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

## Entzündungsbegrenzende Funktion des atypischen Chemokinrezeptors D6 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis



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

> vorgelegt von Andrei Bideak aus Kischiniew

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Volker Vielhauer Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Schmolke Priv. Doz. Dr. Wolfgang Neuhofer Priv. Doz. Dr. Dieter E. Jenne Prof. Dr. Ludger Klein

Dekan:

Prof. Dr. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

05.10.2017

Meinen Eltern

# Teilergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden bereits in Abstract-Form veröffentlicht:

- <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Function of the atypical chemokine receptor 2 in murine immune complex glomerulonephritis. J Am Soc. Nephrol. 2016;27: abstract edition. (Kidney Week 2016, Chicago 15.11.-20.11.2016, Abstract TH-PO136)
- <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. The atypical chemokine receptor 2 (D6) limits inflammatory injury in immune complex glomerulonephritis. Abstract Kongress für Nephrologie, ISSN 1863-2262, 2016. (8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 10.09.-13.09.2016, Poster P058)
- Hoppe JM, Müller MB, Lux M, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. The Role of A20 in inflammation and cell death during immune complex glomerulonephritis. Abstractsammlung 2015 (Poster P204, 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2015, Berlin)
- Hoppe JM, Müller MB, Lux M, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Einfluss von A20 auf Inflammation und Zelltod bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Fellows' Night 2015, Nephrologisches Forum München. Abstractband 2015; S. 13
- Müller MB, Hoppe JM, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Distinct proinflammatory functions of soluble and membrane-bound TNF in murine immune complex glomerulonephritis. Abstractband 2014. (Vortrag A05, 26th European Renal Cell Study Goup Meeting 2014, Kehlheim)
- Müller MB, Hoppe JM, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Different functions of soluble and membrane-bound TNF in nephrotoxic serum nephritis. J Am Soc Nephrol. 2013; 24 (Abstract Edition): 308A (Poster TH-PO918, ASN Kidney Week 2013, Atlanta)
- Müller M, Hoppe J, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Unterschiedliche inflammatorische Effekte von löslichem und membranständigem TNF bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Abstractsammlung 2013 (Poster P084, 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2013, Berlin)
- Müller M, Hoppe J, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Unterschiedliche inflammatorische Effekte von löslichem und membranständigem TNF bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Symposium "Junge Niere" 2013, Regensburg. Nieren- und Hochdruckkrankheiten 2013, 42: 467-468
- Hoppe JM, Müller MB, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Die Rolle von A20 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Symposium "Junge Niere" 2013, Regensburg. Nieren- und Hochdruckkrankheiten 2013, 42: 466

# Inhaltsverzeichnis

A	AbbildungsverzeichnisV					
Ta	abe	ellenv	erzeichnis	/11		
A	bki	ürzun	gsverzeichnis	IX		
Zı	usa	amme	nfassung	XI		
S	um	mary	x	III		
1	E	inleit	ung	.1		
	1.1	Die	klinische Relevanz der Glomerulonephritis	1		
	1.2	2 Die	Pathophysiologie der Niere	3		
		1.2.1	Überblick und Funktion der Niere	3		
		1.2.2	Die Glomerulonephritis	5		
		1.2.3	Das Modell der nephrotoxischen Nephritis	7		
	1.3	Ch	emokine und Chemokinrezeptoren	8		
		1.3.1	Rolle von Chemokinen im Entzündungsgeschehen	8		
		1.3.2	Chemokine als Zielmoleküle anti-inflammatorischer Therapie entzündlicher			
Nierenerkrankungen		10				
		1.3.3	Überblick über die atypischen Chemokinrezeptoren	12		
		1.3.4	Entzündungshemmende Funktionen des atypischen Chemokinrezeptors D6	13		
		1.3.5	Beeinflussung der adaptiven Immunantwort durch den atypischen			
	(	Chemo	okinrezeptor D6	17		
	1.4	Fra	gestellung der vorliegenden Arbeit	18		
2	N	lateri	alien und Methoden	19		
	2.1	Ма	terialien	19		
	2	2.1.1	Geräte	19		
	2	2.1.2	Tierhaltung	20		
	2	2.1.3	Verbrauchsmaterialien	20		
	2	2.1.4	Zellkultur	21		
	2	2.1.5	Chemikalien	21		
	2	2.1.6	Puffer und Lösungen	22		
		2.1.7	Antikörper und Enzyme	23		
	2	2.1.8	Oligonukleotid-Primer für die real-time PCR	24		
	2.2 Tierexperimentelle Methoden25					
	2	2.2.1	Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis (NTN)	25		

2.2.2	Entnahme von Urin, Blut und Gewebeproben	27
2.2.3	Versuchstiere	27
2.2.4	Tierhaltung	27
2.2.5	Genotypisierung der Knockout-Mäuse	28
2.3 Im	nunologische Methoden	31
2.3.1	ELISA	31
2.3.2	Durchflusszytometrie (FACS)	34
2.4 His	tologische Untersuchungen	39
2.4.1	Aufbereitung des Nierengewebes, histologische und immunhistologische	
Auswe	rtung	39
2.5 Mo	lekularbiologische Methoden	40
2.5.1	RNA-Isolierung	40
2.5.2	cDNA-Synthese	41
2.5.3	Quantitative RT-PCR	42
2.6 Ze	lkultur	44
2.6.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	44
2.6.2	Zellzahlbestimmung und Zellvitalität	44
2.6.3	Paramagnetische Isolation von Glomeruli und Tubulointerstitium	44
2.6.4	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46
2.6.4 <b>2.7 St</b> a	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 <b>47</b>
2.6.4 2.7 Sta 3 Ergeb	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums itistische Auswertung	46 <b>47</b> <b>49</b>
2.6.4 2.7 Sta 3 Ergeb 3.1 Die	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums atistische Auswertung nisse nephrotoxische Serumnephritis in D6-defizienten Mäusen	46 <b>47</b> <b>49</b> <b>49</b>
2.6.4 2.7 Sta 3 Ergeb 3.1 Dia 3.1.1	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums atistische Auswertung nisse nephrotoxische Serumnephritis in D6-defizienten Mäusen Albuminurie	46 <b>47</b> <b>49</b> <b>49</b> 49
2.6.4 2.7 Sta 3 Ergeb 3.1 Dia 3.1.1 3.1.2	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums atistische Auswertung nisse nephrotoxische Serumnephritis in D6-defizienten Mäusen Albuminurie Serumanalyse	46 47 49 49 49 50
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums atistische Auswertung nisse nephrotoxische Serumnephritis in D6-defizienten Mäusen Albuminurie Serumanalyse Histologische Auswertung	46 47 49 49 50 52
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 49 50 52 55
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 49 50 52 55 57
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 50 52 55 57 59
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 50 52 55 57 59 61
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 50 52 55 57 59 61 62
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 50 52 55 57 59 61 62 63
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9 3.1.10	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 50 52 55 57 59 61 62 63 65
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9 3.1.10 3.1.11	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 50 52 55 57 59 61 62 63 65 65
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9 3.1.10 3.1.11 3.1.12	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 50 52 55 57 61 62 63 65 65 66 67
2.6.4 <b>2.7 Sta</b> <b>3 Ergeb</b> <b>3.1 Dia</b> 3.1.1 3.1.2 3.1.3 3.1.4 3.1.5 3.1.6 3.1.7 3.1.8 3.1.9 3.1.10 3.1.10 3.1.11 3.1.12 <b>3.2 CO</b>	Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums	46 47 49 50 52 55 57 59 61 62 63 65 65 66 67 68

4.1 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur	73		
4.1.1 D6-Knockout Mäuse entwickeln eine vermehrte Proteinurie und			
Niereninsuffizienz durch stärkeren glomerulären und tubulären Schaden	73		
4.1.2 D6 verhindert durch Chemokin-Degradierung eine übermäßige renale			
Leukozytenakkumulation im tubulo-interstitiellen Kompartiment	73		
4.1.3 D6 ist notwendig für eine effektive lymphatische Leukozyten-migration,			
Chemokin-Drainage und Antigenpräsentation aus entzündetem Gewebe in			
lokoregionäre Lymphknoten	76		
4.1.4 D6 beeinflusst nicht die systemische Immunantwort im Modell der			
nephrotoxischen Serumnephritis	77		
4.2 Schlussfolgerung und Ausblick	79		
Literaturverzeichnis	81		
Danksagung8			
Eidesstattliche Erklärung	88		
Wissenschaftliche Veröffentlichungen90			

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnoseverteilung der QuaSi-Niere Patienten in Nierenersatztherapie
Abbildung 2: Indikationen für eine Nierentransplantation im Jahr 2012
Abbildung 3: Aufbau der Niere und des Nephrons4
Abbildung 4: Die Blutharnschranke5
Abbildung 5: Podozyten und ihre Fortsätze5
Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung bei Glomerulonephritiden
Abbildung 7: Klassische und atypische Chemokinrezeptoren
Abbildung 8: Funktion des atypischen Chemokinrezeptors D6
Abbildung 9: D6 Expression in afferenten Lymphgefäßen14
Abbildung 10: Auswirkungen des D6-Knockouts in <i>in-vivo</i> Krankheitsmodellen
Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf der nephrotoxischen Serumnephritis
Abbildung 12: Genotypisierung der D6-Defizienz
Abbildung 13: Gating-Strategie zur Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltrate
Abbildung 14: Paramagnetische Isolation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums mittels
magnetischen Beads nach <i>Takemoto et. al.</i> 45
Abbildung 15: Separation von tubulointerstitiellem und glomerulärem Nierengewebe
Abbildung 16: Messung der Proteinurie vor Versuchsbeginn und am Tag 14 der NTN
Abbildung 17: Die Nierenfunktionsparameter in Wildtyp(WT) und D6-/- Mäusen an Tag 14 der
NTN
Abbildung 18: Histologische Auswertung des glomerulären Schadens im NTN Modell 53
Abbildung 19: Histologische Auswertung des tubulointerstitiellen Schadens der NTN 54
Abbildung 20: Auswertung der renalen Leukozyteninfiltration an Tag 14 der NTN 55
Abbildung 21: Auswertung der renalen Infiltration mononukleärer Phagozyten an Tag 14 der
NTN
Abbildung 22: Glomeruläre und tubulointerstitielle Infiltration renaler T-Zellen und
Makrophagen an Tag 14 der NTN 58
Abbildung 23: Renale mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren an Tag 14 der NTN 60
Abbildung 24: Renale CC-Chemokinkonzentrationen am Tag 14 der NTN
Abbildung 25: Serumkonzentration von CCL2 am Tag 14 der NTN
Abbildung 26: Analyse der Leukozyten im Vollblut an Tag 14 der NTN
Abbildung 27: Nachweis der autologen Antikörperbildung im Verlauf der NTN
Abbildung 28: Glomeruläre Ablagerung von autologem murinem IgG und Komplement an Tag
14 der NTN
Abbildung 29: Analyse der systemischen und lokalen T-Zell-Aktivierung im NTN Modell 68
Abbildung 30: Kompartimentspezifische CCL2/MCP-1 Ausschüttung

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte Beispiele für Chemokinrezeptoren und ihre Liganden	. 10
Tabelle 2: Chemokinrezeptor-Antagonisten in klinischen Studien.	. 11
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotid-Primer	. 24
Tabelle 4: Intravenöse Anästhesielösung	. 26
Tabelle 5: Mastercycler® Einstellungen für die PCR	. 29
Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung des D6 Knockouts	. 30
Tabelle 7: Zellpopulationen mit der jeweiligen Oberflächenantigenkombination	. 35
Tabelle 8: cDNA-Synthese Mastermix	. 41
Tabelle 9: Lightcycler® Einstellung zur Durchführung der real-time PCR	. 43
Tabelle 10: PCR Mix	. 43

# Abkürzungsverzeichnis

APC Antigen-präsentierende-Zelle					
APES	3-Aminopropyltriethoxy-silan				
BSA	Bovines Serum-Albumin				
BUN	Blood urea nitrogen (Blutharnstoff)				
DC	Dendritische Zelle				
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium				
DNA	Desoxyribonukleinsäure				
EAE	Experimentelle Autoimmun-Enzephalitis				
dsDNA	Doppelstrand-Desoxyribonukleinsäure				
EDTA	Ethylendiaminetetraaceticacid				
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay				
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorting				
FCS	Fetal calf serum				
FITC	Fluoreszeinthiocyanat				
GBM	Glomeruläre Basalmembran				
GF	Gesichtsfeld (am Mikroskop)				
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate				
GN	Glomerulonephritis				
HE	Hämalaun-Eosin-Färbung				
i.p	Intraperitoneal				
IFN	Interferon				
lg	Immunglobulin				
IL	Interleukin				
LEC	Lymphatische Endothelzelle				
LPS	Lipopolysaccharid				

MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1			
mRNA	Messenger-RNA			
MSR-1	Macrophage scavenger receptor-1			
n.s.	Nicht signifikant			
NTN	Nephrotoxische Serumnephritis			
PBS	Phophate-buffered saline			
PCR	Polymerase-Kettenreaktion			
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted			
RNA	Ribonukleinsäure			
RNAse	Ribonuklease			
RT-PCR	Real-time PCR			
TGF	Transforming growth factor			
TNF	Tumor necrosis factor			

## Zusammenfassung

Glomerulonephritiden (GN) gehören zu den häufigsten Ursachen chronisch-progredienter Nierenerkrankungen, die zu einer terminalen Niereninsuffizienz führen. Chemokine und ihre Rezeptoren koordinieren die charakteristische renale Leukozyteninfiltration, die mit einer vermehrten Nierenschädigung einhergeht. D6 (in systematischer Nomenklatur als atypischer Chemokinrezeptor 2, ACKR2 bezeichnet) gehört zu der neuartigen Gruppe der "atypischen" Chemokinrezeptoren, die keine Signaltransduktion nach Ligandenbindung vermitteln, sondern lokale Chemokinkonzentrationen durch Internalisierung und intrazellulären Abbau verändern.

Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig die funktionelle Rolle von D6 im Modell einer Immunkomplex-vermittelten GN, der nephrotoxischen Serumnephritis (NTN) der Maus, zu charakterisieren. Hierfür verwendeten wir D6-Knockout Mäuse (D6-/-) ohne funktionsfähiges D6 Protein und C57/BL6 Wildtypmäuse. Die NTN-Induktion erfolgte durch eine intravenöse Injektion von Schafantikörpern, die gegen die glomeruläre Basalmembran gerichtet sind. In D6-defizienten Mäusen zeigte sich nach 14 Tagen gegenüber der Wildtyp-Kontrollgruppe eine stärkere renale Schädigung mit höherer Albuminurie und einer Verschlechterung der Nierenfunktionsparameter Harnstoff und Kreatinin. Die histologische Untersuchung ergab in D6-/- Mäusen einen signifikant höheren strukturellen Schaden der Glomeruli und des Tubulointerstitiums. In der Durchflusszytometrie korrelierten die verschlechterten funktionellen Parameter und die vermehrte renale Schädigung in D6-/- Mäusen mit einer signifikant höheren renalen Leukozyteninfiltration, insbesondere durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen und mononukleäre Phagozyten.

Als mögliche Ursache hierfür konnten wir in nephritischen Nieren von D6-/- Mäusen signifikant höhere Konzentrationen der proinflammatorischen Chemokine CCL2 und CCL5 messen. In der Kompartiment-spezifischen histologischen Analyse zeigte sich, dass die erhöhte Leukozyteninfiltration in D6-/- Mäusen vor allem auf eine erhöhte Anzahl an T-Zellen und Makrophagen im tubulointerstitiellen Kompartiment zurückzuführen war, während kein Unterschied in den Glomeruli bestand. Damit vereinbar wiesen wir in *in-vitro* Versuchen mit TNF-stimulierten Nierenzellen nach, dass die vermehrte renale Chemokinbildung in D6-/-Mäusen im Verlauf der NTN aufgrund des fehlenden D6-vermittelten Chemokinabbaus im Tubulointerstitium erfolgt. Zusätzlich konnten wir anhand der reduzierten T-Zell Aktivierung in den Lymphknoten der D6-/- Mäuse eine verminderte adaptive zelluläre Immunantwort feststellen. Diese Daten sind gut mit der beschriebenen Expression von D6 auf tubulointerstitiellen lymphatischen Endothelzellen der Niere vereinbar, die einen effektiven Efflux

XI

aktivierter Leukozyten über die Lymphgefäße in die lokoregionären Lymphknoten gewährleistet. Bei gleichzeitig erhöhtem renalen Chemokingehalt und vermehrter Leukozyteninfiltration führte die reduzierte adaptive Immunantwort allerdings nicht zu einer verminderten renalen Entzündung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass D6 eine wichtige Rolle bei der Begrenzung der renalen Entzündungsreaktion im Verlauf einer Immunkomplex-GN spielt. Die vorliegende Arbeit identifiziert somit den atypischen Chemokinrezeptor D6 als ein potentielles Zielmolekül für die Behandlung von Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden.

## Summary

Glomerulonephritis is worldwide a leading cause of progressive renal failure resulting in end stage renal disease (ESRD). It is known that chemokines and their receptors play an important role in renal leukocyte infiltration and cell-mediated renal damage. D6 (named atypical chemokine receptor 2, ACKR2 using systemic nomenclature) belongs to the novel subfamily of "atypical" chemokine receptors, which are unable to induce cell signaling in response to ligand binding but rather regulate local chemokine levels by internalization and intracellular degradation of proinflammatory chemokines.

In this work we characterize for the first time the role of D6 in autologous nephrotoxic nephritis (NTN), a well-established rodent model of an immune complex-mediated, T-cell dependent glomerulonephritis. NTN was induced in C57/BL6 wild-type or *D6*-deficient mice by i.v.-injection of sheep-antibodies against mouse glomerular basement membrane. After 2 weeks *D6*-deficient mice showed more renal damage with increased albuminuria, serum creatinine and urea levels than wild-type controls. Consistently, histological analysis revealed significantly increased structural damage in the glomerular and tubulointerstitial compartment of *D6*-deficient kidneys. By flow cytometry these findings correlated with a significantly higher renal leukocyte infiltration of CD4<sup>+</sup> T cells and mononuclear phagocytes in *D6*-deficient mice.

As a possible cause for these findings, *D6*-knockout mice demonstrated significantly higher proinflammatory chemokine levels of CCL2 and CCL5 in nephritic kidneys. Further histological analysis revealed that increased leukocyte infiltration resulted from higher number of T cells and macrophages in the tubulointerstitial compartment *of D6*-deficient mice, whereas leukocyte infiltration into glomeruli was comparable in both genotypes. Accordingly, in *in-vitro* experiments with TNF-stimulated renal cells we showed that increased chemokine levels in *D6*-deficient mice result from a reduced D6-mediated chemokine degradation in the tubulointerstitial compartment. Furthermore, *D6*-knockout mice showed decreased T-cell activation resulting in a reduced adaptive cellular immune response.

These results are consistent with the known expression of D6 on tubulointerstitial lymphatic endothelial cells, assuring an efficient efflux of activated leukocytes into locoregional lymph nodes. However, the decreased adaptive immune response apparently did not result in decreased renal inflammation during NTN because of simultaneously increased tubulo-interstitial chemokine levels and a higher renal leukocyte infiltration in *D6*-deficient mice.

XIII

Taken together, our data indicate that D6 plays an important role in limiting renal inflammation in nephrotoxic nephritis and therefore identifies D6 as a potential target molecule for novel therapeutic approaches in immune complex-mediated glomerulonephritis.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die klinische Relevanz der Glomerulonephritis

Unter dem Begriff Glomerulonephritis versteht man eine Reihe immunvermittelter Erkrankungen, die mit einer Schädigung des Glomerulus durch entzündliche Prozesse und zelluläre Profileration einhergehen. Die meisten betroffenen Patienten entwickeln eine chronische Nierenerkrankung mit progressiver Niereninsuffizienz. Viele der Glomerulonephritiden sind zunächst asymptomatisch und zeigen erst im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium Symptome. Der Funktionsverlust der Niere führt schlussendlich zum terminalen Nierenversagen mit der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie wie der Dialyse oder der Nierentransplantation.

Die globale Prävalenz der chronischen Nierenerkrankungen liegt bei 8-16% [1]. Im Jahr 2010 verstarben weltweit 735.000 Menschen an einer chronischen Nierenerkrankung - das entspricht einem Zuwachs von 82,3% im Vergleich zum Jahr 1990 [2]. In entwickelten Ländern wie den USA und Deutschland ist die Glomerulonephritis nach der diabetischen und hypertensiven Nephropathie die dritthäufigste Ursache einer chronischen Niereninsuffizienz [3]. Laut dem QuaSi-Niere Jahresbericht 2007 des Bundesverbandes Niere e.V. lag die Prävalenz der Glomerulonephritis unter den erfassten Dialysepatienten bei 19% (**Abbildung 1**) [4].



Abbildung 1: Diagnoseverteilung der QuaSi-Niere Patienten in Nierenersatztherapie [4].

#### Einleitung

Laut der Deutschen Stiftung für Organtransplantation (DSO) war zudem das chronische nephritische Syndrom, dem typischerweise eine Glomerulonephritis zugrunde liegt, mit einem Anteil von 21% die Hauptindikation für eine Nierentransplantation (**Abbildung 2**) [5].

Derzeit bekommen weltweit 2 Millionen Menschen eine Nierenersatztherapie, wobei Schätzungen davon ausgehen, dass es sich hierbei um lediglich 10% der Bedürftigen handelt [6]. In Deutschland sind derzeit etwa 70.000 Menschen terminal niereninsuffizient und auf eine Nierenersatztherapie angewiesen [7]. Es entsteht eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem aufgrund der jährlichen Therapie- bzw. Nachsorgekosten von 40.000 Euro pro Dialysepatient und 18.000 Euro pro nierentransplantiertem Patienten. Zusätzlich besteht bei niereninsuffizienten Patienten ein deutlich erhöhtes Risiko, eine kardiovaskuläre Komplikation, wie einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall, zu erleiden [8]. Besonders schwerwiegend ist das Problem jedoch in Entwicklungsländern, wo die Nierenersatztherapie für große Teile der Bevölkerung nicht zugänglich oder nicht erschwinglich ist und deshalb häufig ein letaler Verlauf auftritt [9].

Diese Daten zeigen, dass die Behandlung von chronischen Nierenerkrankungen und ihrer Komplikationen weltweit eine zunehmende medizinische und sozioökonomische Herausforderung darstellt. Ein besseres Verständnis der Pathogenese der Glomerulonephritiden, insbesondere der entzündlichen Mechanismen der renalen Schädigung, könnte daher helfen, gezielte immunmodulatorische Therapiestrategien zur Prävention und Verhinderung des Fortschreitens der chronischen Niereninsuffizienz zur terminalen Niereninsuffizienz zu entwickeln.

2012 DEUTSCHLAND				
Indikationen für eine Nierentransplantation				
DIE HÄ	ufigsten iCD-10 hauptdiagnosen (bei neuanmeldung) n=3.018			
N03	Chronisches nephritisches Syndrom	517		
Q61	Zystische Nierenkrankheit	474		
N18	Chronische Nierenkrankheit	348		
E10	Primär insulinabhängiger Diabetes mellitus (Typ-1-Diabetes)	326		
112	Hypertensive Nierenkrankheit	262		
N04	Nephrotisches Syndrom	154		
N28	Sonstige Krankheiten der Niere und des Ureters, andernorts nicht klassifiziert	88		
N 11	Chronische tubulointerstitielle Nephritis	77		
E11	Nicht primär insulinabhängiger Diabetes mellitus (Typ-2-Diabetes)	68		
N05	Nicht näher bezeichnetes nephritisches Syndrom	51		
		2.365		
Bei einem Patienten sind mehrere Diagnosen möglich. Insgesamt: 58 Hauptdiagnosen bei 3.018 Fällen				
Quelle: Eurotransplant DSO 96				

Abbildung 2: Indikationen für eine Nierentransplantation im Jahr 2012.

## 1.2 Die Pathophysiologie der Niere

### 1.2.1 Überblick und Funktion der Niere

Obwohl die beiden Nieren des Menschen zusammen lediglich 300 g wiegen, werden sie pro Minute mit etwa 1000 ml Blut perfundiert (ca. 20% des Herzzeitvolumens), also dem 3-fachen ihres Eigengewichts [10]. Diese starke Durchblutung ist ein Ausdruck für die vielfältigen Aufgabenbereiche der Nieren wie der Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, der Regulation des Elektrolyt-, Wasser- und Säure-Base-Haushalts sowie der Hormonproduktion. Die Nieren sind daher für die Funktion und Homöostase des gesamten Körpers unerlässlich. Zur Erfüllung dieser Aufgaben bedarf es eines komplizierten Aufbaus und einer hohen Spezifität der beteiligten Zellen.

Die kleinste funktionelle Untereinheit der Niere ist das Nephron, bestehend aus einem Glomerulus und dem dazugehörigen Tubulus- und Sammelrohrsystem (**Abbildung 3**). Beide Nieren enthalten zusammen etwa 2 Millionen Nephrone, an deren Anfängen stets die Glomeruli stehen. Ein Glomerulus liegt in der Nierenrinde und besteht aus einem Knäuel von ca. 30 Kapillarschlingen, die in der zum Tubulussystem gehörenden Bowman-Kapsel eingestülpt sind. Die Blutzufuhr zum Kapillarknäuel hin und von ihm weg erfolgt über das Vas afferens bzw. Vas efferens. Während der Blutpassage durch das Kapillarknäul des Glomerulus erfolgt die Filtration des Blutplasmas in den Bowman'schen Kapselraum, bei der täglich 180 I des sogenannten Primärharns entstehen. Nach der Passage durch die nachgeschalteten Tubuli beträgt die tatsächliche Urinausscheidung jedoch ca. 1,5 I - also weniger als 1% des ursprünglichen Filtrats. Folglich finden während der Passage durch den Tubulus und das Sammelrohr diverse Änderungen der Zusammensetzung des Primärharns statt. Dabei werden die für den Körper wertvollen Bestandteile wie Salze, Eiweiße, Glukose und Wasser rückresorbiert und einige nicht filtrierte Substanzen sezerniert.

Die Grundlage für diese Prozesse bilden spezifische energieverbrauchende Transportsysteme in den einzelnen Tubulusabschnitten, sowie ein kapilläres und tubuläres Gegenstromprinzip mit einem osmotischen Konzentrationsgradienten, der die Austauschvorgänge ermöglicht. Zudem kehrt die Tubulusschleife jedes Nephrons stets zum eigenen Glomerulus zurück und ermöglicht so ein "tubulo-glomeruläres Feedback", d.h. die Anpassung der glomerulären Filtrationsrate an die Zusammensetzung des Filtrats. Dadurch wird die Adaption der Urinkonzentration an den Hydrationszustand und den Elektrolythaushalt ermöglicht [10-12].



Abbildung 3: Aufbau der Niere und des Nephrons [13].

Das gesamte filtrierte Plasmavolumen aller Glomeruli bezeichnet man als die glomeruläre Filtrationsrate (GFR); diese beträgt bei einem gesunden jungen Menschen 120 ml/min und ist im klinischen Alltag der wichtigste Parameter zur Beurteilung der exkretorischen Nierenfunktion. [13]

Den eigentlichen glomerulären Filter bilden dabei drei Bestandteile: das gefensterte Endothel der glomerulären Kapillarwand; die negativ geladene glomeruläre Basalmembran (GBM); sowie die Podozytenfortsätze mit der dazwischenliegenden Schlitzmembran [13]. Diese sog. Blut-Harn-Schranke ist aufgrund ihrer Eigenschaften normalerweise weitgehend impermeabel für Blutzellen, Makromoleküle und Proteine mit einem Molekulargewicht größer als Albumin (>68 kDa). Kleinere Moleküle hingegen passieren den glomerulären Filter und werden, sofern sie die proximalen Tubulusepithelzellen nicht rückresorbieren, im Urin ausgeschieden. Daher findet sich häufig als Zeichen einer glomerulären Schädigung die pathologische Ausscheidung von Blutzellen und höhermolekularen Proteinen wie Albumin und Immunglobulinen im Urin [14].

Die Nieren aktivieren oder produzieren zudem diverse Hormone: aktives Vitamin D (Calcitriol), das die Knochenhomöostase beeinflusst, Erythropoietin zur Regelung der Erythropoiese und Renin, das über Angiotensin und Aldosteron den Blutdruck und die Osmolarität des Blutes steuert.



Abbildung 4: Die Blutharnschranke [15].

Abbildung 5: Podozyten und ihre Fortsätze [10] .

## 1.2.2 Die Glomerulonephritis

Als Glomerulonephritis (GN) bezeichnet man eine immunreaktive Entzündung der Glomeruli, die häufig mit einer Antikörper- bzw. Immunkomplexablagerung, einer Komplementaktivierung, glomerulären Zellschädigung und der Infiltration von Entzündungszellen einhergeht. Im späteren Verlauf zeigen sich zudem Vernarbungen mit Sklerosierung der beteiligten Glomeruli. Abzugrenzen sind hiervon die nicht-entzündlichen Glomerulopathien, die beispielsweise im Rahmen des Diabetes mellitus und der Amyloidose auftreten.

Es werden primäre und sekundäre Glomerulonephritiden unterschieden. Erstere spielen sich ohne eine erkennbare systemische Grunderkrankung ab, wohingegen die sekundären Glomerulonephritiden im Rahmen von Systemerkrankungen wie z.B. der Kollagenosen und der Vaskulitiden auftreten. Die genaue Differenzierung und Unterteilung der verschiedenen Glomerulonephritiden erfolgt unter Einbeziehung der Histologie, der Klinik sowie serologischer Marker, beispielsweise der Autoantikörper.

In der Pathogenese der glomerulären Inflammation spielen sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunreaktionen eine Rolle. Die beteiligten Antikörper sind meist Autoantikörper, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind. Die verursachenden Antigene entstehen durch eine Kreuz-Reaktivität von Antikörpern gegen bakterielle oder virale Erreger (z.B. Streptokokken, HBV) mit körpereigenen Proteinen. Weiterhin ist es möglich, dass Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene, modifizierte Basalmembranbestandteile oder Zellkernbestandteile (nukleäre Antigene) gebildet werden.

#### Einleitung



Abbildung 6: Immunfluoreszenzfärbung mit linearem IgG-Verteilungsmuster bei (A) der Anti-GBM-Antikörper-GN [16] und (B) granulärer Verteilung bei der postinfektiösen Immunkomplex-GN [11].

Bei der Anti-GBM-Antikörper-GN werden Bestandteile der glomerulären Basalmembran (NC-I-Domäne des Typ-IV-Kollagens) im Rahmen infektiöser oder toxischer Einflüsse zu Autoantigenen (sog. Goodpasture-Antigen), gegen die der Körper IgG-Antikörper bildet, die sich dann typischerweise linear an der Basalmembran ablagern und Immunkomplexe mit dem ortsständigen Antigen bilden (Abbildung 6 A). Daraufhin folgen eine Aktivierung des Komplementsystems, eine leukozytäre Infiltration und die nachfolgende entzündliche Zerstörung der Glomeruli (nekrotisierende Glomerulonephritis).

Bei anderen **Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden** zeigt sich in der Immunfluoreszenzmikroskopie ein granuläres, diskontinuierliches Verteilungsmuster der Immunkomplexe entlang der Basalmembran (**Abbildung 6** B) oder eine mesangiale Ablagerung, welche durch verschiedene Mechanismen entstehen kann. Dabei sind die auslösenden Antigene eines nicht-glomerulären Ursprungs wie z.B. das Streptokokken-Antigen oder das HBV-Oberflächen-Antigen. Nach Antigenkontakt zirkulieren diese Immunkomplexe im Blut und können sich an glomerulären Bestandteilen (Endothel, Mesangialzellen, Epithelzellen oder GBM) ablagern. Es folgt die klassische Komplementaktivierung mit Freisetzung leukotaktischer Faktoren und leukozytärer Einwanderung mit Aktivierung von proteolytischen Enzymen, Prostaglandinen und Sauerstoffradikalen, welche dann die glomeruläre Filtrationsbarriere schädigen [17].

Durch die Immunkomplexablagerung und lokale Komplementaktivierung aktivierten glomerulären Mesangialzellen synthetisieren weitere Mediatoren, wie proinflammatorische Zytokine und Chemokine, die wiederum zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion beitragen [18].

Der Verlauf einer Glomerulonephritis reicht abhängig von Ausmaß und Dauer der auslösenden immunologischen Ursache von zügiger Restitutio ad integrum bis hin zu einer schnellen irreversiblen Vernarbung mit chronischer Niereninsuffizienz. Zeitlich kann eine *rapidprogressive* Form innerhalb von Wochen bis Monaten verlaufen, während eine chronische Form über Jahrzehnte mit entzündlichen Schüben rezidivieren oder chronisch progredient andauern kann [11].

#### 1.2.3 Das Modell der nephrotoxischen Nephritis

Erstmals wurde das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (NTN), ein der Anti-GBM-Glomerulonephritis ähnliches Krankheitsbild, von *Masugi* im Jahr 1933 beschrieben [19]. Es ist bis heute eines der meistgenutzten tierexperimentellen Modelle zur Untersuchung Immunkomplex-vermittelter glomerulärer Erkrankungen. Zur Induktion ist ein Antiserum gegen Bestandteile der glomerulären Basalmembran erforderlich. Die Herstellung dieses Anti-GBM-Serums, des sogenannten nephrotoxischen Serums, erfolgt durch die Immunisierung von Schafen oder Kaninchen mit präparierten glomerulären Basalmembranbestandteilen der Maus oder Ratte. Das aus den immunisierten Schafen oder Kaninchen gewonnene Serum mit den gebildeten Anti-GBM-Antikörpern kann direkt zur Induktion der NTN in der Maus verwendet werden, zusätzlich können die enthaltenen Immunglobuline noch durch Fällungs- und Dialyseschritte aufgereinigt werden.

Nach der intravenösen Injektion des nephrotoxischen Serums und der Ablagerung der Antikörper an der glomerulären Basalmembran kommt es zu einer Entzündungsreaktion mit einer durch die Immunkomplexbildung ausgelösten Komplementaktivierung, Leukozyteninfiltration und Proteinurie. An diese sogenannte "heterologe Phase" schließt sich nach 7-10 Tagen die "autologe Phase" der NTN an [20]. Die Maus bildet hierbei autologe IgG-Antikörper gegen die injizierten und glomerulär abgelagerten heterologen Anti-GBM-Antikörper des Schaf- oder Kaninchenserums. Dies führt zu einer Verstärkung der glomerulären Immunkomplex-Bildung und Nierenschädigung [21]. Diese Reaktion kann zusätzlich durch die vorherige Immunisierung gegen das Immunglobulin der Fremdspezies so verstärkt werden, dass eine ohne vorangegangene Immunisierung nicht zur Nephritis führende Menge des nephrotoxischen Serums (subnephritische Gabe) eine Glomerulonephritis induziert. Die NTN führt innerhalb eines Zeitraums von wenigen Wochen zu einer schweren, histologisch und klinisch nachweisbaren Glomerulonephritis mit Proteinurie, Anstieg der Retentionsparameter, glomerulärer Thrombosierung, Halbmondbildung und Leukozyteninfiltration sowie einer sekundären tubulointerstitiellen Nephritis [22].

## **1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren**

### 1.3.1 Rolle von Chemokinen im Entzündungsgeschehen

Die *in-vivo* Migration von Leukozyten ist ein hochgradig koordinierter Prozess, der hauptsächlich von chemotaktischen Zytokinen, den sog. Chemokinen, gesteuert wird, die leukozytär exprimierte Chemokinrezeptoren aktivieren [23, 24]. Chemokine induzieren hierbei eine gezielte Wanderbewegung von Immunzellen entlang eines Konzentrationsgradienten zum Ort höchster Chemokinkonzentration (*Chemotaxis*). Grundsätzlich werden Chemokine anhand ihrer chemischen Struktur in vier Unterfamilien unterteilt: CC-, CXC-, XC-, CX3C-Chemokine (**Tabelle 1**). Ihre ursprünglichste Rolle ist die Regulation der Stammzell-Migration während der Embryogenese [25], jedoch entwickelte sich das Chemokinsystem der Wirbeltiere stetig weiter und umfasst nun über 50 Chemokine und 18 Chemokinrezeptoren [26], die auch die Leukozytenmigration koordinieren.

Vereinfachen lässt sich die Einteilung der Chemokine anhand ihrer *in-vivo* Funktion. Sogenannte konstitutive (bzw. homöostatische) Chemokine werden kontinuierlich exprimiert und regulieren die basale Wanderung der Abwehrzellen zwischen verschiedenen Organsystemen und die Organisation von sekundären lymphoiden Organen. Typische Vertreter dieser Gruppe sind CCL19 und CCL21 [27], die auf lymphatischen Endothelzellen des Lymphknotens exprimiert werden. Sie regulieren das sogenannte leukozytäre *Homing*, welches den Vorgang der Zellmigration zum Lymphknoten hin und wieder aus ihm heraus, sowie der Bewegung der Zellen innerhalb des Lymphknotens beschreibt. Der dazugehörige Rezeptor CCR7 wird beispielsweise auf den antigenpräsentierenden Zellen exprimiert. Er ermöglicht somit die Migration der antigenpräsentierende Zellen in den Lymphknoten, wo das Antigen dann einer naiven T-Zelle präsentiert werden kann, um eine adaptiven Immunantwort zu starten.

Im Gegensatz dazu sind induzierbare (bzw. inflammatorische) Chemokine normalerweise kaum exprimiert, jedoch steigen ihre Spiegel nach einer Gewebsverletzung, Infektion oder Entzündung drastisch an. Sie unterstützen daraufhin die Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes oder beschädigtes Gewebe, allerdings existieren, anders als bei konstitutiven Chemokinen, diese Gradienten nur für eine begrenzte Zeit. Typische Vertreter der inflammatorischen Chemokine sind CCL2, CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL2 und CXCL8. Ausgelöst wird ihre Bildung in Gewebezellen oder Leukozyten zum Beispiel durch eine Reihe inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IFNγ, aber auch durch sog. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) oder bei Gewebsschaden freigesetzte sog. DAMPs (*damage-associated molecular patterns*).

Bei inflammatorischen Chemokinen und ihren leukozytären Rezeptoren existiert, im Unterschied zu ihren homöostatischen Vertretern, eine Funktionsredundanz. So aktivieren proinflammatorische Chemokine einer Unterfamilie in der Regel mehrere Chemokinrezeptoren, ebenso kann innerhalb einer Unterfamilie der gleiche proinflammatorische Chemokinrezeptor mehrere Chemokine binden. Daher führt eine experimentelle Deletion einzelner Chemokine oder Rezeptoren oft zu unvollständigen oder sich überlappenden Phänotypen, was die Entschlüsselung der genauen Funktion und die Suche nach möglichen therapeutischen Ansatzpunkten erschwert [28]. Biochemisch bestehen Chemokinrezeptoren aus sieben Transmembrandomänen und einem G-Protein-Komplex, der nach Chemokinbindung in eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ y-Untereinheit zerfällt, welche dann nachgeschaltete zelluläre Signalkaskaden induziert. Es resultiert eine in Millisekunden erfolgende Aktivierung von auf der leukozytären Zellmembran exprimierten Integrinen, die eine feste Adhäsion von Leukozyten an das Endothel vor allem der postkapillären Venen ermöglichen, was voraussetzend für ihre nachfolgende Migration in geschädigtes Gewebe ist. Chemokingradienten entstehen durch Diffusion, weshalb eine Anfälligkeit gegenüber Strömungen der sie umgebenden Flüssigkeit besteht. Sie werden daher an Glucosaminoglykanen der Endothelzelloberflächen gebunden, um ein Wegspülen in der Nähe von Blutgefäßen zu verhindern. Diese Immobilisierung dient dazu den Konzentrationsgradienten länger aufrechterhalten zu können. An Orten der Gewebeschädigung und Entzündung gebildete Chemokine können somit in der Blutbahn zirkulierende Leukozyten zur Gewebsmigration veranlassen und inflammatorisch aktivieren, wenn die entsprechende Leukozytenpopulation korrespondierende Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche exprimiert. So werden Rezeptoren für CC-Chemokine vor allem auf Monozyten/Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert, während Granulozyten CXC-Chemokinrezeptoren besitzen.

	Rezeptor	Ligand	
CC Chemokine			
inflammatorisch:	CCR1, 2, 3, 4, 5	CLL2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 22	
homöostatisch:	CCR6, 7, 8, 9, 10	CCL19, 20, 21, 25, 27, 28	
CXC Chemokine			
inflammatorisch:	CXCR1, 2, 3	CXCL1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11	
homöostatisch:	CXCR4, 5	CXCL12, 13	
Atypische Chemokin	rezeptoren und ihre Li	ganden	
	DARC (ACKR1)	CCL1, 2, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 16, 17, 18	
		CXCL5, 6, 8, 9, 10, 11, 13	
	D6 (ACKR2)	CCL2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 17, 22, 23, 24	
	CXCR7 (ACKR3)	CXCL11, 12	
	CCX-CKR (ACKR4)	CCL19, 21, 25	
	CCRL2 (ACKR5)	CCL19	

Tabelle 1: Ausgewählte Beispiele für Chemokinrezeptoren und ihre Liganden.Modifiziert nach [29].

# 1.3.2 Chemokine als Zielmoleküle anti-inflammatorischer Therapie entzündlicher Nierenerkrankungen

Chemokine spielen eine vielfältige Rolle bei der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion. In der Niere korreliert sowohl die zeitliche auch als die räumliche Expression verschiedener Chemokine mit dem lokalen Ausmaß der Schädigung. Wie in anderen Organsystemen auch sind Chemokine dabei für die Rekrutierung von Leukozyten, die direkt oder indirekt die Inflammation und Organumstrukturierung vorantreiben, verantwortlich.

Es liegt also nahe, Chemokine und Chemokinrezeptoren als potentielle Ziele einer pharmakologischen Therapie entzündlicher Nierenerkrankungen in Betracht zu ziehen [30], insbesondere, da die derzeitigen entzündungshemmenden Therapien mit Glucocorticoiden und Zytostatika erhebliche Nebenwirkungen aufweisen und häufig nicht ausreichend effektiv sind. Beide wirken unspezifisch am gesamten Organismus und beeinträchtigen somit auch physiologische Stoffwechselwege, welche mit der eigentlichen Nierenerkrankungen nicht in Beziehung stehen. So erhöhen Glucocorticoide den Blutdruck, wirken diabetogen, osteoporotisch und verursachen Nebenwirkungen an Augen und Haut. Zytostatische Immunsuppressiva gehen mit dem Risiko einer Knochenmarkssuppression und sekundären malignen

#### Einleitung

Erkrankungen einher. Im Gegensatz dazu könnte ein zielgerichtetes Eingreifen in das renale Entzündungsgeschehen eine effizientere und nebenwirkungsärmere Behandlung ermöglichen [31]. So könnte eine Behandlungsstrategie in der Senkung der Leukozytenzahl im Nierenparenchym durch die Hemmung ihrer Chemokin-vermittelten Infiltration bestehen.

Tatsächlich unternimmt die Pharmaindustrie bereits große Anstrengungen zur Entwicklung und Erprobung von Chemokinrezeptorantagonisten im Rahmen klinischer Studien bei diversen entzündlichen Erkrankungen (**Tabelle 2**) [32]. Im Gegensatz zu anderen inflammatorischen und Autoimmunerkrankungen gibt es jedoch bislang keine etablierten, auf Blockade von Chemokinen basierende immunmodulatorischen Therapien chronischer Nierenerkrankungen.

Target	Company	Compound name	Trial phase	Indication	Comments
CCR1	Berlex Biosciences	BX-471 (ZK-811752)	II	MS, psoriasis, endometriosis	no longer reported
	Millennium/Aventis	MLN-3897	II	RA, MS	no efficacy in RA
	ChemoCentryx	CCX354	I	RA	ongoing
	Pharmacopeia	PS-031291	IIa	myeloma, RA	ongoing
	Pfizer	CP-481,715	II	RÁ	no efficacy
	Millennium	MLN-3701	Ι	RA, MS	ongoing
CCR2	Millennium Pharmaceuticals	MLN-1202 (antibody)	II	atherosclerosis, MS, RA	no efficacy for RA, others ongoing
	Incyte Pharmaceuticals	INCB8696	I	MS, SLE	ongoing
	ChemoCentryx	CCX140	I	MS, restenosis	ongoing
	Merck	MK-0812	II	RA, MS	no efficacy
	Pfizer	PF-4136309	II	pain	ongoing
CCR3	Cambridge	CAT-213	II	ocular allergies,	ongoing
	AT/Vancouver Biotech	(antibody, bertilimumab)		allergic conjunctivitis	0 0
	Topigen	TPIASM8	II	asthma	ongoing
	GlaxoSmithKline	GW-766994	II	asthma, allergic rhinitis	no longer reported
	Bristol-Myers Squibb	DPC-168	I	asthma	no longer reported
CCR4	Amgen	KW-0761	I	oncology	ongoing
CCR5	Pfizer	Maraviroc (UK-427857)	approved	HIV	approved
			п	RA	ongoing
	Schering-Plough	Vicriviroc (Sch-417690)	II	HIV	ongoing
	GlaxoSmithKline	Aplaviroc	III	HIV	toxicity reported
	Incyte	INCB9471	II	HIV	ongoing
	Progenics	Pro 140	I	HIV	ongoing
	Schering-Plough	Sch-351125	I	COPD	ongoing
	Ono Pharm. GlaxoSmithKline	ONO-4128	II	HIV	terminated because of liver toxicity
CXCR1/2	Schering-Plough	SCH 527123	II	COPD	ongoing
	Dompe	Reparixin	II	reperfusion injury	ongoing
	GlaxoSmithKline	SB-656933	I	COPD, cystic fibrosis	ongoing
CXCR3	Amgen/Tularik	T-487/AMG-487	II	psoriasis	no efficacy, trials halted
CXCR4	Genzyme/AnorMED	Plerixafor (AMD-3100)	approved	stem cell transplantation	approved
			III	multiple myeloma	ongoing
	AnorMED	AMD-070	II	HIV	ongoing
	Chemokine Therapeutics	CTCE-0214	II	stem cell transplantation	ongoing

#### Tabelle 2: Chemokinrezeptor-Antagonisten in klinischen Studien.

MS=multiple Sklerose, RA= rheumatoide Arthritis, COPD=chronisch obstruktive Lungenerkrankung, SLE=systemischer Lupus Erythematodes. Modifiziert nach Horuk [32, 33]

#### 1.3.3 Überblick über die atypischen Chemokinrezeptoren

Vor wenigen Jahren ist eine neue Gruppe von sogenannten "atypischen Chemokinrezeptoren" identifiziert worden, zu denen auch der D6 Rezeptor zählt [34, 35]. Entsprechend der aktualisierten systemischen Nomenklatur für Chemokinrezeptoren wird der D6 Rezeptor auch als atypischer Chemokinrezeptor 2 (ACKR2) benannt [36]. Atypischen Chemokinrezeptoren fehlt definitionsgemäß die Fähigkeit zur Induktion der für klassische Chemokinrezeptoren charakteristischen intrazellulären Signaltransduktion nach Ligandenbindung (**Abbildung** 7). Ursächlich hierfür ist eine Veränderung im G-Protein-bindenden DRYLAIV-Motiv der Transmembranregion 3. Stattdessen findet eine Internalisierung und intrazelluläre Degradierung des Chemokinliganden statt [37]. Zudem werden sie, anders als klassische Rezeptoren, die sich hauptsächlich auf Leukozyten befinden, vor allem von nicht-leukozytären Zellen exprimiert. Jedoch erfüllen auch sie eine Schlüsselrolle in der Leukozytenmigration durch die Beeinflussung von lokalen Chemokinkonzentrationen und Chemokingradienten.

Den atypischen Rezeptoren CXCR7 (ACKR3) und CCX-CKR (ACKR4) werden aufgrund ihres Ligandenbindungsprofils überwiegend homöostatische Funktionen zugeschrieben [38-40], wohingegen sich das Duffy antigen/receptor for chemokines (DARC, ACKR1) und das Chemokin-bindende Molekül D6 (ACKR2) durch eine Bindung multipler proinflammatorischer Chemokine auszeichnen (siehe **Tabelle 1**). DARC ist der einzige Chemokinrezeptor, der mehr als eine Unterfamilie der Chemokine binden kann. Er spielt eine komplexe Rolle in der Regulierung der Chemokinpräsentation und ihrer Bioverfügbarkeit [41]. Im folgenden Kapitel wird ausführlich auf den aktuellen Wissensstand zu dem atypischen Chemokinrezeptor tor D6 (ACKR2) eingegangen.



#### Abbildung 7: Klassische und atypische Chemokinrezeptoren.

Klassische Chemokinrezeptoren (A) vermitteln nach Bindung des Liganden mittels Signaltransduktion eine gerichtete Leukozytenmigration. Atypischen Rezeptoren (B) fehlt diese Fähigkeit, stattdessen binden und degradieren sie ihre Liganden [34].

## 1.3.4 Entzündungshemmende Funktionen des atypischen Chemokinrezeptors D6

Der atypische Chemokinrezeptor D6 (ACKR2, früher auch *Ccbp2*) wurde erstmals im Jahr 1997 zeitgleich von *Nibbs RJ et al.* [42, 43] und *Bonini JA et al.* [44] beschrieben. Er ähnelt strukturell anderen Chemokinrezeptoren und befindet sich so wie diese innerhalb des gleichen chromosomalen Lokus, besitzt aber, wie alle atypischen Chemokinrezeptoren, eine Alteration im G-Protein-bindenden DRYLAIV-Motiv. Infolgedessen fehlt auch die charakteristische Signaltransduktion nach der Bindung eines Liganden. D6 bindet mit hoher Affinität 14 proinflammatorische CC-Chemokine, jedoch keine CXC-, XC-, CX3C- oder homöostatische CC-Chemokine.

Interessanterweise findet man in D6-exprimierenden Zellen im Ruhezustand das meiste D6 Protein in intrazellulären Vesikeln und nur weniger als 5% befindet sich an der Zelloberfläche [45]. D6 wird kontinuierlich in Rab5-positiven Vesikeln über Clathrin-bedeckte Plasmamembran-Einstülpungen internalisiert und zu Endosomen geleitet [37]. Die internalisierten D6-Moleküle werden anschließend über Rab4- bzw. Rab11-positive Vesikel wieder zurück an die Zelloberfläche transportiert und wiederverwertet [46].

Dieses Verhalten ist eng verknüpft mit der Funktion des D6 als Chemokin-*Scavenger* (Chemokinfänger) im Rahmen einer Entzündungsreaktion. In mehreren Studien [47, 48] konnte gezeigt werden, dass D6 dabei proinflammatorische CC-Chemokine bindet, sie internalisiert und anschließend für eine intrazelluläre lysosomale Degradierung markiert. Schließlich dissoziiert D6 vom Liganden und wandert wieder an die Zelloberfläche zurück.

Im Gegensatz zu klassischen Chemokinrezeptoren, deren Expression an der Zelloberfläche nach einer Ligandenbindung abfällt, steigt die Expression des D6 Proteins und somit auch die Degradierungsrate durch D6 auf Zellen mit erhöhter Chemokinexposition. Hierbei führt die Exposition gegenüber D6 Liganden zu einer Steigerung des oberflächlichen D6, indem es vermehrt aus dem intrazellulären Pool an die Zelloberfläche mobilisiert wird [46].

Die Expression von D6 wurde bisher im Haut-, Darm-, Lungen-, Nieren-, Myokard- und Plazentagewebe [42] nachgewiesen. Es finden sich insbesondere hohe Konzentrationen in lymphatischen Endothelzellen (**Abbildung 9**) [49]. Zudem wird D6 auch von diversen Leukozytenpopulationen, insbesondere Granulozyten, dendritischen Zellen und *innate-like* B-Zellen [50-52] exprimiert.



Abbildung 8: Funktion des atypischen Chemokinrezeptors D6. Modifiziert nach [53].



Abbildung 9: D6 Expression in afferenten Lymphgefäßen. Histologie des entzündeten humanen Appendix mit brauner D6 Immunfärbung [54].

Die Fähigkeit von D6, effizient proinflammatorische Chemokine zu binden, sie zu internalisieren und zu degradieren, qualifiziert den Rezeptor als einen möglichen Regulator der Entzündungsreaktion *in-vivo*. Entsprechend wurden D6-defiziente Mäuse generiert, um diese Hypothese zu erforschen. Unter normalen Bedingungen zeigten D6-defiziente Mäuse keinen auffälligen Phänotyp. Sobald sie aber proinflammatorischen Stimuli ausgesetzt waren, konnte man eine deutlich überhöhte Immunantwort mit vermehrter Entzündungsreaktion im D6-defizienten Gewebe feststellen. Nachfolgend wird eine Übersicht über die bisher publizierten Auswirkungen einer D6-Defizienz in verschiedenen Krankheitsmodellen präsentiert:

#### Haut:

Nach Induktion einer Entzündungsreaktion durch topisches Auftragen des Phorbolesters TPA [55] bzw. nach subkutaner Injektion des *kompletten Freund'schen Adjuvans* (CFA) [56] zeigten D6-defiziente Mäuse eine verminderte Fähigkeit, die lokale Hautentzündung zu begrenzen. Im TPA-Modell wurde eine Psoriasis-ähnliche Pathologie mit epidermaler Hyperproliferation und T-Zell Infiltration beobachtet. Analog dazu entwickelten D6-Knockout-Tiere im CFA-Modell signifikant größere Granulome. Der D6-/- Genotyp war nicht in der Lage, effektiv CC-Chemokine aus den entzündeten Arealen zu entfernen.

*Rot et al.* zeigten in weiterführenden Psoriasis-Studien [52], dass die D6 Expression auf neutrophilen Granulozyten ihre Antwort auf Migrationsreize durch CCR1-Liganden wie z.B. CCL3 vermindert und D6 somit eine Funktion als "Migrations-Regler" zukommt, der eine übermäßige kutane Entzündungsreaktion verhindert.
Im Einklang mit der bekannten Assoziation von Entzündung und Karzinogenese [57] zeigte sich zudem eine erhöhte Tumorigenität bei diesen Tieren [58].

#### Darm:

Im Dextransulfat-(DSS)-Colitis-Modell der Maus liegen bislang widersprüchliche Daten vor. In einer Studie wurde in D6-defizienten Tieren eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der Colitis mit einer Besserung der Symptome berichtet [59], während in einer weiteren Arbeit eine erhöhte Suszeptibilität vorlag [60]. Analog zur Haut bestand eine höhere Rate an Colitis-assoziierten Tumoren im D6-/- Genotyp.

#### Lunge:

In einem Ovalbumin (OVA)-induzierten Modell des allergischen Asthmas konnte im entzündeten D6-/- Lungengewebe eine erhöhte Anzahl von Eosinophilen, T-Zellen sowie dendritischen Zellen nachgewiesen werden [61]. Gleichzeitig lag jedoch eine verringerte Reaktivität der Atemwege vor. In einer anderen Studie zeigten D6-defiziente Tiere eine massive lokale und systemische Entzündungsreaktion nach intranasaler Verabreichung von *M. tuberculosis* [62]. Hierbei wurden zudem erhöhte Konzentrationen von CC-Chemokinen der bronchoalveolären Lavage und im Serum gemessen.

#### Plazenta:

In der Plazenta, dem Organ mit der höchsten D6-Expression, zeigte sich in schwangeren Knockout-Mäusen nach LPS-Stimulation eine deutlich höhere Entzündungsreaktion an der Plazenta mit vermehrter Sterblichkeit des Fötus [63]. Insgesamt waren die Föten durch D6 besser vor proinflammatorischen Zuständen des mütterlichen Immunsystems geschützt [64]. Ursächlich hierfür ist möglicherweise eine Reduktion der im Plasma zirkulierenden bzw. an der Plazentaschranke befindlichen proinflammatorischen Chemokine durch D6.

#### Herz:

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass D6 eine signifikante Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen zukommt [65]. So waren D6-defiziente Mäuse anfälliger gegenüber einer übermäßigen Entzündungsreaktion beim Myokardinfarkt mit nachfolgend verstärkter linksventrikulärer Dilatation und häufigerer Herzruptur als Folge einer übermäßigen Infiltration von Granulozyten.

#### Gehirn:

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Modell der experimentellen Autoimmun-Enzephalitis (EAE), dass eine D6-Defizienz auch protektiv wirken kann [66]. Die Versuchstiere zeigten hierbei geringere Rückenmarksentzündung und Demyelinisierung mit kleinerer Inzidenz und

15

geringerem Schweregrad der EAE. Es kam zu einem reduzierten T-Zell *Priming* mit größeren Ansammlungen dendritischer Zellen an der Injektionsstelle des *MOG*-Antigens. Weniger dendritische Zellen migrierten über die Lymphwege in die drainierenden Lymphknoten, um dort T-Zellen zu primen, was zu Initiierung der enzephalitischen Immunantwort notwendig ist.

#### Graft-vs-Host Reaktion:

In einem Graft-versus-Host-Entzündungsmodell konnte in D6-defizienten Mäusen eine vermehrte Akkumulation von Monozyten in sekundären lymphatischen Organen gezeigt werden. Interessanterweise wiesen die Monozyten verstärkte immunsuppressive Eigenschaften auf und schützten partiell vor einer Graft-versus-Host-Erkrankung [67].

#### Niere:

Die Funktion von D6 bei Nierenerkrankungen wurde bisher nicht untersucht.

**Abbildung 10** fasst die beschriebenen Auswirkungen einer D6-Defizienz zusammen. Während in Modellen mit direkter Gewebsschädigung D6-Defizienz zu einer verstärken Entzündungsreaktion führt ist dies bei Modellen mit immunologisch induzierter indirekter Schädigung nicht der Fall.



#### Abbildung 10: Auswirkungen des D6-Knockouts in *in-vivo* Krankheitsmodellen.

Unterteilt nach Entzündungs-/Tumormodellen und Modellen, die eine adaptive Immunantwort benötigen. Abbildung modifiziert nach [68].

## 1.3.5 Beeinflussung der adaptiven Immunantwort durch den atypischen Chemokinrezeptor D6

Der atypische Chemokinrezeptor D6 ist aufgrund seiner Expression auf lymphatischen Endothelzellen an einer wichtigen Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort positioniert. Wie bereits im vorherigen Kapitel 1.3.4 beschrieben kommt es bei einigen Krankheitsmodellen zu einem verbesserten Verlauf trotz einer bestehenden D6-Defizienz. Hierbei handelt es sich vor allem um Modelle, die eine effektive adaptive Immunantwort erfordern, wie das Modell der experimentellen Autoimmun-Enzephalitis.

Im EAE-Modell konnte in D6-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die lymphatischen Endothelzellen mit proinflammatorischen CC-Chemokinen überladen waren, was zu einer verminderten Beweglichkeit der Antigen-präsentieren Zellen und zu einem verminderten Lymphfluss führte [66]. Die verminderte Migration aktivierter dendritischer Zellen in die drainierenden Lymphknoten führte zu einer Beeinträchtigung der Antigen-präsentierenden Zellen in D6-defizienten Mäusen mit nachfolgend verminderter T-Zell-Aktivierung. Insgesamt hatte dies eine verringerte Empfindlichkeit der D6-defizienten Mäuse gegenüber der Enzephalitis zur Folge. D6 spielt somit eine wichtige Rolle als Koordinator der angeborenen und erworbenen Immunantwort [29].

## **1.4 Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Seit seiner Entdeckung im Jahre 1997 wird zunehmend die Rolle des atypischen Chemokinrezeptors D6 im lokalen und systemischen Entzündungsgeschehen entschlüsselt. Tierexperimentelle Arbeiten in unterschiedlichen Krankheitsmodellen belegen die wichtige Funktion des D6 Rezeptors in der Begrenzung der lokalen Entzündungsreaktionen *in vivo* (Kapitel 1.3.4). Interessanterweise kann D6-Defizienz in Modellen, die durch eine adaptive Immunantwort induziert werden, auch zu einem abgeschwächten Verlauf aufgrund verminderter Antigenpräsentation und T-Zell-Antwort führen (Kapitel 1.3.5). Bisher gibt es keine Untersuchungen zu der Funktion von D6 bei renalen Entzündungen wie der Glomerulonephritis.

In dieser Arbeit sollte daher der folgenden Fragestellung nachgegangen werden:

Welche Rolle spielt der atypische Chemokinrezeptor D6 bei Entstehung und Verlauf einer T-Zell-vermittelten Immunkomplex-induzierten Glomerulonephritis? Was sind die Mechanismen, über die D6 seine Effekte bei renaler Entzündung vermittelt?

Der Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass lokal exprimiertes D6 durch Abbau proinflammatorischer Chemokine die renale Entzündung und Gewebsschädigung im Verlauf einer Glomerulonephritis begrenzen kann und gleichzeitig eine regelrechte T-Zell-Aktivierung gewährleistet. Unter D6-Blockade sollte daher infolge lokal erhöhter Chemokinkonzentrationen die Glomerulonephritis verstärkt ablaufen, trotz einer ggf. reduzierten systemischen T-Zell-Aktivierung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Einfluss einer D6-Defizienz auf Nierenfunktion, renale Gewebsschädigung und Leukozyteninfiltration im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis untersucht. Da eine pharmakologische Hemmung aufgrund fehlender D6-Rezeptorantagonisten nicht möglich ist, wurden die Experimente mithilfe von D6-defizienten Knockout-Mäusen durchgeführt, die uns freundlicherweise von Prof. Locati, Universität Mailand, zur Verfügung gestellt wurden.

# 2 Materialien und Methoden

## 2.1 Materialien

## 2.1.1 Geräte

Durchflusszytometrie:	
FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
ELISA Reader:	
Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim
ELISA Washer:	
Microplate-Washer Elx 50	Biotek, Bad Friedrichshall
Homogenisator:	
Ultra Turra T25 basic	IKA GmbH, Staufen
Mikroskope:	
Leica DC 300F L	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DM RBE	Leica Microsystems, Wetzlar
Leica DM RBE	Leica Microsystems, Wetzlar
Zeiss Axioplan 2	Carl-Zeiss AG, Oberkochen
Olympus BX50	Olympus Mikroskope, Hamburg
Real-time-PCR:	
Lightcycler 480	Roche, Basel, CH
TaqMan Sequence Detection:	
ABI prism 7700 sequence detector	PE Biosystems, Weiterstadt
Spektrophotometrie:	
Nanodrop 1000	Thermo, Wilmington, MA,USA
Zellinkubator:	
Typ B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, München
Zentrifugen:	
Eppendorf centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Megfuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Heraeus Minifuge T	Heraeus Sepatech, Osterode
Autoklav:	
Autoklav 23	Melag Medizintechnik, Berlin

#### Sonstige Geräte:

- Kryostat RM2155 Kryostat CM3000 Mikrotom HM 340E MediMACS Magnet pH-Meter WTW Steril Card Hood Class II, Typ A/B3 Sonifier B-12 Thermomixer 5436 Vortex Genie 2 Waage BP 110S Waage Mettler PJ 3000 Wasserbad HI 1210
- Leica Microsystems, Bernsheim Leica Microsystems, Bernsheim Microm, Heidelberg Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach WTW GmbH, Weilheim The Baker Company, Sanford, USA Branson Sonic power, Danbury, USA Branson Sonic power, Danbury, USA Eppendorf, Hamburg Bender&Hobein AG, Zürich, CH Sartorius, Göttingen Mettler-Toledo, Greifensee, CH Leica Microsystems, Bernsheim

### 2.1.2 Tierhaltung

Makrolone Typ 2 Käfige	Tecniplast, Hamburg
Tierfutter	Ssniff Spezialdiäten, Soest

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Nunc, Wiesbaden
Costar Corning, Schiphol-Rijk, NL
Nunc, Wiesbaden
neoLab Migge, Heidelberg
Brand, Gießen
Eppendorf, Hamburg
BD, Heidelberg
Eppendorf, Hamburg
BD, Heidelberg
Gilson, Middleton, USA
Peske, Aindling-Arnhofen
Eppendorf, Hamburg
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
BD, Heidelberg

Skalpelle Feather No. 20 Zellkulturschalen 10cm Zellkulturschaber 24cm Feather Safety Razor Co, JP TPP, Transadingen, CH TPP, Transadingen, CH

### 2.1.4 Zellkultur

DMEM-MediumGFetales Kälberserum(FCS)BOpti-MEM-MediumGRPMI-1640-MediumGITS, Insulin, Transferrin, SeleniumFPenicillin/Streptomycin(100x)PCollagenaseFPBSPTrypsin / EDTAP

### 2.1.5 Chemikalien

Aceton Albustix Teststreifen Aqua ad injectabila **Bovines Serum Albumin** 2,2,2-Tribromethanol DEPC(Diethylpyrocarbonate) **DNAse Typ III** DTT (100 mM) **EDTA** EDTA-Dikalium 0.2M Einbettmedium Eosin Ethanol FACS Clean **FACS** Rinse FACS Flow Formaldehyd 37% Glycerin HCI

GIBCO/invitrogen, Paisley, UK Biochrom AG, Berlin GIBCO/invitrogen, Paisley, UK GIBCO/invitrogen, Paisley, UK Roche Diagnostics, Mannheim PAA Laboratories GmbH, Cölbe Roche Diagnostics, Mannheim PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Merck, Darmstadt Bayer Braun, Melsungen Roche, Mannheim Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Sigma, Deisenhofen Invitrogen, Carlsbad CA, USA Calbiochem, San Diego, USA neoLab, Heidelberg Jung, Leica Microsystems, Nussloch Sigma, Deisenhofen Merck, Darmstadt **BD**, Heidelberg **BD**, Heidelberg BD, Heidelberg Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Roth, Karlsruhe Merck, Darmstadt

Hematoxilin Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kalium-Chlorid	Merck, Darmstadt
Kalium-dihydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (25 mM)	Fermentas Scientific, Waltham, USA
β Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natrium-Azid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Carbonat	Merck, Darmstadt
Natrium-Chlorid Lösung 0,9 %	Braun, Melsungen
Natrium-hydrogen-Carbonat	Merck, Darmstadt
Natrium-hydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natrium-Carbonat	Merck, Darmstadt
Di-Natrium-hydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Perjodic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Shandeon Formal-Fixx Concentrate	Thermo, Chershire, UK
Tryptan Blau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20 detergent	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Xylene	Merck, Darmstadt

## 2.1.6 Puffer und Lösungen

### Puffer:

FACS Puffer:	<ul> <li>PBS</li> <li>0,1% Na Azid</li> <li>0,2% BSA</li> </ul>	Paris Puffer:	<ul> <li>20mM Tris HCI</li> <li>125mM NaCI</li> <li>10mM KCI</li> <li>10mM Na-Acetat</li> <li>5mM Glucose</li> <li>pH=7,4</li> </ul>
<u>1 L 10x HBSS:</u> ohne Ca, Mg	<ul> <li>4g KCI</li> <li>0,6 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>80g NaCI</li> <li>0,621g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> </ul>	TAC Puffer:	<ul> <li>50mM Tris Puffer</li> <li>450ml 0,83% Ammonium- chlorid</li> <li>pH=7,2</li> </ul>
<u>1 L 10x HBSS:</u> mit Ca, Mg	<ul> <li>3,5g NaHCO<sub>3</sub></li> <li>1,4g CaCl<sub>2</sub></li> <li>1g MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>0</li> <li>1g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>0</li> <li>10g D-Glukose</li> </ul>	MACS Puffer:	<ul> <li>2mM EDTA</li> <li>0,5% BSA pH=7,2</li> </ul>

## 2.1.7 Antikörper und Enzyme

#### Immunhistochemie:

Ratte anti-CD3 Ratte anti-F4/80 Ratte anti-Mac2 Hamster anti-Nephrin Ratte anti-Wilms Tumor (WT)-1 Anti-Maus IgG Ziege anti-C3d Polyklonales Kaninchen anti-Fibrinogen

#### FACS:

Anti-CD3e-FITC Alexa 488 (Clone 145-2C11) Anti-CD4-APC Alexa 647 (Clone RM4-5) Anti-CD45-PE (Clone 30-F11) Anti-CD8a-Cy5-PE (Clone 53-6.7) Anti-F4/80-APC (Clone C1:A3-1) Anti-CD11c-FITC (Clone HL3) Anti-CD69-PE (Clone H1.2F3) Anti-Ly6C-FITC (RB6-8C5) Isotyp anti-F4/80-APC Isotyp anti-CD3 Alexa 488 Isotyp anti-CD8a Cy5-PE Isotyp anti-CD11c FITC Isotyp anti-CD15 PE

#### ELISA:

IgG-FITC, goat-anti-mouse

- Serotec, Düsseldorf Serotec, Düsseldorf Cederlane, Ontario, Kanada Acris Antibodies, Herford Santa Cruz, Santa Cruz, USA Caltag, Burlingame, USA Nordic, Tilburg, NL Abcam, Cambrdge, UK
- BD, Heidelberg
  Serotec, Düsseldorf
  BD, Heidelberg
  BD, Heidelberg

Jackson Immunoresearch, Suffolk, USA

## 2.1.8 Oligonukleotid-Primer für die real-time PCR

Gen	Linke Sequenz	Rechte Sequenz
18s	GCAATTATTCCCCATGAACG	AGGGCCTCACTAAACCATCC
CCL2 (MCP-1)	CCTGCTGTTCACAGTTGCC	ATTGGGATCATCTTGCTGGT
CCL3	CATATGGAGCTGACACCCCG	CAGGAAAATGACACCTGGCTG
CCL5 (RANTES)	CCACTTCTTCTCTGGGTTGG	GTGCCCACGTCAAGGAGTAT
CXCL-10	GGCTGGTCACCTTTCAGAAG	ATGGATGGACAGCAGAGAGC
IFNγ	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT	TGAGCTCATTGAATGCTTGG
IL-1β	TTCCTTGTGCAAGTGTCTGAAG	CACTGTCAAAAGGTGGCATTT
IL-6	TGATGCACTTGCAGAAAACA	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC
IL-10	ATCGATTTCTCCCCTGTGAA	TGTCAAATTCATTCATGGCCT
TGF-β	GGAGAGCCCTGGATACCAAC	CAACCCAGGTCCTTCCTAAA
ΤΝFα	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAACT
iNOS	TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG	TGAAGAAAACCCCTTGTGCT
MSR-1	CCTCCGTTCAGGAGAAGTTG	TTTCCCAATTCAAAAGCTGA
D6 / Ccbp2	CTTCTTTTACTCCCGCATCG	TATGGGAACCACAGCATGAA

Alle Primer wurden kommerziell von der Firma Metabion erworben.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotid-Primer

.

## 2.2 Tierexperimentelle Methoden

## 2.2.1 Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis (NTN)

Das Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (**Abbildung 11**) wurde an C57BL/6J Wildtyp Mäusen und D6-/- (C57BL/6J Hintergrund) Mäusen untersucht. Zu den theoretischen Hintergründen des Modells wird auf das Kapitel 1.2.3 auf Seite 7 verwiesen. Wir nutzten für unsere Versuche ausschließlich männliche Tiere im Alter von 7-9 Wochen. Die Versuchsdauer betrug 14 Tage nach i.v.-Injektion des nephrotoxischen Serums.

**Präimmunisierung**: Zunächst erfolgte drei Tage vor Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis die Präimmunisierung der Mäuse mit einer Emulsion aus Schaf-IgG und CFA (*Complete Freund's Adjuvans*). Hierdurch kommt es zu einer Verstärkung der Immunreaktion der Versuchstiere gegen das Fremdantigen. Zur Herstellung der Emulsion wurde das Schaf-IgG mit PBS auf eine Konzentration 0,2 mg/ml verdünnt, mit 2 ml CFA vermischt und anschließend mehrmals für wenige Sekunden am Sonicator emulgiert. Es wurden unter sterilen Bedingungen 100 µl der hergestellten Emulsion subkutan in die rechte bzw. linke Flanke appliziert. Im Verlauf des Experiments bildeten sich an den Injektionsstellen Granulome.

**Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis:** Drei Tage nach der Präimmunisierung erfolgte unter sterilen Bedingungen die intravenöse Injektion von 50 µl des nephrotoxischen Serums über die Schwanzvene.

Complete Freund's Adjuvans	Sigma-Aldrich, Steinheim
ChromePure Sheep IgG, whole molecule	Jackson Immunoresearch

Anti-GBM Serum (PTX-001S) Probetex, USA



#### Abbildung 11: Zeitlicher Ablauf der nephrotoxischen Serumnephritis.

Zum Versuchsbeginn am Tag 0 findet die i.v. Injektion des nephrotoxischen Serums statt; 3 Tage nach der stattgefundenen subkutanen Präimmunisierung mit Schaf-IgG. Durch die Ablagerung von anti-GBM-Antikörpern entlang der glomerulären Basalmembran entstehen Immunkomplexe und es kommt zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems und Leukozyteninfiltration. Im weiteren Verlauf überwiegt die adaptive Immunantwort, es entstehen große Immunkomplexe infolge einer autologen murinen Antikörperbildung gegen die abgelagerten Schlaf-Anti-GBM-Antikörper des ne-phrotoxischen Serums und Leukozyteninfiltration mit T-Zellen. Zum Zeitpunkt des Versuchsendes besteht klinisch und histologisch eine progressive Glomerulonephritis mit charakteristischer Halbmondbildung.

## 2.2.2 Entnahme von Urin, Blut und Gewebeproben

Vor Versuchsbeginn (Tag 0) und am Versuchsende (Tag 14) wurden Urinproben von allen Versuchstieren abgenommen, um eine Entwicklung der Proteinurie im Rahmen der Glomerulonephritis zu untersuchen. Die Blut- und Organentnahme von Niere, Lymphknoten und Milz am Versuchsende erfolgte nach einer Anästhesie (**Tabelle 4**). Zur Blutentnahme wurde der retroorbitale Venenplexus in den tiefanästhesierten mittels einer heparinisierten Blutkapillare über den lateralen Augenwinkel punktiert und die Bluttropfen in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Die so gewonnen 250 µl wurden zu Serum zentrifugiert (5 Minuten bei 1600 G) und bei -20°C gelagert oder für Serumanalysen an *SynLab.vet GmbH & Co. KG,* Labor Augsburg verschickt.

Die Nieren, Milz und Lymphknoten wurden vor der Entnahme mit vorgewärmter PBS-Lösung perfundiert. Die Perfusion erfolgte an der anästhesierten Maus über den linken Herzventrikel nach der Durchtrennung der V. cava inferior. Im Anschluss daran wurden die Nieren vorsichtig herauspräpariert, die Kapsel entfernt und das Nierengewebe in mehrere Teile geschnitten, die dann für weitere Analysen (z.B. RNA, Histologie, Durchflusszytometrie) verwendet wurden. Zuletzt wurden die abdominellen Lymphknoten und die Milz präpariert.

Anästhesie	10 ml Midazolam (1mg/ml)
	2 ml Fentanyl (0,05 mg/ml)
	1 ml Dormitor (1mg/ml)

Tabelle 4: Intravenöse Anästhesielösung

## 2.2.3 Versuchstiere

Mausstamm	Referenz
C57BL/6J Wildtyp	Bar Harbor, Maine, USA
D6 -/- (C57BL/6J)	Prof. Locati, Mailand

## 2.2.4 Tierhaltung

Alle Versuchstiere wurden unter SPF-Bedingungen (*specific-pathogen-free*) in der Tierhaltung der Abteilung gehalten. Die Haltung wird regelmäßigen mikrobiologischen Kontrolluntersuchungen unterzogen. Es wurden maximal 5 Mäuse in vorher autoklavierten Macrolone Typ II L Käfigen mit Filterdeckel bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus mit Wasser und Standardfutter der Firma ssniff<sup>®</sup> ad libidum gehalten. Das Futter, Wasser und Stroh sowie die Watte wurden ebenfalls autoklaviert. Die Käfige waren bei einer konstanten Raumtemperatur von 22°C sowie einer Luftfeuchtigkeit von 60% untergebracht. In einem Alter von 21 Tagen wurden Jungtiere geschlechtergetrennt abgesetzt und durch Lochmarkierungen am Ohr gekennzeichnet.

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

## 2.2.5 Genotypisierung der Knockout-Mäuse

Die Genotypisierung der verwendeten Versuchstiere erfolgte mithilfe der genomischen DNA aus Schwanzbiopsien. Zunächst wurden jeweils 1-2 mm des Biopsats in 200 µl PBND-Puffer mit 1 µl Proteinase K in einer Konzentration von 20 mg/ml für mindestens vier Stunden bei 56°C im Schüttel-Thermoblock inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden die Proben auf 85°C für 45 min erhitzt und anschließend bei 14.000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit der genomischen DNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

Zur Bestimmung des Genotyps erfolgte eine Genamplifikation mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit der Gabe genspezifischer Primer. Hierzu wurde 1 µl der genomischen DNA mit 24 µl des PCR-Mastermix vermischt und die PCR gestartet.

Vorabdenaturierung	5min	94 °C	
Denaturierung	1min	94 °C	
Annealing	1min	60 °C	35x Wiederholung
Elongation	2min	72 °C	
Polymerisation	5min	72 °C	
	ENDE	4 °C	

#### Tabelle 5: Mastercycler® Einstellungen für die PCR

Die anschließende Auftrennung der amplifizierten Genfragmente verlief mithilfe der Gelelektrophorese. Dafür wurde zunächst ein 1,5% Agarosegel hergestellt, indem 1,5 g Agarose durch Erhitzen in 100 ml TBE-Puffer gelöst und anschließend 7 µl Ethidiumbromid (Konzentration 10 mg/ml) hinzugegeben wurden. Für das Beladen des Gels mit den Proben wurden mithilfe eines Kamms Taschen geschaffen. Die amplifizierten Proben wurden in einem Verhältnis von 1 zu 5 mit 6x *Gel Loading Solution* vermischt und in die Probentaschen im Gel pipettiert.

Als Maßstab für die Größe der Fragmente wurde eine 100 bp- bzw. 1 kb-DNA Leiter von *Invitrogen* auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese mit einer Spannung von 150 V für 45 Minuten durchgeführt. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Taq-Polymerase. Im Anschluss wurde das Gel unter UV Beleuchtung fotografiert.



#### Abbildung 12: Genotypisierung der D6-Defizienz.

Durch homologe Rekombination mit dem Targeting-Vektor erfolgte in den transgenen Mäusen eine komplette Deletion der D6-kodierenden genomischen Sequenz (Abbildung 12 a oben) im Austausch mit einer Neomycin-Selektionskassette (Abbildung 12 a unten). Durch PCR genomischer DNA kann unter Verwendung der Primer A und B (Tabelle 6) in Wildtyp-, nicht aber homozygoten Knockout-Mäusen ein 260 pb-großes PCR-Produkt amplifiziert werden [55]. In homozygoten D6 Knockout-Tieren, nicht aber Wildtypmäusen entsteht dagegen mit den Primern A und C ein 550 bp großes PCR-Produkt, was die Genotypisierung erlaubt (Abbildung 12 b).

#### PBND-Puffer:

- 2 M KCI
- 1 M Tris-HCl
- 1 M MgCl<sub>2</sub>
- 0,1 % w/v Gelatin
- 100 % NP40
- 100 % Tween 20
- ddH<sub>2</sub>O

#### PCR-Mastermix pro Probe:

- 16 µl ddH<sub>2</sub>O
- 2,5 µl 10x Puffer
- 4 µl (300 µM) dNTPs
- 1 µl (10 pM/µl) je pro Primer
- 0,5 µl Taq Polymerase

#### TBE-Puffer:

- 89 mM Tris
- 89 mM Borsäure
- 2 mM EDTA
- in H<sub>2</sub>O gelöst und auf einen pH von 8,0 eingestellt

#### Gel Loading Solution:

- 10 mM Tris / HCI
- 20 % Glycerin
- 0,1 % Bromphenolblau

D6 Primer A	CAGAGCTGAGATGGTCCCAA
D6 Primer B	AGTAAGGCTCTCGGTGAACAG
D6 Primer C	AGCCGTCACCTTAATATGCG

#### Tabelle 6: Primer für die Genotypisierung des D6 Knockouts

## 2.3 Immunologische Methoden

## 2.3.1 ELISA

**Funktionsprinzip:** Mit dem Begriff *Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay* (ELISA) bezeichnet man ein auf einer enzymatischen Farbreaktion beruhendes antikörperbasiertes Nachweisverfahren [69, 70]. Dabei sind quantitative Aussagen über die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes möglich.

In dieser Arbeit wurde die sogenannte *Sandwich-ELISA* Methode verwendet, bei der zwei Antikörper spezifisch an das nachzuweisende Antigen (d.h. die nachzuweisende Substanz) binden.

Zunächst erfolgte die Beschichtung einer 96-*well* Mikrotiterplatte mit dem ersten Antikörper (sog. *capture antibody*), die dann bei 4°C über Nacht gelagert wurde. Am nächsten Tag wurden nach einem 30-minutigen Abblocken der freien Bindungsstellen mit *BSA* oder *FCS* die Proben sowie eine Standardreihe (mit bekannter Antigenkonzentration) in die *wells* pipettiert und für 2 Stunden inkubiert. In dieser Zeit konnte der an die Platte gebundene Antikörper das in der Probe vorhandene Antigen binden. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurde die Platte mehrfach gewaschen um die ungebundenen Bestandteile zu entfernen.

Im zweiten Schritt wurde der Enzym-gekoppelte Detektions-Antikörper (sog. *detection antibody*) hinzugefügt und die Platte nochmals 2 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe der TMB-Lösung, die zu einer durch das an den Detektions-Antikörper gekoppelte HRP(*horseradish peroxidase*)-Enzym katalysierten Farbreaktion führte.

Durch eine Stopplösung aus Schwefelsäure ( $H_2SO_4$ ) wurde nach 5-15 Minuten die Reaktion beendet und die Absorption, die proportional zu der gebundenen Proteinmenge ist, an einem *ELISA-Reader* gemessen. Aus einer Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen konnte dann eine Standardkurve erstellt werden mit deren Hilfe die gemessene Absorption der einzelnen Proben in entsprechende Konzentrationen umgerechnet wurde.

#### CCL2 / MCP-1, CCL5 / RANTES, KIM-1 Messung:

Im Gesamtnierenprotein und im Überstand der stimulierten Glomeruli und des Tubulointerstitiums wurden mittels ELISA die Chemokine CCL2, CCL5, sowie der tubuläre Schadensmarker KIM-1 nachgewiesen.

Die Herstellung des erforderlichen Proteinlysats aus dem Gesamtnierengewebe erfolgte indem dem Nierenstück zunächst 400 µl RIPA Puffer mit einem Protease- und Phosphataseinhibitor hinzugegeben wurde. Anschließend fand eine Homogenisierung mithilfe eines Homogenisators und Sonicators statt. Nach Zentrifugierung und Überführung des Überstandes in ein neues Gefäß, wurde ein Bradford-Test zur quantitativen Proteinmengenbestimmung der einzelnen Proben durchgeführt. Nach Normierung der Proben bezüglich ihres Proteingehalts wurden die o.g. ELISA-Messungen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Analog erfolgte die direkte Messung der CCL2- bzw. CCL5-Konzentration aus dem Zellkulturüberstand und im Serum ohne Notwendigkeit einer vorangehenden Proteinlysatherstellung.

CCL2 / MCP-1	R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
CCL5 / RANTES	R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
KIM-1 / TIM-1 / HAVCR	R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden

#### IgG-Messung:

Zum Nachweis einer autologen Antikörperbildung gegen das Fremdantigen des nephrotoxischen Serums im Rahmen der nephrotoxischen Serumnephritis wurde bei allen Versuchstieren die Menge des gebildeten Maus-Anti-Schaf-IgGs gemessen. Hierzu erfolgte die Benetzung einer lichtundurchlässigen schwarzen 96-*well* Mikrotiterplatte mit Schaf-IgG bei 4°C über Nacht. Die Serumproben wurden dann im Dreifachansatz in mehreren Konzentrationen (1:100, 1:200, 1:400, 1:800) auf die Platte pipettiert und für 2 Stunden inkubiert. Nach mehreren Waschschritten und weiteren 2 Stunden Inkubation mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG-FITC) wurde schließlich die Emission bei 535 nm Wellenlänge im *ELISA-Reader* gemessen.

Goat-anti-Maus-IgG FITC	Jackson Immunoresearch
ChromePure Sheep IgG, whole molecule	Jackson Immunoresearch

#### Bestimmung der Albuminurie:

Die Bestimmung der Albumin-Konzentration im Urin der Versuchstiere erfolgte nach Herstellerangaben mithilfe eines kommerziellen ELISA-Kits. Zur Erhöhung der Genauigkeit wurde eine Verdünnungsreihe von 10<sup>2</sup>-10<sup>7</sup> im Dreifachansatz erstellt und daraus jeweils ein Mittelwert gebildet.

Mouse Albumin ELISA Quantitation Bethyl Laboratories, Montgomery, USA	
---	--

#### Bestimmung des Kreatinin-Werts:

Da die Albuminurie aus dem Spontanurin bestimmt wurde, musste die Albuminkonzentration immer in Relation zur Harnkonzentration gesetzt werden.

Kreatinin entsteht im Muskelgewebe durch Abbau von Kreatin, hat bei stabiler Muskelmasse relativ konstante Plasmaspiegel und wird in der Niere überwiegend glomerulär ausgeschieden. Daher eignet sich der Kreatinin-Wert der Urinprobe als gängiges Maß für die Harnkonzentration und wird als Korrekturfaktor verwendet.

Zur Bestimmung des Kreatinins wurde die Jaffé-Methode, ein kinetischer Farbtest, verwendet. Dieser nutzt die Eigenschaft des Kreatinins, in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen Kreatininpinkrat-Komplex (gelb-orange) zu bilden, welcher dann proportional zur Kreatininkonzentration ist. Zunächst wurde 1 µl der Urinprobe 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt, mit Natronlauge (0,16 mol/l) alkalisiert und 200 µl Pikrinsäure (4,0 mmol/l) hinzugegeben. Im *ELISA-Reader* konnte dann die Extinktion (492 nm) nach 1 min und nach 3 min gemessen und eine Differenz gebildet werden. Anhand der Standardreihe (0, 1, 2, 4, 8 mg/dl) wurde eine Standardfunktion erstellt mit deren Hilfe die Extinktionsdifferenz der Proben in die entsprechenden Kreatininkonzentrationen umgerechnete wurde.

Creatinine FS

DiaSys Diagnostic Systems

## 2.3.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Analyse und Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen in der Niere und anderen Geweben erfolgte in der Durchflusszytometrie anhand ihrer Oberflächenmoleküle. In dieser Arbeit verwendeten wir dafür das 4-Kanal-Gerät *FACSCalibur* (Becton Dickinson) mit entsprechender *CellQuest*<sup>®</sup> Analyse-Software und den Fluorochromen *FITC* (Fluorescein-5isothiocyanat), *PE* (Phycoerythrin), *PE-Cy5* (Phycoerythrincyanin) und *APC* (Allophycocyanin).

**Funktionsprinzip:** Die Durchflusszytometrie bzw. FACS *(fluorescence-actived-cell-sorting)* ist eine Methode der Zellanalyse, die darauf beruht, dass Zellen und andere Partikel anhand ihrer Größe, Struktur und der Expression bestimmter Oberflächenantigene, wie den CD *(cluster of differentiation)*-Antigenen, unterschieden werden können.

Zunächst werden mittels hydrodynamischer Fokussierung und laminarer Strömung die zu untersuchenden Zellen vereinzelt und fließen dann perlschnurartig durch eine Messzelle, wo sie von mehreren Lasern beleuchtet werden. Dabei kann im Vorwärtsstreulicht (*FSC = Forward scatter*) die Zellgröße und im Seitwärtsstreulicht (*SSC = Side scatter*) die Zellgranularität bestimmt werden. Zusätzlich erfolgt eine Markierung der Zellen mit Antikörpern, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Durch den Laserstrahl werden diese verschiedenen Fluorochrome angeregt und emittieren daraufhin Licht einer spezifischen Wellenlänge, welche das FACS-Gerät detektiert und den einzelnen Farbstoffen zuordnet.

Bei der Messung mehrerer Antikörper mit verschiedenen Fluorochromen entsteht das Problem der Teilüberlappung der emittierten Wellenlängen. Daher ist für eine akkurate Auswertung eine Kompensation notwendig, bei der man mit lediglich einem Farbstoff markierte Zellen oder sog. Isotyp-Kontrollen mitanalysiert und den Anteil, der in andere Detektionskanäle einstreut, subtrahiert.

### 2.3.2.1 Analyse der Zellpopulationen in der Niere

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der renalen Infiltration unterschiedlicher Leukozyten in der Durchflusszytometrie wurde zunächst aus den Nieren der D6-defizienten Tiere und Wildtyp-Kontrollgruppe eine Einzelzellsuspension hergestellt. Dazu wurden die Organe entnommen und in einer Petrischale auf Eis mit 3 ml vorgekühltem Paris-Puffer in 0,5 mm große Stücke zerkleinert. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS-Puffer (mit Ca, Mg) erfolgte die Resuspension und Verdauung des Pellets in 5 ml vorgewärmter

Kollagenase / DNAse-Lösung 20 Minuten lang im 37°C Wasserbad. Nach einem weiteren Waschschritt kam es zu nochmaliger 20 minütiger Inkubation in 2 mM EDTA / HBSS-Lösung, sowie erneutem Kollagenase-Verdau für weitere 20 Minuten bei 37°C. Um nun eine Einzelzellsuspension für die Durchflusszytometrie zu erhalten, wurden das verdaute Nierengewebe mit einer Spritze aufgesaugt und mehrmals durch eine 19G- und anschließend eine 26G-Kanüle ausgespritzt. Es folgten weitere Waschschritte mit PBS, eine Zentrifugierung bei 250 g, bevor schließlich der Überstand abgesaugt und die Zellsuspension mit FACS-Puffer resuspendiert wurde. Mit dieser Methode konnten ca. 1-3 Millionen Zellen pro Mausniere gewonnen werden.

Vor der Färbung mit verschiedenen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern wurden die unspezifischen Bindungsstellen an der Zelloberfläche mithilfe einer Mischung aus 5 µl Rattenserum und 5 µl Mausserum blockiert. Pro Ansatz wurde eine 4-fach Färbung mit CD45-PE, CD3e-FITC, CD4-APC und CD8-PE-Cy5, sowie eine 3-fach Färbung mit CD45-PE, F4/80-APC und CD11c-FITC durchgeführt. Für die Kompensation der spektralen Überlappungen der Fluorochrome wurden zudem Färbungen mit Isotyp-Kontrollen angefertigt.

Nachfolgend wird eine Auflistung der Oberflächenantigenkombinationen der verschiedenen Leukozytenpopulationen (**Tabelle 7**), sowie die Gating-Strategie dargestellt (**Abbildung 13**).

Leukozyten	CD45 <sup>+</sup>
Neutrophile Granulozyten	CD45 <sup>+</sup> , Ly6G <sup>+</sup> , F4/80 <sup>-</sup>
Dendritische Zellen	CD45⁺, CD11c⁺
F4/80⁺ dendritische Zellen	CD45 <sup>+</sup> , CD11c <sup>+</sup> , F4/80 <sup>+</sup>
F4/80- dendritische Zellen	CD45⁺, CD11c⁺, F4/80⁻
Makrophagen	CD45 <sup>+</sup> , CD11c <sup>-</sup> , F4/80 <sup>+</sup>
T-Lymphozyten	CD45⁺, CD3⁺
CD4 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻
CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	CD45⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD8⁺
aktivierte CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T-Lymphozyten	CD3 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> bzw. CD8 <sup>+</sup> , CD69 <sup>+</sup>

Tabelle 7: Zellpopulationen mit der jeweiligen Oberflächenantigenkombination.



Abbildung 13: Gating-Strategie zur Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltrate.

**A:** Darstellung aller CD45<sup>+</sup> Zellen (1 oben + unten).

**B**: CD3<sup>+</sup> T-Zellen (2), die nachfolgend in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (3) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (4) differenziert werden.

**C:** CD11c<sup>+</sup> (5a+b) dendritische Zellen, die sich in CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> (5a) und CD11c<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup> (5b) Zellen aufteilen. F4/80<sup>+</sup> Leukozyten in (5b+6) und F4/80<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> Makrophagen (6). Ergänzend sind Isotyp-kontrollen für CD11c-FITC und F4/80-APC dargestellt.

### 2.3.2.2 Analyse der Zellpopulationen im Lymphknoten

Die abdominellen Lymphknoten wurden nach der Entnahme aus der Maus durch ein 70 µm Zellsieb filtriert und die erhaltene Zellsuspension zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde resuspendiert und die unspezifischen Bindungsstellen an der Zelloberfläche mit der Mischung aus 5 µl Rattenserum und 5 µl Mausserum blockiert. Schließlich erfolgte die Färbung mit CD3e-FITC, CD4-APC, CD8-PE-Cy5 und dem CD69-PE, um die verschiedenen Zellpopulationen darzustellen.

## 2.3.2.3 Analyse der Zellpopulationen im Vollblut

Das Blut (ca. 100 µl) wurde direkt nach Entnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus mit 5 µl EDTA vermischt und auf Eis gestellt. Es erfolgte die Zugabe des gleichen Volumens von *AccuCheck* Counting Beads zur absoluten Quantifizierung der Leukozytenanzahl. Auch hier wurden vor der Färbung mit verschiedenen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern zunächst die unspezifischen Bindungsstellen an der Zelloberfläche durch die Zugabe von 5 µl Rattenserum und 5 µl Mausserum blockiert. Pro Ansatz erfolgte eine 4-Fachfärbung mit CD45-PE, CD3e-FITC, CD4-APC, CD8-PE-Cy5 bzw. eine 2-Fachfärbung mit CD45-PE und Ly6C-FITC mit einer anschließenden 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur. Nach der Lyse der Erythrozyten mithilfe der *Lysing Solution* von BD konnten die Proben schließlich in der Durchflusszytometrie analysiert werden. Durch die charakteristischen Eigenschaften von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten im *forward*- und *sideward scatter* konnten diese Leukozytenpopulationen quantifiziert werden (**Tabelle 7**). Die T-Lymphozytenzahl wurde durch die Auswertung der obigen Antikörperfärbung ermittelt, ebenso der Anteil Ly6C+ Monozyten.

#### Paris Puffer:

- 20 mM Tris-HCl
- 125 mM NaCl
- 10 mM KCI
- 10 mM Na-Azetat
- 5 mM D-Glukose
- in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4 (mit 0,1 N HCI)

#### 10x HBSS-Puffer (mit Ca und Mg):

- 4 g Kcl
- 0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 80 g NaCl
- 0,62 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O
- 3,5 g NaHCO<sub>3</sub>
- 1,4 g CaCl<sub>2</sub>
- 1 g MgCl<sub>2</sub>
- 1 g MgSO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O
- 10 g D-Glukose
- in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4 (mit 0,1 N HCI)

#### 10x HBSS-Puffer (ohne Ca, Mg):

- 4 g Kcl
- 0,6 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 80 g NaCl
- 0,62 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O
- in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O, pH 7,4 (mit 0,1 N HCI)

#### Kollagenase / DNAse-Lösung in HBSS-Puffer (ohne Ca,Mg):

- 10 mg Kollagenase Typ I
- 1 mg DNAse Typ III
- in 10 ml HBSS (ohne Ca, Mg)

#### 2 mM EDTA / HBSS-Lösung:

- 100 µl 0,2 EDTA-Stammlösung
- 10 ml HBSS (ohne Ca, Mg)

#### Kollagenase-Lösung in HBSS-Puffer (ohne Ca,Mg):

- 10 mg Kollagenase Typ I
- in 10 ml HBSS ohne Ca,Mg

#### FACS-Puffer:

- 500 ml 1x PBS
- 0,2 % BSA
- 0,1 % Na-Azid

FACS-Antikörper für Nieren- und Blutzellen:			
CD45-PE	BD, Heidelberg		
CD3e-FITC	BD, Heidelberg		
CD4-APC	BD, Heidelberg		
CD8-PE-Cy5	BD, Heidelberg		
F4/80-APC	BD, Heidelberg		
CD11c-FITC	BD, Heidelberg		
Ly6C-FITC	BD, Heidelberg		

AccuCheck Counting Beads

Life Technologies, Carlsbad, USA

## 2.4 Histologische Untersuchungen

## 2.4.1 Aufbereitung des Nierengewebes, histologische und immunhistologische Auswertung

Das entnommene Nierengewebe wurde in Histologiekassetten überführt, für 24 Stunden in 10%-Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden 2 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt, auf einen mit Ammoniumpersulfat (APES) vorbehandelten Objektträger aufgetragen und schließlich in einem Trockenschrank für 12 Stunden bei 37°C aufbewahrt.

Vor jeder Färbung erfolgte zunächst die Entparaffinierung in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50%) mit anschließendem Spülen in PBS.

Bei der Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung wurden die entparaffinierten Nierenschnitte für 5 min in Hämalaun getaucht und in Wasser gebläut. Die anschließende Eosin-Färbung erfolgte mit 2% Eosin-Lösung für 5 min. Schließlich wurden die Schnitte mittels aufsteigender Alkoholreihe und Xylol dehydriert und mit Deckgläschen eingedeckt.

Das Ausmaß der glomerulären Sklerose und Matrixdeposition wurde in der *Periodic Acid Schiff* (PAS)-Färbung ermittelt. Für die Analyse wurden pro Versuchstier 50 Glomeruli semiquantitativ ausgewertet:

- Grad 0 = keine Läsion
- Grad 1 = <25% Sklerose
- Grad 2 = 25-49% Sklerose
- Grad 3 = >50-74% Sklerose
- Grad 4 = >75% Sklerose

Die Erfassung der interstitiellen Schädigung erfolgte mithilfe der *PAS-Färbung* durch das Zählen von tubulären Zylindern pro Gesichtsfeld. Zusätzlich wurde ein tubulärer Dilatations-Score und ein interstitieller Matrix-Score gebildet. Es wurden pro Versuchstier 10 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung analysiert.

Die Auswertung erfolgte anhand der folgenden Skala:

- Grad 0 = keine tubuläre Dilatation bzw. interstitielle Matrixvermehrung
- Grad 1 = leichte tubuläre Dilatation bzw. interstitielle Matrixvermehrung
- Grad 2 = mittelgradige tubuläre Dilatation bzw. interstitielle Matrixvermehrung
- Grad 3 = schwere tubuläre Dilatation bzw. interstitielle Matrixvermehrung

Für die immunhistologische Färbung wurden folgende Antikörper (siehe Kap. 2.1.7) und Antikörperkonzentrationen verwenden: Ratte-Anti-CD3 (1:100), Ratte-Anti-F4/80 (1:100), Ratte-Anti-Mac2 (1:3000), Ziege anti-C3d (1:500), polyklonales Kaninchen-Anti-Fibrinogen. Zur Gegenfärbung wurde eine kurze Inkubation mit Methylgrün durchgeführt.

Bei der CD3 Auswertung wurden pro Versuchstier 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung analysiert und alle CD3 gefärbten Zellen im Niereninterstitium gezählt. Zudem wurden CD3-positive Zellen in 50 Glomeruli quantifiziert.

Für die F4/80-Auswertung wurden pro Versuchstier 20 Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung digital fotografiert und mithilfe des Bildanalyseprogramms *ImageJ* (*National Institutes of Health*) der prozentuale Schwarzanteil der F4/80 gefärbten Zellen am Gesamtbild bestimmt.

Bei der Mac2-Auswertung wurden pro Tier 15 Glomeruli fotografiert und dort der prozentuale Schwarzanteil der Mac2 gefärbten Zellen an der Gesamtfläche des glomerulären Konvoluts bestimmt. Analog dazu wurde bei der IgG-, C3d-Komplement- und Fibrinogen-Färbung verfahren.

Die WT1/Nephrin-Färbung ist eine Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern (siehe Kap. 2.1.7) am Paraffinschnitt. Hierbei wurde die Anzahl an WT1-gefärbten, Nephrinpositiven Podozyten gezählt, sowie die Nephrinexpression bestimmt, indem der prozentuale Anteil an Nephrin pro Glomerulus in jeweils 40 Glomeruli quantifiziert wurde.

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

## 2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Nierengewebe erfolgte mithilfe des *Purelink RNA Mini Kits* (Ambion) nach Herstellerangaben. Ziel dabei war die schnelle Elimination der RNAse-Aktivität, welche die RNA im Gegensatz zur DNA sehr instabil macht. Die auf diese Weise gewonnene Gesamt-RNA wurde entweder für weitere Analysen direkt in cDNA umgeschrieben oder bei -80°C gelagert.

PureLink RNA Mini Kit	Ambion

Die RNA-Reinheit wurde mithilfe eines Spektrometers (NanoDrop, Peqlab) bestimmt, indem die optische Dichte bei  $\lambda$ =260 nm (DNA) und  $\lambda$ =280 nm (Protein) gemessen wurde. Wenn dabei der Koeffizient (260 nm/280 nm) kleiner als 1,8-2,0 war, galt die Probe als kontaminiert (mit Protein, DNA oder aromatischen Substanzen) und wurde nochmals gereinigt.

Eine RNA-Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l entspringt einer OD = 1 bei 260 nm, daher lässt sich die RNA-Konzentration in der Probe folgendermaßen bestimmen:

#### Konzentration (ng/ $\mu$ l) = $E_{260} \mathbf{x}$ Verdünnung $\mathbf{x}$ 40

### 2.5.2 cDNA-Synthese

In der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird zur Amplifizierung die DNA benötigt. Daher muss zunächst die gereinigte Gesamt-mRNA in komplementäre Einzelstrang-DNA (cDNA) revers umgeschrieben werden.

Um die gleiche RNA-Menge in allen Proben umzuschreiben, wurden diese mit RNAsefreiem Wasser gemischt, sodass in einem Volumen von 13,2 µl genau 1 µl RNA enthalten war. Die RNA-Lösung wurde anschließend im Doppelansatz mit dem Mastermix gemischt (**Tabelle 8**). Hierbei wurde zum Ausschluss einer fälschlichen Amplifizierung genomischer DNA in einem Ansatz als Kontrolle anstatt der reversen Transkriptase (Superscript) RNAsefreies-Wasser verwendet (sog. "RT minus" Ansatz).

Zum Starten der cDNA-Synthese wurden 20 µl der RNA-Lösung im Thermomixer für 90 Minuten bei 42°C inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurden die Proben für 5 Minuten auf 85°C erhitzt. Die synthetisierte cDNA wurde direkt für quantitative RT-PCR-Analysen verwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

#### cDNA-Synthese Mastermix:

- 4 µl 5x Puffer
- 0,4 µl 25mM dNTP
- 1 μl 0,1M DTT
- 0,5 µl 40 U/µl RNasin
- 0,25 μl Acrylamid 15 μg/ml
- 0,215 µl Hexanukleotide
- 0,43 μl Superscript bzw. im RT- Ansatz ddH<sub>2</sub>O

Tabelle 8: cDNA-Synthese Mastermix

## 2.5.3 Quantitative RT-PCR

#### Funktionsprinzip:

Die quantitative "real-time PCR" ist, wie die konventionelle PCR, eine Vervielfältigungsmethode für DNA mit dem Unterschied, dass die Amplifikationsreaktion unter fortlaufender Überwachung und photometrischer Messung von Fluoreszenzfarbstoffen stattfindet. *SYBR*<sup>®</sup> *Green* ist ein interkalierender Farbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagern kann. Dabei steigt die gemessene Fluoreszenzintensität mit jedem Amplifikationszyklus direkt proportional zur Menge der vervielfältigten Ziel-DNA an. Das wiederum erlaubt den Rückschluss auf die Menge an eingesetzter DNA.

Zunächst wird für jede Probe ein sogenannter Cycle-Theshold-Wert (CT-Wert) aufgezeichnet, welcher für die genaue Quantifizierung wichtig ist. Dieser Wert entspricht der Zyklusanzahl bei der die gemessene Fluoreszenz einen Schwellwert überschreitet und sich deutlich vom Hintergrundsignal unterscheidet. Folglich sind mit steigender Substratmenge am Anfang weniger Zyklen nötig um den CT-Wert zu erreichen.

Es gibt verschiedene Rechenmodelle für die Quantifizierung, wobei in der vorliegenden Arbeit die relative Quantifizierung eingesetzt wurde, welche das Verhältnis der Zielsequenz zu einer Referenzsequenz bestimmt. Dazu wird das *Housekeeping*-Gen 18S rRNA, das in allen Proben gleichermaßen exprimiert ist, als interne Referenz verwendet.

#### Protokoll:

Zunächst wurde die mRNA, die in Form von "RT<sup>+</sup>" cDNA und "RT<sup>-</sup>" Negativkontrolle vorlag (siehe Kapitel 2.5.2), mit RNAse freiem Wasser 1 zu 10 verdünnt. Es wurden dann jeweils 2 µl der Probe mit 18 µl des PCR-Mix (**Tabelle 10**) gemischt. Der Probenmix wurde im Doppelansatz auf eine 96-well Platte pipettiert und zudem als Negativkontrolle ein Ansatz ohne Taq-Polymerase aufgetragen. Nach Abdichtung mit Folie und Zentrifugation wurde die PCR nach Protokoll (**Tabelle 9**) im Lightcycler 480 von Roche durchgeführt.

Die Auswertung erfolgte mit der Lightcycler Software Version 1.2.9.11. Bei Verunreinigung in der RT-Negativkontrolle oder im Taq-Polymerase-freien Ansatz wurde die real-time PCR wiederholt bzw. die Probe verworfen.

Vorabdenaturierung	5min	95 °C	
Denaturierung	15s	95 °C	
Annealing	45s	60 °C	40x Wiederholung
Extension	30s	72 °C	
Schmelzkurve	5s	95 °C	
	10min	schrittweise Steigerung von 65 bis 95°C	

#### Tabelle 9: Lightcycler® Einstellung zur Durchführung der real-time PCR

#### PCR Mix:

- 10 µl Mastermix mit SYBR Green (v. 1.2)
- 0,6 µl des linken und rechten Primers
- 0,16 µl Taq-Polymerase
- 6,64 µl RNAse freies Wasser

Tabelle 10: PCR Mix

## 2.6 Zellkultur

## 2.6.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultivierung der Nierenzellen, der isolierten Glomeruli und des Tubulointerstitiums erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem Brutschrank (37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Begasung). Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden ausschließlich unter der Sterilwerkbank, die vor Ingebrauchnahme stets desinfiziert wurde, durchgeführt. Die Filter und der laminäre Luftstrom sorgten für eine keimfreie Umgebung. Ebenso wurden sämtliche Gebrauchsgegenstände (wie Pipetten, Schalen, Mediumflaschen) zusätzlich mit Desinfektionsmittel behandelt bzw. autoklaviert.

## 2.6.2 Zellzahlbestimmung und Zellvitalität

Die Zellzahl wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit der folgenden Formel berechnet:

Zellzahl/ml = Mittelwert 4 Großquadranten x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup>

Die Zellvitalität nach Zellisolation und Zelltrennung wurde mit Trypanblau bestimmt. In vitalen Zellen ist die Zellmembran für diesen Farbstoff undurchlässig und daher bleiben sie ungefärbt, wohingegen abgestorbene Zelle mit veränderter Membrandurchlässigkeit das Trypanblau aufnehmen und im Mikroskop tiefblau gefärbt erscheinen.

## 2.6.3 Paramagnetische Isolation von Glomeruli und Tubulointerstitium

Um die spezifische Rolle des D6-Rezeptors in den Glomeruli und dem Niereninterstitum getrennt untersuchen zu können, wurde ein paramagnetisches Isolationsverfahren verwendet. Aufbauend auf dem von *Takemoto et al.* [71] beschriebenen Vorgehen konnte mithilfe dieser Methode eine effiziente, zügige Separation der Glomeruli vom tubulointerstitiellen Gewebe mit einem hohem Reinheitsgrad (>95%) aus den D6-defizienten- und Wildtyp-Mäusen erfolgen.

Wie in der **Abbildung 14** schematisch dargestellt, wurden zunächst 200 µl (8 x 10<sup>7</sup>) M-450 *Dynabeads* (Dynal Invitrogen, Karlsruhe) mit 40 ml vorgewärmter PBS-Lösung vermischt. Diese besitzen einen Durchmesser von 4,5 µm, sowie einen mit Kunststoff ummantelten magnetischen Kern (**Abbildung 14** A). Während der Durchmesser zu einer Embolisierung

der Beads in den Glomeruluskapillaren führt, sorgt die Kunststoffummantelung für eine Verringerung des Perfusionsschadens und der Eisentoxizität im Gewebe (**Abbildung 14** B).

Die Perfusion der Maus erfolgte unter sterilen Bedingungen. Die narkotisierten Tiere wurden zunächst thorakotomiert und das Herz freipräpariert. Nach anschließender Durchtrennung der V.cava superior zum Perfusionsabfluss erfolgte die Injektion der Bead-Lösung über den linken Ventrikel unter ständiger Kontrolle des Perfusionsdruckes (40-60 mmHg). Als Zeichen einer erfolgreichen Perfusion nahmen die Leber und die Nieren einen helleren Farbton an.

Als nächstes wurden die Nieren entnommen, die Nierenkapsel manuell entfernt, mithilfe eines Skalpells zerkleinert und anschließend das Gewebe für 30 min bei 37°C mit Kollagenase A (1 mg Kollagenase A/ml HBSS, Roche/Invitrogen) inkubiert (**Abbildung 14** D). Durch die Kollagenasebehandlung wird das tubulointerstitielle Gewebe verdaut, während die relativ Kollagenase-resistenten Glomeruli kapselfrei als intakte Korpuskel verbleiben [71].

Das Gewebe wurde im Anschluss durch ein 100 µm Zellsieb gedrückt (**Abbildung 14** E) und die Gewebssuspension in einem 12 ml Röhrchen für 7 Minuten in ein starkes Magnetfeld gestellt. Die mit Beads embolisierten Glomeruli hafteten unter dem Einfluss des Magnets (BD-I Magnet, BD Biosciences) an der Wand des Röhrchen, während die verbleibende Zellsuspension mit nicht-glomerulären Nierengewebe mithilfe einer Pipette abpipettiert werden konnte (**Abbildung 14** F).



# Abbildung 14: Paramagnetische Isolation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums mittels magnetischen Beads nach *Takemoto et. al.* [71] Abb. modifiziert nach [20, 72].

Diese tubulointerstitielle Fraktion des ersten Waschgangs wurde dann zentrifugiert (3 min, 225 G, 4°C), der Überstand verworfen und das Sediment für RNA-Isolation gelagert oder für Zellkulturversuche aufgearbeitet.

Die im Röhrchen verbliebenen Glomeruli wurden nach zusätzlichen Waschschritten mit PBS schließlich in 10 ml PBS resuspendiert, erneut durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert und weitere 5 Minuten dem Magnetfeld ausgesetzt.

Die nun verbliebene Glomerulisuspension wurde weitere drei mal im Magnetfeld mit PBS gewaschen und die Reinheit der Fraktion unter dem Mikroskop überprüft (**Abbildung 15**), wobei mit dieser Methode aus einer Niere ca. 10.000 reine Glomeruli isoliert werden konnten.



Abbildung 15: Separation von tubulointerstitiellem und glomerulärem Nierengewebe. Mikroskopische Ansicht der verschiedenen Waschgänge nach Perfusion mit magnetischen Dynabeads. (A) tubulointerstitielle Fraktion des 1. Waschgangs (B) glomeruläre Fraktion mit sichtbaren magnetischen Beads im Glomerulus.

### 2.6.4 Stimulation der Glomeruli und des Tubulointerstitiums

Im Anschluss an die erfolgreiche Isolation aus den D6-/- und Wildtyp Mäusen wurden jeweils 5.000 Glomeruli auf einer 6-well-Platte mit 3 ml RPMI 1640-Medium mit 15% FCS, 15 mM HEPES-Puffer (Invitrogen), 0,66 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin, 100µl Streptomycin kultiviert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums, diesmal jedoch ohne FCS Zugabe, und Inkubation für weitere 24 Stunden. Dann wurden die Glomeruli für 24 Stunden mit unterschiedlichen TNF Konzentrationen stimuliert, nach entsprechender Stimulationsdauer geerntet und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugieren bei 200 G wurde der Überstand bei -20°C für ELISA-Messungen aufbewahrt. Für das isolierte Tubulointerstitium erfolgten die Schritte äquivalent zum oben beschriebenen Vorgehen.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die dargestellten tierexperimentellen und *in-vitro* Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte aus jeweils mindestens zwei unabhängigen Versuchen. Die Daten sind als Mittelwert und Standardabweichung bzw. Standardfehler angegeben. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte mit dem zweiseitigen *Zweistichproben-t-Test (Student's t-test)*, wobei ein p-Wert <0,05 (\*) bzw. <0,01 (\*\*) als signifikant angenommen wurde. Die Berechnung und Darstellung wurde mit den Programmen *Microsoft<sup>®</sup> Excel für Mac 2011* und *GraphPad<sup>®</sup> Prism 5.0* durchgeführt.

# 3 Ergebnisse

# 3.1 Die nephrotoxische Serumnephritis in D6-defizienten Mäusen

Entsprechend der Ausgangshypothese zur entzündungshemmenden Funktion des atypischen Chemokinrezeptors D6 sollte seine Rolle bei der Glomerulonephritis *in-vivo* am Modell der nephrotoxischen Serumnephritis (NTN) der Maus (siehe Kapitel 2.2.1) untersucht werden.

### 3.1.1 Albuminurie

Vor der Induktion der nephrotoxischen Nephritis an Tag 0 zeigte weder die Wildtyp- noch die D6-defiziente-Gruppe eine signifikante Albuminurie. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass diesbezüglich bereits bei gesunden Tieren ohne Nephritis ein Unterschied zwischen beiden Genotypen bestanden hat (**Abbildung 16**).

Zum Versuchsende, zwei Wochen nach der Injektion des nephrotoxischen Serums, entwickelten beiden Versuchstiergruppen eine ausgeprägte Albuminurie, die auf eine Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere mit renalem Proteinverlust hindeutet. Das Modell wurde folglich in beiden Gruppen erfolgreich induziert.

Weiterhin bestand bei den D6-defizienten Tieren mit einer Urinalbumin-Konzentration von 51 mg/mg Kreatinin eine signifikant höhere Albuminurie im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren, die lediglich eine Konzentration von 29 mg/mg Kreatinin aufwiesen (**Abbildung 16**). Dieses funktionelle Ergebnis deutet auf eine stärkere glomeruläre Schädigung im D6-/- Genotyp hin.



Abbildung 16: Messung der Proteinurie vor Versuchsbeginn und am Tag 14 der NTN.

In beiden Gruppen bestand keine Albuminurie am Tag 0 vor der NTN-Induktion. Sowohl Wildtyp (WT) als auch D6-/- Tiere entwickelten eine starke Albuminurie am Tag 14, wobei die Menge des ausgeschiedenen Albumins in der D6-defizienten Gruppe signifikant höher war. Die Albumin/Kreatinin-Ratio wurde aus dem Spontanurin am Tag 0 und Tag 14 bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=7 je Gruppe, \* p < 0,05.

#### 3.1.2 Serumanalyse

Die D6-defizienten-Tiere zeigten eine ausgeprägte Verschlechterung der Albuminurie als Hinweis auf eine verstärkte glomeruläre Schädigung nach Gabe des nephrotoxischen Serums. Daher wurden als nächstes die renalen Funktionsparameter im Serum bestimmt, um zu überprüfen, ob eine stärkere Nierenfunktionsverschlechterung im D6-/- Genotyp vorlag. Die Analyse der Serumproben beider Versuchstiergruppen erfolgte am Ende des Experiments am Tag 14 der Serumnephritis. Als Nierenfunktionsparameter wurden Serum-Harnstoff und Serum-Kreatinin untersucht. Gegebenenfalls erniedrigtes Gesamteiweiß und erhöhtes Cholesterin können auf das Vorliegen eines nephrotischen Syndroms bei chronischer Proteinurie hinweisen.

Es zeigte sich analog zur Albuminurie eine erfolgreiche Induktion des NTN-Modells, das in beiden Genotypen zu einer ausgeprägten Niereninsuffizienz mit deutlich erhöhtem Harnstoff und Kreatinin gegenüber den Normalwerten (--- Linie **Abbildung 17**) führte. Zudem lag in beiden Versuchsgruppen eine deutliche Hypercholesterinämie als Hinweis auf ein sich entwickelndes nephrotisches Syndrom vor. In den D6-defizienten Mäusen waren hierbei die beiden Nierenretentionsparameter Harnstoff und Kreatinin im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren signifikant erhöht, was auf einen höhergradigen Nierenfunktionsverlust hinweist (**Abbildung 17** A, B).
Die Messung des Gesamteiweißes ergab keinen Unterschied zum Normalwert oder zwischen den beiden Gruppen (**Abbildung 17** C). Dieses Ergebnis stellt jedoch keinen Widerspruch zur bestehenden starken Albuminurie dar, da eine möglicherweise vorliegende Hypoalbuminämie bei der Messung des Gesamteiweißes durch eine kompensatorisch erhöhte Proteinsynthese oder ausgeschüttete Entzündungsproteine maskiert worden sein könnte.

Beide Versuchstiergruppen zeigten eine signifikante Erhöhung des Cholesterins mit in D6defizienten-Tieren tendenziell höheren Cholesterinspiegeln, jedoch ohne das Erreichen des Signifikanzniveaus (**Abbildung 17** D).



Abbildung 17: Die Nierenfunktionsparameter in Wildtyp(WT) und D6-/- Mäusen am Tag 14 der NTN.

WT-Tiere entwickelten eine signifikante Erhöhung von Harnstoff- (A) und Kreatinin- (B) und Cholesterinspiegeln (D) im Vergleich zu unbehandelten Tieren (- - -). In D6-defizienten Tieren war der Anstieg von Harnstoff (A) und Kreatinin (B) signifikant höher, das Cholesterin tendenziell höher (D) als in der WT-Gruppe. Bei der Messung des Gesamtproteins im Blut bestand zwischen beiden Gruppen kein Unterschied zum Normalwert (C). Die Messung erfolgte aus dem Serum am Tag 14 der NTN. Die - - Linie zeigt die Normalwerte unbehandelter C57BL/6-Wildtyptiere. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD, n=7 je Gruppe, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

### 3.1.3 Histologische Auswertung

Nachdem die Nierenfunktionsparameter ebenfalls auf eine verstärkte renale Schädigung in D6-defizienten Mäusen hindeuteten, erfolgte im nächsten Schritt die histologische Untersuchung der Nieren, um einen korrelierenden strukturellen Schaden festzustellen.

Die *PAS-Färbung* diente zum Nachweis glomerulärer Matrixablagerung und Sklerose. Hierbei wurde eine semiquantitative Auswertung mithilfe eines glomerulären Sklerose-Scores (siehe Kapitel 2.4.1) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die D6-defizienten Tiere eine stärkere Matrixdeposition mit signifikant höherem Sklerose-Score als die Wildtypkontrollgruppe aufwiesen (**Abbildung 18** A). Analog dazu verhielt es sich mit der glomerulären Fibrinanlagerung als Zeichen der fibrinoiden Nekrose, die in D6-Knockout-Tieren ebenfalls signifikant höher ausfiel als in den Wildtyp-Tieren (**Abbildung 18** B).

In der Immunfluoreszenzfärbung mit *WT1/Nephrin* zeigte sich im D6-/- Genotyp mit durchschnittlich 6 Podozyten pro Glomerulus ein signifikant höherer Podozytenverlust im Vergleich zu der Wildtyp-Kontrollgruppe, die im Schnitt noch 9 Podozyten aufwiesen (**Abbildung 18** C). Als weiterer glomerulärer Schadensmarker folgte die Untersuchung der Proteinexpression von Nephrin, die durch den prozentualen Nephrin-positiven Flächenanteil pro Glomerulus erfasst wurde. Die Menge des gemessenen Nephrins fiel in D6-defizienten Tieren signifikant geringer aus als in den Wildtyp-Gruppe, was ebenfalls auf eine verstärkte Podozytenschädigung in D6-defizienten Tieren hinweist (**Abbildung 18** D).

Die Erfassung der sekundären tubulointerstitiellen Schädigung erfolgte in der *PAS-Färbung* durch die Quantifizierung von tubulären Eiweißzylindern pro Gesichtsfeld und die Erfassung der tubulären Dilatation sowie der interstitiellen Matrixvermehrung mittels der im Methodenteil beschriebenen semiquantitativen Scores (siehe Kapitel 2.4.1). Mit allen drei Parametern wurde eine signifikant höhere Schädigung im Tubulointerstitium der D6-defizienten Tiere gemessen (**Abbildung 19** A, B, C). Dieses Ergebnis wurde durch die ELISA-Messung des tubulären Schadensmarkers KIM-1 im Gesamtnierenprotein bestätigt (**Abbildung 19** D).

Zusammengefasst zeigten die D6-defizienten Tiere in der histologischen Untersuchung, passend zu den verschlechterten funktionellen Parametern, anhand der erhöhten Glomerulosklerose, der vermehrten Fibrinablagerung und des vermehrten Podozytenverlusts mit verminderter Nephrinexpression eine insgesamt stärkere glomeruläre Schädigung als die Wildtyp-Tiere. Analog dazu wurde auch im Tubulointerstitium des D6-/- Genotyps eine stärkere Schädigung durch die höhere Anzahl an tubulären Zylindern, stärkere tubuläre Dilatation, vermehrte interstitielle Matrixablagerung und vermehrte Expression des tubulären Schadenmarkers KIM-1 festgestellt.

52





In D6-defizienten Tieren waren alle gemessenen Parameter der glomerulären Schädigung signifikant erhöht gegenüber den Wildtyp-Tieren. Es zeigte sich ein erhöhter glomerulärer Sklerose-Score (**A**) in der *PAS-Färbung*, sowie eine vermehrte fibrinoide Nekrose (**B**) in der *Fibrinogenfärbung*. Mithilfe der *WT1/Nephrin* Immunfluoreszenzhistologie wurde eine verminderte Podozytenanzahl (**C**) und Nephrin expression (**D**) pro Glomerulus festgestellt. Die ---Linie zeigt die Normalwerte unbehandelter C57BL/6-Wildtyp-Tiere. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD, n=7 je Gruppe, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

53



Wildtyp

#### Abbildung 19: Histologische Auswertung des tubulointerstitiellen Schadens der NTN.

Es wurden in der PAS-Färbung die Anzahl der tubulären Zylinder pro Gesichtsfeld (400x) (A), der tubuläre Dilatation-Score (B) und der interstitielle Matrix-Score (C) gemessen. Die D6-defizienten Tiere zeigten in allen histologischen Parametern der tubulointerstitiellen Schädigung signifikant höhere Messwerte als die Wildtyp-Gruppe. Analog dazu war die renale Proteinexpression des tubulären Schadensmarkers KIM-1 im D6-/- Genotyp signifikant erhöht (D). Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD, n=6 je Gruppe, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

### 3.1.4 Nachweis der renalen Leukozyteninfiltration

Die Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltration am Tag 14 des NTN-Modells erfolgte zunächst mithilfe der Durchflusszytometrie. Hierzu wurde aus dem Gesamtnierengewebe eine Einzelzell-Suspension hergestellt, mit Antikörpern gegen verschiedene leukozytäre Oberflächenmarker (CD45, CD3, CD4, CD8, F4/80, CD11c) gefärbt und schließlich durch-flusszytometrisch analysiert. Die Anzahl der Leukozyten wurde ins Verhältnis zur Gesamtzahl der Nierenzellen gesetzt.

Der Anteil der mit dem Pan-Leukozytenmarker CD45<sup>+</sup> gefärbten Zellen an den Gesamtnierenzellen betrug in der Wildtyp-Gruppe 15%, während er in D6-defizienten Tieren mit 22% signifikant höher ausfiel (**Abbildung 20**). Analog dazu waren CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit einem Anteil von 7,5% in D6-defizienten Tieren gegenüber 4% in Wildtyp-Tieren beinahe verdoppelt. Bei genauerer Analyse der T-Zellpopulationen fiel auf, dass im D6-/- Genotyp nur der Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant erhöht war. Bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen hingegen bestand mit je 1% kein Unterschied zwischen den beiden Versuchstiergruppen.





In D6-defizienten Tieren war eine signifikant höhere Leukozyteninfiltration, sowie vermehrte Anzahl an CD4<sup>+</sup>T-Zellen zu messen. Es wurden pro Probe 100.000 Einzelzellen in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD, n=7 je Gruppe, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

Renale mononukleäre Phagozyten, zu denen Makrophagen und dendritische Zellen gezählt werden, spielen eine wichtige Rolle in Nierenerkrankungen [73] und wurden daher ebenfalls in der Durchflusszytometrie mithilfe der beiden Oberflächenmarker F4/80 und CD11c analysiert.

Es zeigte sich hierbei, dass in D6-defizienten Tieren der Anteil an F4/80<sup>+</sup> renalen Phagozyten mit durchschnittlich 13% signifikant höher als in den Wildtyp-Tieren lag, wo der Anteil lediglich 8% betrug. Ebenso war der Anteil der CD11c<sup>+</sup> Phagozyten mit 13% in den D6defizienten Tieren gegenüber 8% in der Wildtyp-Kontrollgruppe signifikant erhöht (**Abbildung 21**).

In der genaueren Subgruppen-Analyse waren analog dazu die CD11c<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup> Zellen, die klassischen dendritischen Zellen entsprechen, in den D6-defizienten Tieren mit 3% gegenüber 2% in Wildtyp-Gruppe signifikant erhöht. Bei den F4/80<sup>+</sup> CD11c<sup>-</sup> Zellen, die Makrophagen entsprechen, zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung in der D6-Knockout-Gruppe, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die verschlechterten funktionellen Parameter und der vermehrte renale Gewebsschaden in nephritischen D6-defizienten Mäusen mit einer vermehrten renalen Leukozyteninfiltration einhergehen.



# Abbildung 21: Auswertung der renalen Infiltration mononukleärer Phagozyten am Tag 14 der NTN.

In D6-defizienten Tieren war eine signifikant höhere renale Infiltration von  $F4/80^+$  sowie CD11c<sup>+</sup> Phagozyten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe messbar. Insbesondere waren die dendritischen Zellen (CD11c<sup>+</sup>/F4/80<sup>-</sup>) signifikant erhöht. Es wurden pro Probe 100.000 Einzelzellen in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD, n=7 je Gruppe, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

# 3.1.5 Kompartiment-spezifische Leukozyteninfiltration

Nachdem in der Durchflusszytometrie eine erhöhte renale Leukozyteninfiltration in nephritischen D6-defizienten Tieren festgestellt wurde, sollte dieses Ergebnis in der immunhistologischen Untersuchung bestätigt und Kompartiment-spezifisch zwischen glomerulärer und tubulointerstitieller Zelleinwanderung differenziert werden.

In der *CD3-Färbung* zeigte sich in den Glomeruli beider Versuchstiergruppen kein Unterschied in der T-Zell Infiltration (**Abbildung 22** A). Im Gegensatz dazu war im Interstitium der D6-defizienten Tiere eine Verdopplung der T-Zellen im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe festzustellen (**Abbildung 22** B).

Die Infiltration der Makrophagen wurde im Glomerulus mit der *Mac2-Färbung* und im Tubulointerstitium mithilfe der *F4/80-Färbung* bestimmt. Analog zu den T-Zell-Daten wurde hierbei festgestellt, dass in der glomerulären Infiltration der Mac2-positiven-Makrophagen kein Unterschied zwischen beiden Versuchstiergruppen bestand (**Abbildung 22** C). Hingegen zeigte sich im Interstitium des D6-/- Genotyps ein signifikant höherer Anteil an F4/80positiven Makrophagen als in der Wildtyp-Gruppe (**Abbildung 22** D).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die erhöhte renale Anzahl an Leukozyten im D6-/- Genotyp durch eine vermehrte interstitielle Infiltration verursacht wird. Hierbei zeigte sich eine Erhöhung sowohl der interstitiellen T-Zell- als auch der interstitiellen Makrophageninfiltration in D6-defizienten Tieren. Es bestand trotz des vermehrten glomerulären Schadens im D6-/- Genotyp kein Unterschied zwischen dem Ausmaß der glomerulären Infiltration beider Leukozytenpopulationen.



Abbildung 22: Glomeruläre und tubulointerstitielle Infiltration renaler T-Zellen und Makrophagen am Tag 14 der NTN.

Die Quantifizierung der T-Zellen erfolgte durch das Auszählen von 20 Gesichtsfeldern bzw. 50 Glomeruli pro Tier. Die Makrophagen wurden als Anteil der Mac2<sup>+</sup>-Fläche pro Glomerulus bzw. interstitiell als F4/80<sup>+</sup>-Fläche pro Gesichtsfeld (400x) berechnet. In D6-defizienten Tieren zeigte sich eine signifikante Erhöhung der T-Zellen und Makrophagen im Interstitium (**B**, **D**), jedoch nicht im Glomerulus (**A**, **C**). Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD, n=7 je Gruppe, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 GF = Gesichtsfeld, n.s. = nicht signifikant.

### 3.1.6 Expression von renalen Entzündungsmediatoren

Die renale mRNA-Expression von CC-Chemokinen, proinflammatorischen Zytokinen und weiteren Entzündungsmediatoren wurde mithilfe einer quantitativen PCR in nephritischen Nieren beider Genotypen am Tag 14 des NTN Modells untersucht.

Dies waren im Einzelnen die Chemokine CCL2, CCL3, CCL5 sowie die Zytokine Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF), Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), Transforming-Growth-Faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Macrophage scavenger receptor-1 (MSR-1) und die NO-Synthase (iNOS). Zur Kontrolle des Genotyps wurde ebenfalls die Expression von D6 in beiden Gruppen untersucht.

Nach der Auswertung war erwartungsgemäß in D6-defizienten Tieren keine D6-Expression nachzuweisen. Hinsichtlich der Entzündungsmediatoren zeigte sich in D6-defizienten Tieren eine signifikant höhere Menge an CCL2 und IL-6 (**Abbildung 23**). Bei CCL5 und MSR-1 wurde das Signifikanzniveau bei einem p-Wert von 0,07 bzw. 0,09 knapp nicht erreicht. Bei den übrigen Mediatoren war ebenfalls insgesamt eine tendenziell höhere Expression in den nephritischen Nieren der D6-defizienten Versuchstiere im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe festzustellen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass die stärkere renale Schädigung in D6-defizienten Tieren mit einer höheren Expression proinflammatorischer Mediatoren einhergeht.





### 3.1.7 Chemokinkonzentrationen in der Niere

Der atypische Chemokinrezeptor D6 ist in der Lage eine Vielzahl an proinflammatorischen CC-Chemokinen zu internalisieren und intrazellulär zu degradieren (siehe Kapitel 1.3.4). Eine Reduzierung der renalen Chemokinmenge durch D6 könnte die renale Entzündungsreaktion begrenzen und entsprechend die D6-Defizienz durch geringeren Chemokinabbau eine verstärkte Leukozyteninfiltration und renale Schädigung bewirken. Deshalb sollte der Einfluss von D6 auf den renalen Chemokingehalt am Tag 14 des NTN Modells untersucht werden. Hierzu wurde die renale Proteinkonzentration von CCL2/MCP1 und CCL5/RANTES als wichtige Vertreter der CC-Chemokinfamilie bestimmt.

Es zeigten sich in der ELISA-Messung in D6-defizienten Tieren signifikant höhere renale Konzentrationen beider proinflammatorischer Chemokine CCL2 und CCL5 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis lässt sich mit einem Chemokinabbau durch D6 und mit der vermehrten Chemokin-vermittelten renalen Leukozyteninfiltration und der verstärkten renalen Schädigung in D6-defizienten Mäusen vereinbaren.





Es wurde die Proteinkonzentrationen der proinflammatorischen Chemokine CCL2 (A) und CCL5 (B) gemessen. Die D6-defizienten Tiere zeigten hierbei signifikant höhere Proteinmengen der analysierten CC-Chemokine im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Die Messung erfolgte mittels ELISA aus dem isolierten Gesamtnierenprotein. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD, n=5 je Gruppe, \* p < 0,05, \*\* p< 0,01.

### 3.1.8 Chemokinkonzentration im Serum

Vorstudien [62] haben gezeigt, dass die vermehrte Entzündungsreaktion in D6-defizienten Tieren neben den erhöhten Chemokinspiegeln im entzündeten Gewebe (siehe Kapitel 3.1.7) zusätzlich auch mit erhöhten Serumchemokinspiegeln einhergeht. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von D6 auf die Chemokinkonzentration im Serum am Tag 14 des NTN Modells untersucht. Hierzu wurde exemplarisch die Serumkonzentration von CCL2/MCP1 als wichtigen Vertreter der CC-Chemokinfamilie bestimmt.

Wir konnten mittels einer ELISA-Messung in D6-defizienten Tieren eine signifikant höhere Konzentration des proinflammatorischen Chemokins CCL2/ MCP1 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrollgruppe nachweisen. Dieses Ergebnis lässt sich in Einklang mit den Vorstudien bringen und deutet möglicherweise auf eine insgesamt höhere systemische Entzündungsreaktion in D6-Defizienten Tieren hin.



#### Abbildung 25: Serumkonzentration von CCL2 am Tag 14 der NTN.

Es wurde die Serumkonzentrationen des proinflammatorischen Chemokins CCL2 gemessen. Die D6defizienten Tiere zeigten hierbei signifikant höhere Serum-CCL2 Spiegel als die Wildtyp-Tieren. Die Messung erfolgte mittels ELISA aus dem Serum. Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD, n=5 je Gruppe, \* p < 0,05.

## 3.1.9 Analyse der Leukozyten im Vollblut

Im Krankheitsmodell der *M. tuberculosis*-Infektion konnte gezeigt werden, dass die D6-Defizienz neben den Serumchemokinspiegeln auch die Zahl zirkulierender Leukozyten im Blut beeinflusst [62]. Weiterhin ist bekannt, dass D6 einen Einfluss auf Ly6C<sup>+</sup> proinflammatorische Monozyten hat [67]. Daher wurde am Versuchsende des NTN Modells das Vollblut beider Gruppen mit den entsprechenden leukozytären Oberflächenmarkern gefärbt und mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Es zeigte sich im Vollblut von D6-defizienten Tieren eine signifikante Erhöhung der Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten gegenüber den Wildtyp-Tieren (**Abbildung 26**). Bei genauerer Subpopulationsanalyse der Monozyten, zeigte sich, dass hierbei die Ly6C<sup>+</sup>proinflammatorischen Monozyten signifikant erhöht waren.

Zusammenfassend deuten auch diese Ergebnisse auf eine vermehrte systemische Inflammation in D6-defizienten Tieren, welche neben höheren Spiegeln proinflammatorischer Chemokine auch mit einer erhöhten Anzahl an Leukozyten, Lymphozyten und der inflammatorischen Monozyten einhergeht.





Die durchflusszytometrische Analyse des Vollbluts zeigte eine signifikante Erhöhung der peripher zirkulierenden Lymphozyten, Leukozyten und der Monozyten in D6-defizienten Tieren. Bei Analyse der monozytären Subpopulation zeigte sich insbesondere eine Erhöhung der Ly $6C^+$ -proinflammatorischen Monozyten in D6-defizienten Tieren. Es wurden pro Probe 100.000 Einzelzellen in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SEM, n=10 je Gruppe, \* p < 0,05.

### 3.1.10 Nachweis der autologen Antikörperbildung

Der Nachweis einer autologen Antikörperbildung im Rahmen der spezifischen humoralen Immunantwort fand durch die Messung der im Blutkreislauf zirkulierenden Anti-Schaf-IgG-Antikörper mithilfe eines IgG-ELISA statt. Die Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis erfolgte durch die intravenöse Injektion des nephrotoxischen Schaf-Serums. Die gegen Schaf-IgG vorimmunisierten Versuchstiere sollten daher im Rahmen der adaptiven Immunantwort nach kurzer Zeit Antikörper gegen das zugeführte und im Glomerulus abgelagerte Fremdantigen, in diesem Fall das Schaf-IgG, entwickeln. Diese Antikörper spielen eine wichtige Rolle in der autologen Phase der NTN und sorgen für eine verstärkte Immunkomplexbildung (siehe Kapitel 1.2.3).

In beiden Versuchstiergruppen konnten Antikörper gegen das Schaf-IgG nachgewiesen werden (**Abbildung 27**). Es bestand eine Tendenz zu höheren IgG-Titern in D6-defizenten Tieren, jedoch ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen vorlag. Somit hat in beiden Genotypen eine erfolgreiche und vergleichbare adaptive Immunantwort mit autologer Antikörperbildung stattgefunden.





In beiden Versuchstiergruppen fand eine adaptive humorale Immunantwort mit Bildung von anti-Schaf-IgG-Antikörpern statt. Die Antikörper-Menge war zwischen den Genotypen vergleichbar mit einer Tendenz zu höheren Titern in D6-defizienten Tieren. Zur Messung wurden Serumproben vom Tag 14 in mehreren Stufen (1:100/1:200/1:400/1:800) verdünnt und mittels ELISA anti-Schaf-IgG nachgewiesen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD, n=8 je Gruppe, OD = optische Dichte.

# 3.1.11 Glomeruläre Immunkomplex- und Komplementablagerung

Des Weiteren wurde die Ablagerung von autologen murinen Immunglobulinen und Komplement entlang der glomerulären Basalmembran verglichen, um etwaige Unterschiede zwischen den beiden Versuchstiergruppen zu erkennen, die auf eine unterschiedliche primäre immunologische Schädigung im Glomerulus hinweisen könnten.

Es wurde eine immunhistologische *Immunglobulin-G-* bzw. *C3-Komplement*-Färbung verwendet und der gefärbte Anteil zur gesamten glomerulären Fläche ins Verhältnis gesetzt (**Abbildung 28**). In beiden histologischen Untersuchungen war kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der autologen IgG- und Komplementablagerung zwischen beiden Genotypen festzustellen, die eine unterschiedliche Schädigung der Nieren erklären könnte.

Insgesamt zeigen diese Daten, dass die Verschlechterung der Serumnephritis in D6defizienten Tieren nicht auf einer primär verstärkten humoralen Immunantwort beruht, sondern mit der lokal erhöhten Chemokinkonzentration und vermehrten renalen Leukozyteninfiltration korreliert.



# Abbildung 28: Glomeruläre Ablagerung von autologem murinem IgG und Komplement am Tag 14 der NTN.

Es zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen hinsichtlich der IgG- (**A**) bzw. C3-Komplemenablagerung (**B**) entlang der glomerulären Basalmembran. Es wurde der Anteil der Färbung an der glomerulären Gesamtfläche gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SD, n=6 je Gruppe.

# 3.1.12 Analyse der lokalen und systemischen T-Zell-Aktivierung

Die Expression des D6-Rezeptors wurde in verschiedenen Organen und Geweben nachgewiesen (siehe Kapitel 1.3.4). Dabei wird insbesondere eine Expression von D6 auf lymphatischen Endothelzellen beschrieben [49], so dass der Rezeptor, neben einer Reduktion der Chemokinkonzentration im Organparenchym, durch den lokalen Abbau von Chemokinen im Bereich der drainierenden Lymphkapillaren die zelluläre Obstruktion der Lymphwege durch Akkumulation aktivierter Leukozyten verhindert. Zudem wird durch D6 der Efflux aktivierter dendritischer Zellen in die regionalen Lymphknoten gewährleistet und dort eine Antigenpräsentation mit Induktion der adaptiven Immunantwort ermöglicht [74].

Daher sollte der Einfluss einer D6-Defizienz auf die T-Zell Aktivierung im NTN-Modell untersucht werden. Um etwaige Unterschiede zwischen der systemischen und lokalen Aktivierung festzustellen, wurden T-Zellen in der Milz und den loko-regionären Lymphknoten mithilfe des Aktvierungsmarkers *CD*69 in der Durchflusszytometrie analysiert [75].

Die Untersuchung der Milz zeigte, dass kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen hinsichtlich der systemischen Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestand (**Abbildung 29** A). Im Gegensatz dazu war in den Lymphknoten der D6-defizienten Mäuse sowohl die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen signifikant erniedrigt im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe (**Abbildung 29** B).

Die Daten zeigen, dass auch im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis die D6-Defizienz die adaptive zelluläre, nicht jedoch humorale Immunantwort reduziert. Dies führt jedoch, bei gleichzeitig erhöhtem renalen Chemokingehalt und vermehrter renaler Leukozyteninfiltration, nicht zu einer verminderten renalen Entzündung.



#### Abbildung 29: Analyse der systemischen und lokalen T-Zell-Aktivierung im NTN Modell.

 $CD4^{+}$  bzw.  $CD8^{+}$  T-Zellen aus der Milz (**A**) und aus lokoregionären Lymphknoten (**B**) wurden am Tag 14 der NTN mithilfe des Aktivierungsmarkers CD69 durchflusszytometrisch untersucht. In beiden Genotypen lagen keine Unterschiede in der systemischen T-Zellaktivierung in der Milz vor (**A**). Im Gegensatz hierzu war die lokale T-Zellaktivierung im Lymphknoten in D6-defizienten Tieren signifikant vermindert im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (**B**). Es wurden pro Probe 50.000 Events gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SD, n=10, \*p < 0,05, \*\* p < 0,01.

# 3.2 CCL2/MCP-1 Ausschüttung nach TNF-Stimulation

Aus *in-vitro* Untersuchungen ist bekannt, dass alle intrinsischen Nierenzellen nach entsprechender Stimulation in der Lage sind, Chemokine zu produzieren. Als Stimulantien wirken proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1- $\beta$  oder TNF, für die auch eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der NTN belegt ist. In der Regel erfolgt nach einer derartigen Stimulation innerhalb von Minuten bis Stunden ein rapider Anstieg der Chemokinproduktion, der dann über einen Zeitraum von 24-48 Stunden anhält.

Um die Ursachen des vermehrten intrarenalen Chemokingehalts in D6-defizienten Mäusen mit NTN genauer zu charakterisieren, sollte der Einfluss des D6-Rezeptors auf die Chemokinausschüttung von TNF-stimulierten Nierenzellen in der Zellkultur, und zwar unabhängig von vermehrt infiltrierenden Leukozyten während der NTN, untersucht werden. Von besonderem Interesse war dabei die kompartimentspezifische Analyse der Glomeruli und des Tubulointerstitiums. Für die Separation der beiden Gewebekompartimente wurde das paramagnetische Isolationsverfahren nach Takemoto et al. [71] verwendet (siehe Kapitel 2.6.3). Damit wurden aus Wildtyp- und D6-defizienten-Tieren Glomeruli und Tubulointerstitium separat isoliert und für 24 Stunden in der Zellkultur inkubiert. Nach Stimulation der Zellen mit TNF für weitere 24 Stunden wurde im Überstand die CCL2/MCP-1-Konzentration bestimmt. Nichtstimulierte Glomeruli und tubulointerstitielles Gewebe aus Wildtyp- und D6-defizienten Mäusen zeigten eine minimale, vergleichbare CCL2-Expression (Abbildung 30 A, B, Ø TNF). Nach der 24-stündigen **TNF-Stimulation** zeigte sich eine deutliche CCL2/MCP-1-Sekretion im tubulointerstitiellen Gewebe beider Genotypen. Hierbei war die CCL2/MCP-1-Konzentration im tubulointerstitiellen Überstand von D6-defizienten Mäusen signifikant höher als in den Wildtyp-Tieren (Abbildung 30 B). Im Gegensatz hierzu bildeten Glomeruli nach TNF-Stimulation deutlich vermehrte, jedoch in beiden Genotypen vergleichbare Mengen an CCL2/MCP-1 (Abbildung 30 A). Diese Daten korrelieren mit den histologischen Befunden, die im D6-/- Genotyp eine vermehrte interstitielle, jedoch nicht glomeruläre Leukozyteninfiltration nachwiesen und lassen sich gut mit der bekannten Expression von D6 in lymphatischen Endothelzellen des renalen Interstitiums und einer fehlenden glomerulären Expression erklären.

Insgesamt weisen diese *in-vitro* Untersuchungen darauf hin, dass der vermehrte renale Chemokingehalt in D6-defizienten Tieren im Verlauf der NTN primär durch ein Fehlen des D6-vermittelten Chemokinabbaus im Tubulointerstitium bedingt ist, unabhängig von der zusätzlich im Verlauf verstärkten renalen Infiltration von ebenfalls Chemokin-bildenden Leukozyten in D6-defizienten Tieren.



#### Abbildung 30: Kompartimentspezifische CCL2/MCP-1 Ausschüttung.

Paramagnetisch isolierte Glomeruli (10.000 pro Niere) und Tubulointerstitium (normiert mittels Proteingehaltanalyse) wurden in Zellkultur für 24 Stunden mit TNF stimuliert und anschließend jeweils die CCL2/MCP-1 Konzentrationen des Überstandes im ELISA bestimmt. Es zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der glomerulären CCL2/MCP-1-Ausschüttung (A). In D6-defizienten Tieren war jedoch die gemessene CCL2/MCP-1-Sekretion im Tubulointerstitium signifikant höher als in der Wildtyp-Kontrollgruppe (B). Die Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SD, n=5 je Gruppe, \* p < 0,05.

# **4** Diskussion

Chemokine und ihre Rezeptoren spielen eine Schlüsselrolle in der Leukozytenmigration, sowohl in homöostatischen als auch in entzündlichen Verhältnissen [23]. Ihre korrekte Regulation der Immunantwort im Rahmen einer Entzündungsreaktion ist essentiell für die Vermeidung inflammatorischer und autoimmunologischer Erkrankungen [24]. Zuletzt ist eine neue Familie von Chemokinrezeptoren entdeckt worden, die aufgrund ihrer fehlenden Signaltransduktion als "atypische Chemokinrezeptoren" bezeichnet werden und eine entscheidende Rolle in der Begrenzung der Entzündungsreaktionen *in-vivo* spielen [29, 43, 44].

Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Rolle des atypischen Chemokinrezeptors D6 im Modell einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis, der nephrotoxischen Serumnephritis der Maus zu charakterisieren. Aus der Literatur ist bekannt, dass D6 in vielen Organsystemen auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert und dort funktionell verschiedene proinflammatorische CC-Chemokine internalisiert, um sie dann intrazellulär zu degradieren [48, 49]. D6 wird daher häufig als sog. Decoy- oder Scavenger-Rezeptor (Köder- bzw. Fangrezeptor) bezeichnet und ihm wird eine entzündungshemmende Rolle zugesprochen. In tierexperimentellen Studien diverser Krankheitsmodelle konnte diese Funktion weitestgehend bestätigt [56, 59], in manchen Modellen jedoch auch nicht belegt werden [66]. Tatsächlich scheint, neben der durch den Chemokinabbau bewirkten Entzündungshemmung, D6 durch Reduktion der auf lymphatischen Endothelzellen präsentierten Chemokinen den Efflux aktivierter dendritischer Zellen aus parenchymatösen Organen in lokoregionäre Lymphknoten zu gewährleisten. Dort kann anschließend eine effektive T-Lymphozyten-Stimulation als Voraussetzung einer adaptiven Immunantwort erfolgen, die in D6-defizienten Tieren reduziert ist [66]. Dies erklärt, weshalb Erkrankungen, deren Induktion von einer effektiven adaptiven Immunreaktion abhängen, in D6-defizienten Mäusen auch abgeschwächt ablaufen können [66].

Es gab allerdings bisher keine Studien, die sich mit der Rolle von D6 im Rahmen immunologischer Nierenentzündung befassten. Ausgehend vom aktuellen Wissensstand lag der vorliegenden Arbeit die Hypothese zu Grunde, dass durch den Ausfall der Chemokinabbauenden Funktion bei D6-Defizienz die renale Entzündungsreaktion im Rahmen einer Glomerulonephritis zunimmt und es somit zu einer Verschlechterung der nephrotoxischen Serumnephritis kommt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle von D6 im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis *in-vivo* untersucht, im zweiten Teil die zugrundeliegenden Mechanismen weiter charakterisiert. Im Folgenden werden wichtige Ergebnisse interpretiert und diskutiert.

71

# 4.1 Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur

# 4.1.1 D6-Knockout Mäuse entwickeln eine vermehrte Proteinurie und Niereninsuffizienz durch stärkeren glomerulären und tubulären Schaden

Die D6-defizienten Mäuse entwickelten im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis nach 14 Tagen eine stärker ausgeprägte Proteinurie, die auf eine stärkere Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere hinweist (Abbildung 16). Hiermit korrelierte die histologische Erfassung einer stärkeren Glomerulosklerose und fibrinoiden Nekrose sowie eine signifikant verringerte Podozytenanzahl und Nephrinmenge pro Glomerulus im D6-/- Genotyp (Abbildung 18). Zudem lag in D6-defizienten Mäusen eine ausgeprägtere Niereninsuffizienz mit einem signifikant stärkeren Anstieg der beiden Nierenretentionswerte Harnstoff und Kreatinin gegenüber der Wildtyp-Kontrollgruppe vor (Abbildung 17). Beide Parameter korrelieren mit einer beeinträchtigten Funktion des renalen Tubulussystems, was sich zusätzlich durch die Messung des tubulären Schadensmarkers KIM-1 bestätigen ließ (Abbildung 19). Dieses Ergebnis stützend zeigte auch die histologische Auswertung in D6-defizienten Tieren eine erhöhte tubulointerstitielle Schädigung mit vermehrter Anzahl an tubulären Proteinzylindern, ausgeprägter tubulärer Dilatation und stärkerer interstitieller Matrixvermehrung (Abbildung 19). Diese Verschlechterung der Organfunktion und der vermehrte morphologische Schaden in D6-defizienten Mäusen stehen im Einklang mit den bisherigen experimentellen Studien in anderen parenchymatösen Organen. So konnten Berres et al. im in-vivo Modell des akuten Leberversagens ebenfalls eine stärkere Leberinsuffizienz in D6defizienten Tieren nachweisen [76]. Auch im Modell des akuten Myokardinfarkts berichten Cochain et al. von einer Funktionsverschlechterung mit vermehrter linksventrikulärer Dilatation, häufigerer Herzruptur und verringerter Ejektionsfraktion im D6-/- Genotyp [65].

# 4.1.2 D6 verhindert durch Chemokin-Degradierung eine übermäßige renale Leukozytenakkumulation im tubulointerstitiellen Kompartiment

Durchflusszytometrisch konnte eine vermehrte renale Leukozyteninfiltration im D6-Knockout als eine mögliche Erklärung der stärkeren renalen Schädigung gezeigt werden (**Abbildung 20, Abbildung 21**). Bei genauerer Untersuchung der einzelnen Zellpopulationen zeigte sich, dass insbesondere die Zahl renaler CD4<sup>+</sup> T-Zellen, Makrophagen und dendritischer Zellen

signifikant erhöht waren. Diese drei Zelltypen spielen eine herausragende Rolle in der Induktion und Progression der nephrotoxischen Serumnephritis [77-80]. Analog dazu wurde in bisherigen Publikationen im D6-/- Genotyp ebenfalls eine stärkere leukozytäre Infiltration und Schädigung von entzündetem Gewebe festgestellt. So wiesen *Whitehead et al.* im T-Helfer-Zell-abhängigen Modell des Ovalbumin-induzierten Asthmas eine signifikant höhere Anzahl an T-Zellen und dendritischen Zellen im entzündeten Lungenparenchym D6defizienter Mäuse nach [61]. Auch *Jamieson et al.* zeigten in einem experimentellen Psoriasis-Modell eine erhöhte Migration von T-Zellen in die Epidermis von D6-defizienten Tieren [55]. Ursächlich hierfür scheint die mangelnde Fähigkeit der D6-Knockout-Tiere zu sein, proinflammatorische CC-Chemokine degradieren zu können [68]. Diese These konnten wir durch die Messung von signifikant erhöhten Protein-Konzentrationen der proinflammatorischen CC-Chemokine CCL2/MCP-1 und CCL5/RANTES im Lysat der Gesamtniere von nephritischen D6-defizienten Mäusen untermauern (**Abbildung 24**).

Die erhöhte renale Leukozyteninfiltration in D6-defizienten Tieren in der Durchflusszytometrie konnte in der immunhistologischen Untersuchung bestätigt und für das glomeruläre und tubulointerstitielle Kompartiment spezifisch ausgewertet werden. So fiel insbesondere auf, dass im D6-/- Genotyp die vermehrte Infiltration auf eine erhöhte Anzahl an T-Zellen und Makrophagen im tubulointerstitiellen Kompartiment zurückzuführen war (**Abbildung 22** B, D). Bei der glomerulären Leukozyteninfiltration gab es hingegen keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchstiergruppen (**Abbildung 22** A, C). Es stellte sich somit die Frage nach der Ursache dieses Kompartiment-spezifischen Ergebnisses. Dieser Frage wurde in *in-vitro* Stimulationsexperimenten an der paramagnetisch isolierten glomerulären und tubulointerstitiellen Fraktion aus nicht-nephritischen Nieren nachgegangen (siehe Kapitel 2.6.3, 2.6.4). Nach *in-vitro* Stimulation mit TNF zeigte sich unabhängig von einer leukozytären Zellinfiltration eine signifikant höhere CCL2/MCP-1 Sekretion im Überstand der tubulointerstitiellen Nierenparenchymfraktion des D6-defizienten Genotyps (**Abbildung 30**). Bei der glomerulären Zellfraktion war hingegen kein Unterscheid zwischen den beiden Genotypen festzustellen.

Dieses Ergebnis könnte als Erklärung für eine vermehrte tubulointerstitielle Leukozytenakkumulation dienen. Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass D6 insbesondere auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird [49]. Die renalen Lymphkapillaren befinden sich im Tubulointerstitium, jedoch nicht im glomerulären Kompartiment der Niere. Daher ist es schlüssig, dass es im D6-/- Genotyp während der nephrotoxischen Serumnephritis genau hier zu einer erhöhten Chemokinkonzentration und der daraus resultierenden vermehrten Zellinfiltration kommt.

74

Eine verstärkte tubulointerstitielle Entzündung im Verlauf der nephrotoxischen Serumnephritis führt jedoch auch regelhaft zu einer Verschlechterung des glomerulären Schadens [81, 82]. Tatsächlich zeigen die vorgelegten Ergebnisse eine stärkere glomeruläre Schädigung mit vermehrter Proteinurie in D6-defizienten Mäusen, obwohl kein Unterschied zu der Wildtyp-Gruppe hinsichtlich der Immunkomplex- und Komplementablagerungen an der glomerulären Basalmembran und der glomerulären Leukozyteninfiltration vorlag.

Die vermehrte tubulointerstitielle Schädigung in D6-defizienten Tieren könnte auch über den tubuloglomerulären Feedback eine Drosselung der Filtrationsrate in erkrankten Nephronen verursachen und durch die kompensatorische Überlastung und Hyperperfusion der noch gesunden Nephrone eine beschleunigte Schädigung und Proteinurie fördern.

Die vermehrte Entzündungsreaktion in den nephritischen Nieren ging mit einer erhöhten renalen Genexpression proinflammatorischer Chemokine und Zytokine einher. Mithilfe der quantitativen PCR-Analyse konnten wir eine signifikant höhere Expression von CCL2 und IL-6, sowie tendenziell höhere Expression weiterer Zytokine wie TNFα, IL-1β, TGF-β und des Makrophagen-Scavenger-Rezeptors MSR-1 im D6-Knockout nachweisen (**Abbildung 23**). Dieses Ergebnis ist gut mit der vermehrten Leukozyteninfiltration und nachfolgend entsprechend vermehrter Expression leukozytärer und lokaler Entzündungsmediatoren vereinbar. Die entzündungshemmende Funktion des D6-Rezeptors ist daher überwiegend auf Proteinebene durch Chemokin-Degradierung und nicht auf der Genexpressionsebene durch reduzierte Bildung proinflammatorischer Mediatoren erklärbar.

Eine weitere Erklärung der verstärkten renalen Entzündung könnte eine insgesamt vermehrte systemische Entzündungsreaktion bei D6-defizientem Genotyp sein. So konnten *Di Liberto et al.* im Tuberkulose-Modell im Serum von D6-defizienten Tieren signifikant höhere Spiegel vieler proinflammatorischer Chemokine und Zytokine wie CCL2, 3, 4, 5, sowie TNF $\alpha$ , IL-1 und IFN $\gamma$  als in Wildtyp-Mäusen messen [62]. Auch wir wiesen signifikant höhere Serumspiegel des proinflammatorischen CCL2 in D6-defizienten Tieren nach (**Abbildung 25**). Das Ergebnis passt zu einer verminderten abbauenden Aktivität für CC-Chemokine in D6-defizienten Mäusen, aber auch zu einer möglichen vermehrten systemischen Entzündung nach Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis in D6-defizienten Tieren. Ein weiterer Hinweis für die vermehrte systemische Inflammation in unserem Nephritis-Modell ist die signifikant höhere Leukozytose und Menge an zirkulierenden Ly6C<sup>+</sup> proinflammatorischen Monozyten in D6-Knockout-Tieren (**Abbildung 26**). Die stärkere glomeruläre Schädigung könnte somit auch durch eine vermehrte systemische Entzündungsreaktion, welche einen erhöhten Zellschaden im glomerulären Kompartiment zur Folge hatte, bedingt sein.

# 4.1.3 D6 ist notwendig für eine effektive lymphatische Leukozytenmigration, Chemokin-Drainage und Antigenpräsentation aus entzündetem Gewebe in lokoregionäre Lymphknoten

Die Expression des atypischen Chemokinrezeptors D6 auf lymphatischen Endothelzellen positioniert ihn an einer wichtigen Schnittstelle zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität [29]. Das ist insofern bedeutsam, da es hierdurch zu einer veränderten Immunantwort mit andersartigem Krankheitsverlauf kommen kann. So konnten Liu et al. im experimentellen Autoimmun-Enzephalitis (EAE)-Modell der Multiplen Sklerose eine verringerte Rückenmarkentzündung und geringere Demyelinisierung in D6-defizienten Tieren feststellen [64], was augenscheinlich einen Widerspruch zu den bisherigen Daten der vermehrten Entzündungsreaktion im D6-/- Genotyp darstellt. Die Autoren sehen die Ursache hierfür in einem reduzierten T-Zell-Priming durch die massive Akkumulation von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen im Injektionsbereich des krankheitsauslösenden "MOG"-Antigens. Abwesenheit von kommt es CC-In D6 zur vermehrten Chemokinkonzentration und einer Leukozytenakkumulation an lymphatischen Eintrittsstellen mit resultierender Behinderung der Lymphdrainage und Migration von Leukozyten in lokoregionale Lymphknoten. Das wiederum reduziert die Effizienz der Antigen-Präsentation (Abbildung 31), der Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen und damit der adaptiven (Auto-) Immunantwort [83].

Um im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis Veränderungen der lokalen und systemischen Immunantwort zu untersuchen, wurde mithilfe der Durchflusszytometrie die T-Zell-Aktivierung einerseits lokal in den lokoregionalen Lymphknoten und andererseits systemisch in der Milz mithilfe des T-Zell-Aktivitätsmarkers CD69 [75] untersucht. Hierbei zeigte sich in D6-defizienten Mäusen am Tag 14 der Serumnephritis eine signifikante Reduktion der T-Zell-Aktivierung sowohl in CD4<sup>+</sup> als auch in CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den lokoregionären Lymphknoten (**Abbildung 29**). Diese Ergebnisse stimmen mit den publizierten Daten einer Lymphwegsobstruktion mit verminderter Lymphdrainage und damit reduzierter Antigenpräsentation durch dendritische Zellen und geringerer Aktivierung von T-Lymphozyten im drainierenden Lymphknoten überein. Die Leukozytenakkumulation und insbesondere die Erhöhung der dendritischen Zellzahl in den Nieren des D6-/- Genotyps lassen sich aus diesem Blickwinkel nicht nur als Folge der vermehrten interstitiellen Chemokinkonzentrationen und Leukozytenrekrutierung deuten, sondern zusätzlich auch als Folge des behinderten lymphatischen Leukozyten-Effluxes aus der Niere erklären.



#### Abbildung 31: Verstärkte Entzündungsreaktion in D6-defizienten Mäusen.

(a) In Wildtyp-Tieren sorgt D6 durch Degradierung der CC-Chemokine für einen freien Lymphabfluss und eine ungehemmte Drainage von Leukozyten, Antigen-präsentierenden-Zellen (APCs) und Zytokinen aus dem entzündeten Gewebe. (b) In D6-defizienten Tieren kommt es durch die erhöhte Chemokinkonzentration zu einer massiven Leukozytenakkumulation am lymphatischen Endothel mit Behinderung der lymphatischen Migration von Leukozyten (insbesondere APCs) aus dem Organ in drainierendes lymphatisches Gewebe sowie dem Verbleib von Entzündungsmediatoren im Gewebe. Das führt zu einer stärkeren lokalen Gewebeinflammation, aber einer verringerten Antigenpräsentation in lokalen Lymphknoten. Abb. modifiziert nach [74].

# 4.1.4 D6 beeinflusst nicht die systemische Immunantwort im Modell der nephrotoxischen Serumnephritis

Die verminderte T-Zellaktivierung in lokoregionären Lymphknoten wirft die Frage auf, weshalb es in D6-Knockout Mäusen nicht zu einer verminderten renalen Schädigung kommt, da das nephrotoxische Serumnephritis-Modell von einer effektiven Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung abhängt, die eine ausreichende autologe Immunantwort mit Bildung autologer Antikörper und nephritogener T-Lymphozyten gewährleistet [20, 84].

Im Gegensatz zum Modell der experimentellen Autoimmun-Enzephalitis [66], in dem die Schädigung im D6-Genotyp bei verminderter Autoimmunität verringert war, entwickelten die D6-defizienten Tiere im nephrotoxischen Serumnephritis-Modell tatsächlich trotz der geringeren Immunantwort in lokoregionären Lymphknoten eine stärkere renale Schädigung als die Wildtyp-Tiere. Sowohl das EAE-Modell als auch das Nephritis-Modell (Kapitel 2.2.1) sind

#### Diskussion

stark abhängig von der T-Zell Immunantwort, die wiederum eine erfolgreiche Antigen-Präsentation voraussetzt. Entscheidend erscheint jedoch hier die Art und Weise der Antigen-Verabreichung in beiden Modellen. Im EAE Modell erfolgte die alleinige subkutane Gabe des krankheitsauslösenden "MOG"-Antigens, das Modell ist daher durch die D6-Defizienz mit verminderter Antigenpräsentation weitaus stärker betroffen. In unserem Nephritis-Modell fand ebenfalls vorab eine subkutane Präimmunisierung mit dem Schaf-IgG statt, bei der die Antigenpräsentation durch die D6-Defizienz behindert sein könnte. Das krankheitsauslösende nephrotoxische Schafserum wird jedoch intravenös verabreicht und gelangt daher über den Blutkreislauf ungehindert zu den wichtigen sekundären lymphatischen Organen wie der Milz, um dort systemisch als Fremdantigen eine humorale und zelluläre adaptive Immunantwort auszulösen. Diese These wird durch die Untersuchungen der systemischen Immunantwort im NTN-Modell gestützt. In der Milz zeigte sich keine verminderte T-Zell-Aktivierung in D6-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtyptieren (Abbildung 29). Weiterhin konnte eine erfolgreiche autologe Antikörperbildung in beiden Genotypen, ohne signifikante Unterschiede bezüglich der Menge des gebildeten murinen anti-Schaf-IgGs nachgewiesen werden (Abbildung 27). Es zeigte sich im Gegenteil sogar eine leichte Tendenz zu erhöhten Antikörpertitern in D6-defizienten Tieren, auch wenn in der histologischen Analyse der glomerulären Immunkomplex- und Komplementablagerungen keine Unterschiede zwischen beiden Versuchstiergruppen bestanden (Abbildung 28).

Die Ergebnisse belegen, dass die abgeschwächte lokoregionale Immunantwort nach subkutaner Präimmunisierung in den D6-defizienten Tieren offenbar ausreicht, um nach anschließender intravenöser Gabe des nephrotoxischen Serum eine robuste autologe Immunantwort mit Induktion der nephrotoxischen Serumnephritis auszulösen.

# 4.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der atypische Chemokinrezeptor D6 durch lokalen Abbau proinflammatorischer Chemokine und Reduzierung der renalen Leukozyteninfiltration eine Schlüsselrolle bei der Begrenzung der renalen Entzündungsreaktion im Verlauf einer Immunkomplex-Glomerulonephritis spielt. Seine Funktion in der Niere beschränkt sich nicht nur auf das reine Internalisieren und Degradieren von proinflammatorischen Chemokinen zur Senkung der örtlichen Leukozytenrekrutierung. Vielmehr ermöglicht D6 durch die Expression auf den lymphatischen Endothelzellen der Niere auch einen effektiven Efflux aktivierter Leukozyten und Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und Chemokinen über die Lymphgefäße in lokoregionäre Lymphknoten. Er schafft damit auch die Voraussetzung für eine regelrechte Antigenpräsentation in lokalen Lymphknoten zur Initiierung der adaptiven Immunantwort.

Die Ergebnisse lassen keine Aussagen zu der spezifischen Rolle des leukozytär exprimierten D6 zu, da in unseren D6-Knockout Tieren sowohl auf dem Endothel als auch auf den Leukozyten eine D6-Defizienz bestand. Hierbei könnte die Herstellung von chimären Tieren durch eine Knochenmarkstransplantation eine weitere Differenzierung ermöglichen. Weiterhin sollte die D6-Defizienz im Modell eines primär tubulären Schadens, z.B. dem renalen Ischämie-Reperfusion-Modell, untersucht werden. Zudem könnte eine Untersuchung des Niereninterstitiums und des lymphatischen Gewebes mithilfe der Intravital-Mikroskopie die genauen Mechanismen der leukozytären Akkumulation im Bereich der lymphatischen Kapillaren und ihrer Obstruktion im Rahmen einer Entzündungsreaktion näher charakterisieren.

Die entzündungshemmende Funktion von D6 macht diesen atypischen Chemokinrezeptor zu einem potenziellen Zielmolekül einer antiinflammatorischen, immunmodulierenden Therapie der Glomerulonephritis, die effizienter und nebenwirkungsärmer sein könnte als die derzeitig verfügbaren Behandlungen. Ein denkbares Vorgehen könnte beispielsweise die verstärkte Induktion der D6-Expression im Rahmen einer Entzündung oder die Mobilisierung des intrazellulär gelagerten D6 an die Zelloberfläche sein. Vorstellbar wäre auch die gentechnologische Herstellung eines Fusionsproteins aus D6 und IgG, ähnlich wie es für TNF in Form von *Etanercept* existiert. Ein derartiges chimäres Protein könnte nach Bindung an proinflammatorische Chemokine deren Konzentration im entzündeten Gewebe senken.

Weitere Studien sind somit notwendig, um die Bedeutung von D6 in der Pathogenese entzündlicher Nierenerkrankungen genauer zu charakterisieren und therapeutische Strategien zu entwickeln.

79

# Literaturverzeichnis

1. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. Lancet. 2013;382(9888):260-72.

2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet. 2012;380(9859):2095-128.

3. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, Chavers B, Gilbertson D, Ishani A, et al. United States Renal Data System 2008 Annual Data Report. Am J Kidney Dis. 2009;53(1 Suppl):S1-374.

4. U. Frei H-JS-H. QuaSi-Niere: Nierenersatztherapie in Deutschland Bericht 2006 2007.

5. Jahresbericht der deutschen Stiftung Organtransplantation Organspende und Transplantation in Deutschland 2012.

6. Eggers PW. Has the incidence of end-stage renal disease in the USA and other countries stabilized? Curr Opin Nephrol Hypertens. 2011;20(3):241-5.

7. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie e. V. Statistik der Dialyse im Jahr 2013. http://wwwdgfneu/presse/downloadbereich/dialysehtml.

8. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. Lancet. 2013;382(9889):339-52.

9. Barsoum RS. Chronic kidney disease in the developing world. N Engl J Med. 2006;354(10):997-9.

10. Harrison's principles of internal medicine. 18. ed. ed. New York, N.Y.: McGraw-Hill; 2012.

11. Heitz PU, Böcker W, editors. Pathologie. 5., vollst. überarb. Aufl. ed. München: Elsevier; 2012.

12. Behrends JC, editor. Physiologie. 2., überarb. Aufl. ed. Stuttgart: Thieme; 2012.

13. Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. Nat Rev Immunol. 2013;13(10):738-53.

14. Fogo AB, Cohen AH, Jennette JC, Bruijn JA, Colvin RB, editors. Fundamentals of Renal Pathology. New York, NY: Springer New York; 2006.

15. http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/biochemie/harnapparat/blut\_harn/d-blut\_harn.php. Blut-Harn-Schranke.

16. Elizabeth Hammond, University of Utah, Health Care, Institute of Immunopathology. http://librarymedutahedu/WebPath/IMMHTML/IMM018html.

17. Couser WG. Pathogenesis of glomerular damage in glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant. 1998;13 Suppl 1:10-5.

18. Gomez-Guerrero C, Hernandez-Vargas P, Lopez-Franco O, Ortiz-Munoz G, Egido J. Mesangial cells and glomerular inflammation: from the pathogenesis to novel therapeutic approaches. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2005;4(3):341-51.

19. Masugi M, and Y. Tomizuka. "Über die spezifisch zytotoxischen Veränderungen der Niere und des Leber durch das spezifische Antiserum (Nephrotoxin und Hepatoxin).". Trans Jpn Pathol 21 (1931): 329-341.

20. Hoppe JM, Vielhauer V. Induction and analysis of nephrotoxic serum nephritis in mice. Methods Mol Biol. 2014;1169:159-74.

21. Huang XR, Holdsworth SR, Tipping PG. Evidence for delayed-type hypersensitivity mechanisms in glomerular crescent formation. Kidney Int. 1994;46(1):69-78.

22. Assmann KJ, Tangelder MM, Lange WP, Schrijver G, Koene RA. Anti-GBM nephritis in the mouse: severe proteinuria in the heterologous phase. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1985;406(3):285-99.

23. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu Rev Immunol. 2004;22:891-928.

24. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity. 2000;12(2):121-7.

25. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiyama H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. Genome Biol. 2006;7(12):243.

26. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol Rev. 2000;52(1):145-76.

27. Forster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. Nat Rev Immunol. 2008;8(5):362-71.

28. Schall TJ, Proudfoot AE. Overcoming hurdles in developing successful drugs targeting chemokine receptors. Nat Rev Immunol. 2011;11(5):355-63.

29. Graham GJ, Locati M. Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6. J Pathol. 2013;229(2):168-75.

30. Vielhauer V, Anders HJ, Schlondorff D. Chemokines and chemokine receptors as therapeutic targets in lupus nephritis. Semin Nephrol. 2007;27(1):81-97. Epub 2007/03/06.

31. Javaid B, Quigg RJ. Treatment of glomerulonephritis: will we ever have options other than steroids and cytotoxics? Kidney Int. 2005;67(5):1692-703.

32. Horuk R. Chemokine receptor antagonists: overcoming developmental hurdles. Nat Rev Drug Discov. 2009;8(1):23-33.

33. Anders HJ, Sayyed SA, Vielhauer V. Questions about chemokine and chemokine receptor antagonism in renal inflammation. Nephron Exp Nephrol. 2010;114(2):e33-8. Epub 2009/11/06.

34. Graham GJ. D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. Eur J Immunol. 2009;39(2):342-51.

35. Mantovani A, Bonecchi R, Locati M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. Nat Rev Immunol. 2006;6(12):907-18.

36. Bachelerie F, Ben-Baruch A, Burkhardt AM, Combadiere C, Farber JM, Graham GJ, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. Pharmacol Rev. 2014;66(1):1-79.

37. Bonecchi R, Savino B, Borroni EM, Mantovani A, Locati M. Chemokine decoy receptors: structure-function and biological properties. Curr Top Microbiol Immunol. 2010;341:15-36.

38. Yu S, Crawford D, Tsuchihashi T, Behrens TW, Srivastava D. The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. Dev Dyn. 2011;240(2):384-93.

39. Comerford I, Nibbs RJ, Litchfield W, Bunting M, Harata-Lee Y, Haylock-Jacobs S, et al. The atypical chemokine receptor CCX-CKR scavenges homeostatic chemokines in circulation and tissues and suppresses Th17 responses. Blood. 2010;116(20):4130-40.

40. Leick M, Catusse J, Follo M, Nibbs RJ, Hartmann TN, Veelken H, et al. CCL19 is a specific ligand of the constitutively recycling atypical human chemokine receptor CRAM-B. Immunology. 2010;129(4):536-46.

41. Gardner L, Patterson AM, Ashton BA, Stone MA, Middleton J. The human Duffy antigen binds selected inflammatory but not homeostatic chemokines. Biochem Biophys Res Commun. 2004;321(2):306-12.

42. Nibbs RJ, Wylie SM, Pragnell IB, Graham GJ. Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1alpha receptors, CCR-1, CCR-3, and CCR-5. J Biol Chem. 1997;272(19):12495-504. 43. Nibbs RJ, Wylie SM, Yang J, Landau NR, Graham GJ. Cloning and characterization of a novel promiscuous human beta-chemokine receptor D6. J Biol Chem. 1997;272(51):32078-83.

44. Bonini JA, Martin SK, Dralyuk F, Roe MW, Philipson LH, Steiner DF. Cloning, expression, and chromosomal mapping of a novel human CC-chemokine receptor (CCR10) that displays high-affinity binding for MCP-1 and MCP-3. DNA Cell Biol. 1997;16(10):1249-56.

45. Blackburn PE, Simpson CV, Nibbs RJ, O'Hara M, Booth R, Poulos J, et al. Purification and biochemical characterization of the D6 chemokine receptor. Biochem J. 2004;379(Pt 2):263-72.

46. Bonecchi R, Borroni EM, Anselmo A, Doni A, Savino B, Mirolo M, et al. Regulation of D6 chemokine scavenging activity by ligand- and Rab11-dependent surface up-regulation. Blood. 2008;112(3):493-503.

47. McCulloch CV, Morrow V, Milasta S, Comerford I, Milligan G, Graham GJ, et al. Multiple roles for the C-terminal tail of the chemokine scavenger D6. J Biol Chem. 2008;283(12):7972-82.

48. Weber M, Blair E, Simpson CV, O'Hara M, Blackburn PE, Rot A, et al. The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines. Mol Biol Cell. 2004;15(5):2492-508.

49. Nibbs RJ, Kriehuber E, Ponath PD, Parent D, Qin S, Campbell JD, et al. The beta-chemokine receptor D6 is expressed by lymphatic endothelium and a subset of vascular tumors. Am J Pathol. 2001;158(3):867-77.

50. Hansell CA, Nibbs RJ. The odd couple: innate-like B cells and the chemokine scavenger D6. Cell Cycle. 2011;10(21):3619-20.

51. Hansell CA, Schiering C, Kinstrie R, Ford L, Bordon Y, McInnes IB, et al. Universal expression and dual function of the atypical chemokine receptor D6 on innate-like B cells in mice. Blood. 2011;117(20):5413-24.

52. Rot A, McKimmie C, Burt CL, Pallas KJ, Jamieson T, Pruenster M, et al. Cell-autonomous regulation of neutrophil migration by the D6 chemokine decoy receptor. J Immunol. 2013;190(12):6450-6.

53. Locati M, Torre YM, Galliera E, Bonecchi R, Bodduluri H, Vago G, et al. Silent chemoattractant receptors: D6 as a decoy and scavenger receptor for inflammatory CC chemokines. Cytokine Growth Factor Rev. 2005;16(6):679-86.

54. Nibbs R, Graham G, Rot A. Chemokines on the move: control by the chemokine "interceptors" Duffy blood group antigen and D6. Seminars in Immunology. 2003;15(5):287-94.

55. Jamieson T, Cook DN, Nibbs RJ, Rot A, Nixon C, McLean P, et al. The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. Nat Immunol. 2005;6(4):403-11.

56. Martinez de la Torre Y, Locati M, Buracchi C, Dupor J, Cook DN, Bonecchi R, et al. Increased inflammation in mice deficient for the chemokine decoy receptor D6. Eur J Immunol. 2005;35(5):1342-6.

57. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. Nature. 2008;454(7203):436-44.

58. Nibbs RJ, Gilchrist DS, King V, Ferra A, Forrow S, Hunter KD, et al. The atypical chemokine receptor D6 suppresses the development of chemically induced skin tumors. J Clin Invest. 2007;117(7):1884-92.

59. Bordon Y, Hansell CA, Sester DP, Clarke M, Mowat AM, Nibbs RJ. The atypical chemokine receptor D6 contributes to the development of experimental colitis. J Immunol. 2009;182(8):5032-40.

60. Vetrano S, Borroni EM, Sarukhan A, Savino B, Bonecchi R, Correale C, et al. The lymphatic system controls intestinal inflammation and inflammation-associated Colon Cancer through the chemokine decoy receptor D6. Gut. 2010;59(2):197-206.

61. Whitehead GS, Wang T, DeGraff LM, Card JW, Lira SA, Graham GJ, et al. The chemokine receptor D6 has opposing effects on allergic inflammation and airway reactivity. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(3):243-9.

62. Di Liberto D, Locati M, Caccamo N, Vecchi A, Meraviglia S, Salerno A, et al. Role of the chemokine decoy receptor D6 in balancing inflammation, immune activation, and antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis infection. J Exp Med. 2008;205(9):2075-84.

63. Martinez de la Torre Y, Buracchi C, Borroni EM, Dupor J, Bonecchi R, Nebuloni M, et al. Protection against inflammation- and autoantibody-caused fetal loss by the chemokine decoy receptor D6. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(7):2319-24.

64. Madigan J, Freeman DJ, Menzies F, Forrow S, Nelson SM, Young A, et al. Chemokine scavenger D6 is expressed by trophoblasts and aids the survival of mouse embryos transferred into allogeneic recipients. J Immunol. 2010;184(6):3202-12.

65. Cochain C, Auvynet C, Poupel L, Vilar J, Dumeau E, Richart A, et al. The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(9):2206-13.

66. Liu L, Graham GJ, Damodaran A, Hu T, Lira SA, Sasse M, et al. Cutting edge: the silent chemokine receptor D6 is required for generating T cell responses that mediate experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol. 2006;177(1):17-21.

67. Savino B, Castor MG, Caronni N, Sarukhan A, Anselmo A, Buracchi C, et al. Control of murine Ly6C(high) monocyte traffic and immunosuppressive activities by atypical chemokine receptor D6. Blood. 2012;119(22):5250-60.

68. Cancellieri C, Caronni N, Vacchini A, Savino B, Borroni EM, Locati M, et al. Review: Structurefunction and biological properties of the atypical chemokine receptor D6. Mol Immunol. 2013;55(1):87-93.

69. Avrameas S, Guilbert B. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. Eur J Immunol. 1971;1(5):394-6. Epub 1971/11/01.

70. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 1971;8(9):871-4. Epub 1971/09/01.

71. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. The American journal of pathology. 2002;161(3):799-805.

72. Taubitz A. TNF-Rezeptor 1-und 2-spezifische Entzündungsreaktionen im Glomerulus: Dissertation LMU; 2012.

73. Nelson PJ, Rees AJ, Griffin MD, Hughes J, Kurts C, Duffield J. The renal mononuclear phagocytic system. J Am Soc Nephrol. 2012;23(2):194-203.

74. Lee KM, Nibbs RJ, Graham GJ. D6: the 'crowd controller' at the immune gateway. Trends Immunol. 2013;34(1):7-12.

75. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. Stem Cells. 1994;12(5):456-65.

76. Berres ML, Trautwein C, Zaldivar MM, Schmitz P, Pauels K, Lira SA, et al. The chemokine scavenging receptor D6 limits acute toxic liver injury in vivo. Biol Chem. 2009;390(10):1039-45.

77. Duffield JS, Tipping PG, Kipari T, Cailhier JF, Clay S, Lang R, et al. Conditional ablation of macrophages halts progression of crescentic glomerulonephritis. Am J Pathol. 2005;167(5):1207-19.

78. Rosenkranz AR, Knight S, Sethi S, Alexander SI, Cotran RS, Mayadas TN. Regulatory interactions of alphabeta and gammadelta T cells in glomerulonephritis. Kidney Int. 2000;58(3):1055-66.

79. Tipping PG, Huang XR, Qi M, Van GY, Tang WW. Crescentic glomerulonephritis in CD4- and CD8-deficient mice. Requirement for CD4 but not CD8 cells. Am J Pathol. 1998;152(6):1541-8.

80. Hochheiser K, Engel DR, Hammerich L, Heymann F, Knolle PA, Panzer U, et al. Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria. J Am Soc Nephrol. 2011;22(2):306-16.

81. Kurts C, Heymann F, Lukacs-Kornek V, Boor P, Floege J. Role of T cells and dendritic cells in glomerular immunopathology. Semin Immunopathol. 2007;29(4):317-35.

82. Scholz J, Lukacs-Kornek V, Engel DR, Specht S, Kiss E, Eitner F, et al. Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. J Am Soc Nephrol. 2008;19(3):527-37.

83. Lee KM, McKimmie CS, Gilchrist DS, Pallas KJ, Nibbs RJ, Garside P, et al. D6 facilitates cellular migration and fluid flow to lymph nodes by suppressing lymphatic congestion. Blood. 2011;118(23):6220-9.

84. Panzer U, Kurts C. T cell cross-talk with kidney dendritic cells in glomerulonephritis. J Mol Med (Berl). 2010;88(1):19-26.
# Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Allen bedanken, die mir diese Arbeit ermöglicht haben, insbesondere den nachfolgenden Personen:

PD Dr. med. Volker Vielhauer danke ich für seine exzellente Betreuung, die großartige Hilfsbereitschaft und die vielen motivierenden Diskussionen. Die in seinem Labor verbrachte Zeit zur Anfertigung meiner Promotionsarbeit war wissenschaftlich und menschlich eine große Bereicherung für mich.

Meinen beiden Mitdoktoranden Martin Müller und John Hoppe für die großartige Unterstützung, die gemeinsam erlebte Zeit, die vielen wertvollen Diskussionen und Ideen bei praktischen Problemen.

Bei Nuru Eltrich für seine Hilfsbereitschaft und die Einweisung in die Arbeitsmethoden sowie allen anderen hier nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Klinischen Biochemie für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mir auch während der Anfertigung der Doktorarbeit immerzu unterstützend und liebevoll zur Seite standen.

Claudia Pust danke ich vom ganzen Herzen für Ihre Anteilnahme und großartige Unterstützung und Motivation in allen Phasen der Doktorarbeit. Ulrike und Gerion danke ich für das "fachfremde" Korrekturlesen.

Bei Prof. Dr. med. H. J. Anders bedanke ich mich für die Möglichkeit der großzügigen Nutzung seines Labors sowie beim Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Medizinischen Fakultät der Universität München für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation 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.

München, den 15.09.16

Andrei Bideak

## Wissenschaftliche Veröffentlichungen

#### Abstracts:

<u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Function of the atypical chemokine receptor 2 in murine immune complex glomerulonephritis. J Am Soc. Nephrol. 2016;27: abstract edition. (Kidney Week 2016, Chicago 15.11.-20.11.2016, Abstract TH-PO136)

<u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. The atypical chemokine receptor 2 (D6) limits inflammatory injury in immune complex glomerulonephritis. Abstract Kongress für Nephrologie, ISSN 1863-2262, 2016. (8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 10.09.-13.09.2016, Poster P058)

Hoppe JM, Müller MB, Lux M, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. The Role of A20 in inflammation and cell death during immune complex glomerulonephritis. Abstract-sammlung 2015 (Poster P204, 7. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2015, Berlin)

Hoppe JM, Müller MB, Lux M, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Einfluss von A20 auf Inflammation und Zelltod bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Fellows' Night 2015, Nephrologisches Forum München. Abstractband 2015; S. 13

Müller MB, Hoppe JM, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Distinct proinflammatory functions of soluble and membrane-bound TNF in murine immune complex glomerulonephritis. Abstract-band 2014. (Vortrag A05, 26th European Renal Cell Study Goup Meeting 2014, Kehlheim)

Müller MB, Hoppe JM, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Different functions of soluble and membrane-bound TNF in nephrotoxic serum nephritis. J Am Soc Nephrol. 2013; 24 (Abstract Edition): 308A (Poster TH-PO918, ASN Kidney Week 2013, Atlanta)

Müller M, Hoppe J, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Unterschiedliche inflammatorische Effekte von löslichem und membranständigem TNF bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Abstractsammlung 2013 (Poster P084, 5. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie 2013, Berlin)

Müller M, Hoppe J, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Unterschiedliche inflammatorische Effekte von löslichem und membranständigem TNF bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Symposium "Junge Niere" 2013, Regensburg. Nieren- und Hochdruckkrankheiten 2013, 42: 467-468 Hoppe JM, Müller MB, <u>Bideak A</u>, Eltrich N, Vielhauer V. Die Rolle von A20 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. Symposium "Junge Niere" 2013, Regensburg. Nierenund Hochdruckkrankheiten 2013, 42: 466

### Vorträge:

**Bideak A**. Immunregulatorische Funktionen Chemokin-bindender Proteine bei entzündlichen Nierenerkrankungen. Promotionsstudium "Molekulare Medizin" und "Systembiologische Medizin" Berichtskolloquium, 11. Mai bis 13. Mai 2012, Herrsching