

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



**Beeinflussung der
diabetischen Nephropathie durch den
atypischen Chemokinrezeptor 2**

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

vorgelegt von
Manuela Maria Mertsch

aus Fürstenfeldbruck

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Carsten Otto
PD Dr. Ariadni Spyroglou

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung	6
Abstract.....	8
Abbildungsverzeichnis.....	9
Tabellenverzeichnis.....	14
Formelverzeichnis	15
Abkürzungsverzeichnis.....	16
1 Einleitung	19
1.1 Klinische Relevanz der diabetischen Nephropathie	19
1.2 Pathophysiologie der Niere	20
1.2.1 Anatomie und Physiologie der Niere.....	20
1.2.2 Die diabetische Nephropathie	22
1.2.3 Tierexperimentelles Modell der diabetischen Nephropathie	23
1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren	24
1.3.1 Einteilung und Funktion der Chemokine.....	24
1.3.2 Beeinflussung proinflammatorischer Chemokine im Entzündungsgeschehen der diabetischen Nephropathie	26
1.3.3 Überblick über die atypischen Chemokinrezeptoren.....	28
1.3.4 Der atypische Chemokinrezeptor 2.....	28
1.4 Entzündungsbegrenzende Funktion von ACKR2 bei renalen Erkrankungen.....	30
1.5 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung.....	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Materialen.....	32
2.1.1 Tierhaltung.....	32
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	33
2.1.3 Mehrfachartikel	33
2.1.4 Chemikalien, Lösungen und Puffer	34
2.1.5 Antikörper und Primer	40
2.1.6 Geräte	43
2.1.7 Software.....	45
2.2 Tierexperimentelle Methodik.....	46

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	Versuchstiere	46
2.2.2	Tierhaltung.....	46
2.2.3	Genotypisierung.....	46
2.2.4	Tierexperimentelles Modell der diabetischen Nephropathie	48
2.3	Unilaterale Nephrektomie.....	49
2.3.1	Streptozotocin-Injektion	51
2.3.2	Blutzuckerkontrolle.....	52
2.3.3	Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate.....	52
2.3.4	Versuchsabschluss	54
2.4	Methoden zur Phänotypanalyse	56
2.4.1	Klinische Chemie	56
2.4.2	Proteinisolation.....	56
2.4.3	Kreatinin-Assay	56
2.4.4	Bradford-Assay.....	58
2.4.5	Enzym-linked Immunosorbent Assay	59
2.4.6	Durchflusszytometrie.....	63
2.4.7	Molekularbiologische Methoden.....	71
2.4.8	Histologische Untersuchungen	76
2.5	Statistische Analyse.....	78
3	Ergebnisse.....	79
3.1	Induktion des diabetischen Nephropathie-Modells	79
3.2	Charakterisierung der diabetischen Nephropathie in Wildtyp-Mäusen.....	80
3.2.1	Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellage in Wildtyp-Tieren	80
3.2.2	Körper- und Nierengewicht der diabetischen Wildtyp-Tiere	81
3.2.3	Funktionelle Parameter der diabetischen Nierenschädigung in Wildtyp-Tieren.....	82
3.2.4	Histopathologische Veränderungen infolge der diabetischen Nierenschädigung in Wildtyp-Tieren	85
3.3	Verlauf der diabetischen Nephropathie in Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen	86
3.3.1	Überlebensrate in Wildtyp- und Ackr2-defiziten Tieren nach Induktion des Diabetes	87
3.3.2	Diabetische Stoffwechsellage in Wildtyp- und Ackr2-defiziten Mäusen	87
3.3.3	Körper- und Nierengewicht in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen	89
3.3.4	Nierenfunktionsparameter und GFR-Messung in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen	91

Inhaltsverzeichnis

3.3.5	Albuminurie in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen	93
3.3.6	Histopathologische Veränderungen der Nieren in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen	94
3.3.7	mRNA-Expression renaler Schadensmarker.....	95
3.3.8	Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltration mittels Durchflusszytometrie in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen.....	96
3.3.9	Immunhistologische Charakterisierung der renalen Leukozyteninfiltration in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen	98
3.3.10	Ausmaß der renalen Entzündung in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen	99
3.3.11	Fibrotischer Gewebeumbau in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Nieren	101
3.3.12	CCL2-Proteingehalt in Blut, Urin und Nierengewebe diabetischer Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäuse	103
3.3.13	Systemische Immunantwort in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen.....	104
4	Diskussion	110
4.1	Induktion des Diabetes durch STZ und Verlauf in den untersuchten Genotypen	110
4.1.1	Diabetische Stoffwechsellage	110
4.1.2	Entwicklung der diabetischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäuse.....	112
4.1.3	Lipid-Stoffwechsel.....	112
4.2	Einfluss der Ackr2-Defizienz auf funktionelle Parameter der diabetischen Nierenschädigung.....	113
4.3	Einfluss der Ackr2-Defizienz auf den renalen Gewebeschaden bei diabetischer Nephropathie	114
4.4	Einfluss der Ackr2-Defizienz auf die renale Leukozyteninfiltration bei diabetischer Nierenschädigung.....	115
4.5	Einfluss der Ackr2-Defizienz auf die renale Entzündung und Fibrose bei diabetischer Nierenschädigung.....	117
4.6	Einfluss der Ackr2-Defizienz auf lokale und systemische Chemokinkonzentration am Beispiel von CCL2	119
4.7	Systemische Effekte der Ackr2-Defizienz in diabetischen Mäusen	120
4.8	Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur	121
4.9	Limitation der Arbeit und Ausblick	123
Literaturverzeichnis.....	126	
Danksagung	134	
Eidesstattliche Versicherung	135	

Zusammenfassung

Die diabetische Nephropathie gehört zu den bedeutendsten Pathologien der Nephrologie mit hoher klinischer Relevanz. Inflammatorische Prozesse mit leukozytärer Infiltration in das renale Gewebe spielen eine wichtige pathophysiologische Rolle, tragen zur Gewebeschädigung bei und verstärken den Nierenfunktionsverlust. Die Leukozyteninfiltration wird durch Chemokine und deren Rezeptoren gesteuert. CCL2 ist ein klassisches proinflammatorisches Chemokin, das vor allem lokal im Gewebe produziert zur Pathologie beiträgt. Seit einigen Jahren sind atypische Chemokinrezeptoren wie der atypische Chemokinrezeptor 2 (ACKR2) bekannt. Diese vermitteln nicht wie die typischen Chemokinrezeptoren eine Signaltransduktion nach Ligandenbindung, sondern internalisieren vielmehr die gebundenen Chemokine und können zu deren Abbau führen. Daher wird den atypischen Chemokinrezeptoren vor allem eine lokale Beeinflussung des Entzündungsgeschehens zugeschrieben. So kann der ACKR2 durch seine Chemokinabbauende Funktion auch in Tiermodellen verschiedener Nierenerkrankungen renale Entzündung, Gewebeschädigung und Fibrose limitieren und damit der Entwicklung eines chronischen Nierenfunktionsverlusts entgegenwirken. Ziel dieser Arbeit war daher, zunächst erfolgreich einen durch Streptozotocin-Injektionen induzierten Diabetes mellitus im Tiermodell auszulösen und anschließend die Beeinflussung der sich entwickelnden diabetischen Nephropathie durch den atypischen Chemokinrezeptor ACKR2 zu untersuchen. Dieser Arbeit lag die Hypothese zugrunde, dass bei Fehlen des entzündungsbegrenzenden Effekts von ACKR2 die diabetische Nephropathie in den Versuchstieren verschlechtert wird. Zur Untersuchung dieser Annahme wurde der Verlauf der diabetischen Nephropathie in Wildtyp-Mäusen (C57BL/6J) und Ackr2-Knockout-Mäusen ($Ackr2^{-/-}$) im gleichen genetischen Hintergrund verglichen. Zur Induktion des diabetischen Nephropathiemodells wurde zunächst in beiden Mausgruppen eine unilaterale Nephrektomie durchgeführt, um eine für den Diabetes charakteristische Hyperfiltration in der verbliebenen Niere auszulösen und die nachfolgende diabetische Nierenschädigung zu akzelerieren. Anschließend wurde durch Streptozotocin-Injektionen in den Mäusen der Diabetes induziert und nachfolgend die sich entwickelnde diabetische Nephropathie bis Woche 25 im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren charakterisiert. Hierbei wurden funktionelle Parameter wie Albuminurie und glomeruläre Filtrationsrate bestimmt. Am Versuchsende wurden strukturelle Veränderung des Nierengewebes wie Mesangiumexpansion und renale Fibrose analysiert und das Ausmaß der Nierenentzündung, insbesondere die renale Leukozyteninfiltration und der renale Gehalt proinflammatorischer Chemokine, erfasst. Im ersten Teil der Arbeit konnte erfolgreich ein Diabetes mit erhöhten Blutzuckerwerten und erhöhtem HbA1c in Wildtyp-Mäusen induziert werden. Die erhobenen funktionellen Parameter wiesen auf eine diabetische

Zusammenfassung

Nierenschädigung hin, mit im Verlauf zunehmender Albuminurie und abnehmender GFR. Auch konnte strukturell in den Glomeruli eine vermehrte Mesangiumexpansion mit vermehrter Leukozyteninfiltration gezeigt werden. Des Weiteren wurde der Phänotyp der diabetischen Versuchstiere beider Genotypen miteinander verglichen. Hier zeigten sich zunächst keine Unterschiede in der Entwicklung des Diabetes in Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen. Der Diabetes hatte sich somit unbeeinflusst von einer Ackr2-Defizienz entwickelt. Es konnte eine erhöhte Konzentration des proinflammatorischen Chemokins CCL2 im Plasma vor allem der Ackr2^{-/-}-Tiere nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich in Ackr2-defizienten diabetischen Mäusen auch eine vermehrte Rekrutierung von proinflammatorischen Leukozyten in das Nierengewebe, ebenso wie eine erhöhte Leukozytenzahl im Blut und in der Milz. Des Weiteren fielen im Knochenmark der diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäuse eine erniedrigte Leukozytenzahl und eine Reduktion inflammatorischer Makrophagen auf, was für eine verstärkte Chemokin-vermittelte Mobilisation von Leukozyten aus dem Knochenmark in peripheres Gewebe bei Ackr2-Defizienz spricht. Funktionelle und strukturelle Marker der diabetischen Nierenschädigung waren allerdings in Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen zu Woche 25 der diabetischen Nephropathie nicht signifikant unterschiedlich, wobei sich eine tendenzielle, nicht statistisch signifikante Verschlechterung dieser Parameter in Ackr2^{-/-}-Tieren zeigte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Einfluss von ACKR2 auf die inflammatorischen Prozesse der diabetischen Nephropathie gezeigt werden, der sich allerdings zumindest im Verlauf bis Woche 25 nur auf eine signifikant verstärkte renale Leukozyteninfiltration in Ackr2-defizienten Tieren beschränkte, die nicht mit einer signifikanten funktionellen Verschlechterung oder einem vermehrten renalen Gewebeschaden einherging. Allerdings fand sich ein nicht signifikanter Trend zu einem verstärkten glomerulären Schaden bei Ackr2-Defizienz. Die vorliegende Arbeit zeigt somit, dass im hier untersuchten Streptozotocin-induzierten Diabetes-Modell mit insgesamt geringer renaler Entzündungsaktivität der entzündungsbegrenzende Effekt von ACKR2 den auftretenden Nierenschäden im Gegensatz zu anderen renalen Krankheitsmodellen nicht vermindert. Dass ACKR2 die renale Leukozyteninfiltration bis Woche 25 des Modells begrenzt, könnte jedoch darauf hinweisen, dass bei längerem Verlauf des Krankheitsmodells ein nephroprotektiver Effekt von ACKR2 nachgewiesen werden könnte, mit zunehmend verschlechterten funktionellen und strukturellen Markern der Nierenschädigung in diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäusen.

Abstract

Because of its clinical relevance, diabetic nephropathy is one of the most significant pathologies in nephrology. Controlled by chemokines and their receptors, leukocyte infiltration into renal tissue contributes to functional and structural inflammatory renal damage. The proinflammatory chemokine CCL2, secreted locally in tissues, contributes to the pathology of diabetic nephropathy. In recent years, atypical chemokine receptors like the atypical chemokine receptor 2 (ACKR2) became known. In contrast to typical signal transduction after binding, these receptors rather internalize bound chemokines and can promote their degradation. Thus, atypical chemokine receptors like ACKR2 can influence local inflammatory processes by degradation of e.g. CCL2 and may therefore limit structural and functional renal damage. Aim of this dissertation was first to induce diabetic disease in mice by injection of streptozotocin and further to analyze effects of ACKR2 on the development of diabetic nephropathy, hypothesizing that lack of ACKR2 leads to accelerated renal damage. The development of diabetic nephropathy was compared between wildtype mice and Ackr2 knockout mice. To accelerate diabetic kidney injury by promoting renal hyperfiltration, unilateral nephrectomy was performed in all experimental animals before diabetes was induced by streptozotocin injection. Diabetic mice were observed for 25 weeks. Functional parameters including albuminuria and glomerular filtration rate were determined. Finally, structural renal damage, renal leukocyte infiltration and abundance of proinflammatory chemokines were analyzed. In the first part of this study, diabetes mellitus was induced successfully in wildtype mice. Blood sugar levels and HbA1c were elevated and functional parameters reflecting renal damage like albuminuria and reduced GFR were present. In addition, structural damage could be observed in glomeruli, with mesangial matrix expansion and increased leukocyte infiltration. Diabetic disease developed similarly in wildtype and Ackr2-deficient mice. Some differences in inflammatory responses were noted between the two genotypes. These included elevated leukocyte levels in renal tissue and blood, increased mobilization of bone marrow cells and a higher CCL2 levels in plasma of diabetic Ackr2 knockout mice. However, no difference in structural and functional renal damage could be observed comparing diabetic wildtype and Ackr2 knockout mice.

In summary, this study demonstrates a significant influence of ACKR2 on inflammatory responses in diabetic nephropathy. ACKR2 apparently limits leukocyte infiltration into renal tissue until week 25 of diabetic nephropathy. However, despite increased renal leukocyte infiltration Ackr2 deficiency did not result in more severe functional or structural renal damage until week 25 of this streptozotocin-induced diabetic mouse model. An extended observational time could possibly show stronger nephroprotective effects of ACKR2 in this model.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.	Darstellung der Diagnoseverteilung zum Zeitpunkt des Beginns eines Nierenersatzverfahrens 2005 (Frei und Schober-Halstenberg 2006)	19
Abbildung 1.2.	Chemokine und typische Chemokinrezeptoren in der Übersichtsdarstellung (Vielhauer et al. 2004)	25
Abbildung 1.3.	Schematische Darstellung von (A) typischen Chemokinrezeptoren und (B) atypischen Chemokinrezeptoren (Graham 2009)	26
Abbildung 1.4.	Darstellung der Internalisierung und intrazellulärem Abbau der Chemokine durch Ackr2 (D6) (Mantovani et al. 2006)	29
Abbildung 1.5.	Darstellung der physiologischen mRNA-Expression von Ackr2 in verschiedenen Organen unbehandelter C57BL/6J-Kontrollmäuse (Lux et al. 2019)	30
Abbildung 2.1.	Zeitlicher Ablauf des Tiermodells	49
Abbildung 2.2.	Beispielhafte Darstellung einer GFR-Messung mit FITC-Sinistrin und deren Markierung von Baseline, Start- und Endpunkt der T1/2-Bestimmung (x-Achse: Zeit [h:min:sek]; y-Achse: Signalstärke der FITC-Emmission)	54
Abbildung 2.3.	Lineare Standardkurve zur Bestimmung der Kreatinininkonzentrationen der einzelnen Proben.....	58
Abbildung 2.4.	Sigmoidale Standardkurve bei Albuminbestimmung.....	61
Abbildung 2.5.	Lineare Standardkurve bei logarithmierten Werten zur Bestimmung der CCL2-Konzentrationen der einzelnen Proben.....	63
Abbildung 2.6.	Schematische Darstellung der Funktionsweise der FACS-Analyse (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)	64
Abbildung 2.7.	Darstellung des FSC und SSC (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)	64
Abbildung 2.8.	Absorptionsspektren und Maxima einiger exemplarischer Fluoreszenzfarbstoffe (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)	69
Abbildung 2.9.	Emissionsmaxima einiger exemplarischer Fluoreszenzfarbstoffe (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)	69
Abbildung 2.10.	Darstellung der FACS Analyse in Übersicht (Bideak. 2017): A: CD45+ Zellen Darstellung (1), B: CD3+ T-Zellen Darstellung (2), weiter werden CD3+CD4+ (3) und CD3+CD8+ (4) unterschieden, C: CD11c+ dendritische Zellen (5a+b), die wiederum in CD11c+F4/80- (5a) und CD11c+F4/80+(5b) Zellen einteilen lassen. F4/80+ Leukozyten (5b+6) und F4/80+CD11c- Makrophagen (6), CD11c-FITC und F4/80-APC sind als Isotyp-Kontrollen dargestellt (Bideak 2017).	71
Abbildung 3.1.	Darstellung der diabetischen Stoffwechsellsage im Vergleich der Wildtyptier-Kontrollgruppe (Kontroll-WT) und der Wildtypgruppe mit induziertem Diabetes (Diabetes-WT) mit Mittelwerten \pm SEM, A: Glukose im Blutplasma, B: HbA _{1c} im Blutplasma zum Zeitpunkt Woche 25. *** p < 0,001,	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.2. Darstellung der Lipidwerte mit Mittelwerten \pm SEM bei unbehandelten Wildtyp-Kontrolltieren und diabetischen Tieren (Diabetes-WT) zum Zeitpunkt Woche 25, A: Cholesterin im Plasma, B: Triglyzeride im Plasma. * p < 0,05; ** p < 0,01.....	81
Abbildung 3.3. Darstellung der Körper- und Nierengewichte in Woche 25 bei Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Tieren (Diabetes-WT) mit Mittelwerten \pm SEM, A: Körpergewicht der Mäuse, B: Gewicht der Einzelniere von Wildtyp-Kontrolltieren und diabetischen Tieren, C: Gegenüberstellung des Gesamtnierengewichts der Versuchstiere (Kontrolltiere: 2 Nieren, Diabetestiere 1 Niere), D: Gesamtnierengewicht bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse (Kontrolltiere: 2 Nieren, Diabetestiere 1 Niere). *** p < 0,001; ns, nicht signifikant.....	82
Abbildung 3.4. Vergleich der Plasmawerte in Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Wildtypptieren (Diabetes-WT) in Woche 25 (Endpunkt) mit Mittelwerten \pm SEM, A: Kreatininkonzentration im Plasma, B: Harnstoffkonzentration im Plasma, C: Proteinkonzentration im Plasma und D: Albuminkonzentration im Plasma. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001	83
Abbildung 3.5. Darstellung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) in Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Wildtypptieren (Diabetes-WT) in Woche 23 mit Mittelwerten \pm SEM. * p < 0,05.....	84
Abbildung 3.6. Albuminurie in Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Wildtypptieren (Diabetes-WT) in Woche 23 mit Mittelwerten \pm SEM, A: Albuminurie in Woche 23 in diabetischen Wildtypptieren im Vergleich zu Kontrolltieren, B: Zunehmende Albuminurie in Woche 23 im Vergleich zu Woche 0 in diabetischen Wildtypptieren (Diabetes-WT). * p < 0,05 ; ns, nicht signifikant	85
Abbildung 3.7. Histologische Schadensmarker der diabetischen Nephropathie, ausgewertet in PAS-gefärbten Nierenschnitten von Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Wildtypptieren (Diabetes-WT), A: Representative Darstellung des PAS-gefärbten Nierengewebes in der Versuchsgruppen, Vergrößerung x 400, B: Vergleich der Glomerulusgröße und C: der mesangialen Matrixexpansion (erfasste mesangiale Fläche bezogen auf den Glomerulus-Querschnitt) zwischen Wildtyp-Kontrolltieren und diabetischen Wildtypmäusen mit Mittelwerten \pm SEM. *** p < 0,001; ns, nicht signifikant	86
Abbildung 3.8. Überlebenskurve nach Diabetesinduktion bei Wildtypptieren (WT) und Ackr2-defiziten Mäusen (Ackr2 ^{-/-}).....	87
Abbildung 3.9. Entwicklung der diabetischen Stoffwechsellage in Wildtyp (WT)- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen, A: Zeitlicher Verlauf der Plasma-Blutglukosewerte bei den diabetischen Versuchstieren, , B: Glukosewerte im Plasma der WT- und Ackr2 ^{-/-} -Mäuse in Woche 25, C: HbA1c Werte der WT- und Ackr2 ^{-/-} -Mäuse in Woche 25. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM * p < 0,05; ns, nicht signifikant	88
Abbildung 3.10. Lipidstoffwechsel der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2 ^{-/-} -Tiere in Woche 25 (Versuchsende) mit Mittelwerten \pm SEM, A: Plasmakonzentration der Cholesterinwerte, B: Plasmakonzentration der Triglyzeride. ns, nicht signifikant.....	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.11. Körpergewicht der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2 ^{-/-} -Tiere. A: Verlaufsübersicht über die Wochen 0-25, B: Ausgangsgewichte der diabetischen Versuchstiere (WT und Ackr2 ^{-/-}) in der Woche 0 (am Tag 0) ,C: Darstellung der Endkörpergewichte in Woche 25 von unbehandelten Kontrolltieren sowie diabetischen WT- und Ackr2 ^{-/-} -Tieren mit Mittelwerten ± SEM. * p < 0,05.....	90
Abbildung 3.12. Nierengewichte unbehandelter Kontrolltiere sowie diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2 ^{-/-}) Tiere in Woche 25 mit Mittelwerten ± SEM, A: Gewicht der Einzelnieren, B: Einzelnierengewicht bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse, C: Gesamtnierengewicht (Kontrolltiere: 2 Nieren, Diabetestiere 1 Niere) bezogen auf das Körpergewicht. ns, nicht signifikant	91
Abbildung 3.13. Plasmaparameter unbehandelter Kontrolltiere sowie diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2 ^{-/-}) Tiere in Woche 25 mit Mittelwerten ± SEM, A: Plasmaspiegel von Kreatinin, B: Plasmaspiegel von Harnstoff, C: Proteingehalt im Plasma, D: Albumingehalt im Plasma. ns, nicht signifikant	92
Abbildung 3.14. GFR-Messung in unbehandelten Kontrolltieren sowie diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Tieren in Woche 23 mit Mittelwerten ± SEM. ns, nicht signifikant.....	93
Abbildung 3.15. Albuminurie der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Tiere in Woche 0, 12 und 23. Dargestellt sind Mittelwerten ± SEM. ns, nicht signifikant	94
Abbildung 3.16. Histologische Veränderung der Nierenglomeruli in unbehandelten Kontrolltieren sowie diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Tieren in Woche 25, A: Representative Darstellung des PAS-gefärbten Nierengewebes beider diabetischer Versuchsgruppen, Vergrößerung x 400, B: Glomerulusquerschnitt, C: Mesangium-Glomerulus-Verhältnis mit Mittelwerten ± SEM. ns, nicht signifikant.....	95
Abbildung 3.17. mRNA-Expression glomerulärer (Nephrin) und tubulärer (KIM-1, TIMP2) Schadensmarker in Nieren diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2 ^{-/-} -Mäuse in Woche 25 nach Diabetesinduktion. Dargestellt sind Mittelwerte ±SEM. ns, nicht signifikant	96
Abbildung 3.18. Durchflusszytometrische Analyse der renalen Leukozyteninfiltration in diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2 ^{-/-} -Mäusen in Woche 25. Dargestellt sind die Anzahl A: renaler CD45 ⁺ -Leukozyten, B: CD3 ⁺ -T-Zellen, C: CD4 ⁺ - und D: CD8 ⁺ -T-Zellen mit Mittelwerten ± SEM. ** p < 0,01; ns, nicht significant	96
Abbildung 3.19. Durchflusszytometrische Analyse der renalen Akkumulation mononuklearer Phagozyten. Dargestellt ist die Infiltration CD11c ⁺ dendritische Zellen, F4/80 ⁺ Phagozyten und ihrer Subpopulationen in Nieren diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2 ^{-/-}) Mäuse in Woche 25 mit Mittelwerten ±SEM. * p < 0,05, ns, nicht signifikant	97
Abbildung 3.20. Durchflusszytometrische Analyse der renalen Akkumulation von CCR2 ⁺ Phagozytenpopulationen in diabetische Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Nieren mit Mittelwerten ± SEM. * p < 0,05; ns, nicht signifikant	98

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.21. Immunhistologische Auswertung tubulointerstitieller und glomerulärer Zellinfiltration in Nieren der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Tiere. Dargestellt sind repräsentative immunhistologischen Färbungen von A: CD3 ⁺ Zellen, B: F4/80 ⁺ Phagozyten und C: ER-HR3 ⁺ Makrophagen sowie die entsprechende Quantifizierung mit Mittelwerten ± SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01; ns, nicht signifikant	99
Abbildung 3.22. Renale mRNA Expression proinflammatorischer Marker in diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Mäusen in Woche 25 nach Induktion des Diabetes, A Expression von Ackr2 zur Genotypkontrolle, B Expression von TNF α und seiner Rezeptoren, C: Expression von CCR2 und proinflammatorischen Chemokine. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. * p < 0,05; ns, nicht signifikant.....	100
Abbildung 3.23. Renale mRNA-Expression von Markergenen der A: M1 Makrophagen und B: M2 Makrophagen in diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Mäusen in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. ns, nicht signifikant.....	101
Abbildung 3.24. Renale mRNA Expression von Fibroemarkern in diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Mäusen in Woche 25 nach Induktion des Diabetes. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. ns, nicht signifikant	102
Abbildung 3.25. Durchflusszytometrische Quantifizierung von renalen CD45 ⁺ CD11b ⁺ Kollagen 1 ⁺ Fibrozyten in Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Mäusen in Woche 25 nach Diabetesinduktion. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. * p < 0,05	103
Abbildung 3.26. CCL2-Proteingehalt in A: Blutplasma, B: Urin und C: Nierengewebe in diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Mäusen in Woche 25 nach Induktion des Diabetes. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. * p < 0,05; ns, nicht signifikant.....	104
Abbildung 3.27. Durchflusszytometrische Quantifizierung von A: Gesamtleukozytenzahl, B: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten sowie C: CD3 ⁺ T-Zellen und D: deren Subpopulationen CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T- Zellen im Blut diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2 ^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. * p < 0,05; ns, nicht signifikant.....	105
Abbildung 3.28. Durchflusszytometrische Quantifizierung CD11b ⁺ F4/80 ⁺ Monozyten, CD11b ⁺ Ly6C ^{high} inflammatorischer Monozyten sowie CD11b ⁺ CCR2 ⁺ Monozyten und CD11b ⁺ Ly6C ^{high} CCR2 ⁺ inflammatorischer Monozyten im peripheren Blut diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2 ^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. . * p < 0,05; ** p < 0,01	106
Abbildung 3.29. Milzgewichte bezogen auf das Körpergewicht der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 ^{-/-}) Mäuse 25 Wochen nach der Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. ns, nicht signifikant.....	106
Abbildung 3.30. Durchflusszytometrische Quantifizierung von A: Gesamtleukozyten, B: CD3 ⁺ T-Zellen sowie C und D: deren Subpopulationen CD4 ⁺ (C) und CD8 ⁺ (D) T-Zellen in den Milzen diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2 ^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. ns, nicht signifikant	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.31. Durchflusszytometrische Quantifizierung CD11b⁺ F4/80⁺ Makrophagen, CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischer Makrophagen sowie CD11b⁺ CCR2⁺ Makrophagen und CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ inflammatorischer Makrophagen in den Milzen diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01.....107

Abbildung 3.32. Durchflusszytometrische Quantifizierung von A: Gesamtleukozytenzahl, B: CD3⁺ T-Zellen sowie C: CD4⁺ und D: CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. ** p < 0,01; ns, nicht signifikant108

Abbildung 3.33. Durchflusszytometrische Quantifizierung CD11b⁺ F4/80⁺ Makrophagen, CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischer Makrophagen sowie CD11b⁺ CCR2⁺ Makrophagen und CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ inflammatorischer Makrophagen im Knochenmark diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. * p < 0,05; ns, nicht signifikant109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.	Übersicht über atypische Chemokinrezeptoren und Ihre Liganden (Graham und Locati 2013).....	28
Tabelle 2.1.	Mauslinien im Überblick.....	46
Tabelle 2.2.	Mastermix zur Genotypisierung	47
Tabelle 2.3.	Thermocycler-Protokoll für die Genotypisierung	47
Tabelle 2.4.	Primer-Übersicht für die Genotypisierung	48
Tabelle 2.5.	Ansatz für Narkosemischung, Antagonisten und postoperative Schmerztherapie	49
Tabelle 2.6.	Streptozotocin-Dosierung und Auflösung	51
Tabelle 2.7.	Herstellung des Citratpuffers mit dem Ziel-pH 4,3	51
Tabelle 2.8.	Reagenzien für die Bestimmung der Kreatininkonzentration	56
Tabelle 2.9.	Verdünnung der Standardreihe beim Kreatinin Assay.....	57
Tabelle 2.10.	Verdünnung der Standardreihe für die Proteinbestimmung.....	59
Tabelle 2.11.	Verdünnung der Standardreihe für einen Albumin ELSIA.....	60
Tabelle 2.12.	Verdünnung der Proben für Albumin ELISA.....	60
Tabelle 2.13.	Verdünnung der Standardreihe und Proben für einen CCL2 ELISA	62
Tabelle 2.14.	FACS-Färbungen von Blut, Milz, Knochenmark und Niere.....	68
Tabelle 2.15.	Exemplarische Darstellung der Antigenpräsentation auf den unterschiedlichen Zelltypen (Bideak 2017).....	70
Tabelle 2.16.	Mastermix für die reverse Transkription	73
Tabelle 2.17.	Programm des Thermo-Cycler für die reverse Transkription	73
Tabelle 2.18.	Mastermix für Genbestimmungen mittels qPCR im LightCycler 480.....	74
Tabelle 2.19.	Programm der Gen-Analysen mittels qPCR im LightCycler 480.....	75
Tabelle 3.1.	Übersicht der Versuchstiere im Diabetesmodell	79

Formelverzeichnis

Formel 2.1.	Formel zur Bestimmung der auf 100 g pro Kilogramm Körpergewicht bezogenen GFR (Schreiber et al. 2012, S. 3).....	54
Formel 2.2.	Formel zur Bestimmung der absoluten GFR der einzelnen Versuchstiere	54
Formel 2.3.	Berechnung von vergleichbaren PCR Werte: Als Houskeeping Gen dient dabei 18S rRNA	75

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
m-	Mikro-
Ackr2	Atypischer Chemokin Rezeptor 2
Alexa647	Alexa Fluor 647
Alexa488	Alexa Fluor 488
AGEs	Advanced Glycation Endproduct
APC	Allophycocyanin
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BZ	Blutzucker
C57BL/6J	Genetischer Hintergrund der Mäuse
c-	Centi-
CCL2	CC-Chemokinligand 2
CP	Schmelzpunkt
CT	Cycle Threshold
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
D6	Ackr2
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNS/A	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DPBS	Dulbecco's Balanced Salt Solution (ausgewogene Salzlösung)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EPO	Erythropoetin
ER-HR3	Marker für Monocyten und Makrophagen
F4/80	Marker für Monocyten und Makrophagen
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting (Durchfluszytometrie)
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
G (Nadelgröße)	Gauge
G (Zentrifuge)	Vielfaches der mittlere Erdbeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

GB	Großbritannien
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GLUT-2 Rez.	Glukosetransporter Typ 2
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid -
HbA1 _c	Langzeitmarker für Blutzucker-Hämoglobinart
HCl	Salzsäure
HBSS	Hanks's Balanced Salt Solution
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
k-	Kilo-
kgKG	Kilogramm des Körpergewicht
KM	Knochenmark
k.o.	Knock-out
l	Liter
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6G	Marker für neutrophile Granulozyten
Ly6C	Marker für inflammatorische Makrophagen
m	Meter
m-	Milli-
μ-	Mikro-
M	Molar
MAC-2	Marker für glomerulären Makrophagen
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2)
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mRNA	Messanger Ribonukleinsäure
MTA	Medizintechnischen Assistenten
n-	Nano-
N	Normalität (chemische Einheitsgröße für Stoffmengenkonzentration)
PAS-Reaktion	Periodic acid-Schiff-reaktion
PBND-Puffer	PCR Buffer with Nonionic Detergents
PBS	Phosphate-Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin

Abkürzungsverzeichnis

PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5
pH	Pondus Hydrogenii
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
rcf	Relative Zentrifugationsgeschwindigkeit (relative centrifugal force)
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reversen Transkription
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SSC	Sideward Scatter
STZ	Streptozotocin
Taq-Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TMB	Tetramethylbenzidine
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomehtan
Tween 20	Polyoxymethylensorbitan Monolaurat
U	Unit, Einheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
vs.	Versus
W	Watt
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Klinische Relevanz der diabetischen Nephropathie

Chronische Nierenerkrankungen, die bis zur terminalen Niereninsuffizienz führen können haben in der Medizin eine große Relevanz. Viele Mechanismen führen zu einer kontinuierlichen Schädigung des Nierengewebes wie chronisch entzündliche, hypertensive und diabetische Veränderungen. Diabetes spielt als Ursache einer chronischen Nephropathie eine entscheidende Rolle. Nach wie vor kommt es meist trotz Therapie der Grunderkrankung und Minimierung der Risikofaktoren zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der Nierenfunktion bis hin zum vollständigen Funktionsverlust, der mit Nierenersatzverfahren wie Dialysen oder Nierentransplantation langfristig behandelt werden muss (Tuttle et al. 2014). In Abbildung 1.1 wird die Verteilung der Diagnosen zum Zeitpunkt des Beginnes eines Nierenersatzverfahrens für das Jahr 2005 in Deutschland dargestellt. Für diese Darstellung konnten 6.720 Dialysepatienten neu in das Register der QuaSi-Niere gGmbH über Datentreuhänder aufgenommen werden, es handelt sich hierbei also um die Inzidenz im Jahr 2005 für Nierenersatzverfahren. Diabetes nimmt mit 35 % einen sehr großen Anteil der Ursache ein (Frei und Schober-Halstenberg 2006).

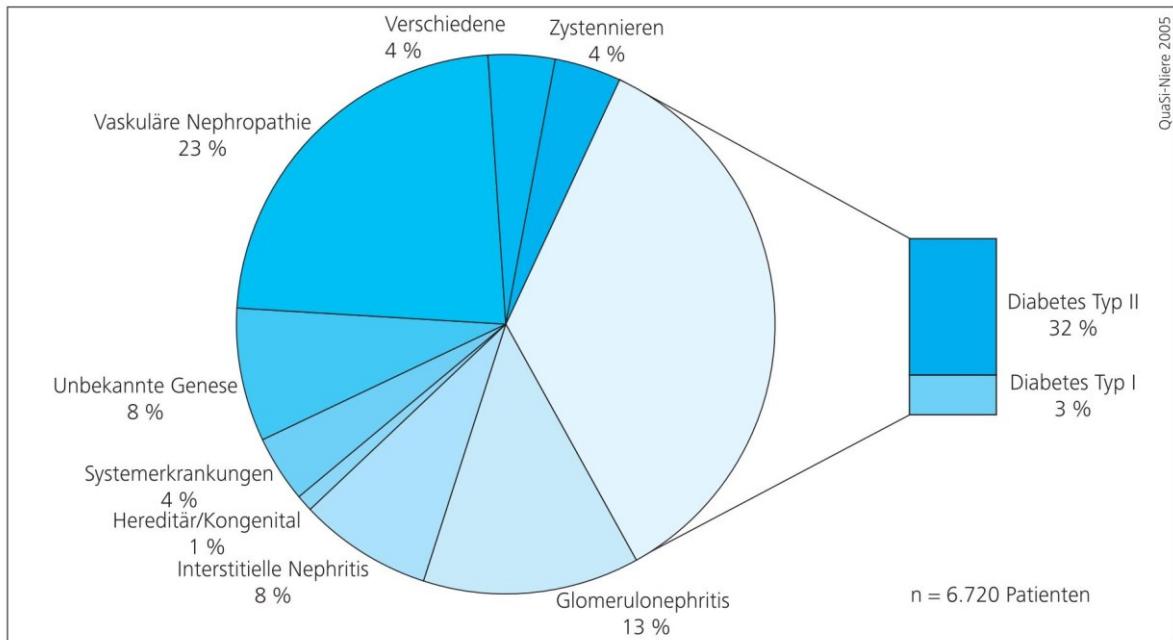


Abbildung 1.1. Darstellung der Diagnoseverteilung zum Zeitpunkt des Beginns eines Nierenersatzverfahrens 2005 (Frei und Schober-Halstenberg 2006)

Dies stellt nicht nur für den Patienten eine hohe Belastung und Einschränkung von Lebenserwartung und Lebensqualität dar, sondern führt auch unweigerlich zu einer hohen Beanspruchung der Gesellschaft, verursacht durch hohe Kosten und hohen

1. Einleitung

Ressourcenverbrauch (Tuttle et al. 2014). Die Entwicklung neuer oder verbesserter Therapieansätze, die die Progression der chronischen Niereninsuffizienz bei Diabetes verlangsamen oder gar aufhalten könnten, ist daher klinisch hochrelevant.

1.2 Pathophysiologie der Niere

1.2.1 Anatomie und Physiologie der Niere

Die Niere ist im menschlichen Körper paarig angelegt, bohnenförmig und befindet sich etwa auf Höhe des 12. Brustwirbels lateral der Wirbelsäule. Die Masse beider Nieren zusammen beträgt etwa 120-180 g, wobei jede einzelne eine Länge von etwa 12 cm, eine Breite von 6 cm und eine Dicke von 3 cm hat und von einer festen Kapsel umgeben ist. Neben der makroskopischen Aufteilung in Nierenmark, Nierenrinde und ableitendes Kelchsystem lassen sich histologisch in der Niere verschiedene Strukturen mit funktionell unterschiedlichen Aufgaben abgrenzen. Die kleinste Funktionseinheit der Niere wird als Nephron bezeichnet, das sich wiederum aus Nierenkörperchen (Glomerulus) und Nierenkanälchen (Tubulus) zusammensetzt. Vor allem die als Glomeruli bezeichneten Nierenkörperchen, bestehend aus dem sich verzweigendem glomerulären Kapillarnetz und der umgebenden Bowman-Kapsel, sind in dieser Arbeit von besonderem Interesse (Klinke et al. 2010). Sie stellen die eigentlichen Filtrationseinheiten der Niere dar, in denen das durch die glomerulären Kapillaren strömende Blut filtriert wird und hierdurch der im Bowmann'schen Kapselraum gesammelte, glomeruläre Primärharn entsteht. Hierbei stellt die glomeruläre Kapillarwand eine selektive Filtrationsbarriere dar, deren dreischichtiger Aufbau aus Endothel, Basalmembran und Podozyten mit ihren durch Schlitzmembranen verbundenen Fußfortsätzen besteht. Diese glomeruläre Filtrationsbarriere hält korpuskuläre Elemente wie Zellen und größere Moleküle in der Blutbahn zurück, während kleinmolekulare Substanzen, Elektrolyte, harnpflichtige toxische Stoffwechselprodukte und Wasser frei filtriert werden. Mittelgroße Moleküle wie z.B. Albumin als häufigstes im Blutplasma vorkommendes Protein können unter physiologischen Bedingungen die glomeruläre Filtrationsbarriere nur in geringem Umfang passieren. Umso wichtiger ist die Tatsache, dass bei glomerulären Erkrankungen mit Schädigung der Filtrationsbarriere verstärkt Albumin in den Harn filtriert wird, sodass die sich entwickelnde Albuminurie ein frühes Zeichen eines glomerulären Schadens darstellt, wie sie auch bei einer früher diabetischen Nierenschädigung typischerweise auftritt (Arasteh et al. 2013). Intraglomeruläre Mesangiumzellen mit ihrer umgebenden extrazellulären Matrix, dem Mesangium, stabilisieren das glomeruläre Kapillarkonvolut, produzieren Matrix und bauen sie ab, phagozytieren Fremdmaterial, das im Mesangium abgelagert wird und können bei Schädigung inflammatorische Mediatoren produzieren und Entzündungszellen rekrutieren. Die Basalmembran selbst besteht aus Kollagen IV, Laminin und Nidogen, in das negativ

1. Einleitung

geladene Glykosaminoglykane eingelagert sind. Die Schlitzmembran, gebildet durch die oben erwähnten Podozyten, enthält zudem noch Nephrin, das die Podozytenfußfortsätze miteinander verbindet (Arastéh et al. 2013).

Täglich wird von der Niere das gesamte Blutvolumen mehrmals gereinigt. Dabei entstehen zunächst durch Filtration in den Glomeruli bis zu 200 l Primärharn, der durch komplexe Vorgänge der Rückresorption von Wasser und Elektrolyten vor allem im tubulären System auf etwa 1,5-2 Liter Endharn minimiert wird. Das gesamte filtrierte Plasmavolumen aller Glomeruli wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet und ist im klinischen Alltag einer der wichtigsten Parameter der Nierenfunktion. Bei einem gesunden jungen Menschen beträgt die GFR etwa 120 ml/min.

Ein Tubulus setzt sich zusammen aus einem proximalen Tubulusanteil (unterteilt in Pars convoluta und Pars recta), einem intermediären Anteil und einem distalen Tubulus (unterteilt in Pars convoluta und Pars recta), der über ein Verbindungstubulus mit dem Sammelrohr verbunden ist, das schließlich in die Papilla renalis im Nierenbecken endet. Die beiden Pars rectae der distalen und proximalen Tubulusanteile und der haarnadelförmig-dünne intermediäre Anteil bilden zusammen die Henle-Schleife. Das Tubulussystem hat verschiedene Aufgaben, unter anderem die Rückgewinnung wichtiger Substanzen und Wasser, Abgabe von Abfallprodukten und Aufrechterhaltung eines physiologischen Säure-Base-Haushaltes. Dies wird durch aktive und passive Vorgänge geregelt. Im Prinzip kann vereinfacht gesagt werden, dass im proximalen Teil des Tubulus durch aktive Resorption von geladenen und osmotischen Teilchen ein Potentialdifferenz und Konzentrationsgefälle entsteht, das weitere Mechanismen zur Resorption von anderen wichtigen Substanzen erst ermöglicht. Eine zentrale Rolle spielt dabei das Natriumion (Na^+). Wichtige Substanzen wie Bicarbonat, Glukose und Aminosäuren können durch diese Mechanismen zurückgewonnen werden. Das Wasser folgt dem osmotischen Gradienten und zieht dabei weitere gelöste Stoffe durch den konvektiven Transport zurück ins Nierenparenchym. Andere Substanzen wie Inulin (oder Sinistrin, dazu mehr in Kapitel 2.3.3) werden nicht/kaum resorbiert und können so durch deren Konzentrationsunterschied zwischen dem Endharn und Blutplasma Aufschluss über die glomeruläre Filtrationsleistung der Niere geben (GFR-Bestimmung). Die Henle-Schleife spielt bei dem Aufbau eines osmotischen Gradienten eine besonders entscheidende Rolle. Dies und das Prinzip des Gegenstroms sind die Voraussetzungen für die Konzentrierung des Urins, sodass final ein in seiner Menge stark reduzierter, aber auch stark konzentrierter Endharn zustande kommt. Neben ihrer Hauptfunktion, der Regulation des Wasser-, Säure-Basen- und Salzhaushaltes sowie der Ausscheidung von harnpflichtigen Stoffwechselprodukten, ist die Niere an vielen weiteren physiologischen Prozessen beteiligt und ist somit ein zentral wichtiges Organ im menschlichen Körper. Beispielweise produziert die Niere, genauer gesagt die Fibroblasten

1. Einleitung

der Nierenrinde, Erythropoetin (EPO), das essentiell für die hämatopoetische Wachstum und die Differenzierung von Erythrozyten ist (Klinke et al. 2010). Außerdem ist die Niere maßgeblich am Vitamin D-Stoffwechsel und der Regulation des Calciumhaushaltes beteiligt. Im Rahmen der renalen Autoregulation steuert die Niere zudem den systemischen Blutdruck über den Renin-Angiotensin-(Aldosteron-) Mechanismus (Klinke et al. 2010).

1.2.2 Die diabetische Nephropathie

Definitionsgemäß spricht man von einer diabetischen Nephropathie, wenn pathologische Veränderungen der Glomeruli nach langem Diabetesverlauf entstanden sind, die von vaskulären, tubulären und interstitiellen Schäden begleitet werden (Arasteh et al. 2013). Zu Beginn fällt bei Diabetikern zunächst eine gesteigerte GFR auf. Diese Hyperfiltration nimmt mit zunehmender Schädigung der Nephrone wieder ab; es tritt eine fortschreitende Verschlechterung der Nierenfunktion auf. Strukturell kommt es früh zu einer glomerulären Hypertrophie und einer Nierenvergrößerung. Im weiteren Verlauf stehen dann vor allem die vernarbende Schädigung des Nierengewebes und das begleitende Entzündungsgeschehen im Vordergrund. Dabei bedingen sich die Verschlechterung der Nierenfunktion und strukturelle Veränderungen des Nierengewebes gegenseitig.

Die fortgeschrittene diabetische Nephropathie fällt histologisch vor allem durch Vernarbung der Glomeruli, die als Glomerulosklerose bezeichnet wird, auf. Merkmale dieser sind ein Podozytenverlust und eine zunehmende extrazelluläre Matrixablagerung, die initial durch die hyperglykämische Stoffwechselsituation bedingt sind. Im weiteren Verlauf kommen dann lokale inflammatorische Prozesse hinzu, die zu weiterer glomerulären Schädigung führen (Tuttle 2005). Funktionell tritt durch die Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere, insbesondere aufgrund des Podozytenverlust eine Albumin- und Proteinurie auf, die im Verlauf bei zunehmender Glomerulosklerose mit progredienter Einschränkung der Nierenfunktion einhergeht. Ebenfalls folgt häufig eine sekundäre tubulointerstitielle Nephritis, die infolge eines Tubulus-Zellschadens durch anhaltende Proteinurie, latenter tubulointerstitieller Ischämie und glomerulären Produktion von Entzündungsmediatoren auftritt. Tubulointerstitielle Leukozyteninfiltration und Fibrose sind die Folge, die ihrerseits die glomeruläre Filtration weiter einschränken (Vielhauer und Anders 2009). Es konnte bereits die renale Infiltration von Makrophagen und T-Lymphozyten im diabetischen Tiermodell nachgewiesen werden, die mit dem Nierenfunktionsverlust korreliert (Chow et al. 2004). Eine Hemmung der renalen Infiltration leukozytärer Entzündungszellen kann dagegen die diabetische Nephropathie im Tiermodell verbessern (Chow et al. 2005).

1. Einleitung

1.2.3 Tierexperimentelles Modell der diabetischen Nephropathie

Tierexperimentelle Modelle des Diabetes und der diabetischen Nephropathie spielen bei Untersuchungen der zugrundeliegenden Pathophysiologie und zur Identifizierung neuer therapeutischer Behandlungsansätze eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurden Knockout-Mäuse verwendet, um die funktionelle Rolle des atypischen Chemokinrezeptors 2 (ACKR2) bei der diabetischen Nierenschädigung zu charakterisieren. Als Mausmodell eines Diabetes wurde dabei die Streptozotocin-induzierte Hyperglykämie gewählt, die pathophysiologisch einem Typ I-Diabetes des Menschen entspricht. Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas gebildet, welches benötigt wird, um Glukose aus dem Blut in die Zellen aufzunehmen, wodurch sich der Blutzuckerspiegel senkt. Fehlt Insulin oder besteht eine mangelnde Sensitivität für Insulin, so führt dies zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels und Manifestation eines Diabetes. Durch die intraperitoneale Injektion von Streptozotocin (STZ) über fünf Tage kann in Mäusen ein Diabetes durch eine partielle Zerstörung der β -Zellen erzeugt werden. STZ ist ein Analogon der N-Acetylglucosamine. Es wird über den Glukosetransporter Typ 2 (GLUT-2 Rezeptoren) in die β -Zellen transportiert und wirkt β -Zell-toxisch (Tesch und Allen 2007). STZ inhibiert dabei die Aktivität des β -Zell Enzyms Protein-3-O-Serin/Threonin N-Acetylglucosaminylhydrolase (O-GlcNAcase), das dafür verantwortlich ist, dass O-gebundenes β -N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) von Proteinen entfernt wird. Es folgt eine irreversible O-Glykosylierung von intrazellulären Proteinen, welche zur β -Zell-Apoptose führt (Wu et al. 2017, Tesch und Allen 2007). In den Versuchstieren wird durch die STZ-Injektion und die dadurch resultierenden β -Zellzerstörung ein absoluter Insulinmangel induziert. Dies gleicht dem Typ-1-Diabetiker beim Menschen, bei dem die β -Zellen durch autoimmune Vorgänge zerstört werden und sich somit eine hyperglykämische Stoffwechsellsage einstellt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mäuse im genetischen C57BL/6J-Hintergrund entwickeln allerdings nach Induktion des Diabetes nur langsam eine diabetische Nierenschädigung. Zur Beschleunigung und Verstärkung des renalen Schadens kann bei den Mäusen vorab eine unilaterale Nephrektomie im Alter von etwa acht Wochen vorgenommen werden. Durch die hierdurch induzierte kompensatorische Hyperfiltration in der verbliebenen Niere mit erhöhter Belastung der glomerulären Filtrationsbarriere wird die nachfolgend auftretende diabetische Nierenschädigung akzeleriert. Zudem stellt die glomeruläre Hyperfiltration, die durch die Hyperglykämie selbst verursacht wird, einen wichtigen pathophysiologischen Mechanismus der diabetischen Nephropathie dar, die im angewandten Modell durch die einseitige Nephrektomie verstärkt wird.

1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

1.3.1 Einteilung und Funktion der Chemokine

Inflammatorische Vorgänge sind komplex reguliert und koordiniert. Dabei wird die Leukozytenimmigration aus der Blutbahn in geschädigtes Gewebe durch lokal gebildeten chemotaktische Botenstoffe, sogenannte Chemokine gesteuert, die an leukozytär-exprimierten Chemokinrezeptoren binden. Hierdurch werden Leukozyten aktiviert und eine Zellmigration entlang eines Konzentrationsgradienten zur höchsten Chemokinkonzentration ausgelöst, was als Chemotaxis bezeichnet wird (Rot und von Andrian 2004). Chemokine werden nach ihrer chemischen Struktur entsprechend der Anordnung von Cysteinresten (C) zwischen weiteren Aminosäuren (X) in vier Untergruppen aufgeteilt: CC-, CXC-, XC-, und CX3C-Chemokine (Abbildung 1.2). Vereinfacht lassen sich die Chemokine auch funktional grob untergliedern. Es gibt dabei sogenannte homöostatische Chemokine, die konstitutiv exprimiert werden und eine stetige physiologische Wanderung von Immunzellen zwischen Organen vermitteln (Calogero et al. 2018). Im Gegensatz dazu gibt es inflammatorische Chemokine, die nicht dauerhaft exprimiert werden und bei Gewebeschädigung induzierbar sind. Kommt es zu einer Entzündung, Infektion oder Gewebsverletzungen steigen diese stark an und vermitteln so eine Infiltration von Entzündungszellen an den Ort der Gewebeschädigung. Ein klassischer Vertreter inflammatorischer Chemokine ist das Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1), dass nach systematischer Nomenklatur (Tesch 2008) als CC-Chemokinligand 2 (CCL2) bezeichnet wird.

Die Chemokinrezeptoren sind an der Zelloberfläche exprimierte, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Entsprechend der Struktur ihrer Chemokinliganden werden die Rezeptoren als CCR-, CXCR-, XCR-, und CX3CR-Chemokinrezeptoren bezeichnet. Insbesondere bei inflammatorischen Chemokinen kann ein Rezeptor häufig innerhalb der gleichen strukturellen Untergruppe (z.B. der CC-Chemokine) mehrere Chemokine binden. Umgekehrt kann das gleiche Chemokin mehrere Chemokinrezeptoren der gleichen Gruppe aktivieren, allerdings mit unterschiedlicher Affinität (siehe Abbildung 1.2).

1. Einleitung

Chemokines			Chemokine receptors	
Common names	Function	Systematic names		
CXC-Chemokines	GCP-2	(i)	CXCL6	
	IL-8	(i)	CXCL8	CXCR1
	Gro- α , KC, MIP-2	(i)	CXCL1	
	Gro- β , CINC-2 α	(i)	CXCL2	
	Gro- γ , CINC-2 β	(i)	CXCL3	
	ENA78	(i)	CXCL5	
	NAP-2	(i)	CXCL7	
	PF4	(i)	CXCL4	
	MIG	(i)	CXCL9	
	IP-10	(i)	CXCL10	
	I-TAC	(i)	CXCL11	
	SDF-1	(h)	CXCL12	CXCR4
	BCA-1	(h)	CXCL13	CXCR5
	Bolekine BRAK	(i)	CXCL14	
CC-Chemokines	Lungkine	(h)	CXCL15	
	SR-PSOX	(?)	CXCL16	CXCR6
	MIP-1 α	(i)	CCL3	
	RANTES	(i)	CCL5	
	MCP-3	(i)	CCL7	
	MIP-3, MPIF-1	(i)	CCL23	
	MCP-1	(i)	CCL2	
	MCP-2	(i)	CCL8	
	MCP-4	(i)	CCL13	
	HCC-1, HCC-3	(i)	CCL14	
	HCC-2	(i)	CCL15	
	HCC-4	(i)	CCL16	
	Eotaxin	(i)	CCL11	
CC-	MPIF-2, eotaxin2	(i)	CCL24	
	MIP-4 α , eotaxin3	(i)	CCL26	
	TARC	(h)	CCL17	
	MDC	(h)	CCL22	
	MIP-1 β	(i)	CCL4	
	DC-CK1	(h?)	CCL18	
	MIP-3 α , LARC	(h)	CCL20	
	ELC	(h)	CCL19	
	SLC	(h)	CCL21	
	I-309, TCA-3	(i)	CCL1	
	TECK	(h)	CCL25	
	CTACK, ESkine	(h)	CCL27	
	MEC	(h)	CCL28	
CX ₃ C-	Lymphotactin	(i)	XCL1	
	SCM-1 β	(i)	XCL2	XCR1
CX ₃ C-	Fractalkine	(i)	CX ₃ CL1	CX ₃ CR1

Abbildung 1.2. Chemokine und typische Chemokinrezeptoren in der Übersichtsdarstellung (Vielhauer et al. 2004)

1. Einleitung

Das Chemokin-Chemokinrezeptorsystem ist daher ein redundantes, komplex reguliertes System, in dem die Aktivierung spezifischer Rezeptoren durch gleichsinnige oder kompetitive Interaktion mehrerer Liganden beeinflusst wird (Graham und Locati 2013). Die Redundanz des Chemokinsystems erschwert dabei die Charakterisierung spezifisch pathophysiologischer Funktionen einzelner Chemokine oder Chemokinrezeptoren (beispielsweise durch ihre experimentelle Blockade oder ihren Knockout) und die Identifizierung entsprechender therapeutischer Ansätze (Calogero et al. 2018). Hauptrezeptor für das proinflammatorische Chemokin CCL2 scheint jedoch der CCR2-Rezeptor zu sein, der auf verschiedenen Leukozytenpopulationen exprimiert wird. Alle Chemokinrezeptoren, die nach Bindung ihrer Liganden eine charakteristische intrazelluläre Signaltransduktion und Zellaktivierung induzieren, werden als typische Chemokinrezeptoren zusammengefasst (siehe dazu auch Abbildung 1.3 A).

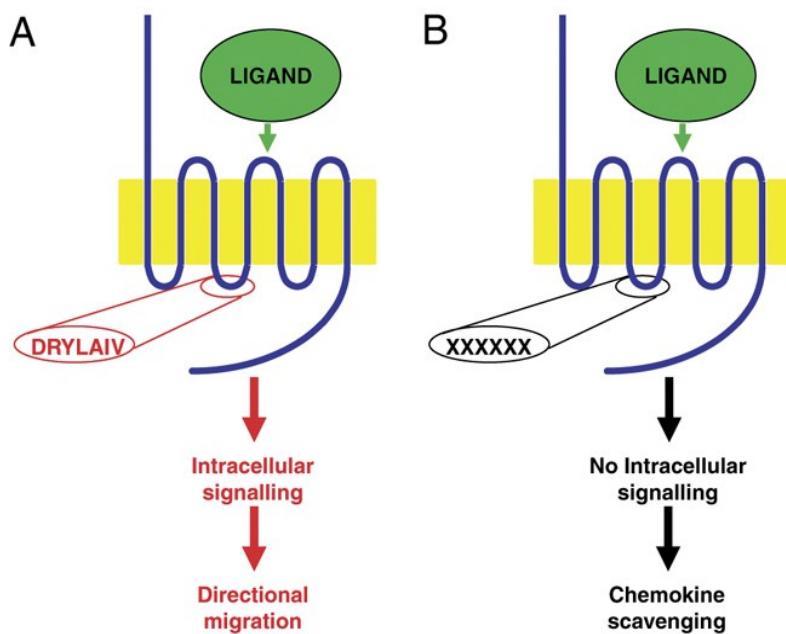


Abbildung 1.3. Schematische Darstellung von (A) typischen Chemokinrezeptoren und (B) atypischen Chemokinrezeptoren (Graham 2009)

1.3.2 Beeinflussung proinflammatorischer Chemokine im Entzündungsgeschehen der diabetischen Nephropathie

Auch für die renale Schädigung spielen lokal gebildete Chemokine und ihre leukozytär-exprimierten Rezeptoren eine wichtige Rolle. Zahlreiche tierexperimentelle Daten belegen ihre pathophysiologische Relevanz für die renale Leukozyteninfiltration, Gewebeschädigung und Nierenfunktionseinschränkung bei glomerulären und tubulointerstitiellen Erkrankungen. Dass durch ihre Blockade im Tiermodell nicht nur die

1. Einleitung

renale Leukozytenakkumulation, sondern auch der renale Schaden vermindert werden kann, verdeutlicht auch die potentiellen therapeutischen Möglichkeiten einer Chemokin- oder Chemokinrezeptorblockade bei renalen Erkrankungen (Vielhauer et al. 2004, Anders et al. 2010). So haben die Expression und Aktivierung des proinflammatorischen Chemokins CCL2 und seines Rezeptors CCR2 auch eine pathophysiologisch relevante Funktion für die renale Rekrutierung inflammatorischer Leukozyten und damit verbundenen Gewebsschädigung bei der diabetischen Nephropathie (Tesch 2008). Bei Diabetikern lassen sich erhöhte Spiegel von CCL2 im Serum und auch eine erhöhte Konzentration im Urin feststellen. Auch wurde gezeigt, dass hohe Glukosekonzentrationen oder die bei diabetischer Stoffwechsellage vermehrte Bildung glykosylierte Moleküle (Advanced Glycation End Products, AGEs) eine vermehrte CCL2-Produktion in humanen Mesangiumzellen verursachen (Tashiro et al. 2002; Ihm et al. 1998). Über CCL2 ist bekannt, dass es eine vermehrte Auswanderung von inflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn und schließlich die Extravasation und Infiltration in geschädigtes Gewebe wie zum Beispiel Glomeruli und das renale Interstitium vermittelt (Vielhauer et al. 2004). Weiterhin wird der CCL2-Rezeptor CCR2 von aktivierte Podozyten exprimiert, dessen Stimulation wiederum zur Schädigung der Podozyten beitragen kann (Lee et al. 2009; Nam et al. 2012).

CCL2 bzw. CCR2 scheinen somit eine pathophysiologische sowie therapeutische Relevanz für die diabetische Nephropathie zu haben, welche bereits durch die Blockade von CCL2 oder dessen Rezeptor tierexperimentell belegt worden sind (Chow et al. 2005; Tesch 2008; Chow et al. 2006; Sayyed et al. 2011). Hier wurde bereits im Tiermodell bei db/db Mäusen mit Typ 2-Diabetes mellitus gezeigt, dass CCL2 als Marker und Therapieansatz für entzündliche Prozesse bei der diabetischen Nephropathie dienen kann (Tesch 2008). Dies basiert auf den bereits bekannten Fakten, dass eine Anhäufung von Makrophagen in der Niere den schädigenden Prozess verstärkt und CCL2 zu ihrer Akkumulierung führt (Chow et al. 2005, Sayyed et al. 2011).

Zudem sprechen humane Daten für eine pathophysiologische Rolle der CCL2-CCR2-Achse bei der diabetischen Nephropathie. Eine erste klinische Studie am Menschen zur Hemmung von CCL2 bei diabetischer Nephropathie konnte mit positivem therapeutischem Effekt abgeschlossen werden. In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine 12-wöchige Blockade von CCL2 mit Emapticap-Pegol, einem CCL2 neutralisierenden Spiegelmer die Albuminurie in behandelten Typ II-Diabetikern senkt (Menne et al. 2017). In einer weiteren klinischen Studie am Menschen wurde gezeigt, dass die Hemmung des CCL2-Rezeptors CCR2 mit dem kleinmolekularen Inhibitor CCX140-B über 52 Wochen ebenfalls in einer signifikanten Reduzierung der Albuminausscheidung in Patienten mit Typ II-Diabetes resultiert (de Zeeuw et al. 2015).

1. Einleitung

Zusammenfassend sprechen die vorliegenden tierexperimentellen und humanen Daten somit für eine pathophysiologische Rolle des proinflammatorischen Chemokins CCL2 bei der diabetischen Nierenschädigung.

1.3.3 Überblick über die atypischen Chemokinrezeptoren

Seit einigen Jahren ist eine neue Gruppe von Chemokinrezeptoren bekannt, denen nach Bindung von Liganden im Gegensatz zu den bereits bekannten "typischen" Chemokinrezeptoren, deren charakteristische Eigenschaft, eine klassische Signaltransduktion und damit verbundene Leukozytenmigration zu vermitteln, fehlt (Abbildung 1.3 B). Sie werden als atypische Chemokinrezeptoren (ACKR) bezeichnet. (Mantovani et al. 2006; Ulvmar et al. 2011).

Atypische Chemokinrezeptoren verändern posttranslational lokale Chemokin-konzentrationen durch Bindung ihrer Chemokinliganden und deren intrazellulären Internalisierung. Das aufgenommene Chemokin kann nach transzellulärem Transport durch die Zelle erneut, zum Beispiel an der Endothelaußenseite, sezerniert oder intrazellulär abgebaut werden. Durch eine lokal reduzierte Konzentration proinflammatorischer Chemokine kann die lokale Leukozyteninfiltration vermindert werden. Daher ist auch den atypischen Chemokinrezeptoren eine indirekte Beeinflussung der Leukozytenmigration zuzuschreiben. Auch die atypischen Chemokinrezeptoren lassen sich grob nach ihrer Funktion in homöostatische (z.B. ACKR3, ACKR4) und in inflammatorische Rezeptoren (z.B. ACKR1) einteilen. Der atypische Chemokinrezeptor ACKR2, auch D6 genannt, gehört dabei zu letzteren (Graham und Locati 2013). Eine Übersicht über die Ligandenbindung gibt Tabelle 1.1. mit den jeweiligen atypischen Chemokinrezeptoren.

Übersicht über atypische Chemokinrezeptoren und ihre Liganden	
Rezeptor	Liganden
ACKR1 (DARC)	CCL1, 2, 5, 7, 8, 11, 13, 14, 16, 17, 18 CXCL5, 6, 8, 9, 10, 11, 13
ACKR2 (D6)	CCL2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 17, 22, 23, 24
ACKR3 (CXCR7)	CXCL11, 12
ACKR4 (CCX-CKR)	CCL19, 21, 25
ACKR5 (CCRL2)	CCL19

Tabelle 1.1. Übersicht über atypische Chemokinrezeptoren und Ihre Liganden (Graham und Locati 2013)

1.3.4 Der atypische Chemokinrezeptor 2

ACKR2 wird auf Leukozyten und lymphatischen Endothelzellen exprimiert (Rot et al. 2013; McKimmie et al. 2013). Im Ruhezustand findet man weniger als fünf Prozent der

1. Einleitung

Proteinrezeptoren tatsächlich auf der Zelloberfläche. Die meisten der Rezeptoren befinden sich intrazellulär in Vesikeln gespeichert (Blackburn et al. 2004). ACKR2 bindet mit hoher Affinität proinflammatorische CC-Chemokine, jedoch keine CXC-, XC-, CX3C- oder andere homöostatische CC-Chemokine. Nach Bindung der Chemokinliganden durch den ACKR2 führt dies zu einer gemeinsamen Internalisierung, gefolgt von einer Dissoziation der beiden Strukturen. Der ACKR2 wird daraufhin wieder an der Zelloberfläche exprimiert, während der Ligand intrazellulär abgebaut wird. (siehe Abbildung 1.4). Eine Bindung von proinflammatorischen Chemokinen wie CCL2 an seinen klassischen Rezeptor (zum Beispiel CCR2) führt dagegen nach induzierter Signaltransduktion zur Internalisierung des Rezeptors und seinem intrazellulären lysosomalen Abbau. Im Gegensatz zu typischen Chemokinrezeptoren steigt bei ACKR2 nach Ligandenbindung dessen Expression an der Zelloberfläche (Bonecchi et al. 2008) ACKR2 wird wegen dieser Eigenschaften als Chemokin-Scavenger, also "Chemokin-Fänger", bezeichnet. Somit scheint ACKR2 lokale Chemokinkonzentrationen zu reduzieren und eine lokale Leukozyteninfiltration und damit verbundene Entzündung einzudämmen (Abbildung 1.4). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Ackr2-defiziente Knockout-Mäuse einen erhöhten Chemokingehalt in entzündetem Gewebe mit verstärkter inflammatorischer Reaktion und Organschäden aufweisen, beispielsweise bei kutanen Entzündungen, allergischer Bronchopneumonie und nach Myokardinfarkt (Jamieson et al. 2005; Whitehead et al. 2007).

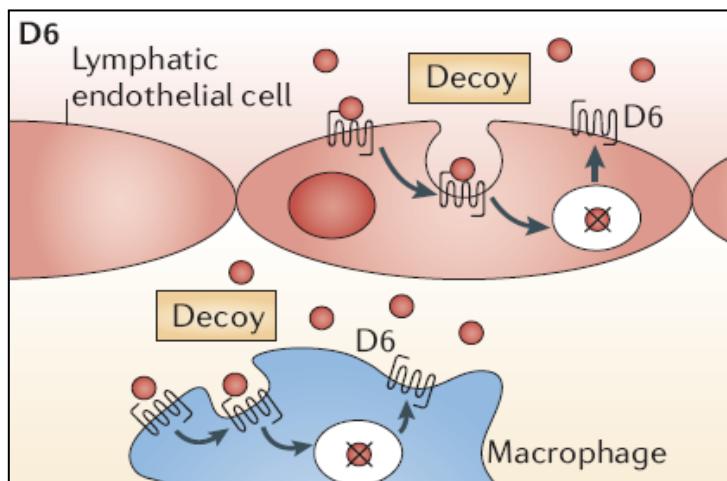


Abbildung 1.4. Darstellung der Internalisierung und intrazellulärem Abbau der Chemokine durch Ackr2 (D6) (Mantovani et al. 2006)

ACKR2 wird lokal in vielen Geweben exprimiert und ist auch schon vielseitig untersucht worden. Abbildung 1.5 zeigt, dass in der Maus unter physiologischen Bedingungen auch in der Niere eine konstitutive Ackr2-mRNA-Expression vorliegt und im Vergleich zu anderen Organsystemen auch hier eine klinische Relevanz bei der Modulation lokaler Chemokinkonzentrationen haben dürfte.

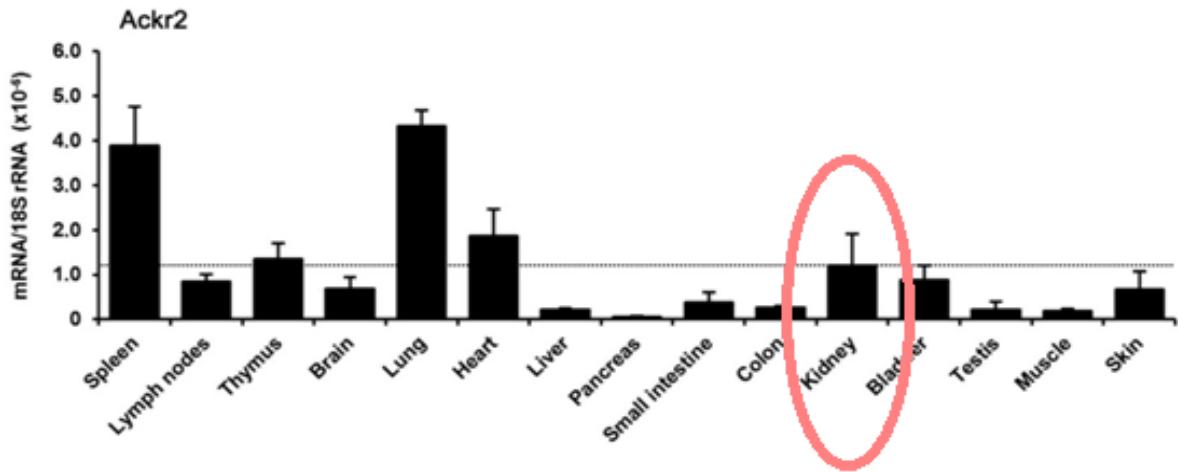


Abbildung 1.5. Darstellung der physiologischen mRNA-Expression von Ackr2 in verschiedenen Organen unbehandelter C57BL/6J-Kontrollmäuse (Lux et al. 2019)

1.4 Entzündungsbegrenzende Funktion von ACKR2 bei renalen Erkrankungen

Tatsächlich konnten Arbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe nachweisen, dass in Knockout-Mäusen mit Ackr2-Defizienz renale Entzündung, Fibrose und Schädigung bei chronischer Immunkomplex-Glomerulonephritis und nach Ischämie-Reperfusionsschaden zunimmt (Bideak et al. 2018, Lux et al. 2019). Beide Modelle beschäftigen sich mit der Beeinflussung inflammatorischer Prozesse durch ACKR2. Es wurden jeweils Ackr2-Knockout-Mäuse mit Wildtyp-Kontrollmäusen (C57BL/6J) verglichen. Im Modell der akuten Ischämie- und Reperfusion-Schädigung (Lux et al. 2019) wurden zwei Zeitpunkte untersucht. Einmal die kurze Zeitspanne von 1 und 5 Tagen nach initialer Schädigung, bei der es keinen Unterschied der renalen Schädigung zwischen den Wildtyp-Mäusen und Ackr2-Knockout-Mäusen gab, sowie die lange Versuchsdauer mit Nachbeobachtung über 5 Wochen. Hier zeigte sich in den Ackr2-Knockout-Mäusen eine stärkere Schädigung als in den Vergleichsnieren der Wildtyptiere. Begründet wurde dies durch den chronischen Prozess einer vermehrten renalen Einwanderung von mononuklearer Phagozyten, T-Zellen und Ly6^{high} inflammatorischen Makrophagen bei den Ackr2-Knockout-Mäusen. Weiterhin zeigte sich eine verstärkte renale Fibrose, verdeutlicht durch vermehrte interstitielle Matrixexpression und Akkumulation α -Smooth Muscle Actin-positiver Myofibroblasten. Auch trat ein vermehrter Tubulusverlust auf (Lux et al. 2019). Im Modell der chronischen Immunkomplex-Glomerulonephritis (Bideak et al. 2018) zeigten sich im zweiwöchigen Verlauf eine vermehrte Albuminurie und erhöhte Harnstoffkonzentrationen im Blut der

1. Einleitung

Ackr2-Knockout-Mäuse, was auf eine verstärkte renale Schädigung hinwies. Auch dies kann durch die nachgewiesene vermehrte renale Einwanderung von mononukleären Phagozyten und CD4+ T-Zellen aufgrund der fehlenden ACKR2-abhängige Reduzierung renaler Entzündungsmediatoren wie CCL2 begründet werden. Es fanden sich unter anderem vermehrte CCL2-Spiegel in Nieren und Blut der Ackr2-Knockout-Mäuse (Bideak et al. 2018).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass im Mausmodell ACKR2 bei chronisch progredienten renalen Erkrankungen eine nephroprotektive Funktion besitzt, da bei Ackr2-Defizienz mit Fehlen seiner Chemokin-abbauenden Funktion eine vermehrte renale Leukozyteninfiltration, Entzündung, Fibrose und Organschädigung auftreten.

1.5 Zielsetzung der Arbeit und Fragestellung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss des atypischen Chemokinrezeptor ACKR2 auf den Verlauf der diabetischen Nephropathie untersucht werden. Basierend auf den bereits erörterten Vordaten lag der Arbeit die Hypothese zugrunde, dass ACKR2 durch seine entzündungsbegrenzende Funktion auch die Entwicklung des diabetischen Nierenschadens reduzieren oder verzögern kann. Zudem wurde in der Arbeit untersucht, ob ACKR2 im gewählten Tiermodell die Entwicklung des Diabetes mellitus nach β -Zellschädigung in Pankreas beeinflusst.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- A.** Wird nach STZ-Gabe der Diabetes unabhängig von einer Ackr2-Defizienz in Wildtyp- und Ackr2-Knockout-Mäusen gleichermaßen induziert?
- B.** Führt die diabetische Stoffwechselleidung durch die chronische Hyperglykämie in dem gewählten Tiermodell zur Schädigung der Nieren mit Beeinträchtigung der Nierenfunktion?
- C.** Führt entsprechend der zugrundeliegenden Arbeitshypothese Ackr2-Defizienz durch verminderten lokalen Abbau von proinflammatorischen Chemokinen wie CCL2 in der Niere zu einer vermehrten renalen Leukozyteninfiltration oder auch direkten Podozytenschädigung?
- D.** Führt Ackr2-Defizienz infolge vermehrter renaler Leukozyteninfiltration und/oder Podozytenschädigung zu einer rascher progredienten glomerulären und tubulointerstitiellen Nierenschädigung, Entzündung und Vernarbung?

Durch Nachweis einer entzündungsbegrenzenden und nephroprotektiven Funktion von ACKR2 im diabetischen Nephropathie-Modell könnte ACKR2 als interessantes Zielmolekül neuartiger Therapieansätze zur Progressionsverlangsamung des diabetischen Nierenschadens identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialen

2.1.1 Tierhaltung

Materialien für die Tierhaltung

Material	Firma
H-TEMP POLYSULFON - PSU - 1284L EUROSTANDARD TYP II L365 x 207 x 140 mm-GF 530 cm ²	Tecniplast, Hamburg
Innenliegender Gitterdeckel - verstärktem Edelstahl-Draht-Rahmen	Tecniplast, Hamburg
Polysulfon (PSU) H-Temp Filterhaube mit Verschlusskammer	Tecniplast, Hamburg
Polyester Filtervlies - 92 % Partikelrückhaltevermögen 8-10 µm	Tecniplast, Hamburg
Polycarbonat Trinkflasche 250 ml Ø 56 x 154 mm	Tecniplast, Hamburg
Polycarbonat Trinkflasche 400 ml 72 x 72 x 122 mm	Tecniplast, Hamburg
Rotes Mäusehaus	Tecniplast, Hamburg
Grobes Einstreu aus Espenholz [190 g/L]	Abedd, Ssniff, Soest
Nestlets	Ssniff, Soest
Nagestäbchen aus Espenholz S-Bricks 1x4 cm	Ssniff, Soest

Standardfutter Zusammensetzung (Ssniff, Soest)

Inhaltsstoffe	Menge
Rohprotein	22,0%
Rohfett	4,5%
Rohfaser	3,9%
Rohasche	6,7%
Kalzium	1,0%
Phosphor	0,7%
Vitamin A	25000 U/kg
Vitamin D ₃	1500 U/kg
Vitamin E	125 mg/kg
Eisen-(II)-sulfat Monohydrat	100 mg/kg
Zinksulfat Monohydrat	50 mg/kg
Mangan-(II)-sulfat Monohydrat	30 mg/kg
Kupfer-(II)-sulfat Pentahydrat	5 mg/kg
Natriumselenit	0,1 mg/kg
Kalziumjodat Anhydrat	2,0 mg/kg

2. Material und Methoden

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
96-well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Gewebekassetten Histosette-II	NeoLab, Heidelberg
Kanülen BD Micronance 19G, 26G, 30G	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
Leukosilkpflaster	BSN medical GmbH, Hamburg
VYCRIL Nahtfaden-resorb. 5-0, P-3	Johnson Medical, Norderstedt
ETHIBOND Nahtfad.-nichtresob.5-0,PS-3	Johnson Medical, Norderstedt
Pipettenspitzen 1-1000 µl	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Pipettenkanüle 10 ml	Peske, Aindlingen-Arnhofen
Rasierklingen SWORD	Wilkinson, Solingen
Serologische Pipetten 5, 10, 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Skalpelle No. 11 und 20	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
Spritzen BD Plastipak 1 ml	Becton Dickinson, Madrid, Spanien
Spritzen BD Discardit 2, 5, 10 und 20 ml	Becton Dickinson, Fraga, Spanien
Spritzen 2 ml, 5 ml, 10 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Steriles Abdecktuch 45x75 cm	Sengewald Klinikprodukte, Rohrdorf
Sterile Kompressen	Verbandmittel Danz GmbH, Eußenheim
Sterile Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz, Wetter
Super Frost Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Tubes 1,5 ml, 2 ml, 15 ml und 50 ml	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen Ø 60 und 96 mm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb 70 µm und 100 µm	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.3 Mehrfachartikel

Name	Firma
Klemme	Servoprax GmbH, Wesel
Messbecher	Servoprax GmbH, Wesel
Inhalationsvorrichtung	Konstruktion AG Vielhauer ,Anders, München
Injektionsvorrichtung	Konstruktion AG Vielhauer, München
Schere	Servoprax GmbH, Wesel
Pasteurpipette	Roth, Karlsruhe
Pinzette spitz-fein und stumpf	Servoprax GmbH, Wesel
Pipettierhilfe Pipetus Classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton, WI, USA

2. Material und Methoden

2.1.4 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Medikamente für Narkose und Schmerzbehandlung

Wirkstoff	Handelsname	Firma
Atipamezol	Revertor®	CP-Pharma, Burgdorf
Dexpanthenol	Bepanthen Auge.	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Buprenorphin	Buprenovet	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Fentanyl	Fentanyl-Jassen®	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Flumazenil	Anexate®	Hexal AG, Holzkirchen
Isofluran	Isofluran CP®	CP-Pharma, Burgdorf
Midazolam	Dormicum®	Ratiopharm GmbH, Ulm
Medetomidin	Dorbene vet®	Zetis GmbH, Kaiserslautern
Metamizol	Novalgin®	Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt a.M.
Naloxon	Naloxon-ratiopharm®	Ratiopharm GmbH, Ulm

Medikamente zur intravenösen und intraperitonealen Anwendung

Name	Firma
FITC-Sinistrin	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.
Streptozotocin	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

Citrat-Puffers, Ziel-pH 4,3

Reagenz	Benötigte Masse [g] in 50 ml ddH ₂ O	Anteil
0,1 M Natriumcitrat	1,47	2
0,1 M Zitronensäure	1,05	3

Vorgefertigte Kits/Antikörper ELISA-Assays

Name	Firma
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Bradfordragenzien Liquit	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
CCL2/MCP-1	R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
DNase Set	Qiagen, Hilden, D
Kreatinin Kit-Creatininin FS* Dia Sys	Qiagen, Hilden, D
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
VectaMount	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite ABC	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2. Material und Methoden

Allgemeine Chemikalien und Enzyme

Name	Firma
5x First strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
10 x Taq Puffer without detergent	Fermentas, St-Leon-Rot
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
AccuCheck Counting Beads	Life Technologies, Carlsbad, USA
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Aqua zur Injektion	Braun, Melsungen
Avidin-Biotin Complex Reagenz	Sigma, Deisenhofen
Äther	Merck, Darmstadt
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten
Borsäure	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roche, Mannheim
Cytofix/Cytoperm Plus	Becton Dickinson, Heidelberg
Diaminobenzidin	Sigma, Deisenhofen
DAB	Sigma, Deisenhofen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
DNAase Typ III	Sigma, Deisenhofen
DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (25nM)	GE Healthcare, München
DPBS	Merck, Darmstadt
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
EDTA	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Puffer	Becton Dickinson, Heidelberg

2. Material und Methoden

Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gelatine	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Hexanukleotide	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Kollagenase A	Roche, Mannheim
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen
Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt
Lysing Solution	Becton Dickinson, Heidelberg
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (25 mM)	Fermentas Scientific, Waltham, USA
Methanol	Sigma, Deisenhofen
Methylgrün	Sigma, Deisenhofen
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
NaCl	Braun, Melsungen
Ni ₂ Cl	Sigma, Deisenhofen
Normal Mouse Serum	Jackson, West Grove, PA, USA
Normal Rat Serum	Jackson, West Grove, PA, USA
NP40 Sigma	Aldrich, Deisenhofen
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Pan Biotech, Aidenbach
PCR-Puffer	Minerva BioLabs, Berlin
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
Phosphatase	Merck, Darmstadt
PTX3 Primer	metabion international AG, Planegg
RIPA-Puffer	Merck, Darmstadt
RNasin (40U/µl)	Promega, Mannheim
RNA loading buffer	Sigma, Deisenhofen
RNase free Spray	Gene Choice, Frederick, USA
RPMI-Medium	Merck, Darmstadt
Salzsäure - HCl	Merck, Darmstadt
Standard Tag Reaction Buffer	New Enland Biolabs, Franfurt a.M.
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR® Green	Sigma, Deisenhofen
Taq-Polymerase	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt

2. Material und Methoden

Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Torrance, USA
TRIS	Roth, Karlsruhe
TRIS-HCl	Roth, Karlsruhe
Tryptan Blau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
VectaMount	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastain Elite ABC	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid - H ₂ O ₂ - 30%	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

Eigene Mixturen/Puffer:

Mastermix für reverse Transkription	20 µl Ansatz/Probe
Reagenz	Volumen Ansatz [µl]
First Strand Buffer (FS-Puffer)	4,5
25 mM dNTPs	0,45
0,1 M DTT	1
Lineares Acrylamid	0,25
Hexanucleotide	0,25
Recombinat RNAasin (= Rublinukleaseinhibitor)	0,5
SuperScript (= Reverse Transkriptase)	0,5
Gesamt	7,45

Mastermix für die qPCR zur Quantifizierung von cDNA

Reagenz	Volumen [µl]
SYBR® Green 2x	10
Taq Polymerase	0,16
Forward Primer	0,6
Reverse Primer	0,6
Gesamt	11,36

2. Material und Methoden

Mastermix zur Genotypisierung mittels PCR

Reagenz	Volumen [μ l]
10x PE Puffer	2,5
11,25 mM dNTPs	4
Forward Primer WT	1
Forward Primer KO	1
Reverse Primer	1
Taq DNA Polymerase	0,2
ddH ₂ O	13,3
Gesamt	23

10x Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) Puffer

Reagenz	Menge [g]
KCl	4
KH ₂ PO ₄	0,6
NaCl	80
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,621
NaHCO ₃	3,5
CaCl ₂	1,4
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1
D-Glukose	10
ddH ₂ O	ad 1000 ml

10x HBSS Puffer ohne Ca²⁺ und Mg²⁺

Reagenz	Menge [g]
KCl	4
KH ₂ PO ₄	0,6
NaCl	80
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,621
ddH ₂ O	ad 1000 ml

2. Material und Methoden

Paris-Puffer

Reagenz	Menge [g]
Tris HCL	2,4228
NaCl	7,31
KCl	2,0
Natriumacetat	0,8203
Glukose	0,9
ddH ₂ O	ad 1000ml, pH 7,4

PBND-Puffer

Reagenz	Menge [ml]
2 M KCl	2,5
1 M TRIS-HC	1
1 M MgCl ₂	0,25
0,1% Gelatine	10
100% NP40	0,45
100% Tween 20	0,45
ddH ₂ O	ad 100 ml

TBE Puffer

Reagenz	Menge [g]
TRIS	108
Borsäure	55
EDTA	5,84
ddH ₂ O	ad 1000 ml

DAB-Färbelösung

Reagenz	Menge [ml]
TRIS-HCl (37°C)	200
DAB	4
NiCl ₂	1
3% H ₂ O ₂	0,0005

2. Material und Methoden

Kollagenase-Lösung (1) und Kollagenase-Lösung mit DNase (2)

Reagenz	Menge [mg]
Kollagenase Typ I	10
DNase Typ IV *(nur in Lösung (2))	1
HBSS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	1 ml

2.1.5 Antikörper und Primer

Durchflusszytometrie

Anti-Maus Antikörper Isotypen für die Durchflusszytometrie	Firma
Anti-CCR2-FITC Klon 475301 (Isotyp: Ratte IgG2b- FITC)	R&D Systems, Abingdon, UK
Anti-CD11b-PE, Klon M1/70 (Isotyp: Ratte IgG2b κ-PE)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD11c-FITC, Klon HL3 (Isotyp: Hamster IgG1 λ1- FITC)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD3ε-FITC, Klon 145-2C11	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD40-PE, Klon 3/23 (Isotyp: Ratte IgG2a κ-PE)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD45-PE, Klon 30-F11	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD45-PE-Cy5, Klon 30-F11	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD4-APC, Klon RM4-5	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD8α-PE-Cy5, Klon 53-6.7	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-F4/80-APC, Klon C1:A3-1 (Isotyp: Ratte IgG2b- APC)	AbD Serotec, Oxford, Großbritannien
Anti-Ly6C-FITC, Klon RB-8C5	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Ly6G-FITC, Klon IA8 (Isotyp: Ratte IgG2a κ-FITC)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Kollagen I-Biotin (polyklonal)	Rockland, Limerick, USA
Streptavidin-APC	BD Pharmingen, Heidelberg

Immunhistochemie

Antikörper für die Immunhistochemie	Firma
Ratte anti-Maus ER-HR3, Klon 2012	BMA Biomedicals, Augst, Schweiz
Ratte anti-Maus F4/80, Klon A3-1	AbD Serotec, Oxford, Großbritannien
Ratte anti-Mensch CD3 (kreuzreaktiv mit Maus), Klon CD3-12	AbD Serotec, Oxford, Großbritannien

2. Material und Methoden

Oligonukleotid-Primer für die quantitative PCR

(F, Forward Primer; R, Reverse Primer)

Gen	Primer-Sequenz	Firma
Ackr2	F: 5'-CTTCTTTACTCCCGCATCG-3' R: 5'-TATGGAACCCACAGCATGAA-3'	Metabion, Planegg
Ccr2	F: 5'-GCTGTGTTGCCTCTTACAGCAG-3' R: 5'-CAAGTAGAGGCAGGATCAGGCT-3'	Metabion, Planegg
Ccl2	F: 5'-CCTGCTGTTCACAGTTGCC-3' R: 5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3'	Metabion, Planegg
Ccl5	F: 5'-CCACTTCTTCTGGGTTGG-3' R: 5'-GTGCCACGTCAAGGAGTAT-3'	Metabion, Planegg
Cxcl10	F: 5'-GGCTGGTCACCTTCAGAAG-3' R: 5'-ATGGATGGACAGCAGAGAGC-3'	Metabion, Planegg
Tnf- α	F: 5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' R: 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3'	Metabion, Planegg
Tnfr1	F: 5'-ATGGATGTATCCCCATCAGC-3' R: 5'-CTTCATTACCGAGCGTTGTC-3'	Metabion, Planegg
Tnfr2	F: 5'-AGATCTGGCACTCGTACCCA-3' R: 5'-GTCTTCGAACTGCAGCTGTG-3'	Metabion, Planegg
Ifn- α	F: 5'-GGCAAAAGGACGGTAACACG-3' R: 5'-TTCACCTCGAACCTGGCGAT-3'	Metabion, Planegg
Ifn- γ	F: 5'-ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT-3' R: 5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3'	Metabion, Planegg
Il-1 β	F: 5'-TGGCAGAAAGGGAACAGAAA-3' R: 5'-CTGGCTGATGGACAGGGAGAT-3'	Metabion, Planegg
Il-6	F: 5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3' R: 5'-ACCAGAGGAAATTTCATAGGC-3'	Metabion, Planegg
Il-10	F: 5'-ATCGATTCTCCCCTGTGAA-3' R: 5'-TGTCAAATTCAATTGCT-3	Metabion, Planegg
Il-12 β	F: 5'-GATTCAGACTCCAGGGGACA-3' R: 5'-GGAGACACCAGCAAAACGAT-3'	Metabion, Planegg
iNos1	F: 5'-TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG-3' R: 5'-TGAAGAAAACCCCTTGTGCT-3'	Metabion, Planegg

2. Material und Methoden

Msr-1	F: 5'-CCTCCGTTCAGGAGAAGTTG-3' R: 5'-TTTCCCAATTCAAAAGCTGA-3'	Metabion, Planegg
Mrc1	F: 5'-ATATATAAACAGAACATGGTGGGCAGT-3' R: 5'-TCCATCCAAATGAATTCTTATCC-3'	Metabion, Planegg
Arg1	F: 5'-AGAGATTATCGGAGCGCCTT-3' R: 5'-TTTTCCAGCAGACCAGCTT-3'	Metabion, Planegg
Fizz-1	F: 5'-CCCTTCTCATCTGCATCTCC-3' R: 5'-CTGGATTGGCAAGAACAGTTCC-3'	Metabion, Planegg
Tgf β	F: 5'-TGATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3' R: 5'-CACAAGAGCAGTGAGCGCTGAA-3'	Metabion, Planegg
Nephrin	F: 5'-CTGGGGGACAGTGGATTGAC-3' R: 5'-GGTCTGTCTTCAGGAGCC-3'	Metabion, Planegg
Kim-1	F: 5'-CTGGAATGGCACTGTGACATCC-3' R: 5'-GCAGATGCCAACATAGAACGCC-3'	Metabion, Planegg
Ngal	F: 5'-AATGTCACCTCCATCCTGGT-3' R: 5'-ATTCAGAGACTGAACTGGC-3'	Metabion, Planegg
Timp2	F: 5'-GCAACAGGCCTTGCAATG-3' R: 5'-AGGTCTTGAACATCTTATCTGC-3'	Metabion, Planegg
Collagen 1a1	F: 5'-ACATGTTCAGCTTGACCTGGACC-3' R: 5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3'	Metabion, Planegg
Collagen 4a1	F: 5'-GTCTGGCTTCTGCTGCTCTT-3' R: 5'-CACATTTCACAGCCAGAG-3'	Metabion, Planegg
α -Sma	F: 5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3' R: 5'-GTTCACTGGTGCCTCTGTCA-3	Metabion, Planegg
Fsp1	F: 5'-CAGCACTCCTCTCTGG-3' R: 5'-TTTGTGGAAGGTGGACACAA-3'	Metabion, Planegg
Ctgf	F: 5'-AGCTGACCTGGAGGAAAACA-3' R: 5'-CCGCAGAACTTAGCCCTGTA-3'	Metabion, Planegg
Fibronectin	F: 5'-GGAGTGGCACTGTCAACCTC-3' R: 5'-ACTGGATGGGTGGAAAT-3'	Metabion, Planegg
Laminin	F: 5'-CATGTGCTGCCTAACGGATGA-3' R: 5'-TCAGCTTAGGAGATGCCA-3'	Metabion, Planegg
18S RNA	F: 5'-GCAATTATTCCCCATGAACG-3' R: 5'-AGGGCCTCACTAACCCATCC-3'	Metabion, Planegg

2. Material und Methoden

2.1.6 Geräte

Gruppe	Gerät	Firma
Autoklav		
	Autoklav 23	Melag Medizintechnik, Berlin
Blutzuckermessgerät		
	Accu-Chek Aviva	Roche Diabetes Care GmbH, Mannheim
	Blutzuckermessgerät	
Durchflusszytometer		
	FACS Calibur	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
ELISA-Reader		
	GENios Plus	Tecan, Crailsheim
GFR-Messvorrichtung		
	NIC-Kidney Patches 3x3cm, 2- Licht+Photodiode	MediBeacon GmbH, Mannheim
	Rechargeable batteries for NIC- Kidney devices	MediBeacon GmbH, Mannheim
	Transdermal GFR Monitor	MediBeacon GmbH, Mannheim
Homogenisator		
	ULTRA-TURRAX®	IKA-Werke, Staufen
Mikroskope/Histologie		
	Leica DC 300F	Leica Microsystems, Cambridge, Großbritannien
	Olympus BX50	Olympus Microscopy, Hamburg
	Cryostat CM3000	Leica Microsystems, Bensheim
	Cryostat RM2155	Leica Microsystems, Bensheim
	Magnet Cell Separation	Magnet Becton Dickinson, Heidelberg
	Mikrotom HM340E	Microm, Heidelberg
	Mikrotom RM2125	Leica Microsystems, Bensheim
PCR-Gerät		
	LightCycler 480 Real-Time PCR- System	Roche Diagnostics GmbH, Unterhaching
	ABI prism 7700 sequence detector	PE Biosystems, Weiterstadt
	Sonifier B-12	Branson Sonic power, Danbury, USA
	Ultra Turra T25 basic	IKA GmbH, Staufen

2. Material und Methoden

Perfusionsgerät

Perfusionsgerät Konstruktion AG Vielhauer, München

pH-Meter

pH-Meter WTW WTW, Weilheim

Spektrophotometer

Beckman DU 530 Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA

NanoDrop Sepectophotometer ND- Biotechnologie GmbH, Bernried
1000

Thermocycler

UNO-II-Cycler Biometra, Göttingen

Mastercyler® pro Eppendorf, Hamburg

Thermomixer comfort Eppendorf, Hamburg

Thermomixer compact Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436 Eppendorf, Hamburg

UV-Licht

UV-Licht Bachofer Laborgeräte, Reutlingen

Vortex

Vortex Genie 2 Bender & Hobein, Zürich, Schweiz

Waagen

Waage BP 110 S Sartorius, Göttingen

Waage Mettler PJ 3000 Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz

Waage-LS2000H G&G GmbH, München

Wasserbad

Wasserbad HI 1210 Leica Microsystems, Bensheim

Wärmelampe

Infrared Rotlicht R95E 100 W Philips, Pila, Polen

Wärmeplatte

Wärmeplatte-12511 MedaxGmbH, Neumünster,

Zentrifugen

Heraeus Biofuge primo Kendro Laboratory Products, Hanau

Heraeus Minifuge T VWR International, Darmstadt

Heraeus Sepatech Biofuge A Heraeus Sepatech, München

2. Material und Methoden

2.1.7 Software

Programm	Firma
ABI PRISM Sequence Detection Software 1.0	Applied Biosystems, Weiterstadt
CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
Citavi	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
GraphPad Prism Version 8.0.2	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
Firefox 3.6	Mozilla, Mountain View, CA, USA
ImageJ (Fiji)	Wayne Rasband, London, Großbritannien
InStat 3.05	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
LightCycler® 480 Software	Roche Life Science, Mannheim
MPD Lab Software	Mannheim Pharma & Diagnostics GmbH
Microsoft Excel Office 2007	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Word Office 2007 und 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft PowerPoint Office 2010	Microsoft, Redmond, WA, USA
NanoDrop 1000 V2.81	Biotechnologie, Bernried
Photoshop	Adobe, San José, USA
QWin	Leica Microsystems, Bensheim
Windows XP Professional, 7 und 10	Microsoft, Redmond, WA, USA

2. Material und Methoden

2.2 Tierexperimentelle Methodik

2.2.1 Versuchstiere

Um eine Beeinflussung der diabetischen Nephropathie durch ACKR2 im Tiermodell zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit Wildtyp-Mäuse und Ackr2-defiziente Knockout-Mäuse ($\text{Ackr2}^{-/-}$ -Mäuse) im genetischen C57BL/6J-Hintergrund mit induzierter diabetischer Nierenschädigung miteinander verglichen. Beide Mauslinien wurden in der eigenen Tierhaltung gezüchtet, nachdem sie aus Wurfgeschwistern heterozygot verpaarter $\text{Ackr2}^{-/-}$ -Mäuse etabliert worden waren. Die $\text{Ackr2}^{-/-}$ -Mauslinie war in der Arbeitsgruppe von Professor Gerard Graham, The Beatson Institute for Cancer Research, Glasgow generiert und in einen C57BL/6J-Hintergrund rückgekreuzt worden (Jamieson et al. 2005). Ihre offizielle Bezeichnung lautet Ackr2^{tm1Gjg} . Zuchtpaare der Ackr2-defizienten Mäuse waren der eigenen Arbeitsgruppe ursprünglich durch Kooperation mit Professor Massimo Locati, Abteilung für Medizinische Biotechnologie und Translationale Medizin, Università degli Studi di Milano, Mailand zur Verfügung gestellt und über Embryotransfer in die eigene Tierhaltung übernommen worden. C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen.

Tabelle 2.1. Mauslinien im Überblick

Bezeichnung im Text	Vollständiger Name	Züchter
WT	C57BL/6J	Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA
$\text{Ackr2}^{-/-}$	Ackr2^{tm1Gjg}	Prof. Locati, Mailand

2.2.2 Tierhaltung

Die Tiere wurden unter spezifisch Pathogen-freien (SPF)-Bedingungen gezüchtet und gehalten. In einem Käfig befanden sich zwei bis fünf Mäuse. Zu Wasser und Futter hatten die Tiere uneingeschränkten Zugang. Das Streu, Futter, Wasser, Häuschen und Käfige wurden durch Autoklavieren vor jedem Benutzen sterilisiert. Alle Tierexperimente wurden entsprechend den deutschen Tierschutzbestimmungen durchgeführt und waren von der Regierung von Oberbayern genehmigt worden.

2.2.3 Genotypisierung

Zur Sicherstellung des korrekten Genotyps der Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäuse wurde eine Genotypisierung mit genomicscher DNA durchgeführt, die aus der Schwanzspitze der Tiere gewonnen wurde. Hierfür wurden zu der Gewebeprobe 200 µl 1x

2. Material und Methoden

PBND-Puffer mit 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) hinzugefügt und für 4 Stunden bei 56°C inkubiert.

Tabelle 2.2. Mastermix zur Genotypisierung

Reagenz	Volumen [µl]
10x PE Puffer	2,5
11,25 mM dNTPs	4
Forward Primer Wildtyp	1
Forward Primer Knockout	1
Reverse Primer	1
Tag DNA Polymerase	0,2
H ₂ O	13,3
Gesamt	23

Die Probe wurde anschließend für 2 min bei 14.000 G zentrifugiert. Danach wurden jeweils 1,5 µl von dem die genomische DNA enthaltenden Überstand entnommen und zu 24 µl des Mastermix (Tabelle 2.2) gegeben. Anschließend erfolgte mithilfe der spezifischen Ackr2-Wildtyp- und Knockout-Primer die Amplifikation der Wildtyp- und Knockout-Allele mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) im Thermocycler unter Verwendung des folgenden PCR-Protokolls (Tabelle 2.3):

Tabelle 2.3. Thermocycler-Protokoll für die Genotypisierung

Protokoll	Zieltemperatur [°C]	Dauer [s]
1. Initiale Denaturierung	94	180
2. Denaturierung zu Einzelsträngen	94	20
3. Annealing (Hybridisierung der Primer)	64	30
4. Elongation	72	35
5. Denaturierung zu Einzelsträngen	94	20
6. Annealing (Hybridisierung der Primer)	58	30
7. Elongation	72	35
8. Abschließende Polymerisation	72	120
9. Abkühlung	4	∞

Dabei wurden die Schritte 2 bis 4 jeweils 12-mal wiederholt. Im Anschluss die Schritte 5 bis 7 jeweils 25-mal wiederholt, um eine exponentielle Vervielfältigung der untersuchten Genabschnitte zu erreichen.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.4. Primer-Übersicht für die Genotypisierung

ACKR2	Sequenz
Primer "A"	5'-CAGAGCTGAGATGGTCCCAA-3'
Primer "B"	5'-AGTAAGGCTCTCGGTGAACAG-3'
Primer "C"	5'-AGCCGTCACCTTAATATGCG-3'

Die Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte anschließend mittels einer Gelelektrophorese. Zur Herstellung des Elektrophorese-Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer gelöst, erhitzt und anschließend mit 7 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt. Das Gel wurde in Gelträger gegossen und mit einem Kamm versehen, um nach Aushärtung und Entfernung des Kamms die gewünschten Vertiefungen (Taschen) im Gel zu erhalten, in die später die Proben pipettiert wurden. Die Tierproben, eine negativ Kontrollprobe mit Aqua sowie ein DNA-Größenstandard wurden vor dem Einbringen in das Gel mit 5 µl 6x-Glycerinladepuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 Volt und 400 mA durchgeführt. Nach 30 min wurden die Gelplatten unter UV-Licht fotografiert.

Die gegenläufigen Primer „A“ und Primer „B“ bilden die genomische Sequenz des ACKR2 Gens ab und konnte somit als 260 bp-großes PCR-Produkt in der Gelelektrophorese abgelesen werden. Bei alleinigem Auftreten dieser 260 bp-großen Bande konnte somit eine homozygote Wildtypmaus nachgewiesen werden. Hingegen bildeten die Primer „A“ mit Prima „C“ ein Sequenzpaar, dass ein 550 bp großes PCR-Produkt entstehen lässt und bei alleinigem Auftreten den homozygoten Ackr2-Knockout nachweist. Dieser Tatsache liegt zu Grunde, dass bei der Rekombination die komplette Deletion der Ackr2-kodierten Sequenz im Austausch mit einer Neomycin-Sequenz erfolgte.

Die folgenden Experimente wurden an männlichen homozygoten Wildtyp- und homozygoten Ackr2-Knockout-Mäusen durchgeführt.

2.2.4 Tierexperimentelles Modell der diabetischen Nephropathie

Zur Überprüfung der Arbeitshypothesen dieser Promotionsarbeit wurde in zwei Versuchstiergruppen, Wildtyp- und Ackr2-Knockout-Mäuse, das Modell eines Diabetes mit nachfolgender diabetischer Nierenschädigung induziert (Abbildung 2.1). Die Versuchstiere wurden im Alter von acht Wochen zunächst einer unilateralen Nephrektomie unterzogen. Nach zwei Wochen Regeneration wurde den Versuchstieren zur Induktion einer diabetischen Stoffwechsellsage ab Tag 0 Streptozotocin fünf Tage in Folge intraperitoneal verabreicht. Die Versuchstiere wurden anschließend für 25 Wochen beobachtet. Es wurden wöchentlich Blut- und Urinproben abgenommen. In Woche 23 wurde eine Bestimmung der Nierenfunktion mittels GFR-Messung durchgeführt. Am

2. Material und Methoden

Versuchsabschluss in Woche 25 erfolgten die Gewinnung von Vollblut und die Organentnahme von Nieren, Knochenmark und Milz für weitere Analysen. Um den Erfolg der Diabetesinduktion und der daraus folgenden schädigenden Wirkung analysieren zu können, wurden zusätzlich die gleichen Untersuchungen mit Organen von gleichaltrigen gesunden Kontrolltieren (WT und Ackr2^{-/-}) durchgeführt.

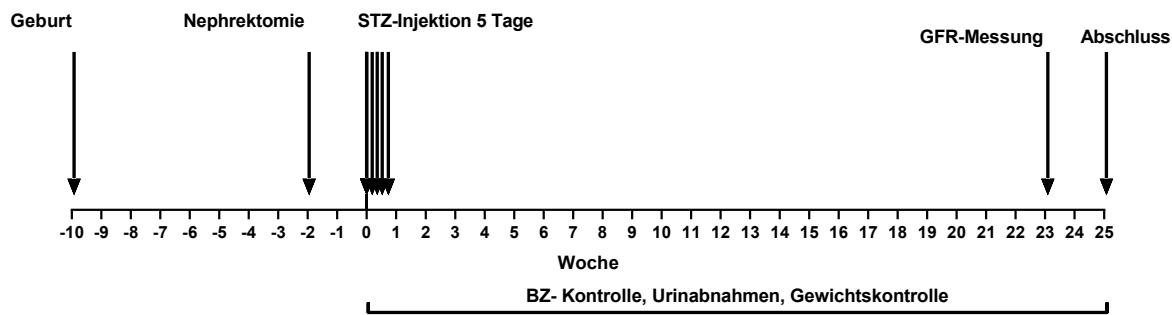


Abbildung 2.1. Zeitlicher Ablauf des Tiermodells

2.3 Unilaterale Nephrektomie

Die linksseitige unilaterale Nephrektomie erfolgte vor Induktion des diabetischen Tiermodells zur späteren Verstärkung der diabetischen Nierenschädigung aufgrund der kompensatorischen Hyperfiltration in der verbliebenen Niere. Die Nephrektomie wurde an 8 Wochen alten Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Versuchstieren durchgeführt. Für die intraperitoneale Narkose wurde eine Mischung aus Medetomidin, Midazolam und Fentanyl (Tabelle 2.5) direkt vor der Operation auf 37°C erwärmt. Die Menge des Narkosemittels wurde gewichtsadaptiert mit 2,5 ml/kg Körpergewicht (KG) injiziert. Das Gewicht wurde unmittelbar vor der Operation bestimmt und diente im Verlauf als Kontrollparameter.

Tabelle 2.5. Ansatz für Narkosemischung, Antagonisten und postoperative Schmerztherapie

Mischung	Substanz	Konzentration [mg/ml]	Dosierung [mg/kg] KG]	Volumen [ml]
Narkose	Fentanyl	0,05	0,05	1
	Midazolam	5	5	1
	Medetomidin	1	0,5	0,5
Antagonist	Naloxon	0,4	1,2	3
	Flumazenil	0,1	0,5	5
	Atipamezol	5	2,5	0,5
Schmerztherapie	Buprenorphin	0,006	0,05	8,34

2. Material und Methoden

Die Operation fand auf einer auf 40°C eingestellter Wärmeplatte unter einer zuvor mit 70% Alkohol gereinigten und anschließend mit sterilen Arbeitstüchern ausgelegten Arbeitsfläche, unter dem Abzug, statt. Um die Augen der Versuchstiere vor einer Hornhautschädigung zu schützen, wurde eine Bepanthen-Augensalbe verwendet und der Kopf zusätzlich auf einer sterilen Komresse gelagert. Die Füße wurden vorsichtig mit Klebestreifen auf der Wärmeplatte fixiert. Zum Rasieren des Operationsareals wurde eine Wilson-Rasierklinge verwendet. Das desinfizierte Operationsareal von 4 cm² befand sich 1-2 cm dorsolateral der Wirbelsäule und etwa 0,5-1 cm kaudal des unteren Rippenbogens. Es wurde ausschließlich autoklaviertes Operationsbesteck verwendet. Mit einer Schere wurde die Haut etwa 1,5-2 cm länglich eröffnet, anschließend wurde das darunterliegende Gewebe, bestehend aus Muskeln und Faszien, mit einem kleinen Initialschnitt durchtrennt und mit einer stumpfen Pinzette aufgeweitet. Die Niere, welche dorsokaudal der dunkel gefärbten Milz zu finden ist, wurde mit einer stumpfen, breiten Pinzette mobilisiert. Die fixierenden Bindegewebsbänder an den Nierenpolen, sowie das den Hilus umgebende Bindegewebe wurden mit einer weiteren feinen Pinzette vorsichtig entfernt. Der frei liegende Hilus wurde von einer aus resorbierbarem Nahtfaden 5-0 (Vyncril) vorbereiteten Schlaufe möglichst proximal umschlossen und ligiert. Die Niere wurde anschließend distal der Knotung abgetrennt. Die Fäden der zugezogenen Schlaufe am verschlossenen Gefäßstumpf wurden gekürzt. Das Muskel- und Fasziengewebe wurde mit einem resorbierbaren Nahtfaden 5-0 (Vyncril) und die darüber liegende Haut mit einem nicht-resorbierbaren Nahtfaden 5-0 (Ethibond) mittels einer Einzelknüpfnaht verschlossen. Die Maus erhielt im Anschluss eine gewichtsadaptierte (8,5 ml/kg KG) subkutane Injektion einer Narkose-Antagonistenmischung (Tabelle 2.5) in die Nackenfalte, bestehend aus Atipamezol, Flumazenil und Naloxon. Zur Schmerztherapie wurde gewichtsadaptiert (8,34 ml/kg KG) eine 0,006 mg/ml Buprenorphin-Lösung subkutan in die Leistenregion appliziert (Tabelle 2.5). Die operierte Maus wurde in einen neuen Käfig mit aufgeweichtem, am Boden liegendem Futter gesetzt und noch einige Zeit mit Rotlicht gewärmt. Zwei Tage in Folge wurde 12-stündiglich wie eben beschrieben gewichtsadaptiert Buprenorphin injiziert und einmal täglich das Gewicht gemessen. Auf den Allgemeinzustand der Tiere wurde dabei genau geachtet. Belastungskriterien waren unter anderem das Körpergewicht der Mäuse, das 10% des Anfangsgewichts nicht unterschreiten durfte, und das Fell, das nicht strapaziert und glanzlos wirken durfte. Die Einzelknüpfnaht an der Operationsnarbe konnte nach Verheilen der Wunden 7-14 Tage später gezogen werden. Bei postoperativem Überschreiten der definierten Belastungsgrenze, die durch tägliches Scoring kontrolliert wurde, erfolgte eine Euthanasie der Tiere.

2. Material und Methoden

2.3.1 Streptozotocin-Injektion

Zur Induktion des Diabetes in den Versuchsmäusen wurden diesen 5 Tage in Folge gewichtsadaptiert entsprechend eines modifizierten, ursprünglich von Tesch und Mitarbeitern publizierten Protokolls (50 mg/kg KG) (Tesch und Allen 2007), hier als "Low-Dose Mouse Model", 40 mg/kg KG STZ intraperitoneal injiziert (Tabelle 2.6). STZ ist ein Analog zu N-Acetylglucosamin (GlcNAc). Dieses wird durch den GLUT-2 Rezeptor in die insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas aufgenommen und wirkt dort zelltoxisch (Tesch und Allen 2007). Die Dosis (40 mg/kg KG) des STZ war dabei so gewählt, dass nur ein Teil der β -Zellen in Pankreas zerstört wurde und somit eine Restfunktion der Insulinproduktion erhalten blieb.

Tabelle 2.6. Streptozotocin-Dosierung und Auflösung

Reagenz	Konzentration [mg/ml]	Dosis [mg/kg KG]	Injektionsmenge [μ l/g KG]
Streptozotocin	5	50	10
		40	8

Der erste Tag der Injektion, 14 Tage nach der unilateralen Nephrektomie, wurde dabei als Tag 0 der Versuchsreihe definiert, an dem Urinproben gewonnen und das Anfangsgewicht bestimmt wurde. Sechs Stunden vor der Injektion wurden die Mäuse in einen Käfig ohne Futter umgesetzt, zu Wasser hatten die Mäuse weiterhin uneingeschränkten Zugang. Der Citratpuffer, zum Lösen des in lichtdichten 1,5 ml Röhrchen abgefüllten und bei -20°C aufbewahrten STZ-Pulvers, wurde täglich neu angesetzt (Tabelle 2.7). Hierfür wurden 2 Einheiten 0,1 M Natriumcitrats und 3 Einheiten 0,1 M Zitronensäure gemischt und auf einen pH von 4,3 mit Hilfe einer 1 N Natronlauge eingestellt (Tesch und Allen 2007).

Tabelle 2.7. Herstellung des Citratpuffers mit dem Ziel-pH 4,3

Reagenz	Benötige Masse [g] in 50 ml ddH ₂ O	Anteil
0,1 M Natriumcitrat	1,47	2
0,1 M Zitronensäure	1,05	3

Der Citratpuffer wurde im Anschluss durch einen Filter sterilisiert. An jedem STZ-Injektionstag wurde das Köpergewicht der Mäuse neu bestimmt. Unmittelbar vor der Injektion wurde das auf Eis gestellte, in kleinen Portionen abgefüllte STZ-Pulver auf die Konzentration 200 μ l/mg mit ebenfalls auf Eis gelagertem Citratpuffer eingestellt - es ergab sich somit eine Konzentration von 5 mg/ml (Tabelle 2.6). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des STZ wurde den Mäusen sofort im Anschluss 8 μ l/g KG der STZ-Lösung intraperitoneal injiziert. Der Lösungsvorgang der Aliquote wurde dabei mehrmals frisch vor

2. Material und Methoden

der Injektion durchgeführt. Die Reihenfolge der Mäuse wurde dabei täglich variiert. Die Mäuse erhielten im Anschluss wieder Futter und wurden bis zum folgenden Tag in ihren gewohnten Käfig gesetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt an 5 Tage in Folge wiederholt. Am dritten Tag nach der letzten Injektion fand eine erste Blutzuckerkontrolle statt.

2.3.2 Blutzuckerkontrolle

Für die wöchentlichen Blutzuckerkontrollen wurde den Mäusen aus einer lateralen Schwanzvene ein Tropfen Blut entnommen und mit einem Blutzuckermessgerät gemessen. Dafür wurden die Mäuse in eine selbstgebaute Injektionsvorrichtung gesetzt und der Schwanz etwas nach lateral gewendet und fixiert. Mit einer feinen sterilen Kanüle wurde die Schwanzvene entlang ihres natürlichen Verlaufens von distal nach proximal vorschließend, flach unter der Epidermis punktiert und wieder zurückgezogen. Es bildete sich ein einzelner Blutstropfen, der für die Blutzuckermessung ausreichend war. Gemessen wurde mit einem Accu-Chek Aviva Blutzuckermessgerät (Messbereich 0 bis 600 mg/dl). Werte die größer als 600 mg/dl waren und als „HI“ erschienen, wurden für Berechnungen mit 600 mg/dl festgesetzt. Es wurden nur erfolgreich initiierte Mäuse für die Berechnungen und Auflistungen berücksichtigt. Für die erste Einschätzung galt eine erfolgreiche Induktion des Diabetes mit hoher Wahrscheinlichkeit, wenn die Versuchstiere einen Blutzuckerwert von größer 280 mg/dl am 3. Tag nach der letzten STZ-Injektion hatten (Tesch und Allen 2007). Eine endgültige Beurteilung erfolgte am Ende der Versuchsreihe: hier sollte der HbA1c-Wert größer als 5 % betragen. Die Blutzuckerwerte wurden im Verlauf wöchentlich bestimmt. Dabei wurde je Zeitpunkt von allen erfolgreich Diabetes-induzierten Mäusen, gruppiert nach Genotypen, der jeweilige Mittelwert gebildet und im Gesamtverlauf zwischen Wildtyp- und *Ackr2^{-/-}*-Mäusen verglichen.

2.3.3 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Zur Messung der GFR wurde die renale Ausscheidung von FITC-konjugiertem Sinistrin, das zu 97% aus Fructose und zu 3% aus Glukose besteht, verwendet. Bei Raumtemperatur ist FITC-Sinistrin sehr gut wasserlöslich und wird somit über die Niere aus dem Körper eliminiert (Pill et al. 2005). FITC-Sinistrin unterliegt, ähnlich wie das bekannte, auch für die GFR-Messung beim Menschen eingesetzte Inulin, kaum den in den Nieren stattfindenden Sekretions- und Resorptionsprozessen und eignet sich daher für die Bestimmung der GFR. Die Bestimmung der GFR erfolgte transkutan mit Hilfe von Messdioden, bestehend aus zwei Lichtwellen emittierenden Blaulichtdioden mit einer für die Anregung von FITC geeigneten Wellenlänge von 470 nm und einer detektierenden Photodiode, deren Sensitivitätsmaximum im Bereich der FITC-Emission von 525 nm liegt (Schreiber et al. 2012).

2. Material und Methoden

Zunächst wurde das aktuelle Gewicht der Versuchstiere ermittelt und es wurden für spätere Analysen Urinproben gewonnen. Für eine kurzzeitig erforderliche Anästhesie während des Anbringens der Messapparatur wurde ein Inhalationsverfahren mit Isofluran 2,5 %Vol in medizinischem Sauerstoff durchgeführt. An der anästhesierten Maus wurde mit einer zuvor in 70% Alkohol getauchten Rasierklinge eine etwa 9 cm² große, quadratische Fläche des Fells im Nacken- bis Schulterblätterbereich rasiert. Die Sensoren der Messdioden mit den konnektierten Lithium-Batterien wurden auf diese Fläche mit einer zugehörigen doppelseitigen Fensterklebefläche befestigt und mit einem Leukosilkpflaster zusätzlich um den Thorax fixiert. Eine Baseline-Messung von einigen Minuten wurde abgewartet. Zur intravenösen Bolusgabe wurde das bei -20°C lichtgeschützt aufbewahrte, in 0,9% NaCl gelöste FITC-Sinistrin über die Schwanzvene annähernd gewichtsadaptiert (56-150 mg/kg KG) injiziert. Das injizierte FITC-Sinistrin wird im Anschluss über die Niere durch Filtration ausgeschieden. Dieses Vorgehen ermöglicht es, die von der GFR abhängige Halbwertszeit des FITC-Sinistrins in der Blutbahn zu bestimmen, die unabhängig von der Anfangskonzentration im Blut ist (Schock-Kusch et al. 2009, Schreiber et al. 2012, Pill et al. 2006, Mulay et al. 2016).

Die wachen, aktiven Mäuse wurden für die Messdauer von 75-120 min separiert in Einzelkäfigen untergebracht (Schock-Kusch et al. 2009, Schreiber et al. 2012). Während der Messdauer erfolgte die kontinuierliche Aufzeichnung der transkutan gemessenen FITC-Sinistrin-Emission. Am Ende des Messzeitraums wurden die Mäuse für die Abnahme der Messdioden erneut kurzzeitig inhalativ narkotisiert und anschließend in ihren ursprünglichen Käfig zurückgesetzt. Das Auslesen der Daten erfolgte durch die Verknüpfung der Messdiode über einen Mikro-USB-Anschluss mit einem Rechner unter Verwendung der dazugehörigen MPD-Lab-App-Software. Die Baseline, sowie Start-, und Endpunkt der Halbwertszeitbestimmung wurden festgelegt (Abbildung 2.2). Die sich daraus ergebende Halbwertszeit $T_{1/2}$ wurde erfasst.

2. Material und Methoden

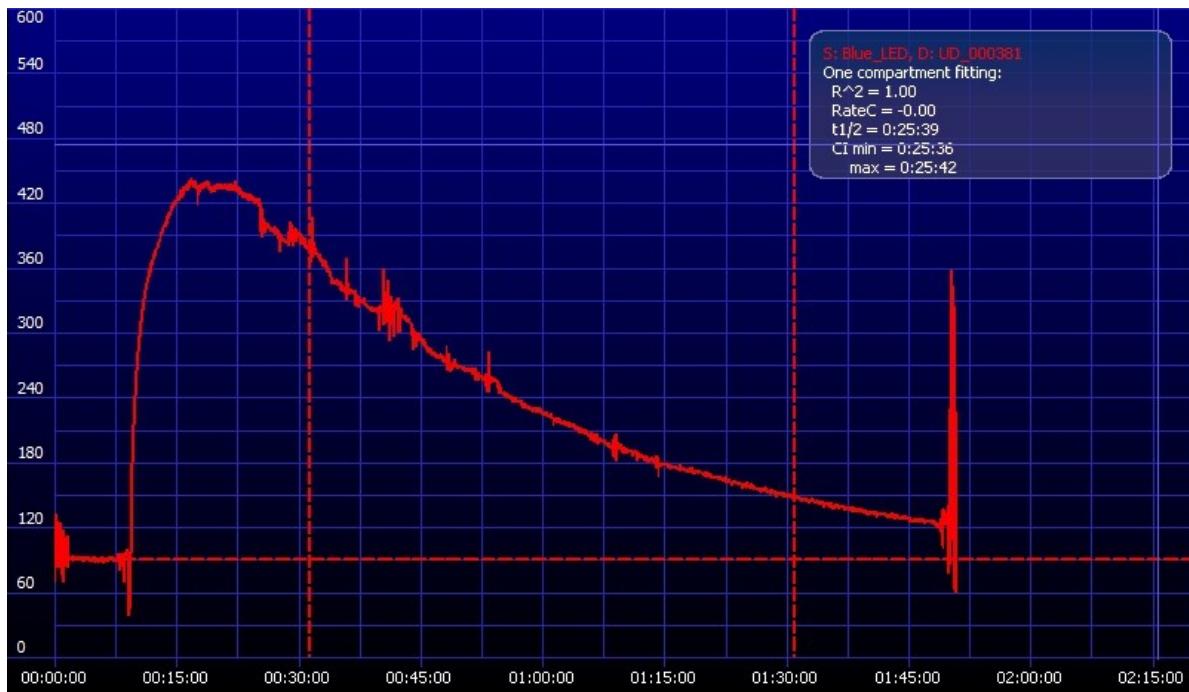


Abbildung 2.2. Beispielhafte Darstellung einer GFR-Messung mit FITC-Sinistrin und deren Markierung von Baseline, Start- und Endpunkt der $T_{1/2}$ -Bestimmung (x-Achse: Zeit [h:min:sek]; y-Achse: Signalstärke der FITC-Emmission)

Zur Bestimmung der absoluten GFR der Einzeltiere wurde aus der auf 100 g KG standardisierten publizierten Formel (Formel 2.1) (Schreiber et al. 2012) unter Berücksichtigung des Körpergewichtes m die Formel für die absolute GFR der einzelnen Versuchstiere (siehe Formel 2.2) abgeleitet. Die Berechnung und Analyse fand mit Microsoft Excel statt.

Formel 2.1. Formel zur Bestimmung der auf 100 g pro Kilogramm Körpergewicht bezogenen GFR (Schreiber et al. 2012, S. 3)

$$GFR \left[\frac{\mu\text{l}}{\text{min} \cdot 100\text{g KG}} \right] = \frac{14616,8 \left[\frac{\mu\text{l}}{100\text{g KG}} \right]}{\frac{T_1}{2} (\text{FITC} - \text{Sinistrin}) [\text{min}]}$$

Formel 2.2. Formel zur Bestimmung der absoluten GFR der einzelnen Versuchstiere

$$GFR \left[\frac{\mu\text{l}}{\text{min}} \right] = \frac{14616,8 \left[\frac{\mu\text{l}}{100\text{g KG}} \right]}{\frac{T_1}{2} (\text{FITC} - \text{Sinistrin}) [\text{min}]} \cdot \frac{m [\text{g KG}]}{100}$$

2.3.4 Versuchsabschluss

Die Versuchsreihen wurden 25 Wochen nach STZ-Gabe beendet. Den Mäusen wurde erneut Spontanurin abgenommen sowie das Abschlusskörpergewicht bestimmt. Zur

2. Material und Methoden

Organentnahme am Versuchsende wurden die Tiere mittels Injektionsnarkose (Tabelle 2.5) tief anästhesiert und durch die im Rahmen der nachfolgenden Organperfusion durchgeführte Thorakotomie euthanasiert.

Unter bestehender Narkose erfolgte zunächst eine retroorbitale Blutentnahme mit Hilfe eines Gläsröhrchens. Das Blut wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäß gesammelt, die 5 µl 5 M EDTA pro 100 µl Vollblut enthielten. 100 µl des auf Eis gestellten Vollbluts wurden, wie in noch folgenden Abschnitt 2.4.6 beschrieben, für eine Durchflusszytometrie aufbereitet. Weitere 100 µl Vollblut wurden für die Analyse des HbA1c im Zentrallabor des Universitätsklinikums der LMU portioniert. Der Rest des Vollbluts wurde für 6 min bei 15.000 G zentrifugiert und der Plasmaüberstand wurde abgenommen. 150 µl des Plasmaüberstandes wurden ebenfalls an das Zentrallabor des Universitätsklinikums der LMU verschickt (Abschnitt 2.4.1). Das übrig gebliebene Plasma wurde für spätere Analysen z.B. der Bestimmung von CCL2 (Abschnitt 2.4.5) bei -20°C eingefroren.

Mit einem Längsschnitt wurden Abdomen und Thorax der narkotisierten Versuchstiere eröffnet, das Zwerchfell wurde von den Rippen gelöst und die V. cava inferior durchtrennt. Die rechte Herzkammer wurde mit einer 19G Kanüle punktiert, an der eine Perfusionsvorrichtung montiert war. Diese bestand aus einem 50 ml Spritzenbehälter gefüllt mit DPBS, einem Filter, einem Verbindungsschlauch zu einer 50 ml Spritze und einer Druckmessungsanzeige gekoppelt mit einem Luftventil, das geöffnet und geschlossen werden konnte. Das Blutgefäßsystem der Maus wurde mit auf 37°C vorgewärmtem DPBS und einem Druck von 140 mmHg perfundiert. Die blutleeren Organe, darunter Milz und Nieren, sowie der Femur zur Gewinnung von Knochenmark wurden entnommen. Das Gewicht von Niere und Milz wurde bestimmt.

Für die Durchflusszytometrie wurden Blut, Knochenmark, Milz und Nieren unmittelbar aufbereitet (wie nachfolgend in Abschnitt 2.4.6.2 beschrieben).

Teilstücke der Niere wurden für die histologische Untersuchung gewonnen und für die folgenden 24 Stunden in Formaldehyd fixiert. Die weitere Behandlung der Gewebe und deren PAS-, F4/80-, ERHR3 - und CD3+-Färbung erfolgten in der Histologie-Core Facility der Abteilung (Abschnitt 2.4.8).

Ein weiterer Anteil des Nierengewebes wurde für die mRNA-Expressionsanalyse in 200 µl RNA-Later bei -20°C eingelagert (Abschnitt 2.4.7.1).

Von den Nieren wurde zudem ein Teilstück für die Proteinanalyse des Gewebes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert (Abschnitt 2.4.2).

2.4 Methoden zur Phänotypanalyse

2.4.1 Klinische Chemie

Wie im Abschnitt 2.3.4 erklärt, wurde bei Versuchsabschluss unter anderem Vollblut gewonnen. Davon wurden 100 µl für weitere Analysen in das Zentrallabor des Universitätsklinikums der LMU übersendet. Zudem wurden 150 µl des gewonnenen Plasmas ebenfalls in das Zentrallabor verschickt. Aus diesen Proben wurden Werte für Kreatinin, Harnstoff, Glukose, Protein, Albumin, Cholesterin, Triglyceride und HbA1c mit Hilfe eines Roche-Autoanalyzers bestimmt.

2.4.2 Proteinisolation

Aus dem für die Proteinisolation bei -80°C gelagerten Nierengewebe wurde ein Teilstück mit 400 µl RIPA-Puffer, 4 µl Phosphatase (1:100 zu RIPA Puffer) und 16 µl Proteinase (1:25 zu RIPA Puffer) in einem Reaktionsgefäß in mehreren Durchgängen (3-4x) mit dem Ultraturrex-Homogenisator homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension zweimal mit Ultraschall beschallt, unterbrochen durch eine Pause von 8 Sekunden auf Eis. Die Proben wurden nun für zwei Stunden auf einem Rotator befestigt, der eine gleichmäßige Durchmischung gewährleistete. Nach Zentrifugieren (5 min, 15.000 G) wurde der benötigte Überstand abpipettiert und sofort weiterverarbeitet oder erneut bei -80°C zwischengelagert.

2.4.3 Kreatinin-Assay

Die Kreatininkonzentration des Urins diente für weitere Analysen als Referenzwert, um verschieden konzentrierte Spontanurinproben vergleichen zu können.

Für die Bestimmung des Kreatinins wurde der Creatinin FS* Dia Sys Kit verwendet, der auf der bekannten Jaffé- Methode basiert. Es handelt sich dabei um einen kinetischen Test ohne Enteiweißung. Kreatinin bildet dabei in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure, die hinzugegeben wird (Reagenz 2), einen orangefarbenen Farbkomplex (Kreatinin-Pikrat-Komplex), dessen Extinktionsdifferenz zu bestimmten aufeinanderfolgenden Zeitpunkten proportional zur Kreatininkonzentration ist.

Tabelle 2.8. Reagenzien für die Bestimmung der Kreatininkonzentration

Reagenzien des Creatinin FS* DiaSys-Kits

Reagenz 1	Natriumhydroxid	0,2 mol/l
Reagenz 2	Pikrinsäure	20 mmol/l
Standard		2 mg/dl (177 µmol/l)

2. Material und Methoden

Für die Kreatininbestimmung wurde zunächst eine Standard-Verdünnungsreihe aus standardisierten Proben des Kreatinin-Kits hergestellt (Tabelle 2.9). Die Urinproben wurden mit ddH₂O 1:5 verdünnt.

Tabelle 2.9. Verdünnung der Standardreihe beim Kreatinin Assay

Standardverdünnung Kreatinin Assay			
Konzentration mg/dl	Lösung 1 (2 mg/dl) µl	Lösung 2 (10 mg/dl) µl	ddH ₂ O µl
1	15	0	15
2	30	0	0
4	0	12	18
8	0	24	6

Es wurden je Well 10 µl der Proben sowie der Standardreihe im Zweifachansatz auf eine 96-Well-Platte aufgetragen, dabei wurde vor jedem Pipettievorgang für einige Sekunden mit einem Vortex-Gerät gut durchmischt, um eine gleichmäßige Konzentrationsverteilung des Kreatinins in der Probe zu gewährleisten. Nun wurden 200 µl des Reagenzgemisches aus dem Kreatinin-Kit (Reagenz 1: Reagenz 2 = 4:1) in die Wells gegeben und die erste Messung des eintretenden Farbumschlags (Kreatinin-Pikrat-Komplex) zum Zeitpunkt $t_A = 1$ min im ELISA-Reader mit einer Wellenlänge von 492 nm gestartet. Nach weiteren zwei Minuten (Zeitpunkt $t_E = 3$ min) erfolgte die zweite Messung. Die Intensität des photometrisch gemessenen Farbumschlags wurde aus der Differenz der beiden Messungen ermittelt und ist proportional zur Kreatininkonzentration in der Urinprobe. Im Vergleich zur linearen Standardkurve (Abbildung 2.3) konnte anhand dieser Werte die Kreatininkonzentrationen der einzelnen Proben ermittelt werden. Die photometrische Messung wurde für jede Probe und Standard in zwei Ansätzen durchgeführt und die jeweiligen Mittelwerte für die Bestimmung der Kreatininkonzentration verwendet.

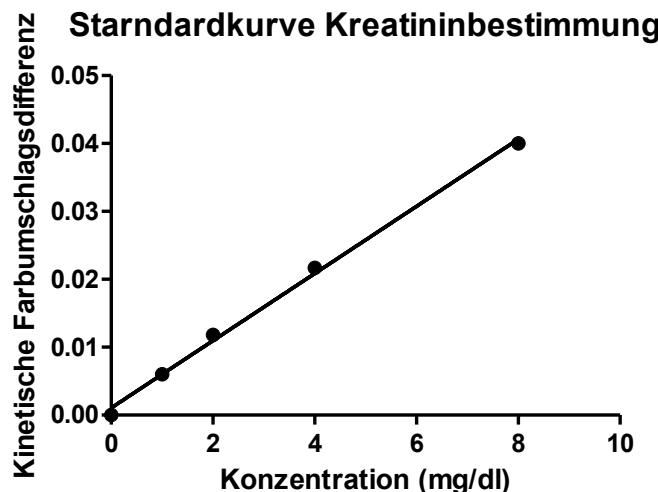


Abbildung 2.3. Lineare Standardkurve zur Bestimmung der Kreatininkonzentrationen der einzelnen Proben

2.4.4 Bradford-Assay

Die Quantifizierung des Gesamtproteingehalts in der Nierengewebeprobe erfolgte mittels Bradford-Methode. Dafür wurde das Nierengewebe einer Proteinisolation (wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben) unterzogen. Die Gesamtproteinkonzentration der Nierenprobe ist ausschlaggebend für weitere Untersuchungen, um Vergleiche der Proben miteinander zu gewährleisten.

Der Bradford-Test ist dabei eine Färbemethode, die mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie-Brillant-Blau ein Nachweis von Proteinen ermöglicht. Im einem sauren Milieu bilden Proteine mit dem Farbstoff einen stabilen Sulfonat-Komplex durch Bindung an unspezifische Kationen und unpolare Aminosäurereste, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von dem ersten $A_{\max} = 470$ nm (proteinungebunden) zu dem neuen $B_{\max} = 595$ nm (protein gebunden) zur Folge hat und so photometrisch gemessen werden kann.

Dafür wurde das Bradford Reagenz Liquid von BioRad 1:5 mit ddH₂O verdünnt und zunächst gekühlt und lichtgeschützt zwischengelagert. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA, 1 µg/ml) und ddH₂O angefertigt, wie in nachfolgender Tabelle 2.10 dargestellt ist.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.10. Verdünnung der Standardreihe für die Proteinbestimmung

Standardverdünnung Proteinisolation

Konzentration µg/ml	BSA (1µg/ml) µl	ddH ₂ O µl
0	0	20
0,1	2	18
0,2	4	16
0,4	8	12
0,6	12	8
0,8	16	4
1	20	0

Von den Standardverdünnungen sowie von der Probe (Verdünnung 1:20 mit ddH₂O) wurden jeweils 10 µl im Zweifachansatz in Wells einer 96-Well-Platte pipettiert. Nun wurden 200 µl/Well vom Bradford Reagenz zugegeben und für fünf Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption des gebildeten Sulfonat-Komplexes mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 590 nm gemessen. Nach Bestimmung der Mittelwerte aus dem Doppelansatz je Probe und Abzug des Leerwerts (210 µl ddH₂O) konnten anhand der ermittelten linearen Standardkurve die Proteinkonzentrationen der Gewebeproben berechnet werden.

2.4.5 Enzym-linked Immunosorbent Assay

Der Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren, um bestimmte Moleküle in Flüssigkeiten nachzuweisen. Bei dieser Arbeit spielt vor allem der Sandwich-ELISA eine Rolle. Hierfür werden Antikörper 1 (AK1) fest an eine Oberfläche gebunden, nicht gebundene AK1 werden weggewaschen. Die Flüssigkeit mit den zu bestimmenden Antigenen (Molekül) wird im Anschluss hinzugegeben, welche an die spezifischen AK1 binden. Nicht oder unspezifisch gebundene Antigene werden ebenfalls herausgewaschen. Zu diesem AK1-Antigen Komplex wird nun ein sekundärer spezifischer Detektions-Antikörper 2 (AK2) hinzugegeben, der die Antigene wie ein Sandwich umschließt (Sandwich-Prinzip). Überschüssige und nicht gebundene AK2 werden ebenfalls herausgewaschen. Der AK2 ist fähig, mit einem hinzugefügten Farbstoff durch Spaltung einen Farbumschlag zu generieren, sodass diese Enzymaktivität photometrisch bestimmt werden kann. Sie ist proportional zu der gebundenen Menge an Zielmolekülen (Antigene), sodass darüber ihre Konzentration über eine Standardkurve bestimmt werden kann.

2. Material und Methoden

2.4.5.1 Albumin-ELISA

Die Albuminkonzentration im Urin wurde durch einen kommerziell bezogenen Albumin-ELISA bestimmt. Am Vortag wurden die ELISA-Platten mit 100 µl/Well der Coating-Lösung (20 ml Carbonat-Puffer + 20 µl des monoklonalen affinitätsgereinigten anti-Maus Albumin-Antikörpers) versehen und 24 h bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde aus einer standardisierten Probe von 1 mg/ml eine Standardverdünnungsreihe - wie in Tabelle 2.11 dargestellt - hergestellt. Auch die Urinproben wurden einer Verdünnung unterzogen. Vor jedem Pipettievorgang wurden die Urinproben für einige Sekunden mit einem Vortex-Gerät gut durchmischt, damit eine gleichmäßige Verteilung des Albumins stattfand.

Tabelle 2.11. Verdünnung der Standardreihe für einen Albumin ELISA

Standardverdünnung Albumin ELISA			
Konzentration	Albumin Standard Reihe		PBS/Tween/BSA
µg/ml	µl	von µg/ml	µl
10	12	1000	1188
1	120	10	1080
0,5	300	1	300
0,1	120	1	1080
0,05	300	0,1	300
0,01	80	0,1	720
0,001	80	0,01	720
0	0	0	1000

Tabelle 2.12. Verdünnung der Proben für Albumin ELISA

Probenverdünnung Albumin ELISA			
Verdünnung	Probe		PBS/Tween/BSA
1:X	µl	von	µl
50	12	Urinprobe	588
100	200	1:50 Probe	200
1000	40	1:100 Probe	360
10000	40	1:1000 Probe	360

Die 96-Well-Platten wurden dreimal einem Waschvorgang unterzogen. Dieser bestand aus der Entfernung der Coating-Lösung und mehrmaligem Ein- und Abpipettieren von 150 µl/well der Waschlösung (PBS/Tween). 100 µl der Proben wurden nun im Dreifachansatz in die Wells pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschvorgängen mit je 150 µl der Waschlösung wurden 100 µl der Detektionsantikörper-Lösung

2. Material und Methoden

(25 ml PBS/Tween/BSA + 2,5 μ l affinitätsgereinigter monoklonaler Horsereddish Peroxidase (HRP)-konjugierter Ziege-anti-Maus-Albumin-Antikörper) in die Wells gegeben und für weitere 2 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Es folgten drei Waschvorgänge wie oben beschrieben. Anschließend wurden 100 μ l des TMB-Farbsubstrats (Substrat A und Substrat B) in die Wells pipettiert und 5 min bis zur sichtbaren Farbentwicklung der Standardproben inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 2 N Schwefelsäure gestoppt und die Absorption mit dem ELISA-Gerät bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Berechnung der Urinalbuminkonzentration erfolgte aus dem Absorptionsmittelwert des Dreifachansatzes abzüglich des Leerwerts (100 μ l ddH₂O) im Vergleich zur ermittelten sigmoidale Standardkurve, die aus den Absorptionen der Standardverdünnungen und den logarithmierten Standardkonzentrationen ermittelt wurde (Beispiel in Abbildung 2.4).

Abbildung 2.4. Sigmoidale Standardkurve bei Albuminbestimmung

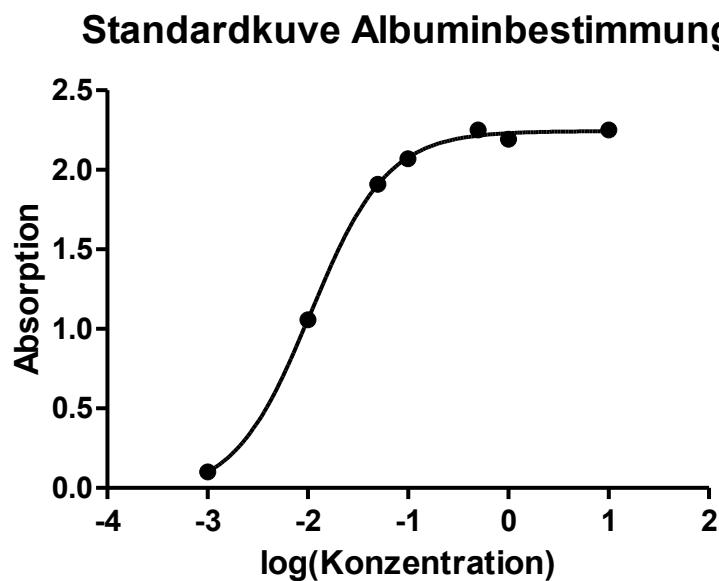


Abbildung 2.4. Sigmoidale Standardkurve bei Albuminbestimmung

Diese Albuminkonzentrationen (μ g/ml) wurde in das Verhältnis zu der entsprechenden in Abschnitt 2.4.3 ermittelten Kreatininkonzentration der gleichen Probe (mg/ml) gesetzt und als Albumin/Kreatinin-Ratio (μ g/mg) dargestellt. Es erlaubt den Vergleich einzelner Proben bei unterschiedlich konzentriertem Urin.

2.4.5.2 CCL2-ELISA

Die CCL2-Proteinkonzentration wurde im Urin, im Plasma und im Nierengewebe bestimmt. Hierfür wurde der kommerziell verfügbare BD OptEIA™ Mouse MCP-1-ELISA-Kit

2. Material und Methoden

verwendet. Am Vortag wurden die ELISA-Platten mit 100 µl/Well der Coating-Lösung (10 ml 0,2 M Natriumphosphatpuffer+ 40 µl Capture-Antikörper(Anti-Maus MCP-1)) versehen und 24 h bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten dreimal einem Waschvorgang unterzogen. Dieser bestand aus der Entfernung der Coating-Lösung und mehrmaligem Ein- und Abpipettieren von 200 µl/well der Waschlösung (PBS/0,05%Tween-20). Im Anschluss wurde mit 200 µl/Well Assay Diluent (PBS/10%FBS) geblockt und bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Aus einem rekombinanten Maus MCP-1-Standard in einer Konzentration von 54 ng/ml wurde eine Standardverdünnungsreihe (Tabelle 2.13) hergestellt. Die Urin- und Proteinproben aus dem Nierengewebe wurden vor der Messung 1:2 bzw. 1:20 verdünnt. Vor jedem Pipettivorgang wurde für einige Sekunden die Probe mit einem Vortex-Gerät gut durchmischt, damit eine gleichmäßige Verteilung des Proteins stattfand.

Tabelle 2.13. Verdünnung der Standardreihe und Proben für einen CCL2 ELISA

Standardverdünnung CCL2 ELISA			
Konzentration (pg/ml)	Albumin Standard Reihe µl	Assay Diluent von pg/ml	Assay Diluent µl
1000	11,1	*Standardprobe	588,9
500	300	1000	300
250	300	500	300
125	300	250	300
62,5	300	125	300
31,3	300	62,5	300
15,6	300	31,3	300
7,8	300	15,6	300
0	-	-	300
*Standardprobe		54 ng/ml	

Nach dem Blockieren erfolgte ein erneuter Waschvorgang mit zwei Durchgängen. Anschließend wurden je 100 µl der Proben im Doppelansatz in die Wells pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünf weiteren Waschvorgängen mit je 200 µl der Waschlösung wurden 100 µl der Working Detector-Lösung (10 ml Assay Diluent + 40 µl HRP-konjugierter anti-Maus-MCP-1-Detektionsantikörper) in die Wells pipettiert und für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschvorgänge wie oben beschrieben. Anschließend wurden 100 µl Substratlösung (1:1 TMB-Gemisch: Wasserstoffperoxid) in die Wells pipettiert und 30 min bis zur Farbentwicklung bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 2 N Schwefelsäure

2. Material und Methoden

gestoppt. Die Proben wurden im ELISA-Gerät bei einer Wellenlänge von 450 nm innerhalb der nächsten 30 min gemessen. Aus den logarithmierten Absorptionswerten der verdünnten Standardproben und ihren Konzentrationen wurde eine lineare Standardkurve ermittelt (Abbildung 2.5). Die Berechnung der CCL2-Konzentration erfolgte aus dem Absorptionsmittelwert des Doppelansatzes abzüglich des Leerwerts (100 μ l ddH₂O) im Vergleich zur ermittelten Standardkurve.

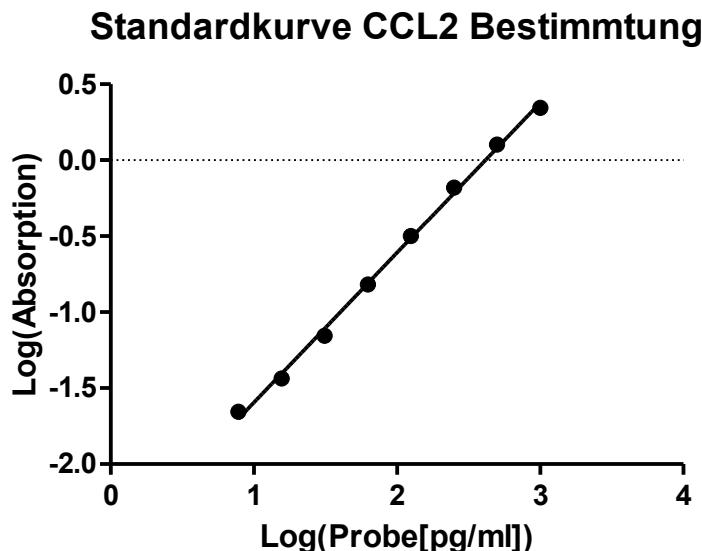


Abbildung 2.5. Lineare Standardkurve bei logarithmierten Werten zur Bestimmung der CCL2-Konzentrationen der einzelnen Proben

Die ermittelten CCL2-Konzentration (μ g/ml) im Urin und im Nierengewebe wurden zur Standardisierung auf die im Urin bestimmte Kreatinin-Konzentration (Abschnitt 2.4.3) bzw. auf die Gesamtproteinkonzentration der Nieren (Abschnitt 2.4.4) bezogen und als CCL2/Kreatinin-Ratio (pg/mg) und CCL2/Gesamtprotein (pg/mg) dargestellt.

2.4.6 Durchflusszytometrie

2.4.6.1 Allgemeine Grundlagen der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie, auch als Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) bezeichnet, ist eine Methode, mit der Größe und Strukturen, aber auch Oberflächeneigenschaften und intrazelluläre Charakteristika von Zellen untersucht werden können. Die zu untersuchenden Partikel, meist Zellen mit einer Größe von 0,2-150 μ m, die sich in einer Flüssigkeit befinden, werden in einem laminaren Flüssigkeitsstrom (1000 Zellen/s) vorbeiströmend von einem Laser bestrahlt. Gleichzeitig sind um diese Probenader Photozellen als Detektoren angeordnet, die verschiedene Lichtqualitäten registrieren. Das Grundprinzip dieser Untersuchungstechnik beruht auf Streuung, Brechung, Beugung, Emission und Absorption

2. Material und Methoden

von optischen Lichtwellen (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000). Die simultan an der vorbeiströmenden Einzelzelle entstehende Lichtsignale werden durch die Photozellen nach Filterung, Ablenkung und Strahlteilung in elektrische Signale umgewandelt, welche vom Computer als Eigenschaft der Zelle registriert werden (Abbildung 2.6).

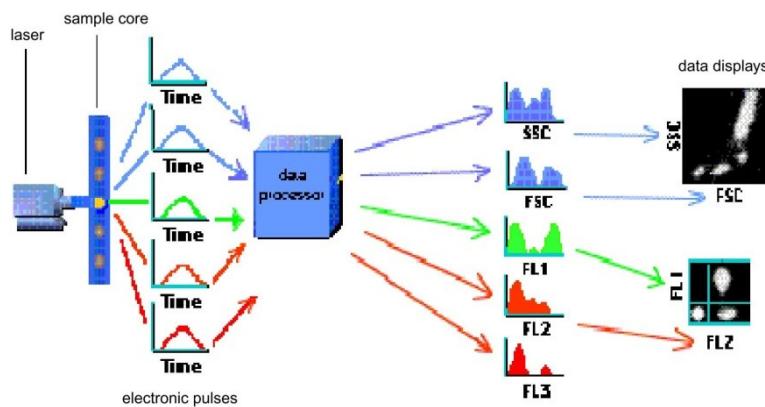


Abbildung 2.6. Schematische Darstellung der Funktionsweise der FACS-Analyse (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)

Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, so wird der Strahl abgelenkt. Dabei werden zwei verschiedene Arten unterscheiden. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter), das durch den linear zum Laserstrahl-Detektor durch die Zellschatten und der Randbeugung der Laserlichtwellen entsteht, ist ein Maß für die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, Sideward Scatter) entsteht dagegen durch die Ablenkung des auf Zellorgane treffenden Laserlichtes und ist daher ein Maß für die Granularität und die Zusammensetzung des Zellinneren. Dieses Streulicht wird durch Detektoren registriert, die zur linearen Achse des Laserlichts abweichen. Durch diese Analyse können Zellen wie Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten unterschieden werden (Abbildung 2.7) (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)

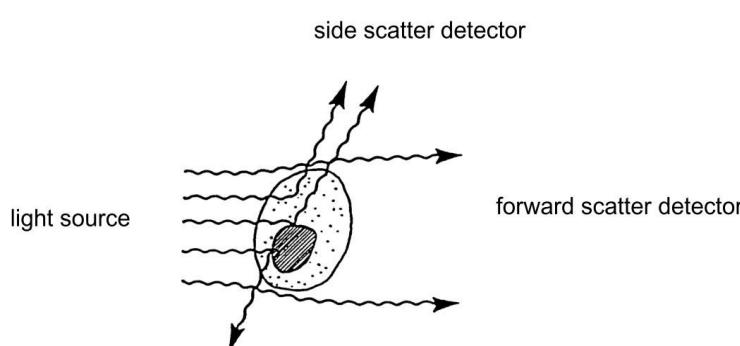


Abbildung 2.7. Darstellung des FSC und SSC (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)

2. Material und Methoden

Ergänzend können in der Durchflusszytometrie auch von Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Fluoreszenzen durch Photozellen mit auf die entsprechenden Farbstoffe abgestimmten Detektionseigenschaften (Kanäle) erfasst werden. Je nach Ausführung des Gerätes können verschiedene Färbungen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarben gleichzeitig registriert werden. Zum Nachweis bestimmter Zelleigenschaften werden hierbei gegen Zelloberflächenmoleküle oder intrazelluläre Antigene gerichtete Antikörper mit geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. Bestimmte Laserwellenlängen können diese Farbstoffe anregen und zur Emission von eigenen Lichtwellen eines definierten Spektrums bringen, das spezifisch durch eine abgestimmte Photozelle detektiert wird. Die Intensität des emittierten Lichts ist hierbei proportional zur Menge des gebundenen Antikörpers und damit zum zellulären Expressionsniveau des Zielantigens. Werden gleichzeitig mehrere Antikörper gegen verschiedene Zellantigene verwendet, müssen sie mit unterschiedlichen Farbstoffen konjugiert sein, die möglichst gering überlappende Emissionsspektren aufweisen, um jeweils spezifisch detektiert zu werden. Eine teilweise überlappende Emission zweier Farbstoffe kann jedoch rechnerisch durch Kompensationseinstellungen korrigiert werden, die durch Verwendung von Farbstoff-konjugierten nichtbindenden Kontrollantikörpern des gleichen Isotyps (Isotyp-Kontrolle) ermittelt werden (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000). Die detektierten Zelleigenschaften werden anhand der elektrischen Signalintensität durch die Auswertungs-Software des FACS-Geräts als Punktwolke oder Histogramm dargestellt. Im Rahmen der Auswertung können Zielbereiche mit vordefinierten Zelleigenschaften bestimmt werden (sogenannte „Gates“), so dass bestimmte, genau charakterisierte Zellpopulationen differenziert und quantifiziert werden können (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000).

2.4.6.2 Vorbereitung der Gewebeproben für die FACS-Analyse

Für die durchflusszytometrische Untersuchung von Zellen verschiedener Organe ist es erforderlich, vorab Einzelzellsuspensionen ohne die Analyse störende Bestandteile herzustellen.

Vorbereitung und Färbung des Vollbluts:

Wie in Abschnitt 2.3.4 beschrieben wurde den Versuchstieren am Versuchsende aus dem retroorbitalen Venenplexus Blut entnommen, das sofort mit 5 µl/100 µl Vollblut einer 5 M EDTA-Lösung zur Gerinnungshemmung versetzt und auf Eis gestellt wurde. Für die vier Färbungen wurden 30 µl des Vollbluts in jedes der vier FACS-Röhrchen pipettiert und zunächst mit einer Mischung aus 5 µl Mäuseserum und 5 µl Rattenserum versetzt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. 1,4 µl der jeweiligen Antikörper wurden 30 µl AccuCheck Counting Beads Lösung dazugegeben und bei 4°C lichtgeschützt für 60 min

2. Material und Methoden

inkubiert. Es folgte die Lyse der Erythrozyten und Fixierung der verbleibenden Blutzellen mit 2 ml Lysing Solution bei 37°C, die nach 10 min mit 2 ml FACS-Puffer gestoppt wurde, gefolgt von Zentrifugieren bei 250 G und 4°C für 4 min. Anschließend wurde das verbliebene Zellpellet mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Bis auf 300 µl wurde der Überstand abgesaugt. Das verbliebende Zellpellet wurde durch Vortexen suspendiert für die FACS-Analyse verwendet.

Vorbereitung des Knochenmarks:

Für die Isolation des Knochenmarks aus dem Femur wurde dieser zunächst in RPMI-Medium eingelegt und vom umliegenden Bindegewebe freipräpariert. Nach Überführen in neues Medium wurde der Femur an beiden Enden eröffnet und mehrmals (3-4 Wiederholungen) unter Verwendung einer 26 G Nadel mit Medium durchspült. Das herausgepresste Knochenmark wurde in der Zellkulturschale gesammelt, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen umgefüllt und für 5 min zentrifugiert (300 G, 4°C). Das Pellet wurde zur Erythrozytenlyse in 5 ml 0,15 M Ammoniumchlorid resuspendiert und im Wasserbad inkubiert (5 min, 37°C). Mit 10 ml gekühltem PBS wurde diese Inkubation gestoppt und erneut zentrifugiert (5 min, 300 G, 4°C). Nach erneutem Waschen mit 1 ml PBS wurde das Pellet durch einen 70 µm Filter mit 10 ml PBS gefiltert und erneut zentrifugiert (5 min, 300 G, 4°C). 500-1000 µl FACS-Puffer wurden dem Pellet hinzugegeben und anschließend jeweils 100 µl der Zellsuspension in FACS-Röhrchen für die Antikörpermarkierung pipettiert. Die weiteren Färbeschritte werden im Nachfolgenden beschreiben.

Vorbereitung des Milzgewebes:

Etwa ein Drittel der durch das in Abschnitt 2.3.4 beschriebene Verfahren gewonnenen Milz wurde mit einem Spritzenkolben durch ein 70 µm Filter gedrückt, mit 11 ml DPBS nachspülend aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 250 G, 4°C). Zur Erythrozytenlyse wurde das Pellet mit 5 ml 0,15 M Ammoniumchlorid durchmischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Mit 10 ml PBS wurde die Lyse gestoppt und die Zellsuspension erneut durch einen 70 µl Filter in neue 15 ml Reaktionsgefäß umgefüllt und zentrifugiert (10 min, 250 G, 4°C). Das Pellet wurde mit 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und zu je 100 µl auf die FACS-Röhrchen aufgeteilt Die weiteren Färbeschritte werden im Nachfolgenden beschreiben.

Vorbereitung der Analyse des Nierengewebes:

Ein Drittel der durch das in Abschnitt 2.3.4 beschriebene Verfahren gewonnenen Niere wurde manuell mit einem Skalpell zerkleinert, in 15 ml Reaktionsgefäß mit auf Eis gekühltem Paris-Puffer überführt und das Volumen auf 11 ml mit Paris-Puffer aufgefüllt. Nach Zentrifugieren (5 min, 250 G, 4°C) wurde das Pellet mit 10 ml auf Eis gekühltem

2. Material und Methoden

HBSS mit Calcium und Magnesium resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 250 G, 4°C). Das Pellet wurde nun mit 5 ml einer auf 37°C vorgewärmten Kollagenase (1 mg/ml)-DNAse (0,1 mg/ml)-Mischung für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugieren (5 min, 250 G, 4°C) wurde das Pellet mit 10 ml HBSS gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 250 G, 4°C). Nun wurde das Pellet mit 5 ml vorgewärmer 2 mM EDTA-Lösung erneut bei 37°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (5 min, 30 G, 4°C). Der Überstand mit dissozierten Einzelzellen wurde in 15 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Das verbliebene Gewebepellet wurde erneut mit 5 ml vorgewärmer Kollagenase-Lösung (1 mg/ml) bei 37°C für 20 min verdaut. Es folgten mehrere Wiederholungsschritte einer mechanischen Zellseparation, indem die Gewebesuspension nach dem Kollagenase-Verdauungsvorgang mehrmals durch immer dünneren Kanülen gespritzt wurde, begonnen mit 19G bis zu 26G. Anschließend wurde diese Zellsuspension dem zuvor gelagerten Überstand hinzugegeben und zentrifugiert (5 min, 250 G, 4°C). Nach Waschen des Zellpellets mit 10 ml DPBS wurde erneut zentrifugiert (5 min, 250 G, 4°C), das Pellet mit 1 ml FACS-Puffer gelöst und durch ein 70 µl Filter mit 10 ml DPBS gefiltert. Nach abschließendem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer gelöst und für die anschließende Antikörperfärbung je 100 µl auf die FACS-Röhrchen verteilt. Die weiteren Färbeschritte werden im Folgenden beschrieben.

Färbeschritte der aufbereiteten Einzelzell-Suspensionen:

Zunächst wurde 100 µl jeder Zellsuspension (Knochenmark, Milz- und Nierengewebe) eine Mischung aus 5 µl Mäuseserum und 5 µl Rattenserum versetzt, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde den Proben je 1,4 µl der Fluorochrom-konjugierten Antikörper zur Detektion definierter Zellpopulationen zugegeben. Die Zusammenstellung der verwendeten Antikörper für die verschiedenen Zellfärbungen in den unterschiedlichen Organen ist in Tabelle 2.14 dargestellt. Knochenmark- und Milzproben (auch die Blutprobe), wurden zusätzlich mit AccuCheck Counting Beads zur späteren absoluten Quantifizierung der Zellzahlen versetzt. Nach Durchmischen im Vortex erfolgte eine lichtgeschützt Inkubation für 60 min bei 4°C. Anschließend wurde zweimalig mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 min, 250 G, 4°C). Zum Schluss wurde die Zellsuspension in 300 µl FACS-Puffer lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt und für die durchflusszytometrische Analyse verwendet.

Intrazelluläre Färbung von Kollagen I:

100 µl der Nierensuspension, nach der oben beschriebenen Methode hergestellt, wurden zunächst mit Anti-CD45- und Anti-CD11b-Antikörpern gefärbt. Es folgte ein zweimaliger Waschschritt. Nachfolgend wurden die Zellen nach Herstelleranweisung durch Zugabe von

2. Material und Methoden

300 µl Cytofix/Cytoperm plus fixiert und permeabilisiert. Anschließend fand die Inkubation mit dem biotinyliertem Antikörpern gegen Kollagen Typ 1 und nachfolgend APC-konjugiertem Streptavidin statt, sodass nach zweimaligem Waschen schließlich die Analyse mithilfe der Durchflusszytometrie für CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen 1⁺ Fibrozyten erfolgen konnte.

Tabelle 2.14. FACS-Färbungen von Blut, Milz, Knochenmark und Niere

Blut

Kurzform						
1. Färbung	CD3	Beads	CD3-Alexa488	CD45-PE	CD8-PE.Cy5	CD4-Alexa647
2. Färbung	F4/80	Beads	Ly6C-FITC	CD45-PE	CD11b-PE.Cy5	F4/80-APC
3. Färbung	Ly6G	Beads	Ly6G-FITC	CD11c-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC
4. Färbung	CCR2	Beads	CCR2-FITC	Ly6C-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC

Milz

Kurzform						
1. Färbung	CD3	Beads	CD3-Alexa488	CD45-PE	CD8-PE.Cy5	CD4-Alexa647
2. Färbung	F4/80	Beads	Ly6C-FITC	CD45-PE	CD11b-PE.Cy5	F4/80-APC
3. Färbung	Ly6G	Beads	Ly6G-FITC	CD11c-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC
4. Färbung	CCR2	Beads	CCR2-FITC	Ly6C-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC

Knochenmark

Kurzform						
1. Färbung	CD3	Beads	CD3-Alexa488	CD45-PE	CD8-PE.Cy5	CD4-Alexa647
2. Färbung	F4/80	Beads	Ly6C-FITC	CD45-PE	CD11b-PE.Cy5	F4/80-APC
3. Färbung	Ly6G	Beads	Ly6G-FITC	CD11c-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC
4. Färbung	CCR2	Beads	CCR2-FITC	Ly6C-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC

Niere

Kurzform						
1. Färbung	CD3		CD3-Alexa488	CD45-PE	CD8-PE.Cy5	CD4-Alexa647
2. Färbung	F4/80		CD11c-FITC	CD45-PE	F4/80-APC	
3. Färbung	Ly6G		Ly6G-FITC	CD11c-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC
4. Färbung	Ly6C		Ly6C-FITC	CD11c-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC
5. Färbung	CCR2		CCR2-FITC	Ly6C-PE	CD11b-PE.Cy5	CD45-APC
6. Färbung	Kollagen		CD45-FITC	CD11b-PE	Kollagen I-APC	

2.4.6.3 FACS-Analyse der verschiedenen Gewebe

Mit dem Gerät FACS Calibur und der dazugehörigen Software CellQuest an einem Apple Macintosh Computer wurden die FACS-Analysen durchgeführt. Für die Messung wurden Antikörper verwendet, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), Alexa Fluor 488 (Alexa488), Phycoerythrin (PE), Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5),

2. Material und Methoden

Allophycocyanin (APC), und Alexa Fluor 647 (Alexa647) konjugiert waren, die sich in der Eigenschaft ihrer Absorptionsmaxima und Emissionsmaxima unterscheiden (siehe Abbildung 2.8 und Abbildung 2.9). Durch bestimmte simultan detektierbare Antikörperkombinationen können dabei bestimmte Zellpopulationen erfasst werden, welche exemplarisch in Tabelle 2.15 dargestellt sind (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000).

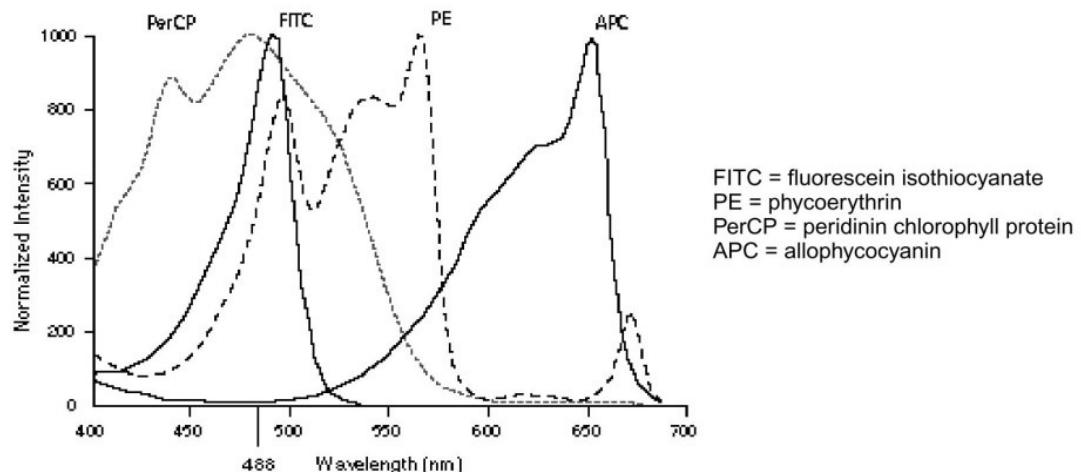


Abbildung 2.8. Absorptionsspektren und Maxima einiger exemplarischer Fluoreszenzfarbstoffe (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)

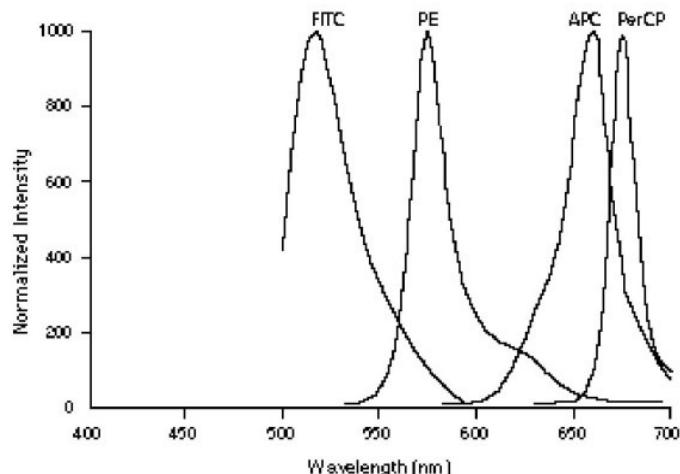


Abbildung 2.9. Emissionsmaxima einiger exemplarischer Fluoreszenzfarbstoffe (BD-Flow-Cytom-Learning-Guide 2000)

2. Material und Methoden

Tabelle 2.15. Exemplarische Darstellung der Antigenpräsentation auf den unterschiedlichen Zelltypen (Bideak 2017)

Zellkategorie	Phänotyp der detektierten Zellen		
Leukozyten	CD45+		
Neutrophile Granulozyten	CD45+	Ly6G+	F4/80-
Dendritische Zellen	CD45+	CD11c+	
F4/80+ dendritische Zellen	CD45+	CD11c+	F4/80+
F4/80- dendritische Zellen	CD45+	CD11c+	F4/80-
Makrophagen	CD45+	CD11c-	F4/80+
T-Lymphozyten	CD45+	CD3+	
CD8+ T-Lymphozyten	CD45+	CD3+	CD8+
CD4+ T-Lymphozyten	CD45+	CD3+	CD4+

In Abbildung 2.10 wird das Vorgehen bei der Auswertung der FACS-Daten dargestellt. Die Einzelzellen werden entsprechend ihrer exprimierten Antigene Populationen zugeordnet (Tabelle 2.14). So können Zellgruppen voneinander unterschieden und einzelne Zellpopulationen quantifiziert werden. Ähnliches Vorgehen erfolgt bei Untersuchung der verschiedenen Organe. Im Blut können Leukozytenpopulationen zudem durch ihre charakteristischen Eigenschaften im Forward- und Sideward Scatter in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenziert werden.

2. Material und Methoden

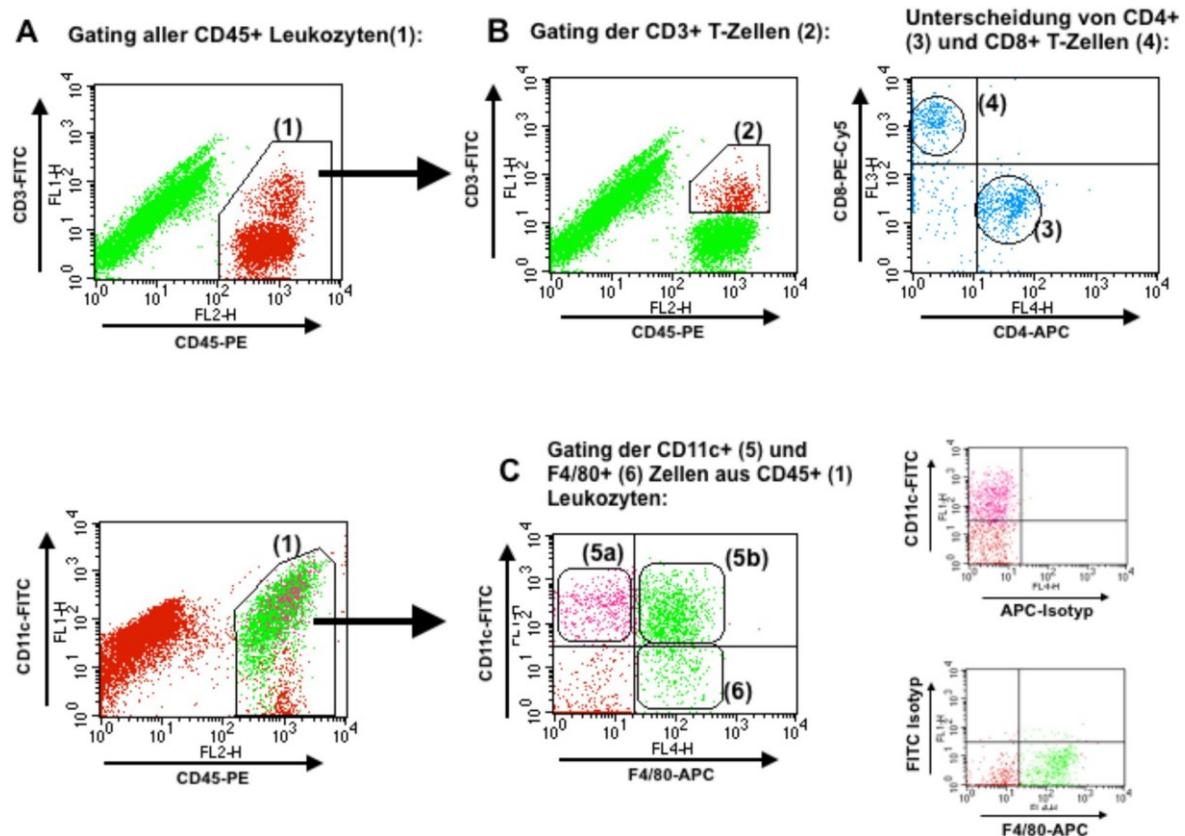


Abbildung 2.10. Darstellung der FACS Analyse in Übersicht (Bideak. 2017):

A: CD45+ Zellen Darstellung (1),
B: CD3+ T-Zellen Darstellung (2), weiter werden CD3+CD4+ (3) und CD3+CD8+ (4) unterschieden,
C: CD11c+ dendritische Zellen (5a+b), die wiederum in CD11c+F4/80- (5a) und CD11c+F4/80+(5b) Zellen einteilen lassen. F4/80+ Leukozyten (5b+6) und F4/80+CD11c- Makrophagen (6), CD11c-FITC und F4/80-APC sind als Isotyp-Kontrollen dargestellt (Bideak 2017).

2.4.7 Molekularbiologische Methoden

2.4.7.1 RNA-Isolation

Für nachfolgende mRNA-Expressionsanalysen war es nötig, die RNA aus Geweben zu isolieren. Dabei wurde das PureLink® RNA mini Kit von Ambion® by Live Technologies verwendet. Sämtliche Schritte erfolgten auf Eis und RNase-frei.

Die Nierenprobe wurden in 600 µl Lyse-Puffer, versetzt mit 6 µl 2-Mercaptoethanol, mit dem Rotatorblatt des Ultra-Turrax® (20 s, Stufe 4) homogenisiert. Vor jeder Homogenisierung wurde das Rotatorblatt des Ultra-Turrax® mit 70% Ethanol und dann mit ddH₂O gereinigt. Zu dieser Zellsuspension wurden zunächst 700 µl 70% Ethanol hinzugegeben und für mehrere Sekunden stark mit einem Vortex-Gerät gemischt. Von dem Gemisch wurden 700 µl Portionen in besondere Zentrifugen-Kartuschen, die sich in Entnahme-Röhrchen befinden, aufgetragen und bei 12.000 G für 30 s bei Raumtemperatur zentrifugiert. Während die in der Probe befindliche RNA in Folge des Zentrifugierens

2. Material und Methoden

gebunden an das Kartuschen-Material zurückblieb, wurde der Durchfluss verworfen. Diese Schritte wurden mit jeweils weiteren 700 µl des Gewebe-Homogenisats wiederholt, bis die gesamte Probe aufgebraucht war. Nun wurden 700 µl des Wasch-Puffers I des Kits hinzugefügt und bei 12.000 G für 15 s und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss sowie das Entnahme-Röhrchen wurden verworfen und die Zentrifugen-Kartusche in ein neues Sammelröhrchen platziert. Nun wurden 500 µl Wasch-Puffer II des Kits hinzugefügt und erneut bei 12.000 G für 15 s und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und diese Schritte insgesamt zweimal wiederholt. Im Anschluss wurde bei 12.000 G für 1-2 min zentrifugiert, um das Kartuschen-Material mit der gebundenen RNA zu trocknen. Es wurden nun 30-100 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für 2 min bei > 12.000 G bei Raumtemperatur zentrifugiert, um die RNA vom Kartuschen-Material zu lösen. Das RNA-haltige Eluat wurde aufgefangen und sofort zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert oder bei -80°C zur späteren Verwendung eingefroren.

2.4.7.2 Umschreibung der RNA in DNA

Zunächst wurde die Konzentration der isolierten RNA mit dem NanoDrop Photometer bestimmt. Dafür wurde 1 µl der Probe auf den mit Aqua geeichten Sensor gegeben und die Konzentration in ng/µl ermittelt. Auf Basis dieser Werte wurden individuell für die Proben Verdünnungen vorgenommen, die für alle Proben eine einheitliche Konzentration von 2 µg in 12,55 µl hervorbrachten. Für die Verdünnung wurde das 2 µg RNA enthaltende Probenvolumen mit DEPC-behandeltem Wasser (RNase-frei) auf ein Endvolumen von 12,55 µl aufgefüllt. Schließlich wurden 7,45 µl Mastermix (Tabelle 2.16) zur RNA-Probe hinzugegeben, der für die reverse Transkription (RT) notwendig ist. Eine reverse Transkription ist eine Umkehrung der physiologischen Transkription. Bei einer Transkription wird doppelsträngige DNA (Deoxyribonucleic acid) abgelesen und eine Kopie als RNA (Ribonucleic acid) erstellt. Bei der reversen Transkription wird nun vorhandene, instabile RNA in eine stabile komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dies muss unter RNase-freien Bedingungen erfolgen, die zum Abbau der instabilen Ausgangs-RNA führen würden.

2. Material und Methoden

Tabelle 2.16. Mastermix für die reverse Transkription

Reagenz	Volumen Ansatz [µl]
FS-Puffer (First Strand Buffer)	4,5
25 mM dNTPs	0,45
0,1 M DTT	1
Lin.Acrylamid	0,25
Hexanucleotide	0,25
Recombinant RNAsin (Rubonukleaseinhibitor)	0,5
SuperScript (Reverse Transkriptase)	0,5
Gesamt	7,45

Nach einem Linearisierungsvorgang der RNA durch starkes Erhitzen und rapide Schock-Kühlung wurde die Transkription im Mastercyler® pro (Eppendorf) durchgeführt (Tabelle 2.17). Mit diesem Vorgang wurde die RNA erfolgreich in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Als Negativkontrolle wurde das Prozedere zusätzlich mit DEPC-behandeltem Wasser als alleiniges Medium durchgeführt; hier wurde keine cDNA generiert. Prinzipiell verwendet man RNase freies DEPC-behandeltes Wasser als Negativkontrolle, um eine möglich Kontamination der Reagenzien mit Fremd-RNA und damit eine fälschliche cDNA-Herstellung und spätere Vervielfältigung zu vermeiden.

Tabelle 2.17. Programm des Thermo-Cycler für die reverse Transkription

Programm	Zieltemperatur [°C]	Dauer [min]
Umschreibung	42	120
Beendigung der Reaktion	85	5
Abkühlung	4	∞

2.4.7.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Quantifizierung der mRNA-Expression durch Messung der umgeschriebenen cDNA. Die Bestimmung erfolgte am Gerät LightCycler 480 Real-Time PCR-System unter Verwendung von 96-Well-Platten. Die Besonderheit der Real-Time PCR im Gegensatz zur konventionellen PCR ist, dass die Amplifikation der DNA durch eine zunehmende Fluoreszenzmarkierung in Echtzeit fortlaufend photometrisch gemessen wird. Am Ende jedes cDNA-Amplifikations-Zyklus wird im LightCycler die Emissionsintensität des in doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoffes SYBR® Green I gemessen. Durch den zunehmenden Einbau des Farbstoffs kommt es zur vermehrten Emission des

2. Material und Methoden

Fluoreszenzsignals, das direkt proportional zur synthetisierten cDNA-Menge ist. Übersteigt das Signal den zuvor festgesetzten Grenzwert, wird die Anzahl der bis dahin durchlaufenen Zyklen als CT-Wert (Cycle Threshold) angegeben. Je kleiner der CT-Wert ist, bei dem das erste Mal ein Fluoreszenzsignal detektiert wird, desto mehr Anfangssubstrat war zu Beginn vorhanden. Um unabhängig von der ursprünglich eingesetzten Gewebemenge das mRNA-Expressionsniveau in unterschiedlichen Proben vergleichen zu können ist es nötig, dieses Signal in Bezug zu einem Referenzwert zu setzen. Hierfür wird ein exprimiertes Gen, das in allen Proben gleichermaßen und konstant vorhanden ist (Housekeeping-Gen), herangezogen. Damit ist eine relative Quantifizierung möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen die ribosomale 18 S RNA (18S rRNA) verwendet.

Zur Durchführung der quantitativen PCR wurden die cDNA-Proben im Verhältnis 1:10 in DEPC-behandeltem Wasser verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 8,64 µl Proben in die jeweiligen Wells gegeben. Als Leerwert und Negativkontrolle wurde in doppelter Ausführung H₂O mit 8,64 µl verwendet. Als weitere Negativkontrolle diente für jede untersuchte Gewebeprobe der RT-Ansatz aus der reversen Transkription, der kein cDNA-Ausgangsmaterial für die Amplifikation enthält. Die notwendigen Nukleinbausteine, Enzyme und Puffer für die qPCR wurden in einem Mastermix zusammengestellt (Tabelle 2.18). Von diesem Mastermix wurden jeweils 11,36 µl zu den verdünnten cDNA-Proben gegeben. Die dafür verwendeten 96-Well-Platten wurden mit einer Folie luftdicht verschlossen und bei 280 G zentrifugiert.

Tabelle 2.18. Mastermix für Genbestimmungen mittels qPCR im LightCycler 480

Reagenz	Volumen [µl]
SYBR® Green 2x	10
Taq Polymerase	0,16
Forward Primer	0,6
Reverse Primer	0,6
Gesamt	11,36

Danach erfolgte die Amplifikation der cDNA über 40 Zyklen im LightCycler 480 Real-Time PCR-System mit quantitativer Analyse der PCR-Reaktionen mittels der dazugehörigen Software. Nach den 40 Amplifikationsschritten erfolgte abschließend die Analyse der Schmelzkurve, um die Spezifität der Amplifikation zu überprüfen. Dieser liegt zugrunde, dass bei Erhitzung doppelsträngiger komplementärer DNA eine Dissoziation in die zwei Einzelstränge erfolgt. Dies kann optisch durch die sich verändernde Absorptionintensität dargestellt werden. Das Aufschmelzen der cDNA in zwei Einzelstränge kann somit bei kontinuierlicher Erhöhung der Temperatur aufgezeichnet werden. Die in Abhängigkeit zur

2. Material und Methoden

Temperaturerhöhung veränderte Absorption wird als sigmoidale Schmelzkurve dargestellt. Der Wendepunkt wird dabei als Schmelzpunkt (CP) bezeichnet. Hier liegen cDNA und Einzelstrang-DNA gleichermaßen vor (50%:50%). Der Schmelzpunkt ist dabei von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem vom DNA-Gehalt an Guanin-Cytosin- (drei Wasserstoffbrückenbindungen) und Adenin-Thymin-Paarungen (zwei Wasserstoffbrückenbindungen), jedoch für die amplifizierte cDNA spezifisch. Durch die Schmelzkurven-Analyse kann somit die Reaktionsspezifität der PCR sichergestellt und die Messung unspezifischer PCR-Produkte oder Primer-Dimere ausgeschlossen werden.

Tabelle 2.19. Programm der Gen-Analysen mittels qPCR im LightCycler 480

Programm	Wiederholung	Zieltemperatur	Dauer	Temperaturänderung
		[°C]	[s]	[°C/s]
Initiale Denaturierung	1	95	300	4,4
		95	15	4,4
Amplifikation	40	60	15	2,2
		68	20	4,4
Schmelzkurve	1	95	5	4,4
		65	60	2,2
		97	-	0,11
Abkühlen	1	40	30	2,2

Es wurden nur Proben ausgewertet, die eine eindeutige Zuordnung zum charakteristischen Temperaturpeak hatten und sich von der Wasserkontrolle differenzierten. Die Quantifizierung des cDNA-Gehalts erfolgte mit Hilfe des CT-Werts, (cycle threshold, c_t), der die PCR-Zykluszahl darstellt, in der die gemessene SYBR® Green I-Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert über dem Hintergrundniveau überschreitet. Je mehr cDNA (und damit ursprünglich mRNA) von einem zu bestimmenden Gen in der Gewebeprobe enthalten war, desto kleiner ist der CT-Wert. Die ermittelten CT-Werte der einzelnen cDNA-Spezies wurden ins Verhältnis zum Referenzwert des Housekeeping-Gens 18S rRNA in der gleichen Probe gesetzt, wie in nachfolgender Formel dargestellt, um die Vergleichbarkeit verschiedener Gewebeproben zu ermöglichen. Es wurde somit eine relative Quantifizierung vorgenommen.

Formel 2.3. Berechnung von vergleichbaren PCR Werte: Als Houskeeping Gen dient dabei 18S rRNA

$$\Delta CT = 2^{-(CT_{18S\ rRNA} - CT_{Zielgen\ mRNA})} \times 10^6$$

2. Material und Methoden

2.4.8 Histologische Untersuchungen

Nach der in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Organgewinnung wurden Organstücke in Histosette-Gewebekassetten überführt, in 10% Formaldehyd in PBS über 24 h fixiert und danach in Paraffin eingebettet. Die weitere Aufbereitung der histologischen Präparate erfolgte in der Histologie-Core Facility der Abteilung. Es wurden 2 µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt, auf einen mit 5 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan (APES) in 245 ml Aceton vorbehandelten Objektträger platziert und für 12 Stunden im Trockenschrank bei 60°C getrocknet. Anschließend erfolgte gleichermaßen für die verschiedenen Färbungen eine Entparaffinierung durch Xylol, eine Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, 50%) und zweimaliges Spülen mit PBS. Die weiteren Schritte der Färbungen wurden nach standardisierten Protokollen des Labors durchgeführt.

PAS-Färbung

Die PAS-Färbung, auf die PAS-Reaktion (periodic acid-Schiff-reaktion) zurückzuführende Färbemethode, ist eine der häufigsten Färbetechniken der Histologie, bei der die Anfärbung von Kohlenhydraten wie Glykogen, Cellulose, neutralen Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen erfolgt. Die Periodsäure oxidiert Glykolgruppen zu zwei Aldehydgruppen, welche nachfolgend durch die Bindung der zugefügten, zunächst farblosen fuchsin-schwefeligen Säure die typische Magenta-Färbung bewirken. Die wie oben beschreiben vorbehandelten Präparate, wurden zur Entparaffinierung durch Oxidierung für 5 min in 2% Periodsäure eingelegt und im Anschluss mit destilliertem Wasser gespült. Die entstandenen Aldehydgruppen wurden durch das Einlegen in Schiff'sches Reagenz für 20 min gefärbt, dann für weitere 2 min in Mayers Hämatoxylin gegengefärbt und schließlich mit fließendem Wasser gespült und wieder entwässert in aufsteigender Alkoholreihe. In Pertex wurden die Schnitte abschließend eingebettet.

Das Ausmaß der für die frühe diabetische Nierenschädigung charakteristischen Vergrößerung der Glomeruli und mesangialen Matrixvermehrung wurde in PAS-gefärbten Schnitten quantifiziert.

Für die Auswertung der **PAS-Färbung** wurden aus dem jeweiligen Schnitt alle erfassten mittig angeschnittenen Glomeruli mit dem Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung abfotografiert. Diese Bilder wurden dann verblindet ausgewertet. Mit Photoshop wurde zunächst die Größe der Glomeruli mit Hilfe der Pixelzahl der Querschnittsfläche bestimmt, die später als Größenbezug verwendet wurde. Weiter wurde die Pixelanzahl der Mesangiumexpansion bestimmt, die anhand der Farbanalyse des Mesangiumgewebes mit charakteristischer Eosinophilie der Matrix abgegrenzt wurde. Diese beiden Pixelanzahlen wurden ins Verhältnis gesetzt, sodass die Mesangiumexpansion als Prozentzahl der

2. Material und Methoden

Glomerulus-Querschnittsfläche angegeben werden konnte. Auf diese Weise wurden 916 Bilder ausgewertet.

Immunhistologie

Für die immunhistologischen Färbungen der histologischen Schnitte zum Nachweis renaler Leukozyteninfiltration wurden unterschiedliche Antikörper und Antikörperkonzentrationen verwendet. Antikörper können dabei direkt farbgekoppelt sein oder mittels einem Sekundärantikörper angefärbt werden. Der Erfassung renaler T-Lymphozyten erfolgte mittels Ratte Anti-CD3-Antikörper (Verdünnung 1:50), interstitieller Makrophagen mittels Ratte Anti-F4/80 (Verdünnung 1:50) und ER-HR3-positiver Makrophagenpopulationen mittels Ratte Anti-ER-HR3-Antikörper (Verdünnung 1:50).

Die Färbungen der Schnitte wurden mittels Avidin-Biotin-Methode angefertigt. Verwendet wurde dafür das Avidin/Biotin Blocking Kit. Dabei bindet an der Zielstruktur des Gewebes ein Primärantikörper, der im zweiten Schritt an einen Biotin-gebundenen Sekundärantikörper gekoppelt wird. Anschließend geht im dritten Schritt das Peroxidase-konjugierte Avidin mit dem Biotin des Sekundärantikörpers eine hochaffine, komplexbildende Bindung ein. Das beinhaltete Farbsubstrat wird von der Peroxidase oxidiert und somit die Komplexe, also die Zielstruktur, durch den Farbumschlag sichtbar. Nach Schritten der Entparaffinierung, Rehydrierung und Waschen (2x mit PBS, je 7 min), folgte zunächst durch das 20- minütige Einlegen in 3% Wasserstoffperoxid-Lösung (30% H₂O₂ in Methanol 1:10-Verdünnung) eine Blockierung der endogenen Peroxidase. Nach weiterem Waschen (2x mit PBS, je 7 min) konnten mittels Erhitzen in einer Mikrowelle und 3 ml einer Antigen-Unmasking-Lösung in 300 ml ddH₂O die Antigene freigelegt werden. Nach erneutem Waschen (2x mit PBS, je 7 min) wurde auch das endogene Biotin mit Avidin innerhalb von 15 min blockiert. Gefolgt von weiteren Waschvorgängen (2x mit PBS, je 7 min) wurde nun Biotin für 15 min zugegeben, ungebundenes wieder ausgewaschen (2x mit PBS, je 7 min) und in 10% Ziegenserum für 10 min eingelegt. Dies dient der Prophylaxe der Fehlkomplexierung unspezifischer Bindungen. Nun folgten die Inkubationen der jeweiligen Antikörper nach Herstellerangaben, denen jeweils Waschvorgänge (2x mit PBS, je 7 min) folgten. Nun wurde die ABC-Substratlösung (15 µl Reagenz A, 15 µl Reagenz B in 1 ml PBS) und der Sekundärantikörper für 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen (2x mit PBS, je 7 min) folgte eine weitere Waschung mit TRIS-Hydrochlorid. Die Färbung erfolgte mit DAB-Färbelösung für einen Zeitraum von 1-10 min, je nach Resultat der Intensitätskontrolle mittels Mikroskop. Eine Gegenfärbung folgte mit Methylgrün. Abschließend wurden die Präparate mit Ethanol (2x 96% Ethanol, 3x 100% Ethanol, für je 10 s) gewaschen und mit VectaMount verschlossen.

2. Material und Methoden

Für die Auswertung der **Anti-CD3-Färbung** zur Bestimmung der glomerulären und interstitiellen T-Lymphozytenzahl wurden zunächst 10 Bildausschnitte der Nierenschnitte pro Versuchstier im Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen und verblindet gespeichert. Es wurde die Zahl gefärbter Zellen mithilfe von ImageJ im Interstitium und gesondert in den mittig angeschnittenen Glomeruli pro Bild (im Durchschnitt 2 Glomeruli/Aufnahme, insgesamt 20) bestimmt. Das Ausmaß der T-Zell-Infiltration im Interstitium und in den Glomeruli wurde aus den Mittelwerten der jeweiligen interstitiellen und glomerulären Zellzahl/Gesichtsfeld je Tier ermittelt.

Für die Auswertung der **Anti-F4/80-Färbung** wurden zunächst 10 Bilder der Nierenschnitte pro Versuchstier im Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung angefertigt und verblindet gespeichert. Es wurde manuell die Anzahl gefärbter Zellen je Bildausschnitt mithilfe von ImageJ gezählt und das Ausmaß der interstitiellen Makrophageninfiltration als gemittelten Wert der Zellzahl/Gesichtsfeld aller ausgewerteten Bilder des gleichen Tieres angegeben. Die renale Akkumulation glomerulärer und interstitieller Makrophagenpopulationen wurde zusätzlich durch Auswertung der **Anti-ER-HR3-Färbung** quantifiziert. Es wurden zunächst 10 Bilder des gefärbten Nierengewebes pro Versuchstier im Mikroskop bei 200-facher Vergrößerung aufgenommen und verblindet gespeichert. Es wurde die Zahl gefärbter Zellen mithilfe von ImageJ im Interstitium und gesondert in den mittig angeschnittenen Glomeruli pro Bild (im Durchschnitt 2 Glomeruli/Aufnahme, insgesamt 20) bestimmt. Das Ausmaß der interstitiellen und glomerulären Makrophagenakkumulation wurde aus den Mittelwerten der interstitiellen und glomerulären Zellzahl/Gesichtsfeld ermittelt.

2.5 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) mit Standardfehler (SEM) angegeben und graphisch dargestellt. Zum statistischen Vergleich von Ergebnissen zweier Gruppen wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt. Dieser ist ein statistisches Prüfverfahren metrisch-skalierter y-Variablen, in welchem Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben, die sich in einer Normalverteilung darstellen, auf Unterschiedlichkeit geprüft werden. Von einem Unterschied mit statistischer Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ ausgegangen und graphisch mit „*“ gekennzeichnet. Unterschiede mit höherem Signifikanzniveau sind mit „**“ ($p < 0,01$) und „***“ ($p < 0,001$) verdeutlicht. Sämtliche Versuche wurden 2- bis 4-mal durchgeführt und waren reproduzierbar. Die Berechnungen von Daten sowie die grafische Darstellung erfolgten mithilfe von Microsoft Excel des Microsoft-Office-Student-Paketes 2007 und GraphPad Prism 5.0. Zur histologischen Auswertung wurden desweiteren Adobe Photoshop und ImageJ verwendet. Für die Darstellung der Überlebenskurve wurde in GraphPad Prism 5.0 eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt und die Berechnung des Signifikanzniveaus mit Log-Rank-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Induktion des diabetischen Nephropathie-Modells

Das Tiermodell der diabetischen Nephropathie wurde in einem zwei-schrittigen Prozess induziert. Im ersten Schritt erfolgte in männlichen 8 Wochen alten Mäusen eine einseitige Nephrektomie zur Auslösung einer für die diabetische Nierenschädigung charakteristischen glomerulären Hyperfiltration in der verbliebenen Niere. Insgesamt wurden 41 Versuchstiere beider Genotypen operiert. Davon überlebten den operativen Eingriff 38. Die Erfolgsrate der Operation lag somit bei 93 %. Hatten die Versuchstiere den Eingriff in Narkose überlebt, gab es keine weiteren Verluste mehr bis zur STZ-Injektion.

2 Wochen nach Nephrektomie erfolgte die Induktion einer diabetischen Stoffwechsellage durch intraperitoneale Injektion von 40 mg/kg KG STZ an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Ein Versuchstier ist beim Injektionsvorgang am ersten Tag verstorben und wurde bei der Gesamtzahl (STZ-Gabe Tag 1) nicht berücksichtigt. Es ergab sich somit eine Anfangstierzahle von 37, mit 21 Wildtyp- und 16 *Ackr2^{-/-}*-Mäusen. Von diesen mussten im weiteren Versuchsverlauf bis Woche 25 nach STZ-Injektion 6 Tiere aufgrund eines verschlechterten Allgemeinzustands vorzeitig euthanasiert werden. Damit erreichten 31 Mäuse (84%) die Endzielwoche 25, hiervon 17 Wildtyp- und 14 *Ackr2^{-/-}*-Mäuse (Tabelle 3.1).

Für die nachfolgende Phänotypanalyse wurden nur Mäuse verwendet, die zu diesem Zeitpunkt anhand eines HbA_{1c} Wertes > 5,0% tatsächlich eine diabetische Stoffwechsellage aufwiesen. Dies waren 25 von 31 Versuchstiere (81%), davon 14 von 17 Wildtyp-Tiere (82%) und 11 von 14 *Ackr2^{-/-}*-Mäuse (79%). Die beiden Genotypen unterschieden sich somit nicht wesentlich in ihrer Häufigkeit einer erfolgreichen Diabetes-Induktion nach den STZ-Injektionen.

Tabelle 3.1. Übersicht der Versuchstiere im Diabetesmodell

Gruppe	STZ-Gabe Tag 1	Versuchsabschluss Woche 25	Hiervon HbA _{1c} > 5%
	Anzahl	Anzahl	Anzahl
WT	21	17 (81%)	14 (82%)
<i>Ackr2^{-/-}</i>	16	14 (88%)	11 (79%)
Gesamt	37	31 (84%)	25 (81%)

Als Kontrollgruppe wurden unbehandelte gleichaltrige männliche Tiere (n = 14) verwendet, hiervon 9 Wildtyp- und 5 *Ackr2^{-/-}*-Mäuse. Bei diesen Tieren erfolgte keine unilaterale Nephrektomie und keine Induktion des Diabetes mellitus. Alle Tiere der beiden Kontrollgruppen wurden bis Woche 25 verfolgt.

3. Ergebnisse

3.2 Charakterisierung der diabetischen Nephropathie in Wildtyp-Mäusen

Zunächst wird das Ausmaß der induzierten diabetischen Nierenschädigung in dem verwendeten Tiermodell durch Vergleich von diabetischen Wildtyp-Tieren mit den unbehandelten Wildtyp-Kontrollen charakterisiert.

3.2.1 Charakterisierung der diabetischen Stoffwechsellage in Wildtyp-Tieren

Grundlage der weiteren Phänotypanalyse der Versuchstiere ist die erfolgreiche Induktion des Diabetes mellitus. Das Bestehen der diabetischen Stoffwechsellage wurde in Woche 25 am Versuchsende kontrolliert. Hierfür wurde den Versuchstieren wie beschrieben Blut abgenommen und laborchemisch die Glukose-Plasmaspiegel und der HbA_{1c}-Wert als Langzeitverlaufsparameter des Diabetes bestimmt. Definitionsgemäß werden nur Tiere mit erfolgreicher Diabetesinduktion ($HbA_{1c} > 5,0\%$, vgl. Abschnitt 2.3.2) in die weitere Analyse einbezogen. Im Vergleich zur unbehandelten Wildtyp-Kontrollgruppe (Kontroll-WT) weisen diese Tiere (Diabetes-WT) hochsignifikant erhöhte Glukose-Plasmaspiegel und signifikant erhöhte HbA_{1c}-Werte als die unbehandelten Wildtyp-Mäuse der Kontrollgruppe auf (Abbildung 3.1).

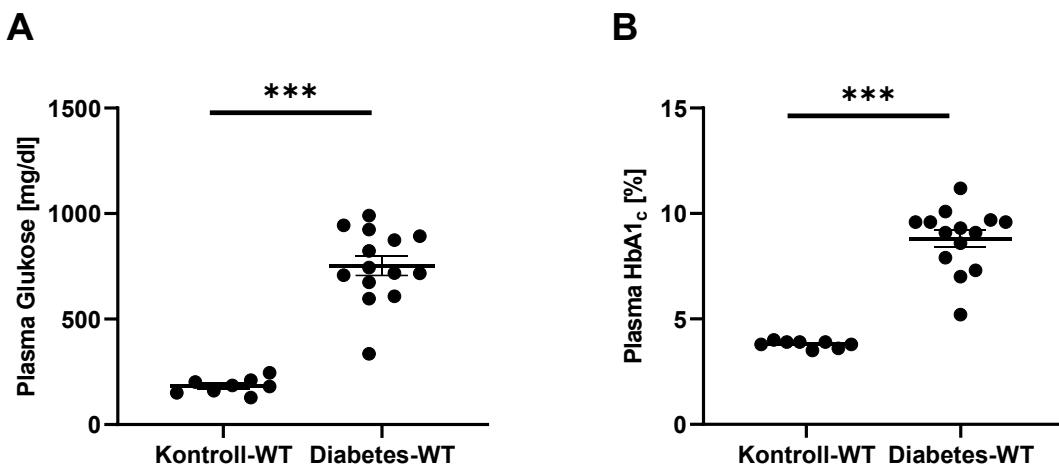


Abbildung 3.1. Darstellung der diabetischen Stoffwechsellage im Vergleich der Wildtypier-Kontrollgruppe (Kontroll-WT) und der Wildtypgruppe mit induziertem Diabetes (Diabetes-WT) mit Mittelwerten \pm SEM, A: Glukose im Blutplasma, B: HbA_{1c} im Blutplasma zum Zeitpunkt Woche 25. *** $p < 0,001$,

Des Weiteren wurden im Plasma die Lipid-Werte als zusätzliche Stoffwechselparameter untersucht. Auch hierbei zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und den diabetischen Wildtyp-Mäusen (Diabetes-WT). Wie in Abbildung 3.2 dargestellt, weisen die diabetischen Tiere signifikant

3. Ergebnisse

verminderte Cholesterinwerte (Abbildung 3.2 A) bei gleichzeitig signifikanter Erhöhung der Triglyceride (Abbildung 3.2 B) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auf.

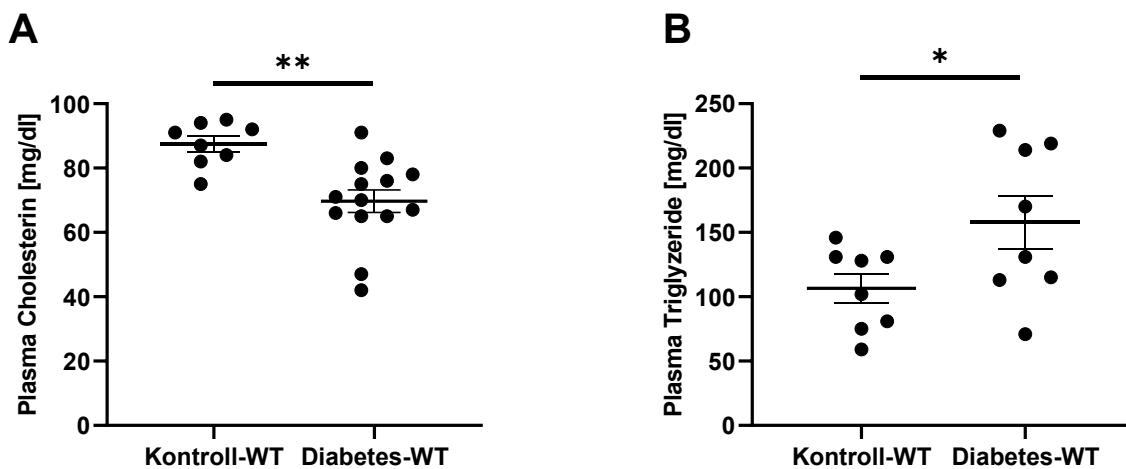


Abbildung 3.2. Darstellung der Lipidwerte mit Mittelwerten \pm SEM bei unbehandelten Wildtyp-Kontrolltieren und diabetischen Tieren (Diabetes-WT) zum Zeitpunkt Woche 25, A: Cholesterin im Plasma, B: Triglyceride im Plasma. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

3.2.2 Körper- und Nierengewicht der diabetischen Wildtyp-Tiere

Am Versuchsende in Woche 25 wurden letztmalig die Körpergewichte der Mäuse bestimmt. Hier zeigen sich bei den diabetischen Wildtyp-Mäusen (Diabetes-WT) ein signifikant geringeres Körpergewicht als bei der unbehandelten Kontrollgruppe (Kontroll-WT) (Abbildung 3.3 A), das am ehesten in dem anhaltenden relativen Insulinmangel in den STZ-behandelten Tieren begründet sein dürfte.

Weiterhin wurden die Nierengewichte der Versuchstiere bestimmt. Es ist nochmals zu erwähnen, dass die diabetischen Mäuse in dem hier verwendeten experimentellen Modell einseitig nephrektomiert worden waren, so dass eine kompensatorische Hypertrophie der verbliebenen Niere auftritt. In Abbildung 3.3 B sind die Gewichte der Nieren aus der diabetischen Gruppe gegen eine Einzelniere der Kontrollgruppe aufgetragen - also jeweils nur eine Niere. Das signifikant höhere Einzelnierengewicht in den diabetischen Versuchstieren verdeutlicht die auftretende kompensatorische Hypertrophie der verbliebenen hyperfiltrierenden Niere. Vergleicht man jedoch das Gesamtnierengewicht, also in der Kontrollgruppe zwei Nieren gegenüber der Einzelniere der diabetischen Versuchstiere, behalten die Kontrolltiere ein signifikant höheres Gesamtnierengewicht, wie in Abbildung 3.3 C dargestellt ist. Aufgrund der signifikant reduzierten Körpergewichte der diabetischen Wildtyp-Mäuse wurde die Gesamtnierengewichte auch im Verhältnis zum Körpergewicht der Mäuse ausgewertet (Gesamt-Nierengewicht/Körpergewicht [g/g KG]).

3. Ergebnisse

Hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den beiden Vergleichsgruppen (Abbildung 3.3 D), was eine ausreichende kompensatorische Hypertrophie der verbliebenen Einzelniere in den diabetischen Mäusen verdeutlicht.

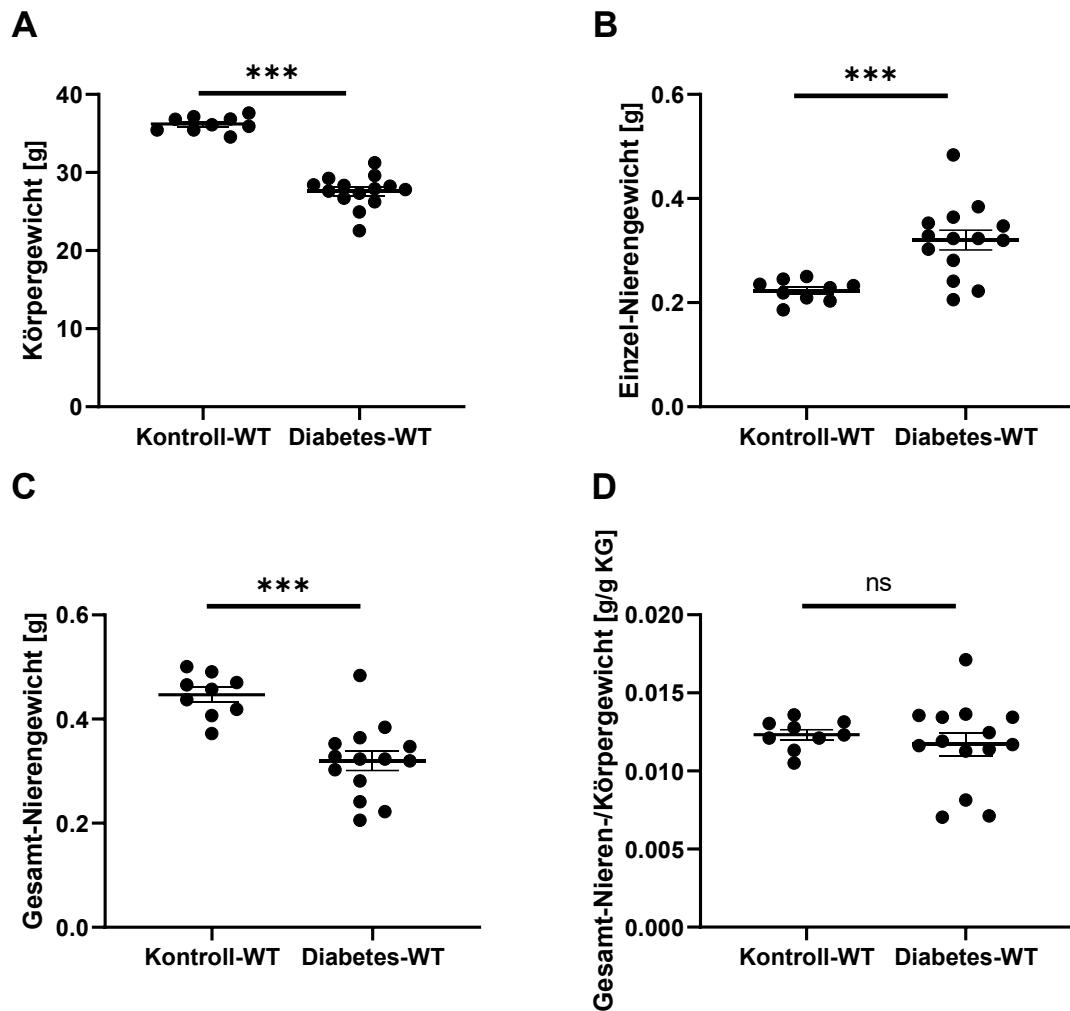


Abbildung 3.3. Darstellung der Körper- und Nierengewichte in Woche 25 bei Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Tieren (Diabetes-WT) mit Mittelwerten \pm SEM, A: Körpergewicht der Mäuse, B: Gewicht der Einzelniere von Wildtyp-Kontrolltieren und diabetischen Tieren, C: Gegenüberstellung des Gesamtnierengewichts der Versuchstiere (Kontrolltiere: 2 Nieren, Diabetestiere 1 Niere), D: Gesamtnierengewicht bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse (Kontrolltiere: 2 Nieren, Diabetestiere 1 Niere). *** $p < 0,001$; ns, nicht signifikant

3.2.3 Funktionelle Parameter der diabetischen Nierenschädigung in Wildtyp-Tieren
 Inwieweit eine Nierenfunktionseinschränkung in dem induzierten diabetischen Nephropathie-Modell vorlag, wurde zunächst durch Bestimmung der Nierenretentionsparameter im Plasma untersucht. In Abbildung 3.4 A (Kreatinin) und B (Harnstoff) sind die Werte der Wildtyp-Kontrolltiere und der diabetischen Versuchstiere in Woche 25 gegenübergestellt. Es zeigen sich in beiden Fällen deutlich signifikant erhöhte Werte in der

3. Ergebnisse

diabetischen Versuchsgruppe. Ergänzend wurden Gesamtprotein- und Albuminwerte ebenfalls im Plasma der Woche 25 bestimmt (Abbildung 3.4 C und D). Es zeigt sich eine signifikant verminderte Plasmakonzentration beider Substanzen in den diabetischen Wildtypieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies könnte auf eine zunehmende glomeruläre Schädigung mit renalen Albumin- und Proteinverlust hinweisen, wie sie für die diabetische Nephropathie charakteristisch ist.

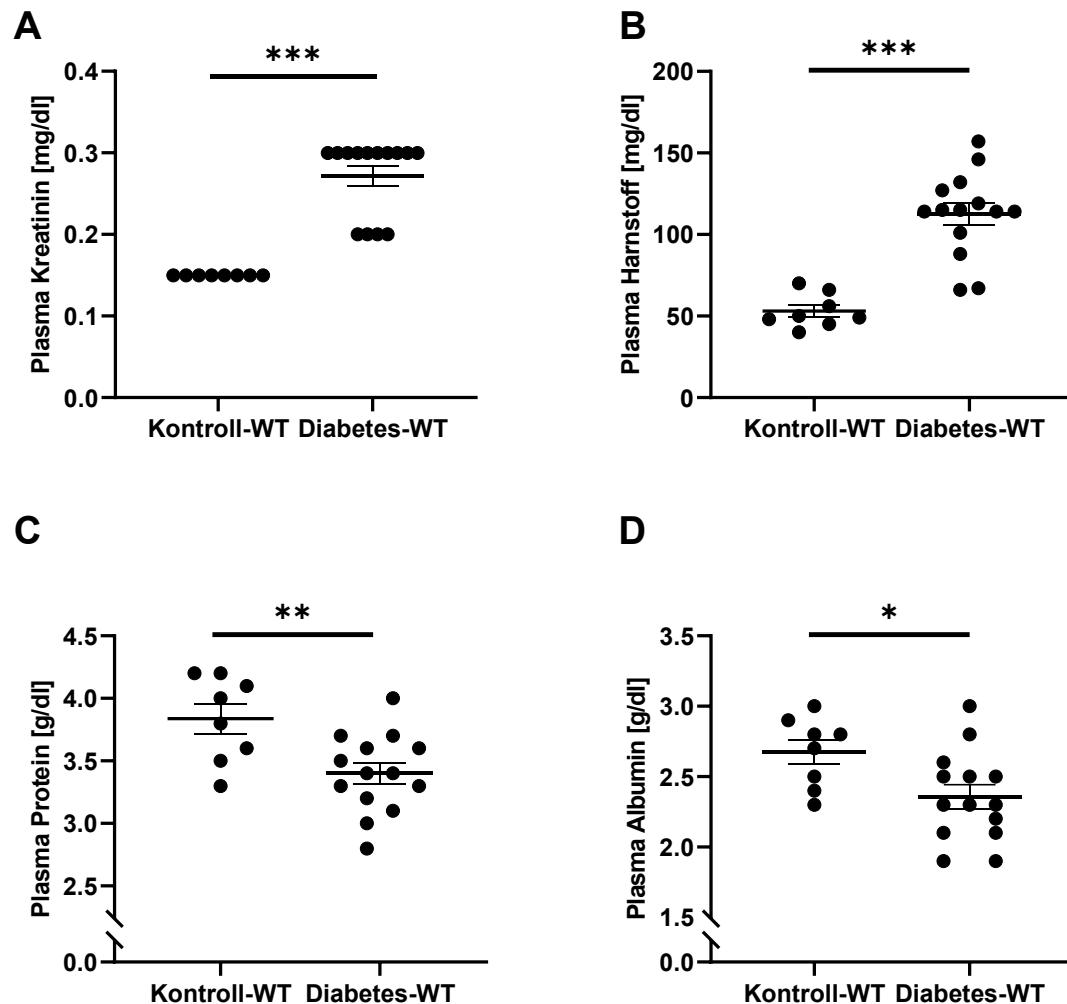


Abbildung 3.4. Vergleich der Plasmawerte in Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Wildtypieren (Diabetes-WT) in Woche 25 (Endpunkt) mit Mittelwerten \pm SEM, A: Kreatininkonzentration im Plasma, B: Harnstoffkonzentration im Plasma, C: Proteinkonzentration im Plasma und D: Albuminkonzentration im Plasma. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Die Nierenfunktion in den beiden Versuchsgruppen wurde zusätzlich durch direkte Messung der GFR anhand der renalen FITC-Sinistrin-Ausscheidung verglichen. Die gemessene GFR in den Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und den diabetischen Wildtypieren (Diabetes-WT) in Woche 23, also zwei Wochen vor dem Versuchsendpunkt (Woche 25), ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Es zeigt sich eine signifikant verminderte GFR

3. Ergebnisse

in den diabetischen Versuchstieren, das mit den erhöhten Plasmakonzentrationen von Kreatinin und Harnstoff in diesen Tieren korreliert.

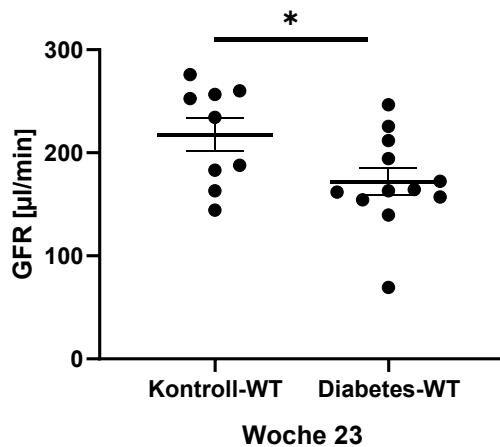


Abbildung 3.5. Darstellung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) in Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Wildtypptieren (Diabetes-WT) in Woche 23 mit Mittelwerten \pm SEM. * $p < 0,05$

Als weiterer funktioneller Parameter der glomerulären Schädigung bei diabetischer Nephropathie wurde die Albuminurie in den Versuchstieren quantifiziert. Im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren weisen die diabetischen Wildtypptiere in Woche 23 eine tendenziell vermehrte, allerdings nicht signifikant höhere Albuminurie auf (Abbildung 3.6 A). Im Vergleich zum Ausgangswert vor Induktion des Diabetes zeigt sich in diabetischen Wildtypptieren dagegen eine signifikante Zunahme der Albuminurie bis Woche 23 (Abbildung 3.6 B). Albuminurie-Daten der Woche 25 wurden nicht ausgewertet, da am Versuchsende nicht von allen Versuchstieren Spontanurin zur Analyse gewonnen werden konnte.

3. Ergebnisse

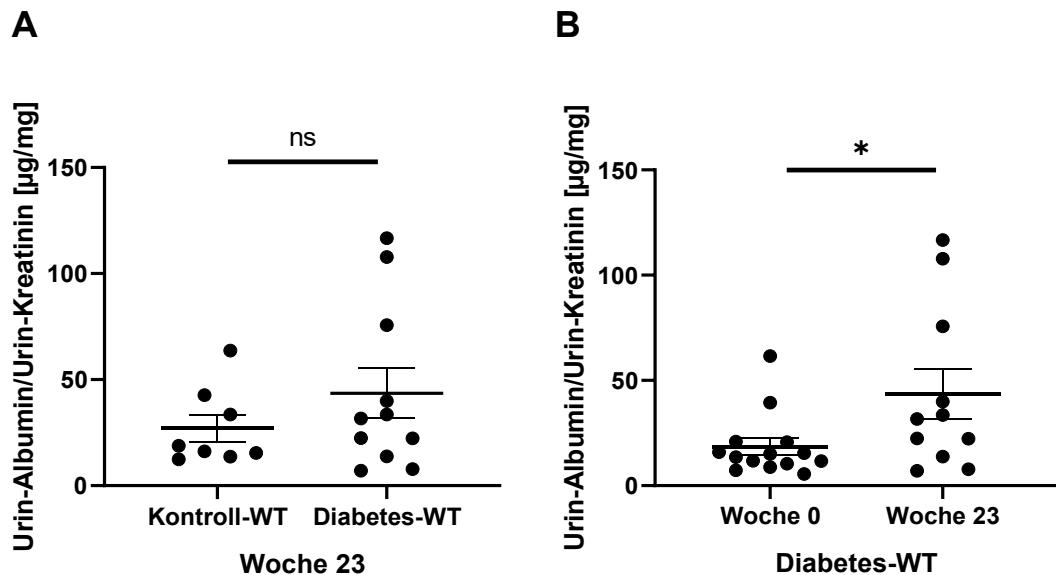


Abbildung 3.6. Albuminurie in Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Wildtyptieren (Diabetes-WT) in Woche 23 mit Mittelwerten \pm SEM, A: Albuminurie in Woche 23 in diabetischen Wildtyptieren im Vergleich zu Kontrolltieren, B: Zunehmende Albuminurie in Woche 23 im Vergleich zu Woche 0 in diabetischen Wildtyptieren (Diabetes-WT). * $p < 0,05$; ns, nicht signifikant

Zusammenfassend weisen diese funktionellen Daten darauf hin, dass sich in den Wildtypmäusen nach einseitiger Nephrektomie und Induktion des Diabetes ein diabetischer Nierenschaden entwickelt hat, der mit einer eingeschränkten exkretorischen Nierenfunktion und einer zunehmenden Albuminurie einhergeht.

3.2.4 Histopathologische Veränderungen infolge der diabetischen Nierenschädigung in Wildtyp-Tieren

Im Folgenden wurde untersucht, ob die verschlechterten funktionellen Parameter der diabetischen Wildtyptiere histologisch mit einer renalen Gewebeschädigung einhergehen. Die Auswertung der PAS-gefärbten Nierenschnitte (Abbildung 3.7 A) ergibt eine tendenzielle Vergrößerung der Glomeruli in diabetischen Mäusen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (Abbildung 3.7 B). Dagegen weisen die diabetischen Wildtyptiere eine deutliche Expansion der mesangialen Matrix im Vergleich zu den Wildtypkontrollen auf, als typisches Charakteristikum des diabetischen Nierenschadens (Abbildung 3.7 C). In den diabetischen Mäusen korrelieren somit verschlechterte Nierenfunktion und vermehrte Albuminurie mit Zeichen der diabetischen Nierenschädigung. Insgesamt erscheint damit das hier charakterisierte Mausmodell der diabetischen Nephropathie geeignet, um durch eine vergleichende Verlaufsuntersuchung in Wildtyp- und Ackr2-Knockout-Mäusen den Einfluss von ACKR2 auf die diabetische Nierenschädigung weiter zu untersuchen.

3. Ergebnisse

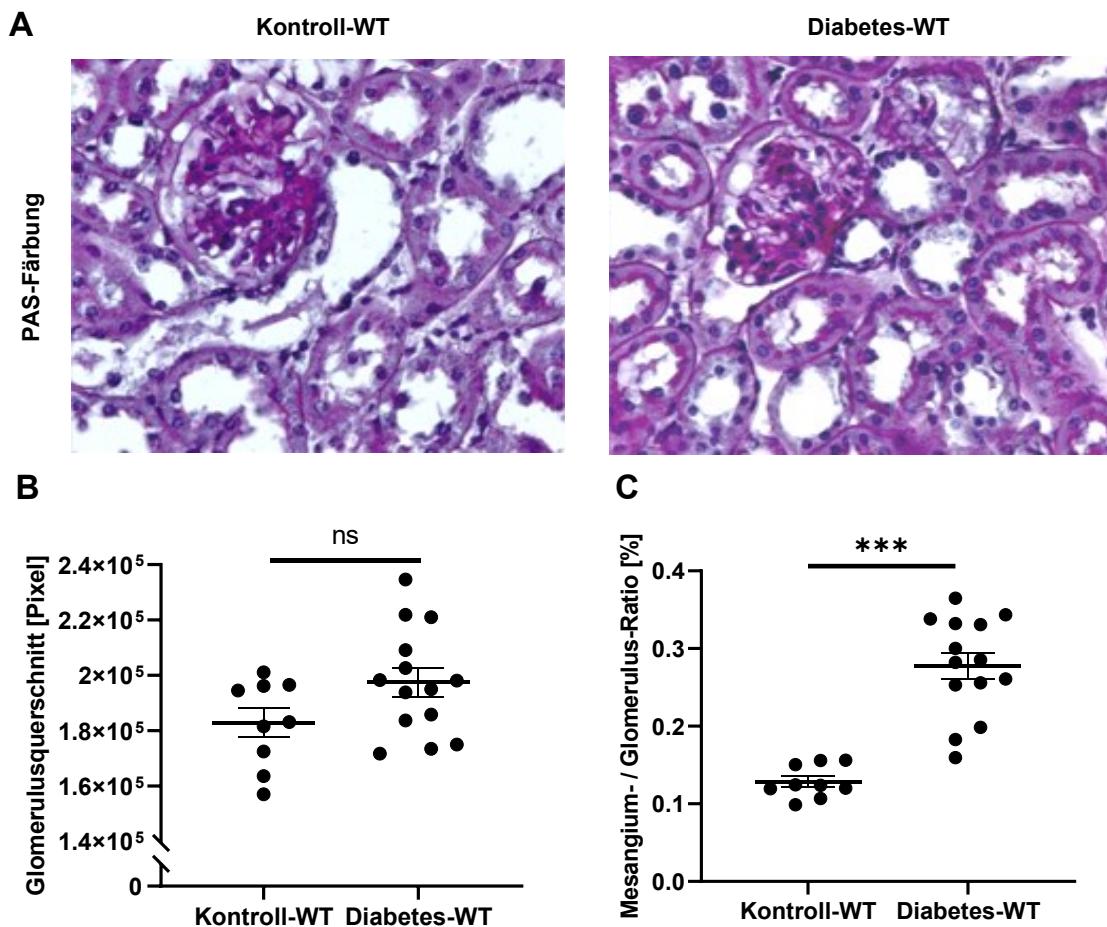


Abbildung 3.7. Histologische Schadensmarker der diabetischen Nephropathie, ausgewertet in PAS-gefärbten Nierenschnitten von Wildtyp-Kontrolltieren (Kontroll-WT) und diabetischen Wildtypieren (Diabetes-WT), A: Representative Darstellung des PAS-gefärbten Nierengewebes in der Versuchsgruppen, Vergrößerung x 400, B: Vergleich der Glomerulusgröße und C: der mesangialen Matrixexpansion (erfasste mesangiale Fläche bezogen auf den Glomerulus-Querschnitt) zwischen Wildtyp-Kontrolltieren und diabetischen Wildtypmäusen mit Mittelwerten \pm SEM. * $p < 0,001$; ns, nicht signifikant**

3.3 Verlauf der diabetischen Nephropathie in Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen

Im zweiten Teil der vorliegenden Promotionsarbeit erfolgt die vergleichende Phänotypanalyse der diabetischen Nephropathie nach Induktion des Diabetes in Wildtypieren (Diabetes-Wildtyp) und Ackr2-defizienten Tieren (Diabetes- Ackr2^{-/-}), um eine mögliche Beeinflussung der renalen Schädigung durch ACKR2 zu charakterisieren. In den grafischen Darstellungen der Ergebnisse sind zum Teil zusätzlich zur Illustration der Normalbefunde in gesunden Kontrollmäusen die entsprechenden Daten unbehandelter Kontrolltiere beider Genotypen (Kontrolle-WT bzw. Kontrolle-Ackr2^{-/-}) dargestellt, ohne dass hier eine erneute statistische Auswertung im Vergleich zu den diabetischen Tieren erfolgt.

3. Ergebnisse

3.3.1 Überlebensrate in Wildtyp- und Ackr2-defiziten Tieren nach Induktion des Diabetes

Nach Diabetesinduktion mit 40 mg/kg KG STZ-Injektionen zeigt sich eine Überlebensrate von 83,8 % der unilaterale nephrektomierten Versuchstiere. Am Versuchsende in Woche 25 lebten noch 31 von 37 Versuchstieren, entsprechen einer Gesamt mortalität von 16,2%. 6 Tiere mussten aufgrund einer Überschreitung der vordefinierten Belastungsgrenze im Rahmen des kontinuierlichen Sculings während des Beobachtungszeitraums vorzeitig euthanasiert werden. Dabei ist die Mortalität zwischen Wildtypieren (4 von 21 Tieren, 19,0%) und Ackr2-defizienten Tieren (2 von 16 Tieren, 12,5%) vergleichbar ($p = 0,5924$) (Abbildung 3.8).

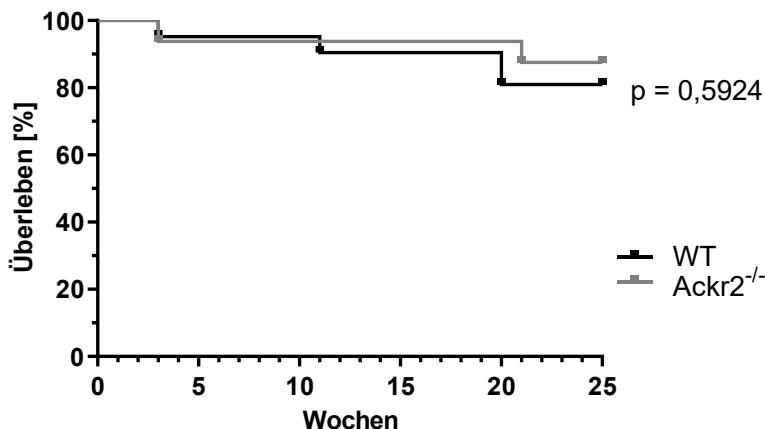


Abbildung 3.8. Überlebenskurve nach Diabetesinduktion bei Wildtypieren (WT) und Ackr2-defiziten Mäusen (Ackr2^{-/-}).

3.3.2 Diabetische Stoffwechsellage in Wildtyp- und Ackr2-defiziten Mäusen

Nach den STZ-Injektionen wurde in den Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen die Entwicklung der Hyperglykämie durch wöchentliche Blutzuckerkontrollen aus dem Vollblut der Schwanzvene untersucht. Wie in Abbildung 3.9 A dargestellt, entwickelt sich in den Tieren mit erfolgreicher Diabetes-Induktion (HbA1_c-Wert in Woche 25 über 5%) in beiden Genotypen eine vergleichbare diabetische Stoffwechsellage mit ähnlichem zeitlichem Verlauf der Blutzuckererhöhung. Nach der Injektion des STZ zum Zeitpunkt 0 stiegen die Blutzuckerwerte in den ersten drei Wochen vergleichbar steil an, um dann auf einem ähnlichen Niveau von durchschnittlich 450 mg/dl konstant zu bleiben.

Am Versuchsende in Woche 25 wurden die Plasmaspiegel für Glukose und der HbA1_c-Wert als Maß für die diabetische Stoffwechsellage in den Versuchsgruppen beider Genotypen bestimmt (Abbildung 3.9 B und C). In Abbildung 3.9 B ist die Plasmakonzentration der Glukose und in C der HbA1_c-Wert als Langzeitparameter für die

3. Ergebnisse

diabetische Stoffwechsellage gegenübergestellt. Es zeigt sich am Versuchsende etwas erniedrigte Plasmakonzentrationen der Glukose in den *Ackr2^{-/-}*-Tieren, wohingegen sich die HbA_{1c}-Werte gleich hoch darstellen lassen. Eine experimentell nicht erfolgreiche Diabetes-Induktion wurde bei einem HbA_{1c}-Wert unter 5,0% angenommen und die betreffenden Tiere nicht in die vergleichende Phänotypanalyse eingeschlossen (vgl. auch Abschnitt 2.3.2). Unbehandelte Kontrolltiere beider Genotypen scheinen dagegen grafisch niedrige Plasmaglukose- und HbA_{1c}-Werte aufzuweisen, die in diesem Abschnitt ohne statistische Auswertung nur zur Übersicht dargestellt sind. (Abbildung 3.9 B und C). Für den Erfolg des Diabetes-Modells verweise ich auf die Daten des bereits beschriebenen Abschnitt 3.2.1. Zusammenfassend ist somit bei vergleichbarem Verlauf der erhöhten Blutzuckerwerte im Versuchszeitraum und gleich erhöhten HbA_{1c}-Werten am Versuchsende trotz leicht erniedrigten Plasmaglukose-Spiegeln in der diabetischen *Ackr2^{-/-}*-Gruppe in Woche 25 von einer weitestgehend vergleichbaren hyperglykämischen Stoffwechsellage in den ausgewerteten diabetischen Tieren der Wildtypgruppe (Diabetes-WT) und der *Ackr2*-defizienten Gruppe (Diabetes-*Ackr2^{-/-}*) auszugehen.

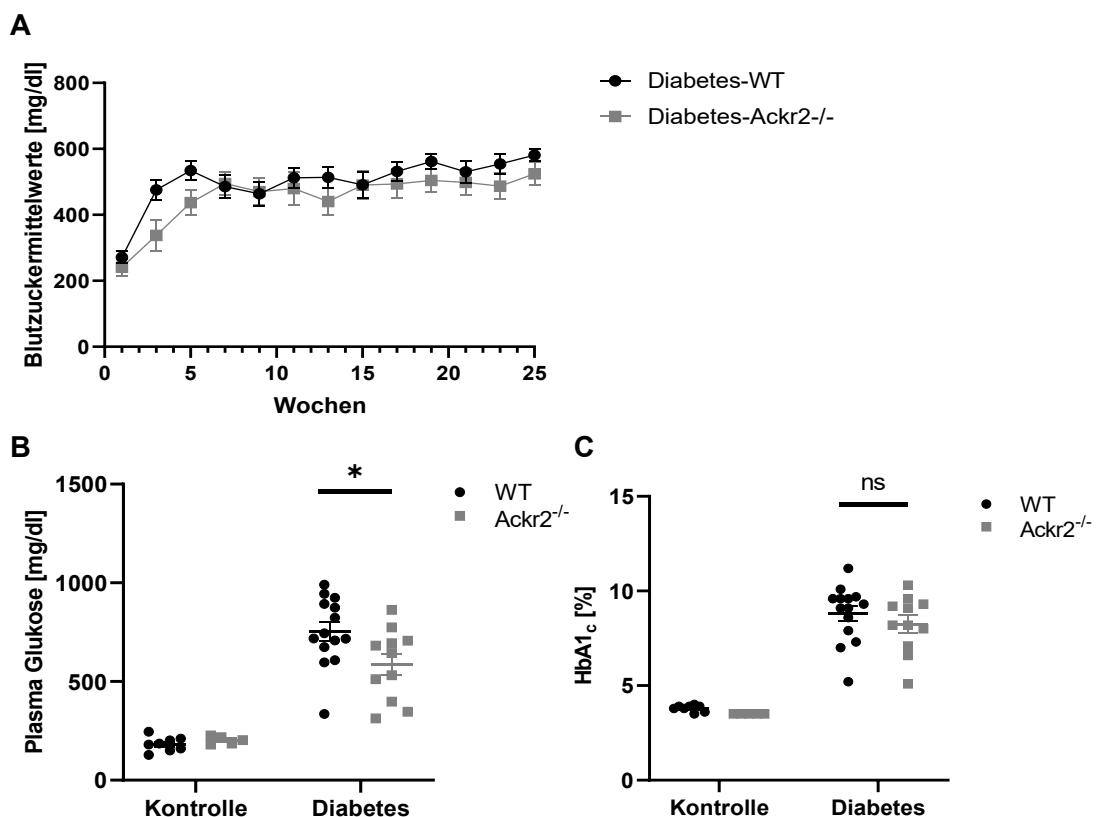


Abbildung 3.9. Entwicklung der diabetischen Stoffwechsellage in Wildtyp (WT)- und *Ackr2^{-/-}*-Mäusen, A: Zeitlicher Verlauf der Plasma-Blutglukosewerte bei den diabetischen Versuchstieren, B: Glukosewerte im Plasma der WT- und *Ackr2^{-/-}*-Mäuse in Woche 25, C: HbA_{1c} Werte der WT- und *Ackr2^{-/-}*-Mäuse in Woche 25. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM * p < 0,05; ns, nicht signifikant

3. Ergebnisse

Hinsichtlich des Lipidstoffwechsels zeigen sich in diabetischen Wildtyp- und *Ackr2^{-/-}*-Mäusen am Versuchsende in Woche 25 vergleichbare Cholesterin- und Triglyceridwerte (Abbildung 3.10). Auch hier kann also von einer vergleichbaren Stoffwechsellage zwischen den diabetischen Versuchstiergruppen ausgegangen werden. Es ist daher unwahrscheinlich, dass mögliche Unterschiede in der Ausprägung der diabetischen Nierenschädigung zwischen den beiden untersuchten Genotypen auf unterschiedliche Exposition gegenüber dem diabetischen Milieu hervorgerufen wurden.

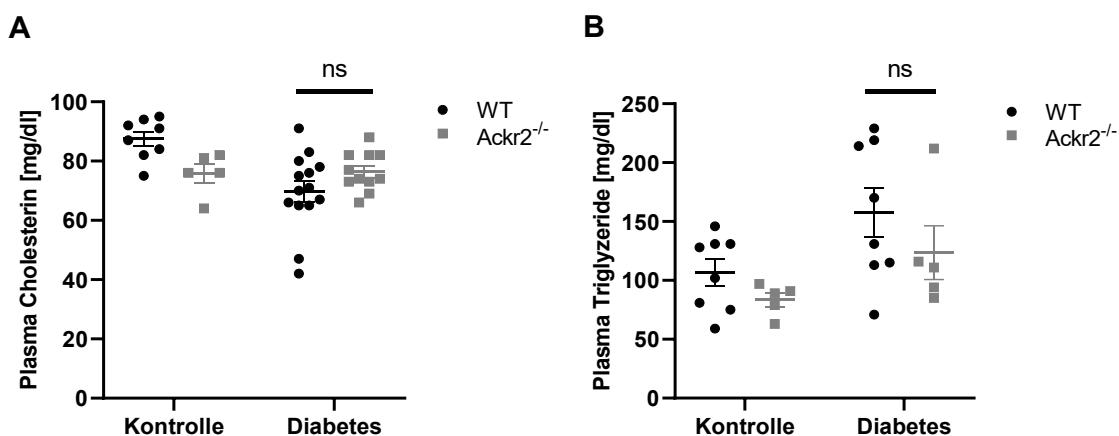


Abbildung 3.10. Lipidstoffwechsel der diabetischen Wildtyp (WT)- und *Ackr2^{-/-}*-Tiere in Woche 25 (Versuchsende) mit Mittelwerten \pm SEM, A: Plasmakonzentration der Cholesterinwerte, B: Plasmakonzentration der Triglyceride. ns, nicht signifikant

3.3.3 Körper- und Nierengewicht in diabetischen Wildtyp- und *Ackr2^{-/-}*-Mäusen

Abbildung 3.11 A verdeutlicht den Gewichtsverlauf der Wildtyp- und *Ackr2^{-/-}*-Tiere nach erfolgreicher Induktion des Diabetes. Bei wöchentlicher Gewichtskontrolle zeigt sich eine ähnliche Progression des Körpergewichtes bei geringfügigen unterschiedlichen Ausgangsgewichten beider Versuchsgruppen (Abbildung 3.11 B). Der Unterschied der Durchschnittsgewichte beträgt 2,48 g. Weiter werden die Gewichte in Woche 25, am Versuchsende, der beiden diabetischen Versuchstiergruppen gegenübergestellt (Abbildung 3.11 C). Hier zeigt sich ebenfalls ein geringfügiger Unterschied von 2,03 g zwischen den beiden diabetischen Genotypen. Zudem wurden hier auch noch einmal die Körpergewichte der beiden Kontrolltiergruppen von Wildtyp- und *Ackr2^{-/-}*-Tiere in Woche 25 zur Verbildlichung der Normwerte ergänzend dargestellt.

Zusammenfassend kann trotz des geringfügigen Gewichtsunterschieds von einem ähnlichen Gewichtsverlauf gesprochen werden, da die Gewichtsprogression eine ähnliche Zunahme zeigt und die beiden Gewichtsdifferenzen am Anfang und Ende ähnlich sind.

3. Ergebnisse

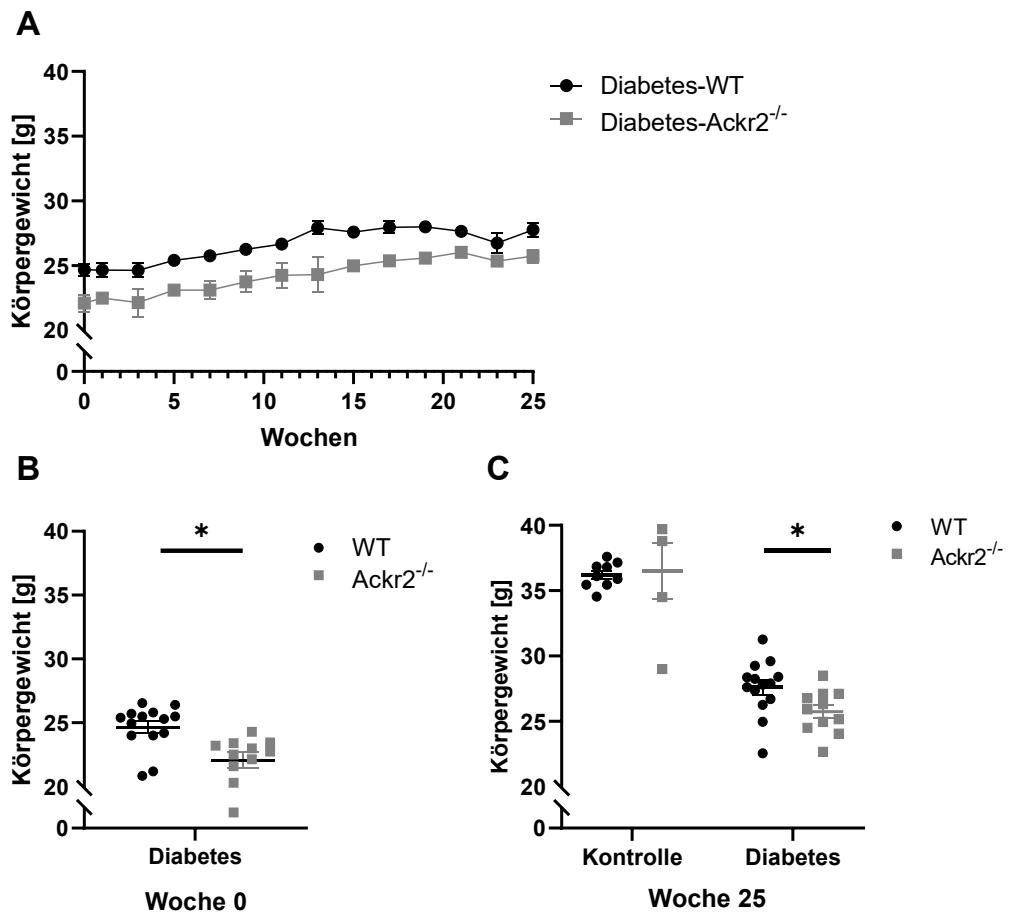


Abbildung 3.11. Körpergewicht der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2^{-/-}-Tiere. A: Verlaufsübersicht über die Wochen 0-25, B: Ausgangsgewichte der diabetischen Versuchstiere (WT und Ackr2^{-/-}) in der Woche 0 (am Tag 0), C: Darstellung der Endkörpergewichte in Woche 25 von unbehandelten Kontrolltieren sowie diabetischen WT- und Ackr2^{-/-}-Tieren mit Mittelwerten \pm SEM. * $p < 0.05$

In Woche 25 wurde auch das Nierengewicht der Tiere bestimmt. In diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen ist sowohl das absolute Einzelnierengewicht der nach unilateraler Nephrektomie verbliebenen Niere (Abbildung 3.12 A) als auch das relative Nierengewicht bezogen auf die Körpergröße (Abbildung 3.12 B) vergleichbar. Es ergibt sich somit kein Anhalt für eine unterschiedlich ausgeprägte Hypertrophie (z.B. durch vermehrte Hyperfiltration) oder eine deutlichere Atrophie (z.B. durch fibrotische Umbauprozesse) der diabetischen Nieren im Vergleich der beiden Genotypen. In Abbildung 3.12 A und B sind zusätzlich die Einzelnierengewichte der unbehandelten Kontrollgruppe beider Genotypen dargestellt, das die Nierenhypertrophie nach unilateraler Nephrektomie in den diabetischen Versuchstieren veranschaulicht. In Abbildung 3.12 C werden noch einmal die Nierengewichte der diabetischen Versuchstiere im Bezug zur Gesamtnierenmasse beider gesunden Nieren relativiert zum Körpergewicht von unbehandelten Kontrolltieren dargestellt.

3. Ergebnisse

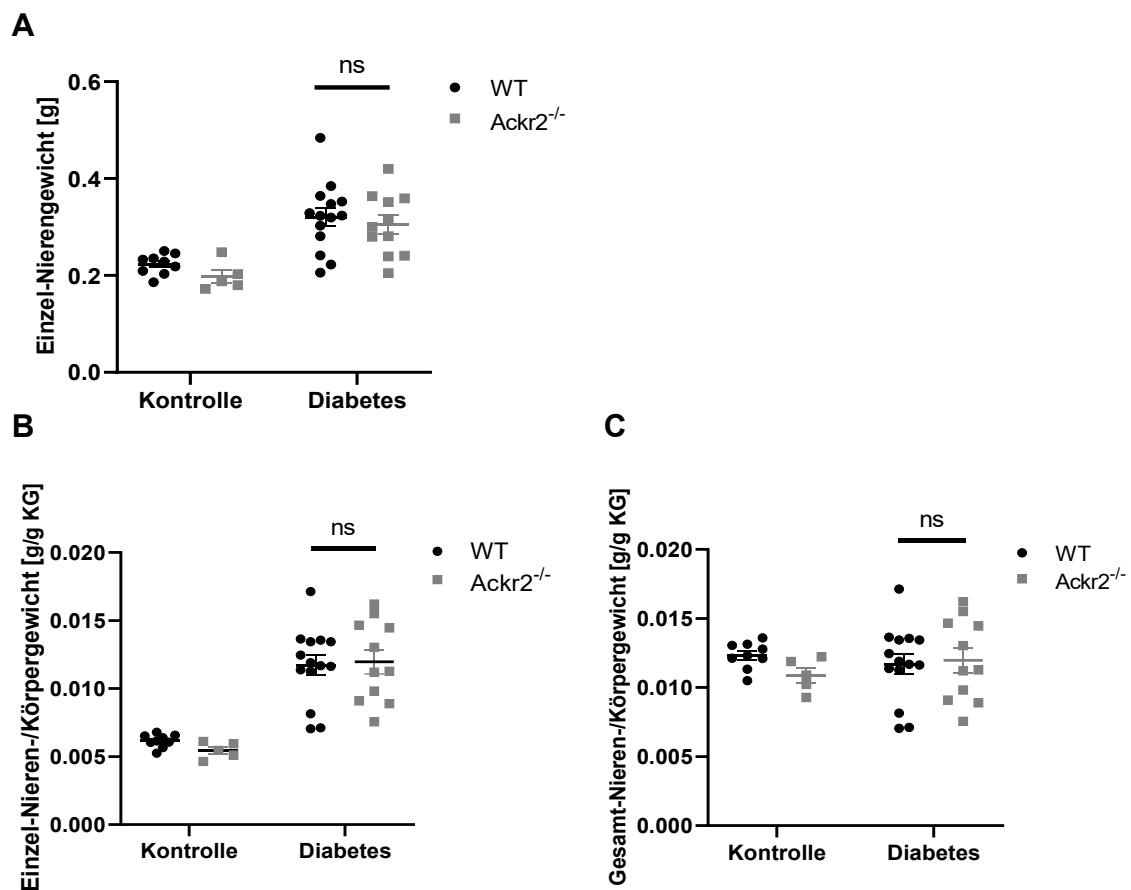


Abbildung 3.12. Nierengewichte unbehandelter Kontrolltiere sowie diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Tiere in Woche 25 mit Mittelwerten \pm SEM, A: Gewicht der Einzelnieren, B: Einzelnierengewicht bezogen auf das Körpergewicht der Mäuse, C: Gesamtnierengewicht (Kontrolltiere: 2 Nieren, Diabetestiere 1 Niere) bezogen auf das Körpergewicht. ns, nicht signifikant

3.3.4 Nierenfunktionsparameter und GFR-Messung in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen

Zum Versuchsende in Woche 25 wurden aus den diabetischen Mäusen Blutplasma gewonnen, um die Nierenretentionswerte, Gesamteiweiß und Albumin zu bestimmen. Mögliche Unterschiede zwischen den diabetischen Wildtypieren und den diabetischen Ackr2-defizienten Tieren werden verglichen. Die Darstellung der unbehandelten Kontrolltiergruppe beider Genotypen dient zur Illustration der Normalwerte in altersgleichen Tieren ohne Diabetes. Wie in Abbildung 3.13 A und B dargestellt ergab sich kein signifikanter Unterschied der erhöhten Plasmakreatinin- und Plasmaharnstoffwerte zwischen den diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen. Auch Plasmawerte für Gesamtprotein und Albumin waren in den diabetischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen vergleichbar (Abbildung 3.13 C und D). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ackr2-Defizienz in den diabetischen Mäusen zu keiner Verschlechterung der Nierenfunktion oder vermehrten Eiweißverlust führt.

3. Ergebnisse

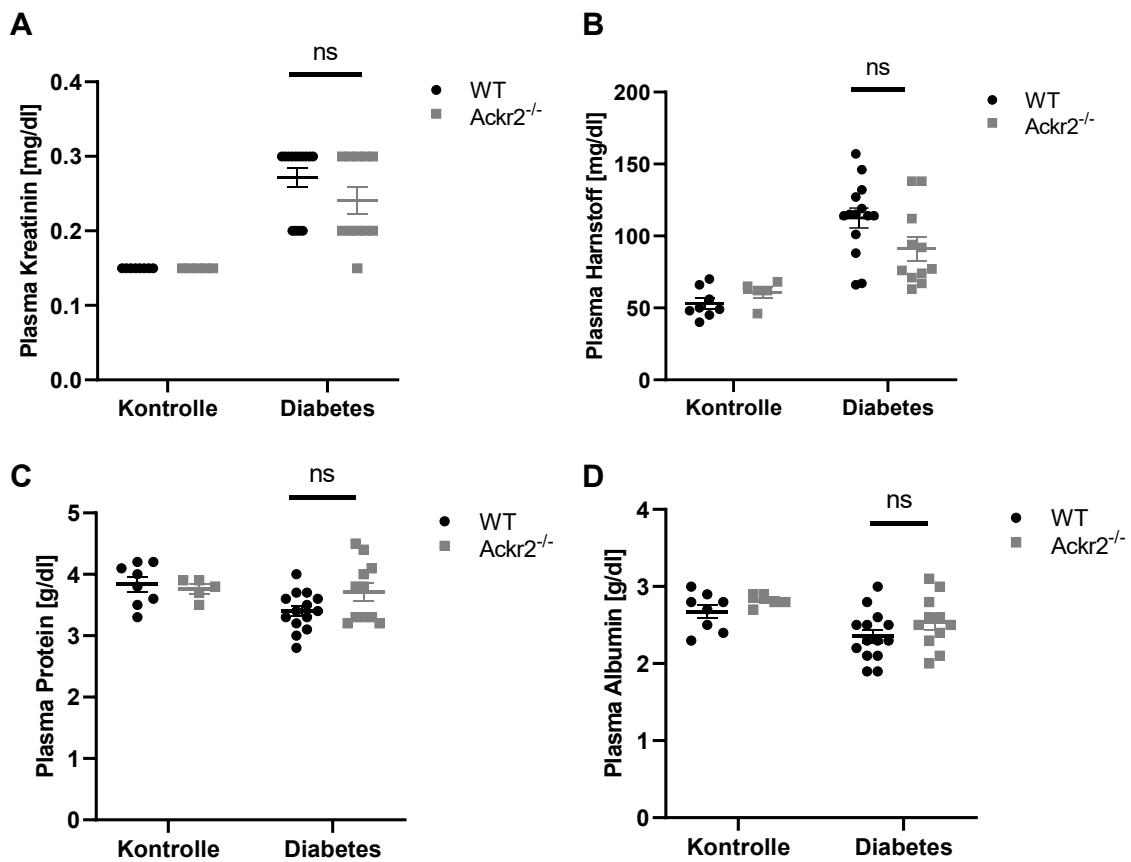


Abbildung 3.13. Plasmaparameter unbehandelter Kontrolltiere sowie diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Tiere in Woche 25 mit Mittelwerten \pm SEM, A: Plasmaspiegel von Kreatinin, B: Plasmaspiegel von Harnstoff, C: Proteingehalt im Plasma, D: Albumingehalt im Plasma. ns, nicht signifikant

Zur genaueren Bestimmung der Nierenfunktion erfolgte zusätzlich die Messung der GFR bei Versuchstieren in Woche 23. Bei dieser sensitiven Methode der Nierenfunktionsbestimmung zeigt sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen (Abbildung 3.14).

Zusammenfassend ergeben sich somit aus der Bestimmung dieser funktionellen Parameter bei vergleichbar erhöhten Nierenretentionsparametern, vergleichbaren Plasmaproteinwerten und gleichem GFR-Verlust keine Hinweise auf einen unterschiedlichen Verlauf der diabetischen Nierenschädigung in Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen.

3. Ergebnisse

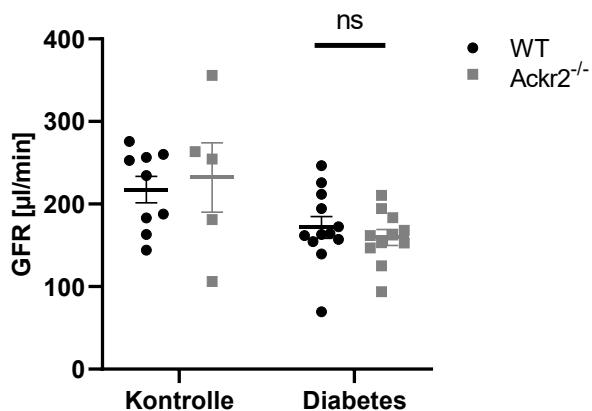


Abbildung 3.14. GFR-Messung in unbehandelten Kontrolltieren sowie diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2^{-/-}) Tieren in Woche 23 mit Mittelwerten \pm SEM. ns, nicht signifikant

3.3.5 Albuminurie in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen

Mittels eines Albumin-ELISAs wurden die Albuminwerte im Urin der Versuchstiere bestimmt und nach Bezug auf die Urinkreatininwerte als Albumin/Kreatinin-Quotient angegeben. Bei den diabetischen Versuchstieren erfolgte eine Albuminuriebestimmung in Woche 0, Woche 12 und Woche 23. In Abbildung 3.15 sind die Werte der Albuminurie der diabetischen Versuchstiere beider Genotypen im Verlauf dargestellt. Es ist eine ähnliche Zunahme der Albuminurie in beiden Versuchstiergruppen zu sehen, mit statistisch nicht unterschiedlichen Werten zwischen den diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Tieren bis Woche 23. Ähnlich wie die Plasmawerte und GFR, zeigen somit diabetische Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäuse auch eine vergleichbare Albuminurie als Marker für die bestehende diabetische Schädigung der Glomeruli.

3. Ergebnisse

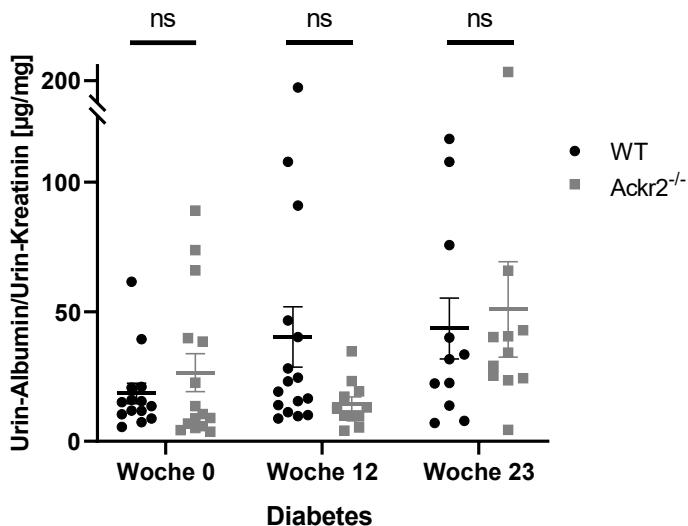


Abbildung 3.15. Albuminurie der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2^{-/-}) Tiere in Woche 0, 12 und 23. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. ns, nicht signifikant

3.3.6 Histopathologische Veränderungen der Nieren in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen

Eine Vergrößerung der Glomeruli und eine mesangiale Matrixexpansion stellen charakteristische histopathologische Veränderungen der diabetischen Nephropathie dar. In den histologischen PAS-Färbungen wurden daher die glomeruläre Querschnittsflächen und die Größe der mesangialen Matrix in diabetischen Nieren der Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Tiere morphometrisch erfasst und verglichen (Abbildung 3.16 A). In Abbildung 3.16 B wird der glomeruläre Querschnitt der diabetischen Tiere beider Genotypen gegenübergestellt. Hier ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den diabetischen Versuchstiergruppen. Abbildung 3.16 C illustriert die mesangiale Matrixexpansion der diabetischen Tiere, erfasst als Größe der glomerulären Mesangiumfläche im Verhältnis zum glomerulären Querschnitt. Die im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren beider Genotypen deutliche mesangiale Matrixexpansion zeigt ebenfalls keinen Unterschied zwischen den diabetischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen. 25 Wochen nach Induktion des Diabetes weisen somit Ackr2-defiziente Tiere einen den Wildtypieren vergleichbaren histopathologischen Nierenschaden auf. Dies korreliert mit den ähnlichen funktionellen Parametern der diabetischen Nierenschädigung beider Genotypen.

3. Ergebnisse

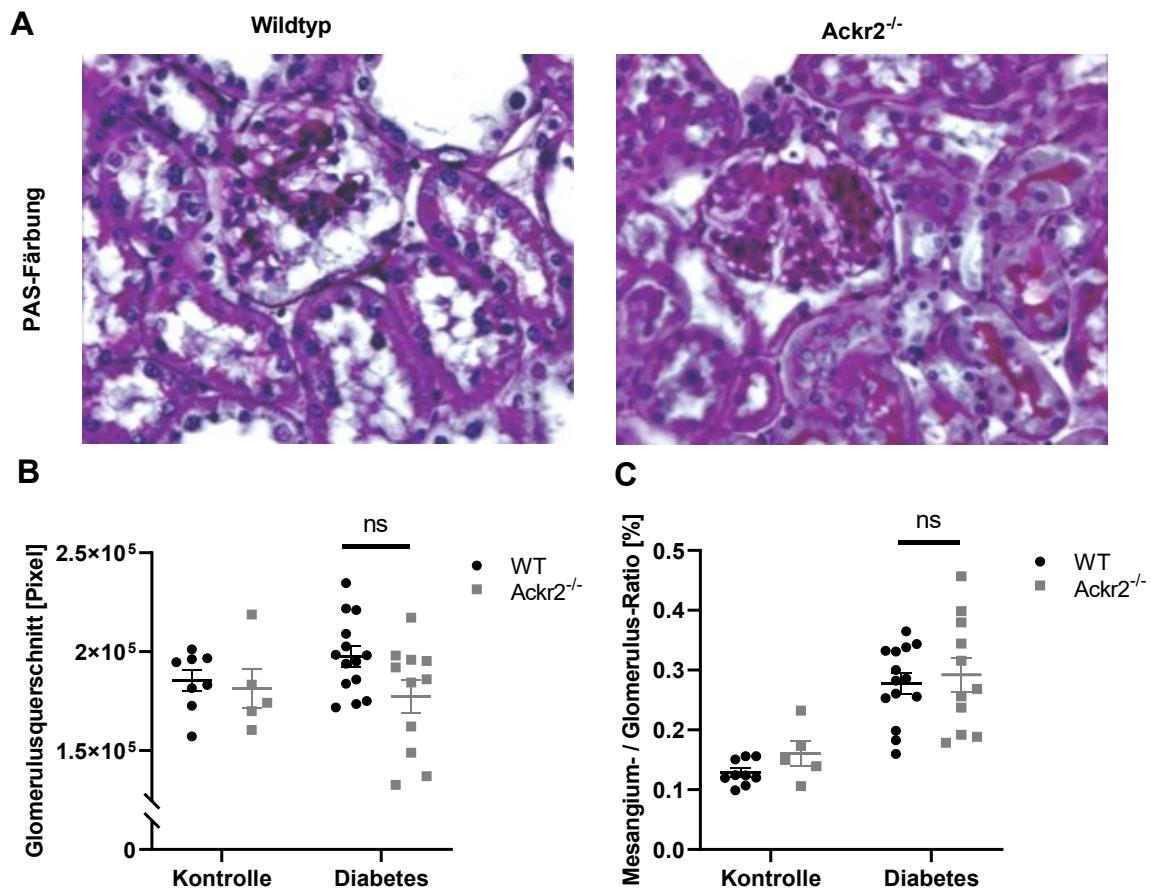


Abbildung 3.16. Histologische Veränderung der Nierenglomeruli in unbehandelten Kontrolltieren sowie diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2^{-/-}) Tieren in Woche 25, A: Representative Darstellung des PAS-gefärbten Nierengewebes beider diabetischer Versuchsgruppen, Vergrößerung $\times 400$, B: Glomerulusquerschnitt, C: Mesangium-Glomerulus-Verhältnis mit Mittelwerten \pm SEM. ns, nicht signifikant

3.3.7 mRNA-Expression renaler Schadensmarker

Das Nierengewebe wurde nach Versuchsende mittels quantitativer PCR auf exprimierte mRNA verschiedener Proteine untersucht, deren Expression eine Schädigung des Nierengewebes anzeigen. Im Vergleich zwischen diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des glomerulären Markers Nephrin oder der tubulären Schadensmarker KIM-1 und TIMP2 (Abbildung 3.17). Diese Daten weisen somit ebenfalls auf einen vergleichbaren renalen Parenchymenschaden beider Genotypen hin. Die erhaltene und vergleichbare Expression des Podozyten-spezifischen Nephriins zeigt zudem, dass Ackr2-Defizienz nicht zu einem verstärkten Podozytenschaden, z.B. über vermehrte CCL2-vermittelte Stimulierung von podozytär exprimiert CCR2 führt.

3. Ergebnisse

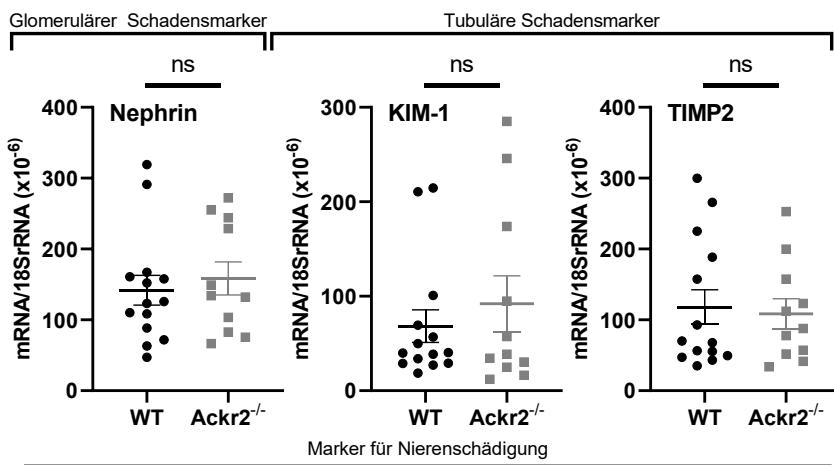


Abbildung 3.17. mRNA-Expression glomerulärer (Nephrin) und tubulärer (KIM-1, TIMP2) Schadensmarker in Nieren diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2^{-/-}-Mäuse in Woche 25 nach Diabetesinduktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. ns, nicht signifikant

3.3.8 Quantifizierung der renalen Leukozyteninfiltration mittels Durchflusszytometrie in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen

Zum Versuchsende in Woche 25 wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS) das Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration untersucht. Es zeigt sich, dass in Ackr2^{-/-}-Versuchstieren statistisch signifikant mehr CD45⁺ Leukozyten in den diabetischen Nieren akkumulieren als in den diabetischen Wildtyp-Tieren (Abbildung 3.18 A). Auch erkennbar ist eine in den Ackr2^{-/-}-Versuchstieren tendenziell vermehrte renale Infiltration von CD3⁺ T-Lymphozyten (Abbildung 3.18 B). Hier zeigt vor allem die Untergruppe CD4⁺ (Abbildung 3.18 C) eine signifikante Vermehrung, wohingegen die CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 3.18 D) wieder nur eine Tendenz anzeigen.

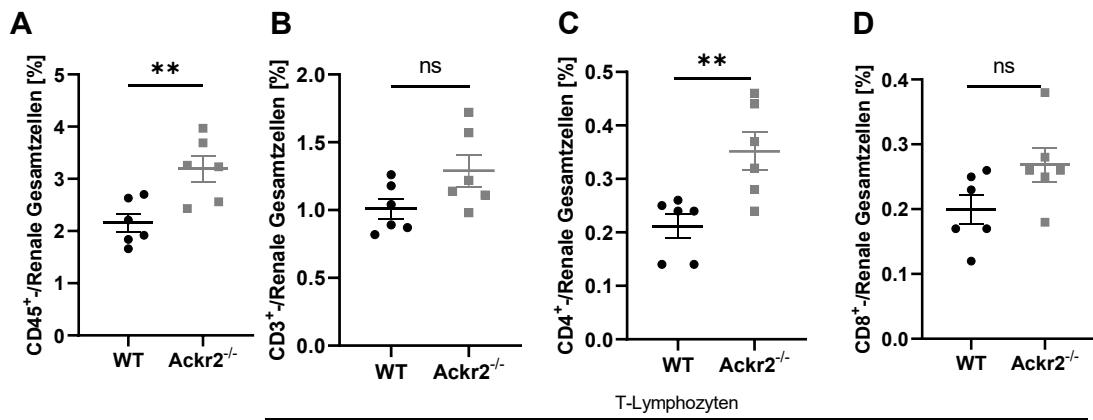


Abbildung 3.18. Durchflusszytometrische Analyse der renalen Leukozyteninfiltration in diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2^{-/-}-Mäusen in Woche 25. Dargestellt sind die Anzahl A: renaler CD45⁺-Leukozyten, B: CD3⁺-T-Zellen, C: CD4⁺- und D: CD8⁺-T-Zellen mit Mittelwerten \pm SEM. ** p < 0,01; ns, nicht signifikant

3. Ergebnisse

Zudem wurde die renale Akkumulation verschiedener mononuklearer Phagozytenpopulationen untersucht (Abbildung 3.19). Hier zeigt sich, dass im Nierengewebe sowohl CD11c⁺ dendritische Zellen als auch F4/80⁺ Phagozyten statistisch signifikant erhöht in den diabetischen Ackr2^{-/-}-Versuchstieren vorlagen. Bei weiterer Differenzierung von Subtypen ergibt sich vor allem eine vermehrte renale Akkumulation von CD11c⁺ F4/80⁺ - und CD11c⁺ F4/80⁻ dendritischen Zellen, nicht jedoch F4/80⁺ CD11c⁻ Makrophagen.

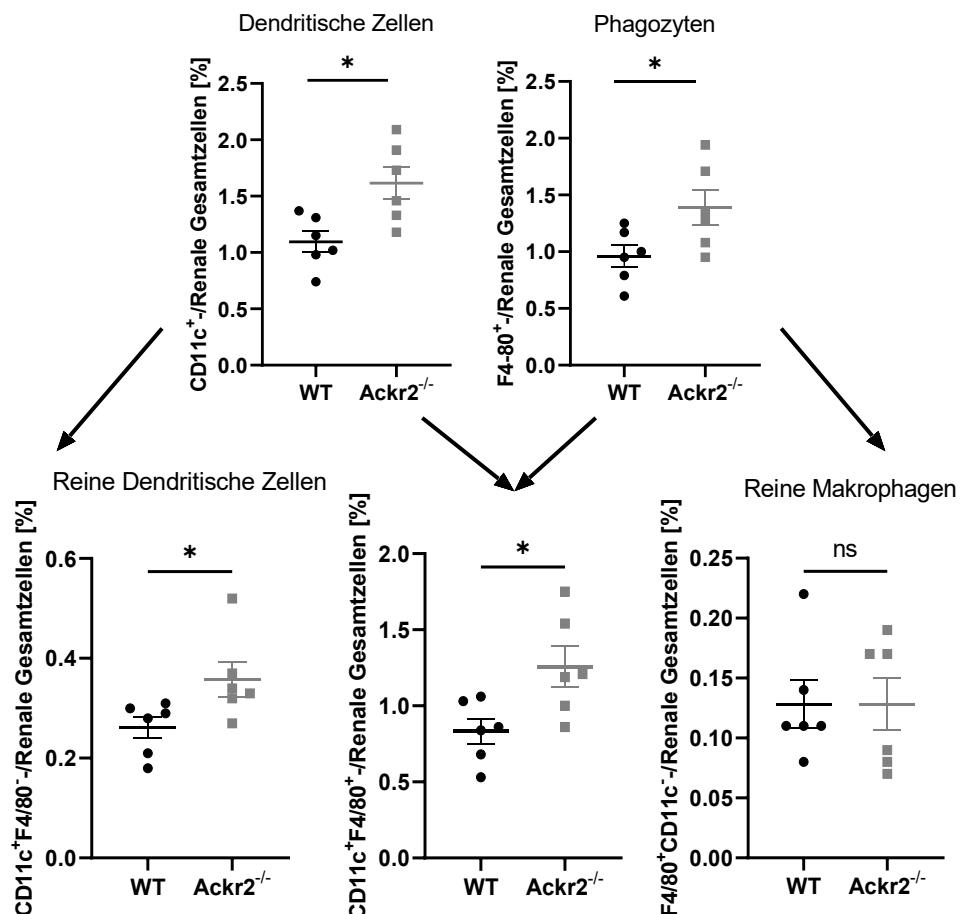


Abbildung 3.19. Durchflusszytometrische Analyse der renalen Akkumulation mononuklearer Phagozyten. Dargestellt ist die Infiltration CD11c⁺ dendritische Zellen, F4/80⁺ Phagozyten und ihrer Subpopulationen in Nieren diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 mit Mittelwerten \pm SEM. * $p < 0,05$, ns, nicht signifikant

Die durchflusszytometrische Analyse erlaubt auch die Quantifizierung renaler Leukozyten, die den Chemokinrezeptor CCR2 exprimieren. Eine bei Ackr2-Defizienz vermehrte renale Verfügbarkeit des CCR2- ligierenden CCL2 könnte zu einer vermehrten Infiltration CCR2⁺ Leukozyten beitragen. Wie in Abbildung 3.20 gezeigt wird, weisen die Nieren der diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp tatsächlich eine vermehrte Akkumulation CD11b⁺ CCR2⁺ Phagozyten auf. Auch die Zahl inflammatorischer CD11b⁺

3. Ergebnisse

$\text{Ly6C}^{\text{high}} \text{CCR2}^+$ Makrophagen war in den Ackr2-defizienten Nieren tendenziell, allerdings nicht signifikant, erhöht (Abbildung 3.20)

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass Ackr2-Defizienz zu einer vermehrten Akkumulation renaler Leukozyten in den diabetischen Nieren führt, allerdings ohne eine verstärkte renale Parenchymenschädigung. Die vermehrte Zahl renaler CCR2^+ Leukozyten könnte Folge einer verstärkten CCL2-CCR2-vermittelte Leukozyteninfiltration sein, die dabei durch einen geringeren Ackr2-vermittelten Chemokin-Abbau, unter anderem von CCL2, begründet wäre.

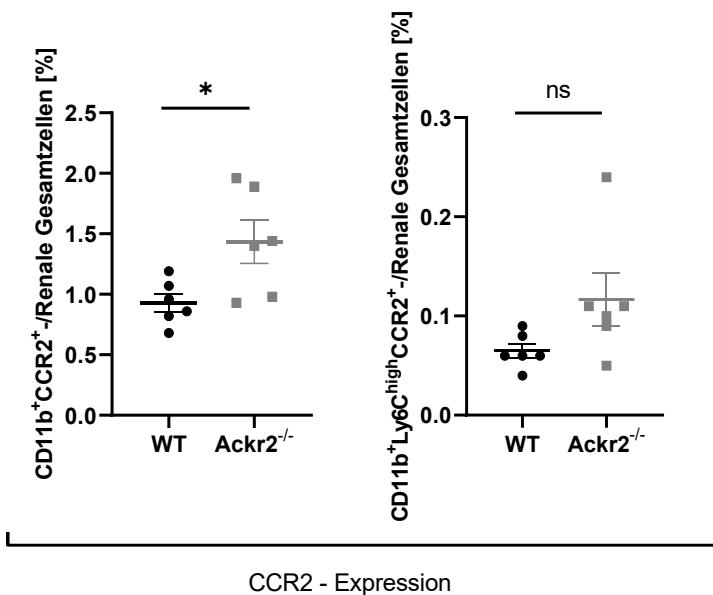


Abbildung 3.20. Durchflusszytometrische Analyse der renalen Akkumulation von CCR2^+ Phagozytenpopulationen in diabetische Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2^{-/-}) Nieren mit Mittelwerten ± SEM. * $p < 0,05$; ns, nicht signifikant

3.3.9 Immunhistologische Charakterisierung der renalen Leukozyteninfiltration in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen

Zur Bestätigung der durchflusszytometrischen Daten und ihrer genaueren Lokalisation erfolgte eine ergänzende immunhistologische Untersuchung der renalen Leukozyteninfiltrate in den diabetischen Nieren (Abbildung 3.21). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie zeigt sich eine vermehrte Einwanderung renaler CD3⁺ T-Zellen in das Tubulointerstitium der diabetischen Ackr2^{-/-}-Versuchstiere im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Abbildung 3.21 A). Die Zahl glomerulärer T-Zellen beider Genotypen ist dagegen vergleichbar. Zudem ergibt sich eine statistisch signifikant vermehrte Akkumulation von tubulointerstitiellen F4/80⁺ Phagozyten in den Ackr2^{-/-}-Versuchstieren mit Diabetes (Abbildung 3.21 B). Bei der ER-HR3⁺ Makrophagen-

3. Ergebnisse

Subpopulation zeigt sich im Interstitium kein Unterschied, jedoch besteht eine statistisch signifikant vermehrte Akkumulation ER-HR3+ Makrophagen in den Glomeruli (Abbildung 3.21 C). Insgesamt bestätigen damit die immunhistologischen Untersuchungen eine verstärkte renale Akkumulation von T-Lymphozyten und Phagozytenpopulationen in diabetischen Ackr2-defizienten Mäusen, mit vor allem vermehrter tubulointerstitieller Infiltration, aber auch gesteigerter Akkumulation glomerulärer Makrophagen.

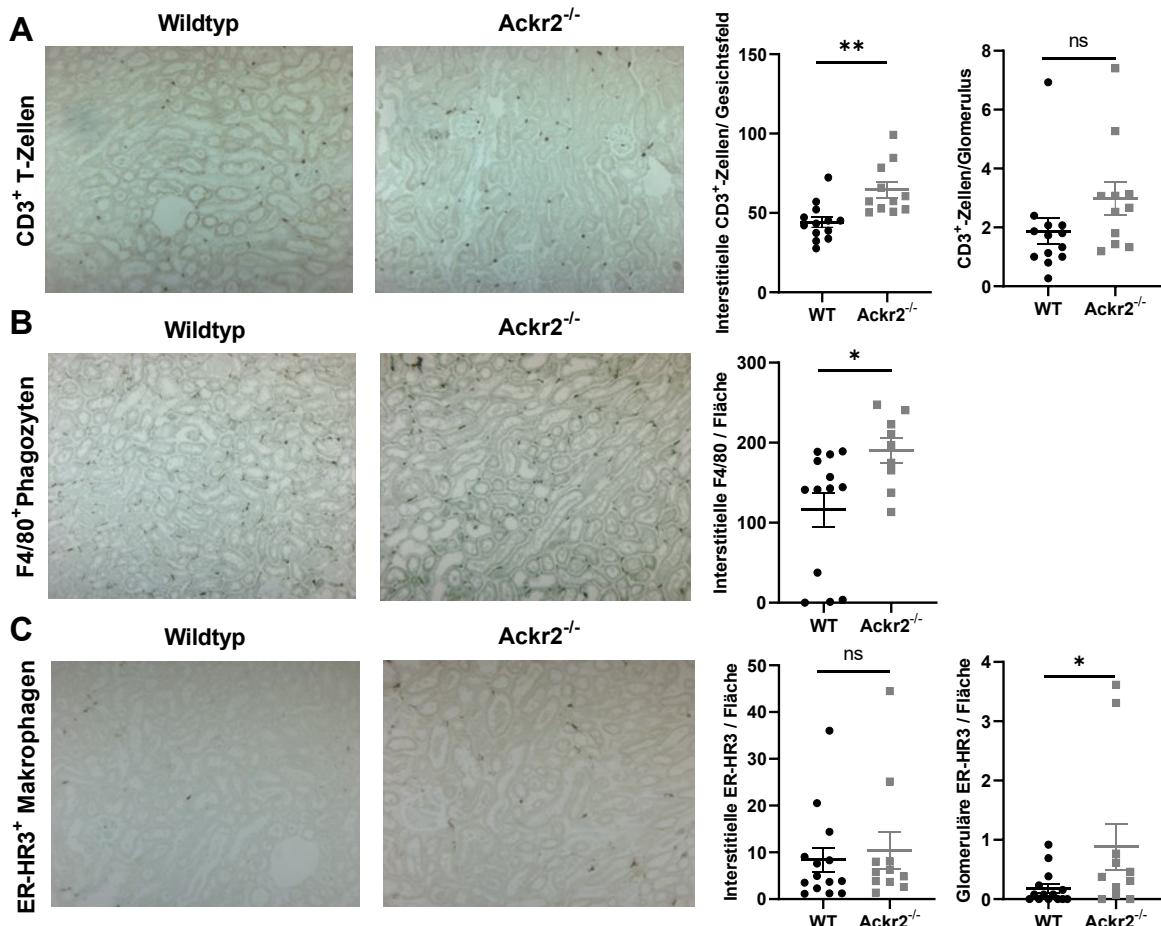


Abbildung 3.21. Immunhistologische Auswertung tubulointerstitieller und glomerulärer Zellinfiltration in Nieren der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2^{-/-}) Tiere. Dargestellt sind repräsentative immunhistologischen Färbungen von A: CD3⁺Zellen, B: F4/80⁺ Phagozyten und C: ER-HR3⁺ Makrophagen sowie die entsprechende Quantifizierung mit Mittelwerten \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns, nicht signifikant

3.3.10 Ausmaß der renalen Entzündung in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen

Um zu untersuchen, ob die vermehrte renale Leukozytenakkumulation in diabetischen Nieren der Ackr2-defizienten Mäuse mit einer verstärkten renalen Entzündung einhergeht,

3. Ergebnisse

wurde die mRNA-Expression verschiedener inflammatorischer Marker in diabetischen Nieren der Wildtyp- und $Ackr2^{-/-}$ -Mäuse analysiert (Abbildung 3.22). Erwartungsgemäß liegt in den $Ackr2^{-/-}$ -Nieren im Gegensatz zum Wildtyp keine relevante $Ackr2$ -Expression vor, das den Genotyp der Versuchstiere nochmals bestätigt (Abbildung 3.22 A).

Des Weiteren ergeben sich zwischen beiden Genotypen keine Unterschiede im renalen Expressionsniveau für das proinflammatorische Zytokin $TNF\alpha$ und seine Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 (Abbildung 3.22 B). Auch die mRNA-Expression des klassischen proinflammatorischen Chemokinrezeptors CCR2, seines Liganden CCL2 und weiterer proinflammatorischer Chemokine, die im Verlauf der diabetischen Nierenschädigung verstärkt exprimiert werden, ist in diabetischen Wildtyp- und $Ackr2^{-/-}$ -Nieren vergleichbar (Abbildung 3.22 C).

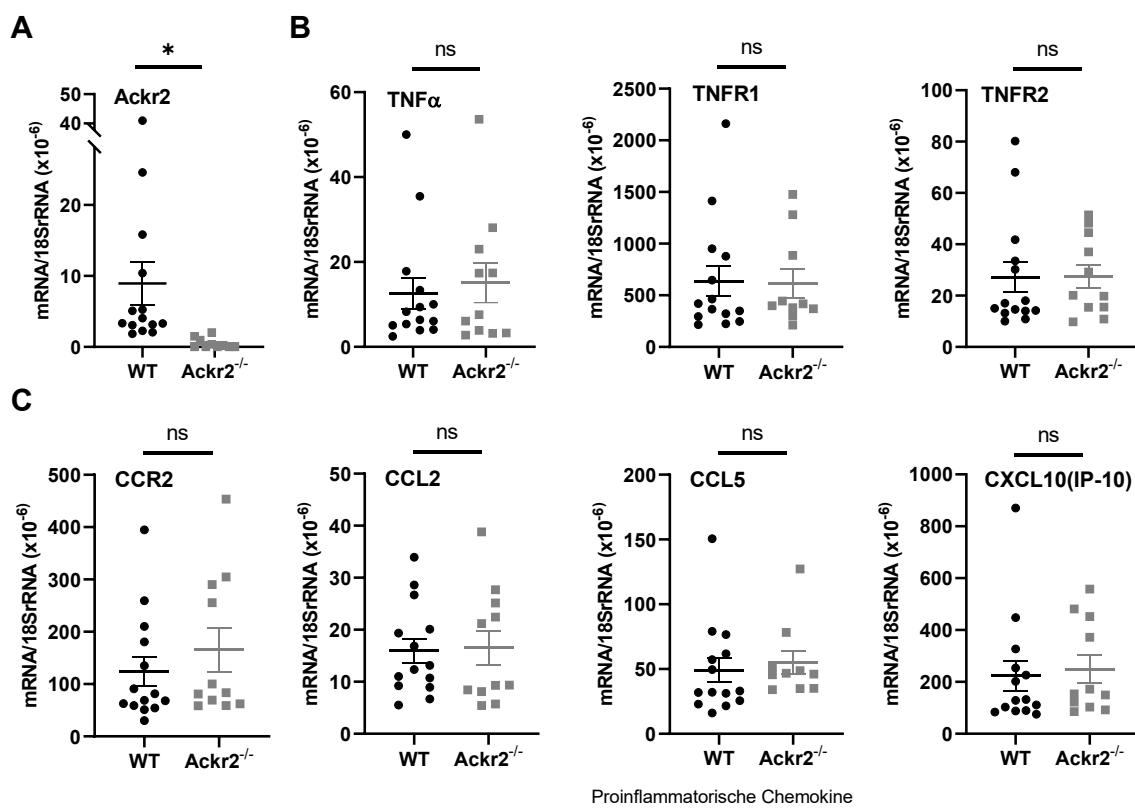


Abbildung 3.22. Renale mRNA Expression proinflammatorischer Marker in diabetischen Wildtyp (WT)- und $Ackr2$ -defizienten ($Ackr2^{-/-}$) Mäusen in Woche 25 nach Induktion des Diabetes. A Expression von $Ackr2$ zur Genotypkontrolle, B Expression von $TNF\alpha$ und seiner Rezeptoren, C: Expression von CCR2 und proinflammatorischen Chemokine. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$; ns, nicht signifikant

Auch wurde die renale mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren untersucht, die Marker für die Aktivierung klassischer proinflammatorischer M1 Makrophagen (Abbildung 3.23 A) und regenerativer und profibrotischer M2 Makrophagen (Abbildung 3.23 B) darstellen. Im Vergleich zwischen diabetischen Wildtyp- und $Ackr2^{-/-}$ -Nieren zeigt sich auch

3. Ergebnisse

bei diesen Markern keine unterschiedliche renale Expression. Zusammenfassend weisen die Expressionsdaten renaler Entzündungsmediatoren auf eine vergleichbare Entzündungsaktivität in diabetischen Wildtyp- und $Ackr2^{-/-}$ -Mäusen hin, trotz verstärkter renaler Leukozyteninfiltration bei Fehlen von Ackr2.

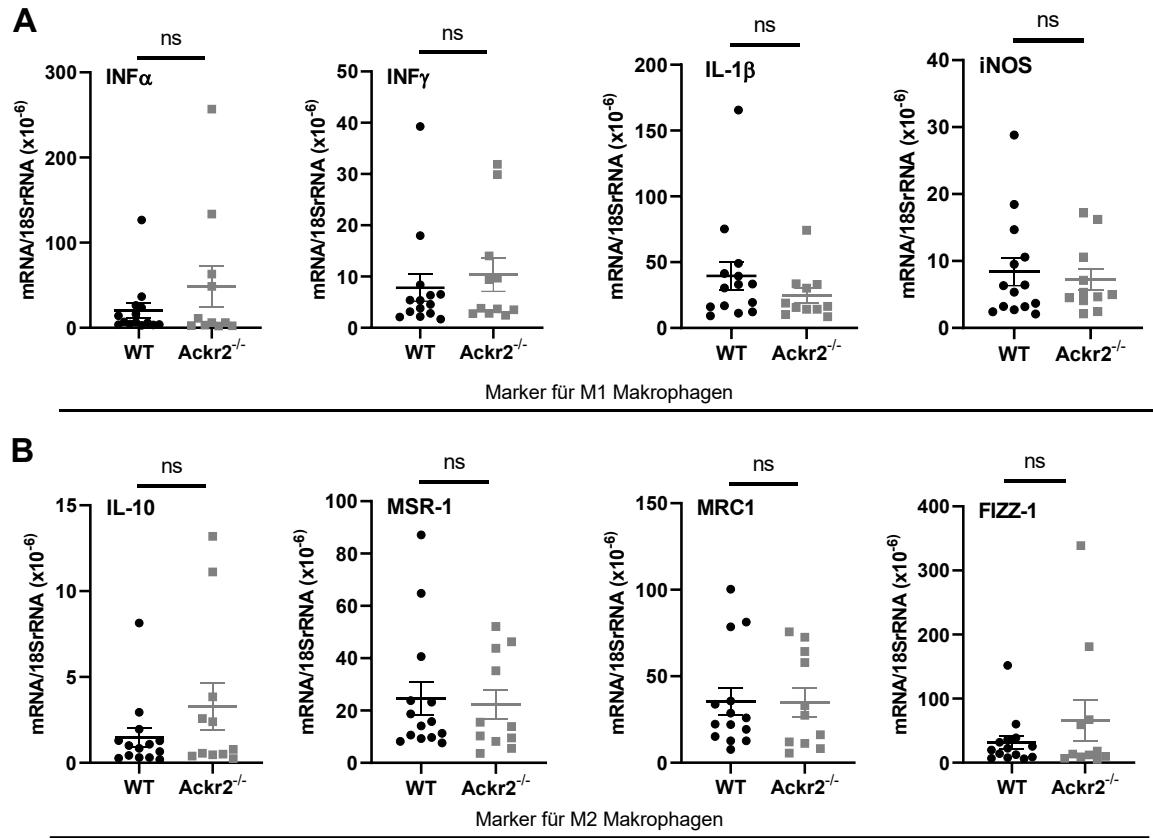


Abbildung 3.23. Renale mRNA-Expression von Markergenen der A: M1 Makrophagen und B: M2 Makrophagen in diabetischen Wildtyp (WT)- und $Ackr2$ -defizienten ($Ackr2^{-/-}$) Mäusen in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten \pm SEM. ns, nicht signifikant

3.3.11 Fibrotischer Gewebeumbau in diabetischen Wildtyp- und $Ackr2^{-/-}$ -Nieren

Diabetische Stoffwechsellage und chronische Entzündung führen bei der diabetischen Nierenschädigung zu einem fibrotischen Gewebeumbau der Nieren. Inwieweit Ackr2-Defizienz bei verstärkter renaler Leukozyteninfiltration, aber vergleichbarer renaler Entzündung die renale Fibrose beeinflusst, wurde durch Analyse der renalen mRNA-Expression verschiedener Fibrosemarker in diabetischen Wildtyp- und $Ackr2^{-/-}$ -Mäusen in Woche 25 nach Diabetesinduktion untersucht. Bestimmt wurde die renale Expression der FibrosemEDIATOREN CTGF und TGF β , der extrazellulären Matrixmoleküle Fibronectin, Laminin, Prokollagen 1, Prokollagen 4, sowie der Fibroblastenmarker α SMA und FSP-1. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 illustriert. Es kann kein statistisch signifikanter

3. Ergebnisse

Expressionsunterschied zwischen den beiden Genotypen detektiert werden, sodass von einer vergleichbaren renalen Fibrosierung in diabetischen Wildtyp- und $Ackr2^{-/-}$ -Nieren auszugehen ist.

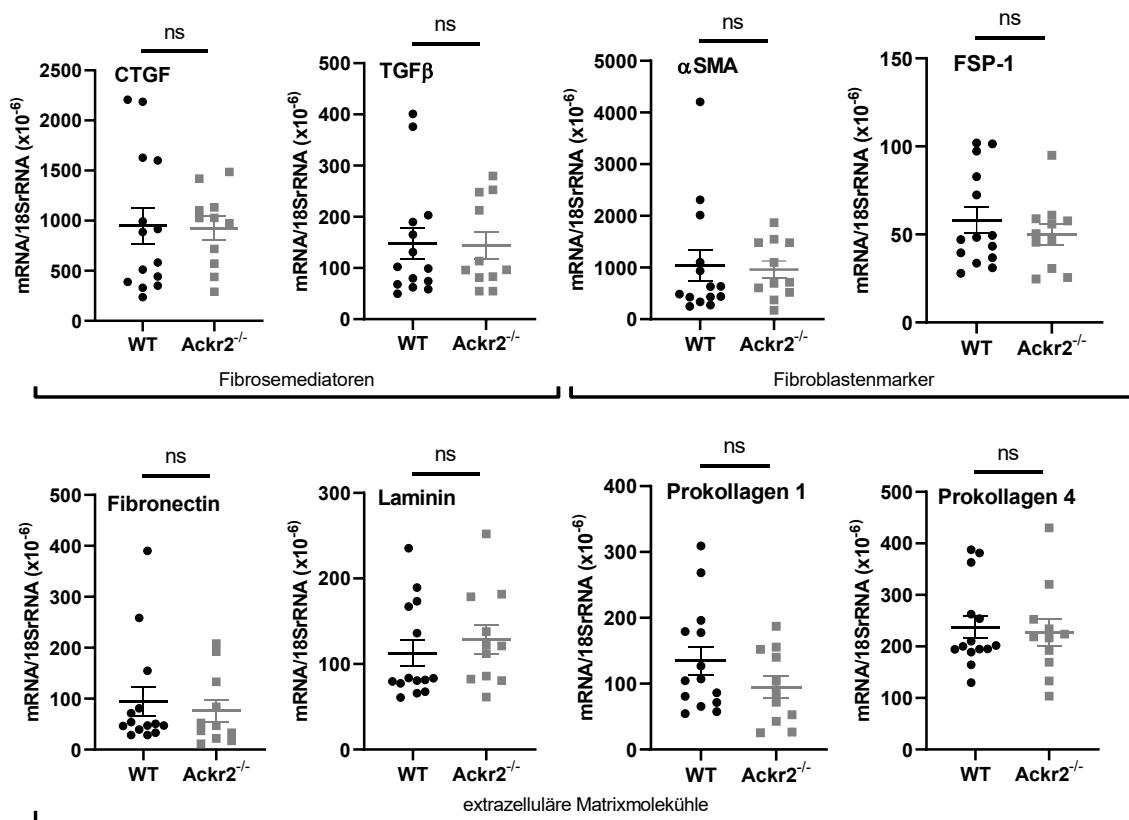


Abbildung 3.24. Renale mRNA Expression von Fibroemarkern in diabetischen Wildtyp (WT)- und $Ackr2^{-/-}$ -defizienten (Ackr2-/-) Mäusen in Woche 25 nach Induktion des Diabetes. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. ns, nicht signifikant

Neben aktivierten renalen Myofibroblasten können aus dem Knochenmark stammende, im Blut zirkulierende Fibrozyten in erkrankte Nieren infiltrieren und zur Fibrosierung beitragen (Bucala et al. 1994, Chesney et al. 1998). Diese Infiltration scheint auch über Aktivierung von auf Fibrozyten exprimierten CCR2 durch CCL2 vermittelt zu werden (Reich et al. 2013). Daher wurde durchflusszytometrisch die Zahl akkumulierender CD45⁺ CD11b⁺ Kollagen 1⁺ Fibrozyten in den diabetischen Nieren von Wildtyp- und $Ackr2^{-/-}$ -Mäusen untersucht. Ähnlich wie bei der gesteigerten renalen Leukozyteninfiltration zeigt sich eine verstärkte Akkumulation von Fibrozyten in Ackr2-defiziente Nieren im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.25). Trotz dieser erhöhten Fibrozytenzahl scheint bei vergleichbar exprimierten Fibroemarkern jedoch keine verstärkte renale Fibrose in diabetischen $Ackr2^{-/-}$ -Nieren vorzuliegen.

3. Ergebnisse

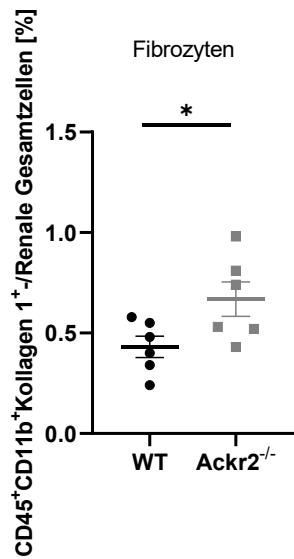


Abbildung 3.25. Durchflusszytometrische Quantifizierung von renalen $CD45^+ CD11b^+$ Kollagen 1 $^+$ Fibrozyten in Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2 $^{-/-}$) Mäusen in Woche 25 nach Diabetesinduktion. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$

3.3.12 CCL2-Proteingehalt in Blut, Urin und Nierengewebe diabetischer Wildtyp- und Ackr2 $^{-/-}$ -Mäuse

Der verstärkten renalen Akkumulation von Leukozyten und Fibrozyten bei Ackr2-Defizienz könnte ein verminderter Ackr2-vermittelter Abbau von Chemokinen wie CCL2 zugrunde liegen. Daher wurde in Blutplasma, Urin und Nierengewebe der Versuchstiere zum Endzeitpunkt in Woche 25 mittels ELISA die CCL2-Proteinkonzentration bestimmt. Abbildung 3.26 fasst die CCL2-Konzentrationen der drei Kompartimente in diabetischen Wildtyp- und Ackr2 $^{-/-}$ -Mäusen zusammen. Im Blut zeigen sich statistisch signifikant erhöhte Plasma-CCL2-Spiegel in der Ackr2-defizienten Gruppe (Abbildung 3.26 A). Dagegen sind die CCL2-Konzentrationen im Urin zwischen Wildtyp- und Ackr2 $^{-/-}$ -Versuchstieren nicht signifikant verschieden (Abbildung 3.26 B). Auch der CCL2-Proteingehalt in den diabetischen Nieren beider Genotypen unterscheidet sich nicht signifikant, bei tendenziell eher geringeren Werten in den Ackr2 $^{-/-}$ -Nieren (Abbildung 3.26 C). Diese Daten weisen darauf hin, dass die verstärkte renale Leukozyteninfiltration bei Ackr2-Defizienz nicht durch verminderten Chemokin-Abbau in der Niere vermittelt wird, jedoch eine verstärkte systemische Immunantwort aufgrund erhöhter CCL-Spiegel im Blut hierzu beitragen könnte.

3. Ergebnisse

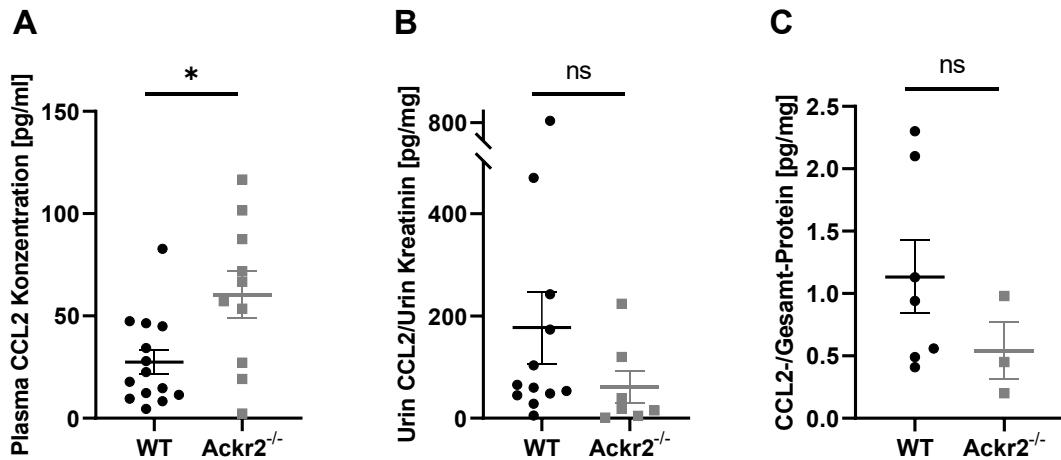


Abbildung 3.26. CCL2-Proteingehalt in A: Blutplasma, B: Urin und C: Nierengewebe in diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2^{-/-}) Mäusen in Woche 25 nach Induktion des Diabetes. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. * p < 0,05; ns, nicht signifikant

3.3.13 Systemische Immunantwort in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen

Um mögliche systemische Effekte der Ackr2-Defizienz auf die Immunantwort in diabetischen Mäusen zu erfassen, wurden am Versuchsende auch in Blut, Milz und Knochenmark die Leukozytenpopulationen durchflusszytometrisch quantifiziert.

Im Blut zeigt sich in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen eine vergleichbare Gesamtleukozytenzahl (Abbildung 3.27 A). Weiter differenziert zeigt sich eine vergleichbare Lymphozyten- und Granulozytenzahl, dagegen fallen bereits in der Forward/Sideward Scatter-Analyse statistisch signifikant vermehrte Monozyten im peripheren Blut der Ackr2-defizienten Mäuse auf (Abbildung 3.27 B). Die Lymphozyten werden noch weiter differenziert betrachtet. Hier sind CD3⁺ T-Zellzahlen (Abbildung 3.27 C) und deren Subtypen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellzahlen (Abbildung 3.27 D) nicht signifikant unterschiedlich in den beiden diabetischen Genotypen.

3. Ergebnisse

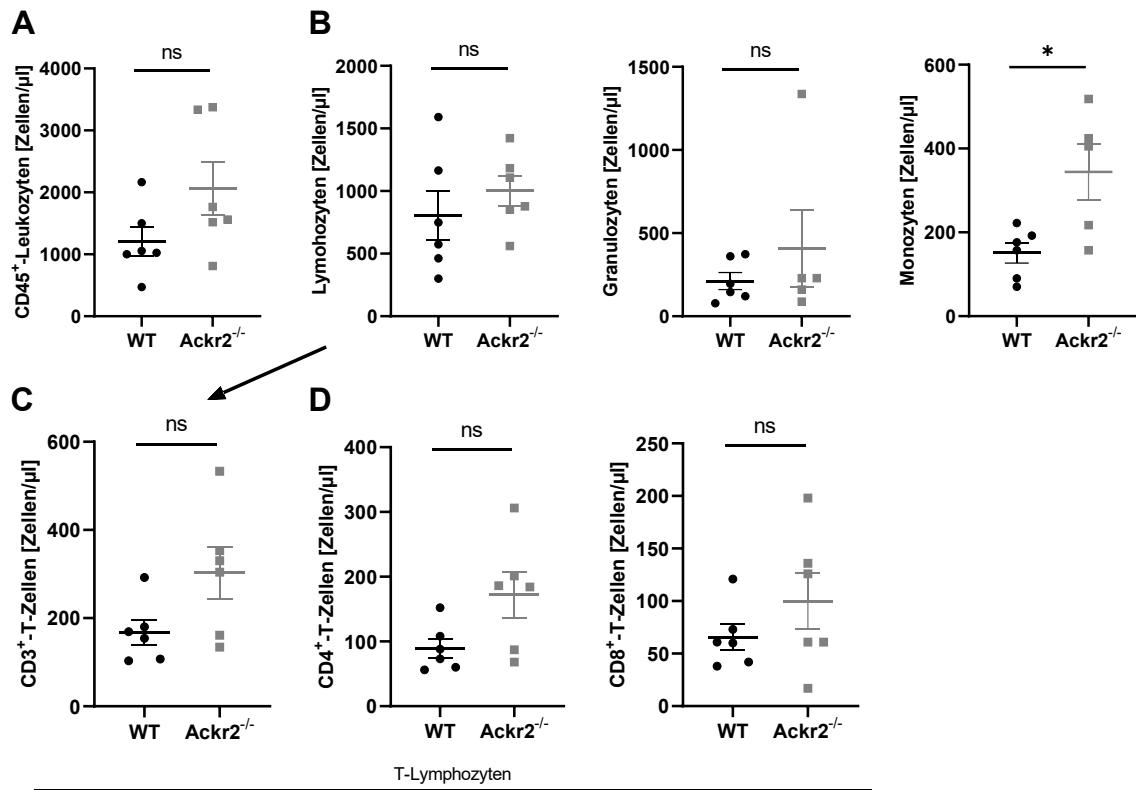


Abbildung 3.27. Durchflusszytometrische Quantifizierung von A: Gesamtleukozytenzahl, B: Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten sowie C: CD3⁺ T-Zellen und D: deren Subpopulationen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten \pm SEM. * $p < 0,05$; ns, nicht signifikant

Die Monozytenpopulation im peripheren Blut wurde durchflusszytometrisch weiter differenziert und quantifiziert (Abbildung 3.28). Hierbei zeigt sich eine statistisch signifikant höhere Zahl CD11b⁺ F4/80⁺ Monozyten in Ackr2^{-/-}-Mäusen, ebenso eine deutlich erhöhte Zahl zirkulierender inflammatorischer CD11b⁺ Ly6C^{high} Monozyten im Vergleich zum Wildtyp. Die meisten dieser Zellen exprimieren den CCL2-Rezeptor CCR2. Entsprechend sind auch CD11b⁺ CCR2⁺ Monozyten und CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ inflammatorische Monozyten im peripheren Blut der diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermehrt.

3. Ergebnisse

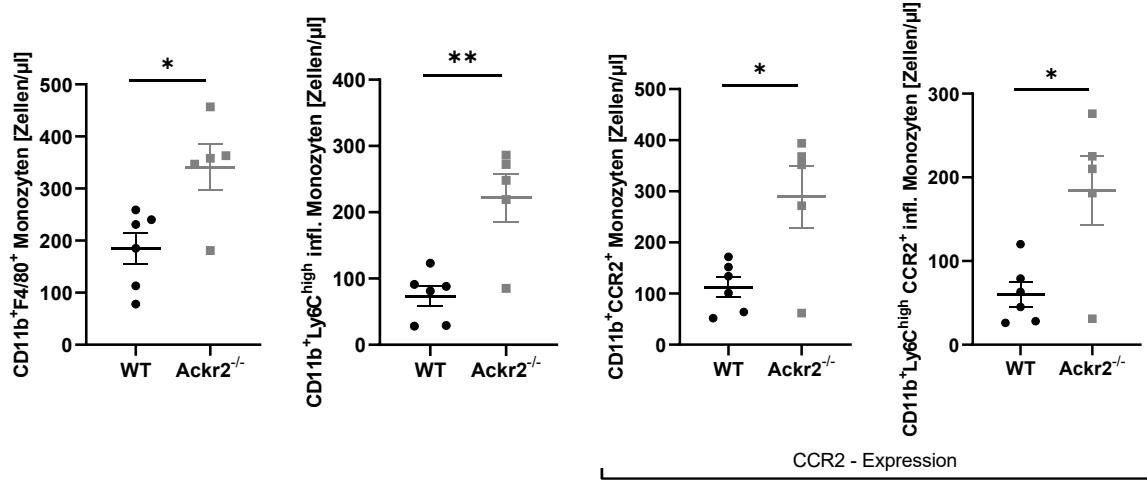


Abbildung 3.28. Durchflusszytometrische Quantifizierung CD11b⁺ F4/80⁺ Monozyten, CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischer Monozyten sowie CD11b⁺ CCR2⁺ Monozyten und CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ inflammatorischer Monozyten im peripheren Blut diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. . * p < 0,05; ** p < 0,01

Die Milzgröße ist in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-} Mäusen vergleichbar, wie in Abbildung 3.29 dargestellt. Die Milzgewichte sind hierbei auf die Körpergewichte der Versuchstiere bezogen.

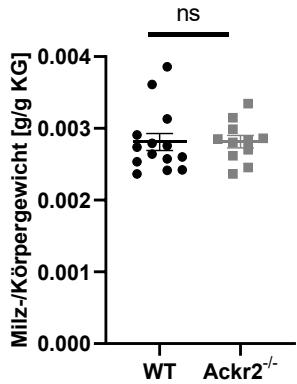


Abbildung 3.29. Milzgewichte bezogen auf das Körpergewicht der diabetischen Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienten (Ackr2^{-/-}) Mäuse 25 Wochen nach der Induktion des Diabetes mit Mittelwerten ± SEM. ns, nicht signifikant

Entsprechend ergibt auch die durchflusszytometrische Quantifizierung der Gesamtleukozytenzahl in den Milzen vergleichbare Werte in diabetischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren. Auch die CD3⁺ T-Lymphozyten sowie die Zahl CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind in beiden Versuchsgruppen nicht unterschiedlich (Abbildung 3.30)

3. Ergebnisse

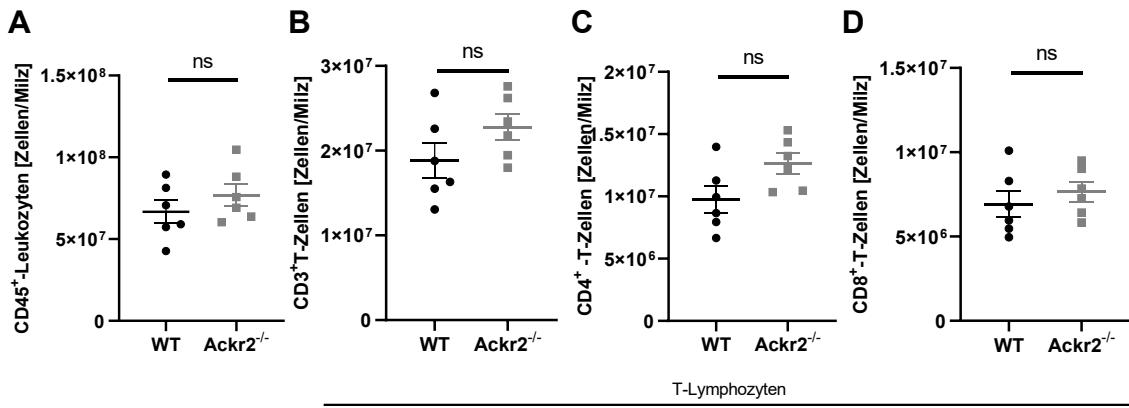


Abbildung 3.30. Durchflusszytometrische Quantifizierung von A: Gesamtleukozyten, B: CD3⁺ T-Zellen sowie C und D: deren Subpopulationen CD4⁺ (C) und CD8⁺ (D) T-Zellen in den Milzen diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten \pm SEM. ns, nicht signifikant

Dagegen zeigen sich ähnlich wie bei den Blutmonozyten in den Milzen der Ackr2-defizienten diabetischen Tieren signifikant vermehrte Makrophagenpopulationen (Abbildung 3.31). Hier fällt bei Ackr2-Defizienz eine erhöhte Zahl von CD11b⁺ F4/80⁺ Milzmakrophagen auf, ebenso eine größere Zahl an inflammatorischen CD11b⁺ Ly6C^{high} Makrophagen. In Ackr2^{-/-}-Milzen waren auch die CD11b⁺ CCR2⁺ Makrophagen und CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ inflammatorischen Makrophagen im Vergleich zum Wildtyp erhöht.

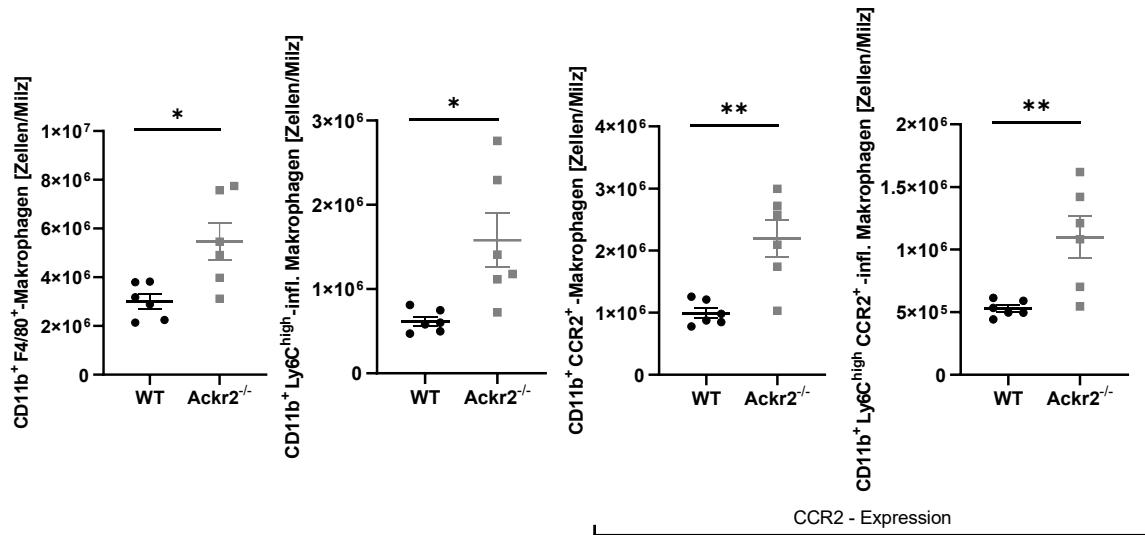


Abbildung 3.31. Durchflusszytometrische Quantifizierung CD11b⁺ F4/80⁺ Makrophagen, CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischer Makrophagen sowie CD11b⁺ CCR2⁺ Makrophagen und CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ inflammatorischer Makrophagen in den Milzen diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten \pm SEM. * p < 0,05; ** p < 0,01

3. Ergebnisse

Bei der Quantifizierung der Leukozytenpopulationen im Knochenmark zeigt sich dagegen in diabetischen Ackr2^{-/-}-Versuchstieren eine statistisch signifikant geringere Gesamtleukozytenzahl im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.32 A). Hierbei unterscheidet sich die Häufigkeit von CD3⁺ T-Lymphozyten (Abbildung 3.32 B) und ihrer CD4⁺ und CD8⁺ Untergruppen beider Genotypen nicht (Abbildung 3.32 C und D).

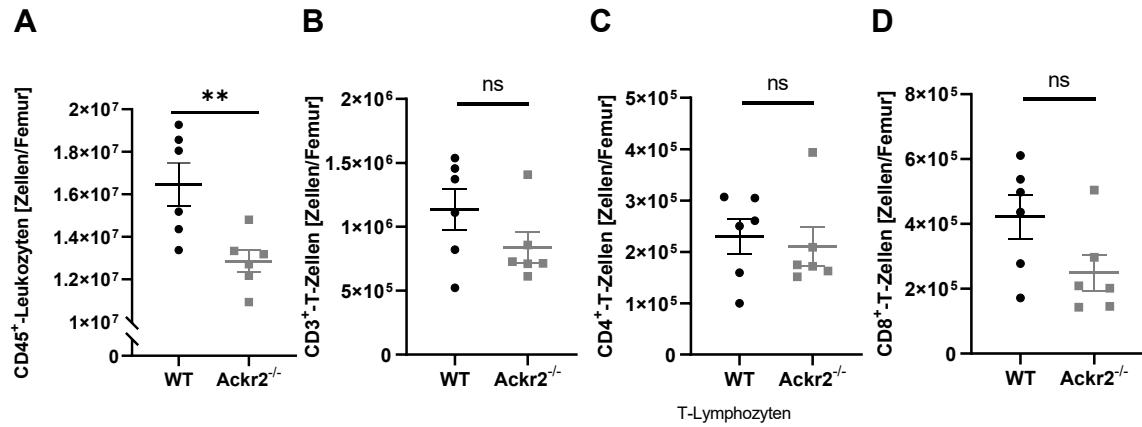


Abbildung 3.32. Durchflusszytometrische Quantifizierung von A: Gesamtleukozytenzahl, B: CD3⁺ T-Zellen sowie C: CD4⁺ und D: CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten \pm SEM. ** p < 0,01; ns, nicht signifikant

Bei Analyse der CD11b⁺ Makrophagenpopulationen (Abbildung 3.33) zeigen sich vergleichbare Werte für die Menge CD11b⁺ F4/80⁺ Knochenmark-Makrophagen in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Tieren und eine tendenzielle, nicht signifikant verminderte Zahl CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischer Makrophagen in Ackr2^{-/-}-Mäusen. Die Zahl CD11b⁺ CCR2⁺ Makrophagen ist ebenfalls vergleichbar. Das Knochenmark Ackr2-defizienter Mäuse enthält jedoch signifikant weniger CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ inflammatorische Makrophagen.

3. Ergebnisse

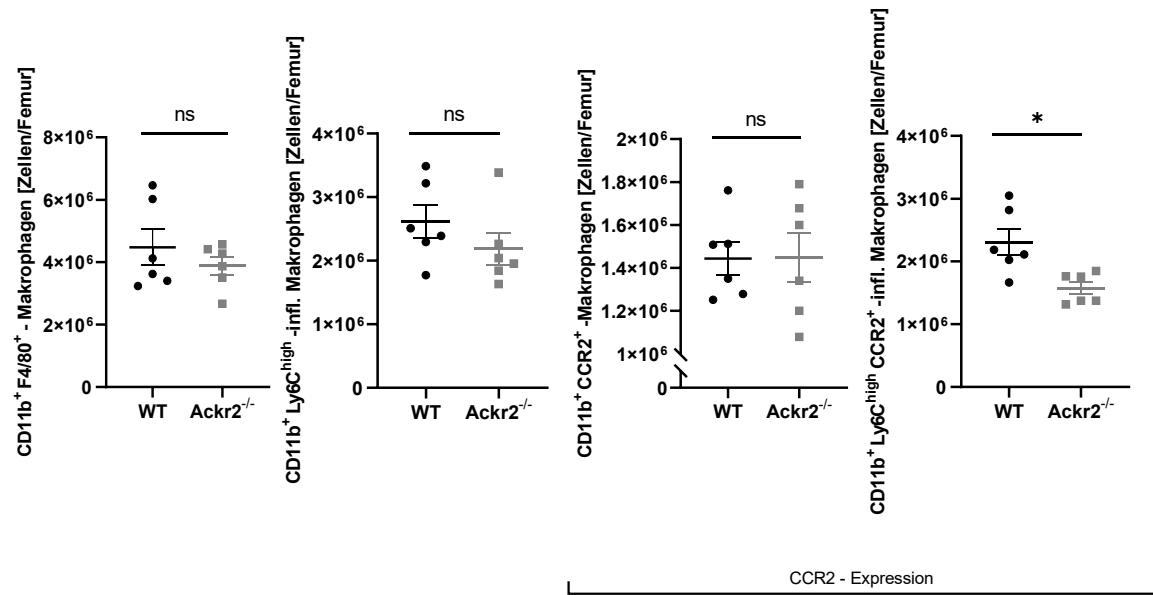


Abbildung 3.33. Durchflusszytometrische Quantifizierung CD11b⁺ F4/80⁺ Makrophagen, CD11b⁺ Ly6C^{high} inflammatorischer Makrophagen sowie CD11b⁺ CCR2⁺ Makrophagen und CD11b⁺ Ly6C^{high} CCR2⁺ inflammatorischer Makrophagen im Knochenmark diabetischer Wildtyp (WT)- und Ackr2-defizienter (Ackr2^{-/-}) Mäuse in Woche 25 nach Induktion des Diabetes mit Mittelwerten \pm SEM. * p < 0,05; ns, nicht signifikant

Die erhöhte Zahl insbesondere CCR2⁺ Makrophagenpopulationen im peripheren Blut und in den Milzen der diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäuse bei gleichzeitig reduzierter Zahl im Knochenmark weist auf eine verstärkte Mobilisation dieser Leukozyten aus dem Knochenmark in die Peripherie hin, die durch die bei Ackr2-Defizienz erhöhten systemischen CCL2-Spiegel im Blut vermittelt werden könnte. Bei vergleichbarem renalen CCL2-Proteingehalt in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Nieren könnte die vermehrte zirkulierenden inflammatorischen Leukozytenpopulationen die Ursache für die verstärkte renale Leukozyteninfiltration in Ackr2-defizienten Mäusen sein.

4 Diskussion

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die Beeinflussung der diabetischen Nephropathie durch ACKR2 zu überprüfen, eine mögliche entzündungsbegrenzende und damit nephroprotektive Wirkung von ACKR2 nachzuweisen und ihn damit als potentielles Zielmolekül für Therapien zur Verlangsamung der diabetischen Nierenschädigung zu identifizieren.

Folgende Hypothesen sollten überprüft werden:

- A.** Durch die STZ-Gabe wird ein Diabetes erfolgreich und unabhängig von der genetischen Ackr2-Defizienz in den Knockout-Mäusen induziert
- B.** Die diabetische Stoffwechsellage führt durch chronische Umbauprozesse und Entzündung zur Schädigung der Nieren mit Beeinträchtigung der Nierenfunktion
- C.** Ackr2-Defizienz führt durch verminderten lokalen Abbau proinflammatorischer Chemokinen wie CCL2 in der Niere zur vermehrten renalen Leukozyteninfiltration, renaler Entzündung und damit verbunden zu einer verstärkten Nierenschädigung
- D.** Ackr2-Defizienz führt infolge vermehrter renaler Leukozyteninfiltration und/oder Podozytenschädigung zu einer rascher progredienten glomerulären und tubulointerstitiellen Nierenschädigung und Vernarbung

In den folgenden Kapiteln werden diese Hypothesen unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten analysiert und diskutiert.

4.1 Induktion des Diabetes durch STZ und Verlauf in den untersuchten Genotypen

4.1.1 Diabetische Stoffwechsellage

Nach der STZ-Injektion von 40 mg/kg Körpergewicht entwickelten die meisten Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäuse eine diabetische Stoffwechsellage. Von einer erfolgreichen Induktion des Diabetes wurde ausgegangen, wenn die Tiere am Versuchsende in Woche 25 einen HbA1_c-Wert > 5,0% aufwiesen. Dies war bei 14 von 17 (82%) der Wildtyp-Tiere und 11 von 14 (79%) der Ackr2-defizienten Mäuse der Fall (Tabelle 3.1). Die HbA1_c-Werte der unbehandelten Kontrolltiere lagen dagegen zwischen 3,5% und 4% (Abbildung 3.1). Nach Literaturangaben sollten die Blutzuckerwerte eine Woche nach Abschluss der STZ-Injektion größer als 280 mg/dl sein, um von einer erfolgreichen Induktion des Diabetes auszugehen (Tesch und Allen 2007). Dies wurde bei den eingeschlossenen (HbA1_c-Wert > 5,0%) diabetischen Tieren beider Genotypen erreicht. Es ist somit von einer vergleichbaren Effektivität der Diabetes-Induktion durch STZ in den beiden Genotypen auszugehen. Auch die weitere Entwicklung der Blutzuckerwerte während der 25 Wochen nach STZ-Injektion zeigte in den diabetischen Tieren beider Genotypen eine ähnliche Dynamik. Lediglich die

4. Diskussion

Plasmaglukose-Spiegel in der diabetischen *Ackr2^{-/-}*-Gruppe in Woche 25 war im Vergleich zum Wildtyp leicht erniedrigt, obwohl die vorangegangenen Blutzuckerlaufmessungen aus dem Vollblut der Schwanzvene und die HbA_{1c}-Mittelwerte beider Genotypen in Woche 25 vergleichbar waren (Abbildung 3.9). Hierbei ist zu bedenken, dass der Glukosewert im Blut regelhaften Schwankungen unterliegt, die von vielen Faktoren abhängen: Tagesschwankung mit Schlaf-/Wach-Rhythmus und Ausschüttung von Cortisol, postprandialer Zustand, Stress etc., um nur einige zu nennen. Es handelt sich somit um eine Momentaufnahme, die größeren Streuungen unterliegen kann. Dieser Effekt kann durch Bestimmung der HbA_{1c}-Werte verringert werden. Beim HbA_{1c} handelt es sich um eine Hämoglobinvariante, die durch nichtenzymatische Glykosylierung des Hämoglobinmoleküls entsteht und dessen Häufigkeit damit von der Höhe des Blutzuckerspiegel während der physiologische Lebensdauer des Erythrozyten abhängt (Arastéh et al. 2013). Sie unterliegt daher keinen kurzfristigen Schwankungen und ist somit ein zuverlässiger Langzeitparameter der glykämischen Stoffwechsellage. Daher war dieser Wert auch der ausschlaggebende Faktor zur Definition einer erfolgreichen Diabetesinduktion in den Versuchstieren, deren HbA_{1c} Wert über 5,0% liegen sollte. Der HbA_{1c}-Wert war in der vorliegenden Arbeit also ein wesentlicher Parameter für die Bewertung des diabetischen Stoffwechsels.

Bei beiden Genotypen lag eine gute Gesamtüberlebensrate von 83,8 % (31 von 37) vor, die sich nicht signifikant zwischen den diabetischen Wildtyp- und den *Ackr2^{-/-}*-Mäusen unterschied (Tabelle 3.1). Die Erfolgsquote der Diabetesinduktion lag insgesamt bei den Mäusen beider Versuchsgruppen bei 81% (25 von 31). Somit haben 19% der Mäuse, anhand des HbA_{1c} bewertet, keinen suffizienten Diabetes entwickelt. Ein Diabetes Typ 1 manifestiert sich, wenn etwa 80-90% der β -Zellen zerstört sind (Arastéh et al. 2013). Die Wahl der STZ-Dosis mit 40 mg/kg Körpergewicht erlaubte, bei den meisten Versuchstieren einen manifestierten Diabetes zu induzieren, gleichzeitig aber eine Restfunktion der β -Zellen zu erhalten, um eine Mortalität durch übermäßige Hyperglykämien zu verhindern. Mit einer Sterblichkeit von 16% (6 von 37) (Notwendigkeit der Euthanasie aufgrund verschlechterten Allgemeinzustands infolge von Hyperglykämie) und eine Misserfolgsquote der Diabetesinduktion bei den überlebenden Versuchstieren von 19% (6 von 31) erschien die ausgewählte STZ-Dosis für das angewandte diabetische Modell geeignet zu sein.

Insgesamt sprechen diese Daten für eine ähnlich erfolgreiche Induktion des Diabetes bei beiden Genotypen mit vergleichbarer diabetischer Stoffwechsellage im Verlauf. Hypothese A wurde somit validiert. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die nachfolgende Beurteilung, ob bei *Ackr2*-Defizienz der Verlauf der diabetischen Nierenschädigung beeinflusst wird.

4. Diskussion

4.1.2 Entwicklung der diabetischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäuse

Der Gewichtverlauf galt, neben der wöchentlichen Blutzuckerverlaufskontrolle, als wesentlicher Anhaltspunkt für die Überwachung der Versuchstiere (Abbildung 3.11). Dabei zeigte sich eine ähnliche Progression der Körpergewichte der Versuchstiere beider Genotypen bei leicht unterschiedlichen Startgewichten. Die gleiche Steigung der Wachstumskurven mit einer Gewichtszunahme von etwa 0,207 g/Woche in beiden Tiergruppen lässt darauf schließen, dass sich beide Genotypen gleichermaßen unter dem Einfluss des Diabetes entwickelten. Außerdem waren die diabetischen Versuchstiere gegenüber ihren unbehandelten Kontrollgruppen (d.h. ohne eine Entwicklung eines Diabetes) zum Endzeitpunkt in Woche 25 signifikant leichter (Abbildung 3.3 A). Die Versuchstiere haben durch die STZ-Injektion und dadurch resultierenden β -Zellenzerstörung einen absoluten Insulinmangel. Dies gleicht dem Typ-1-Diabetiker beim Menschen, bei dem die β -Zellen durch autoimmune Vorgänge zerstört werden und sich somit eine hyperglykämische Stoffwechsellage einstellt. Der Hyperglykämie folgen eine Glukosurie und damit ein Kalorienverlust, sodass sich ein Gewichtsdefizit im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erklären lässt (Arastéh et al. 2013).

4.1.3 Lipid-Stoffwechsel

Veränderungen des Lipidprofils im Rahmen der diabetischen Stoffwechsellage wurden durch Bestimmung der Plasmacholesterin- und Triglyzeridwerte erfasst. Zudem könnte eine ausgeprägte Proteinurie bei diabetischer Nierenschädigung zu einer Hypercholesterinämie wie beim nephrotischen Syndrom führen.

Insulin ist vor allem für die Senkung des Glukosespiegels verantwortlich, allerdings ist es auch in größerem Ausmaß an der Stoffwechselregulation beteiligt. Insulin beeinflusst sämtliche Stoffwechselschritte, die insgesamt zu einer Senkung des Blutzuckers führen, so auch den Lipid-, Kohlenhydrat- und Eiweißmetabolismus (Klinke et al. 2010). Als anaboles Hormon fördert Insulin die Synthese und intrazelluläre Einlagerung von Triglyzeriden und hemmt gleichzeitig die Lipolyse. In der Leber wird weiter durch Insulin die β -Oxidation von freien Fettsäuren zu Ketonkörpern gehemmt, weshalb von einer antiketogenen Wirkung gesprochen wird. Bei einem Mangel an Insulin steigen die Triglyzeride im Blut somit an. Dies war auch in dieser Arbeit nachweisbar (Abbildung 3.2). Diabetische Versuchstiere im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren zeigten erhöhte Triglyzeridwerte im Plasma. Hingegen weisen Diabetische Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Tiere vergleichbare Triglyzeride und Cholesterinwerte auf (Abbildung 3.10). Entsprechend der vergleichbaren Blutzuckerwerte ergaben sich somit keine statistisch signifikanten Unterschiede der Cholesterin- und Triglyzeridwerten zwischen den diabetischen Versuchstieren beider Genotypen, das

4. Diskussion

ebenfalls für eine durch Ackr2-Defizienz nicht beeinflusste, vergleichbare diabetische Stoffwechsellage spricht.

4.2 Einfluss der Ackr2-Defizienz auf funktionelle Parameter der diabetischen Nierenschädigung

In dieser Arbeit wurde ein chronisches Tiermodell etabliert, das das Ziel hatte, langsam ablaufende Prozesse der Nierenschädigung unter dem Einfluss eines Diabetes zu detektieren. Anhand der funktionellen Parameter konnte gezeigt werden, dass in den diabetischen Wildtyp-Tieren im Vergleich zu ihren gesunden Kontrolltieren eine beginnende Schädigung der Niere durch den Diabetes aufgetreten ist (Abschnitt 3.2.3). Die Veränderung der funktionellen Parameter unterschied sich in ihrem Ausmaß jedoch nicht zwischen diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen (Abschnitt 3.3.4).

Im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren zeigten die Wildtyp-Tiere nach unilateraler Nephrektomie und Induktion des Diabetes am Versuchsende zu Woche 25 eine eingeschränkte Nierenfunktion, mit Erhöhung der Kreatinin- und Harnstoffwerte im Plasma (Abbildung 3.4 A und B) und einer Verminderung der gemessenen GFR in Woche 23 (Abbildung 3.5).

Gesamtprotein- und Albuminwerte im Plasma waren in diabetischen Tieren gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ebenfalls verringert (Abbildung 3.4 B und C), vereinbar mit einem Eiweißverlust bei glomerulärer Nierenschädigung der verbliebenen Niere im Rahmen der Hyperfiltration und diabetischen Stoffwechsellage. Entsprechend zeigten diabetische Wildtyp-Tiere eine im Versuchsverlauf ansteigende Albuminurie als Hinweis auf eine sich entwickelnde diabetische Nephropathie. Bei vergleichbaren Werten in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen wurden diese funktionellen Parameter durch die Ackr2-Defizienz jedoch nicht beeinflusst. Sowohl die Kreatinin- und Harnstoffwerte als auch die Plasmakonzentrationen der Proteine und des Albumins in beiden Genotypen unterschieden sich nicht (Abbildung 3.13).

Vordaten aus Untersuchung anderer chronischer renaler Krankheitsmodelle konnten dagegen eine Verschlechterung funktioneller Nierenparameter in Ackr2-defizienten Knockout-Mäusen nachweisen. Untersucht wurde unter anderem der Einfluss von Ackr2 auf den Verlauf der Immunkomplex-Glomerulonephritis (Bideak et al. 2018). In einem Zwei-Wochenmodell wurden hier Ackr2-defiziente Mäuse mit C57BL/6J-Wildtyp-Mäusen verglichen. Es zeigte sich eine Verschlechterung der renalen Funktion. Albuminurie und Harnstoffkonzentration im Plasma waren in den Ackr2-defizienten Mäusen erhöht (Bideak et al. 2018). Zwar konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nach erfolgreich induziertem Diabetes die Albuminurie im Verlauf zunimmt (Abbildung 3.6 B), jedoch konnte kein Unterschied zwischen den diabetischen Wildtyp und Ackr2-defizienten Mäusen

4. Diskussion

nachgewiesen werden (Abbildung 3.15). Auch die erhöhte Harnstoffkonzentration in den diabetischen Versuchsgruppen beider Genotypen war ähnlich. In dieser Arbeit wurde zusätzlich die GFR der diabetischen Versuchstiere bestimmt (Abbildung 3.14), die ebenso eine vergleichbare Nierenfunktionseinschränkung in den beiden diabetischen Vergleichsgruppen zeigte. Sie gilt als deutlich sensitivere Methode zur Bestimmung der Nierenfunktion (Pill et al. 2005). Im Gegensatz zum Glomerulonephritis-Modell führt somit Ackr2-Defizienz im hier untersuchten chronischen Langzeitdiabetes-Modell nicht zu einem verstärkten renalen Funktionsverlust. Diese Daten sprechen, zumindest innerhalb des hier untersuchten Beobachtungszeitraums von 25 Wochen gegen einen nephroprotektiven Effekt von ACKR2 bei der diabetischen Nephropathie.

Untersuchungen an einem weiteren diabetischen Nephropathiemodell in OVE26-Mäusen, die spontan eine diabetische Stoffwechsellsage entwickeln, zeigten sogar nach 6 Monaten eine Verminderung der Albuminurie in Ackr2-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp, so dass diese Autoren einen der Erkrankung beschleunigten Effekt von ACKR2 postulierten (Zheng et al. 2016). Harnstoffmessungen oder andere funktionelle Testverfahren wie die GFR-Bestimmung wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. In den OVE26-Mäusen entwickelte sich ein Typ 1-Diabetes mit nachfolgender Nierenschädigung durch transgene Überexpression von Calmodulin in pankreatischen β -Zellen, die hierdurch geschädigt werden und so zu einer defizienten Insulinproduktion und Sekretion führt (Epstein et al. 1989). Bei beiden Modellen, den OVE226-Mäusen und dem in dieser Arbeit verwendeten STZ-induzierten Diabetes, handelt es sich um Langzeitmodelle der diabetischen Nephropathie mit einem Beobachtungszeitraum über 6 Monaten. In beiden Modellen entwickelte sich die diabetische Stoffwechsellsage unabhängig von ACKR2. Die Ursache für die unterschiedliche Beeinflussung der Albuminurie durch Ackr2-Defizienz, insbesondere deren Verbesserung bei Fehlen von Ackr2 in den OVE26-Mäusen bleibt unklar, könnte jedoch möglicherweise im unterschiedlichen genetischen Hintergrund der OVE26-Mäuse oder Unterschieden in pathophysiologischen Mechanismen und zeitlicher Dynamik der diabetischen Nephropathieentwicklung begründet sein (Yang et al. 2011).

4.3 Einfluss der Ackr2-Defizienz auf den renalen Gewebeschaden bei diabetischer Nephropathie

Die diabetischen Wildtyp-Tiere entwickelten nach unilateraler Nephrektomie und Induktion der diabetischen Stoffwechsellsage im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine deutliche Hypertrophie der verbliebenen Niere (Abbildung 3.3 B-D), wie sie auch für den diabetischen Nierenschaden beim Menschen charakteristisch ist (Arastéh et al. 2013). Dieser liegt eine glomeruläre Hyperfiltration zu Grunde, die im angewendeten Tiermodell durch die Kompensationsmechanismen nach einseitiger Nephrektomie verstärkt wird

4. Diskussion

(Douglas-Denton et al. 2002). Das Nierengewicht der diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Tiere in Woche 25 nach Induktion des Diabetes war allerdings vergleichbar (Abbildung 3.12), das auf eine ähnlich ausgeprägte glomeruläre Veränderungen in beiden Genotypen hinweist. In der histologischen Analyse wiesen diabetische Wildtyp-Nieren im Vergleich zu gesunden Kontrollen keine signifikant vergrößerten Glomeruli auf, zeigten jedoch eine vermehrte, für den beginnenden diabetischen Nierenschaden charakteristische mesangiale Matrixzunahme (Abbildung 3.7). Das Ausmaß dieser glomerulären Mesangiumexpansion unterschied sich in diabetischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Nieren allerdings nicht (Abbildung 3.16). Die vergleichbaren funktionellen Parameter der diabetischen Nierenschädigung korrelierten somit mit einem ähnlich ausgeprägten renalen Gewebeschaden beider Genotypen. Hierauf wiesen auch die vergleichbare renale mRNA-Expression des glomerulären Strukturproteins Nephrin (Cooper et al. 2002) und der tubulären Schadensmarker KIM-1 (Panduru et al. 2015) und TIMP2 (Oremek et al. 2022) in Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen hin. Bei einer verstärkten glomerulären oder sekundär tubulointerstitiellen Schädigung in Ackr2-defizienten Tieren wäre eine verminderte Nephrin- bzw. erhöhte KIM-1- und TIMP2-Expression zu erwarten gewesen, hingegen zeigte sich in dieser Arbeit kein Unterschied (Abbildung 3.17).

Tatsächlich hatte sich in Ackr2^{-/-}-Mäusen mit Immunkomplex-Glomerulonephritis im Vergleich zum Wildtyp histologisch eine verstärkte Glomerulosklerose gezeigt (Bideak et al. 2018). Dort war Nephrin in den Ackr2-defizienten im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen erniedrigt, wohingegen KIM-1 in den Ackr2-defizienten Mäusen vermehrt exprimiert wurden. Es zeigte sich somit in der vorangegangenen Arbeit bei Glomerulonephritis eine Zunahme der glomerulären und tubulären Schädigung in Ackr2-defizienten Mäusen (Bideak et al. 2018). Die Vergleichsarbeit des diabetischen Nephropathiemodells in OVE26-Mäusen zeigt hierzu keine Daten (Zheng et al. 2016). Die verfügbaren Daten weisen damit darauf hin, dass der renale Gewebeschaden im Verlauf der diabetischen Nephropathie durch ACKR2 nicht entscheidend beeinflusst wird. Im Gegensatz zum Immunkomplex-Glomerulonephritis-Modell konnte in der vorliegenden Arbeit somit kein nephroprotektiver Effekt von ACKR2 bei diabetischer Nierenschädigung nachgewiesen werden.

4.4 Einfluss der Ackr2-Defizienz auf die renale Leukozyteninfiltration bei diabetischer Nierenschädigung

In der durchflusszytometrischen Analyse hatte sich eine verstärkte Infiltration von CD45⁺ Leukozyten in das renale Gewebe diabetischer Ackr2^{-/-}-Mäuse im Vergleich zum Wildtyp gezeigt (Abbildung 3.18). Dies betraf sowohl CD3⁺ T-Lymphozyten und ihre CD4⁺ Subpopulation, als auch eine signifikant vermehrte Akkumulation mononukleärer Phagozyten, als wichtige Effektorzellen, einer renalen Schädigung (Abbildung 3.19),

4. Diskussion

einschließlich Subpopulationen mit Expression des CCL2-Rezeptors CCR2 (Abbildung 3.20). Diese Ergebnisse wurden auch durch die ergänzende immunhistologische Auswertung bestätigt (Abbildung 3.21), in der sich eine signifikant vermehrte Infiltration von CD3⁺ T-Zellen, F4/80⁺ Phagozyten und ER-HR3⁺- Makrophagen im renalen Kortex diabetischer Ackr2^{-/-}-Tiere zeigte. Entsprechend der ursprünglichen Arbeitshypothese sind diese Daten mit einer bei Ackr2-Defizienz verstärkten Chemokin-vermittelten Leukozytenrekrutierung in geschädigtes Nierengewebe infolge eines verminderten lokalen Abbaus, z.B. von CCL2, vereinbar.

Diese Ergebnisse stimmen mit Daten aus dem Immunkomplex-Glomerulonephritis-Modell überein (Bideak et al. 2018). Dort zeigten sich in Ackr2-defizienten Mäusen im Vergleich zur Wildtypgruppe ebenfalls eine vermehrte renale Leukozyteninfiltration mit signifikanter Erhöhung der T-Zellen und ihrer Subpopulationen sowie F4/80⁺ Phagozyten. Diese Ergebnisse wurden sowohl mithilfe der Durchfluszytometrie als auch immunhistologisch erhoben. Ähnliche Daten ergaben sich bei Analyse des chronischen Verlaufs nach akutem renalem Ischämie/Reperfusionsschaden in Ackr2-defizienten Mäusen (Lux et. al. 2019). Dort wurden Ackr2-defiziente Mäuse mit Wildtyptieren verglichen, bei denen durch transientes Abklemmen der Nierenarterien ein akuter tubulärer Schaden induziert wurde. In diesem Modell wurde die Regenerationsphase nach der akuten Schädigung über einen Zeitraum von 5 Wochen analysiert. Schon am Tag 1 nach Verursachung der Ischämie konnte ein leichter Anstieg der renalen Leukozyteneinwanderung in Ackr2-defizienten Mäusen beobachtet werden. Im Verlauf am Tag 5 und in Woche 5 konnte die vermehrte renale Leukozytenakkumulation zunehmend nachgewiesen werden. Der größte Effekt wurde in Woche 5 nach Ischämie/Reperfusionsschaden detektiert. Vermehrt akkumulierende T-Zellen mit der CD4⁺ Population, sowie Phagozyten konnten sowohl durchfluszytometrisch als auch in der immunhistologischen Untersuchung gezeigt werden. Zusammenfassend weisen diese in verschiedenen renalen Krankheitsmodellen erhobenen Daten (Immunkomplex-Glomerulonephritis, chronischer Verlauf nach renalem Ischämie/Reperfusionsschaden, diabetische Nephropathie) darauf hin, dass Ackr2-Deletion die lokale Einwanderung von Leukozyten in geschädigtes Nierengewebe verstärkt (Bideak et al. 2018; Lux et. al. 2019). Tatsächlich konnte auch in weiteren nichtrenalen Krankheitsmodellen wie Hautentzündung oder Myokardinfarkt bei Ackr2-Defizienz eine verstärkte Leukozyteninfiltration und Organschädigung nachgewiesen werden (Blackburn et. al. 2004; Cochain et al. 2012; Graham 2009). Widersprüchliche und damit überraschende Ergebnisse in Bezug auf die renale Leukozyteninfiltration liefert dagegen die Vergleichsarbeit am diabetischen Modell der OVE26-Mäuse (Zheng et al. 2016). Dort zeigten sich in der immunhistologischen Auswertung verminderte CD45⁺ und CD3⁺ Zellen in den Nieren Ackr2-defizienter Mäuse im Vergleich zum Wildtyp. Eine weiterführende

4. Diskussion

Analyse, insbesondere über die Zahl infiltrierender mononukleärer Phagozytenpopulationen wurde allerdings nicht durchgeführt. Im OVE26-Diabetesmodell korrelieren damit die verbesserte Nierenfunktion und geringere Albuminurie bei Ackr2-Defizienz mit der verminderten renalen Leukozytenakkumulation. Eine Ursache für diese diskrepanten Befunde im Vergleich zu den hier vorgelegten Daten im STZ-induzierten Diabetesmodell und den vorangegangenen Ergebnissen weiterer renaler Krankheitsmodelle mit primär glomerulärer (Immunkomplex-Glomerulonephritis) oder tubulointerstitieller (chronischer Verlauf nach Ischämie/Reperfusionsschaden) Schädigung bleibt allerdings unklar.

4.5 Einfluss der Ackr2-Defizienz auf die renale Entzündung und Fibrose bei diabetischer Nierenschädigung

Die vermehrte Leukozytenakkumulation in diabetischen Ackr2^{-/-}-Nieren könnte zu einer verstärkten renalen Entzündungsreaktion führen. Tatsächlich ergab die renale mRNA-Expressionsanalyse aber vergleichbare Werte für die Expression entzündlicher Mediatoren des diabetischen Nierenschadens in Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Mäusen, wie TNF α , seiner Rezeptoren und verschiedener inflammatorischer Chemokine (Abbildung 3.22). Auch die renale Expression inflammatorischer M1 Makrophagen-Marker und regeneratorischer/profibrotischen M2 Makrophagen-Marker war zwischen beiden Genotypen vergleichbar (Abbildung 3.23). Somit korrelierte die vermehrte Akkumulation von T-Zellen und vor allem renaler Makrophagen nicht mit einer verstärkten oder qualitativ veränderten Entzündungsaktivität im renalen Gewebe Ackr2-defizienter Tiere.

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Daten aus dem Verlauf anderer renaler Krankheitsmodelle bei Ackr2-Defizienz (Bideak et al. 2018; Lux et. al. 2019). So zeigten die Untersuchungen im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis in den erkrankten Nieren Ackr2-defizienter Mäuse erhöhte Konzentrationen inflammatorischer Chemokine wie CCL2 und eine vermehrte mRNA-Expression des Rezeptors CCR2, welche mit der verstärkten Einwanderung von Leukozyten korrelierten (Bideak et al. 2018). Auch im chronischen Verlauf nach akutem renalem Ischämie/Reperfusionsschaden zeigten sich bei Ackr2-Defizienz vergleichbare Effekte (Lux et al. 2019). Im Verlauf dieses Modells korrelierte am Tag 5 und noch ausgeprägter in Woche 5 nach Ischämie die vermehrte renale Leukozytenakkumulation nicht nur signifikant mit gesteigerter renaler Expression von Entzündungsmediatoren, sondern es konnte auch eine gesteigerte Expression von Markern für inflammatorische M1- und regeneratorische/profibrotische M2 Makrophagen nachgewiesen werden. In dem hier untersuchten STZ-induzierten diabetischen Nephropathiemodell konnte diese Korrelation dagegen nicht nachgewiesen werden. Trotz vermehrter renaler Leukozyteninfiltration in Ackr2-defiziente diabetische Nieren wiesen

4. Diskussion

diese im Vergleich zum Wildtyp keine vermehrte, sondern eine vergleichbare Expression von Entzündungsmediatoren und Makrophagenmarkern auf. Möglicherweise lag in Woche 25 der STZ-induzierten diabetischen Nephropathie im Vergleich zu den bisher untersuchten renalen Krankheitsmodellen (Bideak et al. 2018; Lux et. al. 2019) eine so geringe Ausprägung der entzündlichen Aktivität vor, dass trotz vermehrter renaler Leukozytenfiltration in Ackr2-defizienten Mäusen keine relevante Verstärkung der Entzündung auftritt. Entsprechend korrelierte die in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Tieren vergleichbare renale Entzündung letztendlich mit der gleich ausgeprägten renalen Gewebeschädigung und Funktionseinschränkung in den beiden Genotypen. Interessanterweise führte im diabetischen OVE26-Mausmodell die verminderte renale Leukozyteninfiltration bei Ackr2-Defizienz auch zu einer zumindest tendenziell verminderten renalen Expression der inflammatorischen Chemokine CCL2 und CCL5, sowie des Chemokinrezeptors CCR2, wie mittels PCR in diabetischen Ackr2-defizienten Mäusen nachgewiesen wurde (Zheng et al. 2016). Die renale Expression weiterer Entzündungsmediatoren wurde in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht. Ebenso bleiben Mechanismen, wie Ackr2-Defizienz zu einer geringeren Entzündungsaktivität in der Niere führt, ungeklärt. Ein potentiell verminderter Abbau proinflammatorischer Chemokine bei Fehlen von Ackr2 sollte eher eine Verstärkung inflammatorischer Prozesse in der Niere mit vermehrter Gewebeschädigung bewirken (Vielhauer et al. 2004, Anders et al. 2010, Tesch 2008, Tashiro et al. 2002, Ihm et al. 1998, Lee et al. 2009, Nam et al. 2012, Chow et al. 2005, Chow et al. 2006, Sayyed et al. 2011).

Die verstärkte renale Entzündung in Ackr2-defizienten Mäusen mit Immunkomplex-Glomerulonephritis, chronischem Ischämie/Reperfusionsschaden oder auch Aristolochiasäure-induzierter Nephropathie führte in diesen Modellen auch zu einer vermehrten renalen Fibrose, die mit einer rascheren Progression der Nierenfunktionseinschränkung bei Ackr2-Defizienz korrelierte (Bideak et al. 2018, Lux et al. 2019). Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten diabetischen Nephropathie-Modell ergaben sich allerdings keine Hinweise auf eine verstärkte Fibrosierung bei Ackr2-Defizienz, verdeutlicht durch eine vergleichbare renale mRNA-Expression von Fibrosemediatoren, extrazellulären Matrixmolekülen und Fibroblastenmarkern in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-} Mäusen (Abbildung 3.24). Gleiche Entzündungsaktivität in den Nieren beider Genotypen korrelierte somit auch mit vergleichbarer renaler Fibrose und ähnlicher Einschränkung der Nierenfunktion in Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäusen. In diabetischen OVE-Mäusen mit Ackr2-Defizienz ging dagegen das verminderte Entzündungsniveau auch mit geringerer renaler Fibrose einher, deren Ausmaß histologisch mittels Trichrom-Färbung erfasst wurde (Zheng et al. 2016).

4. Diskussion

Interessanterweise ergab die durchflusszytometrische Analyse im Rahmen dieser Arbeit dennoch eine verstärkte Akkumulation von Fibrozyten in den diabetischen Nieren der Ackr2-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 3.25). Fibrozyten exprimieren den CCL2-Rezeptor CCR2 (Reich et al. 2013, Xia et al. 2013), so dass ein verminderter CCL2-Abbau bei Ackr2-Defizienz ihre verstärkte renale Infiltration vermitteln könnte. Die renale Fibrozytenzahl war auch in Ackr2-defizienten Tieren mit Immunkomplex-Glomerulonephritis und nach Ischämie-/Reperfusionsschaden erhöht (Bideak et al. 2018, Lux et al. 2019), ging bei diesen Erkrankungen jedoch im Gegensatz zum hier untersuchten diabetischen Nephropathiemodell auch mit einer verstärkten renalen Fibrose einher. Möglicherweise tragen aus der Zirkulation einwandernde Fibrozyten, im Gegensatz zu anderen renalen Erkrankungsmodellen wie beispielsweise der obstruktiven Nephropathie (Reich et al. 2013) bei der diabetischen Nephropathie, nicht relevant zum fibrotischen Gewebeumbau in der Niere bei. Tatsächlich wurde kürzlich eine signifikante profibrotische Rolle von Fibrozyten bei der Entwicklung der renalen Fibrose generell in Frage gestellt (Kramann et al. 2018).

4.6 Einfluss der Ackr2-Defizienz auf lokale und systemische Chemokinkonzentration am Beispiel von CCL2

Die in diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäusen vermehrte renale Akkumulation von Leukozyten, insbesondere auch CCR2-exprimierender Subpopulationen, sowie Fibrozyten wäre, einer dieser Arbeit zugrundeliegenden Hypothesen entsprechend, mit höheren renalen Chemokinkonzentrationen (z.B. von CCL2) infolge eines verminderten Ackr2-vermittelten lokalen Abbaus vereinbar. Bei der Bestimmung des renalen CCL2-Proteingehalts in diabetischen Wildtyp- und Ackr2^{-/-}-Tieren am Versuchsende in Woche 25 zeigten sich jedoch keine Unterschiede in den beiden Versuchsgruppen (Abbildung 3.26). Hiermit übereinstimmend war auch die CCL2-Konzentration im Urin der diabetischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Mäuse vergleichbar. Im hier untersuchten diabetischen Nephropathiemodell scheint daher die Chemokin-degradierende Funktion von Ackr2 in der Niere redundant zu sein und bei Fehlen von Ackr2 durch andere Chemokin-abbauende Mechanismen kompensiert zu werden. Dies ist in anderen Nephropathie-Modellen wie der Immunkomplex-Glomerulonephritis und des chronischen Ischämie/Reperfusionsschadens nicht der Fall. Bei diesen Erkrankungen konnte in den Ackr2-defizienten Tieren erhöhte renale CCL2-Spiegel gemessen werden, die mit einer gesteigerten renalen Leukozyteninfiltration, Entzündung, Fibrose und stärker eingeschränkten Nierenfunktion korrelierten (Bideak et al. 2018, Lux et al. 2019). Eine insgesamt geringe renale Entzündungsaktivität bei diabetischer Nephropathie, im Vergleich zu den vorgenannten

4. Diskussion

Krankheitsmodellen, könnte für die unterschiedliche funktionelle Relevanz von ACKR2 für die Kontrolle der lokalen Entzündungsreaktion verantwortlich sein.

Interessanterweise konnten im Blut der diabetischen Ackr2^{-/-} Mäuse im Vergleich zum Wildtyp erhöhte CCL2-Plasmaspiegel gemessen werden. Erhöhte CCL2-Konzentrationen im Blut lagen auch in Ackr2-defizienten Mäusen mit Glomerulonephritis, chronischem Ischämie/Reperfusionsschaden und obstruktiver Nephropathie vor (Bideak et al. 2018, Lux et al. 2019), so dass von einem generellen systemischen Effekt einer Ackr2-Defizienz auszugehen ist, der durch verminderten Chemokin-Abbau zu erhöhten Blutspiegeln von CCL2 führt.

Während erhöhte CCL2-Blutspiegel in diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäusen mit erhöhten Zahlen leukozytärer Effektorzellen im peripheren Blut korrelieren, ergeben sich aus den vorliegenden Ergebnissen kein Anhalt für eine gesteigerte inflammatorische Aktivierung von Podozyten durch vermehrte CCL2-Exposition. Aktivierte Podozyten exprimieren den CCL2-Rezeptor CCR2, dessen Stimulierung zur direkten Podozytenschädigung beitragen kann (Lee et al. 2009, Nam et al. 2012). Eine artifizielle Podozyten-spezifische Überexpression von CCR2 im Tiermodell bewirkt tatsächlich auch die Verschlechterung einer diabetischen Nierenschädigung (You et al. 2017). Der eindeutige Nachweis einer pathophysiologisch entscheidenden Rolle der CCR2-vermittelten Podozytenschädigung, beispielsweise durch Untersuchungen an Podozyten-spezifischen CCR2-Knockout-Mäusen, wurde bisher jedoch noch nicht publiziert. Der Podozytenschaden geht mit einer verminderten Expression des podozytären Strukturgens Nephrin einher. Bei vergleichbarer Albuminurie (Abbildung 3.15) als funktioneller Marker für eine glomeruläre Schädigung, insbesondere der Podozyten, und vergleichbarer Nephrin mRNA-Expression (Abbildung 3.17) in diabetischen Wildtyp- und Ackr2-defizienten Tieren ergab sich jedoch in den vorliegenden Untersuchungen kein Anhalt für einen vermehrten Podozytenschaden bei erhöhten CCL2-Blutspiegeln infolge der Ackr2-Defizienz.

4.7 Systemische Effekte der Ackr2-Defizienz in diabetischen Mäusen

Korrelierend zu den erhöhten systemischen Blutspiegeln von CCL2 zeigten sich in diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Zahl von zirkulierenden Monozyten im peripheren Blut (Abbildung 3.28), insbesondere von den CCL2-Rezeptor CCR2 exprimierenden inflammatorischen Monozyten. Diese Leukozytenpopulationen waren in gleichem Maße in Ackr2-defizienten Milzen vermehrt (Abbildung 3.31). Im Gegensatz hierzu zeigten sich im Knochenmark der Ackr2^{-/-}-Mäuse eine verminderte Leukozytenzahl mit deutlicher Reduzierung der CCR2⁺ inflammatorischen Makrophagen (Abbildung 3.33). Diese Daten sprechen für einen verstärkten CCL2-abhängigen Efflux, insbesondere CCR2⁺ Makrophagenpopulationen, aus dem Knochenmark mit nachfolgender Anreicherung in Blut

4. Diskussion

und Milz. Auch bei chronischem renalen Ischämie/Reperfusionsschaden konnten eine höhere Zahl zirkulierender Monozyten, unter anderem CCR2⁺ inflammatorischer Monozyten und dendritische Zellen im Blut Ackr2-defizienter Mäuse bei gleichzeitiger Reduktion dieser Leukozyten im Knochenmark nachgewiesen werden (Lux et al. 2019). Im Verlauf der Immunkomplex-Glomerulonephritis und bei obstruktiver Nephropathie zeigten sich in Ackr2^{-/-}-Tieren ebenfalls vermehrt Monozyten und inflammatorische CD11b⁺ Ly6C^{high} Monozyten im peripheren Blut (Bideak et al. 2018, Lux et al. 2019). Auch andere Autoren konnten eine erhöhte Zahl zirkulierender Monozyten im Blut Ackr2-defizienter Mäuse nach CCL2-Gabe nachweisen (Savino et al. 2012). Umgekehrt wurden in CCR2-Knockout-Mäusen verminderte inflammatorische Monozyten und dendritische Zellen im Blut bei gleichzeitiger Akkumulation im Knochenmark beschrieben (Fujimura et al. 2015). Die vermehrte CCL2-vermittelte Rekrutierung leukozytärer Effektorpopulationen aus dem Knochenmark und ihre Erhöhung im peripheren Blut könnte bei Fehlen erhöhter renaler Chemokinspiegel die vermehrte Leukozytenakkumulation in den diabetischen Nieren der Ackr2-defizienten Tiere bewirken.

4.8 Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisse im Vergleich zur Literatur

Bei der diabetischen Nephropathie weisen zahlreiche Daten zur Expression und funktionellen Rolle von Chemokinen, insbesondere des proinflammatorischen Chemokins CCL2 und seines Rezeptors CCR2 auf deren pathophysiologisch relevante Funktion für die renale Rekrutierung inflammatorischer Leukozyten und nachfolgender Gewebeschädigung hin (Tesch 2008). So zeigen Diabetiker erhöhte CCL2-Spiegel im Serum und sezernieren deutlich vermehrt CCL2 im Urin. Humane Mesangiumzellen produzieren vermehrt CCL2, wenn sie hohen Glukosekonzentrationen oder glykosylierten Molekülen (AGEs) ausgesetzt sind (Tashiro et al. 2002, Ihm et al. 1998). CCL2 vermittelt die Auswanderung inflammatorischer Monozyten aus dem Knochenmark in die Zirkulation und die nachfolgende Infiltration in extravasales Gewebe, wie den Glomerulus und das renale Interstitium (Vielhauer et al. 2004). Die pathophysiologische und therapeutische Relevanz der CCL2/CCR2-Achse für die diabetische Nephropathie wurde inzwischen in zahlreichen tierexperimentellen Studien mit Blockade von CCL2 oder CCR2 in Mausmodellen gezeigt (Chow et al. 2005, Chow et al. 2006, Tesch et al. 2008, Sayyed et al. 2011, Sullivan et al. 2013). Auch erste klinische Studien am Menschen zur Hemmung von CCL2 oder seines Rezeptors CCR2 wurden erfolgreich abgeschlossen und konnten eine Verringerung des klinischen Surrogat-Parameters Albuminurie unter der Behandlung zeigen (Menne et al. 2017, de Zeeuw et al. 2015). Diese Daten legen nahe, dass ein verringelter renaler oder systemischer Abbau inflammatorischer Chemokine wie CCL2 bei Ackr2-Defizienz in

4. Diskussion

Analogie zu anderen Nierenerkrankungen (Bideak et al. 2018, Lux et al. 2019) zu einer Verschlechterung des diabetischen Nierenschadens führen könnte, das die Grundhypothese dieser Arbeit darstellt.

Tatsächlich zeigen die erarbeiteten Ergebnisse jedoch, dass bei gleichermaßen effizienter Induktion der diabetischen Stoffwechsellsage in beiden Genotypen Ackr2-defiziente Mäuse im Vergleich zum Wildtyp zwar erhöhte systemische CCL2-Spiegel im Blut mit korrespondierender Vermehrung zirkulierender leukozytärer Effektorzellen und verstärkter renaler Leukozytenakkumulation aufweisen. Bei vergleichbarem CCL2-Gehalt in diabetischen Nieren führt dies jedoch nicht zu vermehrter renaler Entzündung, fibrotischen Gewebeumbau und verschlechtertem Verlauf der diabetischen Nephropathie. Die eher chronische, geringe entzündliche Aktivität im Verlauf der STZ-induzierten diabetischen Nephropathie erklärt möglicherweise die redundante Funktion von ACKR2 in diesem Modell, in dem offensichtlich das Fehlen der Ackr2-vermittelten Chemokin-abbauenden Funktion in den diabetischen Nieren durch andere lokale Mechanismen kompensiert werden kann. Offenbar wäre auch eine höhere intrarenale Chemokinkonzentration notwendig, um die vermehrt akkumulierenden Leukozyten in den Ackr2-defizienten Nieren ausreichend zu aktivieren und zu vermehrter Entzündung und renalem Schaden zu führen. Dies steht im Gegensatz zu Nephropathiemodellen mit stärkerer initialer renaler Schädigung und Entzündungsreaktion, wie der Immunkomplex-Glomerulonephritis oder dem chronischen Ischämie/Reperfusionsschaden (Bideak et al. 2018, Lux et al. 2019), in denen Ackr2-defiziente Tiere erhöhte renale CCL2-Konzentrationen, vermehrte Entzündung und Fibrose mit Verschlechterung der Nierenfunktion aufwiesen. Möglicherweise hätte in dem hier untersuchten diabetischen Nephropathiemodell die anhaltend gesteigerte renale Leukozytenakkumulation in Ackr2^{-/-}-Mäusen bei längerem Verlauf beispielsweise über 50 Wochen doch zu einer verstärkten renalen Entzündung mit erhöhten renalen CCL2-Spiegeln und verstärkter Gewebeschädigung geführt. Ein entsprechend langer Versuchszeitraum wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht.

Die Beeinflussung der diabetischen Nephropathie durch den atypischen Chemokinrezeptor Ackr2 wurde bereits in einem alternativen Diabetes-Modell untersucht. Es wurden statt des STZ-Modells transgene OVE26-Mäuse verwendet, in denen die Überexpression eines inserierten Calmodulins mit einer frühen β -Zellzerstörung im Pankreas assoziiert ist (Epstein et al. 1989). Diese Mäuse entwickeln bereits in den ersten Lebenstagen eine Hyperglykämie. Zheng und Mitarbeiter untersuchten den Einfluss eines Ackr2-Knockouts in OVE26-Mäusen (Zheng et al. 2016). Überraschender Weise berichten diese Autoren eine proinflammatorische, nierenschädigende Funktion von Ackr2 in ihrem diabetischen Nephropathiemodell. Ackr2-defiziente OVE26-Mäuse im Alter von 6 Monaten wiesen im

4. Diskussion

Vergleich zu OVE26-Kontrollmäusen verbesserte Nierenretentionsparameter, eine verminderte Albuminurie, geringere renale Leukozytenakkumulation und Chemokinexpression, sowie eine geringere renale Fibrose auf (Zheng et al. 2016). Zugrundeliegende Mechanismen für diesen unerwarteten Phänotyp wurden nicht untersucht. Die Autoren spekulieren über eine möglicherweise effektivere Beseitigung hyperglykämischer Nierenschäden in Ackr2^{-/-}-OVE26-Mäusen, so dass keine ausgeprägte chronische Nierenentzündung bei Ackr2-Defizienz entsteht. Tatsächlich wurden verstärkte anti-inflammatorische Immunantworten bei Fehlen von Ackr2 berichtet, beispielsweise eine vermehrt entzündungshemmende Funktion verstärkt akkumulierender Ly6C^{high} Monozyten bei muriner Graft versus Host-Erkrankung in Ackr2-defizienten Mäusen (Savino et al. 2012). Die berichteten Ergebnisse im diabetischen OVE26-Mausmodell stehen allerdings im Widerspruch zu den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten, die eine vermehrte renale Leukozytenakkumulation und keine Verbesserung von Nierenfunktionsparametern, renaler Entzündung und Fibrose in diabetischen Ackr2^{-/-}-Mäusen zeigt. Auch die in den anderen Nephropathiemodellen berichteten Ergebnisse, sowie Untersuchungen in zahlreichen anderen Erkrankungen wie Hautentzündung oder Myokardinfarkt weisen auf organprotektiven, lokal entzündungsbegrenzende Eigenschaften von ACKR2 mit Verschlechterung der Erkrankungen bei Ackr2-Defizienz hin (Bideak et al 2018, Lux et al. 2019, Cochain et al. 2012; Graham 2009). Gründe für die diskrepanten Ergebnisse in den beiden diabetischen Nephropathiemodellen bleiben unklar, könnten jedoch beispielsweise im speziellen genetischen Hintergrund des OVE26-Mausmodells liegen. Übereinstimmend weisen aber sowohl die hier erhobenen Daten im STZ-induzierten Diabetes-Modell als auch die publizierten Ergebnisse in der OVE26-Maus auf das Fehlen eines nephroprotektiven ACKR2-Effekts hin, da in beiden Modellen Ackr2-Defizienz nicht mit einer Verschlechterung der Erkrankung einhergeht.

4.9 Limitation der Arbeit und Ausblick

Trotz erhöhter CCL2-Plasmaspiegel und vermehrter renaler Leukozyteninfiltration in diabetischen Ackr2-defizienten Mäusen ergab sich in dem hier untersuchten STZ-induzierten Diabetesmodell entgegen der Ausgangshypothese dieser Arbeit keine Verschlechterung der diabetischen Nephropathie bei Ackr2-Defizienz. Während in renalen Krankheitsmodellen mit hoher entzündlicher Aktivität wie der Immunkomplex-Glomerulonephritis oder dem chronischen Verlauf nach Ischämie/Reperfusionsschaden (Bideak et al 2018, Lux et al. 2019) ein entzündungsbegrenzender, nephroprotektiver Effekt von ACKR2 nachgewiesen wurde, könnte eine insgesamt geringe Entzündungsaktivität im Verlauf der STZ-induzierten diabetischen Nephropathie eine Ursache für den fehlenden Nachweis einer nephroprotektiven ACKR2-Funktion in diesem

4. Diskussion

Modell sein. Im chronischen Verlauf nach Ischämie/Reperfusionsschaden zeigte sich ein stärkerer entzündungsbegrenzender und nephroprotektiver Effekt von ACKR2 mit zunehmender Beobachtungsdauer in Woche 5, auch wenn bereits nach 5 Tagen eine verstärkte Leukozyteninfiltration in Ackr2-defizienten Nieren vorlag (Lux et al. 2019). Es könnte somit sein, dass im Diabetesmodell der Beobachtungszeitraum bis Woche 25 nicht ausreichend war, um Unterschiede in dem langsamer ablaufenden Entzündungsprozess in Ackr2-defizienten Mäusen erfassen zu können. Dafür spräche, dass eine erhöhte Leukozyteninfiltration in Woche 25 bereits festgestellt werden konnte, eine vermehrte renale Inflammation und Fibrose und schließlich strukturelle Nierenschädigung bei den Ackr2-defizienten Mäusen jedoch eventuell noch nicht vorhanden war. Eine weitere Versuchsreihe mit verlängertem Beobachtungszeitraum z.B. bis Woche 52 könnte somit eine Charakterisierung möglicher nephroprotektiver ACKR2-Effekte in diesem Modell erlauben. Ergänzend könnte die funktionelle Relevanz von ACKR2 bei der diabetischen Nephropathie auch an weiteren Diabetes-Modellen untersucht werden. Ein möglicher Ansatz wäre, diabetische db/db Mäuse als etabliertes Modell eines Typ II-Diabetes zu untersuchen (Kobayashi et al. 2000). Nachteil wäre jedoch die Notwendigkeit, den Ackr2-Knockout in Mäuse mit genetischem db/db-Hintergrund langwierig über mehrere Generationen einkreuzen zu müssen. Dagegen könnten Untersuchungen von Ackr2-defizienten Mäusen in weiteren Diabetes-Modellen hilfreich sein, die widersprüchlichen Ergebnisse in den vorliegenden Arbeiten im STZ-induzierten Diabetesmodell und den OVE26-Mäusen aufzuklären.

Eine weitere Limitation der vorgelegten Arbeit stellt die Verwendung eines globalen Ackr2-Knockouts dar, der nicht die Untersuchung Zelltyp-spezifischer ACKR2-Funktionen, z.B. in Leukozyten oder Podozyten, erlaubt. Hier wären ergänzende Untersuchungen an Knochenmark-chimären Mäusen oder Zelltyp-spezifische Knockout-Mäuse, die bisher nicht verfügbar sind, notwendig gewesen. Untersuchung von Knockout-Mäusen ermöglicht zudem keine experimentelle Beurteilung der therapeutischen Relevanz; hier müssten Interventionsstudien mit ACKR2-Antagonisten oder Agonisten nach erfolgter Ausbildung der diabetischen Nierenschädigung durchgeführt werden.

In Anbetracht der klinischen Bedeutung der diabetischen Nephropathie und der Tatsache, dass dies eine weit verbreitete Erkrankung vor allem der Wohlstandsbevölkerung ist, wird die Notwendigkeit der Therapieausweitung und noch weiter gedacht der Heilung der diabetischen Nephropathie ersichtlich. Auch wenn in der vorgelegten Arbeit der atypische Chemokinrezeptor ACKR2 nicht als therapeutisches Zielmolekül progressionsverlangsamender Behandlungsansätze der diabetischen Nephropathie identifiziert werden konnte, ist angesichts der experimentellen Ergebnisse in anderen Nephropathiemodellen eine nephroprotektive Funktion von ACKR2 beim Diabetes nicht ausgeschlossen. Die oben

4. Diskussion

diskutierten Limitationen, des hier untersuchten diabetischen Nephropathiemodells, legen weiterführenden Studien an Diabetes-Modellen mit anderen Charakteristika wie beispielsweise der db/db-Maus nahe, um die pathophysiologische Funktion von ACKR2 auch hinsichtlich der zum Teil widersprüchlichen Daten in den verschiedenen Diabetesmodellen weiter aufzuklären. Experimentelle Interventionsstudien mit ACKR2-Antagonisten oder Agonisten, sofern in Zukunft verfügbar, wären hierfür zusätzlich hilfreich.

Literaturverzeichnis

Anders, H. J., Sayyed, S. A., & Vielhauer, V. (2010). Questions about chemokine and chemokine receptor antagonism in renal inflammation. *Nephron. Experimental nephrology*, 114(2), e33–e38. DOI: 10.1159/000254389.

Arastéh, K., Baenkler, H. W., Bieber, C., Brandt, R., Chatterjee, T. T., Dill, T., Ditting, T., Eich, W., Ernst, S., Fischli, S., Fleck, F., Füeßl, H., Hahn, J. H., Hamm, C., Harenberg, J., Herzog, W., Holstege, A., Huck, K., Keller, M., Klingmüller, D., Kowol, S., Kuck, K. H., Kähler, J., Köster, R., Loßnitzer, N., Löwe, B., Matzdorff, A., Müller-Tasch, T., Nienaber, C. A., Nikendei, C., Pausch, J., Petzsch, M., Sauer, N., Scherbaum, H., Schlehofer, B., Schmidt, M., Schneider, H., Schuchert, A., Schwab, M., Schäfer, J., Stocker, H., Teschner, A., Träder, C., Usadel, K. H., Veelken, R., Voll, R. E., Wißner, E., & Zeuzem S. (2013). Innere Medizin. (3., überarb. Aufl. Stuttgart). *George Thieme Verlag KG (Duale Reihe)*, 843-1022. DOI:10.1055/b-002-5209.

BD-Flow-Cytom-Learning-Guide (01 April, 2000). Introduction to flow Cytometry – A learning guide. *BD Biosciences*. Manual Part Number: 11-11032-01.
<https://docplayer.net/427097-Introduction-to-flow-cytometry.html>. [abgerufen 02.08.2023]

Bideak, A. (2017). Entzündungsbegrenzende Funktion des atypischen Chemokinrezeptors D6 bei der Immunkomplex-Glomerulonephritis. (*Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät*). DOI: 10.5282/edoc.21254.

Bideak, A., Blaut, A., Hoppe, J. M., Müller, M. B., Federico, G., Eltrich, N., Gröne, H. J., Locati, M., & Vielhauer, V. (2018). The atypical chemokine receptor 2 limits renal inflammation and fibrosis in murine progressive immune complex glomerulonephritis. *Kidney international*, 93(4), 826–841. DOI:10.1016/j.kint.2017.11.013.

Blackburn, P. E., Simpson, C. V., Nibbs, R. J., O'Hara, M., Booth, R., Poulos, J., Isaacs, N. W., & Graham, G. J. (2004). Purification and biochemical characterization of the D6 chemokine receptor. *The Biochemical journal*, 379(2), 263–272. DOI:10.1042/bj20031266.

Bonecchi, R., Borroni, E. M., Anselmo, A., Doni, A., Savino, B., Mirolo, M., Fabbri, M., Jala, V. R., Haribabu, B., Mantovani, A., & Locati, M. (2008). Regulation of D6 chemokine scavenging activity by ligand- and Rab11-dependent surface up-regulation. *Blood*, 112(3), 493–503. DOI:10.1182/blood-2007-08-108316.

Bucala, R., Spiegel, L. A., Chesney, J., Hogan, M., & Cerami, A. (1994). Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1(1), 71–81. PMID: 8790603.

Calogero, G., Papior, N. R., Bøggild, P., & Brandbyge, M. (2018). Large-scale tight-binding simulations of quantum transport in ballistic graphene. *Journal of physics. Condensed matter: an Institute of Physics journal*, 30(36), 364001. DOI:10.1088/1361-648X/aad6f1.

Chesney, J., Metz, C., Stavitsky, A. B., Bacher, M., & Bucala, R. (1998). Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 160(1), 419–425. PMID: 9551999.

Chow, F. Y., Ozols, E., Nikolic-Paterson, D. J., Atkins, R. C., & Tesch, G. H. (2004). Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. *Kidney international*, 65(1), 116–128. DOI:10.1111/j.1523-1755.2004.00367.x.

Chow, F. Y., Nikolic-Paterson, D. J., Ozols, E., Atkins, R. C., & Tesch, G. H. (2005). Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(6), 1711–1722. DOI:10.1681/ASN.2004070612.

Chow, F. Y., Nikolic-Paterson, D. J., Ozols, E., Atkins, R. C., Rollin, B. J., & Tesch, G. H. (2006). Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney international*, 69(1), 73–80. DOI:10.1038/sj.ki.5000014.

Cochain, C., Auvynet, C., Poupel, L., Vilar, J., Dumeau, E., Richart, A., Récalde, A., Zouggari, Y., Yin, K. Y., Bruneval, P., Renault, G., Marchiol, C., Bonnin, P., Lévy, B., Bonecchi, R., Locati, M., Combadière, C., & Silvestre, J. S. (2012). The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(9), 2206–2213. DOI:10.1161/ATVBAHA.112.254409.

Cooper, M. E., Mundel, P., & Boner, G. (2002). Role of nephrin in renal disease including diabetic nephropathy. *Seminars in nephrology*, 22(5), 393–398. DOI:10.1053/snep.2002.34724.

de Zeeuw, D., Bekker, P., Henkel, E., Hasslacher, C., Gouni-Berthold, I., Mehling, H., Potarca, A., Tesar, V., Heerspink, H. J., Schall, T. J., & CCX140-B Diabetic Nephropathy Study Group (2015). The effect of CCR2 inhibitor CCX140-B on residual albuminuria in patients with type 2 diabetes and nephropathy: a randomised trial. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 3(9), 687–696. DOI:10.1016/S2213-8587(15)00261-2.

Douglas-Denton, R., Moritz, K. M., Bertram, J. F., & Wintour, E. M. (2002). Compensatory renal growth after unilateral nephrectomy in the ovine fetus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 13(2), 406-410. DOI:10.1681/ASN.V132406

Epstein, P. N., Overbeek, P. A., & Means, A. R. (1989). Calmodulin-induced early-onset diabetes in transgenic mice. *Cell*, 58(6), 1067–1073. DOI:10.1016/0092-8674(89)90505-9.

Frei, U., & **Schober-Halstenberg** H.J. (2006). Nierenersatztherapie in Deutschland, Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2005-2006. QuaSi-Niere gGmbH: *Jahresbericht 2005 – 2006*. https://www.bundesverband-niere.de/wp/wp-content/uploads/2019/02/QuaSi-Niere-Bericht_2005-2006.pdf. [abgerufen am 03.05.2018].

Fujimura, N., Xu, B., Dalman, J., Deng, H., Aoyama, K., & Dalman, R. L. (2015). CCR2 inhibition sequesters multiple subsets of leukocytes in the bone marrow. *Scientific reports*, 5, 11664. DOI:10.1038/srep11664.

Graham G. J. (2009). D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *European journal of immunology*, 39(2), 342–351. DOI:10.1002/eji.200838858.

Graham, G. J., & **Locati**, M. (2013). Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6. *The Journal of pathology*, 229(2), 168–175. DOI:10.1002/path.4123.

Ihm, C. G., Park, J. K., Hong, S. P., Lee, T. W., Cho, B. S., Kim, M. J., Cha, D. R., & Ha, H. (1998). A high glucose concentration stimulates the expression of monocyte chemotactic peptide 1 in human mesangial cells. *Nephron*, 79(1), 33–37. DOI:10.1159/000044988.

Jamieson, T., Cook, D. N., Nibbs, R. J., Rot, A., Nixon, C., McLean, P., Alcami, A., Lira, S. A., Wiekowski, M., & Graham, G. J. (2005). The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. *Nature immunology*, 6(4), 403–411. DOI:10.1038/ni1182.

Literaturverzeichnis

Klinke, R., Pape, H.P., Kurtz, A., Silbernagl, S., Baumann, R., Brenner, B., Burckhardt, G., Draguhn, A., Ehmke, H., Eysel, U., Frandrey, J., Gekle, M., Gödecke, A., Kämmerer, U., Kelm, M., Korbmacher, C., Kühl, M., Kuschinsky, W., Luhmann, H. J., Mairbäurl, H., Meßlinger, K., Oberleithner, H., Paschke, R., Persson, P. B., Rieger, L., Schrader, J., Singer, D., Voigt, K., & Walzog, B. (Hg.) (2010). *Physiologie*. (6., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart). *George Thieme Verlag KG*, 327-412. DOI: 10.1055/b-002-46974

Kramann, R., Machado, F., Wu, H., Kusaba, T., Hoeft, K., Schneider, R. K., & Humphreys, B. D. (2018). Parabiosis and single-cell RNA sequencing reveal a limited contribution of monocytes to myofibroblasts in kidney fibrosis. *JCI insight*, 3(9), e99561. DOI:10.1172/jci.insight.99561

Kobayashi, K., Forte, T. M., Taniguchi, S., Ishida, B. Y., Oka, K., & Chan, L. (2000). The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding. *Metabolism: clinical and experimental*, 49(1), 22-31. DOI:10.1016/s0026-0495(00)90588-2.

Lee, E. Y., Chung, C. H., Khoury, C. C., Yeo, T. K., Pyagay, P. E., Wang, A., & Chen, S. (2009). The monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 loop, inducible by TGF-beta, increases podocyte motility and albumin permeability. *American journal of physiology. Renal physiology*, 297(1), F85-F94. DOI:10.1152/ajprenal.90642.2008.

Lux, M., Blaut, A., Eltrich, N., Bideak, A., Müller, M. B., Hoppe, J. M., Gröne, H. J., Locati, M., & Vielhauer, V. (2019). The Atypical Chemokine Receptor 2 Limits Progressive Fibrosis after Acute Ischemic Kidney Injury. *The American journal of pathology*, 189(2), 231–247. DOI:10.1016/j.ajpath.2018.09.016.

Mantovani, A., Bonecchi, R., & Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. *Nature reviews. Immunology*, 6(12), 907–918. DOI:10.1038/nri1964.

McKimmie, C. S., Singh, M. D., Hewit, K., Lopez-Franco, O., Le Brocq, M., Rose-John, S., Lee, K. M., Baker, A. H., Wheat, R., Blackbourn, D. J., Nibbs, R. J., & Graham, G. J. (2013). An analysis of the function and expression of D6 on lymphatic endothelial cells. *Blood*, 121(18), 3768–3777. DOI:10.1182/blood-2012-04-425314.

Literaturverzeichnis

Menne, J., Eulberg, D., Beyer, D., Baumann, M., Saudek, F., Valkusz, Z., Więcek, A., Haller, H., & Emapticap Study Group (2017). C-C motif-ligand 2 inhibition with emapticap pegol (NOX-E36) in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 32(2), 307–315. DOI:10.1093/ndt/gfv459.

Mulay, S. R., Eberhard, J. N., Pfann, V., Marschner, J. A., Darisipudi, M. N., Daniel, C., Romoli, S., Desai, J., Grigorescu, M., Kumar, S. V., Rathkolb, B., Wolf, E., Hrabě de Angelis, M., Bäuerle, T., Dietel, B., Wagner, C. A., Amann, K., Eckardt, K. U., Aronson, P. S., Anders, H. J., & Knauf, F. (2016). Oxalate-induced chronic kidney disease with its uremic and cardiovascular complications in C57BL/6 mice. *American journal of physiology. Renal physiology*, 310(8), F785–F795. DOI:10.1152/ajprenal.00488.2015.

Nam, B. Y., Paeng, J., Kim, S. H., Lee, S. H., Kim, D. H., Kang, H. Y., Li, J. J., Kwak, S. J., Park, J. T., Yoo, T. H., Han, S. H., Kim, D. K., & Kang, S. W. (2012). The MCP-1/CCR2 axis in podocytes is involved in apoptosis induced by diabetic conditions. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 17(1), 1–13. DOI:10.1007/s10495-011-0661-6.

Oremek, G. M., Passek, K., von der Eltz, V., Dröge, J., & Bendels, M. (2022). Die Biomarker TIMP-2 und IGFBP7 in der Diagnostik der Niereninsuffizienz. *Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergonomie* 72(4), 190–194. DOI: 10.1007/s40664-022-00472-y.

Panduru, N. M., Sandholm, N., Forsblom, C., Saraheimo, M., Dahlström, E. H., Thorn, L. M., Gordin, D., Tolonen, N., Wadén, J., Harjutsalo, V., Bierhaus, A., Humpert, P. M., Groop, P. H., & FinnDiane Study Group (2015). Kidney injury molecule-1 and the loss of kidney function in diabetic nephropathy: a likely causal link in patients with type 1 diabetes. *Diabetes care*, 38(6), 1130–1137. DOI:10.2337/dc14-2330.

Pill, J., Kraenzlin, B., Jander, J., Sattelkau, T., Sadick, M., Kloetzer, H. M., Deus, C., Kraemer, U., & Gretz, N. (2005). Fluorescein-labeled sinistrin as marker of glomerular filtration rate. *European journal of medicinal chemistry*, 40(10), 1056–1061. DOI:10.1016/j.ejmech.2005.03.020.

Pill, J., Issaeva, O., Woderer, S., Sadick, M., Kränzlin, B., Fiedler, F., Klötzer, H. M., Krämer, U., & Gretz, N. (2006). Pharmacological profile and toxicity of fluorescein-labelled sinistrin, a novel marker for GFR measurements. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 373(3), 204–211. DOI:10.1007/s00210-006-0067-0.

Literaturverzeichnis

Reich, B., Schmidbauer, K., Rodriguez Gomez, M., Johannes Hermann, F., Göbel, N., Brühl, H., Ketelsen, I., Talke, Y., & Mack, M. (2013). Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney international*, 84(1), 78–89. DOI:10.1038/ki.2013.84.

Rot, A., & von Andrian, U. H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annual review of immunology*, 22, 891–928. DOI:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543.

Rot, A., McKimmie, C., Burt, C. L., Pallas, K. J., Jamieson, T., Pruenster, M., Horuk, R., Nibbs, R. J. B., & Graham, G. J. (2013). Cell-autonomous regulation of neutrophil migration by the D6 chemokine decoy receptor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(12), 6450–6456. DOI:10.4049/jimmunol.1201429.

Savino, B., Castor, M. G., Caronni, N., Sarukhan, A., Anselmo, A., Buracchi, C., Benvenuti, F., Pinho, V., Teixeira, M. M., Mantovani, A., Locati, M., & Bonecchi, R. (2012). Control of murine Ly6C(high) monocyte traffic and immunosuppressive activities by atypical chemokine receptor D6. *Blood*, 119(22), 5250–5260. DOI:10.1182/blood-2011-10-388082.

Sayyed, S. G., Ryu, M., Kulkarni, O. P., Schmid, H., Lichtnekert, J., Grüner, S., Green, L., Mattei, P., Hartmann, G., & Anders, H. J. (2011). An orally active chemokine receptor CCR2 antagonist prevents glomerulosclerosis and renal failure in type 2 diabetes. *Kidney international*, 80(1), 68–78. DOI:10.1038/ki.2011.102.

Schock-Kusch, D., Sadick, M., Henninger, N., Kraenzlin, B., Claus, G., Kloetzer, H. M., Weiss, C., Pill, J., & Gretz, N. (2009). Transcutaneous measurement of glomerular filtration rate using FITC-sinistrin in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 24(10), 2997–3001. DOI:10.1093/ndt/gfp225.

Schreiber, A., Shulhevich, Y., Geraci, S., Hesser, J., Stsepankou, D., Neudecker, S., Koenig, S., Heinrich, R., Hoecklin, F., Pill, J., Friedemann, J., Schweda, F., Gretz, N., & Schock-Kusch, D. (2012). Transcutaneous measurement of renal function in conscious mice. *American journal of physiology. Renal physiology*, 303(5), F783-F788. DOI:10.1152/ajprenal.00279.2012.

Literaturverzeichnis

Sullivan, T. J., Miao, Z., Zhao, B. N., Ertl, L. S., Wang, Y., Krasinski, A., Walters, M. J., Powers, J. P., Dairaghi, D. J., Baumgart, T., Seitz, L. C., Berahovich, R. D., Schall, T. J., & Jaen, J. C. (2013). Experimental evidence for the use of CCR2 antagonists in the treatment of type 2 diabetes. *Metabolism: clinical and experimental*, 62(11), 1623–1632. DOI:10.1016/j.metabol.2013.06.008

Tashiro, K., Koyanagi, I., Saitoh, A., Shimizu, A., Shike, T., Ishiguro, C., Koizumi, M., Funabiki, K., Horikoshi, S., Shirato, I., & Tomino, Y. (2002). Urinary levels of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy. *Journal of clinical laboratory analysis*, 16(1), 1–4. DOI:10.1002/jкла.2057.

Tesch, G. H., & **Allen**, T. J. (2007). Rodent models of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton, Vic.)*, 12(3), 261–266. DOI:10.1111/j.1440-1797.2007.00796.x.

Tesch G. H. (2008). MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy. *American journal of physiology. Renal physiology*, 294(4), F697-F701. DOI:10.1152/ajprenal.00016.2008.

Tuttle K. R. (2005). Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 16(6), 1537–1538. DOI:10.1681/ASN.2005040393.

Tuttle, K. R., Bakris, G. L., Bilous, R. W., Chiang, J. L., de Boer, I. H., Goldstein-Fuchs, J., Hirsch, I. B., Kalantar-Zadeh, K., Narva, A. S., Navaneethan, S. D., Neumiller, J. J., Patel, U. D., Ratner, R. E., Whaley-Connell, A. T., & Molitch, M. E. (2014). Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference. *Diabetes care*, 37(10), 2864–2883. DOI:10.2337/dc14-1296.

Ulvmar, M. H., Hub, E., & Rot, A. (2011). Atypical chemokine receptors. *Experimental cell research*, 317(5), 556–568. DOI:10.1016/j.yexcr.2011.01.012.

Vielhauer, V., Eis, V., Schlöndorff, D., & Anders, H. J. (2004). Identifying chemokines as therapeutic targets in renal disease: lessons from antagonist studies and knockout mice. *Kidney & blood pressure research*, 27(4), 226–238. DOI:10.1159/000079867

Vielhauer, V., & **Anders**, H. J. (2009). Chemokines and chemokine receptors as therapeutic targets in chronic kidney disease. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 1(1), 1–12. DOI:10.2741/s1.

Literaturverzeichnis

Whitehead, G. S., Wang, T., DeGraff, L. M., Card, J. W., Lira, S. A., Graham, G. J., & Cook, D. N. (2007). The chemokine receptor D6 has opposing effects on allergic inflammation and airway reactivity. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175(3), 243–249. DOI:10.1164/rccm.200606-839OC.

Wu, J. L., Chiang, M. F., Hsu, P. H., Tsai, D. Y., Hung, K. H., Wang, Y. H., Angata, T., & Lin, K. I. (2017). O-GlcNAcylation is required for B cell homeostasis and antibody

Xia, Y., Entman, M. L., & Wang, Y. (2013). CCR2 regulates the uptake of bone marrow-derived fibroblasts in renal fibrosis. *PLoS one*, 8(10), e77493. DOI:10.1371/journal.pone.0077493

Yang, L., Brozovic, S., Xu, J., Long, Y., Kralik, P. M., Waigel, S., Zacharias, W., Zheng, S., & Epstein, P. N. (2011). Inflammatory gene expression in OVE26 diabetic kidney during the development of nephropathy. *Nephron. Experimental nephrology*, 119(1), e8–e20. DOI:10.1159/000324407.

You, H., Gao, T., Raup-Konsavage, W. M., Cooper, T. K., Bronson, S. K., Reeves, W. B., & Awad, A. S. (2017). Podocyte-specific chemokine (C-C motif) receptor 2 overexpression mediates diabetic renal injury in mice. *Kidney international*, 91(3), 671–682. DOI:10.1016/j.kint.2016.09.042

Zheng, S., Coventry, S., Cai, L., Powell, D. W., Jala, V. R., Haribabu, B., & Epstein, P. N. (2016). Renal Protection by Genetic Deletion of the Atypical Chemokine Receptor ACKR2 in Diabetic OVE Mice. *Journal of diabetes research*, 2016, 5362506. DOI:10.1155/2016/5362506.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an all diejenigen aussprechen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei:

Herrn *Prof. Dr. Volker Vielhauer*, meinem Doktorvater, der mich mit seinem Wissen und seiner Erfahrung durch die Jahre bis zum Abschluss dieser Arbeit geleitet hat. Vielen Dank für die Ideen, die Bereitstellung des Themas und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Danke für die großartige Unterstützung, die gute Betreuung und die zahlreichen Diskussionen.

Nuru Eltrich, der als Medizinisch-technischer Assistent mit seiner langjährigen Erfahrung der erste Ansprechpartner der gesamten Arbeitsgruppe ist. Vielen Dank für die vielen Stunden, die Geduld und die Arbeit, die zu dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Meine Mitdoktoranden der AG Vielhauer: *Alexander Blaut, Alexandra Lindenthal, Julia Krappe, Anja Wilkening, Moritz Lux* und *John Hoppe*; mit denen ich viele Stunden gemeinsam an der Bench verbracht habe und die nicht nur moralische, sondern auch arbeitstechnisch durch ihre Erfahrung eine große Unterstützung waren.

Julian Maschner, der für mich durch seine großartigen Laborkenntnissen so oft ein zuverlässiger Ansprechpartner war und mir so oft weiter geholfen hat.

Jessica Schmelcher, die mir durch ihre einzigartigen Deutschkenntnisse geholfen hat, kleine Stolperer in der deutschen Sprache auszubügeln.

Frau Dr. Ph.D. Stefanie Steiger, die auch mir, trotz ihrer Doktorandenschützlinge, so oft durch kritische Diskussionen und Erklärungen zielführende Hilfestellungen gegeben hat. Vielen Dank für dein Engagement und deine persönliche Wertschätzung.

Janina Mandelbaum, Dan Draganovici, die sich als Medizinisch-technische Assistenten um die histologischen Schnitte und Färbungen fachkundig gekümmert haben.

Yvonne Minor, die sich als Tierpflegerin liebevoll um das Wohl der Mäuse gekümmert hat.

AG Anders, die durch die zahlreichen Diskussionsrunden und Fortbildungen stetig für neuen Input und kritische Anregungen gesorgt haben.

Meiner Familie, der ich meine Arbeit widmen möchte. Sie hat immer an mich geglaubt und mich in so vielen Bereichen unterstützt. Danke vor allem an meinem Papa, der trotz seiner Fachfremde sich gewissenhaft eingearbeitet hat, um final noch einmal möglichst genau Korrektur zu lesen.

Eidesstattliche Versicherung

Manuela Maria Mertsch

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

Beeinflussung der diabetischen Nephropathie durch den atypischen
Chemokinrezeptor 2

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

Fürstenfeldbruck, 18.12.2023

Manuela Maria Mertsch

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin