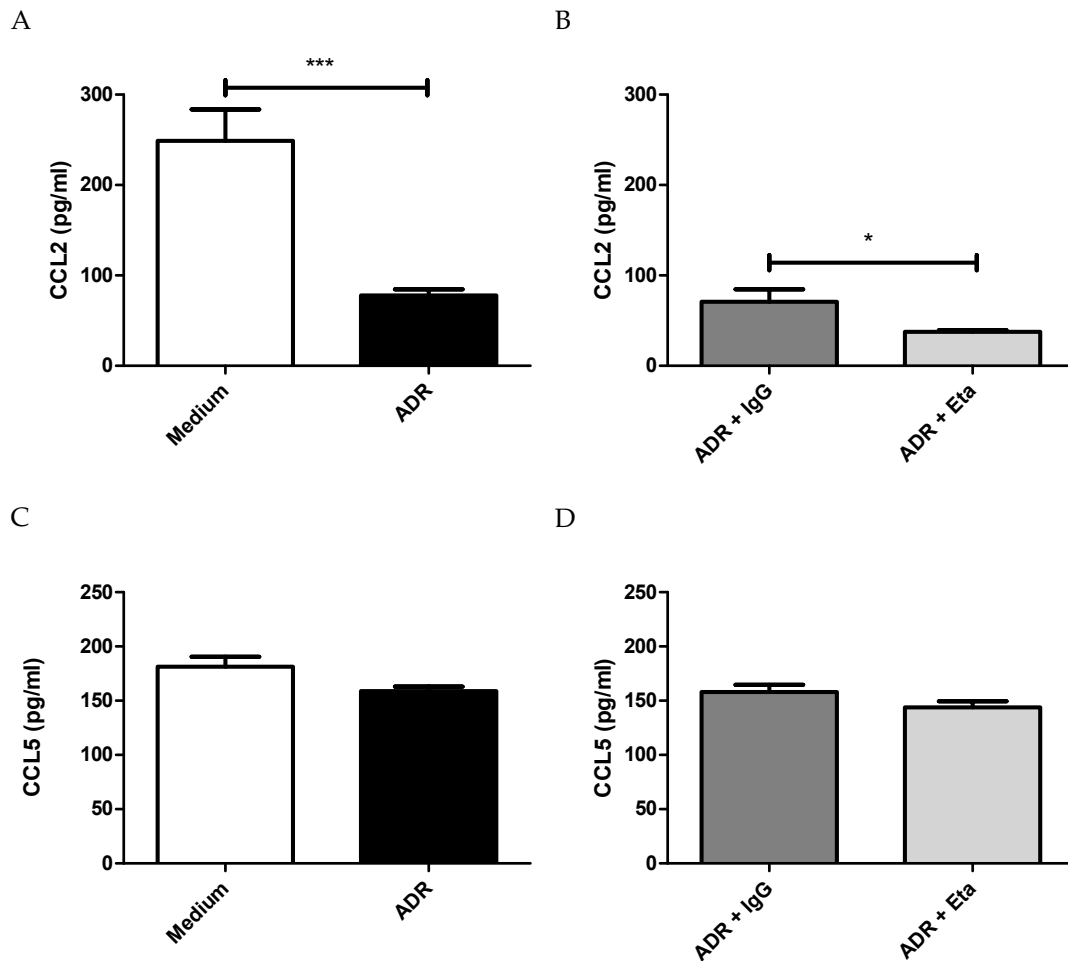


Abbildung 3.7: Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Glomerula nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin: Primäre Glomerula ex vivo wurden für 24 Stunden mit Adriamycin in einer Konzentration von 3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit ADR+Eta 10 µg/ml oder ADR+IgG 10 µg/ml. Mittels ELISA wurde die Konzentration von CCL2 (A, B) und CCL5 (C,D) bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3. * p ≤ 0,05, *** p ≤ 0,001

3 Ergebnisse

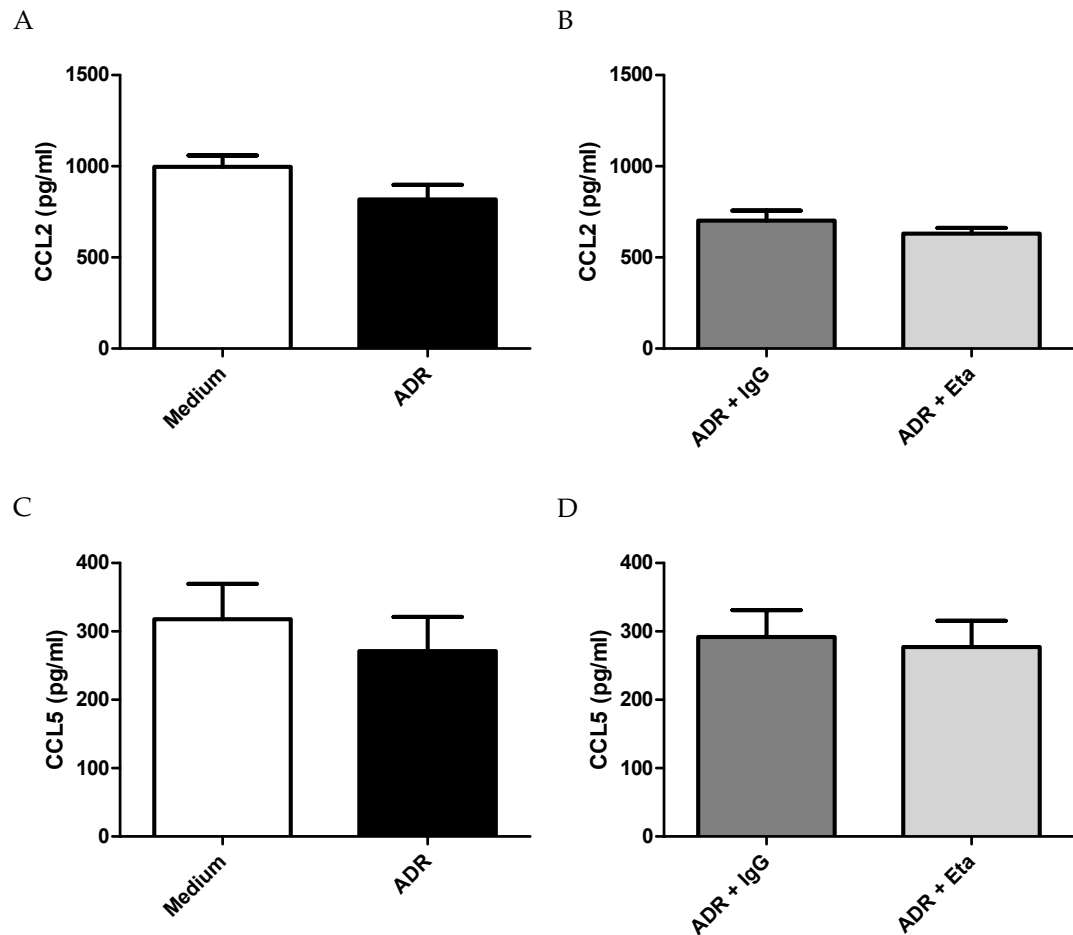


Abbildung 3.8: Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Podozyten nach Stimulation mit 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Adriamycin: Immortalisierte Podozyten wurden für 24 Stunden mit Adriamycin in einer Konzentration von 0,3 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit ADR+Eta 10 $\mu\text{g/ml}$ oder ADR+IgG 10 $\mu\text{g/ml}$. Mittels ELISA wurde die Konzentration von CCL2 (A,B) und CCL5 (C,D) bestimmt. Dargestellt sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$. $n=3$

3.3 Adriamycin-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro

3.9C Medium 317 ± 51 pg/ml; ADR 289 ± 36 pg/ml; 3.9D ADR+IgG 274 ± 26 pg/ml; ADR+Eta 254 ± 23 pg/ml).

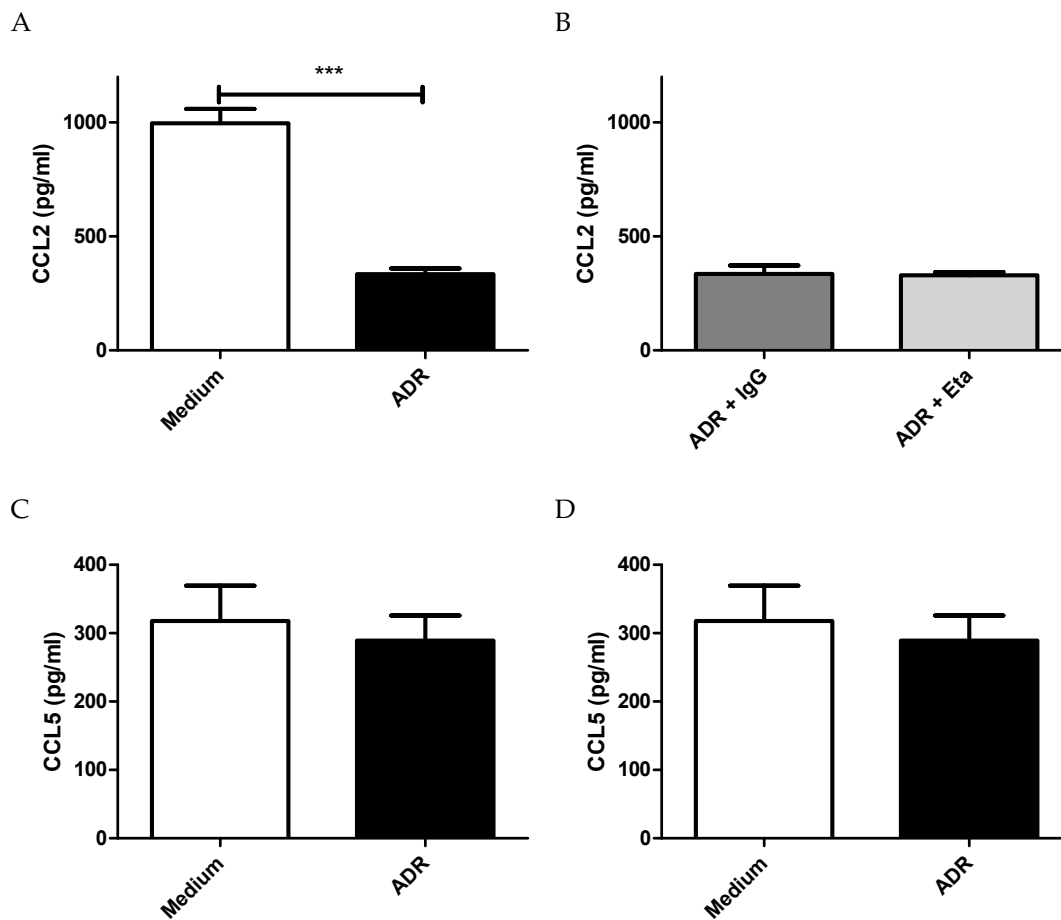


Abbildung 3.9: Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Podozyten nach Stimulation mit 3 μ g/ml Adriamycin: Immortalisierte Podozyten wurden für 24 Stunden mit Adriamycin in einer Konzentration von 3 μ g/ml stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit ADR+Eta 10 μ g/ml oder ADR+IgG 10 μ g/ml. Mittels ELISA wurde die Konzentration von CCL2 (A,B) und CCL5 (C,D) bestimmt. Dargestellt sind MW \pm SEM. n=3

Mesangialzellstimulation:

In immortalisierten Mesangialzellen wurde die Chemokinsekretion nach Adriamycin-Stimulation untersucht. Bei einer Adriamycin-Dosis von 0,3 μ g/ml zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CCL2-Freisetzung unter Adriamycin-Stimulation im Ver-

3 Ergebnisse

gleich zur Mediumkontrolle (Abbildung 3.10A Medium 350 ± 47 pg/ml; ADR 643 ± 110 pg/ml). Nach Etanercept-Gabe wurde die CCL2-Sekretion in Adriamycin-exponierten Mesangialzellen im Vergleich zur IgG-Kontrolle tendenziell reduziert (Abbildung 3.10B ADR+IgG 616 ± 142 pg/ml; ADR+Eta 524 ± 103 pg/ml). Wie in den isolierten Glomerula induzierte die Adriamycin-Stimulation in Mesangialzellen keine CCL5-Freisetzung und Etanercept-Gabe zeigte keinen Einfluss auf die CCL5-Sekretion (Abbildung 3.10C Medium 583 ± 109 pg/ml; ADR 322 ± 49 pg/ml; 3.10D ADR+IgG 275 ± 49 pg/ml; ADR+Eta 325 ± 67 pg/ml).

Bei der hohen Adriamycin-Dosis von $3 \mu\text{g/ml}$ zeigte sich eine signifikant reduzierte CCL2- und tendenziell verminderte CCL5-Freisetzung (Abbildungen 3.11A CCL2 Medium 350 ± 47 pg/ml; ADR 54 ± 11 pg/ml; 3.11B ADR+IgG 68 ± 11 pg/ml; ADR+Eta 43 ± 6 pg/ml 3.11C CCL5 Medium 583 ± 109 pg/ml; ADR 225 ± 54 pg/ml; 3.11D ADR+IgG 287 ± 39 pg/ml; ADR+Eta 256 ± 47 pg/ml). Der fehlende Anstieg der Chemokinfreisetzung unter einer Adriamycin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ könnte wieder durch eine hohe Zytotoxizität von Adriamycin in dieser Konzentration bedingt sein.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass Adriamycin in niedrigen Konzentrationen in Glomerula *ex vivo* eine CCL2-Sekretion induziert. Hierfür scheinen vor allem Mesangialzellen, nicht aber Podozyten verantwortlich zu sein. Die CCL2-Sekretion ist TNF-vermittelt, da die Blockade mit Etanercept zu einer verminderten glomerulären CCL2-Freisetzung führt. CCL5 wird nach Adriamycin-Exposition weder von Glomeruli, noch von Mesangialzellen oder Podozyten sezerniert. Interessanterweise führt eine Adriamycin-Konzentration von $3 \mu\text{g/ml}$ in Glomeruli und beiden Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der Chemokinsekretion, was durch die Zytotoxizität der hohen Adriamycin-Konzentration erklärt werden kann. Um diese These zu untermauern wurde das Apoptoseverhalten von Podozyten und Mesangialzellen unter Adriamycin-Stimulation untersucht.

3.3 Adriamycin-abhängige Chemokinausschüttung von Nierenzellen in vitro

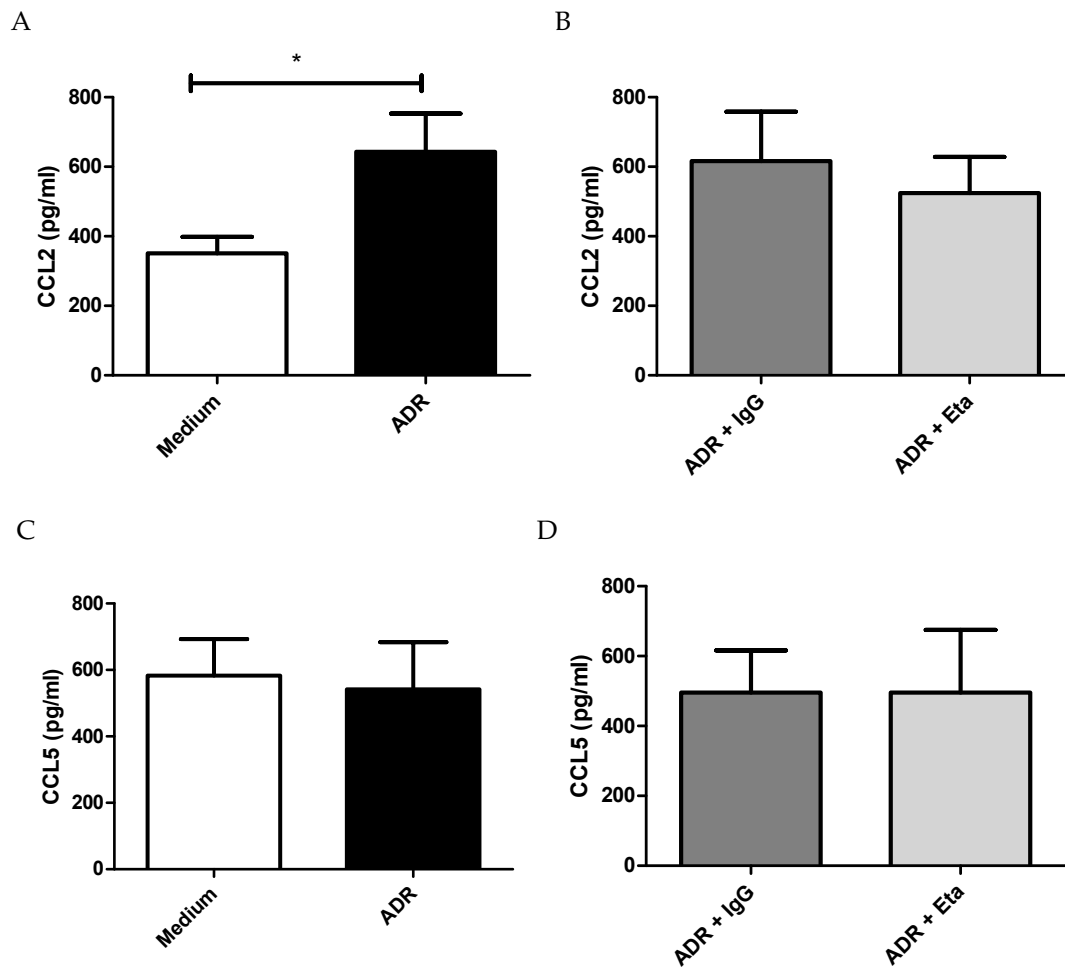


Abbildung 3.10: Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Mesangialzellen nach Stimulation mit 0,3 µg/ml Adriamycin: Immortalisierte Mesangialzellen wurden für 24 Stunden mit Adriamycin in einer Konzentration von 0,3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit ADR+Eta 10 µg/ml oder ADR+IgG 10 µg/ml. Mittels ELISA wurde die Konzentration von CCL2 (A,B) und CCL5 (C,D) bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3. * p ≤ 0,05

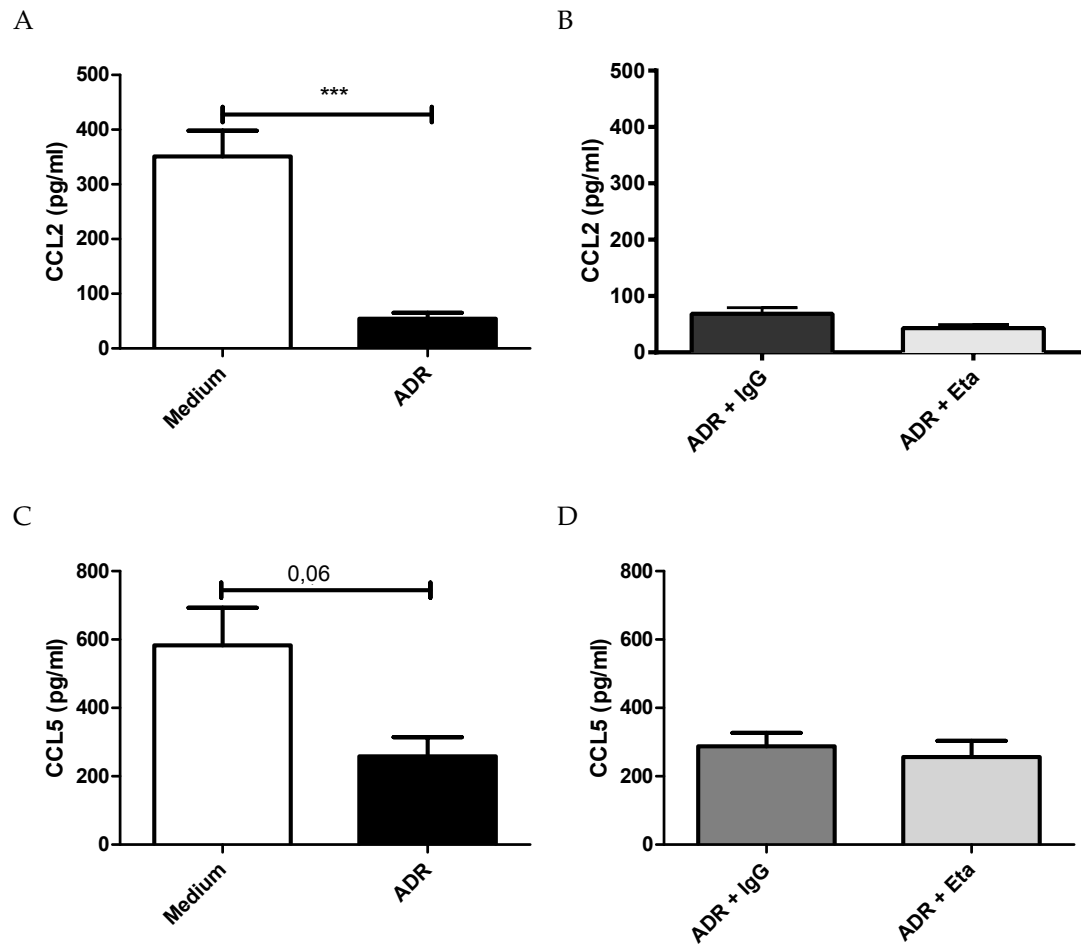


Abbildung 3.11: Adriamycin-induzierte, TNF-vermittelte Sekretion der Chemokine CCL2 und CCL5 in Mesangialzellen nach Stimulation mit 3 µg/ml Adriamycin: Immortalisierte Mesangialzellen wurden für 24 Stunden mit Adriamycin in einer Konzentration von 3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit ADR+Eta 10 µg/ml oder ADR+IgG 10 µg/ml. Mittels ELISA wurde die Konzentration von CCL2 (A,B) und CCL5 (C,D) bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3. *** p ≤ 0,001

3.4 Toxizität von Adriamycin auf Podozyten und Mesangialzellen

Um die geringere Chemokinsekretion unter der Adriamycin-Konzentration von 3 µg/ml durch die von uns vermutete Zytotoxizität von Adriamycin zu bestätigen, wurde bei Podozyten und Mesangialzellen das Ausmaß der Apoptose nach Adriamycin-Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen wie in den anderen Versuchen 24 Stunden mit Adriamycin in den Konzentrationen 0,3 µg/ml, beziehungsweise 3 µg/ml stimuliert. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Annexin V und PI sowie eine FACS-Analyse. Die lebenden (Annexin V-, und PI-negativen) wurden von den (früh)apoptotischen (Annexin V-positiv, PI-negativ) und den spätapoptotischen, beziehungsweise nekrotischen (Annexin V- und PI-positiven) Zellen unterschieden.

Bei Podozyten kam es nach Stimulation mit der niedrigeren Adriamycin-Konzentration von 0,3 µg/ml zu einem tendenziellen, nicht signifikantem Anstieg von apoptotischen Zellen. Etanercept führte zu einer geringen, tendenziellen Reduktion der apoptotischen Zellen (Abbildung 3.12A Medium $35,8 \pm 3,7\%$; ADR $46,9 \pm 2,7\%$; 3.12B ADR+IgG $57,5 \pm 3,1\%$; ADR+Eta $47,2 \pm 2,4\%$). Die Stimulation mit der niedrigeren Adriamycin-Konzentration von 0,3 µg/ml induzierte in Mesangialzellen keine erhöhte Apoptoserate. Eine Behandlung mit Etanercept beeinflusste diese mesangiale Apoptoserate nicht (Abbildung 3.12C Medium $24,6 \pm 2,5\%$; ADR $29,8 \pm 1,9\%$; 3.12D ADR+IgG $32,5 \pm 1,9\%$; ADR+Eta $31,9 \pm 2,4\%$).

Wie vermutet zeigte sich nach Stimulation mit der höheren Adriamycin-Konzentration von 3 µg/ml sowohl bei Podozyten als auch bei Mesangialzellen eine signifikant erhöhte Zahl an apoptotischen Zellen (Abbildung 3.13A Podozyten Medium $35,8 \pm 3,7\%$; ADR $61,6 \pm 3,3\%$; 3.13C Mesangialzellen Medium $24,0 \pm 1,0\%$; ADR $60,7 \pm 2,7\%$). Interessanterweise führte eine Etanercept-Behandlung wieder zu einer tendenziell verminderten Apoptoserate in Podozyten (Abbildung 3.13B ADR+IgG $50,2 \pm 3,8\%$; ADR+Eta $38,9 \pm 1,9\%$). Mesangialzellen zeigten dagegen unter Etanercept und IgG-Kontrolle vergleichbare Apoptoseraten (Abbildung 3.13D ADR+IgG $58,1 \pm 2,6\%$; ADR+Eta $62,6 \pm 2,8\%$).

3 Ergebnisse

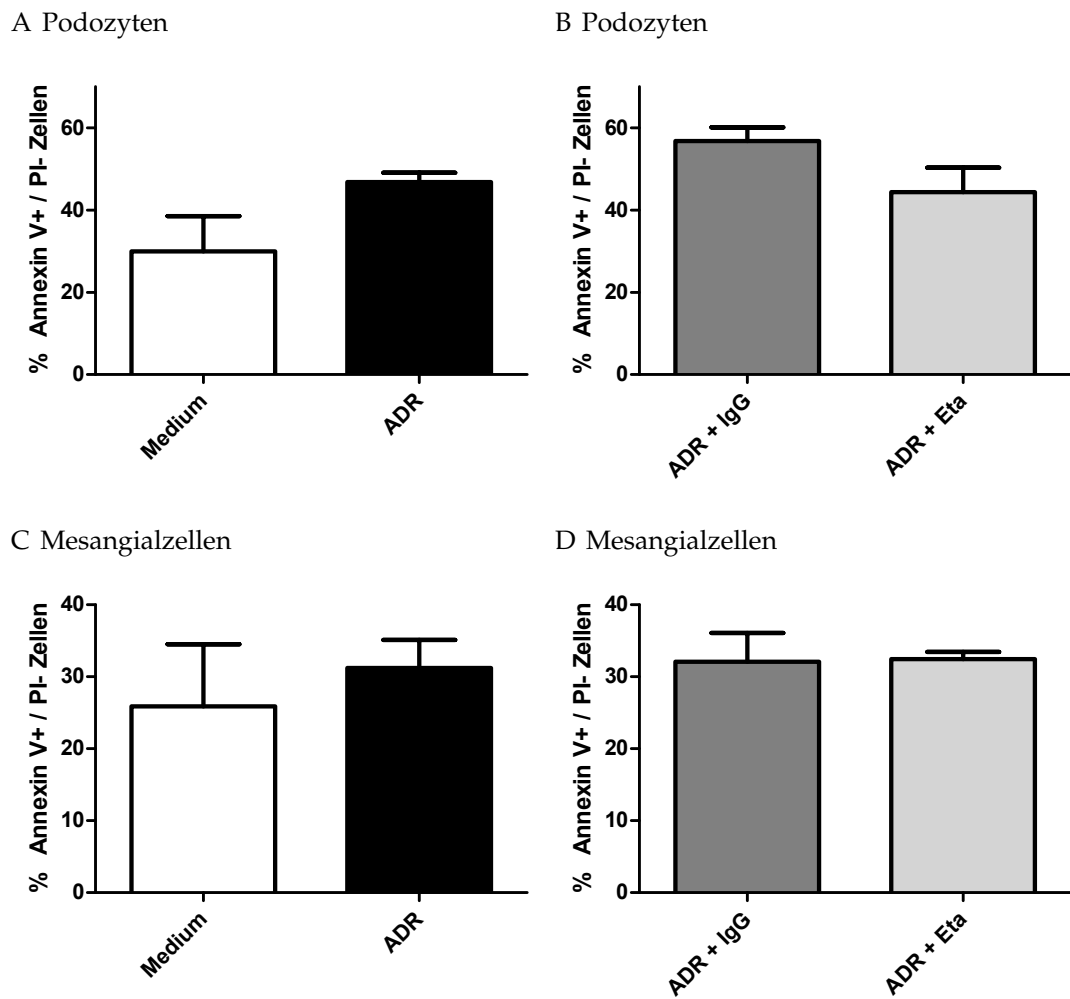
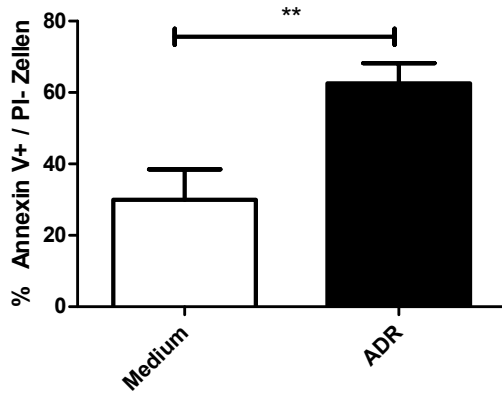


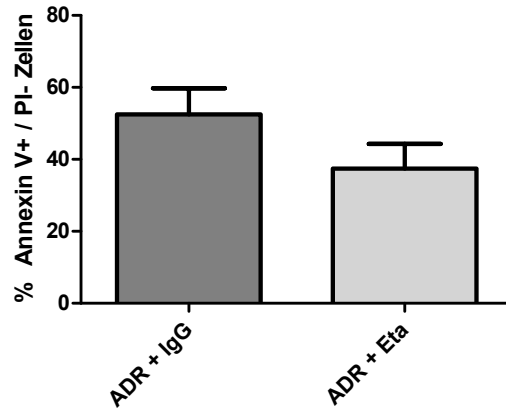
Abbildung 3.12: Bestimmung apoptotischer Podozyten bzw. Mesangialzellen nach Adriamycin-Stimulation mit 0,3 µg/ml: Immortalisierte Podozyten (A,B) bzw. Mesangialzellen (C,D) wurden für 24 Stunden mit Adriamycin in der Konzentration 0,3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit ADR+Eta 10 µg/ml oder ADR+IgG 10 µg/ml. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Rate an frühapoptischen (Annexin V- positiven, PI- negativen) Zellen bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3.

3.4 Toxizität von Adriamycin auf Podozyten und Mesangialzellen

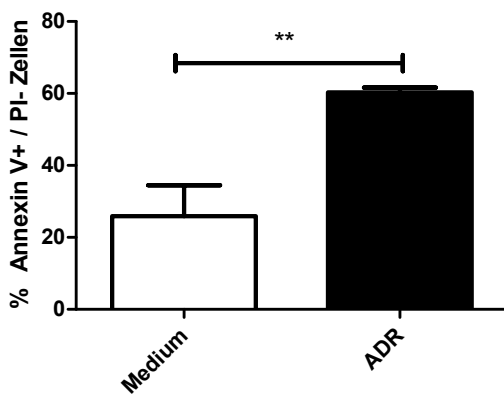
A Podozyten



B Podozyten



C Mesangialzellen



D Mesangialzellen

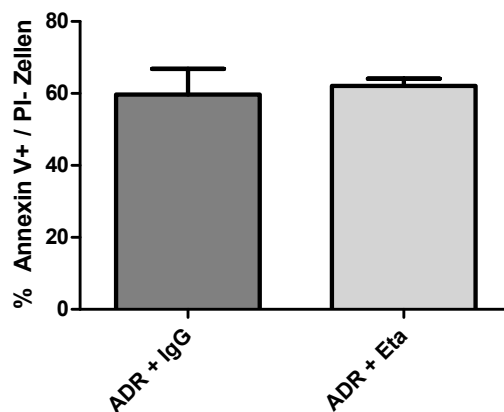


Abbildung 3.13: Bestimmung apoptotischer Podozyten bzw. Mesangialzellen nach Adriamycin-Stimulation mit 3 µg/ml: Immortalisierte Podozyten (a,b) bzw. Mesangialzellen (c,d) wurden für 24 Stunden mit Adriamycin in den Konzentration 3 µg/ml stimuliert. Zusätzlich erfolgte eine Stimulation mit ADR+Eta 10 µg/ml oder ADR+IgG 10 µg/ml. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Rate an frühapoptotischen (Annexin V-positiven, PI-negativen) Zellen bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. n=3. ** p ≤ 0,01

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse bestätigen die vermutete Zytotoxizität von Adriamycin in einer Konzentration von 3 µg/ml. Sowohl bei Podozyten als auch bei Mesangialzellen führte die Adriamycin-Stimulation zu einem signifikant höheren Anteil frühapoptotischer Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle. Die TNF-Blockade mit Etanercept zeigte bei Podozyten, nicht aber Mesangialzellen eine tendenziellente Reduktion der frühapoptotischen Zellen. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass verschiedene Apoptosesignalwege in den einzelnen Zelllinien durch Adriamycin angeregt werden. In Podozyten könnte es nicht nur über Adriamycin selbst, sondern auch TNF-vermittelt zu Apoptose kommen. Dies wäre gut mit der Beobachtung der verminderten Apoptoserate unter Etanercept vereinbar.

Zusammenfassend zeigen die *in vitro*-Stimulationsversuche mit Adriamycin eine erhöhte Freisetzung von TNF in primären Glomerula und Mesangialzellen. TNF-Stimulation führte in Podozyten und Mesangialzellen zu einer vermehrten Chemokinfreisetzung, sowohl von CCL2 als auch von CCL5. Ebenfalls zeigte sich ein Anstieg der Chemokinfreisetzung von CCL2 in Adriamycin-stimulierten Glomeruli und Mesangialzellen. Es wurde gezeigt, dass die TNF-Blockade mittels Etanercept *in vitro* die messbare TNF-Konzentration im Überstand stimulierter Glomeruli und Mesangialzellen reduziert und in Adriamycin-stimulierten Glomeruli die CCL2-Sekretion vermindert. Dies führte zur Hypothese, dass Adriamycin-induzierte TNF-Sekretion eine wichtige Rolle bei der Adriamycin-Nephropathie spielen könnte. Durch eine TNF-induzierte, erhöhte Chemokinausschüttung und proinflammatorische Effekte von TNF selbst könnte es zu einer Progression der Adriamycin-induzierten FSGS kommen.

Eine TNF-Blockade mittels Etanercept könnte somit auch *in vivo* im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie die Freisetzung proinflammatorischer Chemokine wie CCL2 reduzieren. Dies könnte letztlich zu einer verminderten Progression der lokalen Entzündung, zu weniger Fibrose und einer verbesserten Nierenfunktion führen. Die TNF-Blockade mittels Etanercept könnte möglicherweise ein neuer Therapieansatz zur Behandlung der FSGS sein.

3.5 Effekt von Etanercept auf die Adriamycin-Nephropathie

Wie schon in der Einleitung erwähnt, sind die meisten chronischen glomerulären Nierenkrankheiten durch die Entwicklung einer Glomerulosklerose, tubulointerstitielle Entzündung und letztlich Fibrose gekennzeichnet. Das Modell der Adriamycin-induzierten FSGS ist ein gut etabliertes Modell chronischer Nierenerkrankung in Mäusen. Aufgrund der positiven *in vitro* Ergebnisse wurde die Relevanz einer TNF-Blockade mittels Etanercept auf die Progredienz der FSGS *in vivo* untersucht. Es wurden drei Gruppen verglichen. Bei zwei Gruppen wurde eine Nephropathie mit Adriamycin induziert und gleichzeitig entweder Etanercept (ADR+Eta) oder Kontroll-IgG (ADR+IgG) appliziert. In der dritten Gruppe wurden mögliche Effekte des Kontroll-IgGs ohne Induktion der Adriamycin-Nephropathie untersucht (IgG-Kontrolle).

3.5.1 Gewichtsverlauf

Das Gewicht der BALB/c Mäuse wurde zu Beginn des Experiments und dann wöchentlich von allen Tieren bestimmt. Bei beiden Adriamycin-behandelten Gruppen zeigte sich der für die Adriamycin-Nephropathie typische Gewichtsverlust. Bei der IgG-Kontrollgruppe stieg das Gewicht regelhaft und altersentsprechend an (Abbildung 3.14 Woche 0: IgG-Kontrolle $23,1 \pm 0,3$ g; ADR+IgG $21,6 \pm 0,3$ g; ADR+Eta $21,8 \pm 0,3$ g; Woche 1: IgG-Kontrolle $24,9 \pm 0,3$ g; ADR+IgG $20,9 \pm 0,5$ g; ADR+Eta $21,6 \pm 0,2$ g; Woche 2: IgG-Kontrolle $25,4 \pm 0,5$ g; ADR+IgG $19,0 \pm 0,2$ g; ADR+Eta $19,5 \pm 0,2$ g; Woche 3: IgG-Kontrolle $26,4 \pm 0,2$ g; ADR+IgG $17,4 \pm 0,3$ g; ADR+Eta $17,3 \pm 0,3$ g; Woche 4: IgG-Kontrolle $26,1 \pm 0,1$ g; ADR+IgG $16,7 \pm 0,3$ g; ADR+Eta $16,6 \pm 0,3$ g). Im Vergleich zu der IgG-Kontrollgruppe zeigten die Adriamycin-behandelten Gruppen von Woche 1 bis Woche 4 einen hochsignifikanten Unterschied im Gewichtsverlauf. Dieses klinische Bild spiegelt die pathologische Wirkung der Adriamycin-Injektion wider.

3 Ergebnisse

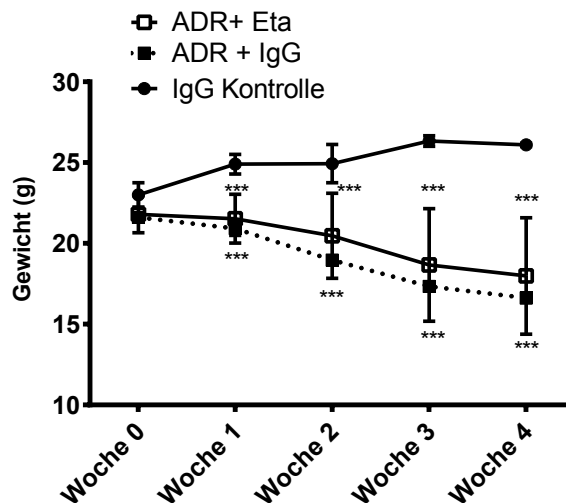


Abbildung 3.14: Gewichtsverlauf: Der Gewichtsverlauf der drei Gruppen wurde zum Zeitpunkt 0, 7, 14, 21 und 28 Tage bestimmt. Dargestellt sind $MW \pm SEM$. ADR+Eta bzw. ADR+IgG $n=14$, IgG-Kontrolle $n=5$. *** $p \leq 0,001$ im Vergleich zur IgG-Kontrolle

3.5.2 Proteinurie

Zur Bestimmung der Proteinurie wurde wöchentlich von allen Tieren Spontanurin abgenommen. Die Tiere der Adriamycin-Gruppen zeigten ab der ersten Woche nach Adriamycin-Injektion eine Proteinurie. Diese stieg im Laufe des Versuchs progredient an. Ab der dritten Woche unterschieden sich die Werte zwischen den mit Adriamycin-behandelten Tieren von denen der IgG-Kontrollgruppe signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte die IgG-Kontrollgruppe ohne Adriamycin-Behandlung wie erwartet keine Proteinurie. Zwischen den mit ADR+IgG und den ADR+Eta behandelten Tieren zeigte sich kein Unterschied in der Proteinurie (Abbildung 3.15 Woche 0: IgG-Kontrolle $38,8 \pm 4,7 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+IgG $11,8 \pm 1,3 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+Eta $24,2 \pm 10,3 \mu\text{g}/\text{mg}$; Woche 1: IgG-Kontrolle $27,6 \pm 2,6 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+IgG $8895 \pm 2592 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+Eta $10210 \pm 2664 \mu\text{g}/\text{mg}$; Woche 2: IgG-Kontrolle $26,4 \pm 3,9 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+IgG $5333 \pm 1307 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+Eta $6376 \pm 1222 \mu\text{g}/\text{mg}$; Woche 3: IgG-Kontrolle $37,2 \pm 7,7 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+IgG $15695 \pm 4668 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+Eta $21554 \pm 3721 \mu\text{g}/\text{mg}$; Woche 4: IgG-Kontrolle $35,6 \pm 3,3 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+IgG $25485 \pm 6533 \mu\text{g}/\text{mg}$; ADR+Eta $27544 \pm 5937 \mu\text{g}/\text{mg}$).

3.5 Effekt von Etanercept auf die Adriamycin-Nephropathie

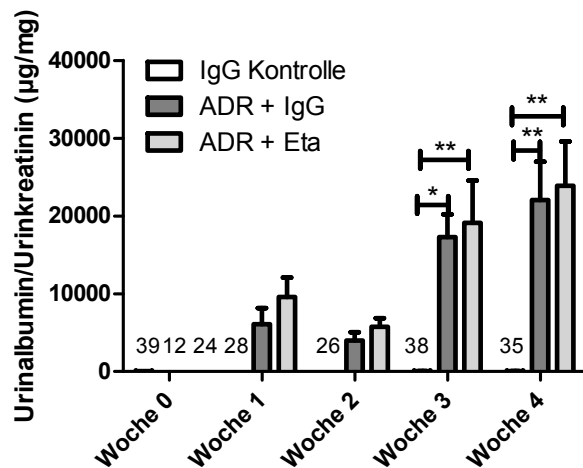


Abbildung 3.15: Proteinurie: Zum Zeitpunkt 0, 7, 14, 21 und 28 Tage wurde allen Tieren der drei Gruppen Spontanurin abgenommen und mittels ELISA das Ausmaß der Proteinurie bestimmt. Dargestellt sind MW \pm SEM. ADR+Eta bzw. ADR+IgG n=14, IgG-Kontrolle n=5. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

3.5.3 Serumchemie

Serum der Mäuse wurde am Tag 28 des Experiments gewonnen und analysiert. Die mit Adriamycin-behandelten Gruppen zeigten im Vergleich zur IgG-Kontrollgruppe tendenziell erhöhte Serumharnstoffwerte (Abbildung 3.16A IgG-Kontrolle $52,0 \pm 1,9$ mg/dl; ADR+IgG $87,3 \pm 10,9$ mg/dl; ADR+Eta $100 \pm 13,8$ mg/dl). Dagegen ergaben sich für die Serumkreatinin-Werte kein Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen (Abbildung 3.16B IgG-Kontrolle $0,2 \pm 0,01$ mg/dl; ADR+IgG $0,3 \pm 0,03$ mg/dl; ADR+Eta $0,2 \pm 0,02$ mg/dl). Eine signifikant ausgeprägte Hypercholesterinämie, mit fünffach höheren Werten als die IgG-Kontrollgruppe, weist zusammen mit der massiven Proteinurie auf die Entwicklung eines nephrotischen Syndroms in den Adriamycin-behandelten Gruppen hin, die allerdings durch die Etanercept-Behandlung nicht beeinflusst wurde (Abbildung 3.16C, 3.15 IgG-Kontrolle $128 \pm 4,6$ mg/dl; ADR+IgG $620 \pm 49,9$ mg/dl; ADR+Eta $586 \pm 48,9$ mg/dl). Dagegen lagen die Werte für Serumprotein in allen drei Tiergruppen im Normbereich (Abbildung 3.16D IgG-Kontrolle $4,9 \pm 0,1$ g/dl; ADR+IgG $5,2 \pm 0,2$ g/dl; ADR+Eta $5,3 \pm 0,4$ g/dl).

3 Ergebnisse

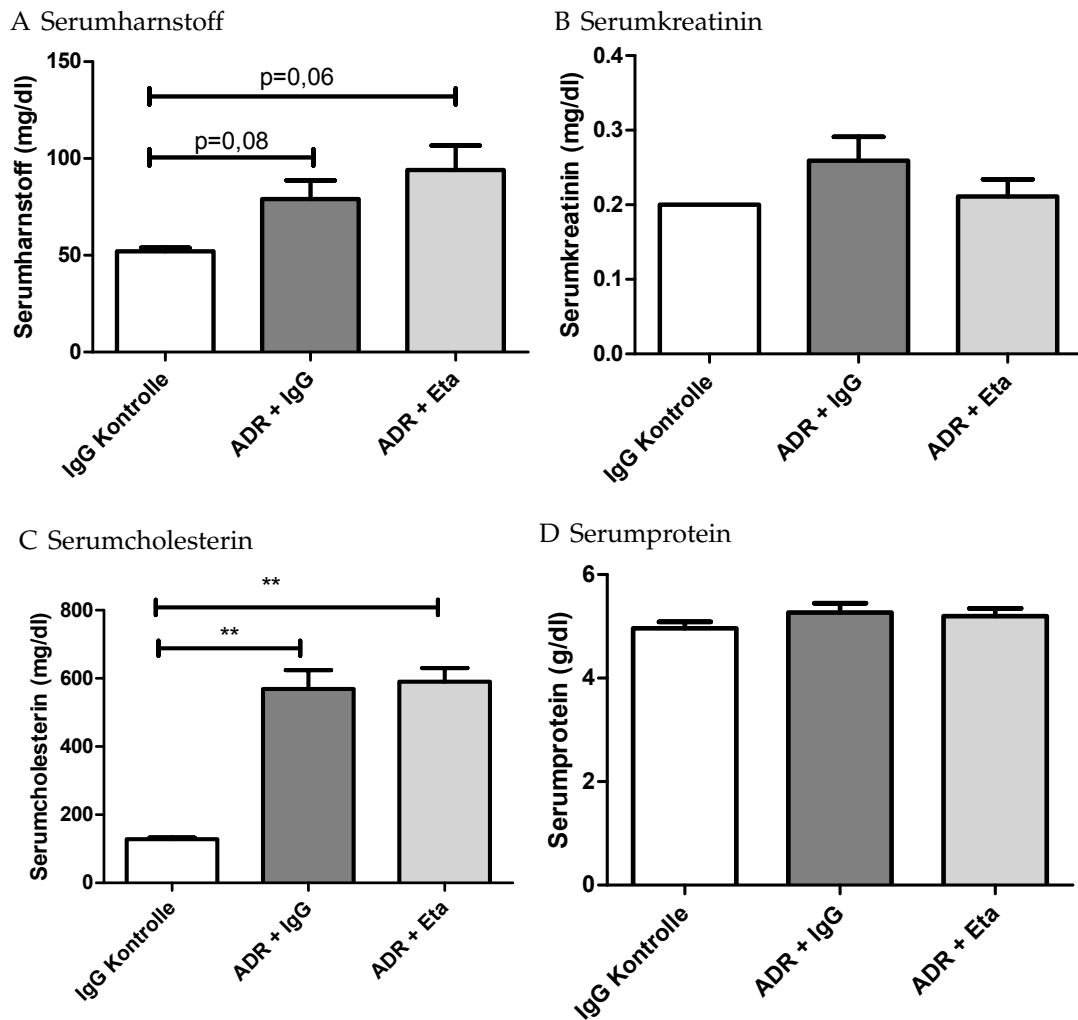


Abbildung 3.16: Serumchemie: Am Tag 28 wurde jedem Tier Blut zur Analyse der Serumparameter Harnstoff, Kreatinin, Cholesterin und Protein entnommen. Dargestellt sind MW \pm SEM. ADR+Eta bzw. ADR+IgG n=14, IgG-Kontrolle n=5. ** $p \leq 0,01$

3.5.4 Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung des renalen Gewebes Schadens erfolgte am Tag 28 nach Induktion der Adriamycin-Nephropathie. Die zweimalige Adriamycin-Injektion führte bei beiden behandelten Versuchsgruppen lokal zu einer Vernarbung und Atrophie der Glomerula, im Sinne einer fokalen Sklerose mit segmentaler Vermehrung von hyaliner Matrix und kollabierten Kapillarschlingen einzelner Glomeruli (Abbildung 3.17). Der PAS-Score, der ein morphometrisches Quantifizierungssystem PAS-positiver glomerulärer Ablagerungen darstellt, war bei beiden Adriamycin-Gruppen sehr signifikant um das zehnfache im Gegensatz zu der IgG-Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 3.18A IgG-Kontrolle $0,13 \pm 0,02$; ADR+IgG $0,92 \pm 0,1$; ADR+Eta $0,98 \pm 0,1$). Dies spricht für eine deutliche Schädigung der Glomerula und Induktion einer Glomerulosklerose. Die Etanercept-Behandlung beeinflusste allerdings das Ausmaß der PAS-positiven glomerulären Ablagerungen im Vergleich zur IgG-Kontrolle nicht. Zur Beurteilung der Leukozyteninfiltration wurden immunhistologische Färbungen für F4/80-positive Makrophagen und CD3-positive T-Lymphozyten durchgeführt. Es fanden sich periglomeruläre und diffus-interstitielle Makrophageninfiltrate. Zwischen den Gruppen zeigte sich eine dreifach höhere Makrophageninfiltration (Anteil F4/80+ Fläche) in den Adriamycin-behandelten Tieren im Vergleich zu der IgG-Kontrollgruppe. Auch hier ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Etanercept- und IgG-behandelten Gruppen (Abbildung 3.18B IgG-Kontrolle $0,36 \pm 0,02$ %; ADR+IgG $0,93 \pm 0,1$ %; ADR+Eta $0,93 \pm 0,1$ %). CD3-positive T-Lymphozyten fanden sich vor allem im Interstitium. Hier gab es keinen Unterschied zwischen den Adriamycin-behandelten und unbehandelten Gruppen (Abbildung 3.18C IgG-Kontrolle $8,2 \pm 0,6$ Zellen/Gesichtsfeld; ADR+IgG $10,1 \pm 1,2$ Zellen/Gesichtsfeld; ADR+Eta $9,5 \pm 0,8$ Zellen/Gesichtsfeld).

Die morphologischen Untersuchungen der Adriamycin- bzw. IgG-Kontrollgruppen stimmen somit mit den funktionellen Ergebnissen der Proteinurie und der Serumparame-ter überein. Die IgG-Kontrollgruppe zeigte morphologisch und laborchemisch wie erwartet keinerlei pathologische Veränderungen. Die Adriamycin-behandelten Tiere entwickelten einen funktionellen und morphologischen Nierenschaden entsprechend einer FSGS. Allerdings unterscheiden sich die histologischen Parameter der glomerulären Schädigung sowie das Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration

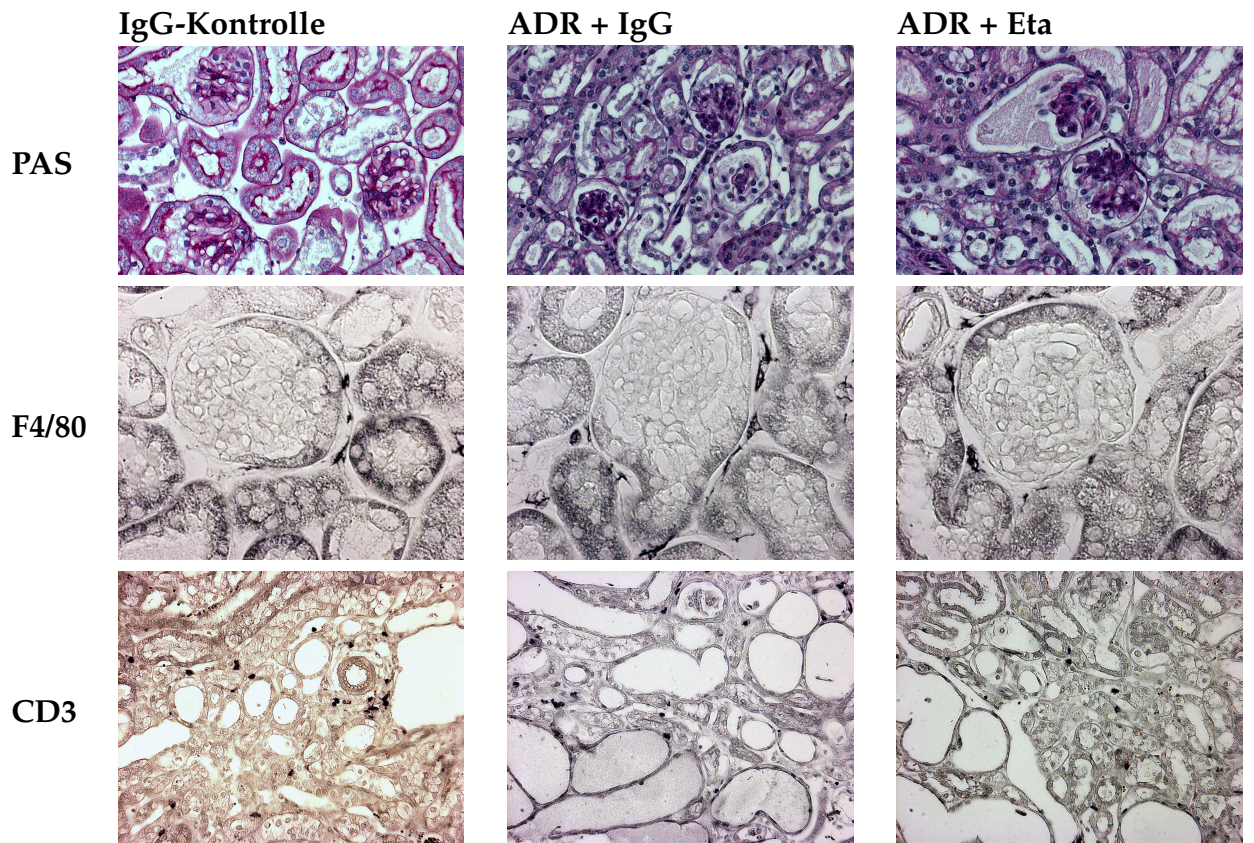


Abbildung 3.17: Gewebeschaden und renale Leukozyteninfiltration der Adriamycin-Nephropathie: Am Tag 28 nach Induktion der Adriamycin-Nephropathie wurden Nieren von jedem Tier gewonnen und in Formaldehyd fixiert. Es folgte bei jedem Tier die histologische Aufarbeitung mit PAS, F4/80 sowie CD3. Gezeigt werden repräsentative Bilder für jede Versuchsgruppe.

3.5 Effekt von Etanercept auf die Adriamycin-Nephropathie

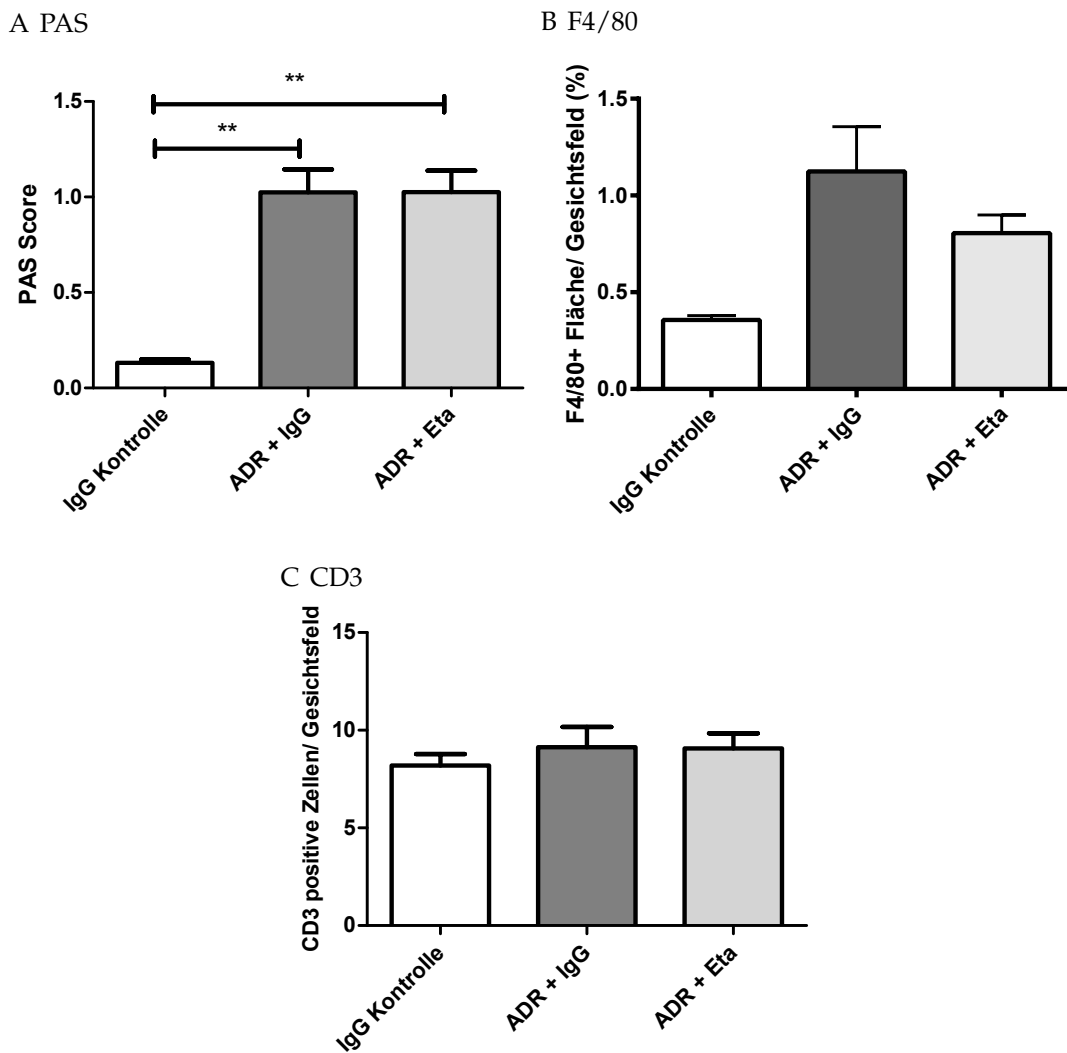


Abbildung 3.18: Quantifizierung von Gewebeschaden und renaler Leukozyteninfiltration der Adriamycin-Nephropathie: Am Tag 28 wurde von allen Tieren Nierengewebe entnommen, in Formaldehyd fixiert und histologisch aufgearbeitet. Es wurden von jedem Tier jeweils eine PAS-Färbung, eine F4/80- und eine CD3-Färbung hergestellt. In der PAS-Färbung wurde der Glomerulosklerose-Score bewertet. In der F4/80-Färbung wurde der prozentuale Anteil der F4/80-positiven Fläche pro Gesichtsfeld bestimmt. In der CD3-Färbung wurden die CD3-positiven Zellen im Interstitium pro Gesichtsfeld ausgewertet. Pro Tier wurden zwei Nierenschnitte mit je 25 Glomeruli bzw. 25 Gesichtsfeldern ausgewertet. Dargestellt sind MW ± SEM. ADR+Eta bzw. ADR+IgG n=14, IgG-Kontrolle n=5. ** p ≤ 0,01

zwischen der Etanercept- und der Kontroll-IgG Adriamycin-behandelten Gruppen nicht.

3.5.5 Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltration mittels Durchflusszytometrie

Die renale Leukozyteninfiltration bei der Adriamycin-induzierten FSGS wurde zusätzlich durchflusszytometrisch nach Oberflächenfärbung der renalen Einzelzellsuspension für CD45, CD3, CD4, CD8, CD11c und F4/80 quantifiziert. Zur Quantifizierung des gesamten Leukozyteninfiltrats wurden zunächst alle CD45-positiven Leukozyten analysiert. Im Vergleich zur IgG-Kontrollgruppe ohne Adriamycin-Nephropathie mit etwa 2% renaler Leukozyten wiesen die Adriamycin-behandelten Tiere mit 10% Leukozyten bezogen auf die Gesamtnierenzellen eine signifikant gesteigerte Leukozyteninfiltration auf. Zwischen den Kontroll-IgG und Etanercept-behandelten Adriamycin-Tieren bestand dagegen kein Unterschied in der renalen Leukozyteninfiltration (IgG-Kontrolle $2,2 \pm 0,06$ %; ADR+IgG $11,2 \pm 0,3$ %; ADR+Eta $10,9 \pm 0,3$ %). Weiterhin wurden die Zellen gegen CD3 gefärbt, um das renale T-Zell-Infiltrat zu quantifizieren. Wieder zeigten die beiden Adriamycin-behandelten Gruppen einen signifikant höheren Anteil CD45-positiver, CD3-positiver T-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe, während zwischen den Etanercept- und Kontroll-IgG-behandelten Adriamycin-Tieren keine signifikant unterschiedliche Zellzahl vorlag (IgG-Kontrolle $0,2 \pm 0,003$ % ; ADR+IgG $2,8 \pm 0,01$ %; ADR+Eta $2,4 \pm 0,01$ %). Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei den CD4+ und CD8+ T-Zellen ab. Im Vergleich mit der IgG-Kontrolle zeigte sich auch hier bei den Adriamycin-behandelten Gruppen eine signifikant gesteigerte CD4- und CD8-T-Zell-Infiltration, wobei die Etanercept-Behandlung im Vergleich zu IgG-behandelten Kontrolle keine Veränderung zeigte (CD4: IgG-Kontrolle $0,2 \pm 0,06$ % ; ADR+IgG $0,6 \pm 0,03$ %; ADR+Eta $0,6 \pm 0,03$ % CD8: IgG-Kontrolle $0,1 \pm 0,02$ %; ADR+IgG $0,9 \pm 0,02$ %; ADR+Eta $0,6 \pm 0,04$ %).

Um die histologische Makrophageninfiltration zu verifizieren, wurden unterschiedliche mononukleäre Phagozytenpopulationen quantifiziert. Dabei wurden die F4/80+/CD11c- Zellen als Makrophagen, sowie CD11c+/F4/80- und CD11c+/F4/80+ Zellen als dendritische Zellen evaluiert. Bei den F4/80+/CD11c- Zellen zeigte sich

3.5 Effekt von Etanercept auf die Adriamycin-Nephropathie

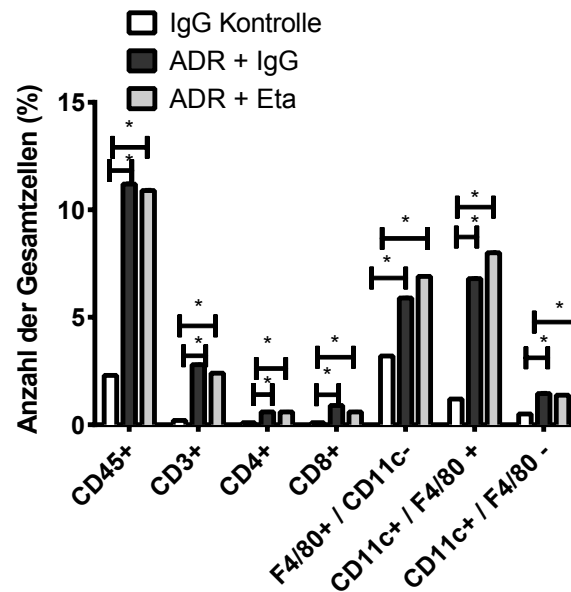


Abbildung 3.19: Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltration: Zur Quantifizierung der Leukozyteninfiltration in der Niere wurde von jeder Mausnieren eine Einzelzellsuspension hergestellt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind MW \pm SEM. ADR+IgG bzw. ADR+Eta n=14, IgG-Kontrolle n=5. ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001

3 Ergebnisse

eine signifikante Erhöhung in den Adriamycin-Gruppen im Vergleich zu der IgG-Kontrollgruppe ohne Adriamycin-Nephropathie (IgG-Kontrolle $1,25 \pm 0,6$ %; ADR+IgG $5,2 \pm 0,03$ %; ADR+Eta $6,5 \pm 0,03$ %). Im Vergleich zur IgG-Kontrolle mit Adriamycin-Behandlung ließ sich durch Etanercept-Gabe kein signifikanter Effekt auf Makrophagen nachweisen. Bei CD11c+/F4/80+ und CD11c+/F4/80- dendritischen Zellen zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung in den Adriamycin-behandelten Gruppen im Vergleich zur IgG-Kontrollgruppe ohne Adriamycin-Nephropathie (Abbildung 3.19 CD11c+/F4/80+: IgG-Kontrolle $0,8 \pm 0,02$ %; ADR+IgG $5,9 \pm 0,06$ %; ADR+Eta $5,7 \pm 0,02$ % CD11c+/F4/80-: IgG-Kontrolle $0,3 \pm 0,01$ %; ADR+IgG $1,5 \pm 0,04$ %; ADR+Eta $1,4 \pm 0,02$ %).

Zusammenfassend zeigen die durchflusszytometrischen Daten vergleichbar zu dem immunhistologischen Ergebnis eine signifikant höhere Leukozyteninfiltration, insbesondere der Makrophagen und dendritischen Zellen in den beiden Adriamycin-Gruppen im Vergleich zu der IgG-Kontrollgruppe ohne Adriamycin-Nephropathie. Durchflusszytometrisch konnte dieser Effekt auch für die Infiltration renaler T-Zellen gezeigt werden, obwohl sich hier immunhistologisch in den Adriamycin-behandelten Gruppen keine gesteigerte T-Zellinfiltration ergab. Ursächlich für diese diskrepanten Ergebnisse beider Methoden könnte sein, dass in der Durchflusszytometrie das gesamte Nierengewebe, immunhistologisch jedoch nur der Nierenkortex ausgewertet wurde. Beide Methoden zeigten jedoch in jedem Fall das in den Adriamycin-Gruppen die Etanercept-Behandlung die renale Leukozyteninfiltration im Vergleich zur IgG-Kontrolle nicht beeinflusst.

3.5.6 Expression renaler Entzündungsmediatoren

Zur Quantifizierung der renalen Expression pro- und antiinflammatorischer Chemokine, Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Transkriptionsfaktoren im Modell der Adriamycin-Nephropathie wurde eine quantitative real-time PCR des Nierengewebes durchgeführt. Dabei zeigte sich bei beiden Adriamycin-behandelten Gruppen im Vergleich zur gesunden IgG-Kontrollgruppe, eine mRNA-Induktion des Chemokins CCL2, nicht aber von CCL5 (Abbildung 3.20A CCL2: IgG-Kontrolle $2,6 \times 10^{-5} \pm 1,7 \times 10^{-6}$; ADR+IgG $4,0 \times 10^{-5} \pm 7,4 \times 10^{-6}$; ADR+Eta $5,6 \times 10^{-5} \pm 7,6 \times 10^{-6}$ Abbildung 3.20B CCL5: IgG-Kontrolle $6,9 \times 10^{-5} \pm 3,3 \times 10^{-5}$; ADR+IgG $6,2 \times 10^{-5} \pm 1,7 \times 10^{-5}$;

3.5 Effekt von Etanercept auf die Adriamycin-Nephropathie

ADR+Eta $7,4 \times 10^{-5} \pm 2,2 \times 10^{-5}$). Innerhalb der Adriamycin-behandelten Gruppen ergab sich jedoch kein Unterschied bezüglich der Expression von CCL2. Das Adhäsionsmolekül VCAM wurde ebenfalls in den Nieren der beiden Adriamycin-behandelten Tiergruppen im Vergleich zur gesunden IgG-Kontrolle vermehrt exprimiert, ohne signifikante Unterschiede zwischen Etanercept und Kontroll-IgG behandelten Adriamycin-Tieren (Abbildung 3.20C IgG-Kontrolle $4,9 \times 10^{-5} \pm 1,5 \times 10^{-5}$; ADR+IgG $7,2 \times 10^{-5} \pm 2,2 \times 10^{-5}$; ADR+ Eta $10,1 \times 10^{-5} \pm 4,4 \times 10^{-5}$). Für TNF zeigte sich kein Unterschied zwischen der gesunden IgG-Kontrollgruppe ohne Adriamycin-Nephropathie und den mit Adriamycin-behandelten IgG- oder Etanercept-Gruppen (Abbildung 3.20D IgG-Kontrolle $1,5 \times 10^{-5} \pm 5,9 \times 10^{-6}$; ADR+IgG $1,2 \times 10^{-5} \pm 4,2 \times 10^{-6}$; ADR+Eta $1,5 \times 10^{-5} \pm 7,2 \times 10^{-6}$). Dagegen war das profibrotische Zytokin TGF- β in beiden Gruppen mit Adriamycin-Nephropathie im Vergleich zur gesunden IgG-Kontrollgruppe ohne Adriamycin-Nephropathie signifikant induziert, was für eine verstärkte Fibrose des Gewebes spricht (Abbildung 3.20E IgG-Kontrolle $2,4 \times 10^{-5} \pm 9,3 \times 10^{-6}$; ADR+IgG $12,4 \times 10^{-5} \pm 4,1 \times 10^{-5}$; ADR+Eta $14,3 \times 10^{-5} \pm 5,8 \times 10^{-5}$). Auch der Transkriptionsfaktor GATA-3, welcher die T-Zell Entwicklung zu Gunsten der bei der Adriamycin-Nephropathie relevanten Th2-Immunantwort lenkt, wurde in beiden Adriamycin-Gruppen vermehrt exprimiert, während die renale T-bet Expression, welche mit einer Th1-Zellentwicklung assoziiert ist, signifikant vermindert nachweisbar war. Die Etanercept-Behandlung beeinflusste dieses Expressionsmuster im Vergleich zur IgG-Kontrolle mit Adriamycin-Behandlung nicht signifikant (Abbildung 3.20F GATA-3: IgG-Kontrolle $2,1 \times 10^{-5} \pm 9,2 \times 10^{-6}$; ADR+IgG $9,1 \times 10^{-5} \pm 4,8 \times 10^{-5}$; ADR+Eta $15,6 \times 10^{-5} \pm 7,4 \times 10^{-5}$ 3.20G T-bet: IgG-Kontrolle $60,1 \times 10^{-6} \pm 33,2 \times 10^{-6}$; ADR+IgG $1,7 \times 10^{-6} \pm 6,2 \times 10^{-7}$; ADR+Eta $3,9 \times 10^{-6} \pm 2,8 \times 10^{-6}$).

Zusammenfassend zeigte sich bei der mRNA-Analyse wie bei den funktionellen und morphologischen Parametern keine signifikanten Effekte der Etanercept-Behandlung auf die renale Expression inflammatorischer Mediatoren, die im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie induziert werden. Insgesamt konnte somit in den in vivo-Versuchen kein therapeutischer Effekt der Etanercept-Behandlung auf die Adriamycin-Nephropathie nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

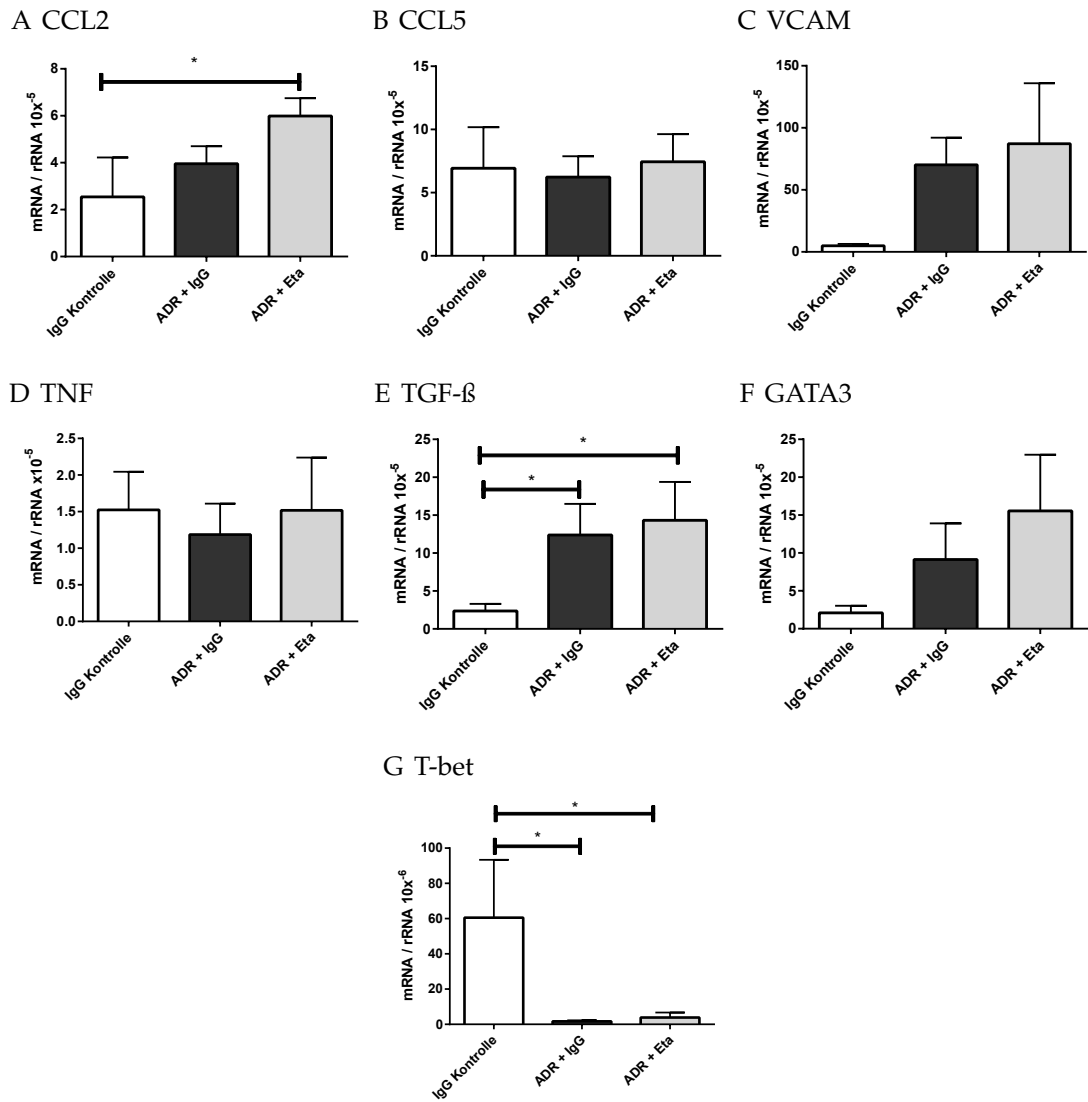


Abbildung 3.20: Expression renaler Entzündungsmediatoren in Kontroll- und Adriamycin-Nephropathie Gruppe mit Etanercept- und Kontroll-IgG- Behandlung: Gesamt-RNA wurde am Tag 28 aus den Nieren der Mäuse gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Die mRNA-Expression wurde durch real-time PCR für CCL2, CCL5, VCAM, TNF, TGF-β, GATA3 und T-bet bestimmt. Dargestellt sind MW ± SEM. ADR+IgG bzw. ADR+Eta n=5, IgG-Kontrolle n=5 * $p \leq 0,05$

Diskussion

4.1 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse

Die *in vitro*-Stimulation mittels Adriamycin führte sowohl in primären Glomerula *ex vivo*, als auch in den immortalisierten Mesangialzellen, nicht aber in Podozyten zu einer erhöhten TNF-Freisetzung. Eine TNF-Blockade mit dem TNFR2-IgG-Fusionsprotein Etanercept konnte in den *in vitro*-Versuchen die TNF-Konzentration senken. Das als Kontrolle von Etanercept applizierte humane IgG zeigte keine signifikante Wirkung auf Zellen bezüglich der TNF-Freisetzung und wurde deshalb als geeignete Negativkontrolle zu Etanercept verwendet.

Bei der Stimulation mit TNF zeigte sich, dass sowohl Mesangialzellen, als auch Podozyten durch exogenes TNF aktiviert werden und dosisabhängig mit erhöhter Chemokinsekretion von CCL2 und CCL5 reagierten. Etanercept reduzierte die Freisetzung beider Chemokine signifikant. Die Stimulation von Glomerula, Mesangialzellen und Podozyten mit Adriamycin zeigte eine erhöhte Adriamycin-induzierte Chemokinfreisetzung von CCL2, nicht jedoch von CCL5 in Glomeruli und Mesangialzellen. Unter Adriamycin-Stimulation verminderte Etanercept die CCL2-Freisetzung. Etanercept zeigte keinen Einfluss auf die nach Adriamycin-Stimulation nicht induzierte CCL5-Freisetzung. Das Apoptose-FACS bestätigte eine hohe Zytotoxizität von Adria-

4 Diskussion

mycin in der Dosis 3 µg/ml vor allem in Podozyten, aber auch in Mesangialzellen. Bei einer niedrigeren Dosis von 0,3 µg/ml wurde die Toxizität deutlich reduziert.

Die Versuche zeigten, dass Adriamycin-Stimulation eine TNF-vermittelte CCL2-Freisetzung in Glomeruli und Mesangialzellen, nicht jedoch in Podozyten induziert. Sowohl TNF, als auch CCL2 könnten daher zur Progression der Glomerulosklerose im Modell der Adriamycin-Nephropathie beitragen. Die TNF-Blockade mittels Etanercept zeigte *in vitro* gute Ergebnisse hinsichtlich der Reduktion beider Proteine. Folglich wurde die Wirksamkeit einer TNF-Blockade mit Etanercept hinsichtlich einer Verbesserung der Adriamycin-induzierten Glomerulosklerose und Progression *in vivo* evaluiert.

Die TNF-Blockade mittels Etanercept führte im Modell der Adriamycin-Nephropathie in BALB/c Mäusen entgegen der Erwartung zu keinem positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf. Weder kam es zu einer signifikanten Verbesserung der funktionellen Parameter wie Albuminurie, Serumharnstoff oder Cholesterin, noch zeigte sich eine histologische Verbesserung des renalen Gewebeschadens, der renalen Leukozyteninfiltration oder der renalen mRNA-Expression inflammatorischer Mediatoren.

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

4.2.1 Effekte von Adriamycin und TNF auf Nierenzellen *in vitro*

Die Ergebnisse der Versuche führen zu zwei wichtigen Aussagen. Zum einen, dass Adriamycin selbst in höherer Konzentration zytotoxisch ist und Mesangialzellen und Podozyten schädigt. Zum anderen, dass Adriamycin über TNF-Freisetzung zu einer glomerulären Ausschüttung proinflammatorischer Chemokine wie CCL2 führt, was wiederum eine renale Gewebeschädigung und Leukozyteninfiltration verstärken kann. Die Gruppe von Kriz zeigte am Puromycin-Aminonucleosid-Rattenmodell, ein Modell, das der murinen Adriamycin-Nephropathie ähnelt, dass das Initialereignis zur Entwicklung des Nierenschadens der Verlust von Podozyten ist. Die Ver-

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

änderungen in der glomerulären Basalmembran und dem Aktinzytoskelett im Podozyten selbst führen durch Verschmelzung der Fußfortsätze letztlich zum Integritätsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere. Diese Ereignisse treten ebenfalls im Adriamycin-Modell auf. Adriamycin führt zu Interkalierung der DNA in Zellen, was über eine Hemmung der Topoisomerase 11 letztlich in der Generierung von freien Radikalen mündet. Diese freien Radikale führen wiederum zu DNA-Schädigung, Zerstörung der Zellmembran, Fußfortsatzverlust und letztendlich zu Nekrose von Podozyten sowie zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie TNF [99]. Die hier erarbeiteten in vitro-Daten zeigen, dass Adriamycin-Exposition in murinen Glomeruli und Mesangialzellen, nicht jedoch in Podozyten eine TNF-Sekretion induziert. Der früh einsetzende Podozytenverlust und glomerulärer Schaden im Adriamycin-Modell könnte daher durch glomeruläre TNF-Sekretion mitvermittelt und durch TNF-Blockade mittels Etanercept reduziert werden. Im Modell der Alportnephropathie zeigte Ryu et al., dass TNF zu vermehrter Apoptose in Podozyten führt, welche durch Etanercept-Behandlung reduziert werden kann. Jedoch zeigte Etanercept selbst keinen Einfluss auf die Fußfortsatzveränderungen [100].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Adriamycin in Mesangialzellen zu einer TNF-Freisetzung führt (siehe Kapitel 3.3). Die aktivierten Mesangialzellen könnten neben TNF noch weitere proinflammatorische Faktoren wie Chemokine sezernieren, und so Podozyten und tubuläre Epithelzellen aktivieren. Dass die Zellen des Glomerulus und Tubulointerstitiums über solch einen „Cross talk“ miteinander in Verbindung stehen und dass TNF ein wichtiger Faktor in diesem „Cross talk“ ist, wurde von Lai et al. gezeigt [14]. Es kommt wahrscheinlich zu einer Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs, welcher zur Induktion proinflammatorischer Mediatoren wie CCL2 führt [101]. Im Adriamycin-Modell wurde eine CCL2- und CCL5-Expression in renalen Tubuluszellen beschrieben [102]. Im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis ist CCL2 mit glomerulärer und interstitieller Entzündung assoziiert [103]. CCL2 spielt eine entscheidende Rolle bei der Infiltration inflammatorischer Zellen wie Makrophagen und dendritischer Zellen in Glomerula oder das Interstitium, um so die Entzündung zu initiieren oder zu aggravieren. Die Chemokinsekretion korreliert dabei mit der Anzahl an lokal infiltrierten Effektorzellen, hauptsächlich Makrophagen und T-Zellen, sowie dem Ausmaß des renalen Schadens [104]. Auch im Adriamycin-Modell führen CCL2 und CCL5 zu einer Infiltration von Leukozyten, einer konsek-

4 Diskussion

tiven Entzündung, Fibrose und letztlich zu einem Funktionsverlust der Niere. Durch Vakzination gegen beide Chemokine, jedoch nicht gegen CCL2 alleine, konnte eine signifikante Verbesserung der funktionellen Parameter und histologischen Schädigung erzielt werden [105]. Ob die Adriamycin-Exposition direkt über TNF-Freisetzung zu einer renalen Expressionssteigerung der Chemokine CCL2 und CCL5 führt, wurde bisher noch nicht untersucht. Wäre dies der Fall, könnte eine TNF-Blockade zu einer Reduktion der CCL2- und CCL5-Sekretion führen. Die nachfolgende verminderte Chemotaxis auf Leukozyten könnte somit eine Reduktion von Inflammation und Fibrose zur Folge haben.

In den durchgeführten in-vitro Versuchen zeigte sich ein von der Adriamycin-Konzentration abhängiges Ergebnis. Sowohl bei den Glomeruli, als auch bei den Mesangialzellen kam es bei der Adriamycin-Dosis von 0,3 µg/ml zu einer gesteigerten Sekretion von CCL2. Durch die TNF-Blockade mit Etanercept konnte eine signifikante Reduktion der glomerulären, und vor allem der mesangialen Chemokinfreisetzung erreicht werden. Dieses Ergebnis belegt eine TNF-vermittelte CCL2-Produktion nach glomerulärer Adriamycin-Exposition, da die TNF-Blockade sonst auf die Adriamycin-induzierte Chemokinsekretion wirkungslos bleiben würde. Die Adriamycin-Dosis 3 µg/ml zeigte bei Glomerula, Mesangialzellen und Podozyten deutlich reduzierte Chemokinausschüttung, was durch Zytotoxizität der hohen Adriamycin-Konzentration erklärt werden kann. Damit vereinbar sind die Ergebnisse von Jin et al., die zeigten, dass bereits eine 24-stündige Adriamycin-Stimulation mit einer Dosis von 0,2 µg/ml in Mesangialzellen zu Zellskelettveränderungen führt, und die Kontraktilität einschränkt [106]. Dagegen stimulierten Guo et al. Podozyten über drei Tage mit einer Adriamycin-Dosis von 3 µg/ml, die sich in unseren Experimenten als deutlich zytotoxisch herausgestellt hat [94].

Interessanterweise konnten wir im Gegensatz zu CCL2 weder in Glomerula, noch in Podozyten und Mesangialzellen eine Adriamycin-induzierte Sekretion von CCL5 beobachten, obwohl eine direkte Stimulation mit TNF in Podozyten und Mesangialzellen zu einer vermehrten CCL2- und CCL5-Produktion führte. Auch in vorangegangenen Arbeiten hatte unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen können, dass eine Expression und Sekretion von CCL2, aber auch CCL5 in TNF-stimulierten Glomerula induziert wird [65]. Die durch Adriamycin-Stimulation induzierte TNF-Freisetzung

scheint dagegen nur zu einer Induktion der CCL2-, nicht jedoch CCL5-Sekretion zu führen.

4.2.2 Bedeutung der TNF-Blockade mit Etanercept auf die Adriamycin-Nephropathie in vivo

Die Ergebnisse der in vitro-Zellexperimente legen nahe, dass Adriamycin neben einem direkt zytotoxischen Effekt auf glomeruläre Zellen auch über vermehrte TNF-Freisetzung zu einer zusätzlichen Entzündungsreaktion, glomerulärem Schaden und letztlich zur chronischen Nierenfunktionseinschränkung führt. Durch TNF-Blockade mittels Etanercept könnte es zu einer Unterbrechung verschiedener immunologischer Kaskaden kommen, unter anderem der pathophysiologisch relevanten CCL2-Freisetzung, welche die Progression der Glomerulosklerose möglicherweise verzögern würde. Diese Hypothese wurde in vivo im Modell der Adriamycin-induzierten Nephropathie in BALB/c Mäusen überprüft. Dieses Modell ist besonders gut geeignet, da es das menschliche Korrelat der fokal segmentalen Glomerulosklerose sowohl im glomerulären, als auch sekundär interstitiellen Verlauf widerspiegelt, und sich so mögliche therapeutische Effekt gut untersuchen lassen [91].

Die Ergebnisse zeigen, dass es bei den Adriamycin-behandelten Gruppen zu einem signifikanten Gewichtsverlust kommt. Dieser ist typisch für die Adriamycin-Nephropathie und war in der IgG-Kontrollgruppe ohne Adriamycin-Applikation nicht vorhanden [91]. Die mit Adriamycin-behandelten Gruppen entwickelten eine massive Proteinurie innerhalb der ersten Woche nach Induktion. Dies ging mit einem Anstieg der Serumharnstoffwerte bis Woche vier einher. Adriamycin-Behandlung führte im Gegensatz zur IgG-Kontrollgruppe zu signifikant erhöhten Serumcholesterinwerten. Erhöhte Cholesterinwerte sprechen für das Vorliegen eines nephrotischen Syndroms. Allgemein korrelieren erhöhte Cholesterinwerte positiv mit der Gesamtproteinurie. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Hyperlipidämie den renalen Schaden verstärken kann [107][108]. Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Adriamycin-Nephropathie erfolgreich induziert werden konnte. Proteinurie, sowie die veränderten Serumwerte könnten durch direkte Zytotoxizität von Adriamycin und konsekutiven Podozytenschaden erklärt werden. Adriamycin verändert die glo-

4 Diskussion

meruläre Filtrationsbarriere, vor allem durch Schädigung der glomerulären Basalmembran und der Podozyten durch Verschmelzung der Fußfortsätze. Es kommt zu einer dünneren Glykokalyx, einer erweiterten Porengröße des Endothels und einer verminderten Ladungsselektivität. Alle genannten Veränderungen führen durch direkte Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere auch zu einer anschließenden Schädigung des Tubulointerstitiums [109]. Einen weiteren Hinweis auf die direkte Adriamycin-Toxizität lieferte die Arbeitsgruppe von DeBoer. Durch das Abklemmen einer Nierenarterie während der Adriamycin-Injektion kam es zu deutlich weniger sklerotischen Läsionen in der abgeklemmten, nicht Adriamycin-exponierten Niere [107].

Neben der direkten Zytotoxizität zeigten unsere *in vitro* Versuche, dass Adriamycin in Glomeruli, Podozyten und Mesangialzellen zur vermehrten Sekretion von TNF führt. TNF führt glomerulär freigesetzt zu einer auto- oder parakrinen Stimulation von Mesangialzellen und Podozyten. In Podozyten führt TNF zu einer vermehrten Sekretion von proinflammatorischen Proteinen, einer Generation von ROS, einer Reorganisation des Zytoskeletts und vermehrter Apoptose [66]. In Mesangialzellen stimuliert TNF ebenfalls die Produktion von CCL2, ROS, TGF- β und führt ebenfalls zu vermehrter Apoptose. Mesangial sezerniertes TNF führt auch zu einer Aktivierung von Tubulusepithelzellen, was in einer sekundären Inflammation des Interstitiums mündet [110][111][112]. TNF spielt also potentiell eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der Adriamycin-Nephropathie. Neben TNF können filtrierte Plasmaproteine einen starken proinflammatorischen Stimulus für Tubulusepithelzellen darstellen [113].

In unseren Versuchsmäusen zeigte sich eine massive Proteinurie. Diese Proteinurie könnte neben TNF selbst, zur Progression der Adriamycin-Nephropathie beitragen. Proteinurie führt zu einer Ausschüttung von CCL2 und CCL5 aus tubulären Epithelzellen, und induziert so eine Infiltration von Makrophagen und später Lymphozyten in das renale Interstitium. Auch in Adriamycin-behandelten Mäusen konnten wir in der aktuellen Untersuchung, wie auch in Vorarbeiten eine gesteigerte CCL2 mRNA-Expression nachweisen [42]. Im Modell der toxischen Serumnephritis, einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis mit Proteinurie und sekundärer interstitieller Schädigung, zeigten CCL2 knock-out Mäuse eine deutlich geringere Infiltration von Makrophagen und T-Zellen in das Interstitium und einen milderen tubu-

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

lointerstitiellen Schaden. Die gleiche Gruppe zeigte, dass CCL2 Makrophagen rekrutiert, die später für interstitiellen Zellschaden und Fibrose verantwortlich sind [103]. Die Menge des gebildeten CCL2 korreliert dabei positiv mit der Anzahl an infiltrierten Makrophagen, die wiederum mit dem Ausmaß der Fibrose korreliert [114]. Die in der vorliegenden Arbeit durch in vitro Untersuchungen nachgewiesene, Adriamycin-induzierte TNF-Sekretion in Glomerula, vor allem in Mesangialzellen, könnte somit sowohl glomerulär, als auch tubulointerstitiell durch lokale Induktion proinflammatorischer Mediatoren wie CCL2 zur renalen Schädigung im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie beitragen.

Trotz der vielversprechenden in vitro Daten zeigte eine TNF-Blockade mit Etanercept in Adriamycin-behandelten Tieren keine Verbesserung funktioneller Parameter wie Proteinurie, Serumharnstoffwerte und Cholesterin. Auch das Ausmaß der renalen Schädigung (Glomerulosklerose), die renale Leukozyteninfiltration und die renale Expression inflammatorischer und profibrotischer Moleküle wurde durch die Etanercept-Behandlung nicht beeinflusst.

Eine mögliche Ursache für die fehlende Verbesserung der Adriamycin-Nephropathie durch Etanercept könnte sein, dass die glomeruläre TNF-Expression nach Adriamycin-Behandlung in vivo sehr niedrig, und daher vielleicht pathophysiologisch nicht relevant sein könnte. Einen Anhalt hierfür geben die in den Versuchen ermittelten TNF mRNA-Expressionsdaten. Allerdings wurde die TNF-Expression im Gesamtnierengewebe, aber nicht spezifisch in Glomeruli untersucht. Somit könnte es sein, dass eine hohe glomeruläre TNF-Expression nach Adriamycin-Behandlung eventuell nicht detektiert wurde.

Eine andere mögliche Ursache für die fehlende Verbesserung der Adriamycin-Nephropathie unter Etanercept-Gabe könnte sein, dass die erreichten Etanercept-Spiegel in der von uns gewählten intraperitonealen Applikation zu niedrig waren um TNF in vivo wirksam zu blockieren. Eine höhere Etanercept-Dosis hätte möglicherweise eine protektive Wirkung auf die Adriamycin-Nephropathie gezeigt. Dem gegenüber steht, dass in verschiedenen anderen Arbeitsgruppen das gleiche Etanercept-Applikationsschema oder sogar niedrigere Etanercept-Dosen appliziert wurden. Im Modell der hypertensiven Nephropathie verbesserte eine Etanercept-Applikation von 5 mg/kg pro Tag das Ausmaß des renalen Schadens [115]. Eine acht-

4 Diskussion

wöchige, intraperitoneale Etanercept-Applikation führte im Modell der diabetischen Nephropathie in Mäusen zu einer deutlichen Verbesserung von Proteinurie, einer verringerten Expression der proinflammatorischen Moleküle CCL2 und VCAM-1, sowie zu einer Reduktion von F4/80-positiven Makrophagen *in vivo*. Dieser protektive Effekt von Etanercept wurde vornehmlich durch eine Blockade von TNF-TNFR2-vermittelten proinflammatorischen Signalen erreicht. Etanercept-Behandlung führte zu erniedrigten mRNA- und Protein-Expression von TNFR2, nicht aber von TNF oder TNFR1 im Vergleich zu unbehandelten Mäusen [116].

Eine weitere Ursache der fehlenden Verbesserung der Adriamycin-Nephropathie unter Etanercept-Behandlung könnten die möglichen unterschiedlichen pathophysiologischen Effekte von sezerniertem, löslichen TNF (sTNF) und membranständig exprimiertem TNF (mTNF) in Glomerula sein. Vordaten weisen auf eine entscheidende Rolle von membranständigem TNF bei glomerulärer Entzündung hin. So ist vor allem lokal, durch intrinsische Nierenzellen sezerniertes TNF im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis entscheidend für die Bildung glomerulärer Halbmonde [57]. Membranständiges TNF, nicht aber gelöstes TNF ist essentiell, um TNFR2 zu aktivieren [44][117]. Vordaten aus unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigen interessanterweise, dass durch intrinsische Nierenzellen, vor allem auf glomerulären Endothelzellen exprimierter TNFR2 und nicht TNFR1 für die glomeruläre Schädigung im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis essentiell ist [118]. Mäuse mit ausschließlicher mTNF-Expression ohne die Möglichkeit der TNF-Sekretion zeigen entsprechend im nephrotoxischen Serumnephritis-Modell eine deutliche Verschlechterung des glomerulären Schadens (preliminäre Daten unserer Arbeitsgruppe). Aus diesen Daten ergibt sich die Hypothese, dass das Fusionsprotein Etanercept zwar *in vitro*, nicht aber *in vivo* das pathophysiologisch im Glomerulus relevante mTNF blockiert. Im Gegensatz dazu könnten TNF-blockierende Antikörper wie Infliximab oder Adalimumab dieses pathophysiologisch wichtige mTNF blockieren. Infliximab bindet mTNF effektiver als Etanercept, da es im Gegensatz zu Etanercept alle drei freien TNF-Einheiten bindet, während Etanercept aufgrund seiner Struktur nur zwei der drei TNF-Einheiten binden kann, und somit eine TNF-Einheit als potentielle Bindungsstelle frei ist [78][119]. Ebenfalls wurde in Studien an Patienten gezeigt, dass Etanercept in der Therapie granulomatöser Erkrankungen wie Morbus Crohn, in denen lokal exprimiertes mTNF wahrscheinlich eine führende Rolle für die Krankheits-

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

progression spielt, im Gegensatz zu TNF-blockierenden Antikörpern wie Infliximab keinen Einfluss auf die Krankheit hat [120][121]. Entsprechend zeigte sich auch kein zusätzlicher therapeutischer Effekt einer Etanercept-Behandlung bei der Granulomatose mit Polyangiitis (vormals Morbus Wegener), einer ANCA-assoziierten Kleingefäßvaskulitis mit häufiger nekrotisierender Glomerulonephritis [122][123]. Dagegen führte die Behandlung der SLE-bedingten Glomerulonephritis (Lupusnephritis) mit dem TNF-blockierenden Antikörper Infliximab zu einer langanhaltenden Besserung mit deutlicher Reduzierung der Proteinurie [124]. Schließlich zeigt die Anwendung TNF-blockierender Therapien in der Rheumatologie, vor allem bei rheumatoider Arthritis, dass gerade Etanercept im Vergleich zu den TNF-blockierenden Antikörpern das geringste Tuberkulose-reaktivierende Potential hat [125][126]. Etanercept unterdrückt wahrscheinlich die für die Heilung von Tuberkulose wichtige Granulombildung am wenigsten von allen TNF-blockierenden Medikamenten. Es wurde gezeigt, dass mTNF an der Immunreaktion gegen *Mycobacterium tuberculosis* beteiligt ist [127]. Tierexperimentelle Daten zeigen, dass gerade mTNF eine essentielle Rolle für die Granulombildung bei Tuberkulose spielt [128]. Daher ist es wahrscheinlich, dass Etanercept eine für die Heilung von Tuberkulose wichtige Granulombildung weniger stark unterdrückt, indem es mTNF geringer als Infliximab bindet. Gewebeproben von Infliximab-behandelten Patienten weisen keine Granulombildung auf [125][126].

Zusammenfassend hat die TNF-Blockade mit Etanercept zwar nicht zu einer Verbesserung der funktionellen oder morphologischen Parameter der FSGS geführt, jedoch kann der Stellenwert einer TNF-Blockade in der Adriamycin-Nephropathie noch nicht abschließend beurteilt werden. Es fehlen in vivo Experimente mit TNF-blockierenden Antikörpern wie Infliximab oder Adalimumab, die durch eine potentiell effektivere Hemmung von mTNF eventuell einen therapeutischen Effekt aufzeigen können.

Abkürzungsverzeichnis

ADR	Adriamcyin
ANCA	Antineutrophile zytoplasmatische Antikörper
APC	Allophycocyanin
APES	Ammuniompersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL	Chemokinrezeptor Ligand
CD2AP	CD2-assoziiertes Protein
CDC	Komplement-vermittelte Zytotoxizität
cDNA	komplementäre DNA
CT-Wert	Cycle Threshold-Wert
DC	Dendritische Zellen
DEPC	Diethyl-pyrocarbonat
DMARD	Disease modifying antirheumatic drugs
DMEM	Dulbeco's Modified Eigel Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Deoxynucleotriphosphate
EDTA	Ethylen-diamin Tetraessigsäure
ELISA	Enzym linked Immunosorbent Assay
Eta	Etanercept
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate

Abkürzungsverzeichnis

HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDA	Kilodalton
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
mTNF	transmembranes TNF
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffoxid
PAS-Färbung	Periodic Acid Schiff- Färbung
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanine 5
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SMA-Färbung	alpha-Smooth Muscle Antigen-Färbung
SPF	spezifisch-pathogenfreien
sTNF	lösliches TNF
SV40-TAg Vektor	SV40-large-T-antigen Vektor
TACE	TNF-alpha converting enzyme
TGF-β	Transforming-growth-factor beta
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
VCAM	Vascular adhesion molecule

Literaturverzeichnis

- [1] Schober-Halstenberg H.-J., Frei U. Nierenersatztherapie in Deutschland: QuaSi Niere Jahresbericht 2006/2007, 2008.
- [2] (USRDS), United States Renal System. Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States: Annual Report 2011 , 2011.
- [3] C. Kitiyakara, J. B. Kopp, and P. Eggers. Trends in the epidemiology of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin. Nephrol.*, 23(2):172–182, Mar 2003.
- [4] M. Mourad, J. Malaise, D. Chaib Eddour, M. De Meyer, J. Konig, R. Schepers, J. P. Squifflet, and P. Wallemacq. Correlation of mycophenolic acid pharmacokinetic parameters with side effects in kidney transplant patients treated with mycophenolate mofetil. *Clin. Chimi.*, 47(1):88–94, Jan 2001.
- [5] Jenette C. Fogo A.B., Cohen A. *Fundamentals of renal pathology*. Springer, New York City, New York, 2008.
- [6] Toronto Western Hospital Chief of Medicine Cole E. Nephrotic syndrome. http://morningreporttwh.blogspot.de/2012_09_01_archive.html, 2012. [Online; accessed 10-März-2014].
- [7] B. Haraldsson, J. Nystrom, and W. M. Deen. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol. Rev.*, 88(2):451–487, Apr 2008.
- [8] W. Kriz. Biologie des Podozyten. *Nephrologe*, 1:144–152, Jan 2006.

- [9] R. Gbadegesin, P. Lavin, J. Foreman, and M. Winn. Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update. *Pediatr. Nephrol.*, 26(7):1001–1015, Jul 2011.
- [10] B. G. Hudson, K. Tryggvason, M. Sundaramoorthy, and E. G. Neilson. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N. Engl. J. Med.*, 348(25):2543–2556, Jun 2003.
- [11] C. Kwoh, M. B. Shannon, J. H. Miner, and A. Shaw. Pathogenesis of nonimmune glomerulopathies. *Annu. Rev. Pathol.*, 1:349–374, 2006.
- [12] R. C. Wiggins. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.*, 71(12):1205–1214, Jun 2007.
- [13] A. B. Fogo. Glomerular hypertension, abnormal glomerular growth, and progression of renal diseases. *Kidney Int. Suppl.*, 75:15–21, Apr 2000.
- [14] K. N. Lai, J. C. Leung, L. Y. Chan, M. A. Saleem, P. W. Mathieson, F. M. Lai, and S. C. Tang. Activation of podocytes by mesangial-derived TNF-alpha: glomerulo-podocytic communication in IgA nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 294(4):F945–955, Apr 2008.
- [15] R. S. Al-Lamki, J. Wang, J. N. Skepper, S. Thiru, J. S. Pober, and J. R. Bradley. Expression of tumor necrosis factor receptors in normal kidney and rejecting renal transplants. *Lab. Invest.*, 81(11):1503–1515, Nov 2001.
- [16] T. J. Neale, B. M. Ruger, H. Macaulay, P. R. Dunbar, Q. Hasan, A. Bourke, R. P. Murray-McIntosh, and A. R. Kitching. Tumor necrosis factor-alpha is expressed by glomerular visceral epithelial cells in human membranous nephropathy. *Am. J. Pathol.*, 146(6):1444–1454, Jun 1995.
- [17] B. Laurent and R. Ardaillou. Reactive oxygen species: Production and role in the kidney. *Am. J. Physiol.*, 251:20/5, 1986.
- [18] A. R. Rich. A hitherto undescribed vulnerability of the juxtamedullary glomeruli in lipoid nephrosis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 100(4):173–186, Apr 1957.
- [19] J. Churg, R. Habib, and R. H. White. Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children.

Lancet, 760(1):1299–1302, Jun 1970.

- [20] V. D'Agati, F. J. Kaskel, and R. J. Falk. Focal segmental glomerulosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 365(25):2398–2411, Dec 2011.
- [21] V. D'Agati. Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis. *Semin. Nephrol.*, 23(2):117–134, Mar 2003.
- [22] R. C. Harris and E. G. Neilson. Toward a unified theory of renal progression. *Annu. Rev. Med.*, 57:365–380, 2006.
- [23] L. Kairaitis, Y. Wang, L. Zheng, Y. C. Tay, Y. Wang, and D. C. Harris. Blockade of CD40-CD40 ligand protects against renal injury in chronic proteinuric renal disease. *Kidney Int.*, 64(4):1265–1272, Oct 2003.
- [24] Y. Wang, D. Mahajan, Y. C. Tay, S. Bao, T. Spicer, L. Kairaitis, G. K. Rangan, and D. C. Harris. Partial depletion of macrophages by ED7 reduces renal injury in Adriamycin nephropathy. *Nephrology (Carlton)*, 10(5):470–477, Oct 2005.
- [25] Y. Wang, Y. Wang, X. Feng, S. Bao, S. Yi, L. Kairaitis, Y. C. Tay, G. K. Rangan, and D. C. Harris. Depletion of CD4(+) T cells aggravates glomerular and interstitial injury in murine adriamycin nephropathy. *Kidney Int.*, 59(3):975–984, Mar 2001.
- [26] J. Park, D. R. Ryu, J. J. Li, D. S. Jung, S. J. Kwak, S. H. Lee, T. H. Yoo, S. H. Han, J. E. Lee, D. K. Kim, S. J. Moon, K. Kim, D. S. Han, and S. W. Kang. MCP-1/CCR2 system is involved in high glucose-induced fibronectin and type IV collagen expression in cultured mesangial cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 295(3):F749–757, Sep 2008.
- [27] G. K. Rangan, Y. Wang, Y. C. Tay, and D. C. Harris. Cytokine gene expression in Adriamycin nephropathy: effects of antioxidant nuclear factor kappaB inhibitors in established disease. *Nephron*, 86(4):482–490, Dec 2000.
- [28] Q. Ao, Q. Cheng, Q. Ma, X. Wang, and S. Liu. Inhibition of calcium(2+)/calmodulin-dependent protein kinase type IV ameliorates experimental nephrotic syndrome. *Intern. Med.*, 52(10):1035–1041, 2013.
- [29] Y. Wang, Y. P. Wang, G. Zheng, V. W. Lee, L. Ouyang, D. H. Chang, D. Mahajan, J. Coombs, Y. M. Wang, S. I. Alexander, and D. C. Harris. Ex vivo programmed

- macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int.*, 72(3):290–299, Aug 2007.
- [30] E. A. Carswell, L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, and B. Williamson. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72(9):3666–3670, Sep 1975.
- [31] B. B. Aggarwal, B. Moffat, and R. N. Harkins. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.*, 259(1):686–691, Jan 1984.
- [32] B. B. Aggarwal, S. Shishodia, K. Ashikawa, and A. C. Bharti. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 1(4):327–341, Dec 2002.
- [33] M. Feldmann. Development of anti-TNF therapy for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(5):364–371, May 2002.
- [34] G. Kollias and D. Kontoyiannis. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13(4-5):315–321, 2002.
- [35] P. J. Charles, R. J. Smeenk, J. De Jong, M. Feldmann, and R. N. Maini. Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials. *Arthritis Rheum.*, 43(11):2383–2390, Nov 2000.
- [36] L. Lepore, F. Marchetti, S. Facchini, V. Leone, and A. Ventura. Drug-induced systemic lupus erythematosus associated with etanercept therapy in a child with juvenile idiopathic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 21(2):276–277, 2003.
- [37] M. B. Stokes, K. Foster, G. S. Markowitz, F. Ebrahimi, W. Hines, D. Kaufman, B. Moore, D. Wolde, and V. D. D’Agati. Development of glomerulonephritis during anti-TNF-alpha therapy for rheumatoid arthritis. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 20(7):1400–1406, Jul 2005.

- [38] B. W. van Oosten, F. Barkhof, L. Truyen, J. B. Boringa, F. W. Bertelsmann, B. M. von Blomberg, J. N. Woody, H. P. Hartung, and C. H. Polman. Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology*, 47(6):1531–1534, Dec 1996.
- [39] D. S. Goodsell. The molecular perspective: tumor necrosis factor. *Oncologist*, 11(1):83–84, Jan 2006.
- [40] D. J. MacEwan. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. *Br. J. Pharmacol.*, 135(4):855–875, Feb 2002.
- [41] K. Pfeffer. Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 14(3-4):185–191, 2003.
- [42] P. Vassalli. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.*, 10:411–452, 1992.
- [43] S. M. Santee and L. B. Owen-Schaub. Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *J. Biol. Chem.*, 271(35):21151–21159, Aug 1996.
- [44] M. Grell, E. Douni, H. Wajant, M. Lohden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, W. Lesslauer, G. Kollias, K. Pfizenmaier, and P. Scheurich. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83(5):793–802, Dec 1995.
- [45] G. R. Brown, E. Lee, and D. L. Thiele. TNF-TNFR2 interactions are critical for the development of intestinal graft-versus-host disease in MHC class II-disparate (C57BL/6J-C57BL/6J x bm12)F1 mice. *J. Immunol.*, 168(6):3065–3071, Mar 2002.
- [46] G. Herbein, U. Mählknecht, F. Batliwalla, P. Gregersen, T. Pappas, J. Butler, W. A. O’Brien, and E. Verdin. Apoptosis of CD8⁺ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature*, 395(6698):189–194, Sep 1998.

- [47] M. I. Kafrouni, G. R. Brown, and D. L. Thiele. The role of TNF-TNFR2 interactions in generation of CTL responses and clearance of hepatic adenovirus infection. *J. Leukoc. Biol.*, 74(4):564–571, Oct 2003.
- [48] C. Perez, I. Albert, K. DeFay, N. Zachariades, L. Gooding, and M. Kriegler. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell*, 63(2):251–258, Oct 1990.
- [49] J. Xu, A. K. Chakrabarti, J. L. Tan, L. Ge, A. Gambotto, and N. L. Vujanovic. Essential role of the TNF-TNFR2 cognate interaction in mouse dendritic cell-natural killer cell crosstalk. *Blood*, 109(8):3333–3341, Apr 2007.
- [50] L. A. Tartaglia, D. Pennica, and D. V. Goeddel. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.*, 268(25):18542–18548, Sep 1993.
- [51] K. J. Van Zee, T. Kohno, E. Fischer, C. S. Rock, L. L. Moldawer, and S. F. Lowry. Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(11):4845–4849, Jun 1992.
- [52] D. Kontoyiannis and G. Kollias. Accelerated autoimmunity and lupus nephritis in NZB mice with an engineered heterozygous deficiency in tumor necrosis factor. *Eur. J. Immunol.*, 30(7):2038–2047, Jul 2000.
- [53] T. Zhou, C. K. Edwards, P. Yang, Z. Wang, H. Bluethmann, and J. D. Mountz. Greatly accelerated lymphadenopathy and autoimmune disease in *lpr* mice lacking tumor necrosis factor receptor I. *J. Immunol.*, 156(8):2661–2665, Apr 1996.
- [54] E. Douni and G. Kollias. A critical role of the p75 tumor necrosis factor receptor (p75TNF-R) in organ inflammation independent of TNF, lymphotoxin alpha, or the p55TNF-R. *J. Exp. Med.*, 188(7):1343–1352, Oct 1998.
- [55] H. Ishida, T. Muchamuel, S. Sakaguchi, S. Andrade, S. Menon, and M. Howard. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J. Exp. Med.*, 179(1):305–310, Jan 1994.

- [56] J. R. Timoshanko and P. G. Tipping. Resident kidney cells and their involvement in glomerulonephritis. *Current Drug Targets - Inflammation & Allergy*, 4(3):353–362, Jun 2005.
- [57] J. R. Timoshanko, J. D. Sedgwick, S. R. Holdsworth, and P. G. Tipping. Intrinsic renal cells are the major source of tumor necrosis factor contributing to renal injury in murine crescentic glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14(7):1785–1793, Jul 2003.
- [58] Z. I. Niemir, M. Ondracek, G. Dworacki, H. Stein, R. Waldherr, E. Ritz, and H. F. Otto. In situ upregulation of IL-10 reflects the activity of human glomerulonephritides. *Am. J. Kidney Dis.*, 32(1):80–92, Jul 1998.
- [59] T. Takemura, K. Yoshioka, K. Murakami, N. Akano, M. Okada, N. Aya, and S. Maki. Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis. *Virchows Arch.*, 424(5):459–464, 1994.
- [60] I. L. Noronha, C. Kruger, K. Andrassy, E. Ritz, and R. Waldherr. In situ production of TNF-alpha, IL-1 beta and IL-2R in ANCA-positive glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 43(3):682–692, Mar 1993.
- [61] J. Aten, A. Roos, N. Claessen, E. J. Schilder-Tol, I. J. Ten Berge, and J. J. Weening. Strong and selective glomerular localization of CD134 ligand and TNF receptor-1 in proliferative lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 11(8):1426–1438, Aug 2000.
- [62] N. I. Tomosugi, S. J. Cashman, H. Hay, C. D. Pusey, D. J. Evans, A. Shaw, and A. J. Rees. Modulation of antibody-mediated glomerular injury in vivo by bacterial lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and IL-1. *J. Immunol.*, 142(9):3083–3090, May 1989.
- [63] J. F. Navarro, F. J. Milena, C. Mora, C. Leon, and J. Garcia. Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration. *Am. J. Nephrol.*, 26(6):562–570, 2006.
- [64] V. Vielhauer and T. N. Mayadas. Functions of TNF and its receptors in renal disease: distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation.

Sem. Nephrol., 27(3):286–308, May 2007.

- [65] A. Taubitz, M. Schwarz, N. Eltrich, M. T. Lindenmeyer, and V. Vielhauer. Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation in mice. *PLoS ONE*, 8(7):e68167, 2013.
- [66] L. A. Bruggeman, P. E. Drawz, N. Kahoud, K. Lin, L. Barisoni, and P. J. Nelson. TNFR2 interposes the proliferative and NF- κ B-mediated inflammatory response by podocytes to TNF- α . *Lab. Invest.*, 91(3):413–425, Jan 2011.
- [67] K. Okamura, P. Dummer, J. Kopp, L. Qiu, M. Levi, S. Faubel, and J. Blaine. Endocytosis of albumin by podocytes elicits an inflammatory response and induces apoptotic cell death. *PLoS ONE*, 8(1):e54817, 2013.
- [68] T. Kita, N. Tanaka, and T. Nagano. The immunocytochemical localization of tumour necrosis factor and leukotriene in the rat kidney after treatment with lipopolysaccharide. *Int J Exp Pathol*, 74(5):471–479, Oct 1993.
- [69] A. Nakamura, E. J. Johns, A. Imaizumi, R. Niimi, Y. Yanagawa, and T. Kohsaka. Role of angiotensin II-induced cAMP in mesangial TNF- α production. *Cytokine*, 19(1):47–51, Jul 2002.
- [70] V. Vielhauer, V. Eis, D. Schlondorff, and H. J. Anders. Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney Blood Press. Res.*, 27(4):226–238, 2004.
- [71] C. A. Siegel, S. M. Marden, S. M. Persing, R. J. Larson, and B. E. Sands. Risk of lymphoma associated with combination anti-tumor necrosis factor and immunomodulator therapy for the treatment of Crohn’s disease: a meta-analysis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, 7(8):874–881, Aug 2009.
- [72] M. H. Weisman. What are the risks of biologic therapy in rheumatoid arthritis? An update on safety. *J. Rheumatol. Suppl.*, 65:33–38, Sep 2002.
- [73] K. M. Mohler, D. S. Torrance, C. A. Smith, R. G. Goodwin, K. E. Stremmler, V. P. Fung, H. Madani, and M. B. Widmer. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J. Immunol.*,

151(3):1548–1561, Aug 1993.

- [74] Committee, FDA Arthritis Advisory. ENBREL (Etanercept), 2001.
- [75] A. M. Reimold. New indications for treatment of chronic inflammation by TNF-alpha blockade. *Am. J. Med. Sci.*, 325(2):75–92, Feb 2003.
- [76] S. B. Hanauer, B. G. Feagan, G. R. Lichtenstein, L. F. Mayer, S. Schreiber, J. F. Colombel, D. Rachmilewitz, D. C. Wolf, A. Olson, W. Bao, and P. Rutgeerts. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet*, 359(9317):1541–1549, May 2002.
- [77] B. Haraoui. Differentiating the efficacy of the tumor necrosis factor inhibitors. *Semin. Arthritis Rheum.*, 34(5 Suppl1):7–11, Apr 2005.
- [78] T. Horiuchi, H. Mitoma, S. Harashima, H. Tsukamoto, and T. Shimoda. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*, 49(7):1215–1228, Jul 2010.
- [79] Z. Kaymakcalan, P. Sakorafas, S. Bose, S. Scesney, L. Xiong, D. K. Hanzatian, J. Salfeld, and E. H. Sasso. Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clin. Immunol.*, 131(2):308–316, May 2009.
- [80] H. Mitoma, T. Horiuchi, and H. Tsukamoto. Binding activities of infliximab and etanercept to transmembrane tumor necrosis factor-alpha. *Gastroenterology*, 126(3):934–935, Mar 2004.
- [81] A. Nesbitt, G. Fossati, M. Bergin, P. Stephens, S. Stephens, R. Foulkes, D. Brown, M. Robinson, and T. Bourne. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm. Bowel Dis.*, 13(11):1323–1332, Nov 2007.
- [82] J. M. Shohet, P. Pemberton, and M. C. Carroll. Identification of a major binding site for complement C3 on the IgG1 heavy chain. *J. Biol. Chem.*, 268(8):5866–5871, Mar 1993.
- [83] N. Koch, M. Jung, R. Sabat, J. Kratzschmar, W. D. Docke, K. Asadullah, H. D. Volk, and G. Grutz. IL-10 protects monocytes and macrophages from

- complement-mediated lysis. *J. Leukoc. Biol.*, 86(1):155–166, Jul 2009.
- [84] S. B. Khan, H. T. Cook, G. Bhangal, J. Smith, F. W. Tam, and C. D. Pusey. Antibody blockade of TNF-alpha reduces inflammation and scarring in experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.*, 67(5):1812–1820, May 2005.
- [85] S. S. Koca, A. Isik, I. H. Ozercan, B. Ustundag, B. Evren, and K. Metin. Effectiveness of etanercept in bleomycin-induced experimental scleroderma. *Rheumatology (Oxford)*, 47(2):172–175, Feb 2008.
- [86] A. A. Elmarakby, J. E. Quigley, D. M. Pollock, and J. D. Imig. Tumor necrosis factor alpha blockade increases renal Cyp2c23 expression and slows the progression of renal damage in salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, 47(3):557–562, Mar 2006.
- [87] M. Ryu, S. R. Mulay, N. Miosge, O. Gross, and H. J. Anders. Tumour necrosis factor-alpha drives Alport glomerulosclerosis in mice by promoting podocyte apoptosis. *J. Pathol.*, 226(1):120–131, Jan 2012.
- [88] M. Takemoto, N. Asker, H. Gerhardt, A. Lundkvist, B. R. Johansson, Y. Saito, and C. Betsholtz. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am. J. Pathol.*, 161(3):799–805, Sep 2002.
- [89] D. Schiwiek, N. Endlich, L. Holzman, H. Holthofer, W. Kriz, and K. Endlich. Stable expression of nephrin and localization to cell-cell contacts in novel murine podocyte cell lines. *Kidney Int.*, 66(1):91–101, Jul 2004.
- [90] J. A. Satriano, B. Banas, B. Luckow, P. Nelson, and D. O. Schlondorff. Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 8(4):596–603, Apr 1997.
- [91] Y. Wang, Y. P. Wang, Y. C. Tay, and D. C. Harris. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.*, 58(4):1797–1804, Oct 2000.
- [92] S. Hutchison, B. S. Choo-Kang, R. V. Bundick, A. J. Leishman, J. M. Brewer, I. B. McInnes, and P. Garside. Tumour necrosis factor-alpha blockade suppresses murine allergic airways inflammation. *Clin Exp Immunol.*, 151(1):114–122, Jan

2008.

- [93] V. Vielhauer, E. Berning, V. Eis, M. Kretzler, S. Segerer, F. Strutz, R. Horuk, H. J. Grone, D. Schlondorff, and H. J. Anders. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.*, 66(6):2264–2278, Dec 2004.
- [94] J. Guo, R. Ananthakrishnan, W. Qu, Y. Lu, N. Reiniger, S. Zeng, W. Ma, R. Rosario, S. F. Yan, R. Ramasamy, V. D’Agati, and A. M. Schmidt. RAGE mediates podocyte injury in adriamycin-induced glomerulosclerosis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19(5):961–972, May 2008.
- [95] V. Vielhauer, O. Kulkarni, C. A. Reichel, and H. J. Anders. Targeting the recruitment of monocytes and macrophages in renal disease. *Sem. Nephrol.*, 30(3):318–333, May 2010.
- [96] Y. Wang and D. C. Harris. Macrophages in renal disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 22(1):21–27, Jan 2011.
- [97] G. Zheng, Y. Wang, S. H. Xiang, Y. C. Tay, H. Wu, D. Watson, J. Coombes, G. K. Rangan, S. I. Alexander, and D. C. Harris. DNA vaccination with CCL2 DNA modified by the addition of an adjuvant epitope protects against “nonimmune” toxic renal injury. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17(2):465–474, Feb 2006.
- [98] V. W. Lee and D. C. Harris. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)*, 16(1):30–38, Jan 2011.
- [99] J. W. Pippin, P. T. Brinkkoetter, F. C. Cormack-Aboud, R. V. Durvasula, P. V. Hauser, J. Kowalewska, R. D. Krofft, C. M. Logar, C. B. Marshall, T. Ohse, and S. J. Shankland. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 296(2):F213–229, Feb 2009.
- [100] M. Ryu, O. P. Kulkarni, E. Radomska, N. Miosge, O. Gross, and H. J. Anders. Bacterial CpG-DNA accelerates Alport glomerulosclerosis by inducing an M1 macrophage phenotype and tumor necrosis factor-alpha-mediated podocyte loss. *Kidney Int.*, 79(2):189–198, Jan 2011.

- [101] A. Oeckinghaus and S. Ghosh. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 1(4):a000034, Oct 2009.
- [102] Y. Wang, J. Chen, L. Chen, Y. C. Tay, G. K. Rangan, and D. C. Harris. Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 8(10):1537–1545, Oct 1997.
- [103] G. H. Tesch, A. Schwarting, K. Kinoshita, H. Y. Lan, B. J. Rollins, and V. R. Kelley. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *J. Clin. Invest.*, 103(1):73–80, Jan 1999.
- [104] H. J. Anders, V. Vielhauer, and D. Schlondorff. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int.*, 63(2):401–415, Feb 2003.
- [105] H. Wu, Y. Wang, Y. C. Tay, G. Zheng, C. Zhang, S. I. Alexander, and D. C. Harris. DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in adriamycin nephropathy. *Kidney Int.*, 67(6):2178–2186, Jun 2005.
- [106] J. S. Jin, C. W. Yao, T. Y. Chin, S. H. Chueh, W. H. Lee, and A. Chen. Adriamycin impairs the contraction of mesangial cells through the inhibition of protein kinase C and intracellular calcium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 287(2):F188–194, Aug 2004.
- [107] E. De Boer, G. Navis, A. T. Tiebosch, P. E. De Jong, and D. De Zeeuw. Systemic factors are involved in the pathogenesis of proteinuria-induced glomerulosclerosis in adriamycin nephrotic rats. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10(11):2359–2366, Nov 1999.
- [108] B. A. Greco and J. A. Breyer. Cholesterol as a predictor of progression in non-diabetic chronic renal disease. *Contrib Nephrol*, 120:48–61, 1997.
- [109] M. Jeansson, K. Bjorck, O. Tenstad, and B. Haraldsson. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 20(1):114–122, Jan 2009.

- [110] N. M. Benador, G. E. Grau, C. Ruef, and E. P. Girardin. Endogenous TNF-alpha modulates the proliferation of rat mesangial cells and their prostaglandin E2 synthesis. *Microvasc. Res.*, 50(2):154–161, Sep 1995.
- [111] P. Mene, C. Pascale, A. Teti, S. Bernardini, G. A. Cinotti, and F. Pugliese. Effects of advanced glycation end products on cytosolic Ca²⁺ signaling of cultured human mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10(7):1478–1486, Jul 1999.
- [112] R. Pai, H. Ha, M. A. Kirschenbaum, and V. S. Kamanna. Role of tumor necrosis factor-alpha on mesangial cell MCP-1 expression and monocyte migration: mechanisms mediated by signal transduction. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7(6):914–923, Jun 1996.
- [113] M. Abbate, A. Benigni, T. Bertani, and G. Remuzzi. Nephrotoxicity of increased glomerular protein traffic. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 14(2):304–312, Feb 1999.
- [114] H. J. Anders, S. A. Sayyed, and V. Vielhauer. Questions about chemokine and chemokine receptor antagonism in renal inflammation. *Nephron Exp. Nephrol.*, 114(2):e33–38, 2010.
- [115] C. Whiting, A. Castillo, M. Z. Haque, and D. S. Majid. Protective role of the endothelial isoform of nitric oxide synthase in ANG II-induced inflammatory responses in the kidney. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 305(7):F1031–1041, Oct 2013.
- [116] K. Omote, T. Gohda, M. Murakoshi, Y. Sasaki, S. Kazuno, T. Fujimura, M. Ishizaka, Y. Sonoda, and Y. Tomino. Role of the TNF pathway in the progression of diabetic nephropathy in KK-A(y) mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 306(11):F1335–1347, Jun 2014.
- [117] C. Richter, S. Messerschmidt, G. Holeiter, J. Tepperink, S. Osswald, A. Zappe, M. Branschadel, V. Boschert, D. A. Mann, P. Scheurich, and A. Krippner-Heidenreich. The tumor necrosis factor receptor stalk regions define responsiveness to soluble versus membrane-bound ligand. *Mol. Cell. Biol.*, 32(13):2515–2529, Jul 2012.
- [118] V. Vielhauer, G. Stavrakis, and T. N. Mayadas. Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J.*

Clin. Invest., 115(5):1199–1209, May 2005.

- [119] H. Mitoma, T. Horiuchi, H. Tsukamoto, Y. Tamimoto, Y. Kimoto, A. Uchino, K. To, S. Harashima, N. Hatta, and M. Harada. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. *Arthritis Rheum.*, 58(5):1248–1257, May 2008.
- [120] F. J. Baert and P. R. Rutgeerts. Anti-TNF strategies in Crohn's disease: mechanisms, clinical effects, indications. *Int. J. Colorectal. Dis.*, 14(1):47–51, Feb 1999.
- [121] S. R. Targan, S. B. Hanauer, S. J. van Deventer, L. Mayer, D. H. Present, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible, and P. J. Rutgeerts. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 337(15):1029–1035, Oct 1997.
- [122] Stone J. Etanercept plus standard therapy for Wegener's granulomatosis. *N. Engl. J. Med.*, 352(4):351–361, Jan 2005.
- [123] C. Mukhtyar and R. Luqmani. Current state of tumour necrosis factor alpha blockade in Wegener's granulomatosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 64 Suppl 4:v31–36, Nov 2005.
- [124] M. Aringer, W. B. Graninger, G. Steiner, and J. S. Smolen. Safety and efficacy of tumor necrosis factor alpha blockade in systemic lupus erythematosus: an open-label study. *Arthritis Rheum.*, 50(10):3161–3169, Oct 2004.
- [125] J. J. Gomez-Reino, L. Carmona, V. R. Valverde, E. M. Mola, and M. D. Montero. Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. *Arthritis Rheum.*, 48(8):2122–2127, Aug 2003.
- [126] J. Keane, S. Gershon, R. P. Wise, E. Mirabile-Levens, J. Kasznica, W. D. Schwietzman, J. N. Siegel, and M. M. Braun. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med.*, 345(15):1098–1104, Oct 2001.

- [127] B. M. Saunders, S. Tran, S. Ruuls, J. D. Sedgwick, H. Briscoe, and W. J. Britton. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.*, 174(8):4852–4859, Apr 2005.
- [128] M. L. Olleros, R. Guler, D. Vesin, R. Parapanov, G. Marchal, E. Martinez-Soria, N. Corazza, J. C. Pache, C. Mueller, and I. Garcia. Contribution of transmembrane tumor necrosis factor to host defense against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-guerin and *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Am. J. Pathol.*, 166(4):1109–1120, Apr 2005.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Entzündliche Mechanismen der Glomerulosklerose und sekundären interstitiellen Nierenschädigung: Rolle von Tumornekrosefaktor

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand