

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

Identifizierung einer pathophysiologischen Rolle des Chemokinrezeptors CCR2 bei der fokal segmentalen Glomerulosklerose

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

vorgelegt von
Anja Wilkening
aus Traunstein

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: PD Dr. Michael Schmolke
PD Dr. Dieter Jenne
Prof. Dr. Ludger Klein

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

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2019

Ergebnisse dieser Promotionsarbeit wurden bereits in Abstractform und Originalartikeln veröffentlicht:

1. Wilkening A, Eltrich N, Luckow B, Vielhauer V. The chemokine receptor CCR2 mediates glomerular injury and interstitial fibrosis in focal segmental glomerulosclerosis. Abstract-USB-Stick Kongress für Nephrologie 2018. (10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 27.09.-30.09.2018. Freier Vortrag FV31)
2. Wilkening A, Eltrich N, Luckow B, Vielhauer V. Deficiency for the chemokine receptor CCR2 protects from glomerular injury and interstitial fibrosis in adriamycin-induced glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol. 2018; 29 (Abstract Suppl): 696 (Kidney Week 2018, American Society of Nephrology, San Diego 23.10.-28.10.2018. Poster FR-PO1058)
3. Wilkening A, Krappe J, Mühe AM, Lindenmeyer MT, Eltrich N, Luckow B, Vielhauer V. C-C chemokine receptor type 2 mediates glomerular injury and interstitial fibrosis in focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant. Epub 2018 Dec 28.

Identifizierung einer pathophysiologischen Rolle des Chemokinrezeptors CCR2 bei der fokal segmentalen Glomerulosklerose

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VI
Formelverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Verzeichnis im Text erwähnter Biomoleküle.....	VIII
Zusammenfassung	XI
Summary	XIII
1 Einleitung	1
1.1 Niereninsuffizienz als gesellschaftlich und wirtschaftlich bedeutsame Erkrankung	1
1.2 Physiologie der Niere	2
1.2.1 Renale Phagozyten-Populationen	4
1.3 Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS).....	5
1.3.1 Epidemiologie	6
1.3.2 Ätiologie	6
1.3.3 Pathologie.....	7
1.3.4 Therapie	9
1.4 Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei renaler Entzündung	10
1.4.1 Einteilung und Funktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren.....	10
1.4.2 Chemokin-vermittelte Leukozyteninfiltration	12
1.4.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren in Nierenerkrankungen.....	13
1.4.4 Der Chemokinrezeptor 2 (CCR2)	14
1.5 Therapeutische Perspektiven	15
2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	17
3 Material und Methoden	18
3.1 Geräte und Materialien	18
3.1.1 Tierhaltung.....	18
3.1.2 Durchflusszytometrie	18
3.1.3 ELISA	18
3.1.4 Glomerulusisolation	18
3.1.5 Histologie	18
3.1.6 PCR	18
3.1.7 Sonstige Geräte.....	19
3.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.9 Chemikalien	19
3.1.10 Puffer und Lösungen	22
3.1.11 Antikörper und Enzyme	23
3.1.12 Oligonukleotid-Primer für real-time PCR	24
3.1.13 Software	26
3.2 Tierexperimentelle Methodik	27
3.2.1 Tierhaltung.....	27
3.2.2 Versuchstiere.....	27
3.2.3 Injektionsnarkose bei Mäusen	28

3.2.4	Intravenöse Injektion von Adriamycin	28
3.2.5	Urin-, Blut- und Gewebeentnahme	29
3.3	Immunologische Methoden	30
3.3.1	Durchflusszytometrie	30
3.3.2	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA).....	36
3.3.3	Weitere kolorimetrische Untersuchungen.....	38
3.4	Glomerulus-Isolation.....	38
3.5	Histologische Untersuchungen.....	41
3.5.1	Aufbereitung des Nierengewebes und Herstellung histologischer Präparate	41
3.5.2	Histologische und immunhistologische Auswertung.....	43
3.6	Molekularbiologische Methoden	45
3.6.1	RNA Isolation.....	45
3.6.2	Umschreibung zu cDNA	46
3.6.3	Quantitative Real-time PCR	46
3.6.4	Weitere molekularbiologische Methoden.....	49
3.7	Statistische Methoden	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Glomeruläre Veränderungen im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie	50
4.2	Die Ccr2-defiziente Maus im Modell der Adriamycin-Nephropathie	52
4.2.1	Funktionelle Nierenparameter	52
4.2.2	Struktureller Schaden	54
4.2.3	Ccr2-Defizienz führt zu geringerer Expression renaler Chemokine	58
4.2.4	Ccr2-Defizienz vermindert die Infiltration inflammatorischer Zellen	61
4.2.5	Ccr2-Defizienz vermindert die renale Fibrose	67
5	Diskussion	71
5.1	In der murinen Adriamycin-Nephropathie als Modell der humanen FSGS wird Ccl2 induziert.....	71
5.2	CCL2 und CCR2 bei der diabetischen Nephropathie.....	73
5.3	Interpretation der Ergebnisse Ccr2-defizienter Tiere im Vergleich zum Wildtyp	74
5.3.1	Ccr2-Defizienz verbessert renale funktionelle Parameter in der Adriamycin-Nephropathie.....	74
5.3.2	Ccr2-Defizienz vermindert strukturellen Schaden	75
5.3.3	Ccr2-Defizienz vermindert die renale Akkumulation von Leukozyten	78
5.3.4	Ccr2-Defizienz vermindert renale Fibrose und Fibrozytenakkumulation	81
5.4	Konklusion und Ausblick.....	83
	Literaturverzeichnis	85
	Danksagung	101
	Eidesstattliche Versicherung	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere	3
Abbildung 2: CD11b- und CD11c-Expressionsmuster von renalen Phagozyten	5
Abbildung 3: Histopathologische Varianten der FSGS	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Chemokin-Rezeptor-Interaktion	12
Abbildung 5: Aufteilung des Nierengewebes	30
Abbildung 6: Durchflusszytometrische Gatingstrategie für die Gesamtnierenzellen ..	35
Abbildung 7: Gatingstrategie der Blutproben	36
Abbildung 8: Funktionsprinzip des Sandwich-ELISA	37
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Glomerulusisolierung nach Takemoto....	39
Abbildung 10: Histologische Darstellungen der Magnetisolierung	41
Abbildung 11: Glomerulosklerose im Verlauf der FSGS.....	51
Abbildung 12: Glomeruläre Expressionsveränderungen in der Adriamycin- Nephropathie	52
Abbildung 13: Funktionelle Nierenparameter.....	54
Abbildung 14: Beurteilung des glomerulären Schadens in der Adriamycin- Nephropathie	56
Abbildung 15: Beurteilung des tubulointerstitiellen Schadens in der Adriamycin- Nephropathie	58
Abbildung 16: Kompartimentspezifische Expression von Zytokinen und Zytokinrezeptoren in der Adriamycin-Nephropathie	60
Abbildung 17: Reduzierte Expression von Entzündungsmarkern an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie	61
Abbildung 18: Durchflusszytometrische Charakterisierung renaler Leukozyten an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie	63
Abbildung 19: Histologische Analyse der Infiltration von Leukozyten.....	65
Abbildung 20: Leukozyten im Blut.....	66
Abbildung 21: Fibrose in der Adriamycin-Nephropathie	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadien und Symptome der Niereninsuffizienz	1
Tabelle 2: Funktionen der Niere und Anwendungen der Nierenersatztherapie	2
Tabelle 3: Ursachen der FSGS.....	7
Tabelle 4: Risikofaktoren für ein Wiederauftreten der FSGS nach Transplantation ..	10
Tabelle 5: Verwendete Primer	24
Tabelle 6: Gewichtsadaptiertes Narkoseschema.....	28
Tabelle 7: Zellpopulation mit jeweiliger Antikörpermarkierung.....	34
Tabelle 8: Mastermixansatz für reverse Transkription	46
Tabelle 9: Zeitschema für die PCR.....	47
Tabelle 10: Expression von Ccr2 in den verschiedenen Phagozytenpopulationen ...	80

Formelverzeichnis

Formel 1: Errechnung der Konzentration isolierter RNA.....	45
Formel 2: Normalisierung des CT-Wertes des Zielgens auf den CT-Wert der rRNA	48

Abkürzungsverzeichnis

ADR	Adriamycin
APES	Ammoniumpersulfat
APC	Allophycocyanin
BM	Basalmembran
BSA	Bovines Serum-Albumin
BUN	Blood urea nitrogen, Blutharnstoff
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation
CT	Cycle threshold
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritic cell, dendritische Zelle
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESRD	End Stage Renal Disease, terminale Niereninsuffizienz
etc.	et cetera
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärts-Streulicht
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
i.p.	Intraperitoneal (Injektion)
IRI	Ischemia Reperfusion Injury, Ischämie-Reperfusionsschaden
i.v.	Intravenös (Injektion)
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

Verzeichnis im Text erwähnter Biomoleküle

KG	Körpergewicht
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	Messenger ribonucleic acid, messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl Beobachtungen
n.s.	Nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAS	Perjodsäure Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein cyan 5.5
RT-PCR	Realtime Polymerase Chain Reaction, Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Rounds per minute, Umdrehungszahl pro Minute
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid, ribosomale Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean
SSC	Seitwärts-Streulicht
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UUO	Unilaterale Ureterobstruktion
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vit	Vitamin
z.B.	zum Beispiel

Verzeichnis im Text erwähnter Biomoleküle

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Arg1	Arginase
α -SMA	α -smooth muscle actin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
Ccl2/Mcp1	chemokine (CC motif) ligand 2

Verzeichnis im Text erwähnter Biomoleküle

Ccl3	chemokine (CC motif) ligand 3
Ccl4	chemokine (CC motif) ligand 4
Ccl5/Rantes	chemokine (CC motif) ligand 5
Ccl7	chemokine (CC motif) ligand 7
Ccl8	chemokine (CC motif) ligand 8
Ccl11	chemokine (CC motif) ligand 11
Ccl12	chemokine (CC motif) ligand 12
CCL13	chemokine (CC motif) ligand 13
Ccl16	chemokine (CC motif) ligand 16
Ccl26	chemokine (CC motif) ligand 26
Ccr1	chemokine (CC motif) receptor 1
Ccr2	chemokine (CC motif) receptor 2
Ccr5	chemokine (CC motif) receptor 5
Cd31	auch: Pecam1, platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
Cxcl1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Cxcl10/lp10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Cxcr1	chemokine (C-X-C motif) receptor 1
F4/80	auch: Adgre1, adhesion G protein-coupled receptor E1
Fsp	Fibroblastenspezifisches Protein
Fibronectin	-
Fizz1	auch: Retnla, resistin like alpha
Kim-1	kidney injury molecule
Ifn- γ	Interferon- γ
Il6	Interleukin 6
Il10	Interleukin 10
Il12- β	Interleukin 12- β
iNos	auch: Nos2, nitric oxide synthase 2
Laminin	-
LDL	low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6c	lymphocyte antigen 6 complex, locus c
Ly6g	lymphocyte antigen 6 complex, locus g
MAPK	mitogen activated proteinkinase
Mrc1	mannose receptor, C type 1

Verzeichnis im Text erwähnter Biomoleküle

Msr1	macrophage scavenger receptor 1
Ngal	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin
Prokollagen4- α	-
Prokollagen1	-
Prokollagen2	-
Prokollagen3	-
Tnf	Tumornekrosefaktor
Tnfr1	Tumornekrosefaktorrezeptor 1
Tnfr2	Tumornekrosefaktorrezeptor 2
Tgf- β	transforming growth factor - β
Ym1	auch: Chi3, chitinase-like 3

Zusammenfassung

Heutzutage sind ca. 90% der Fälle chronischer Niereninsuffizienz im Endstadium auf primär glomeruläre Nephropathien zurückzuführen. Meist steht ein direkter oder indirekter Podozytenschaden am Beginn der Erkrankung, welcher zu einer glomerulären Vernarbung (Glomerulosklerose) führt. In frühen Stadien sind hierbei zunächst teilweise geschädigte Bereiche in einzelnen betroffenen Glomeruli zu beobachten (fokal segmentale Glomerulosklerose, FSGS). Klinisch äußert sich die FSGS mit Proteinurie im nephrotischen Bereich, in späteren Stadien kommt es oft zur terminalen Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit.

Immunologische Mechanismen spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Progression der Glomerulosklerose. Renale Zellen sezernieren nach inflammatorischer Aktivierung chemotaktische Zytokine (Chemokine), die nach Bindung an korrespondierende Chemokin-Rezeptoren zur Einwanderung von Leukozyten in geschädigtes Gewebe führen. In der Vergangenheit wurden einige dieser Moleküle als therapeutische Zielstrukturen identifiziert. Die Blockade verschiedener Chemokine bei glomerulären Erkrankungen führt tierexperimentell zu verminderter Leukozyteninfiltration und geringerem strukturellen und funktionellem Nierenschaden. In vitro-Experimente zeigten, dass in isolierten Glomeruli zum Beispiel nach Stimulation mit TNF- α die Expression zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren induziert wird. Am stärksten exprimiert wird hierbei interessanterweise das Chemokin CCL2 (auch: MCP1), das vor allem Chemotaxis und Aktivierung von Makrophagen bewirkt. Makrophagen exprimieren den korrespondierenden Rezeptor CCR2. Die Bindung von CCL2 an den Chemokinrezeptor vermittelt die Migration von Monozyten und Makrophagen in geschädigtes Gewebe und trägt so zur renalen Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung bei. Entsprechend führt eine pharmakologische Blockade von CCL2 bei der murinen Glomerulonephritis, der Lupus-Nephritis sowie eine Ccl2-Defizienz bei Mäusen mit diabetischer Nephropathie zu einer Besserung der Erkrankung. Ebenso wurde durch pharmakologische Blockierung von CCR2 eine Verminderung des diabetischen Nierenschadens nachgewiesen.

Interessanterweise exprimieren nicht nur die oben genannten Leukozytenpopulationen den Chemokinrezeptor CCR2, sondern auch glomeruläre Podozyten. Deren initiale Schädigung ist für die Entstehung einer FSGS entscheidend. Die Stimulation der CCL2/CCR2-Achse kann Podozyten inflammatorisch aktivieren, ihre Apoptose

Zusammenfassung

induzieren und ihre Motilität steigern. Durch Podozytenverlust tritt ein Funktionsverlust der glomerulären Filtrationsbarriere auf, es kommt zur Proteinurie.

In Zusammenschau stellt der CCR2-Rezeptor daher ein vielversprechendes Zielmolekül eines dualen Therapieansatzes glomerulärer Erkrankungen dar. Seine Blockade könnte einerseits durch Verminderung der renalen Leukozyteninfiltration entzündungsbegrenzend wirken und zusätzlich direkte protektive Effekte auf Podozyten vermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Auswirkung einer Ccr2-Defizienz auf den Verlauf der FSGS untersucht. Hierzu wurden zunächst Analysen von Glomeruli an Tag 7, 14 und 28 der Adriamycin-Nephropathie durchgeführt, einem etablierten Mausmodell der primären FSGS. Hierbei zeigten sich eine progrediente Glomerulosklerose, die mit Verlust von glomerulärem Nephtrin als Zeichen eines Podozytenschadens sowie einer Induktion der glomerulären Chemokinexpression von CCL2 und CCL5 einherging. Anschließend wurde die Adriamycin-Nephropathie in Wildtyp- und Ccr2-Knock-out-Mäusen induziert. Nach vier Wochen wurde der Phänotyp hinsichtlich Proteinurie, funktionellen Parametern und allgemein strukturellem sowie podozytärem Schaden evaluiert. Hierbei zeigte sich ein abgeschwächter Verlauf der Adriamycin-Nephropathie bei Ccr2-Defizienz. Die Ccr2-defizienten Mäuse wiesen eine deutlich reduzierte Proteinurie, eine verbesserte Nierenfunktion und einen signifikant geringeren strukturellen Nierenschaden auf. Zudem zeigte sich eine verminderte renale Leukozyteninfiltration, insbesondere inflammatorischer Makrophagen sowie eine geringere renale Entzündungsreaktion. Des Weiteren waren die Anzahl renaler Myofibroblasten und die renale Akkumulation von Fibrozyten aus dem Knochenmark in der Ccr2-defizienten Gruppe vermindert. Auch die renale mRNA-Expression von Fibroblastenmarkern und extrazellulären Matrixmolekülen war in der Ccr2-defizienten Gruppe an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie vermindert.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine pathophysiologische Bedeutung von CCR2 bei der FSGS hin. Eine Blockade von CCR2 könnte daher auch eine Behandlungsstrategie bei der humanen FSGS darstellen.

Summary

CC chemokines mediate leukocyte infiltration into inflamed tissue. We have shown that CCL2 is one of the most prominently induced chemokines in glomeruli after stimulation with TNF. Its corresponding receptor CCR2 is expressed in monocytes and macrophages and mediates infiltration of these cells into injured and inflamed tissues. Moreover, podocytes express CCR2 and CCR2 signalling can induce podocyte apoptosis and increases protein permeability of the glomerular sieve. Blockade of CCR2 is protective in glomerular diseases like lupus nephritis and diabetic nephropathy. However, it is not known whether *Ccr2* deficiency or *Ccr2* blockade has a beneficial effect on progressive renal injury in focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). We therefore studied the phenotype of *Ccr2*-deficient mice in a murine model of adriamycin-induced FSGS with nephrotic syndrome and progressive interstitial inflammation and fibrosis. Progressive FSGS was induced in 9 week-old male BALB/c wild-type and *Ccr2*-deficient mice by two intravenous injections of adriamycin (11.5 mg/kg) at day 0 and 14, respectively. Initially, we analyzed expression of glomerular damage markers and inflammatory mediators in paramagnetically isolated glomeruli of wild-type mice exposed to adriamycin compared to saline-treated controls on day 7, 14 and 28 after the initial adriamycin injection. Furthermore, we assessed renal functional parameters, structural alterations, chemokine expression, and renal leukocyte infiltration in wild-type and *Ccr2*-deficient mice on day 28 of adriamycin nephropathy using ELISA, morphometry, immunohistochemistry, flow cytometry and RT-PCR.

In isolated glomeruli of adriamycin-treated mice we found a significant decrease in nephrin and increased expression of the chemokines *Ccl2* and *Ccl5*. The nephrotic syndrome was ameliorated in *Ccr2*-deficient mice with FSGS on day 28, as indicated by significantly reduced albuminuria and cholesterolemia compared to wild-type. In addition, *Ccr2* deficiency reduced renal functional impairment. PAS staining revealed decreased glomerulosclerosis in *Ccr2*-deficient mice with FSGS. Renal leukocyte infiltration also decreased in the *Ccr2*-deficient group, in particular renal accumulation of *Ccr2*-positive inflammatory macrophages. Consistently, renal inflammation was reduced in *Ccr2* deficient kidneys. Additionally, numbers of renal myofibroblasts and renal accumulation of bone marrow-derived fibrocytes was reduced in the *Ccr2*-deficient group compared to the wild-type. Consistently, renal m-RNA-expression of fibroblast

Summary

markers and extracellular matrix molecules was reduced in *Ccr2*-deficient mice at day 28 of adriamycin nephropathy.

In summary, these results identify a functional role for CCR2 in FSGS. Thus, blockade of CCR2 may be a potential therapeutic strategy in FSGS which can reduce glomerular injury and secondary fibrotic remodelling in diseased kidneys.

1 Einleitung

1.1 Niereninsuffizienz als gesellschaftlich und wirtschaftlich bedeutende Erkrankung

Die chronische Niereninsuffizienz ist ein häufiges internistisches Krankheitsbild. Im Jahr 2013 wurden ca. 80 000 terminal niereninsuffiziente, und dadurch dialysepflichtige Patienten in Deutschland verzeichnet [1], die Inzidenz ist jedoch rasch steigend. Nach der Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) ist die chronische Niereninsuffizienz als Nierenschaden, der über drei Monate andauert, definiert. Entscheidendes Insuffizienz Kriterium ist die glomeruläre Filtrationsrate (siehe Tabelle 1). Daneben fließen histologische bzw. strukturelle Veränderungen ein.

Tabelle 1: Stadien und Symptome der Niereninsuffizienz
in Abhängigkeit von der glomerulären Filtrationsrate (GFR)

Stadium	GFR in ml/min	Symptome
1	>90	Proteinurie
2	60-89	Proteinurie
3	30-59	Hypertonus, Leistungsminderung, Anstieg harnpflichtiger Stoffe im Blut
4	15-29	Ödeme, Nausea, Emesis, renale Anämie
5	<15	Dialysepflichtigkeit

Zu den Hauptursachen zählen sowohl primäre Nierenerkrankungen als auch sekundäre Nierenveränderungen im Rahmen von Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Hypertonus, Kollagenosen, Vaskulitiden, Infektionen, etc. [2]. Von diesen sekundären Faktoren sind einerseits viele Menschen im mittlerem bis hohen Lebensalter betroffen. Es gibt jedoch andererseits viele Kinder und junge Patienten, die durch Medikamentennebenwirkung, Zystennieren oder idiopathische Formen von Nierenerkrankungen schon früh eine Einschränkung der Nierenfunktion mit Dialysepflicht erleiden. Klinisch äußert sich die Niereninsuffizienz je nach Stadium in Abgeschlagenheit, Pruritus, Polyneuropathie, Ödemen, therapierefraktärer Hypertonie, Enzephalopathie, bis hin zu urämischem Koma (siehe Tabelle 1) [3]. Diese Symptome führen zu einer empfindlichen Einschränkung der Lebensqualität für die Patienten. Neben diesen individuellen Folgen ist die Bedeutung der Niereninsuffizienz auch volkswirtschaftlich schwerwiegend. Die Versorgung der in Deutschland betroffenen Patienten benötigte im Jahr 2015 ca. drei Milliarden Euro [4]. In den USA verursacht die Behandlung der

chronischen Niereninsuffizienz jährliche Kosten von etwa 20 Milliarden Dollar [2]. Die Nierenersatztherapie mittels Dialyse nimmt hiervon pro Patient jährlich 40.000 Euro ein. Mit 18 000 Euro pro Jahr und Patient ist die Nierentransplantation im Vergleich die ökonomisch effizienteste Therapie dieser Patienten [5] .

1.2 Physiologie der Niere

Die Niere übt verschiedene Funktionen aus. Dazu gehören einerseits Ausscheidung und Metabolismus von körpereigenen harnpflichtigen Stoffen und Fremdstoffen wie Pharmaka und Noxen. Andererseits hat sie zusammen mit anderen Organsystemen Einfluss auf unterschiedliche Bereiche der Homöostase. Hierzu zählen die Regulation des Wasserhaushalts und Blutvolumens und damit des Blutdrucks, die Regulation von Elektrolyten, Säuren und Basen und der Hämatopoese. Dies geschieht beispielsweise durch die Produktion bzw. Bildung von Hormonen wie Calcitriol und Erythropoetin (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Funktionen der Niere und Anwendungen der Nierenersatztherapie

Funktion	Folgen der Niereninsuffizienz	Therapie
Entgiftung	Urämie	Dialyse
Säure-Base-Haushalt	Azidose	Dialyse Alkalisierung
Elektrolyt-Haushalt	Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie Sek. Hyperparathyreoidismus	Dialyse Diuretika Phosphatbindner
Wasserhaushalt	Ödeme Hypertonie	Dialyse Diuretika, Antihypertensiva
Erythropoietinproduktion	Renale Anämie	Gabe eines rekombinanten Analogons
Hydroxilierung von Calcidiol zu Calcitriol	Vit-D-Mangel	Gabe von Calcitriol
Reninproduktion	Hypertonie	Antihypertensiva

Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Es besteht aus einem Glomerulus (Nierenkörperchen) mit zugehöriger Bowman-Kapsel und dem Tubulussystem. Jede Niere enthält ca. eine Million dieser kleinsten Einheiten [6]. Hier werden täglich 180 Liter Blutplasma filtriert. Essentiell für diesen Vorgang ist die Blut-Harn-Schranke. Sie grenzt das Blutgefäßsystem vom Bowman-Kapselraum und dem nachgeschalteten Tubulussystem ab und schafft eine Barriere mit selektiver Durchlässigkeit zwischen Blut und Primärharn. Diese glomeruläre Filtrationsbarriere wird vom Kapillarepithel,

Einleitung

der glomerulären Basalmembran und den Fußfortsätzen der Podozyten gebildet (siehe Abbildung 1). Jede dieser drei Schichten hat eine unterschiedliche Durchlässigkeit für Moleküle.

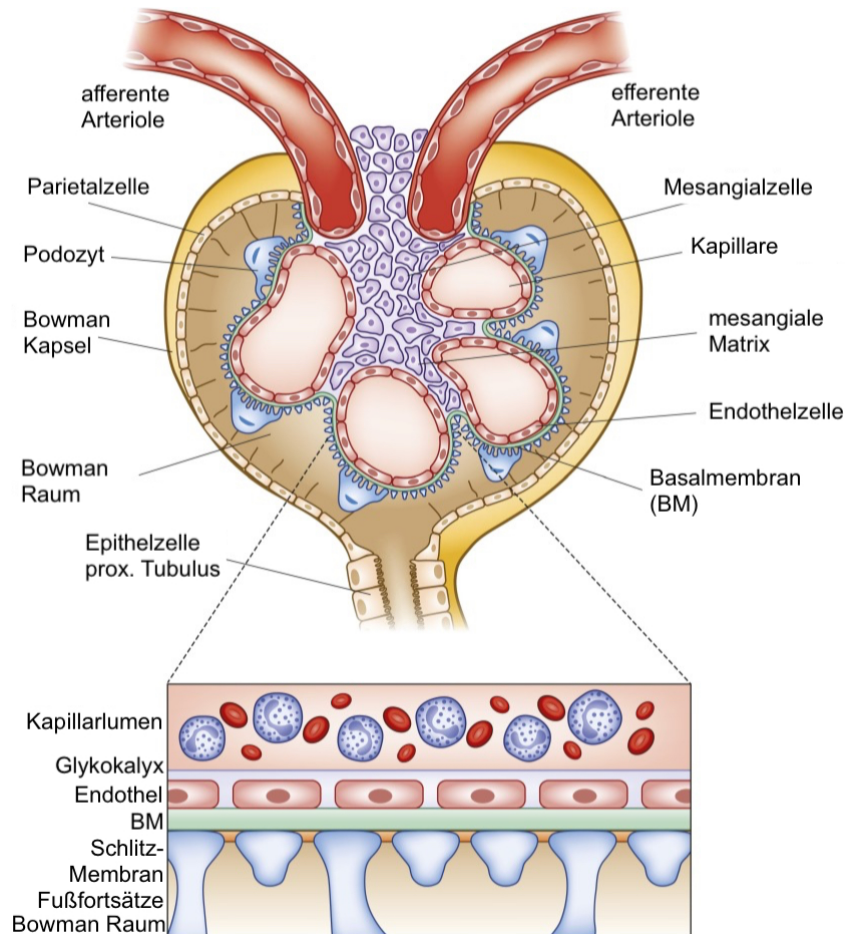


Abbildung 1: Aufbau der glomerulären Filtrationsbarriere
modifiziert nach [7]

Das gefensterete Endothel der glomerulären Kapillaren hat eine Porengröße von 50-100 nm und hält hauptsächlich zelluläre Blutbestandteile zurück. Die glomeruläre Basalmembran besteht aus endothelialen und podozytären Anteilen und ist undurchlässig für Makromoleküle mit einer Größe über 25 nm. Die limitierende und letztendlich ausschlaggebende Barriere (<5 nm) wird von Podozyten gebildet. Ihre benachbarten Fußfortsätze sind durch die Schlitzmembran verbunden, die vor allem durch das Protein Nephrin gebildet wird. Die Fußfortsätze bilden auf der dem Urin zugewandten Seite der glomerulären Filtrationsbarriere eine in sich verzahnte Schicht, die den glomerulären Kapillaren aufliegt. Sie haben Charakteristika von *tight*, *adhesion*, *gap*, und

neuronal junctions, um der Beanspruchung durch Filtration von Makromolekülen, hohen Drücken und Scherkräften standzuhalten. Die Anpassung an Umgebungsänderungen wird hierbei über das Aktin-Zytoskelett vermittelt. Zusätzlich sezernieren Podozyten *vascular endothelial growth factor A* (VEGF-A). Hierüber nehmen sie Einfluss auf die glomeruläre Homöostase und parakrin auf die benachbarten Endothelzellen [8-10].

Neben der Molekülgröße hat außerdem die elektrische Ladung einen Einfluss auf die Filtration. Die glomeruläre Filtrationsbarriere hat durch die Expression von Proteoglykanen eine deutlich negative Ladung. Dementsprechend werden negative Moleküle, beispielsweise Plasmaproteine, durch elektrostatische Abstoßung am Übertritt in den Primärharn gehindert [11].

1.2.1 Renale Phagozyten-Populationen

Makrophagen spielen eine wichtige pathophysiologische Rolle im Rahmen renaler Schädigung und Fibrose. Sie vermitteln einerseits die Initialisierung und Aufrechterhaltung der Entzündung, andererseits erfüllen sie wichtige Funktionen im Rahmen der anschließenden Resolutionsphase, in dem sie immunregulatorisch die Entzündungsreaktion terminieren und Geweberegeneration induzieren können.

Die Zellpopulation der Makrophagen hat eine hohe Heterogenität und Plastizität. Dem System der mononukleären Phagozyten (MPS) gehören Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen an [12, 13]. Die verschiedenen Phagozytenpopulationen werden unterschiedlich klassifiziert, beispielsweise als M1- und M2-Population. Die aktivierten, iNOS-positiven M1-Makrophagen haben proinflammatorische Wirkung. iNOS ist eine Stickstoffmonoxid-Synthase, die insbesondere durch proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- α induziert wird.

Diese entzündungsfördernden Eigenschaften macht ihre Elimination zu einem potentiellen therapeutischen Ansatz. Die aktivierten M2 Makrophagen sollen hingegen hauptsächlich regenerative Effekte vermitteln und ausschlaggebend für die postinflammatorische Wundheilung und den fibrotischen Gewebeumbau sein. Sie sezernieren antiinflammatorische Zytokine wie *Transforming Growth Factor β* (TGF- β) und sind unter anderem durch Expression von Mannose-Rezeptor und Arginase charakterisiert [13]. Der Großteil der Makrophagen nimmt jedoch aufgrund ihrer hohen Plastizität unter Einfluss des lokalen Gewebemilieus vermutlich Phänotypen mit wechselndem Anteil von M1- und M2-Charakteristika an. Kawakami et al. entwickelten einen Ansatz, mononukleäre Phagozytenpopulationen der Niere in fünf umschriebene Populationen

zu unterteilen (Abbildung 2) [14]. Die Unterscheidung erfolgte aufgrund verschiedener Gen- und Oberflächenantigenexpressionsmustern, hauptsächlich der CD11b- und CD11c-Expression, aber auch F4/80, CD103, CD14, CD16 und CD64 in der Durchflusszytometrie. Im Rahmen dieser Einteilung konnten unterschiedliche proinflammatorische und immunregulierende Funktionen dieser Subpopulationen beschrieben werden.

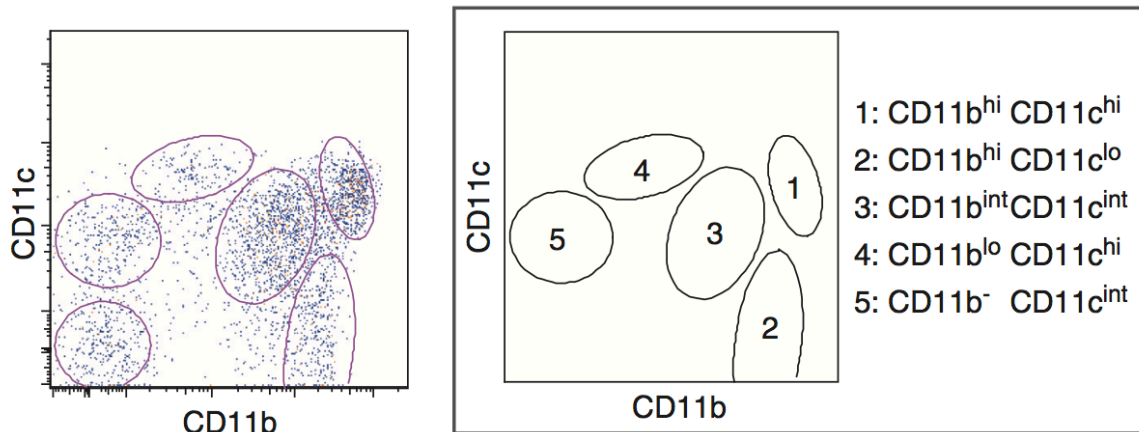


Abbildung 2: CD11b- und CD11c-Expressionsmuster von renalen Phagozyten in der Durchflusszytometrie [14]

Jede dieser Populationen besitzt in unterschiedlich starker Ausprägung phagozytäre, d.h. Makrophagen-Merkmale und Antigen-präsentierende, d.h. dendritische Zellmerkmale. Den ersten beiden dieser Subpopulationen, diejenigen mit der höchsten phagozytären Potenz, konnten Eigenschaften von M1-Makrophagen zugeordnet werden, die Subpopulationen 3 und 4 gehören hingegen den M2-Makrophagen an. Die Funktion der fünften Population bleibt unklar, vermutlich stellen sie eine Art dendritischer Zellen dar [15-17]. Besonders die CD11b^{hi} CD11c^{hi} (Population 1) und CD11b^{hi} CD11c^{lo} (Population 2) positiven Zellpopulationen exprimieren in größerem Ausmaß den proinflammatorischen Chemokinrezeptor CCR2. Interessanterweise exprimieren genau diese Populationen nach Stimulation mit LPS am stärksten proinflammatorische Chemokine und sind wie o.g. als inflammatorisch anzusehen [14]. Somit liegen besonders sie im Fokus therapeutischer Überlegungen.

1.3 Fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS)

Eine anhaltende Podozytenschädigung oder glomeruläre Entzündung führt zu einem narbigen Umbau der Glomeruli, der Glomerulosklerose. Diese Vernarbung beginnt

regelmäßig fokal in einzelnen Glomeruli und betrifft zunächst nur segmental einzelne Abschnitte des Glomerulus. Hieraus ergibt sich histopathologisch das typische Bild der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS). Bei anhaltender Schädigung kann diese im Verlauf diffus alle Glomeruli betreffen, die letztendlich komplett (global) sklerosieren.

1.3.1 Epidemiologie

In den USA liegt 5-20% der glomerulosklerotischen Nierenschäden eine fokal segmentale Glomerulosklerose (FSGS) zu Grunde. Damit ist die FSGS die häufigste primäre Ursache für terminales, dialysepflichtiges Nierenversagen. Meist führt die Erkrankung innerhalb von 5-10 Jahren zur Niereninsuffizienz [18]. Die Prävalenz der FSGS ist stark, derzeit um das bis zu 13-fache, steigend [19]. Die Ursache hierfür ist noch weitestgehend unbekannt, ein Erklärungsansatz ist die Zunahme von Übergewichtigkeit in Industrienationen wie beispielsweise der USA [20].

1.3.2 Ätiologie

Die FSGS ist sowohl klinisch als auch pathologisch ein sehr heterogenes Schädigungsmuster [21]. Der FSGS ist oftmals keine eindeutige Ursache zuordenbar. Generell gibt es genetische, adaptive, virus-assoziierte und medikamenteninduzierte Formen. Häufig tritt die FSGS jedoch auch idiopathisch auf (siehe Tabelle 3) [19].

Tabelle 3: Ursachen der FSGS
nach [22]

Idiopathische/ primäre FSGS	Immunologische Faktoren	Ursache unbekannt, fragl. zirkulierende Permeabilitätsfaktoren und genetische Disposition
Sekundäre FSGS	Familiär	a. Mutationen, v.a. in Strukturproteinen b. Mitochondriale Zytopathien
	Virusassoziiert	a. HIV-assoziiert b. Parvovirus B19
	Medikamentös	a. Heroin b. Interferon- α c. Lithium d. Pamidronate/Alendronate e. Anabole Steroide
	Reaktiv durch Glomerulus-Hypertrophie oder Hyperfiltration	a. normales Nierengewicht - Diabetes mellitus - Hypertension - Adipositas - Zyanotische Herzfehler - Sichelzellanämie b. erniedrigtes Nierengewicht - Oligomeganephronie - Unilaterale Nierenagenesie - Nierendysplasie - Kortikale Nekrose - Refluxnephropathie - chirurgische Nieren-Ablatio - Chronische Abstoßungsreaktion - jede chronische Nierenerkrankung, die mit einer Reduktion funktionsfähiger Nephrone einhergeht
	Maligne Lymphome	
Nicht-spezifische FSGS-Läsionen infolge chronischer glomerulärer Erkrankungen		a. Fokal proliferative Glomerulonephritiden (IgA-Nephritis, Lupus-Nephritis, pauci-immun Glomerulonephritis) b. Hereditäre Nephritiden (Alport Syndrom) c. Membranöse Glomerulopathie d. Thrombotische Mikroangiopathie

1.3.3 Pathologie

Histomorphologisch umfasst die FSGS fünf Varianten: die kollabierende, zelluläre, perihiläre, mit Läsionen an der Glomerulus-Spitze und nicht näher bezeichnete FSGS, welche in Abbildung 3 dargestellt sind.

In der Vergangenheit konnte die Bedeutung der podozytären Schädigung für die Entstehung und die Progression von Glomerulopathien, insbesondere der FSGS ermittelt werden [23]. Unter Zellstress oder inflammatorischer Aktivierung kommt es zur Ablösung der podozytären Fußfortsätze von der Basalmembran bis hin zum Zelltod. Durch

Einleitung

die Schädigung der Filtrationsbarriere des Glomerulus kommt es so zu einer gesteigerten Durchlässigkeit für Proteine. Diese Vorgänge sind assoziiert mit einer Induktion von TGF- β , einem profibrotischen Mediator, und Endothelin 1 (EDN1), einem hochpotent vasoaktiven Peptidhormon, was parakrin Endothelzellen beeinflusst und endotheliale Dysfunktion nach sich zieht [8]. Es zeigt sich glomerulär eine Vermehrung der extrazellulären Matrix, Verdickung der Basalmembran und eine Ausdehnung des Mesangiums. Zusätzlich bewirken Kapillarkollaps und Verklebungen zwischen Kapillarschlingen und Bowman-Kapsel eine Störung der Filtration und letztendlich den Untergang des ganzen zugehörigen Nephrons [24, 25].

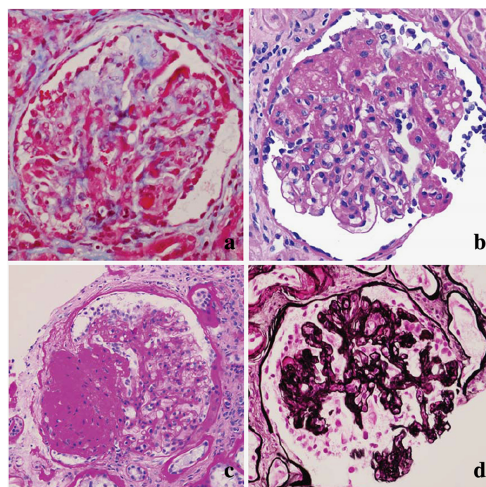


Abbildung 3: Histopathologische Varianten der FSGS

In Folge der Schädigung kommt es zu narbigem Umbau mit Vermehrung der extrazellulären Matrix zwischen den Kapillarschlingen und schließlich zu deren Kollaps und Verödung. **a** Anhaftung von Kapillarschlingen an die Bowman-Kapsel als Ausgangspunkt für die FSGS (Trichrom-Färbung), **b** FSGS mit hyalinen Ablagerungen (PAS-Färbung), **c** segmentale Konsolidierung (<50%) als typische Läsion der nicht näher bezeichneten FSGS (PAS-Färbung), **d** kollabierende FSGS mit charakteristischen segmentalen bzw. globalen Veränderungen der Podozyten und Kapillarschlingen (Jones Methenamin Silberfärbung) aus [26]

Das Interstitium ist sekundär ebenfalls von der Fibrosierung betroffen [27]. Die in der Niere akkumulierenden Makrophagen sezernieren proinflammatorische Chemokine und Zytokine, Sauerstoffradikale und Arachidonsäurederivate, welche zusätzlich schädigend auf das umliegende Gewebe wirken [21]. Durch die Zerstörung der glomerulären Filtrationsbarriere kommt es zur Ausschwemmung der proinflammatorischen Mediatoren mit dem Primärfiltrat in das Tubulus-System und hämatogen in das Interstitium. Die so aktivierten Tubulusepithelzellen führen durch parakrine Stimulation mit proinflammatorischen Mediatoren zu einer weiteren Verstärkung der Entzündung im Tubulointerstitium. Diese gegenseitige Stimulation von Nierenzellen und Leukozyten bedingt das Fortschreiten der Nierenschädigung. Zu Beginn sind diese Veränderungen auf einzelne glomeruläre Segmente (segmental) und umschriebene Teile der Niere

(fokal) begrenzt. Bei weiterer Progredienz können sie jedoch auch global auftreten [18].

Die Prognose der FSGS ist abhängig von ihrer Ätiologie, dem Therapieansprechen und verschiedenen Risikofaktoren. Hierzu gehören einerseits das Ausmaß des Serum-Kreatinin-Anstiegs, der globalen Sklerose und des tubulointerstitiellen Schadens bei Diagnosestellung. Andererseits ist auch die histopathologische Variante prognosebestimmend. Hierbei zeigt die kollabierende Variante die schwerste glomeruläre und tubulointerstitielle Beteiligung. Zudem ist der größte Anteil der Patienten mit dieser Variante der FSGS bereits bei Diagnosestellung niereninsuffizient und das Risiko der Entwicklung einer Dialysepflichtigkeit ist am größten. Die Remissionswahrscheinlichkeit ist verglichen mit den anderen Varianten am geringsten. Im Gegensatz dazu haben Patienten mit prädominanten Läsionen an der Glomerulusspitze eine hohe Remissionsrate und entwickeln selten eine terminale Niereninsuffizienz [28, 29].

Die fortschreitende glomeruläre Vernarbung äußert sich klinisch in Form eines nephrotischen Syndroms mit Proteinurie, Hypoalbuminämie, Hyperlipidämie und peripheren Ödemen. Hinzu kommen im Verlauf die oben genannten Symptome der chronischen Niereninsuffizienz.

1.3.4 Therapie

Die derzeit etablierte Therapie der FSGS besteht aus den beiden Säulen supportive Behandlung und Immunmodulation. Die supportive Therapie beinhaltet die Behandlung sekundärer, die Nierenfunktion weiter einschränkender Prozesse und die Verbesserung der Lebensqualität der Patienten [30]. Sie beinhaltet die Behandlung mit Diuretika, ACE-Hemmern oder Angiotensinrezeptor-Blockern und Lipidsenkern.

Chronische Niereninsuffizienz hat, unabhängig von ihrer Ursache, immer eine inflammatorische Komponente. Deren Ausmaß korreliert positiv mit der Progression der Erkrankung und dem Funktionsverlust [31]. Dies bildet die Rationale für Therapieansätze mit immunmodulierender bzw. immunsuppressiver Wirkung. Übliche Wirkstoffe sind Glukokortikoide, Kalzineurinhibitoren (Ciclosporin, Tacrolimus), antiproliferative Medikamente und monoklonale Antikörper (Rituximab). Sie alle haben gemeinsam, dass sie die inflammatorische Antwort auf die Gewebsschädigung unterbinden bzw. abschwächen sollen. Das Ziel der Therapie ist die Bewahrung der Nierenfunktion mit Rückgang der Proteinurie bzw. eine Progressionsverlangsamung der Erkrankung [32]. Vor allem Glukokortikoide sind eine häufig eingesetzte Therapieoption, die allerdings zum Teil mit erheblichen Nebenwirkungen einhergeht. Schon bei niedriger Dosierung

steigt das Risiko für Frakturen, Infektionen und gastrointestinale Nebenwirkungen. Bei Einnahme über längere Zeit kann es zu Steroid-Myopathie, Katarakt, Hyperlipidämie und beschleunigter Atherosklerose kommen [33]. Die bisher verfügbaren therapeutischen Optionen zeigen je nach Studie in bis zu 70% der Fälle befriedigende Wirkung [34]. Zwar zeigen viele Patienten ein ausreichendes Ansprechen auf Immunsuppressiva wie Glukokortikoide oder Ciclosporin, doch nur bei einem kleinen Prozentsatz der Patienten tritt eine vollständige Remission ein. Auch nach einer Transplantation kommt es bei 25-40% der Patienten mit FSGS zu einem Rezidiv (siehe auch Tabelle 4) [35-37].

Tabelle 4: Risikofaktoren für ein Wiederauftreten der FSGS nach Transplantation
nach [38]

Mit einem hohen Rückfallrisiko assoziierte Faktoren	Mit einem niedrigen Rückfallrisiko assoziierte Faktoren
Retransplantation bei Rückfall im ersten Spenderorgan	Familiäre FSGS
Kindesalter	Sporadische Form mit Podocin-Mutation
Rasch auftretende Urämie	Langsam auftretende Urämie
Mesangiale Proliferation in den nativen Nieren	Nicht-nephrotische Proteinurie bei Ersterkrankung
Lebendspende	
Kaukasische Rasse	
Spender älteren Alters	

Aus der Kombination einer hohen Prävalenz und Inzidenz der FSGS und wenigen, nebenwirkungsreichen therapeutischen Optionen leitet sich eine dringliche Notwendigkeit für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und Strategien ab [19, 32, 39]. Auch die Blockade von proinflammatorischen Chemokinen mit ihren Rezeptoren könnte hier einen Stellenwert besitzen. Die Hintergründe sollen im Folgenden erläutert werden.

1.4 Bedeutung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren bei renaler Entzündung

1.4.1 Einteilung und Funktion von Chemokinen und Chemokinrezeptoren

Chemokine sind chemotaktische Zytokine. Sie sind basische, Heparin-bindende Proteine mit einem Molekulargewicht von 6-94 kDa, die meist als Monomere wirken [40]. Sie dienen der komplexen Kommunikation zwischen allen Arten von Zellen. Bis heute

Einleitung

wurden über 50 humane Chemokine identifiziert, die an über 20 korrespondierende Rezeptoren binden [41]. Ihre Einteilung kann strukturell und funktionell erfolgen.

Chemokine haben mindestens je vier Cysteinreste, die zwei Disulfidbrücken bilden. Anhand der Anzahl von Aminosäuren zwischen den ersten beiden Cysteinresten unterscheidet man vier Unterformen der Chemokine. Nach systematischer Nomenklatur sind dies CC, CXCL, CX₃C und C Chemokine [42]. Die spezifische Bindung an Rezeptoren erfolgt über den N-Terminus der Moleküle. Multimerisation, Bindung an Glykosaminoglykane und Präsentation auf der Zelloberfläche erfolgt hingegen über das Kernstück und den C-Terminus (siehe Abbildung 4) [43].

Als namensgebende Hauptfunktion vermitteln Chemokine die Rekrutierung und Migration von Entzündungszellen [3]. Sie haben allerdings vielfältige andere Funktionen, sowohl unter physiologischen als auch entzündlichen Bedingungen [42, 44]. Dementsprechend können sie funktionell in Chemokine mit entzündlicher (z.B. CCL2, CCL5, CXCL10) beziehungsweise homöostatischer (z.B. CCL18, CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13, CXCL14) Aktivität eingeteilt werden. Zu den homöostatischen Funktionen gehört die Beeinflussung von Angiogenese und Fibrogenese, bzw. Proliferation und Polarisation von Progenitorzellen. Um diese Aufgaben zu erfüllen, binden Chemokine an spezifische, auf der Oberfläche von Zielzellen exprimierte Rezeptoren und interagieren mit anderen löslichen Faktoren und Adhäsionsmolekülen.

Die biologische Wirkung der Chemokine wird nach Bindung an die jeweiligen Chemokinrezeptoren vermittelt. Alle bisher identifizierten Chemokinrezeptoren ähneln sich strukturell. Sie alle zählen zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren aus der Rhodopsin- oder Serpentin-Familie. Das Rezeptorprotein besteht aus insgesamt sieben hydrophoben Transmembrandomänen. Sie sind verbunden durch jeweils drei intrazelluläre bzw. extrazelluläre Schleifen. Am intrazellulären Ende befindet sich der C-Terminus, am extrazellulären Ende der N-Terminus. Dieser N-Terminus ist verantwortlich für die hochaffine Bindung von Liganden (siehe hierzu Abbildung 5). Weiterhin sind die drei extrazellulären Schleifen für die Rezeptoraktivität verantwortlich [41].

Die meisten Chemokine können innerhalb ihrer Subfamilie an mehrere Rezeptoren binden. Umgekehrt können Chemokinrezeptoren in der Regel durch mehrere Chemokinliganden aktiviert werden. Durch die Bindungsspezifität des extrazellulären N-Terminus und die nachfolgenden intrazellulären Signalwege, vermittelt durch verschiedene Proteinkinasen (wie z.B. MAPK, *mitogen activated protein kinase*), scheinen die Chemokinrezeptoren jedoch spezifische Effekte zu vermitteln [40, 45]. Somit sind die

Wirkungsweisen zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren in vivo außerordentlich komplex [46, 47].

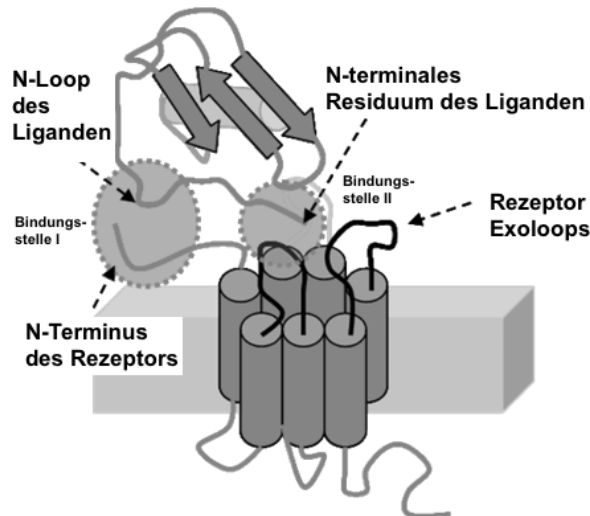


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Chemokin-Rezeptor-Interaktion
 modifiziert aus [48]

1.4.2 Chemokin-vermittelte Leukozyteninfiltration

Eine der wichtigsten Funktionen von Chemokinen ist die Rekrutierung von Leukozyten und deren Infiltration in geschädigtes Gewebe. Nach der Schädigung produziert das Gewebe inflammatorische Mediatoren, welche die Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel induzieren [49]. Zu diesen Adhäsionsmolekülen gehören Selektine und Integrine. Zusätzlich werden Chemokine an Proteoglykanen der luminalen Endothelzelloberfläche bei Schädigung benachbarter Bereiche präsentiert. Durch Interaktion von Selektinen des Endothels mit der Zelloberfläche von Leukozyten kommt es zum sogenannten *rolling*. Hierbei rollen die Leukozyten am Gefäßendothel entlang [42]. Im Verlauf dieses Vorgangs binden die auf der Endothelzelloberfläche präsentierten Chemokine an die entsprechenden, durch rollende Leukozyten exprimierten Chemokinrezeptoren und aktivieren so Integrine. Deren Bindungsaffinität wird hierdurch gesteigert. Es kommt zur festen Bindung der Leukozyten an das Endothel (*adhesion*). Anschließend wandern die Leukozyten para- oder transzellulär durch das Endothel in das subendotheliale Gewebe ein [50, 51]. Zum Ort der Schädigung gelangen sie entlang des Chemokingradienten im Gewebe [52]. Durch Bindung mancher Chemokine an ihre entsprechenden Rezeptoren kann die Leukozytenadhäsion an das aktivierte Endothel auch ohne vorheriges *rolling* stattfinden. CX3CL1 vermittelt beispielsweise in seiner membrangebundenen Form nach Bindung an den Rezeptor CX3CR1 eine direkte,

Integrin-unabhängige Adhäsion von Monozyten, T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen an Endothelzellen [53].

Chemokine stellen in beiden Fällen den entscheidenden Baustein für die Migration und Infiltration von Leukozyten dar. Sie können hierbei von aktivierten Endothelzellen, aktivierten Thrombozyten und subendothelialen, geschädigten Parenchymzellen exprimiert werden [54]. In letzterem Fall gelangen die Chemokine anschließend durch Transzytose an die Endotheloberfläche [55]. Die beschriebene Interaktion von Adhäsionsmolekülen, Proteoglykanen und Chemokinen erlaubt eine sehr differenzierte Infiltration von verschiedenen Leukozyten-Subtypen in geschädigtes Gewebe [49].

1.4.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren in Nierenerkrankungen

Fast alle Arten von Nierenzellen können CC- bzw. CXC-Chemokine produzieren [56-58]. Proinflammatorische Chemokine werden unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringem Ausmaß exprimiert. Inflammatorische Stimuli, hierunter Zytokine wie TNF- α und IL1- β , führen jedoch zu einer ausgeprägten Induktion der renalen Chemokinexpression. Auch andere Faktoren wie Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien, Immunglobulin-Aggregate, *low density* Lipoprotein (LDL), Interferon und *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP) haben dieses Potential [59-61]. Auch in verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass renale Chemokine und Chemokinrezeptoren im Verlauf von Nephritiden induziert werden. So werden in der murinen Immunkomplex-Glomerulonephritis und nach obstruktiver Ureterligatur eine erhöhte renale Expression von CCL2, CCL5 und ihrer Rezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 detektiert [58, 62]. Am Beispiel der Lupusnephritis wurde gezeigt, dass auch bei Autoimmunnephritiden die oben genannten Chemokine, und zusätzlich CCL4 und CXCL10 induziert werden [63].

In Zellkulturexperimenten zeigte sich, dass die höchste Chemokin-Konzentration nach Einwirken des auslösenden Stimulus innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden erreicht ist und für gewöhnlich innerhalb von 24 bis 48 Stunden wieder abklingt. Die Regulation der Chemokinexpression findet auf Transkriptionsebene statt. Hierbei scheint der Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa B* (NF-kappaB), welcher bei inflammatorischer Stimulation zu den Startcodons der Chemokin-Gene transloziert, eine Hauptrolle zu spielen. Durch cAMP oder Glukokortikoide wird NF-kappaB gehemmt, was eine verminderte Chemokinexpression bewirkt. Auch vasoaktive Hormone wie Angiotensin II nehmen Einfluss auf die Transkription von Chemokinen. Am Häufigsten finden sich CCL2, CCL5 und CX3CL1 im Rahmen renaler Schädigung im Gewebe. CCL2 und

CCL5 werden größtenteils von Mesangialzellen und eingewanderten Leukozyten sezerniert. Vom Endothel exprimiertes CX3CL1 ermöglicht über seine Tertiärstruktur auch direkt eine verstärkte Leukozytenadhäsion [64].

Generell ergeben sich in den verschiedenen Kompartimenten der Niere unterschiedliche Expressionsmuster der Chemokine. Damit hat jede Nephropathie ein typisches Chemokinprofil, abhängig von der Art, dem Ort und der Abfolge der einwirkenden Noxen [64]. Je nach Ort der Schädigung werden beispielsweise die Chemokine CCL2, CCL3, CCL4 und CCL5 glomerulär oder tubulointerstitiell induziert [54]. In der akuten Immunkomplexglomerulonephritis kommt es initial zur glomerulären Induktion von Chemokinen [62]. Im Modell der unilateralen Ureterligatur hingegen ist vornehmlich das Interstitium geschädigt, welches hier auch Ort der Chemokinproduktion ist [58]. Im Verlauf vieler Modelle führt ein primär glomerulärer Schaden zu sekundären Schäden im Tubulointerstitium. Ist dies der Fall finden sich in beiden Kompartimenten Expressionssteigerungen der oben genannten Chemokine [63, 65].

1.4.4 Der Chemokinrezeptor 2 (CCR2)

Nach Ligandenbindung kommt es zur Induktion verschiedener MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signalkaskaden, die beispielsweise bei der Aktivierung von Integrinen und der Chemotaxis eine Rolle spielen [66, 67]. Nach Ligandenbindung und Initiierung der Signaltransduktion wird CCR2 zügig internalisiert [3, 46, 68]. Wie der Großteil der Chemokinrezeptoren hat auch CCR2 mehrere Liganden. Diese sind in der Maus CCL2 (MCP-1), CCL7 (MCP-2), CCL8 (MCP-3) und CCL12 (MCP-5) [41]. Beim Menschen binden neben den eben genannten Liganden zusätzlich CCL11, CCL13, CCL16 und CCL26 an CCR2 [69]. Nur CCL2 und CCL12 wirken ausschließlich über CCR2, alle anderen Chemokine binden noch an weitere Rezeptoren. CCL2 ist jedoch das Chemokin mit der höchsten Bindungspotenz gegenüber CCR2 [70]. CCR2 wird spezifisch auf bestimmten Zelltypen exprimiert. Hierzu gehören sowohl bei der Maus als auch beim Menschen zum einen Monozyten und ihre Abkömmlinge [71]. Nach Bindung seines Liganden CCL2 vermittelt CCR2 die Migration und Proliferation dieser Zellen in entzündetes Gewebe [43]. Zum anderen wird CCR2 auf T-Lymphozyten, Podozyten und glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Im Podozyten führt seine Aktivierung *in vitro* zu einer Verminderung der Nephrin-Expression [72]. Im Folgenden kommt es zu einer Motilitätssteigerung oder Apoptose-Induktion. Dies bewirkt eine vermehrte Durchlässigkeit der geschädigten glomerulären Filtrationsbarriere, was mit gesteigerter Proteinurie einhergeht [46, 72, 73]. Es wurde gezeigt, dass *Ccr2*-defiziente Mäuse

in einem Streptozotocin-induzierten Diabetesmodell auch nach neunwöchiger Versuchslaufzeit im Hinblick auf die Nierenfunktion geschützt waren. Eine transgene Überexpression von Ccr2 in Podozyten von Ccr2-defizienten Mäusen führte jedoch sowohl zu funktionellen, als auch zu strukturellen Schäden mit Podozytenverlust und glomerulärer Apoptose [74]. Neben dieser chemotaktischen und aktivierenden Wirkung ist CCR2 unter physiologischen Bedingungen außerdem essenziell für die Auswanderung von Monozyten aus dem Knochenmark ins Blut. Studien konnten zeigen, dass Ccr2-defiziente Mäuse hyperzelluläres Knochenmark und eine Monozytopenie im Blut aufweisen [75-77]. Das Expressionsmuster von Ccr2 in der Maus entspricht fast vollständig dem des Menschen [78].

1.5 Therapeutische Perspektiven

Aufgrund ihrer Bedeutung für die Immunantwort und das Entzündungsgeschehen im Verlauf renaler Erkrankungen rückte die Blockade von Chemokinen und ihren Rezeptoren in den Fokus therapeutischer Strategien. Die Intervention muss aufgrund der erkrankungsspezifischen Chemokin-Profile spezifisch für jede Nierenerkrankung entwickelt werden. Bei Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritiden hat sich gezeigt, dass eine Erhöhung funktioneller Parameter wie Albuminurie, Urämie, etc., die zur Einschätzung des renalen Schadens bzw. Schweregrads der Erkrankung dienen, positiv mit der Expression von CCL2 durch intrinsische Nierenzellen sowie eingewanderte Zellen korreliert. Weiterhin geben die CCL2-Spiegel im Urin chronisch nierenkranker Patienten deren Krankheitsaktivität analog zu herkömmlichen Indices wieder [79, 80]. In der Vergangenheit wurden therapeutische Effekte einer Blockierung des Ccl2-Ccr2 Signalwegs in einigen renalen Erkrankungsmodellen untersucht. Hierbei zeigte sich eine Besserung des renalen Schadens in der diabetischen Nephropathie, der obstruktiven Ureterligatur und der Lupusnephritis. Methodisch wurden sowohl kleinmolekulare Ccr2-Antagonisten, als auch Ccl2-blockierende Spiegelmerer verwendet [81-85].

Ein CCR2-Antagonist, CCX140B, konnte im Rahmen einer klinischen Studie zusätzlich zur Standardbehandlung mit ACE-Hemmern bzw. Angiotensinrezeptorantagonisten die Ratio von Albumin und Kreatinin im Morgenurin bei Patienten mit diabetischer Nephropathie um bis zu 16% im Vergleich zum Placebo vermindern [86]. Zudem konnte gezeigt werden, dass das CCL2-blockierende Spiegelmerer Emapticap pegol (NOX-E36) bei Patienten mit diabetischer Nephropathie einen krankheitsmodifizierenden Effekt hinsichtlich HbA1c und Albuminurie hat [87].

Es bleibt jedoch unklar, ob eine Blockade von CCR2 auch bei der FSGS therapeutische Effekte erzielen könnte. Im FSGS-Modell der Adriamycin-Nephropathie erzielten Wu et al. einen therapeutischen Effekt durch Vakzination mit Ccl2 kodierender DNA [88].

Diese Daten legen nahe, dass durch pharmakologische Blockade des CCL2-CCR2-Signalwegs bei der FSGS eine Verbesserung der Glomerulosklerose und der sekundären tubulointerstitiellen Entzündung und Fibrose erreicht werden könnte. Hierzu kann sowohl die Verminderung einer CCR2-vermittelten Podozytenschädigung als auch die Reduzierung einer CCR2-vermittelten renalen Leukozyteninfiltration beitragen.

Um CCR2 als mögliches therapeutisches Zielmolekül zur Behandlung der FSGS zu identifizieren sollte daher in der vorliegenden Promotionsarbeit die pathophysiologische Rolle von CCR2 mit Hilfe von Ccr2-defizienten Knockout-Mäusen in der Adriamycin-Nephropathie als Mausmodell einer FSGS untersucht werden.

2 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Angesichts der individuellen und volkswirtschaftlichen Bedeutung des terminalen Nierenversagens in Folge einer Glomerulosklerose ist die Weiterentwicklung der momentan verfügbaren Therapien dringend notwendig. Die therapeutischen Ansätze stützen sich derzeit mit geringem Erfolg auf bisher verfügbare immunsuppressive oder immunmodulatorische Pharmaka. Einige chronische Nierenerkrankungen sprechen auf eine Inhibition des Chemokinrezeptors CCR2 an. Dies wurde jedoch bisher nicht für die FSGS gezeigt.

Um CCR2 als potentielles Zielmolekül einer immunmodulatorischen Therapie der FSGS zu identifizieren, sollte daher in der vorliegenden Arbeit die pathophysiologische Funktion von Ccr2 in einem Mausmodell der FSGS, der Adriamycin-induzierten Nephropathie mit Hilfe von Ccr2-defizienten Knockout-Mäusen untersucht werden. Der Arbeit liegt die Hypothese zu Grunde, dass die glomeruläre und sekundär tubulointerstitielle Schädigung im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle in Ccr2-defizienten Mäusen mit Adriamycin-Nephropathie abgeschwächt wird. Dies könnte durch eine verminderte Infiltration von leukozytären Entzündungszellen in geschädigte Glomeruli und tubulointerstitielles Gewebe bewirkt werden. Zudem ist auch eine Verminderung der direkten CCR2-vermittelten Podozytenschädigung bei der Glomerulosklerose vorstellbar.

CCR2 könnte somit sowohl durch seine Leukozyten-rekrutierende Funktion als auch seine Podozyten-schädigende Wirkung eine wichtige pathophysiologische Rolle bei der FSGS spielen und erscheint daher als potentielles therapeutisches Zielmolekül besonders geeignet.

3 Material und Methoden

3.1 Geräte und Materialien

3.1.1 Tierhaltung

Makrolone Typ 2 Käfige

Tecniplast, Hamburg

Tierfutter

Ssniff Spezialdiäten, Soest

3.1.2 Durchflusszytometrie

FACSCalibur

Becton Dickinson, San José, CA, USA

3.1.3 ELISA

ELISA reader Tecan, GENios Plus

Tecan, Crailsheim

ELISA Microplate Strip Washer ELx50

BioTek, Bad Friedrichshall

3.1.4 Glomerulusisolation

Cell Separation Magnet, BD IMag™

Beckton Dickinson, Heidelberg

Kollagenase A

Roche, Mannheim

M-450-Epoxy-Dynabeads

ThermoFisher, Waltham, USA

3.1.5 Histologie

Leica DC 300F L

Leica Microsysteme, Wetzlar

Leica DM RBE

Leica Microsysteme, Wetzlar

Zeiss Axioplan 2

Carl-Zeiss AG, Oberkochen

Olympus BX50

Olympus Mikroskope, Hamburg

Kryostat RM2155

Leica Microsystems, Bernsheim

Kryostat CM3000

Leica Microsystems, Bernsheim

Mikrotom HM 340E

Microm, Heidelberg

3.1.6 PCR

Ultra Turra T25 basic

IKA GmbH, Staufen

Nano drop

PEQLAB Biotechnology, Erlangen

LightCycler 480 Real-Time PCR System

Roche, Basel, CH

LightCycler 480 Multiwell-Platte 96

Roche, Basel, CH

ABI prism 7700 sequence detector

PE Biosystems, Weiterstadt

Sonifier B-12

Branson Sonic power, Danbury, USA

3.1.7 Sonstige Geräte

Autoklav 23	Melag Medizintechnik, Berlin
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Heraeus Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Heraeus Minifuge T	Heraeus Sepatech, Osterode
Steril Card Hood Class II, Typ A/B3	The Baker Company, Sanford, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Zürich, CH
Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen
Waage Mettler PJ 3000	Mettler-Toledo, Greifensee, CH
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Bernsheim

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

96-well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Einmal-Küvetten 1,5 ml Plastibrand®	Brand, Gießen
Eppendorfgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Falcons 15 ml und 50 ml	Beckton Dickinson, Heidelberg
Gewebekassette	neoLab Migge, Heidelberg
Multikanalpipette Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Nadel BD Microlance 20 G; 26 G; 30 G	Beckton Dickinson, Heidelberg
Pipetten Pipetman P1-20/200/1000 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen 1-1000 µl Typ Gilson	Peske, Aindling-Arnhofen
Pipettenspitzen epTIPS Standard	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetus classic	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plastikfilter 70 µm	Beckton Dickinson, Heidelberg
Skalpelle Feather No. 20	Feather Safety Razor Co, JP
Zellkulturschalen 10 cm	TPP, Transadigen, CH

3.1.9 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Albustix Teststreifen	Bayer, Leverkusen
Aqua ad injetabila	Braun, Melsungen
Bovines Serum Albumin	Roche, Mannheim
2,2,2-Tribromethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Material und Methoden

DEPC (Diethylpyrocarbonate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNase Typ III	Sigma, Deisenhofen
DTT (100 mM)	Invitrogen, Carlsbad CA, USA
EDTA	Calbiochem, San Diego, USA
EDTA-Dikalium 0,2 M	neoLab, Heidelberg
Einbettmedium	Jung, Leica Microsystems, Nussloch
Eosin	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formalin	Merck, Darmstadt
Hematoxin Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kalium-Chlorid	Merck, Darmstadt
Kalium-dihydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (25 mM)	Fermentas Scientific, Waltham, USA
β Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Natrium-Azid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Carbonat	Merck, Darmstadt
Natrium-Chlorid Lösung 0,9%	Braun, Melsungen
Natrium-hydrogen-Carbonat	Merck, Darmstadt
Natrium-hydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
Di-Natrium-Carbonat	Merck, Darmstadt
Di-Natrium-hydrogen-Phosphat	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Perjodic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Shandon Formal-Fix Concentrate	Thermo, Cheshire, UK
Tryptan Blau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20 detergent	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylene	Merck, Darmstadt

Chemikalien für Durchflusszytometrie

PBS (Phosphate Buffered Saline)	Pan Biotech, Aidenbach
FACS Clean	Beckton Dickinson, Heidelberg
FACS Flow	Beckton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Beckton Dickinson, Heidelberg

Material und Methoden

DNAse Typ IV	Sigma, Deisenhofen
Kollagenase Typ I	Sigma, Deisenhofen
Normal Mouse Serum	Jackson, West Grove, PA, USA
Normal Rat Serum	Jackson, West Grove, PA, USA
Cytofix Fixation Buffer	Beckton Dickinson, Heidelberg

Chemikalien für Immunhistologie

Antigen Unmasking Solution	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Torrance, USA
VectaMount	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastain Elite ABC	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Anti-mouse Nephryn (Meerschweinchen)	Acris Antikörper, Herford, DE
Anti-mouse WT1 (Kaninchen)	SantaCruz Biotech, Santa Cruz, USA
Anti-pig Alexa-488 (Ziege)	ThermoFisher, Waltham, USA
Anti-rabbit Cy3 (Ziege)	Jackson IR Labs, West Grove, USA
Anti-rabbit Biotin (Ziege)	Vector Laboratories, Burlingame, CA
TRIS-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Avidin-Biotin Complex Reagenz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DAB	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DAB-Färbelösung	200 ml TRIS-HCl (37°C), 4 ml DAB 1 ml NiCl ₂ , 500 µl 3% H ₂ O ₂
Methylgrün	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

RNA-Isolierung, cDNA-Umschreibung und RT-PCR

5x First strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
10 x Taq Puffer without detergent	Fermentas, St-Leon-Rot
Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BioStab PCR Optimizer	Bitop, Witten
dNTPs (25 nM)	GE Healthcare, München
DTT (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe

Material und Methoden

Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Hexanucleotide	Roche, Mannheim
Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt
MgCl ₂ (25 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot
PureLink RNA Mini Kit	Ambion, Darmstadt
RNA loading buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RNase free Spray	Gene Choice, Frederick, USA
RNasin (40 U/μl)	Promega, Mannheim
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR Green Dye detection	Applied Biosystems, Norwalk, USA
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA

3.1.10 Puffer und Lösungen

<p>FACS-Puffer</p> <p>PBS</p> <p>0,2% BSA</p> <p>0,1% Na-Azid</p>	<p>Paris Puffer</p> <p>20 mM Tris-HCl</p> <p>125 mM NaCl</p> <p>10 mM KCl</p> <p>10 mM Na-Azetat</p> <p>5 mM Glukose</p> <p>pH 7,4</p>
<p>1 L 10x HBSS</p> <p>ohne Ca, Mg</p> <p>4 g KCl</p> <p>0,6 g KH₂PO₄</p> <p>80 g NaCl</p> <p>0,621 g Na₂HPO₄</p>	<p>mit Ca, Mg</p> <p>3,5 g NaHCO₃</p> <p>1,4 g CaCl₂</p> <p>1 g MgCl₂·6 H₂O</p> <p>1 g MgSO₄·7 H₂O</p> <p>10 g D-Glukose</p>
<p>TAC Puffer</p> <p>50 mM Tris Puffer</p> <p>450 ml 0,83% Ammoniumchlorid</p> <p>pH 7,2</p>	<p>MACS Puffer</p> <p>2 mM EDTA</p> <p>0,5% BSA</p> <p>pH 7,2</p>

Kollagenase / DNase 10 mg Kollagenase Typ I 1 mg DNase Typ IV in 10 ml HBSS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Kollagenase-Lösung in HBSS-Puffer 10 mg Kollagenase Typ I in 10 ml HBSS ohne Ca, Mg
TBE-Puffer 89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA in H ₂ O gelöst und auf einen pH von 8,0 eingestellt	PCR-Mastermix pro Probe 16 µl ddH ₂ O 2,5 µl 10x Puffer 4 µl (300 µM) dNTPs 1 µl (10 pM/µl) je pro Primer 0,5 µl Taq Polymerase
2 mM EDTA / HBSS-Lösung 100 µl 0,2 EDTA-Stammlösung 10 ml HBSS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	Gel Loading Solution 10 mM Tris / HCl 20% Glycerin 0,1% Bromphenolblau

3.1.11 Antikörper und Enzyme

Alexa Fluor® 488-Hamster Anti-Mouse Cd3e	Beckton Dickinson, Heidelberg
PE-Rat Anti-Mouse Cd45	Beckton Dickinson, Heidelberg
APC-Rat Anti-Mouse Cd45	Beckton Dickinson, Heidelberg
PE-Cy TM 5-Rat Anti-Mouse Cd8a	Beckton Dickinson, Heidelberg
APC-Rat Anti-Mouse Cd4	Beckton Dickinson, Heidelberg
PE-Hamster Anti-Mouse Cd11c	Beckton Dickinson, Heidelberg
FITC-Hamster Anti-Mouse Cd11c	Beckton Dickinson, Heidelberg
PerCP-Cy5.5 Rat Anti-Mouse Cd11b	Beckton Dickinson, Heidelberg
FITC-Rat Anti-Mouse Cd11b	Beckton Dickinson, Heidelberg
FITC-Rat Anti-Mouse Ly-6C	Beckton Dickinson, Heidelberg
PE-Rat Anti-Mouse Ly-6C	Beckton Dickinson, Heidelberg
FITC-Rat anti-Mouse Ly-6G	Beckton Dickinson, Heidelberg
FITC-Hamster Anti-Mouse IgG1, λ1	Beckton Dickinson, Heidelberg
APC-Rat Anti-Mouse F4/80	Bio-Rad, Hercules, California, U.S.A.

APC-Rabbit Anti-Mouse Collagen1 Rockland, Pennsylvania, USA
 AccuCheck Counting Beads Life Technologies, Carlsbad, USA

ELISA-Assays/ Kolorimetrische Tests

Ccl2 / Mcp-1 R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
 Ccl5 / Rantes R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
 Kim-1/ Tim-1/ Havcr R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
 Tgf-β R&D Systems, Nordenstadt, Wiesbaden
 Mouse Albumin ELISA Quantitation Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
 Creatinine FS DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim
 Urea FS DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim

Immunhistologie

Ratte anti-Maus Cd3 Serotec, Düsseldorf
 Ratte anti-Maus F4/80 Serotec, Düsseldorf
 Ratte anti-Maus Mac2 Cederlane, Ontario, Kanada
 Hamster anti-Mensch Nephryn Acris Antibodies, Herford
 Ratte anti-Kaninchen Wt1 Santa Cruz, Santa Cruz, USA
 Maus anti-Mensch Sma Dako, Glostrup, Dänemark
 Ratte anti-Maus Er-Hr3 BMA Biomedical, Augst, Switzerland

3.1.12 Oligonukleotid-Primer für real-time PCR

Alle Primer wurden kommerziell von der Firma *Metabion* erworben.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Gen	Sequenz
18S	5'-GCAATTATCCCCATGAACG-3' (vorwärts) 5'-AGGGCCTCACTAAACCATCC-3' (rückwärts)
Ccl2	5'-CCTGCTGTTACAGTTGCC-3' (vorwärts) 5'-ATTGGGATCATCTTGCTGGT-3' (rückwärts)
Ccl5	5'-CCACTTCTTCTCTGGGTTGG-3' (vorwärts) 5'-GTGCCACGTCAAGGAGTAT-3' (rückwärts)
Il6	5'-TGATGCACTTGCAGAAAACA-3' (vorwärts) 5'-ACCAGAGGAAATTTCAATAGGC-3' (rückwärts)

Material und Methoden

Il10	5'-ATCGATTTCTCCCCTGTGAA-3' (vorwärts) 5'-TGTCAAATTCATTCATGGCCT-3' (rückwärts)
Il12-β	5'-GATTCAGACTCCGAGGGGACA-3' (vorwärts) 5'-GGAGACACCAGCAAACGAT-3' (rückwärts)
Ifn-γ	5'-ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT-3' (vorwärts) 5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3' (rückwärts)
iNos1	5'-TTCTGTGCTGTCCCAGTGAG-3' (vorwärts) 5'-TGAAGAAAACCCCTTGTGCT-3' (rückwärts)
Mrc1	5'-ATATATAACAAGAATGGTGGGCAGT-3' (vorwärts) 5'-TCCATCCAATGAATTTCTTATCC-3' (rückwärts)
Msr1	5'-CCTCCGTTCCAGGAGAAGTTG-3' (vorwärts) 5'-TTTCCAATTCAAAGCTGA-3' (rückwärts)
Arg1	5'-AGAGATTATCGGAGCGCCTT-3' (vorwärts) 5'-TTTTTCCAGCAGACCAGCTT-3' (rückwärts)
Fizz1	5'-CCCTTCTCATCTGCATCTCC-3' (vorwärts) 5'-CTGGATTGGCAAGAAGTTCC-3' (rückwärts)
Ym1	5'-TCTGGGTACAAGATCCCTGAA-3' (vorwärts) 5'-TTTCTCCAGTGTAGCCATCCTT-3' (rückwärts)
α-Sma	5'-ACTGGGACGACATGGAAAAG-3' (vorwärts) 5'-GTTTCAGTGGTGCCTCTGTCA-3' (rückwärts)
Tnf-β	5'-GGAGAGCCCTGGATACCAAC-3' (vorwärts) 5'-CAACCCAGGTCCTTCCTAAA-3' (rückwärts)
Tnf-α	5'-CCACCACGCTCTTCTGTCTAC-3' (vorwärts) 5'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT-3' (rückwärts)
Tnfr1	5'-ATGGATGTATCCCCATCAGC-3' (vorwärts) 5'-CTTCATTCACGAGCGTTGTC-3' (rückwärts)

Material und Methoden

Tnfr2	5'-AGATCTGGCACTCGTACCCA-3' (vorwärts) 5'-GTCTTCGAACTGCAGCTGTG-3' (rückwärts)
Nephrin	5'-ACCCTCCAGTTAACTTGTCTTTGG-3' (vorwärts) 5'-ATGCAGCGGAGCCTTTGA-3' (rückwärts)
Fibronectin	5'-GGAGTGGCACTGTCAACCTC-3' (vorwärts) 5'-ACTGGATGGGGTGGGAAT-3' (rückwärts)
Laminin	5'-CATGTGCTGCCTAAGGATGA-3'(vorwärts) 5'-TCAGCTTGTAGGAGATGCCA-3' (rückwärts)
Fsp1	5'-CAGCACTTCCTCTCTTTGG-3' (vorwärts) 5'-TTTGTGGAAGGTGGACACAA-3' (rückwärts)
Prokollagen4 α	5'-GTCTGGCTTCTGCTGCTCTT-3' (vorwärts) 5'-CACATTTTCCACAGCCAGAG-3' (rückwärts)
Prokollagen1	5'-ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC-3' (vorwärts) 5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3' (rückwärts)
Prokollagen2	5'-CTACGGTGTGAGGGCCAG-3' (vorwärts) 5'-GCAAGATGAGGGCTTCCATA-3' (rückwärts)
Prokollagen3	5'-GGAACCTGGTTTCTTCTCACC-3' (vorwärts) 5'-TAGGACTGACCAAGGTGGCT-3' (rückwärts)
Cd31	5'-GCAGGACAGGTCCAACAAC-3' (vorwärts) 5'-GCAAAGTGGAATCAAACCGT-3' (rückwärts)
Ngal	5'-AATGTCACCTCCATCCTGGT-3' (vorwärts) 5'-ATTTCCCAGAGTGAAGTGGC-3' (rückwärts)

3.1.13 Software

LightCycler 480 Software, Version 1.2.9.11

Roche, Mannheim

CellQuest Version 3.3

Becton Dickinson, Heidelberg

Endnote X9

Thomson Reuters, New York, NY, USA

InStat 3.05	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
MacOS Sierra und Mojave	Apple Inc., Cupertino, CA, USA
Microsoft Office 2010 und 2011	Microsoft, Redmond, WA, USA
QWin	Leica Microsystems, Bensheim
Windows XP Professional und 7	Microsoft, Redmond, WA, USA

3.2 Tierexperimentelle Methodik

3.2.1 Tierhaltung

Alle experimentellen Tierversuche wurden laut Vorschrift des deutschen Tierschutzgesetzes und nach entsprechender Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung der Medizinischen Klinik unter spezifisch Pathogen-freien Bedingungen gehalten (SPF). Die Einhaltung dieser Vorgaben wurde durch regelmäßige mikrobiologische Untersuchungen kontrolliert und gewährleistet. Die Tiere wurden artgerecht in Gruppen von höchstens fünf Tieren pro Makrolone Typ II Käfig (Tecniplast, Hamburg) gehalten. Käfige, Einstreu, Futtermittel (ssniff® Spezialdiäten, Soest), Trinkwasser (autoklaviertes VE-Wasser), Nestwatte und Häuschen wurden vor ihrem Einsatz im Autoklaven sterilisiert und je nach Verschmutzung regelmäßig, spätestens jedoch nach einer Woche, gewechselt. Die Raumtemperatur lag konstant bei 22-23°C mit einer Luftfeuchtigkeit um 50%. Die Tag-Nacht-Rhythmik betrug 12 Stunden, Trinkwasser und Futter waren dauerhaft und unbegrenzt frei zugänglich.

3.2.2 Versuchstiere

BALB/c Wildtyp	Charles River Laboratories, Sulzfeld
BALB/c Ccr2-defizient	PD Dr. rer. nat. Bruno Luckow, Nephrologisches Zentrum, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Klinikum der Universität München

Alle im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Tiere hatten einen genetischen BALB/c Hintergrund, der als suszeptibler Hintergrund die Induktion der Adriamycin-Nephropathie erlaubt. Die Wildtyp-Tiere wurden von Charles River, die Tiere mit Knockout des Ccr2-Rezeptors freundlicherweise von Herrn PD Dr. rer. nat. Bruno Luckow (Nephrologisches Zentrum, Medizinische Klinik und Poliklinik IV, Ludwig-Maximilians-

Universität München) zur Verfügung gestellt. Die Ccr2-defizienten Mäuse haben einen unauffälligen spontanen Phänotyp und eine normale Lebenserwartung [89].

3.2.3 Injektionsnarkose bei Mäusen

<i>Ansatz Injektionsnarkose</i>	<i>Dosierung des Narkosemixes</i>
2 ml Fentanyl (0,05 mg/ml)	Fentanyl 0,05 mg/kg
2 ml Dormicum (Midazolam, 5 mg/ml)	Dormicum 5 mg/kg
1 ml Medetomidin (Dormitor, 1 mg/ml)	Medetomidin 0,5 mg/kg

Tabelle 6: Gewichtsadaptiertes Narkoseschema

Körpergewicht (in g)	Volumen Narkosemix (in µl)
20	130
21	137
22	143
23	150
24	156
25	163
26	169
27	176
28	182
29	189
30	195

Die Arzneimittel stammten aus der Apotheke des Klinikums Innenstadt der LMU München. Das gewichtsadaptierte Volumen wurde intraperitoneal appliziert und die Tiere so narkotisiert (siehe Tabelle 6). Ein negativer Zwischenzehenreflex wurde als Zeichen ausreichender Narkosetiefe gewertet.

3.2.4 Intravenöse Injektion von Adriamycin

Als Modell für die fokale segmentale Glomerulosklerose wurde die murine Adriamycin-Nephropathie verwendet. Hierbei wird durch das verabreichte Adriamycin ein Podozytenschaden mit nachfolgender Entwicklung einer chronischen proteinurischen Nephropathie mit strukturellem Schaden und renaler Infiltration von Leukozyten hervorgerufen. Die Adriamycin-Nephropathie gleicht der humanen FSGS klinisch, histologisch und bezüglich der Immunreaktion [90]. Der Pathomechanismus der Adriamycin-

Nephropathie ist nicht vollständig bekannt. Die am häufigsten vertretene Hypothese ist, dass die glomeruläre Toxizität von Adriamycin durch reaktive Sauerstoffmetaboliten und eine Schädigung der Glykokalyx bedingt wird. Die sich selbst unterhaltende Immunantwort führt zum Fortschreiten der Schädigung [91-93]. Die Induktion des chronischen Nieren- und insbesondere glomerulären Schadens wurde durch progrediente Albuminurie bestätigt. Zur Induktion des Modells wurden den neun Wochen alten männlichen BALB/c-Mäusen an Tag null jeweils 11,5 mg/kg KG Adriamycin (DOXO-cell, Cell Pharm) in die Schwanzvene injiziert. Als Vehikel wurden gegebenenfalls entsprechende Volumina isotonischer Kochsalzlösung gespritzt. Die Injektionen wurden an Tag 14 zur Aufrechterhaltung des Krankheitsbildes bzw. seiner weiteren Progredienz wiederholt. An Tag 28 wurde der Versuch beendet und Blut und Nierengewebe entnommen.

3.2.5 Urin-, Blut- und Gewebeentnahme

Während der Versuchslaufzeit wurde in wöchentlichen Abständen von allen Tieren Urin gewonnen. Hierfür wurde die Blasenentleerung durch sanften Druck auf den Unterbauch des Tiers ausgelöst und der anfallende Urin in einem Eppendorfgesäß aufgefangen.

Am Versuchsendpunkt (Tag 28) wurden die Tiere zur Organ- und Gewebeentnahme getötet. Nach i.p.-Einleitung der Narkose und Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes wurde mit der retroorbitalen Blutentnahme mittels feiner Glaskapillaren begonnen. Die für die Aufbewahrung benutzten Eppendorfgesäße wurden zuvor mit 20 µl 0,5 M EDTA vorbereitet, um Plasma für Blutwertbestimmungen und Vollblut für durchflusszytometrische Untersuchungen zu erhalten.

Die tiefnarkotisierten Tiere wurden mit Hilfe von Pins rücklings auf einer sauberen Unterlage befestigt und mit 70%-igem Alkohol desinfiziert. Abdomen und Thorax wurden eröffnet, die untere Hohlvene durchtrennt und der Kreislauf durch Punktion des linken Ventrikels mit sterilem PBS unter einem Perfusionsdruck von ca. 100 mmHG perfundiert. Die erfolgreiche Perfusion konnte durch eine Entfärbung von Leber und Nieren kontrolliert werden. Anschließend wurden beide Nieren freipräpariert, entnommen und für die verschiedenen Arten der Konservierung zerteilt (siehe Abbildung 5). Ein Drittel jeder Niere wurde für spätere Proteinanalysen in Eppendorfgesäße überführt und genau wie je ein kleines Mittelstück Niere in Alufolie für spätere Gefrierschnitte in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Weitere Mittelstücke für die Anfertigung histologischer Schnittpräparate wurden in Einbettkassetten überführt und über Nacht in Formalin

(4%) fixiert. Die weitere Verarbeitung des Gewebes ist im jeweiligen Kapitel beschrieben. Für spätere mRNA-Expressionsanalysen wurden je Niere ca. 1 mm dicke Polstücke in zum Schutz vor endogenen RNAsen mit RNA-later versehene Eppendorfgefäße gegeben und bei -20°C eingefroren.

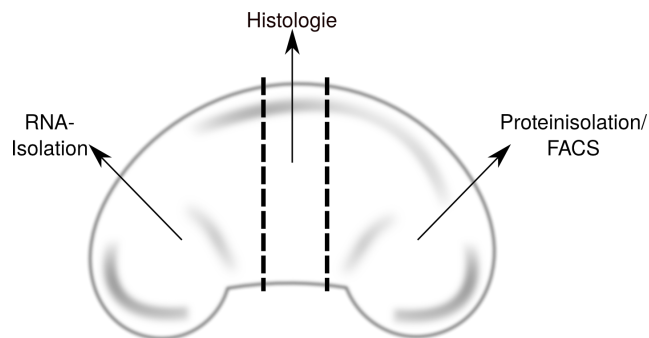


Abbildung 5: Aufteilung des Nierengewebes

Die Pole jeder Niere wurden für die Isolation von RNA bzw. Protein abgetrennt. Ein kleines Mittelstück Niere wurde für eventuelle spätere Gefrierschnitte aufbewahrt, ein weiteres Mittelstück für die Anfertigung histologischer Schnittpräparate.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Durchflusszytometrie

Allgemeine Verfahrensweise

Die Durchflusszytometrie ist ein maschinelles Verfahren zur Analyse von Zellen in Zellsuspensionen. Im Gegensatz zum eigentlichen *fluorescence activated cell sorting* (FACS) werden in der Durchflusszytometrie Zellen nach bestimmten Merkmalen beurteilt und unterschieden, nicht jedoch sortiert. Hierbei ist es möglich Größe, Granularität und Oberflächenantigenexpression zu beurteilen und so Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden.

Die zu analysierenden Zellen werden in Suspension vom Durchflusszytometer in einer Kapillare aufgenommen und treffen dann einzeln auf einen Lichtstrahl und verschiedene Laser. Die Zellen treten nacheinander in den Strahlengang und streuen bzw. brechen das Licht abhängig von ihren spezifischen Eigenschaften. Diese Emissionen werden wiederum von Fotodetektoren aufgenommen und gespeichert. Es können zwei verschiedene Streuungsmuster unterschieden werden. Das bei flachem Brechungswinkel entstehende Vorwärtsstreulicht (FSC, *Forward Scatter*) gibt Aufschluss über das Volumen der Zellen, das bei Brechung im rechten Winkel entstehende

Seitwärtsstreulicht (SSC, *Sideward Scatter*) über Granularität des Zytoplasmas sowie Aufbau und Größe des Zellkerns.

Außerdem können fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper an Oberflächenantigene und intrazelluläre Moleküle gebunden und deren wellenlängenspezifisches Emissionssignal nach Bestrahlung mit dem Laser von Detektoren erkannt werden. Dies geschieht entweder durch direkte Bindung der fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper an die Zelloberfläche oder nach Permeabilisierung für intrazelluläre Antigene. Der Signalgeber kann entweder ein direkt bindender fluoreszierender Antikörper sein oder ein farbstoffmarkierter Sekundärantikörper, der an einen zuvor applizierten spezifischen Antikörper gegen das gewünschte Molekül bindet. Je nach Stärke des emittierten Signals kann von einer höheren bzw. niedrigeren Expression des untersuchten Antigens auf oder in der Zelle ausgegangen werden und somit eine Charakterisierung der Zelle erfolgen. Durch die Verfügbarkeit mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe mit jeweils unterschiedlichen Wellenlängen ist es möglich, eine Zelle parallel auf mehrere Merkmale hin zu untersuchen. Hierbei ist es essenziell, eine Überlappung des Wellenlängenspektrums der Farbstoffe zu vermeiden. Ist dies nicht immer möglich, kann durch Kompensation, d.h. Subtraktion eines zu ermittelnden Prozentsatzes der Emission, die durch Überschneidung der Emission unterschiedlicher Farbstoffe in ein und demselben Absorptionskanal zustande kommt, gegengesteuert werden. Dies verkleinert das Risiko falsch hoher Werte. Falsch hohe Werte können ebenso eine Folge unspezifischer Bindung der Fluoreszenzfarbstoffe sein. Dieses Risiko wird minimiert, indem mittels unspezifischer Isotyp-Antikörper, die mit dem gleichen Fluoreszenzfarbstoff wie der Detektions-Antikörper gekoppelt wurden, das Maß der unspezifischen Bindungen ermittelt wird. Diese Negativkontrollen dienen als Grenzwert, über dem ein Fluoreszenzsignal als tatsächlich positiv angesehen werden kann.

Die so gewonnenen Datensätze aller Zellen werden in einer Auswertungssoftware analysiert und maximal je zwei Merkmale in Streudiagrammen dargestellt. Innerhalb dieser Streudiagramme ist es möglich, Teilmengen aus der Gesamtheit herauszunehmen und hinsichtlich weiterer Parameter zu typisieren. Dieses Vorgehen wird als *gating* bezeichnet.

Die Durchflusszytometrie ist somit eine sehr detaillierte und auf Grund der hohen analysierbaren Zellzahl (bis zu 1200 Zellen/s) statistisch sehr aussagekräftige Methode und ein wichtiges Verfahren, Organe hinsichtlich der Infiltration von Zellen, bzw. die Zellzusammensetzung des Blutes qualitativ und quantitativ zu beurteilen.

Aufbereitung des Nierengewebes zur Herstellung einer Einzelzellsuspension

Wie oben beschrieben ist für die Durchführung der Durchflusszytometrie die Herstellung einer Einzelzellsuspension notwendig. Nach Entnahme der Nieren wurde deshalb ca. ein Drittel jedes Organs in 1 ml eisgekühlten Paris-Puffer überführt, mit einem Skalpell manuell zerkleinert, in ein Greinerröhrchen überführt und wiederum mit PBS auf 11 ml aufgefüllt. Nach fünfminütiger Zentrifugierung (4°C, 260 g) und Verwerfen des Überstands erfolgte ein Waschschrift mit je 10 ml eisgekühltem HBSS, erneute Zentrifugation bei gleichen Geräteeinstellungen und wiederum das Verwerfen des abzentrifugierten Überstands. Zur weiteren Aufarbeitung der Gewebestückchen erfolgten nun zwei enzymatische Lyseschritte. Zunächst wurden je 5 ml Kollagenase/DNase-Lösung in die Greinerröhrchen gegeben, 20 Minuten inkubiert und wiederum fünf Minuten bei 4°C und 260 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen. Einem Waschschrift mit HBSS folgte ein weiterer Gewebeverdau mit EDTA-Lösung mit ebenfalls 20-minütiger Inkubation. Um größeren Zellschaden zu vermeiden fand die anschließende Zentrifugierung nur bei 30 g statt. Nach diesem Schritt wurde der Überstand in neue Greinerröhrchen überführt, das verbleibende Pellet in 10 ml PBS gelöst und erneut bei 260 g ab zentrifugiert. Anschließend erfolgte zum weiteren Aufbrechen von Zellkonglomeraten ein Ausspritzen durch 26 G- und 29 G-Nadeln in Petrischalen. Anschließend wurden die Proben zu den jeweiligen Überständen aus vorhergegangenen Schritt gegeben. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstands wurden die verbliebenen Zellpellets in je 1 ml FACS-Puffer gelöst und unter Zugabe von 10 ml PBS durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert.

Aufbereitung Blutproben für die Vollblutdurchflusszytometrie

Unmittelbar nach Entnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus wurden etwa 100 µl Vollblut zur Hemmung der Blutgerinnung mit 5 µl 5 M EDTA versetzt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt. Die Erythrozyten wurden mittels *Lysing Solution* (Beckton Dickinson, Heidelberg) zersetzt.

Färbungen

In dieser Arbeit wurde mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-, R-Phycoerythrin (PE)-, PE-Cyanin 5 (PE-Cy5)- und Allophycocyanin (APC)-markierten Antikörpern gefärbt.

Hierbei handelt es sich um Fluorochromfarbstoffe mit unterschiedlichen Emissionsspektren.

Jeweils 100 µl der wie oben beschrieben gewonnenen Einzelzellsuspension wurden in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Dazu wurde ein Mix aus je 5 µl Ratten- und Mausem serum gegeben, um die Fc-Rezeptoren und damit unspezifische Bindungen auf der Zelloberfläche zu blockieren. Anschließend erfolgte die eigentliche Färbung mit verschiedenen Kombinationen aus Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern zur Quantifizierung der renalen Leukozytenpopulationen (siehe Tabelle 7).

Für die Fibrozytenfärbung wurde nach Hinzugabe der Fluorochrom-gekoppelten Antikörper zur Einzelzellsuspension die intrazelluläre Kollagenfärbung vorgenommen. Hierzu wurde die Probe mit 300 µl Cytotfix für 20 Minuten bei 4°C inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Nach entsprechenden Waschschritten erfolgte anschließend die Färbung mit dem Fluorochrom-gekoppelten Kollagen-Antikörper.

Für die Leukozytenfärbung wurden vier Färbeansätze durchgeführt:

1. Ansatz: Cd45-PE, Cd3-FITC, Cd4-APC und Cd8-PE-Cy
2. Ansatz: Cd45-PE, F4/80-APC und Cd11c-FITC
3. Ansatz: Cd45-APC, Cd11b-Percp-cy, Cd11c-PE und Ly6g-FITC
4. Ansatz: Cd45-APC, Cd11b-Percp-cy, Cd11c-PE und Ly6c-FITC

Für die Färbung der Blutproben wurden folgende Ansätze benutzt:

1. Ansatz: Cd45-PE, Cd3-FITC, Cd4-APC und Cd8-PE-Cy
2. Ansatz: Cd45-PEcy5, F4/80-APC und Cd11b-PE, Ly6c-FITC

Für die Färbung der Fibrozyten wurde folgender Ansatz benutzt:

Cd45-PE, Cd11b-FITC, intrazelluläre Färbung für Kollagen1-APC

Tabelle 7: Zellpopulation mit jeweiliger Antikörpermarkierung

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 ⁺
Cd4 ⁺ T-Lymphozyten	Cd45 ⁺ , Cd3 ⁺ , Cd4 ⁺ , Cd8 ⁻
Cd8 ⁺ T-Lymphozyten	Cd45 ⁺ , Cd3 ⁺ , Cd4 ⁻ , Cd8 ⁺
Fibrozyten	Cd45 ⁺ , Cd11b ⁺ , Coll1 ⁺

Aus oben genannten Gründen wurden außerdem Iso-Typ-Kontrollen für bestimmte Farbstoffe durchgeführt. Den Proben wurde FACS-Puffer zugegeben, daraufhin wurden sie bei 4°C für 4 Minuten bei 260 g zentrifugiert. Die Proben wurden bis auf 300 µl abpipettiert und somit überschüssige, nicht gebundene Antikörper entfernt. Nach erneutem Vortexen wurden die Proben der Messung im Durchflusszytometer zugeführt. Die Blutproben wurden nach der Färbung mit einer bekannten Anzahl von *Beads* pro ml versetzt, sodass nach der Messung der Proben die Zählungen auf die Zellzahl/ml umgerechnet werden konnte.

Messung

Die Messung der aufbereiteten Proben erfolgte im FACSCalibur (Becton Dickinson), zur Auswertung der so erstellten Datensets wurde die FACS-Software Cellquest Pro verwendet (siehe Abbildung 6 und 7).

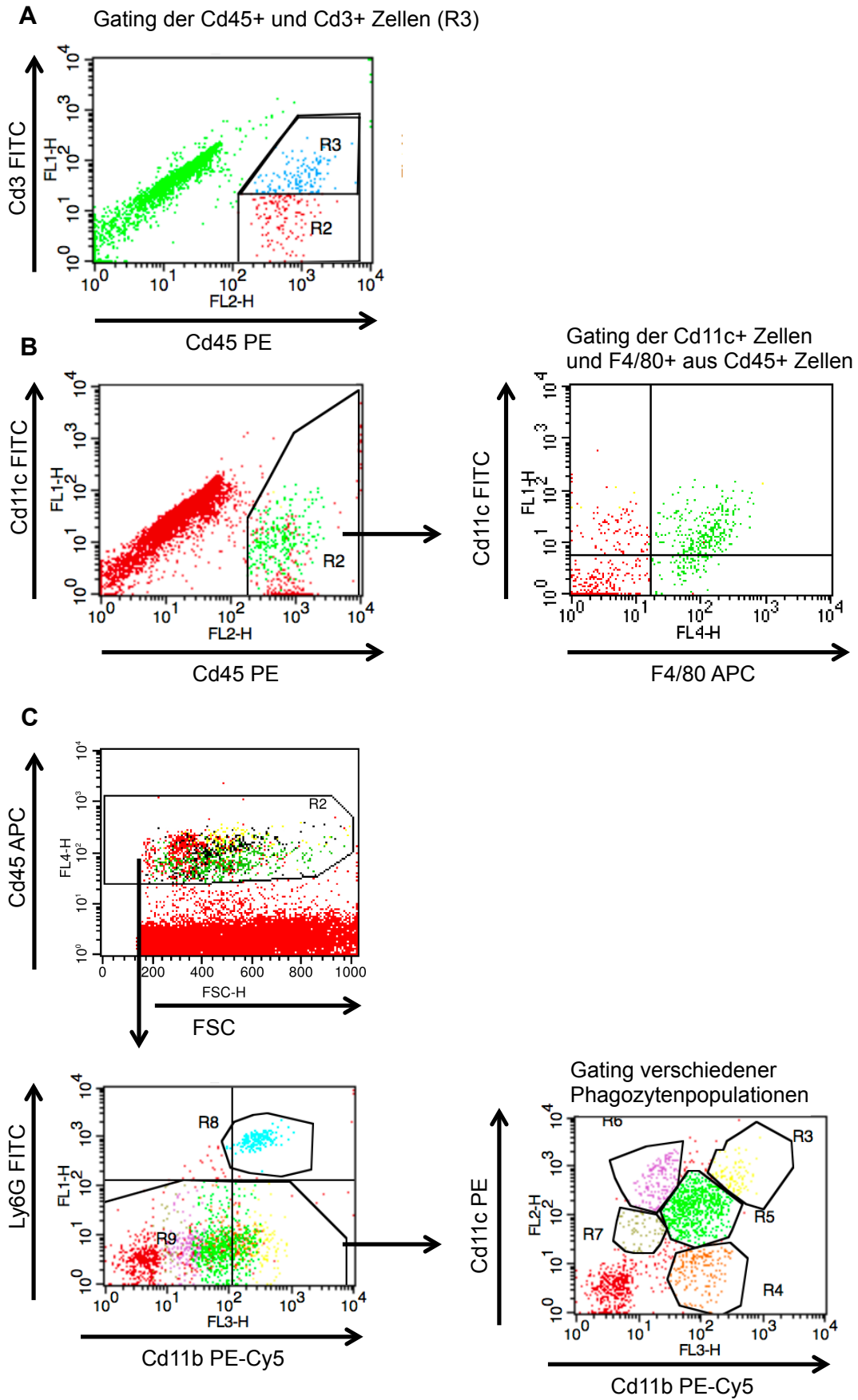


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Gatingstrategie für die Gesamtnierenzellen
 A Darstellung der Gesamtnierenzellen nach Cd45 (R2+3) und Cd3 (R3).

B Exemplarische Abbildung des Gating nach Cd11c und F4/80 mit weiterer Aufteilung in Cd11c⁺ F4/80⁻ und Cd11c⁺ F4/80⁺ Zellen.

C Darstellung des von Lichtnecker et al. [94] beschriebenen Gating renaler Phagozytenpopulationen nach Cd11c und Cd11b. Zunächst erfolgt das Gating nach Cd45⁺ Zellen. Im zweiten Schritt werden Cd11b⁺Ly6g⁺ Granulozyten ausgeschlossen. In der Darstellung entspricht R3 der Cd11b^{high}Cd11c^{high}, R4 der Cd11b^{high}Cd11c^{low}, R5 der Cd11b^{int}Cd11c^{int}, R6 der Cd11b^{low} Cd11c^{high} und R7 der Cd11b⁻Cd11c^{int} Population.

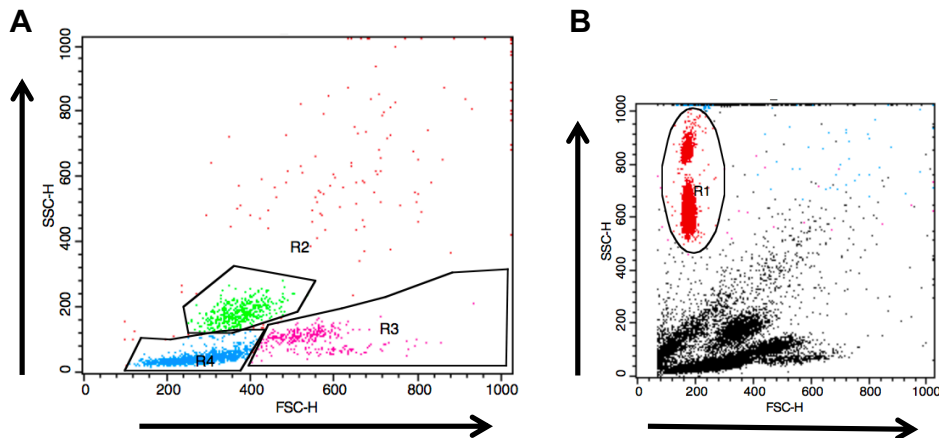


Abbildung 7: Gatingstrategie der Blutproben

A Darstellung des Gatings von Granulozyten (R2), Monozyten (R4) und Lymphozyten (R3) anhand der SSC- und FSC-Eigenschaften.

B Darstellung der verwendeten Beads in der Durchflusszytometrie zur Quantifizierung der Leukozytenpopulationen im Blut.

3.3.2 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Allgemeine Funktionsweise

Der enzymgekoppelte Immunadsorptionstest ist ein hochsensitives Verfahren, mit dessen Hilfe Moleküle verschiedener Klassen, beispielsweise Proteine nachgewiesen werden können. Die Methode bedient sich der hohen Spezifität von Antikörpern für ihr jeweiliges Antigen und der ebenfalls spezifischen Farbreaktion von an Streptavidin gebundenen HRP-Enzymen (*horse radish peroxidase*) mit ihrem Substrat Tetramethylbenzidin (TMB). Von den bekannten Variationen dieser Methode wurde in dieser Arbeit hauptsächlich der sogenannte „sandwich ELISA“ verwendet und soll daher näher beschrieben werden (siehe Abbildung 9). Eine 96-Kammer-Platte wird einige Stunden mit einer Lösung inkubiert, die aus dem in einem Karbonatpuffer (*coating buffer*) gelösten ersten Antikörper (*capture antibody*) besteht. Nach mehrmaligem Waschen im ELISA-Washer muss nun zur Verhinderung unspezifischer Bindung eine Blockierlösung mit bovinem Serumalbumin (BSA) auf die Platte aufgebracht und inkubiert werden (*blocking*). Nach nochmaligem Waschen können nun Analysat und Standardproben aufgebracht werden und in Bindung mit dem *capture antibody* gehen. Nach vorgegebener Inkubationszeit werden die Kammern erneut gewaschen und mit dem

zweiten Antikörper (*detection antibody*) versehen, der hochspezifisch ein anderes Epitop als der zuvor eingesetzte *capture antibody* bindet. Diese für den „sandwich ELISA“ namensgebende Anordnung aus Erstantikörper, Analysat und Zweitantikörper mit HRP löst letztendlich nach Zugabe des TMB-Substrats einen Farbumschlag aus (siehe Abbildung 8). Die Farbreaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt und in seiner Intensität bei 450 nm durch den ELISA reader gemessen. Durch Vergleich mit den applizierten Standards kann die in den Proben enthaltene Konzentration des zu untersuchenden Moleküls errechnet werden. Die Ergebnisse aus Urinproben wurden als Ratio des bestimmten Moleküls und der Urinkreatinin-Konzentration angegeben, um unterschiedliche Urinkonzentrationen zu berücksichtigen.

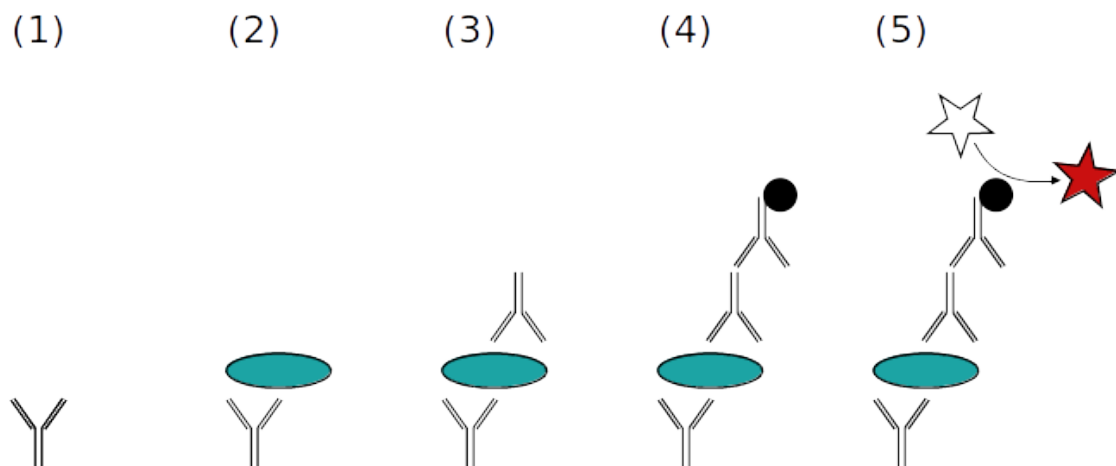


Abbildung 8: Funktionsprinzip des Sandwich-ELISA

(1) Der *capture antibody* wird auf die Platte gegeben; (2) die Probe wird aufgetragen, das Antigen bindet an den Antikörper; (3) der *detection antibody* wird zugefügt und bindet an das Antigen; (4) der enzymgebundene Antikörper wird hinzugefügt und bindet an den *detection antibody*; (5) nach Zugabe des Substrates kommt es zum Farbumschlag. Von Jeffrey M. Vinocur nach GNU Free Documentation License.

Muriner Ccl2 (MCP-1)-, Kim-1- und Ccl5 (Rantes)-ELISA

Die Bestimmung oben genannter Chemokine im Urin wurde mittels ELISA aus Spontanurin durchgeführt. Für alle Proben wurde jeweils eine Verdünnung von 1:10 gewählt.

Muriner Tgf-β1-ELISA

Da Tgf-β1 teilweise in latenter Form vorliegt wurden Urinproben vor ihrer Verarbeitung zunächst mit 1N HCl versetzt, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit

NaOH/HEPES neutralisiert und unverdünnt aufgetragen. Darauf folgten die bekannten Schritte der Methode.

Albumin-ELISA

Die Bestimmung des Albumins wurde mittels ELISA aus Spontanurin durchgeführt. Im Vorfeld wurden je 2 µl der Probe auf Urin-Stix aufgebracht. Je nach Ergebnis der orientierenden Proteinanalyse mittels Stix wurden die Proben verdünnt. Bei schwacher Proteinurie wurden die Proben je 10²-fach und 10³-fach verdünnt, bei starker Proteinurie je 10⁴-fach und 10⁵-fach.

3.3.3 Weitere kolorimetrische Untersuchungen

Im Gegensatz zum ELISA wird der Farbumschlag bei den folgenden kolorimetrischen Verfahren direkt ohne Beteiligung von Antikörpern ausgelöst. Standards in verschiedenen Konzentrationen sowie die zu untersuchende Probe werden auf die Platte aufgetragen, das Substrat hinzugefügt und die Kinetik des Farbumschlags in festgelegten Zeitintervallen mit dem ELISA reader gemessen.

Kreatinin-Bestimmung mittels Jaffé Methode

Die Bestimmung der Kreatininkonzentration im Spontanurin wurde mittels Creatinine FS Kit (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim) durchgeführt. Die Absorptionsmessung erfolgt 60, 180 Sekunden und 20 Minuten nach Substratapplikation bei 492 nm.

Serumharnstoff-Bestimmung

Die Serumharnstoffkonzentration wurde im Zentrallabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV der LMU, Ziemssenstraße 1, in München mittels Autoanalyser bestimmt.

Serumcholesterol-Bestimmung

Die Serumcholesterolkonzentration wurde nach Versenden der Proben von SynLab (Augsburg) bestimmt.

3.4 Glomerulus-Isolation

Um kompartimentspezifische Untersuchungen in Glomeruli und tubulointerstitiellem Gewebe durchführen zu können, wurden aus der Gesamtniere Glomeruli isoliert. Dieses Verfahren wurde ursprünglich im Jahr 2002 von Takemoto et al. beschrieben und geringfügig abgeändert.

Die Methodik beruht auf der hochreinen Trennung von Glomeruli und Tubulointerstitium mittels ferromagnetischer Partikel (Dynabeads) [95].

Zur Durchführung der Methode wurden die Versuchstiere am Versuchsende narkotisiert und arteriell nach Punktion des linken Herzventrikels perfundiert. Es wurde hierfür eine Bead-Lösung verwendet. Diese Lösung bestand aus 200 µl M-450-Epoxy-Dynabeads und 40 ml auf 37°C vorgewärmten PBS. Aufgrund der renalen Gefäßarchitektur und ihrer Größe embolisieren die 4,5 µm großen, beschichteten ferromagnetischen Dynabeads während der Perfusion die glomerulären Kapillaren. Zudem wird durch die Perfusion verbliebenes Blut aus den Nierengefäßen ausgeschwemmt, so dass anschließend die Verarbeitung des Nierengewebes mit minimaler Verfälschung durch nierenfremde Zellen möglich war. Nachdem die gesamte Lösung perfundiert war, erschienen Nieren und Leber gelb-bräunlich entfärbt.

Die Nieren wurden freipräpariert, von ihrer Kapsel befreit und mit einem Skalpell in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert.

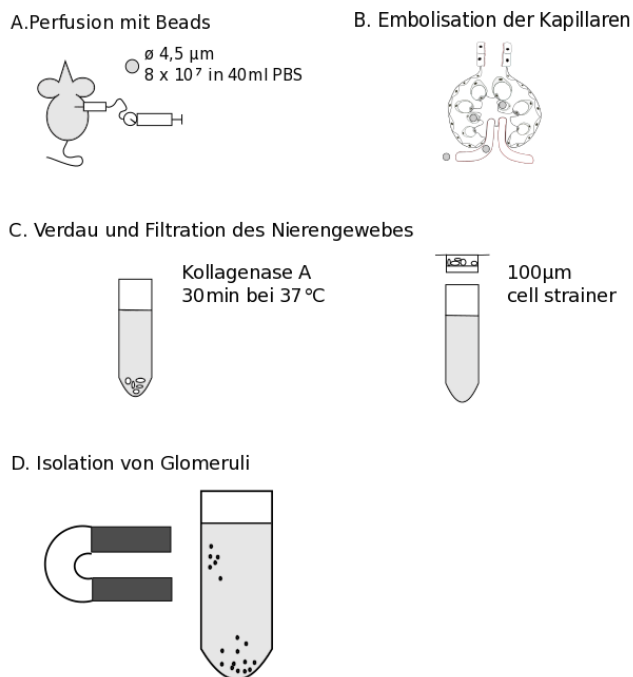


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Glomerulisolation nach Takemoto

Eine Anzahl von 8*10⁷ Beads in 40 ml PBS wird in den Kreislauf des Tiers appliziert. Diese Beads mit 4,5 µm Durchmesser embolisieren die glomerulären Kapillaren. Nach Entnahme beider Nieren wird das Gewebe für 30 min bei 37°C durch Kollagenase A verdaut und anschließend durch einen 100 µm cell strainer gefiltert. Das verbleibende Gewebe wird daraufhin mit Hilfe eines Magnets in Glomeruli und Tubulointerstitium aufgetrennt. Die ausschließlich in den Glomeruli befindlichen magnetischen Beads dienen hierbei als Gegenpol für den Magneten.

Anschließend wurde das Gewebe in 2 ml Kollagenase A (1 mg/ml in HBSS) für 30 min bei 37°C im Thermomixer verdaut. Zur weiteren Zerkleinerung wurde das Gewebe mit Hilfe eines Spritzenpistills durch einen Filter mit 100 µl Porengröße gedrückt und mit 7 ml eisgekühltem PBS nachgespült. Anschließend folgte die eigentliche magnetische Auftrennung der Gewebebestandteile in der Suspension. Da die Glomeruli gegenüber dem Kollagenaseverdau verhältnismäßig resistent sind enthält die Gewebesuspension intakte Glomeruli, tubulointerstitielle Gewebefragmente und Zellen. Die Suspension wurde in 1 ml Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden in eine Magnethalterung gesetzt. Dort wurde die Suspension für 7 min dem Magnetfeld eines Stabmagneten ausgesetzt, der durch die Halterung an einer Seitenwand des Zentrifugenröhrchens angebracht war.

Durch das Magnetfeld werden die nach dem Kollagenaseverdau unverändert intakten Glomeruli mit den embolisierten ferromagnetischen Dynabeads an der Wand des Zentrifugenröhrchens fixiert (siehe Abbildung 9). Dagegen führt der Kollagenaseverdau zur Zerstörung des tubulointerstitiellen Gewebes, sodass ursprünglich in den interstitiellen Kapillaren verbliebene Dynabeads freigesetzt werden und keine tubulointerstitielle Gewebebestandteile zurückgehalten werden. Der verbliebene Überstand, der hauptsächlich tubulointerstitielle Bestandteile enthielt, wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette vorsichtig, ohne die wandständigen Glomeruli abzulösen, in ein weiteres Zentrifugenröhrchen abpipettiert. Die im ersten Zentrifugenröhrchen verbliebenen Glomeruli wurden nach Entfernung des Röhrchens aus dem Magnetfeld mit 10 ml eisgekühltem PBS von dessen Wand gelöst und resuspendiert. Die entstandene Lösung wurde daraufhin wiederholt für 7 min im Magnetfeld aufgetrennt, der Überstand verworfen, das verbliebene Sediment in 4 ml eisgekühltem PBS gelöst und diesmal ohne Einsatz des Pistills durch das 100 µl Sieb gesiebt (siehe Abbildung 10). Das Gesamtvolumen wurde mit PBS auf 10 ml aufgefüllt. Dieser Waschschrift mit Magnetisolation wurde dreimal wiederholt und zum Abschluss die Reinheitskontrolle der glomerulären Fraktion unter dem Mikroskop durchgeführt (siehe Abbildung 10).

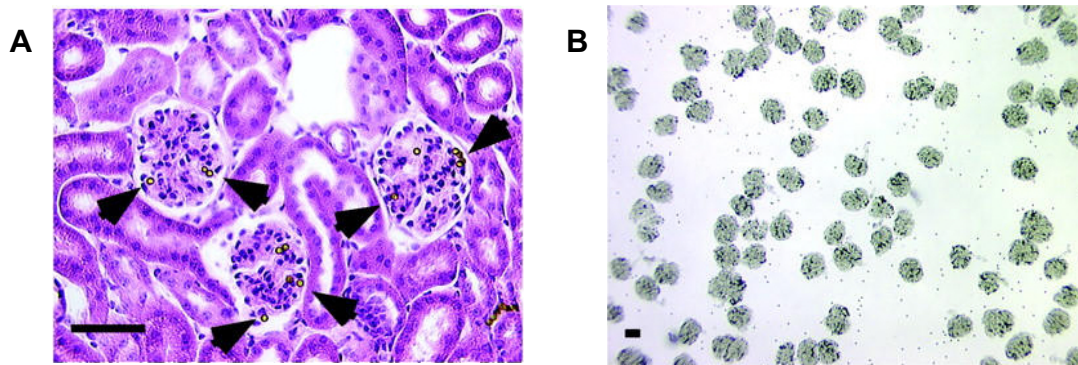


Abbildung 10: Histologische Darstellungen der Magnetisolation

A Murines Nierengewebe nach Perfusion mit Dynabeads (HE-Färbung). Die Pfeilköpfe weisen auf die in den glomerulären Kapillaren liegenden magnetischen Beads.

B Murine Glomeruli nach Isolation. Die Legende zeigt 50µm an. Modifiziert aus [95]

Der anfangs in ein zweites Zentrifugenröhrchen überführte tubulointerstitielle Überstand wurde zur Aufreinigung durch ein 70 µm Sieb pipettiert und bei 4°C mit 300 g für 3 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen, das Sediment mit MACS-Puffer resuspendiert. Die so aufgetrennten Gewebeanteile wurden der RNA-Isolation und PCR zugeführt.

3.5 Histologische Untersuchungen

3.5.1 Aufbereitung des Nierengewebes und Herstellung histologischer Präparate

Die wie oben beschrieben über Nacht in Formalinlösung fixierten Gewebekassetten mit Nierenmittelstücken wurden in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden 2 µm dicke Schnitte der Präparate angefertigt und in einem 40°C warmen Wasserbad aufgefangen. Die Objektträger waren zuvor zweimal mit Aceton für je fünf Minuten und anschließender fünfminütiger Behandlung mit Ammoniumpersulfat-Lösung (5 ml APES in 245 ml Aceton) entfettet worden. Daraufhin wurden die Objektträger mit entmineralisiertem Wasser gespült und luftgetrocknet. Nach der Trocknung konnten die Gewebeschnitte auf die Objektträger aufgebracht und im Trockenschrank über Nacht bei 60°C getrocknet werden. Zur Entparaffinisierung im Vorfeld der Färbung wurden die Schritte dreimal für je 5 min mit Xylol behandelt, in absteigender Alkoholreihe rehydriert (100%, 96%, 70%, 50%) und mit PBS gewaschen.

PAS-Färbung

Mit Hilfe der sogenannten PAS-Reaktion (*periodic acid-schiff*) können kohlenhydrathaltige Gewebebestandteile, z.B. Glykogen und Glykoproteine, sichtbar gemacht

werden. Nach Entparaffinisierung der fixierten Schnitte wurden diese 5 min in 2% Perjodsäure oxidiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Um die gebildeten Aldehydgruppen sichtbar zu machen, wurden die Schnitte daraufhin für 20 min in Schiff'sches Reagenz eingebracht und für 2 min mit Mayer's Hämatoxylin gegengefärbt. Abschließend wurden die Präparate unter fließendem Wasser gespült, in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Eindeckmedium (Pertex) eingebettet.

Immunhistologie

Allgemeines Funktionsprinzip

Anders als in der herkömmlichen Histochemie werden bei der Immunhistochemie Gewebebestandteile mit Hilfe von Antikörpern gefärbt. Diese Antikörper sind entweder direkt farbstoffgekoppelt oder werden in einem zweiten Schritt mittels farbstoffgekoppeltem Sekundärantikörper bzw. Biotin-Streptavidin sichtbar gemacht. Handelt es sich um fluoreszierende Farbstoffe, so spricht man von einer Immunfluoreszenzfärbung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Färbungen mit der Avidin-Biotin-Methode angefertigt. Hierbei bindet ein Primärantikörper an das Epitop der Zielstruktur im Gewebeschnitt. Der gebundene Primärantikörper wird durch einen Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden. Das Peroxidase-konjugierte Avidin bildet im dritten Schritt hochaffine Komplexe mit dem vorhandenen Biotin am Sekundärantikörper. Dort, wo diese Komplexe an der Zielstruktur gebildet wurden, kann ein daraufhin zugegebenes Farbsubstrat von der Peroxidase oxidiert werden. Der resultierende Farbausschlag markiert so die gesuchte Zielstruktur.

Herstellung immunhistochemischer Präparate

Zur Herstellung der immunhistochemischen Färbungen wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte zunächst entparaffiniert, rehydriert und zwei Waschschritten mit PBS für je 7 min unterzogen. Der erste Schritt der Färbung ist die Blockierung endogener Peroxidasen durch 3% Wasserstoffperoxidlösung (30% H₂O₂, 1:10 in Methanol) für 20 min und anschließendes zweimaliges Waschen mit PBS für 7 min. Die Antigene wurden durch eine Behandlung der Schnitte mit 3 ml Antigen-Unmasking-Lösung und 300 ml ddH₂O durch Erhitzung in der Mikrowelle freigelegt. Es folgten zwei weitere Waschschrritte mit PBS. Nach Abkühlen der Schnitte wurde das in den Schnitten enthaltene endogene Biotin mit Avidin für 15 min geblockt. Nach einem weiteren kurzen Waschen, 15-minütiger Inkubation mit Biotin und erneutem zweimaligen Waschen mit PBS für je 7 min wurden die Schnitte nun für 10 min mit 10% Ziegen Serum inkubiert. Dies dient

der Vermeidung unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers. Die Antikörper wurden aufgetragen und nach Herstellerangaben inkubiert. Nach erneutem 7-minütigem Waschen mit PBS wurde die ABC-Substratlösung (15 µl Reagenz A und 15 µl Reagenz B zu 1 ml PBS) der sekundären Antikörper hinzugefügt, für 30 min inkubiert, und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Schnitte für 5 min mit TRIS-Hydrochlorid gewaschen. Es folgten die Färbung mit DAB-Lösung für 1-10 min, die Kontrolle der Intensität mittels Mikroskopie sowie die Gegenfärbung mit Methylgrün. Anschließend wurden die Schnitte zunächst zwei Mal für 10 s in 96% Ethanol gewaschen, daraufhin drei Mal in 100% Ethanol. Schlussendlich wurden die Schnitte mit einem Tropfen VectaMount versehen und mit Deckgläschen verschlossen.

Immunfluoreszenz

Zur Herstellung der Nephrin-Wt1-Immunfluoreszenzfärbung wurden 2 µm dicke Paraffinschnitte entparaffiniert, rehydriert und zwei Waschschritten mit PBS für je 7 min unterzogen. Die Antigene wurden durch eine Behandlung der Schnitte mit 3 ml Antigen-Unmasking-Lösung, 300 ml H₂O und viermalige Erhitzung in der Mikrowelle für je 180 s freigelegt. Es folgten zwei weitere Waschschrritte mit PBS. Nach Abkühlen der Schnitte wurde das in den Schnitten enthaltene Biotin mit Avidin für 15 min geblockt. Nach einem weiteren kurzen Waschen, 15-minütiger Inkubation mit Biotin und erneutem zweimaligen Waschen mit PBS für je 7 min wurden die jeweiligen Antikörper aufgetragen. Zunächst wurde auf jeden Gewebeschnitt 50-100 µl des 1:100 mit PBS verdünnten Hamster Anti-Mensch-Nephrin-Antikörpers aufgebracht und für 60 min inkubiert. Es folgte ein 7-minütiger Waschschrtritt. Nun wurden ebenfalls 50-100 µl des 1:100 verdünnten Alexa-488-konjugierten Antikörpers als sekundärem Detektionsantikörper zugegeben und für 30 min inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS für je 7 min wurde der Ratte anti-Kaninchen-WT1-Antikörper, ebenfalls je 50-100 µl in der Verdünnung 1:25 zugegeben. Die Inkubation dauerte 60 min. Einem weiteren 7-minütigen Waschschrtritt folgte die Auftragung von 50-100 µl des 1:200 verdünnten sekundären Anti-Kaninchen-Cy3-Antikörpers mit 30-minütiger Inkubation. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS für je 7 min wurden die Gewebeschnitte mit einem Tropfen VectaMount und einem Deckgläschen verschlossen.

3.5.2 Histologische und immunhistologische Auswertung

Glomerulosklerose in der Lichtmikroskopie

Die PAS-Färbung wurde in 400-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop ausgewertet. Je Niere wurden alle in der Rindenregion auffindbaren, mittig angeschnittenen Glomeruli gezählt und als sklerosiert bzw. unauffällig bewertet. Aus der ermittelten Anzahl je Kategorie wurde der prozentuale Anteil sklerosierter Glomeruli pro Tier berechnet. Die Auswertung wurde stets unter Verblindung durchgeführt.

Tubulointerstitieller Schaden in der Lichtmikroskopie

Das Ausmaß des sekundären Tubulusschadens wurde ebenfalls in der PAS-Färbung semiquantitativ evaluiert. Hierzu wurde für jedes Tier ein morphometrischer Score mit Beurteilung vier tubulointerstitieller Schadensmarker auf einer Skala von 0-4 erhoben: Tubuläre Dilatation, Tubuluszellabflachung, Tubuluszellverlust und intraluminaler Zylinder [96].

Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Cd3⁺ T-Zellen wurden in 10 Gesichtsfeldern (Vergrößerung 200x) des Interstitiums pro Niere eines Versuchstiers gezählt. Analog hierzu wurden Cd3⁺ Zellen in 50 Glomeruli pro Versuchstier ausgezählt. Das Ausmaß der Infiltration von F4/80⁺ Makrophagen wurde mittels ImageJ errechnet. Hierfür wurde von je 5 digitalen Fotografien (Vergrößerung 200x) pro Niere der prozentuale Flächenanteil mit positiver F4/80-Färbung am Gesamtbild ausgewertet. Die Er-Hr3 Färbung dient zur Identifizierung inflammatorischer Makrophagen. Er-Hr3⁺ Zellen wurden in je 10 Gesichtsfeldern (Vergrößerung 200x) pro Maus ausgezählt. Mac2⁺ glomeruläre Makrophagen wurden in je 30 Glomeruli (Vergrößerung 200x) pro Maus ausgezählt. Wt1/Nephrin wurde an Paraffinschnitten mittels Fluoreszenz-markierter Antikörpern gefärbt. Doppelt positive Zellen wurden als Podozyten gewertet und pro Glomerulus (mindestens 14 Glomeruli pro Schnitt) gezählt. Für die Cd31-Färbung wurden mindestens 20 digitalen Fotografien je Schnitt aufgenommen (Vergrößerung 200x), mittels ImageJ Binärbilder erstellt und der prozentuale Anteil der Färbung pro Glomerulusfläche errechnet. Die unterschiedliche Anzahl an ausgezählten Schnitten, Gesichtsfeldern bzw. Glomeruli kommt durch die Qualität der Färbungen und die Anzahl der mittig angeschnittenen Glomeruli pro Schnitt zustande.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 RNA Isolation

Zum Schutz der RNA wurde auf einen möglichst RNase-armen Arbeitsplatz geachtet. Die RNA-Isolierung wurde mittels PureLink RNA Mini Kit (Ambion) durchgeführt. Das Nierengewebe wurde nach Entnahme für die spätere Verarbeitung in RNA-Lyse-Puffer eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Gewebe in 350 µl RNA-Lyse-Puffer mit 1% β-Mercaptoethanol überführt und via Ultra Turrax zerkleinert. Anschließend wurde 350 µl 70% nicht vergälltes Ethanol zugegeben und das homogenisierte Gewebe gründlich gevortext. Das Gesamtvolumen von 700 µl wurde anschließend auf die Filtersäulen des Isolationskits pipettiert. In den Filtersäulen wurde die RNA nach der darauffolgenden Zentrifugation (15 s bei 13500 g) gebunden. Das verbliebene Filtrat wurde abgegossen. Die Filtersäule wurde mit Hilfe von 700 µl *Wash-Buffer 1* und 15-sekündiger Zentrifugation bei 13500 g von Ethanolrückständen befreit. Das Filtrat wurde wiederum abgegossen und verworfen. Es folgten zwei weitere Wasch-Schritte mit *Wash-Buffer 2*, Entfernung des Filtrats und anschließend eine 2-minütige Zentrifugation bei 13500 g zur Trocknung der Filtermembran. Die so in den Filtersäulen aufgereinigte RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser nach einminütiger Inkubation gelöst und in RNase-freien Behältern aufgefangen. Im Anschluss wurde die RNA entweder direkt zu cDNA umgeschrieben oder bei -80°C eingefroren.

Zur Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der RNA wurde ein Photometer (Nano-Drop) verwendet. Hierbei wurden 2 µl der Probe mit isolierter RNA auf den Probenabnehmer des Photometers aufgetragen und die Extinktion bei $\lambda=260$ nm (RNA, DNA) und $\lambda=280$ nm (Protein) gemessen. Bei einem Koeffizienten ($260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$) von $> 1,8$ bzw. < 2 wurde von der Reinheit der Probe, anderenfalls von einer Kontamination mit Protein, genomischer DNA oder aromatischen Substanzen ausgegangen. Bei 260 nm entspricht eine optische Dichte von OD =1 einer RNA-Konzentration von 40 ng/µl. Daraus lässt sich die Konzentration der RNA-Proben mittels photometrischer Messung berechnen (siehe Formel 1).

Formel 1: Errechnung der Konzentration isolierter RNA

(Konzentration [ng/µl] = E260 x Verdünnung x 40)
--

3.6.2 Umschreibung zu cDNA

Für die quantitative RT-PCR-Analyse ist zunächst eine reverse Transkription der RNA in cDNA nötig. Im ersten Schritt der Umschreibung wurden die Proben im Thermomixer für 5 min bei 65°C erhitzt und dann direkt auf Eis bei 4°C gelagert. Alle weiteren Schritte wurden ebenfalls auf Eis pipettiert.

Um gleiche Konzentrationen an RNA für die Umschreibung zu erhalten wurden die Proben verdünnt. Hierbei sollten 13,2 µl RNA-Lösung genau 1 µg RNA enthalten. Dieses Volumen wurde anschließend in umzuschreibendes Volumen (RT+) und Negativkontrolle (RT-) aufgeteilt. Entsprechend wurden zwei Ansätze des unten näher beschriebenen Mastermixes angefertigt, die sich lediglich in der Präsenz (RT+) oder Abwesenheit (RT-) der reversen Transkriptase (*Superscript II*) unterscheiden. Zum RT- Ansatz wurde RNase-freies Wasser zum Volumenausgleich pipettiert. Die Menge des anzusetzenden Gesamtvolumens berechnet sich aus der Probenzahl mal 6,37 µl Reaktionsgemisch (Tabelle 8).

Tabelle 8: Mastermixansatz für reverse Transkription

Volumen [µl]	RT-	RT+
4	5x Puffer	
0,4	25 mM dNTP	
1	0,1 M DTT	
0,5	40 U/µl RNasin	
0,25	Acrylamid 15 µg/ml	
0,215	Hexanukleotid Primer	
0,43	Superscript II	H ₂ O
13,2	Probe	
	Σ 20 µl	

Das Gesamtvolumen von 20 µl RNA-Reaktions-Gemisch wurde für die cDNA-Synthesereaktion insgesamt 90 min bei 42°C im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch fünf-minütiges Erhitzen auf 85°C gestoppt und die Proben nach kurzer Zentrifugation mit 9400 g bei -20°C gelagert.

3.6.3 Quantitative Real-time PCR

Allgemeines Funktionsprinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein molekularbiologisches Standardverfahren, das die Vervielfältigung von DNA ermöglicht. Die

Vervielfältigung findet hierbei in den sich immer wieder wiederholenden drei Schritten Denaturierung, Hybridisierung und Amplifikation statt. Die Denaturierung bezeichnet das Auftrennen des DNA-Doppelstrangs in komplementäre Einzelstränge durch Erhitzen auf 95°C. Bei der Hybridisierung lagern sich die Primer nach Abkühlen auf 65°C an die Einzelstränge an. Primer sind kurze Sequenz-komplementäre Oligonukleotide, die spezifisch an den Enden des DNA-Abschnitts, der amplifiziert werden soll, hybridisieren. In der Amplifikation folgt bei 72°C die Elongation des gebundenen Primers und damit die Synthese eines komplementären DNA-Strangs durch die hitzestabile DNA-Polymerase. Ideeller Weise verdoppelt sich so die Kopienzahl der Zielsequenz in jedem solchen Zyklus, so dass nach 30-35 Wiederholungen selbst kleinste Mengen der Zielsequenz soweit vervielfältigt worden sind, dass sie quantitativ erfassbar sind (siehe Tabelle 9). In realiter ist die Effizienz der Reaktion <2, was vornehmlich an der Bindungsaffinität und Spezifität der Primer an der Ziel- oder auch an Fremdsequenzen liegt.

Tabelle 9: Zeitschema für die PCR

	Dauer (min)	Temperatur (°C)	
Vorabdenaturierung	5	95	
Denaturierung	0,25	95	40x Wiederholung
Hybridisierung	0,75	60	
Extension	0,5	72	
Schmelzkurve	0,08	95	
	10	schrittweise Steigerung von 65 auf 95	

Die Real-time PCR ist eine besondere Form der PCR. Sie macht sich das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, kombiniert mit der Möglichkeit einer zusätzlichen Quantifizierung der amplifizierten DNA mit Hilfe eines Doppelstrang-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes, zu nutze. Die Messungen finden während der PCR-Zyklen in Echtzeit statt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für diese Methode der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I benutzt. Hierbei handelt sich um ein asymmetrisches Cyanin, das sich als interkalierender Farbstoff in den DNA-Doppelstrang einlagert und dessen Fluoreszenz nach Bindung an die DNA steigt. Die Fluoreszenz nimmt proportional zu der Menge an in der PCR vervielfältigten Nukleinsäuren zu. Der sogenannte CT-Wert (*cycle threshold*) beschreibt die Zykluszahl, ab der sich das Fluoreszenzsignal der Proben deutlich vom Hintergrund abhebt und exponentiell ansteigt. Nach Normalisierung

des CT-Wertes des Zielgenes (siehe Formel 2) auf den CT-Wert der ribosomalen RNA 18S, welche im Rahmen dieser Arbeit als Housekeeping Gene fungiert, wurden die Expressionsniveaus der analysierten Proben zwischen Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren verglichen und graphisch aufbereitet.

Formel 2: Normalisierung des CT-Wertes des Zielgens auf den CT-Wert der rRNA

$$\text{mRNA} / 18\text{S rRNA} = 2^{(\text{CT}_{18\text{S}} - \text{CT}_{\text{gene of interest}})}$$

Die Daten wurden stets nur dann analysiert, wenn an Hand der im Anschluss an die PCR durchgeführten Schmelzkurvenanalyse keine Hinweise auf die Entstehung unspezifischer Produkte gefunden wurden. Die Identifizierung mehrerer Schmelzpunkte in einer Probe lässt den Verdacht zu, dass entweder die Generierung des Komplementärstranges der Zielsequenz während der Amplifikation nicht vollständig abgelaufen ist oder die Primer schon in der Annealingphase an mehrere Sequenzen gebunden haben und so unterschiedliche Produkte entstanden sind. In beiden Fällen korreliert die gemessene Fluoreszenzintensität nicht mehr streng mit der Kopienzahl der intendierten Zielsequenz, was zu einer falsch hohen Annahme der Expression des Zielgens in einer Probe führt.

Durchführung

Zunächst wurden beiden die wie oben dargestellt umgeschriebenen cDNA-Ansätze (RT+ und RT-) mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt. Zu jeweils 2,2 µl beider Proben wurden anschließend 18 µl des PCR-Mixes gegeben. Dieser bestand aus den folgenden Ingredienzien:

10 µl Mastermix mit SYBR Green

0,6 µl jeweils des Primers (vorwärts bzw. rückwärts) der Zielsequenz

0,16 µl Taq-Polymerase

6,64 µl RNase-freies Wasser

Die Proben wurden daraufhin in Duplikaten auf eine 96-well-Lightcycler-Platte aufgetragen. Als Negativkontrollen wurde für jedes untersuchte Gen das Probenvolumen durch Wasser ersetzt (*non template control*). Nach Abdichtung der Platte mit einer Folie und Zentrifugation wurde die eigentliche PCR durchgeführt.

Für alle Messungen im Rahmen dieser Arbeit wurde der Lightcycler 480 von Roche und die Lightcycler 480 Software (Version 1.2.9.11), ebenfalls von Roche, verwendet. Als *Houskeeping*-Gen wurde die 18S rRNA benutzt. Bei eventueller Verunreinigung in der RT-cDNA oder der Taq-Polymerase wurde die real-time-PCR wiederholt oder gegebenenfalls die Probe verworfen. Alle in dieser Studie verwendeten Primer wurden so ausgewählt, dass ihre Annealingtemperatur bei 60°C liegt.

3.6.4 Weitere molekularbiologische Methoden

Serumprotein-Bestimmung

Die Serumproteinkonzentration wurde nach Versenden der Proben von SynLab (Augsburg) mittels Autoanalyser bestimmt.

3.7 Statistische Methoden

Die gewonnenen Daten wurden via Microsoft Excel oder GraphPad Prism ausgewertet und unter Benutzung von Mittelwert und zugehöriger Standardabweichung (*SD*) dargestellt. In Einzelfällen sind die Fehlerbalken als *standard error of the mean (SEM)* dargestellt. Dieser errechnet sich aus dem Quotienten der Standardabweichung und der Quadratwurzel der Versuchstieranzahl in einer Gruppe. Die Anwendung von *SD* oder *SEM* ist in der jeweiligen Abbildung gekennzeichnet.

Falls der Datensatz nach Shapiro-Wilk-Test normalverteilt und nach Levene's Test homoskedastisch war, wurden die Gruppen mittels gepaartem Student's t-test verglichen. Andernfalls kam der Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Von einem statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen wurde bei einem p-Wert <0,05 ausgegangen. Im Fließtext erscheinen diese Werte als *statistisch signifikant* oder *signifikanter* Unterschied. Die verschiedenen Signifikanzniveaus wurden wie folgt gekennzeichnet:

- * p<0,05
- ** p<0,01
- *** p<0,001.

4 Ergebnisse

4.1 Glomeruläre Veränderungen im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie

Um eine mögliche pathophysiologische Bedeutung des Ccl2-Ccr2-Signalweges im Verlauf der FSGS näher zu charakterisieren wurde zunächst die glomeruläre Expression der Chemokine Ccl2 und Ccl5 im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie untersucht.

Glomeruli wurden nach einem von Takemoto beschriebenen, paramagnetischen Verfahren bei Wildtypmäusen mit Adriamycin-Nephropathie isoliert [95]. Es erlaubt die Trennung von Glomeruli und Tubulointerstitium, sodass anschließend kompartimentspezifische Expressionsanalysen durchgeführt werden können.

Vorab wurde zusätzlich ein kleiner Anteil Nierengewebe für die histologische Aufarbeitung fixiert. Im folgenden Experiment wurden aus Wildtyptieren vor der ersten Adriamycin-Injektion (Tag 0) sowie an Tag 7, Tag 14 und Tag 28 nach der ersten Adriamycin-Injektion Glomeruli und tubulointerstitielles Gewebe isoliert und mRNA extrahiert. Histologisch zeigte sich wie vorbeschrieben [97] eine fokal segmental ausgeprägte progrediente Glomerulosklerose bis Tag 28 des Experiments (Abbildung 11).

Nephrin ist ein Protein, das maßgeblich an der Bildung der Schlitz-Membran und Interaktion zwischen Podozyten beteiligt ist [98, 99]. Nephrin kann daher als Marker der Integrität von Podozyten und damit auch der Filtrationsbarriere verwendet werden. In den Adriamycin-behandelten Tieren zeigte sich ein progredienter Verlust des podozytären Nephrin im isolierten Glomerulusgewebe korrelierend mit der histopathologisch zunehmenden Schädigung. Im isolierten Interstitium hingegen war die Expression von Nephrin in allen Gruppen wie zu erwarten kaum nachweisbar (nicht dargestellt). Dies spricht für die Reinheit der kompartimentspezifischen Gewebeisolation. Die kompartimentspezifische Analyse der renalen Chemokinexpression zeigte, dass die glomeruläre Expression von Ccl2 nach Administration von Adriamycin ansteigt und an Tag 28 deutlich induziert ist. Die glomeruläre Expression von Ccl5 wurde ebenfalls induziert, allerdings in geringerem Maße (siehe Abbildung 12).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell der Adriamycin-Nephropathie Charakteristika einer FSGS mit deutlicher Podozytenschädigung aufweist. Die zunehmende Podozytenschädigung und glomeruläre Sklerose korreliert hierbei mit einer zunehmenden glomerulären Expression von CCL2. Die Ergebnisse unterstützen daher die Hypothese, dass die glomeruläre Schädigung und

Ergebnisse

Sklerose in der FSGS auch über eine Aktivierung des CCL2-CCR2-Signalwegs vermittelt wird.

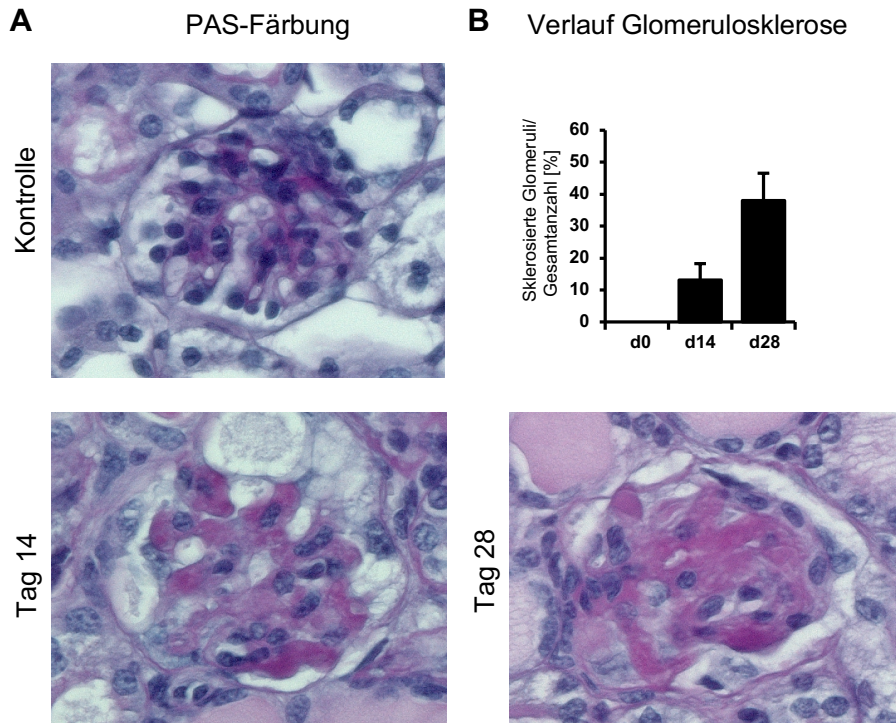


Abbildung 11: Glomerulosklerose im Verlauf der FSGS

Zunehmende Entwicklung glomerulosklerotischer Läsionen im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie
A Exemplarische Darstellung eines gesunden Glomerulus und von Glomeruli mit FSGS-typischen Läsionen an Tag 14 und Tag 28.

B Auswertung mittels Berechnung des Anteils sklerosierter Glomeruli an der Gesamtzahl eines histologischen PAS-Präparates. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit $n = 5-9$ je Zeitpunkt.

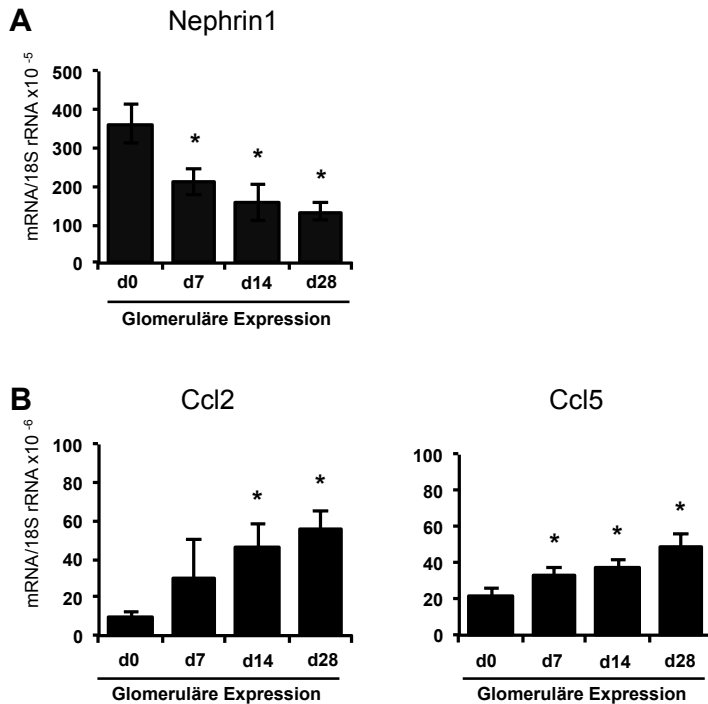


Abbildung 12: Glomeruläre Expressionsveränderungen in der Adriamycin-Nephropathie

A Glomeruläre Expression von Nephrin in vivo an Tag 0, Tag 7, Tag 14 und Tag 28 im Modell der Adriamycin-Nephropathie. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=5 \pm \text{SEM}$. **B** Glomeruläre Expression von CCL2 und CCL5 in vivo an Tag 7, Tag 14 und Tag 28 im Modell der Adriamycin-Nephropathie verglichen mit NaCl-behandelten Kontrolltieren. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=5 \pm \text{SEM}$.

4.2 Die Ccr2-defiziente Maus im Modell der Adriamycin-Nephropathie

Im Rahmen dieser Studie wurden die Effekte einer Ccr2-Defizienz auf den Verlauf der Adriamycin-Nephropathie untersucht. Dazu wurde eine von PD Dr. Bruno Luckow generierte Ccr2-defiziente Mauslinie im BALB/c-Hintergrund verwendet.

4.2.1 Funktionelle Nierenparameter

Proteinurie und Serumparameter des nephrotischen Syndroms

Nach Schädigung der podozytären Schlitzmembran kommt es zum Übertritt von Proteinen in das Ultrafiltrat. Hauptvertreter dieser Proteine ist das Albumin, und somit im Urin gemessen ein verlässlicher Indikator für die Funktion bzw. Intaktheit der glomerulären Filtrationsbarriere. Das Ausmaß der Albuminurie wurde mittels ELISA aus Spontanurin der Versuchstiere an Tag 0, 7, 14, 21, und 28 nach Induktion der Adriamycin-Nephropathie bestimmt. Um mögliche Verdünnungseffekte im Spontanurin zu berücksichtigen wurden die Albuminwerte mit Hilfe der Kreatininbestimmung im Urin normiert und sind als Albumin/Kreatinin-Ratio in $\mu\text{g}/\text{mg}$ dargestellt. Vor Induktion

der Nephropathie durch Injektion von ADR zeigten beide Versuchsgruppen vergleichbar niedrige Albuminuriewerte. Dies lässt darauf schließen, dass beide Genotypen zu Beginn des Versuchs nierengesund waren. Nach der ersten Adriamycin-Injektion zeigte sich in Wildtyp-Tieren ein rascher Anstieg der Albuminurie im Sinne einer initialen Schädigung. Im Verlauf sinkt das Ausmaß der Proteinurie wieder ab, was durch eine zwischenzeitliche Regeneration der Niere erklärt werden kann. Durch eine zweite Adriamycin-Injektion an Tag 14 der Studie wird ein erneuter Anstieg mit progredienter Proteinurie hervorgerufen (siehe Abbildung 13). Die Ccr2-defizienten Tiere entwickeln nach Adriamycin-Injektion ebenfalls eine Proteinurie, deren Ausmaß jedoch niedriger als in der Wildtyp-Gruppe ist. In der Ccr2-defizienten Gruppe gipfelt die Proteinurie wie in der Wildtyp-Gruppe nach der zweiten Adriamycin-Injektion und nimmt anschließend wieder ab. In der Zusammenschau weist die verminderte Albuminurie über den gesamten Zeitraum des Versuchs auf einen insgesamt geringeren glomerulären Schaden in den Ccr2-defizienten Tieren verglichen mit Wildtyp-Tieren hin.

Der renale Proteinverlust kann im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie wie bei der humanen FSGS zu einer Hypoproteinämie, Hypoalbuminämie und Hypercholesterolämie im Rahmen eines sich manifestierenden nephrotischen Syndroms führen. In den durchgeführten Versuchsserien zeigte sich allerdings in beiden Versuchsgruppen an Tag 28 keine Hypoprotein- oder Hypoalbuminämie (siehe Abbildung 13 B, C).

Dagegen wiesen Wildtyp-Tiere an Tag 28 eine deutliche Hypercholesterinämie auf, während Ccr2-defiziente Mäuse verminderte Cholesterinwerte zeigten (Abbildung 13 D). Insgesamt weisen die geringere Albuminurie und Cholesterolämie auf eine verminderte Ausprägung des nephrotischen Syndroms in Ccr2-defizienten Mäusen hin.

Serumkreatinin- und Harnstoffwerte

Nachdem die Analyse der Albuminurie auf eine geringere Schädigung der Filtrationsbarriere in den Ccr2-defizienten Mäusen schließen lässt, wurde im Weiteren die exkretorische Nierenfunktion überprüft. Hierfür wurde die Konzentration von Kreatinin und Harnstoff als renale Retentionsparameter bestimmt. Die Blutentnahme erfolgte an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie, zum Zeitpunkt der maximalen Albuminurie in der Wildtyp-Gruppe.

Es zeigten sich tendenziell verminderte Kreatinin- und signifikant niedrigere Harnstoffwerte im Serum der Ccr2-defizienten Mäuse hinweisend auf eine geringer ausgeprägte Einschränkung der Nierenfunktion in Ccr2-defizienten Tieren (siehe Abbildung 13).

Ergebnisse

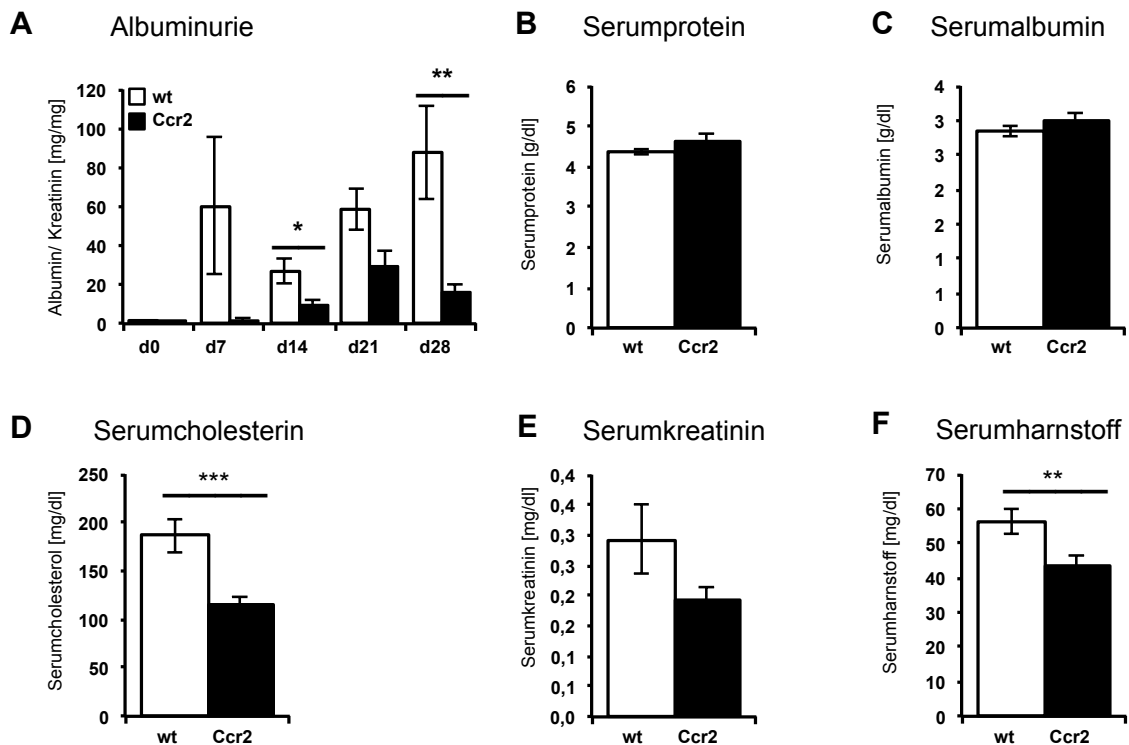


Abbildung 13: Funktionelle Nierenparameter

A Albuminurie im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie in Wildtyp- und Ccr2-defizienten Mäusen. Dargestellt ist die Albumin/Kreatinin-Ratio im Verlauf der Nephropathie.

B Serumprotein an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Mäusen. BALB/c Tiere weisen physiologisch eine Serumproteinkonzentration von ca. 4 g/dl auf.

C Serumalbumin an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Mäusen.

D Serumcholesterin an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Mäusen.

E Serumkreatinin an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Mäusen.

F Harnstoff an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Mäusen.

Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM aus einem Experiment mit n=11-12 je Gruppe.

Insgesamt weisen die funktionellen Daten auf eine deutlich geringere renale Gewebeschädigung in Ccr2-defizienten Mäusen mit Adriamycin-Nephropathie hin. Das Ausmaß des Nierenschadens wurde im Folgenden histopathologisch zwischen Wildtyp- und Ccr2-defizienten Mäusen an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie untersucht.

4.2.2 Struktureller Schaden

Um zu prüfen, ob die geringere funktionelle Einschränkung in Ccr2-defizienten Tieren auch mit einer verminderten renalen Gewebeschädigung korreliert, wurden mit Hilfe verschiedener histologischer Färbungen unterschiedliche Parameter des Nierenschadens beider Gruppen an Tag 28 beurteilt.

Glomerulärer Schaden

Die Lichtmikroskopie zeigte einen fokal glomerulosklerotischen Phänotyp mit segmentaler Hyalinisierung und Kapillarkollaps. In der PAS-Färbung wurde der Anteil sklerosierter Glomeruli pro Gesamtanzahl ermittelt. Hierbei ergaben sich 1,7-fach niedrigere Werte in den Tieren mit Ccr2-Defizienz als in den Wildtyp-Tieren (Abbildung 14 A).

Ein podozytärer Schaden stellt bei der FSGS den Ursprung der glomerulären Sklerosierung dar. Neben einigen anderen Zelltypen exprimieren auch Podozyten den Rezeptor CCR2, durch dessen Aktivierung Podozyten stimuliert und zur Apoptose angeregt werden [73]. Zur Beurteilung der glomerulären Podozyten wurde eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit Wt1 und Nephrin angefertigt. Nachdem Podozyten jeweils beide Marker tragen, wurden doppeltpositive Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie als Podozyten gewertet. Ihre Anzahl pro Glomerulus wurde ausgezählt. Beide Genotypen zeigten eine verminderte Anzahl an Podozyten im Vergleich zu gesunden Nieren hinweisend auf den Adriamycin-induzierten Podozytenschaden. Zwischen den beiden Gruppen des Experiments lag jedoch ein vergleichbarer Podozytenverlust vor (siehe Abbildung 14 B). Passend hierzu zeigte sich eine ähnlich verminderte glomeruläre Expression von Nephrin in beiden Gruppen (siehe Abbildung 14 B).

Cluster of differentiation 31 (CD31), auch *Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)* genannt, wird als Marker für Endothelzellen verwendet. Im Rahmen dieser Studie wurde die glomeruläre Expression von Cd31 in beiden Gruppen ermittelt, um eine Schädigung endothelialer Zellen im Rahmen der Glomerulosklerose zu erfassen. Ähnlich zu vergleichbarer Podozytenzahl und Nephrinexpression zeigten sich in der Wildtyp- und Ccr2-defizienten Gruppe vergleichbare Cd31-Werte (siehe Abbildung 14 C).

Ergebnisse

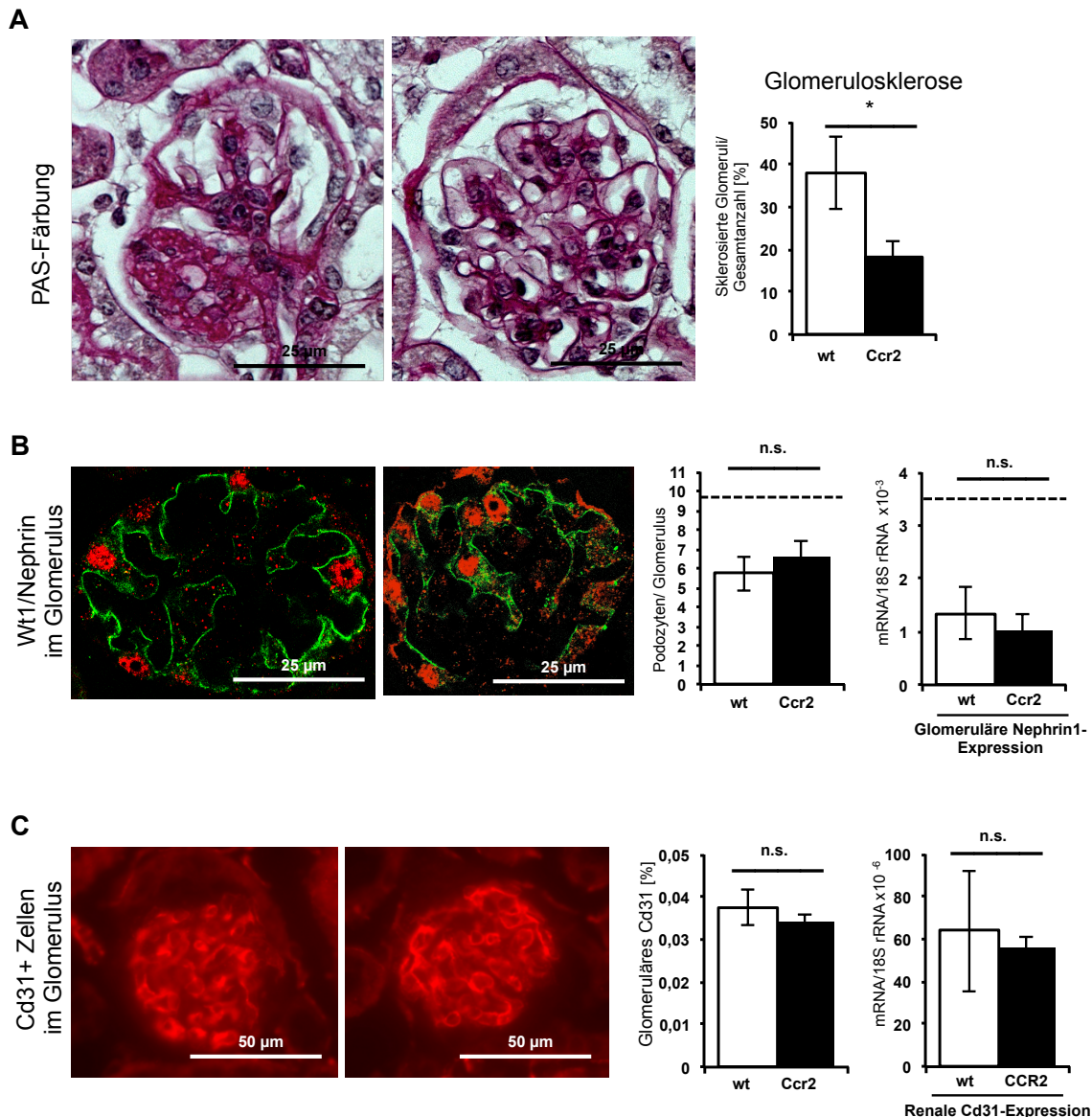


Abbildung 14: Beurteilung des glomerulären Schadens in der Adriamycin-Nephropathie

A Ausmaß der Glomerulosklerose in der Adriamycin-Nephropathie an Tag 28 bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren. Beurteilung durch Auszählung des Anteils sklerosierter Glomeruli an der Gesamtzahl in der PAS-Färbung. Exemplarisch ist je ein Glomerulus beider Gruppen in der PAS-Färbung dargestellt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit $n=9$.

B Anzahl intakter Podozyten pro Glomerulus bei Wildtyp und Versuchsgruppe dargestellt in der WT1/Nephrin-Färbung. Ein Glomerulus je Gruppe ist exemplarisch in o.g. Färbung abgebildet. Die gestrichelte Linie illustriert die mittlere Podozytenanzahl gesunder Mäuse. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit $n=7$ je Gruppe. Glomeruläre Expression von Nephrin 1 bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=5 \pm$ SEM. Die gestrichelte Linie illustriert die mittlere Nephrinexpression gesunder Mäuse.

C Glomeruläre Cd31-Färbung an Tag 28 in der Adriamycin-Nephropathie. Exemplarisch ist je ein Glomerulus beider Gruppen dargestellt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=5 \pm$ SEM. Glomeruläre Expression von Cd31 bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=5 \pm$ SEM.

Zusammenfassend ergab sich eine Verminderung der glomerulären Sklerose in *Ccr2*-defizienten Tieren verglichen mit dem Wildtyp in der Adriamycin-Nephropathie. Hierbei korreliert die verminderte Glomerulosklerose jedoch nicht mit einer reduzierten Podozytenschädigung in der *Ccr2*-defizienten Gruppe. Eine verminderte glomeruläre Endothelzellenschädigung scheint ebenso wenig Ursache der verminderten Glomerulosklerose in *Ccr2*-defizienten Mäusen zu sein.

Tubulointerstitieller Schaden

Glomerulärer Schaden führt im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie zur sekundären Schädigung des Tubulointerstitium. Diese histologischen Veränderungen wurden semiquantitativ in der PAS-Färbung beurteilt. Hierzu wurde für jedes Tier das Ausmaß von vier tubulointerstitiellen Schadensmarkern (tubuläre Dilatation, Tubuluszellabflachung, Tubuluszellverlust, intraluminaler Zylinder) beurteilt. Beide Versuchsgruppen zeigten deutliche Zeichen der sekundären tubulointerstitiellen Schädigung, die jedoch in *Ccr2*-defizienten Tieren signifikant vermindert war (Abbildung 15 A).

Ergänzend wurde die renale mRNA-Expression von *neutrophil gelatinase associated lipocalin* (*Ngal*) in beiden Gruppen als Parameter für die tubuläre Schädigung untersucht [100, 101]. Die renale Expression dieses Markers zeigte sich bei *Ccr2*-Defizienz um das 13,7-fache vermindert (siehe Abbildung 15 B). *Kidney Injury Molecule-1* (*Kim1*) ist ein Transmembranprotein, dessen Expression in geschädigten proximalen Tubuli stark induziert wird [102]. Auch die renale mRNA-Expression war in *Ccr2*-defizienten Tieren signifikant niedriger als in der Wildtyp-Gruppe (siehe Abbildung 15 B). Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit die Kim-1-Proteinausscheidung mittels ELISA im Spontanurin der Versuchstiere gemessen. Sie war im Urin der *Ccr2*-defizienten Gruppe im Vergleich zum Wildtyp signifikant vermindert (siehe Abbildung 15 B).

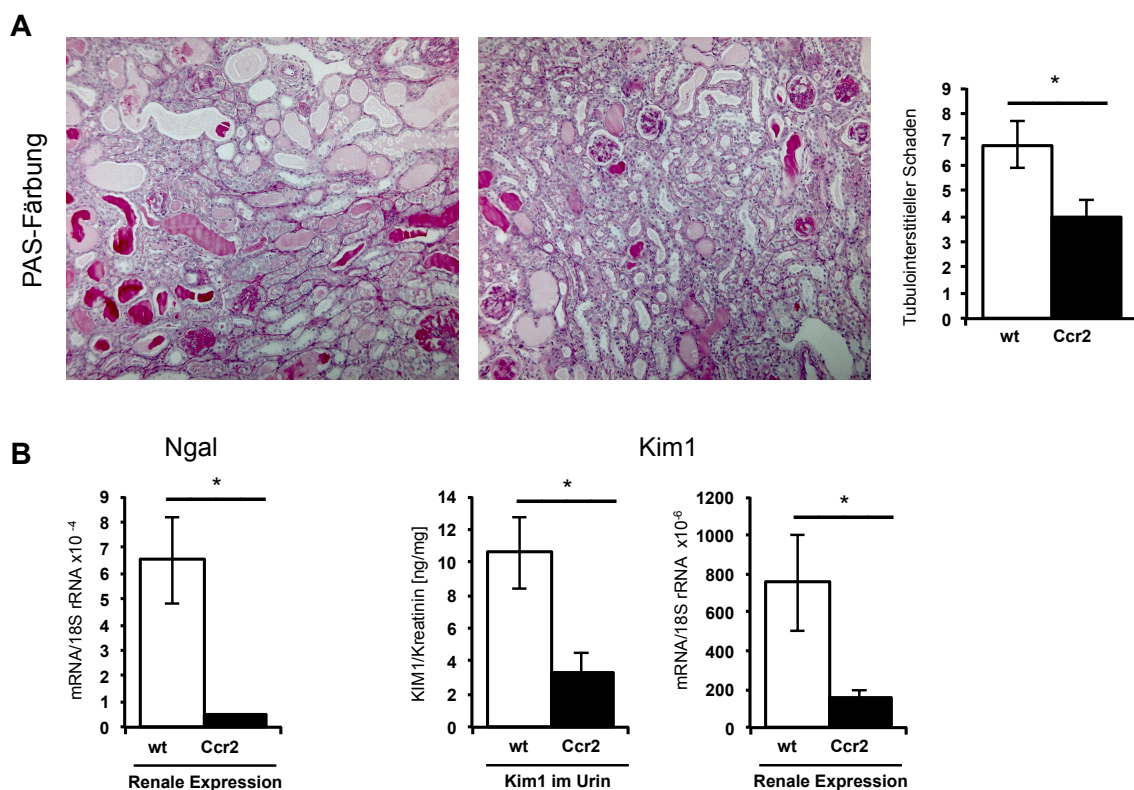


Abbildung 15: Beurteilung des tubulointerstiellen Schadens in der Adriamycin-Nephropathie

A Tubulointerstitieller Schaden an Tag 28 in der PAS-Färbung bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren beurteilt nach tubulärer Dilatation, Tubuluszellabflachung, Tubuluszellverlust und intraluminalen Zylindern. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit $n=9$.

B Expression von Ngal und Kim1 im Gesamtnierengewebe und Konzentration von Kim1 im Urin von Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=5 \pm$ SEM.

Zusammenfassend zeigte der Ccr2-defiziente Genotyp somit sowohl einen verminderten glomerulären Schaden als auch eine geringere sekundär tubulointerstitielle Nierenschädigung in der Adriamycin-Nephropathie.

4.2.3 Ccr2-Defizienz führt zu geringerer Expression renaler Chemokine

Der renale Schaden geht bei vielen Erkrankungen mit einer Induktion inflammatorischer Chemokine als Folge des schädlichen Stimulus einher. Die renale Expression solcher Chemokine wurde im Rahmen dieser Studie mittels qPCR und Elisa an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie gemessen.

Die kompartimentspezifische Analyse ergab für glomeruläres und für tubulointerstitielles Ccl2 eine signifikante Verminderung in Ccr2-defizienten Tieren. Analog dazu zeigte sich bei den Ccr2-defizienten Tieren eine verminderte renale Ausscheidung von Ccl2 über den Urin. Die kompartimentspezifische Expression von Ccl5 und die Ausscheidung über den Urin verhielten sich ähnlich. Für das Chemokin Cxcl10, das ebenso

Ergebnisse

eine Migration von Entzündungszellen vermittelt und die Immunantwort lokal verstärkt, zeigte sich auf Expressionsebene sowohl glomerulär als auch im Interstitium eine signifikante Verminderung in der Ccr2-defizienten Gruppe im Vergleich zum Wildtyp. Passend hierzu war die Ausscheidung von Cxcl10 über den Urin signifikant geringer (siehe Abbildung 16 A/B). TNF- α ist ein weiteres Zytokin, das von Makrophagen ausgeschüttet wird und Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und die Ausschüttung weiterer Chemokine induziert. Für die Expression von Tnf- α zeigte sich glomerulär eine tendenziell verringerte Expression. Die beiden Tnf- α -Rezeptoren Tnfr1 und Tnfr2 waren in Glomeruli der Ccr2-defizienten Gruppe signifikant weniger exprimiert. Im Tubulointerstitium ergab sich ein entsprechendes Expressionsmuster mit signifikant verminderter Expression von für Tnf- α , Tnfr1 und Tnfr2 in Ccr2-defizienten Mäusen (Abbildung 16 C).

Ergebnisse

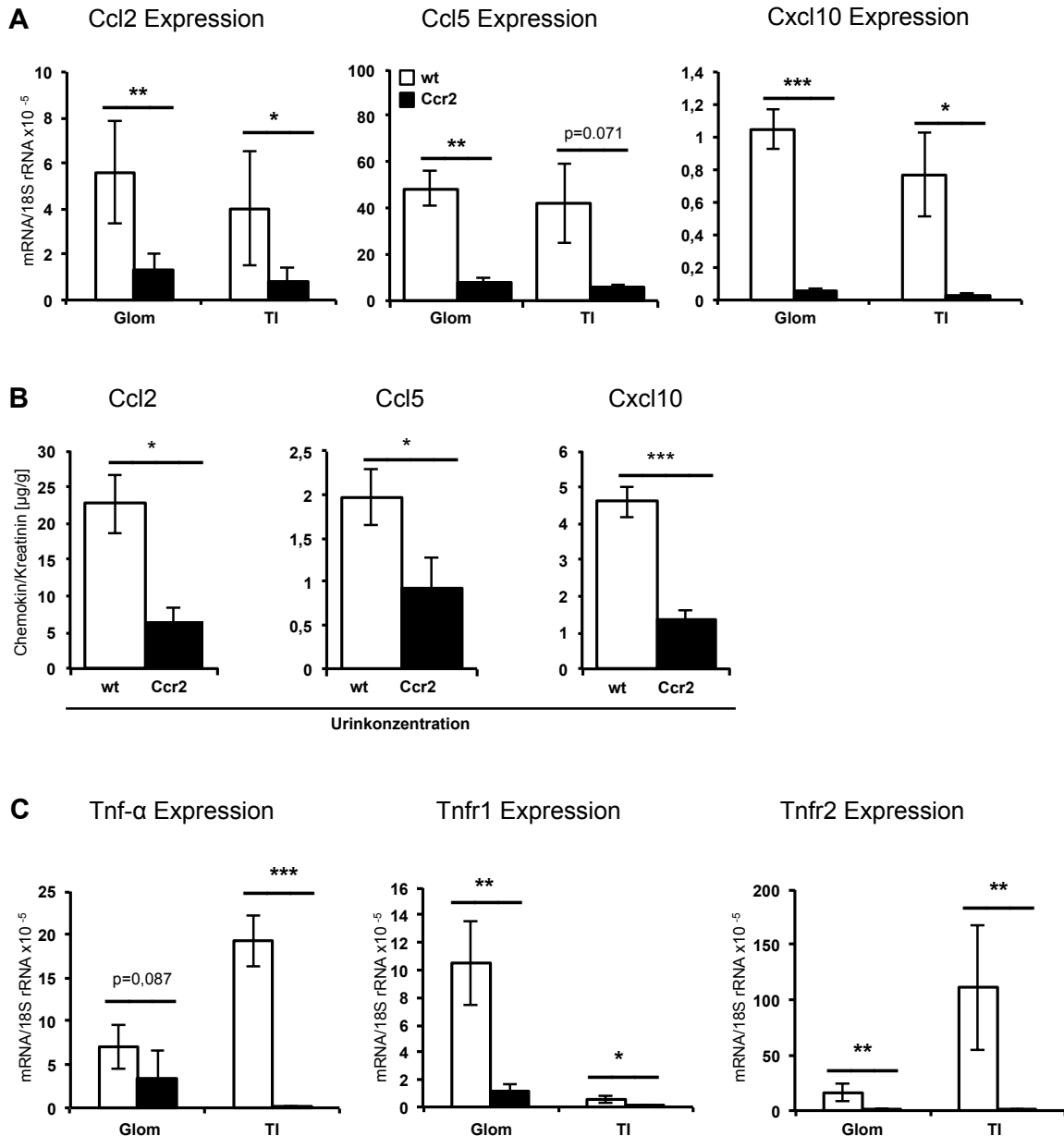


Abbildung 16: Kompartimentspezifische Expression von Zytokinen und Zytokinrezeptoren in der Adriamycin-Nephropathie

A Expression von Ccl2, Ccl5 und Cxcl10 an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren. Dargestellt sind Analysen aus Glomeruli (Glom) und Tubulointerstitium (TI).

B Urinkonzentration von Ccl2, Ccl5 und Cxcl10 an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren.

C Expression von Tnf- α , Tnfr1 und Tnfr2 in Glomeruli (Glom) und Tubulointerstitium (TI) an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren.

Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit n=5 je Gruppe.

In der Gesamtniere war die Expression verschiedener proentzündlicher bzw. von Leukozyten exprimierter Zytokine in der Ccr2-defizienten Gruppe verglichen zum Wildtyp vermindert, hierunter Interleukin 6 (Il6), Interleukin 12 (Il12) und Interferon- γ (Ifn- γ). Diese Zytokine werden auch zu den Markern für Makrophagen mit M1-Eigenschaften gezählt (siehe Abbildung 17 A). Zudem waren Marker, die für M2-differenzierte

Ergebnisse

Makrophagen sprechen, in *Ccr2*-defizienten Nieren vermindert exprimiert. Zu diesen M2-Markern zählen *mannose Receptor C-Type 1* (*Mrc1*), *macrophage scavenger receptor 1* (*Msr1*), Arginase 1 (*Arg1*), Fizz und Ym1 (siehe Abbildung 17 B).

Die verminderte Expression von proentzündlichen Chemokinen sowie verschiedener Makrophagenmarker spricht in *Ccr2*-defizienten Tieren für ein weniger ausgeprägtes Entzündungsgeschehen. Dies betrifft sowohl das glomeruläre als auch das tubulointerstitielle Kompartiment.

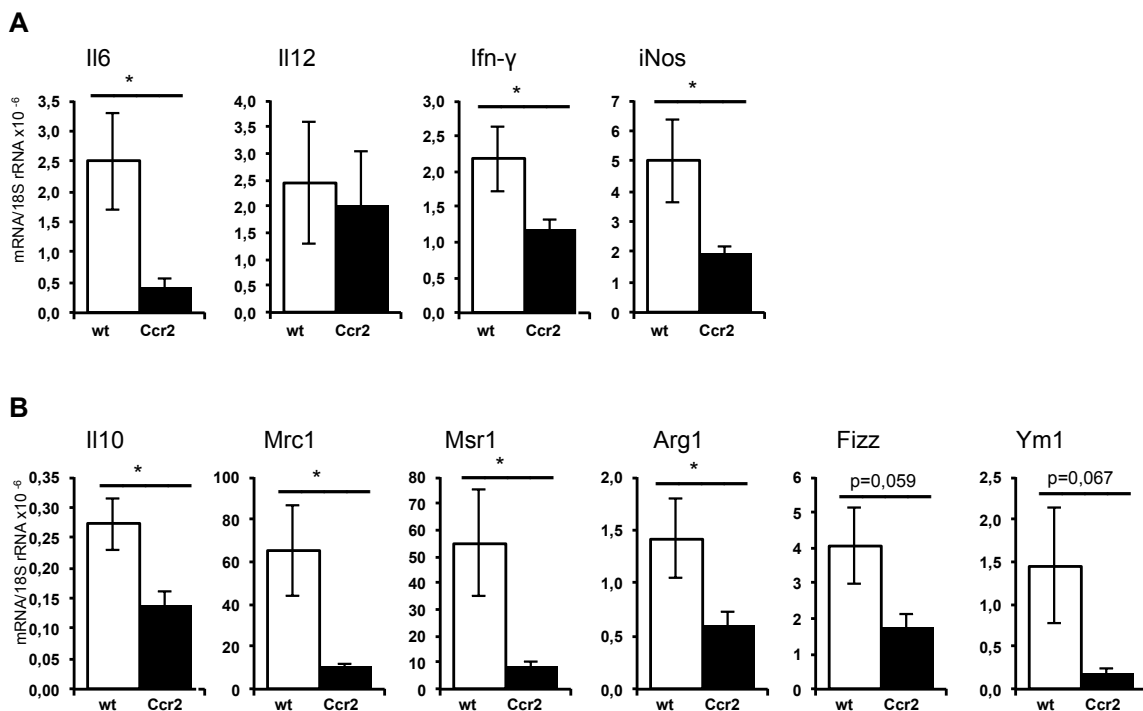


Abbildung 17: Reduzierte Expression von Entzündungsmarkern an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie
A Expression von M1-Makrophagenmarkern an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und *Ccr2*-defizienten Tieren.

B Expression von M2-Makrophagenmarker an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und *Ccr2*-defizienten Tieren.

Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit n=5 je Gruppe.

4.2.4 *Ccr2*-Defizienz vermindert die Infiltration inflammatorischer Zellen

Die induzierte Expression inflammatorischer Chemokine und Zytokine führt zu einer Infiltration von Leukozyten in die Niere, wodurch es zu einer fortschreitenden Nierenschädigung kommt, die bei chronischem Verlauf letztendlich im terminalen Nierenversagen enden kann [79]. Daher wurde im Folgenden untersucht, inwiefern die verminderte renale Schädigung und Expression von Entzündungsmediatoren bei *Ccr2*-Defizienz mit einer reduzierten renalen Zellinfiltration korreliert.

Durchflusszytometrische Analyse der renalen Leukozyteninfiltration

Ergebnisse

Zunächst wurde die renale Gesamtleukozytenzahl durchflusszytometrisch analysiert. Renale Cd45⁺-Zellen wurden als Leukozyten identifiziert und im Folgenden in Cd3⁺-T-Zellen, F4/80⁺/Cd11⁺ Phagozyten und Ly6g⁺-Granulozyten differenziert. Die genauen Färbemuster und angewendeten Gating-Strategien sind in Kapitel 3.3.1 näher beschrieben.

An Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie betrug der Anteil leukozytärer Zellen an den Gesamtnierenzellen 5,3% in der Ccr2-defizienten Gruppe, in der Wildtyp-Gruppe waren es zum Vergleich 10,5% (p=0,04). Im Hinblick auf die Cd3⁺-Gesamtlymphozytenpopulation und Ly6g⁺-Granulozyten zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen. Dagegen zeigten sich in Leukozytenpopulationen mit bekannter Ccr2-Expression signifikante Unterschiede. So war die Zahl der Cd4⁺ und Cd8⁺ T-Lymphozyten signifikant reduziert. Vor allem die F4/80⁺ Phagozyten, sowie die der F4/80⁺Cd11c⁺ und F4/80⁺Cd11c⁻ Subpopulationen in der Ccr2-defizienten Gruppe stellten sich signifikant vermindert dar (p<0,03) (Abbildung 18 A/B).

Unterscheidung verschiedener phagozytärer Subpopulationen

Die renalen mononukleären Phagozyten können in fünf Subpopulationen unterschieden werden, die verschiedene Eigenschaften aufweisen [14]. Die Differenzierung erfolgte mittels Färbung und *gating* für das Expressionsmuster von Cd11b und Cd11c. Besonderes Augenmerk lag auf den Populationen, die bekanntermaßen am stärksten CCR2 auf ihrer Oberfläche exprimieren, vornehmlich Cd11b^{high}Cd11c^{high} und Cd11b^{high}Cd11c^{low}. Erstere hat komplexe Charakteristika. So besitzt sie neben Dendriten-ähnlichen Eigenschaften auch inflammatorische Funktionen und migriert in entzündetes Gewebe. Bei der Zweiten handelt es sich um die klassischerweise als inflammatorische Phagozyten (M1 Phänotyp) bezeichneten Zellen [103]. Drei der fünf beschriebenen Subpopulationen der renalen Phagozyten waren im Ccr2-defizienten Genotyp signifikant vermindert eingewandert. Vor allem die beiden o.g., Ccr2-exprimierenden Phagozyten-Populationen akkumulierten in signifikant geringerem Ausmaß in der Niere Ccr2-defizienter Tiere (p=0,04 und p=0,01) (Abbildung 18 C). Auch die Zahl infiltrierender inflammatorischer Cd11b⁺Ly6c^{high} Makrophagen war in den Nieren der Ccr2-defizienten Gruppe signifikant reduziert (Abbildung 18 D).

Ergebnisse

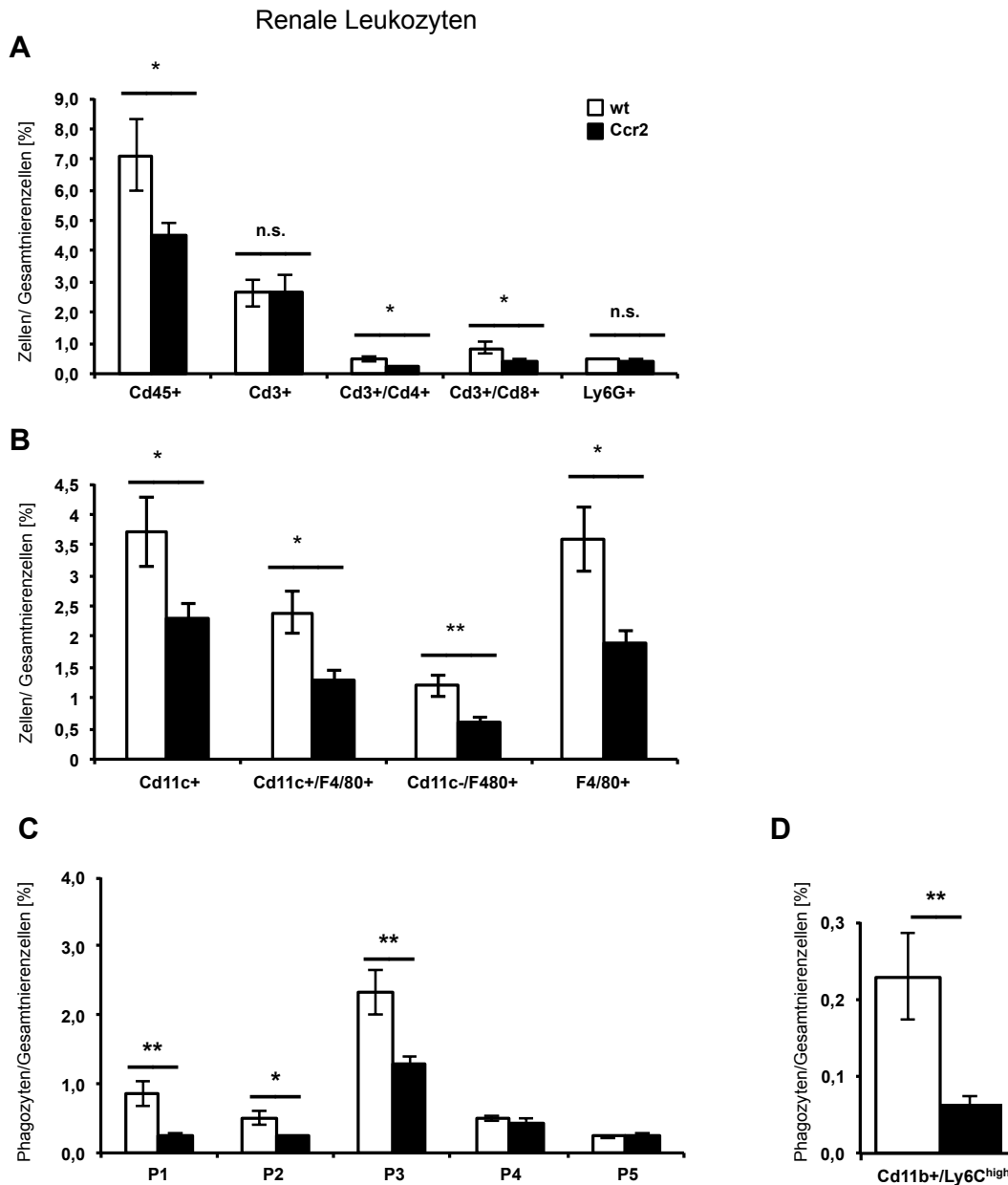


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Charakterisierung renaler Leukozyten am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie

A Cd45⁺ Zellen in der Durchflusszytometrie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienter Gruppe. Dargestellt als prozentualer Anteil an den Gesamtnierenzellen dargestellt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ±SEM mit n=11 je Gruppe.

B Darstellung der Makrophagenpopulationen nach Expression von F4/80 und Cd11c bei Ccr2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ±SEM mit n=11 je Gruppe.

C Durchflusszytometrische Analyse mononukleärer Phagozytenpopulationen entsprechend ihrer Cd11b- und Cd11c-Expression in der Wildtyp- und Ccr2-defizienter Gruppe. Färbung nach Ly6c und Cd11b. P1 entspricht der Cd11b^{high}Cd11c^{high} Population, P2 der Cd11b^{high}Cd11c^{low}, P3 der Cd11b^{int}Cd11c^{int}, P4 der Cd11b^{low}Cd11c^{high} und P5 der Cd11b^{int}Cd11c^{int} Population. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ±SEM mit n=11 je Gruppe.

D Durchflusszytometrische Analyse renaler Cd11b⁺Ly6C^{high} inflammatorischer Makrophagen in Wildtyp- und Ccr2-defizienten Mäusen. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ±SEM mit n=11 je Gruppe.

Leukozytenzählung in der Immunhistochemie

Die Ergebnisse aus der Durchflusszytometrie wurden anschließend histologisch verifiziert und kompartimentspezifisch ausgewertet. In der immunhistologischen Cd3-

Ergebnisse

Färbung zeigte sich wie bereits in der Durchflusszytometrie sowohl in Glomeruli als auch im Tubulointerstitium kein Unterschied hinsichtlich der renalen Infiltration zwischen den Gruppen (siehe Abbildung 19 A/B). In der F4/80- und ERHR3-Färbung für Makrophagen ergab sich eine signifikant verminderte Zellzahl in Ccr2-defizienten Tieren (siehe Abbildung 19 D/E). Die Zahl Mac2⁺ glomerulärer Makrophagen war um 45% in den Ccr2-defizienten Tieren reduziert (Abbildung 19 C).

Ergebnisse

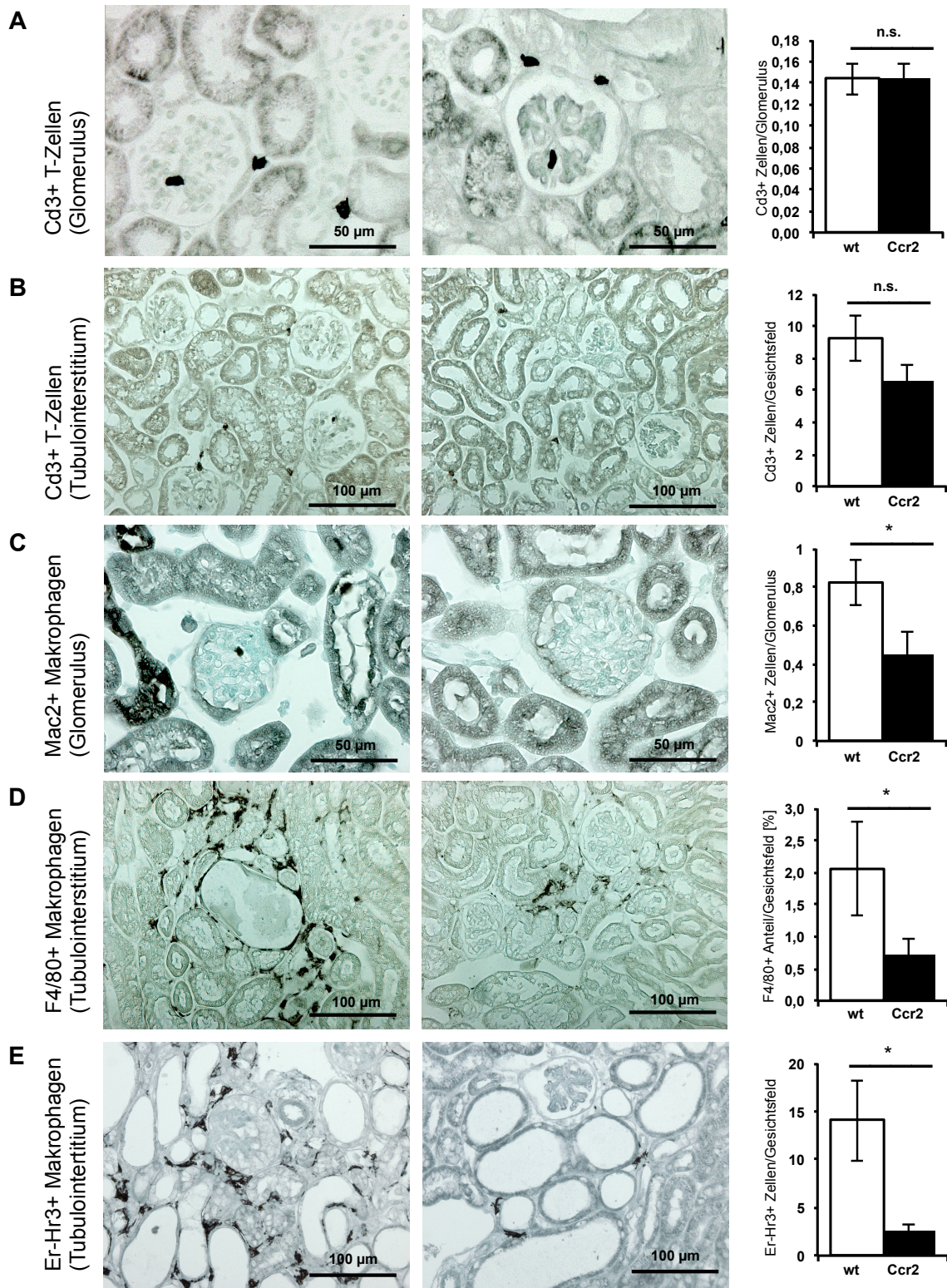


Abbildung 19: Histologische Analyse der Infiltration von Leukozyten

A Anzahl Cd3⁺ T-Lymphozyten pro Glomerulus bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit n=6-7 ±SEM.

B Anzahl Cd3⁺ T-Lymphozyten im Tubulointerstitium am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren dargestellt als Zellen/HPF in der Cd3-Färbung. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit n=6-7 ±SEM.

C Anzahl Mac2⁺ Makrophagen in Glomeruli bei Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit n=7 ±SEM.

Ergebnisse

D Anzahl F4/80⁺ Makrophagen pro Gesichtsfeld ausgewertet als prozentualer Anteil an der Gesamtfläche. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=6-7 \pm \text{SEM}$.

E Anzahl ERHR3⁺ Makrophagen in der Nieren an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Beurteilung der angefärbten Zellen/HPF in der ERHR3-Färbung. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=11-12 \pm \text{SEM}$.

Leukozytenzahl im peripheren Blut

Der CCL2-CCR2-Signalweg spielt neben seiner Bedeutung für die Gewebeeinfiltration von Leukozyten auch eine Rolle bei deren Auswanderung aus dem Knochenmark. Es wurde gezeigt, dass gesunde Mäuse mit Ccr2-Defizienz eine Monozytopenie im Blut aufweisen, die auf die blockierte Emigration der Zellen aus dem Knochenmark zurückzuführen war [75]. Eine verminderte Monozytenzahl im Blut Ccr2-defizienter Tiere könnte daher neben einer direkten Hemmung ihrer Infiltration zu einer reduzierten renalen Leukozytenakkumulation beitragen.

Es erfolgte daher durchflusszytometrisch die Bestimmung der Leukozytenpopulationen im peripheren Blut an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Es zeigte sich, dass beide Versuchsgruppen eine ähnliche Anzahl an Gesamtleukozyten im Blut aufwiesen ($p=0,23$). Auch bei T-Lymphozyten ($p=0,37$) und Granulozyten ($p=0,75$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Population der Monozyten, sowohl proinflammatorische Ly6c^{high} Monozyten (M1-Phänotyp), als auch Ly6c^{low} Monozyten (M2-Phänotyp), waren in der Ccr2-defizienten Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe jedoch signifikant kleiner und betrug nur etwa ein Drittel des Werts der Kontrolle ($p=0,002$) (Abbildung 20).

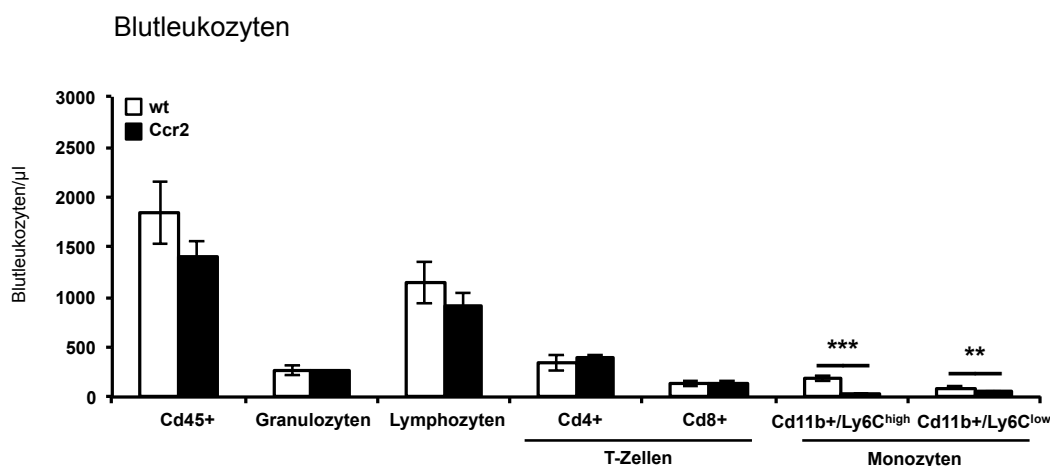


Abbildung 20: Leukozyten im Blut

Cd45⁺ Zellen, Granulozyten, Lymphozyten und monozytäre Zellen im Blut von Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie dargestellt als Zellen/µl Blut. Die Daten repräsentieren den Mittelwert aus einem Experiment mit $n=7 \pm \text{SEM}$.

Somit kann angenommen werden, dass die Monozytopenie einen Anteil zur verringerten Infiltration von Leukozyten in die Niere Ccr2-defizienter Tiere beiträgt.

Zusammenfassend zeigen die durchflusszytometrischen als auch immunhistologischen Untersuchungen, dass im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie Ccr2-Defizienz zu einer reduzierten renalen Infiltration von Leukozyten, insbesondere von Makrophagenpopulationen führt. Diese verminderte Zellinfiltration betrifft sowohl die Glomeruli als auch das tubulointerstitielle Kompartiment. Sie korreliert mit verminderter renaler Expression von Entzündungsmediatoren und geringerem glomerulärem sowie tubulointerstitiellem Schaden in Ccr2-defizienten Mäusen.

4.2.5 Ccr2-Defizienz vermindert die renale Fibrose

Wie oben beschrieben zeigt der Ccr2-defiziente Genotyp eine verminderte Glomerulosklerose, verbesserte funktionelle Parameter und eine geringere renale Infiltration leukozytärer Entzündungszellen in der Adriamycin-Nephropathie. Akkumulierende Leukozyten sind eine der Hauptquellen proentzündlicher Chemokine, aber auch profibrotischer Mediatoren. Makrophagen des M2-Phänotyps tragen durch Ausschüttung von antiinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren entscheidend zur Geweberegeneration, aber auch zum fibrotischen Gewebeumbau bei [15, 104]. In Ccr2-defizienten Tieren waren wie unter 4.2.3 beschrieben klassische M2-Makrophagen-Marker vermindert exprimiert. Daher wurde im Folgenden untersucht, inwiefern sich die Expression antiinflammatorischer bzw. profibrotischer Mediatoren zwischen der Ccr2-defizienten Gruppe und dem Wildtyp unterschied.

Transforming growth factor- β (TGF- β) ist einer der potentesten Vermittler fibrotischer Prozesse und der Aktivierung von Myofibroblasten [105]. Fibroblasten wiederum tragen durch die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine (EZM) entscheidend zur Entstehung renaler Fibrose bei [106, 107].

Renales Tgf- β war in Ccr2-defizienten Tieren auf mRNA-Ebene um 71% weniger exprimiert ($p=0,047$). Die kompartimentspezifische Analyse ergab eine entsprechende Verminderung in der Ccr2-defizienten Gruppe auch für glomeruläres Tgf- β ($p=0,0035$). Analog dazu stellte sich die Konzentration von Tgf- β im Urin dar. Ccr2-defiziente Tiere schieden an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie signifikant weniger Tgf- β über den Urin aus als der Wildtyp ($p=0,03$) (siehe Abbildung 21 A).

Die verminderte Induktion profibrotischer Signalwege zeigte sich auch in einer geringeren Expression von extrazellulären Matrixmolekülen in Ccr2-defizienten Nieren. Wichtige Vertreter sind das hauptsächlich von Fibroblasten ausgeschüttete Kollagen

Ergebnisse

4 α , die Kollagene 1 bis 3, Laminin und Fibronectin [108, 109]. Die mRNA für Prokollagen4 α ($p=0,01$), Prokollagen1 und 2 ($p=0,02$ und $p=0,05$), Laminin ($p=0,048$), und Fibronectin ($p=0,04$) wiesen hierbei jeweils eine signifikant niedrigere Expression in Ccr2-defizienten Nieren als im Wildtyp auf (siehe Abbildung 21 B). Auch die renale Akkumulation profibrotischer Zellpopulationen war in Ccr2-defizienten Tieren reduziert. Fibroblasten sind ortsständige, spindelförmige Zellen mit langen, verzweigten Zellfortsätzen. Diese bilden durch Zell-Zell-Verbindungen wie *tight* und *gap junctions* ein Netzwerk aus, welches das faserige Bindegewebe stabilisiert. Unter entzündlichen Bedingungen können sie aktiviert und zur verstärkten Produktion extrazellulärer Matrix angeregt werden [106]. *Fibroblasten spezifisches Protein 1* (FSP1) kann über die Identifizierung aktiver Fibroblasten zur Einschätzung des Schweregrads der renalen Fibrose beitragen [110]. Ccr2-defiziente Tiere wiesen eine signifikant geringere renale FSP1-mRNA-Expression als die Kontrollgruppe auf ($p=0,01$) (siehe Abbildung 21 C). Fibrozyten sind aus dem Knochenmark stammende Zellen, welche hauptsächlich Kollagen1, aber auch andere Matrixproteine produzieren [111, 112]. Die Tatsache, dass Fibrozyten neben dem Ort der Gewebeschädigung auch in der peripheren Blutbahn gefunden werden, spricht dafür, dass sie nicht nur lokal aus Monozyten differenzieren können, sondern auch als zumindest teilweise differenzierte Zellen aus der Peripherie in geschädigtes Gewebe einwandern können [113]. Fibrozyten wurden in dieser Arbeit durchflusszytometrisch als Cd45⁺Cd11b⁺Collagen1⁺ Zellen identifiziert. In der Ccr2-defizienten Gruppe zeigte sich eine signifikante Verminderung fibrozytärer Zellen verglichen mit dem Wildtyp ($p=0,021$) (siehe Abbildung 21 C). Ein weiterer Parameter für das Ausmaß der renalen Fibrose und Akkumulation profibrotischer Zellen extrazellulären Matrixablagerung ist α *smooth muscle actin* (α SMA). Es kennzeichnet Myofibroblasten und korreliert mit dem Ausmaß der Organfibrose. Histologisch zeigte sich eine deutlich verminderte renale Akkumulation von α SMA-positiven Zellen in der Ccr2-defizienten Gruppe im Vergleich zum Wildtyp ($p=0,015$) (Abbildung 21 B/D).

Zusammenfassend zeigte sich in der Niere Ccr2-defizienter Tiere eine geringere Induktion profibrotischer Signalwege, was mit einer verminderten Akkumulation von profibrotischen Zellen und letztendlich geringerer Bildung extrazellulärer Matrixmoleküle im Rahmen der Adriamycin-Nephropathie einherging. Dieser verminderte fibrotische Umbau der Niere in Ccr2-defizienten Tieren, der mit einem besseren Erhalt der Nierenfunktion einher geht und damit zu einer geringer ausgeprägten Progression der

Ergebnisse

chronischen Niereninsuffizienz führt weist darauf hin, dass eine Ccr2-Blockade eine vielversprechende therapeutische Strategie bei Glomerulosklerose sein könnte.

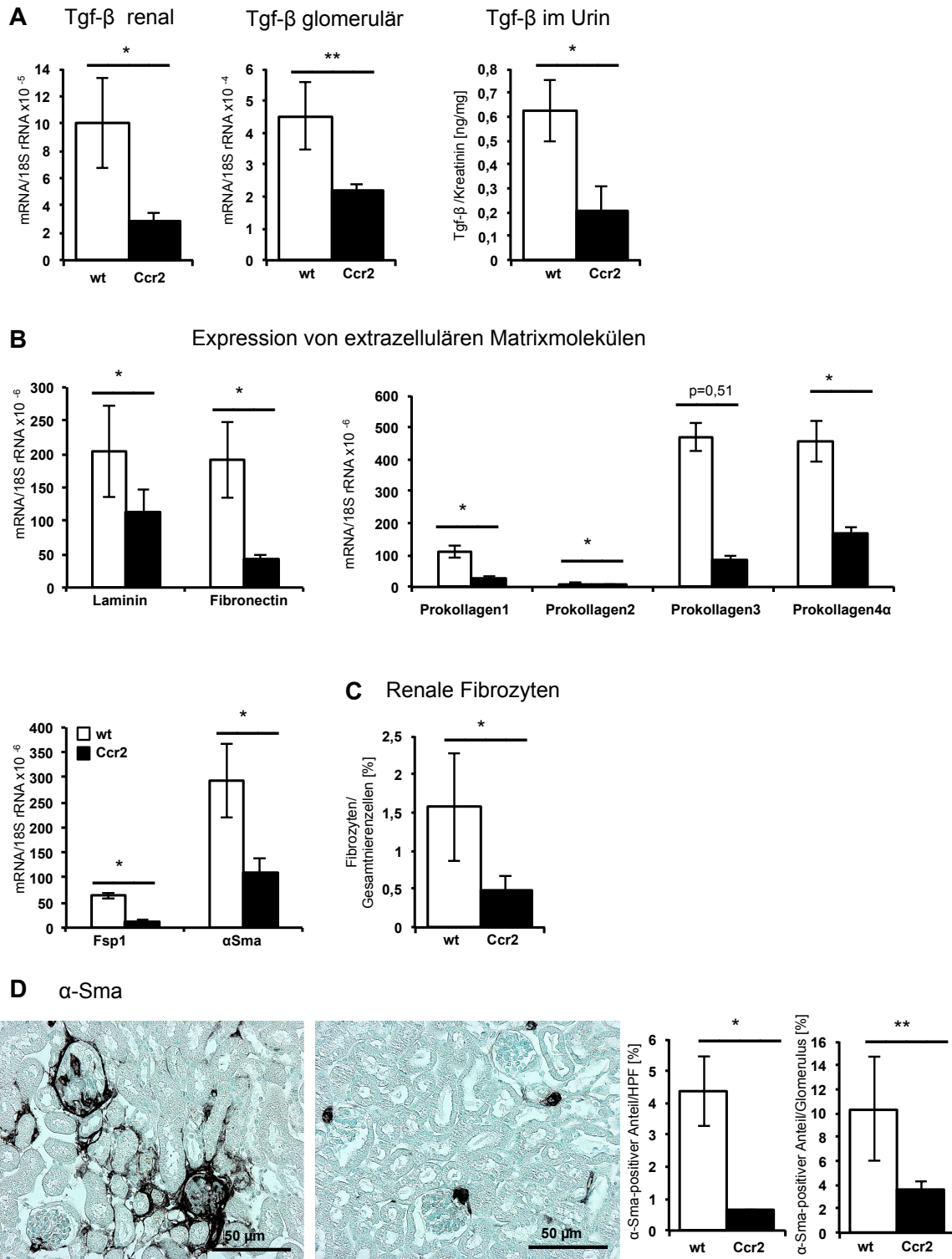


Abbildung 21: Fibrose in der Adriamycin-Nephropathie

A Tgf- β mRNA-Expression bzw. Proteinausscheidung im Urin am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie in Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren. Dargestellt sind Werte aus Gesamtnierengewebe, Glomerulustissue, sowie Urinproben. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit $n=5$ je Gruppe.

Ergebnisse

B Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix in der Niere von Ccr2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit n=6-7 je Gruppe.

C Anzahl von Fibrozyten im Nierengewebe von Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie ermittelt anhand der Durchflusszytometrie. Coll1⁺, Cd45⁺ und Cd11b⁺ Zellen wurden als Fibrozyten identifiziert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit n=4-5 pro Gruppe.

D Immunhistochemische Anfärbung von α SMA in der Niere Ccr2-defizienter Tiere im Vergleich zum Wildtyp am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Auswertung mittels ImageJ als Anteil gefärbter Pixel am HPF und als Anteil gefärbter Pixel an der Glomerulusfläche. Die Daten repräsentieren den Mittelwert \pm SEM mit n=7 je Gruppe.

5 Diskussion

Der fibrotische Umbau innerer Organe im Rahmen chronisch entzündlicher Erkrankungen führt meist zum Funktionsverlust des betroffenen Gewebes. Fibroproliferative Erkrankungen machen in der heutigen Zeit einen großen Teil chronischer Erkrankungen aus und sind mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet [114]. Glomerulosklerotische Erkrankungen wie die FSGS zählen hierzu.

Ziel dieser Arbeit war es, die pathophysiologische Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR2 im Krankheitsbild der FSGS zu charakterisieren. Die Arbeitshypothese war hierbei, dass der CCL2-CCR2-Signalweg in der FSGS maßgeblich induziert wird, wodurch es zu einer gesteigerten Leukozyteninfiltration und verstärktem Schaden im renalen Gewebe kommt. Im Umkehrschluss sollte die Defizienz von Ccr2 zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf mit geringerem Funktionsverlust, struktureller Schädigung und leukozytärer Infiltration führen. Diese Hypothese wird gestützt von bisherigen Erkenntnissen über den Einfluss von Chemokinen und ihren Rezeptoren auf renale Erkrankungen und den bisherigen Erfolgen von Chemokinrezeptor-Blockaden [64, 115]. Organfibrosen haben immer eine immunologische Komponente [31]. Das Ausmaß der Fibrose korreliert eng mit der Anzahl der eingewanderten Leukozyten, wobei diese Leukozyten rasch zur Hauptquelle inflammatorischer Chemokine und Zytokine werden [116, 117]. Der CCL2-CCR2 Signalweg ist im Rahmen der renalen Schädigung von besonderer Bedeutung. CCL2 ist ein Schlüsselchemokin, das die Migration und Infiltration von Monozyten und Makrophagen in entzündetes Gewebe vermittelt. Diese Zellpopulationen sezernieren ihrerseits wiederum CCL2 und vermitteln die Progression renaler Erkrankungen wie in einem *circulus vitiosus* [46]. Seinen korrespondierenden Rezeptor CCR2 tragen außer Monozyten bzw. Makrophagen und einigen T-Zellpopulationen auch einige renale Zellarten. Daher könnte neben einer CCR2-vermittelten renalen Rekrutierung leukozytärer Effektorzellen z.B. auch die entzündliche Aktivierung von Podozyten durch den CCL2-CCR2-Signalweg zur Schädigung der glomerulären Filtrationsbarriere und Entstehung von Proteinurie beitragen [73].

5.1 In der murinen Adriamycin-Nephropathie als Modell der humanen FSGS wird Ccl2 induziert

Das Modell der Adriamycin-Nephropathie ist ein murines Äquivalent der FSGS beim Menschen. In der Maus ist die Induktion der Adriamycin-Nephropathie im BALB/c-Hintergrund, nicht aber in der C57BL/6-Maus möglich [118]. Diese genetische

Suszeptibilität für die Adriamycin-Nephropathie ist abhängig vom DOXNPH- bzw. Prkdc-Lokus auf Chromosom 16 [119-121]. Dementsprechend wurden auch in dieser Arbeit ausschließlich Mäuse im BALB/c-Hintergrund verwendet. Von einer Auswirkung der CCR2-Defizienz auf die Suszeptibilität ist nicht auszugehen, da sich der CCR2-Lokus auf Chromosom 9 befindet [122].

In der Literatur finden sich unterschiedliche Injektionsschemata für Adriamycin. Diese variieren einerseits in Bezug auf die Anzahl der Injektionen und die Applikationsart (intravenös oder intraperitoneal). Andererseits finden sich in der Literatur Dosisempfehlungen zwischen 2 und 13 mg/kg Körpergewicht. Zudem unterscheiden sich die in der Literatur angegebenen Laufzeiten der Versuche [36, 90, 97]. Wang et al. beschrieben beispielsweise eine einzelne Injektion von Adriamycin zur Induktion des Modells [90]. Unsere Arbeitsgruppe etablierte das Modell der Adriamycin-Nephropathie mittels intravenöser Injektion von je 11,5 mg/kg an Tag 0 und 14. Hierunter wurden progrediente renale Läsionen sowie eine zunehmende Proteinurie und Einschränkung der Nierenfunktion erreicht. Im Hinblick auf die Proteinurie als Korrelat der glomerulären Schädigung wurden tendenziell höhere Werte als in Vorarbeiten beobachtet [123]. Als Versuchslaufzeit bewährte sich in unseren Händen die Versuchsdauer von 28 Tagen, da die Tiere zu späteren Zeitpunkten eine übermäßige Nephropathie und Kachexie mit zum Teil letalem Ausgang entwickelten. Schwankungen in der Ausprägung der Nephropathie bei gleicher Adriamycindosierung können durch Variabilität der Chargen und genetischen Hintergründe erklärt werden.

Das applizierte Adriamycin verursacht glomerulosklerotische Läsionen, die denen der humanen FSGS gleichen. Diese Läsionen werden u.a. auf einen podozytären Schaden zurückgeführt, der mit einer Abnahme der Expression von Nephrin 1 einhergeht [124]. Auch im Rahmen dieser Studie zeigte sich eine signifikante Verminderung podozytären Nephrins nach Modellinduktion. Der Podozyten-Schaden wird initial durch einen direkt zytotoxischen Effekt des Adriamycins verursacht. Die Substanz wird im Körper zügig über die Galle und den Urin ausgeschieden [125, 126]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die progressive Glomerulosklerose durch eine kumulative Toxizität hervorgerufen wird. Vielmehr treiben immunologische Mechanismen die glomeruläre Schädigung voran, die sekundär auch zunehmend zu einem tubulointerstitiellen Schaden und Fibrose führt.

Die kompartimentspezifischen Expressionsanalysen dieser Arbeit zeigen, dass im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie parallel zur fortschreitenden Glomerulosklerose und

dem Verlust der Nephrexpression die glomeruläre Ccl2-Expression ansteigt. Auch die glomeruläre Expression weiterer Chemokine, wie Ccl5 und Cxcl10, wurde induziert. Ähnliche Ergebnisse zeigten bereits in vitro-Experimente unserer Arbeitsgruppe nach inflammatorischer Stimulation intakter Glomeruli [57]. Allerdings ist gerade für CCL2 und CCR2 auch in anderen glomerulären Erkrankungen, insbesondere der diabetischen Nephropathie sowohl tierexperimentell als auch in klinischen Studien eine pathophysiologische Rolle belegt worden.

Die ermittelte Induktion von Ccl2 auch in Glomeruli mit Adriamycin-vermittelter Sklerose stellt daher die Rationale für weitere Untersuchungen zur Beeinflussung der Glomerulosklerose durch das Eingreifen in den CCL2-CCR2-Signalweg dar.

5.2 CCL2 und CCR2 bei der diabetischen Nephropathie

Die diabetische Nephropathie ist eine der häufigsten Ursachen für eine Glomerulosklerose beim Menschen. Es ist bekannt, dass entzündliche Geschehen maßgeblich an der Nierenschädigung bei diabetischer Nephropathie beteiligt sind [127, 128]. Wichtige Entzündungsmediatoren, deren Anwesenheit zur Entstehung und Progression der diabetischen Nierenschädigung führen, sind unter anderem CCL2, CX3CL1 und CCL5 [129]. Zudem wird angenommen, dass CCL2 in der Entwicklung einer peripheren Insulinresistenz und damit der Entstehung eines Diabetes mellitus Typ II eine entscheidende Rolle spielt [130, 131].

Die renale Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen unter diabetischen Konditionen trägt zur Ausbildung der diabetischen Nierenschädigung bei [132, 133]. Der Chemokinrezeptor CCR2 vermittelt Leukozytenmigration und erscheint auch an der Pathogenese der diabetischen Nephropathie beteiligt zu sein. Die infiltrierenden Leukozyten sezernieren ihrerseits inflammatorische Chemokine und Zytokine, welche die Gewebeschädigung aufrechterhalten bzw. verstärken, z.B. TNF- α [134]. Es konnte gezeigt werden, dass pharmakologische Blockade mit dem Ccr2-Antagonisten RS504393 bzw. eine Ccr2-Defizienz in der murinen Streptozotosin-induzierten diabetischen Nephropathie zu einem verminderten Nierenschaden führt. Dieser äußerte sich in einer Verminderung von Albuminurie, Serumharnstoff, Plasmakreatinin, histologischen Veränderungen und glomerulärer Akkumulation von Makrophagen [135]. Ein ähnlicher Effekt konnte für den Ccr2-Antagonisten RS102895 sowie das Ccl2-blockierende Siegelmer mNOX-E36-3'PEG in Studien bei db/db-Mäusen mit diabetischer Nephropathie gezeigt werden [83, 84]. Es wird vermutet, dass im Rahmen der erhöhten Blutzuckerwerte bereits in frühen Krankheitsstadien Makrophagen in die Niere und

besonders die Glomeruli migrieren und maßgeblich an den molekularen und strukturellen Veränderungen beteiligt sind, die zur Glomerulosklerose führen [136]. You et al. konnten zeigen, dass in einem Modell mit Streptozotosin-induziertem Diabetes eine transgene Überexpression von *Ccr2* auf Podozyten von CCR2-defizienten Mäusen zu einem aggravierten Nierenschaden führt. Hieraus schließen die Autoren, dass auf Podozyten exprimierter *Ccr2* auch eine direkte Rolle bei der diabetischen Nephropathie spielt [74].

5.3 Interpretation der Ergebnisse *Ccr2*-defizienter Tiere im Vergleich zum Wildtyp

5.3.1 *Ccr2*-Defizienz verbessert renale funktionelle Parameter in der Adriamycin-Nephropathie

Gesunde *Ccr2*-defiziente Tiere weisen eine veränderte Homöostase und Immunzellantwort auf [89]. Hinsichtlich der Mortalität und der Nierenfunktion zeigen sich jedoch keine Unterschiede. In dieser Studie ist besonders wichtig, dass die gesunden *Ccr2*-defizienten Mäuse in Bezug auf Albuminurie, Glomerulonephritis, Tubulusatrophie, aber speziell auch in Bezug auf Glomerulosklerose und mesangialer Matrixmenge dem Wildtyp gleichen [81, 122, 137].

Bei der FSGS geht die glomeruläre Schädigung typischerweise mit einer progredienten klinischen Befundkonstellation aus Proteinurie, Hypoproteinämie, Hyperlipidämie und Urämie einher. Vor allem die Proteinurie ist ein für die Prognose der Niereninsuffizienz entscheidender Parameter. Ihr Ausmaß korreliert positiv mit der Schwere des glomerulären Schadens, welcher jedoch mit den verfügbaren Therapien oftmals nicht suffizient zu kontrollieren ist [79, 138].

So entwickeln viele Patienten trotz optimaler supportiver Therapie (u.a. mit Renin-Angiotensin-Blockade), Steroiden und Immunsuppressiva (u.a. Calcineurininhibitoren) eine terminale Niereninsuffizienz. Auch immunmodulatorische Therapieansätze wie eine Blockade des Chemokinrezeptors *Ccr1* zeigte tierexperimentell keinen Einfluss auf den glomerulären Schaden und die Albuminurie in der Adriamycin-Nephropathie [123]. Dagegen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie die *Ccr2*-Defizienz zu einer signifikant niedrigeren Albuminurie führt. Gleichzeitig war als Manifestation des nephrotischen Syndroms auch die Hypercholesterolämie in *Ccr2*-defizienten Tieren an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie signifikant geringer ausgeprägt, während Serumprotein- und

Serumalbuminwerte in beiden Genotypen vergleichbar blieben. Insbesondere wiesen Ccr2-defiziente Mäuse auch verbesserte Nierenretentionsparameter auf, mit einem tendenziell geringeren Anstieg von Serumkreatinin und signifikant verminderten Harnstoffwerten im Vergleich zum Wildtyp. Insgesamt sprechen diese verbesserten funktionellen Daten für einen geringeren glomerulären Schaden in Ccr2-defizienten Mäusen mit Adriamycin-Nephropathie. In ähnlicher Weise wurde sowohl für die diabetische Nephropathie als auch die Lupusnephritis gezeigt, dass eine Hemmung des Ccl2-Ccr2-Signalweges zu einer Verminderung des histopathologischen Schadens und einer Verbesserung der renalen Funktionsparameter, insbesondere der Albumin-urie, führt [84, 85, 87].

5.3.2 Ccr2-Defizienz vermindert strukturellen Schaden

In beiden Gruppen konnten die FSGS-typischen Läsionen beobachtet werden. Hierzu zählen Podozytenschaden, glomeruläre Matrixdeposition und Kapillarverödung, sowie sekundäre tubulointerstitielle Schäden wie tubuläre Dilatation, Tubuluszellabflachung, Tubuluszellverlust und die Formation intratubulärer Zylinder. In Ccr2-defizienten Tieren waren korrelierend zu verminderter Albuminurie und Nierenfunktionseinschränkung histopathologisch die sklerotischen Veränderungen im Glomerulus und die tubulointerstitielle Schädigung signifikant vermindert.

Auch in anderen Studien zur Auswirkung einer CCR2-Blockade auf die renale Schädigung, zum Beispiel bei diabetischem Nierenschaden, konnte tierexperimentell ein Schutz von Podozyten durch die Blockade des Ccl2-Ccr2-Signalweges gezeigt werden. In diesen Studien fanden diabetische Nephropathie-Modelle bei Leptin-Deletion (db/db) und Diät-assoziiertem Diabetes Anwendung [139].

Die Adriamycin-Nephropathie beruht zum einen auf der direkten Toxizität des Adriamycins, welche zu Veränderungen der glomerulären Filtrationsbarriere führt. Zum anderen beruht sie auf den durch die nachfolgende Immunantwort vermittelten Sekundärschäden. Die direkten Veränderungen betreffen gleichermaßen die glomerulären Endothelzellen, die glomeruläre Basalmembran, als auch die Podozyten. Zu den wesentlichen Effekten auf zellulärer Ebene zählen hierbei DNA-Interkalierungen und Cross-Linking, die Inhibierung der Topoisomerase 11 und die Entstehung freier Radikale, welche wiederum Schäden an genomischer DNA und Mitochondrien, Lipid-Peroxidation und Zellmembranschäden induzieren. In den betroffenen Zellen führen diese Mechanismen zu immunogenem Zelltod, Apoptose oder Zellseneszenz [140].

Die Aktivität rekrutierter Immunzellen mit proinflammatorischen Eigenschaften, die der initialen Adriamycintoxizität folgt, verursacht weiteren, ebenfalls immunogenen Zelltod, der eine Spirale aus Nekrosen und Entzündung, die sogenannte Nekroinflammation, auslöst [141]. Aufgrund der berichteten Ccr2-Expression in Podozyten wäre darüber hinaus eine direkte Ccl2-Ccr2-vermittelte Podozytenschädigung im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie denkbar. So wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Ccr2 durch Ccl2 in murinen Podozyten die zelluläre Motilität steigert, zu einer Neuordnung des Zytoskelettes führt und die Durchlässigkeit für Albumin erhöht [73]. In der diabetischen Nephropathie hat die Überexpression bzw. Abwesenheit von Ccl2 Auswirkungen auf die Expression von glomerulärem Nephrin und die Ausbildung von Albuminurie. Es wird vermutet, dass unter diabetischen Bedingungen die Aktivierung des Ccl2-Ccr2-Signalweges zur Apoptose von Podozyten führt [142]. Für humane Podozyten wurde gezeigt, dass die Nephrinexpression durch die Aktivierung des CCL2-CCR2-Signalweges vermindert wird. Gleichzeitig wird CCR2 in den Podozyten von Patienten mit diabetischer Nephropathie überexprimiert [72]. You et al. zeigten, dass die Podozyten-spezifische Überexpression von Ccr2 zu jeweils verstärkter Albuminurie, Urämie, glomerulärer Apoptose sowie einem größeren Ausmaß an Gewebeschaden, Kollagenexpression und Podozytenverlust im diabetischen Nephropathie-Modell führt. Dies schien unabhängig von der Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen zu sein [74]. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich in Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie ein vergleichbarer Podozytenverlust und eine vergleichbare Abnahme der glomerulären Nephrinexpression. Daher ist trotz verminderter Albuminurie und Glomerulosklerose in Ccr2-defizienten Mäusen von einer gleichen Adriamycin-induzierten Podozytenschädigung in beiden Genotypen auszugehen. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine direkte CCR2-vermittelte Schädigung von Podozyten im Verlauf der Adriamycin-induzierten Glomerulosklerose.

Parallel zur Podozytenschädigung treten im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie auch pathologische Veränderungen in glomerulären Endothelzellen auf [143, 144]. Diese Veränderungen umfassen den Verlust der endothelialen Fenestrierung [144] und der membranständigen Glykokalyx [145]. Allerdings zeigten sich in Wildtyp- und Ccr2-defizienten Tieren an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie keine Unterschiede in der Expression des Endothelzellmarkers Cd31, was eine direkte Ccr2-vermittelte Schädigung glomerulärer Endothelzellen unwahrscheinlich erscheinen lässt. Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass Ccr2 nicht über direkte Effekte auf

intrinsische glomeruläre Zellen die glomeruläre Schädigung bei der Adriamycin-Nephropathie vermittelt.

Üblicherweise werden untergegangene Zellen durch Narbengewebe ersetzt. Dass in dieser Studie trotz ähnlichem Podozytenverlust eine verminderte glomeruläre Vernarbung bei Ccr2-Defizienz zu sehen war lässt vermuten, dass CCR2 vor allem über die Vermittlung der renalen Leukozyteninfiltration an der Progression der FSGS beteiligt ist. So könnte eine Ccr2-abhängige Leukozytenakkumulation mit nachfolgender inflammatorischer Aktivierung glomerulärer Zellen wie parietaler Endothelzellen oder Mesangialzellen zur glomerulären Synthese extrazellulärer Matrix und damit der Glomerulosklerose beitragen. Um die pathophysiologische Rolle einer Ccr2-Expression in glomerulären Zellen im Verlauf der Adriamycin-Nephropathie differenzierter beurteilen zu können, sind weitere Studien erforderlich. Ansätze könnten beispielsweise Zellkulturexperimente und die Verfolgung genetischer Abstammung von Zellen *in vivo* (*lineage tracing*) sowie Untersuchungen an Mäusen mit Zelltyp-spezifischem Ccr2-Knockout, z.B. in Monozyten oder Podozyten, sein.

In Bezug auf das Tubulointerstitium erbrachten die histologischen Analysen des Ccr2-defizienten Nierengewebes ebenfalls einen signifikant verminderten Schaden verglichen mit dem Wildtyp. Passend hierzu ließ sich im Rahmen der vorliegenden Experimente auch auf mRNA-Expressionsebene signifikant weniger Tubulusschaden im Ccr2-defizienten Genotyp nachweisen. Dies zeigte sich durch eine verminderte Expression von Kim1 und Ngal als Marker für eine Schädigung des proximalen Tubulus. Zusätzlich konnte auch eine verminderte Ausscheidung von Kim1 auf Proteinebene im Urin nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten damit, dass der Ccr2-defiziente Genotyp im Vergleich zum Wildtyp in der Adriamycin-Nephropathie neben einem geringeren glomerulären Schaden auch im Hinblick auf die sekundäre tubulointerstitielle Schädigung geschützt ist. Passend hierzu konnte gezeigt werden, dass die renale Expression von Chemokinen, welche die Entzündung bedingen und aufrechterhalten, bei Ccr2-Defizienz vermindert ist. So ergab sich in beiden renalen Kompartimenten, glomerulär und tubulointerstitiell, eine verminderte Expression von Ccl2, Ccl5 und Cxcl10. Diese Chemokine konnten analog auch im Urin Ccr2-defizienter Mäuse in verminderter Konzentration nachgewiesen werden. Die Expression von TNF- α war ebenfalls bei Ccr2-Defizienz vermindert, allerdings nur im Tubulointerstitium auf signifikantem Niveau. Für die beiden korrespondierenden TNF- α -Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 zeigte sich

ebenso in beiden Kompartimenten eine signifikant verminderte Expression bei Ccr2-Defizienz. Ein direkter Zusammenhang zwischen Fehlen bzw. Blockade von Ccr2 und der reduzierten Expression proentzündlicher Zytokine in vivo wurde auch für andere Glomerulopathien, wie z.B. die diabetische Nephropathie [83, 84], aber auch für Tiermodelle der Lungengranulomatose [89], der Colitis [146] oder des ischämischen Schlaganfalles [147] beschrieben.

Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf eine verminderte funktionelle und strukturelle Schädigung in Ccr2-defizienten Mäusen hin, die mit einer geringeren renalen Entzündungsreaktion einherging, gekennzeichnet durch eine verminderte Expression inflammatorischer Chemokine und Zytokine.

5.3.3 Ccr2-Defizienz vermindert die renale Akkumulation von Leukozyten

Die Infiltration von Leukozyten entlang des Chemokin-Gradienten ist ein Charakteristikum progredienter Nierenerkrankungen und wird auch durch den Ccl2-Ccr2-Signalweg vermittelt [3, 148, 149]. Vor allem eingewanderte Makrophagen tragen entscheidend zur Schädigung des Gewebes bei [150]. Ihre Anzahl im Gewebe korreliert mit dem Grad der Niereninsuffizienz [108].

Die Blockade des CCL2-CCR2-Signalweges führte bereits in verschiedenen Geweben zu einer verminderten Leukozyteninfiltration [151, 152]. Außerhalb der Niere konnte unter anderem für experimentelle Autoimmunenzephalomyelitis und Lungenfibrose eine verminderte Leukozyteninfiltration im Rahmen einer Ccr2-Defizienz gezeigt werden [153, 154]. Für die unilaterale Ureterobstruktion war unter Behandlung mit den Ccr2-Antagonisten Propergermanium und RS-504393 bzw. bei Ccr2-defizienten Mäusen die Leukozyteninfiltration vermindert. Hiervon betroffen waren vor allem F4/80⁺ Makrophagen [82]. Propergermanium bewirkte auch in der murinen diabetischen Nephropathie eine Reduktion der Leukozyteninfiltration in die Niere [155]. Auf die verminderte glomeruläre Infiltration von Makrophagen und Verbesserung der diabetischen Nephropathie im Mausmodell durch Ccr2-Blockade mit dem Antagonisten RS-504393 wurde bereits hingewiesen (vgl. 5.2) [135]. Ähnliche Resultate ergaben auch Studien zum Ischämie-Reperfusionsschaden (*ischemia reperfusion injury*, IRI) bzw. der Lupusnephritis. Bei der IRI ergab sich in Ccr2-defizienten Mäusen eine verminderte Anzahl eingewanderter renaler Leukozyten [156]. MRL/lpr Mäuse mit Ccr2-defizientem Hintergrund hatten ebenso verminderte glomeruläre und tubulointerstitielle Makrophagen- und T-Zell-Zahlen im Verlauf der Lupusnephritis [81]. Einhergehend mit der verminderten Leukozyteninfiltration waren jeweils eine verbesserte Nierenfunktion sowie ein

geringerer struktureller Nierenschaden. Wu et al. beschrieben die Effekte einer Impfung mit Ccl2-kodierender DNS in der Adriamycin-Nephropathie bei Ratten. In der genannten Studie wurde die DNS viermalig in wöchentlichen Intervallen intramuskulär verabreicht und anschließend die Adriamycin-Nephropathie induziert. Am Studienendpunkt zeigten sich zum einen die Bildung von Anti-Ccl2-Antikörper, zum anderen eine verminderte Glomerulosklerose mit signifikant verminderten interstitiellen Leukozyteninfiltraten [88]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit bestätigen die bisher angenommenen Effekte des Ccl2-Ccr2-Signalweges auf die renale Leukozyteninfiltration. Analog zur Verminderung funktioneller Einschränkungen, struktureller Veränderungen und renaler Expression von Chemokinen und Zytokinen, war auch die durchflusszytometrisch ermittelte Infiltration der Cd45⁺ Gesamtleukozyten in die Niere im Ccr2-defizienten Genotyp geringer. Die vergleichbare Zahl Cd3⁺ Zellen in der Niere beider Gruppen ist vereinbar mit deren hauptsächlichlicher Aktivierung durch andere Chemokinrezeptoren, wie beispielsweise CCR1 [123]. Studien haben gezeigt, dass bis zu 60% der Neutrophilen CCR2 exprimieren. Diese Population spielt jedoch hauptsächlich in Frühphasen der Organschädigung eine Rolle [77, 157]. So erklärt sich möglicherweise, dass sich der Anteil Ly6g⁺-Neutrophiler in der Niere Ccr2-defizienter Tiere zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt des Versuchs im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nicht unterscheidet. Die in dieser Studie gezeigte signifikant verminderte renale Infiltration verschiedener Makrophagenpopulationen in Ccr2-defizienten Mäusen mit Adriamycin-Nephropathie passen zu der bekannten Expression von CCR2 auf der Oberfläche dieser Zellen und der Rolle dieses Rezeptors für deren Migration im Rahmen von Entzündungsgeschehen [135]. Es ist bekannt, dass sich Makrophagen-Subpopulationen phänotypisch unterscheiden. Insbesondere drei dieser Populationen mit inflammatorischer Aktivität, CD11b^{high}CD11c^{high}, CD11b^{high}CD11c^{low} und CD11b^{int}CD11c^{int}, exprimieren CCR2 (vgl. Tabelle 10) [14]. Gemäß der untersuchten Hypothese waren eben diese Populationen in Ccr2-defizienten Nieren vermindert. Neben M1-Makrophagenmarkern exprimiert insbesondere die renale CD11b^{high}CD11c^{low} und CD11b^{int}CD11c^{int} Makrophagenpopulation auch M2-Markergene wie Interleukin 10 [14]. In den Ccr2-defizienten Tieren zeigte sich sowohl eine verminderte renale Expression von M1- als auch M2-Markern an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie. Diese Daten stimmen mit dem Konzept überein, dass infiltrierende Monozyten erst in Abhängigkeit vom intrarenalen Mikromilieu zu M1- oder M2-Makrophagen differenzieren [158].

Tabelle 10: Expression von Ccr2 in den verschiedenen Phagozytenpopulationen
aus [14]

Population	Ccr2-Expression
1: CD11b ^{high} CD11c ^{high}	+++
2: CD11b ^{high} CD11c ^{low}	++
3: CD11b ^{int} CD11c ^{int}	+
4: CD11b ^{low} CD11c ^{high}	±
5: CD11b ⁻ CD11c ^{int}	±

Histopathologisch zeigte sich, dass in die Glomeruli, den Ort der initialen Schädigung, im Ccr2-defizienten Hintergrund signifikant weniger Makrophagen infiltrierten. Dazu passt auch die reduzierte glomeruläre Expression von klassischen Entzündungsmediatoren bzw. deren Rezeptoren wie Ccl2, Ccl5, TNF- α , TNFR1 und TNFR2. Interstitielle Makrophagen, charakterisiert durch ihre F4/80- oder ERHR3-Expression, waren in Ccr2-defizienten Tieren ebenfalls vermindert, korrelierend zum geringer ausgeprägten renalen Schaden.

Es ist bekannt, dass ein Ccr2-defizienter Genotyp in der gesunden Maus mit einer Monozytopenie im Blut einhergeht, da Ccr2 die Auswanderung insbesondere inflammatorischer Monozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn vermittelt [75, 159]. So zeigten Serbina und Pamer, dass in Ccr2-defizienten Tieren nach Infektion durch das Bakterium *Listeria monocytogenes* Ly6C⁺ Monozyten im Knochenmark akkumulieren, sodass die Zusammensetzung der zirkulierenden Monozyten deutlich verändert war. Sie vermuteten, dass diese Zellen jedoch in periphere geschädigte Organe unabhängig von Ccr2 migrieren, die eigentliche Organinfiltration also auch bei Ccr2-Defizienz möglich ist [159, 160]. Andere Autoren zeigten dagegen im Modell der Thioglykolat-induzierten Peritonitis [75] und nach renalem Ischämie-Reperfusionsschaden [156] eine Ccr2-abhängige Rekrutierung von Monozyten in entzündetes Gewebe.

In unserer Untersuchung waren die Versuchstiere am Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie ebenso monozytopen. Neben einer verminderten Infiltration von Leukozyten in die Niere aufgrund des inhibierten Ccl2-Ccr2-Signalwegs könnte daher die Monozytopenie der Ccr2-defizienten Versuchstiere zum Teil ursächlich für die verminderte Infiltration von Entzündungszellen sein. Um genauer differenzieren zu können, welchen Anteil die Monozytopenie Ccr2-defizienter Tiere oder eine abgeschwächte Ccr2-vermittelte renale Leukozyteninfiltration an der verminderten Leukozytenakkumulation in

die Niere hat, sind weitere Untersuchungen notwendig. Beispielsweise könnten Experimente mit adaptivem Transfer von Wildtyp- und Ccr2-defizienten Monozyten neue Erkenntnisse liefern. So würde eine verminderte Rekrutierung von Ccr2-defizienten Monozyten in geschädigte Nieren dafür sprechen, dass Ccr2 direkt zur renalen Gewebeeinfiltration beiträgt.

5.3.4 Ccr2-Defizienz vermindert renale Fibrose und Fibrozytenakkumulation

Die Fibrosierung geschädigten Gewebes ist das Endstadium vieler chronisch-entzündlicher Erkrankungen und geht unabhängig von der Art des betroffenen Gewebes meist mit dessen Funktionsverlust einher [114].

TGF- β steht am Anfang einiger Fibrose-assoziiierter Signalwege und leitet fibrotischen Umbau des Gewebes durch Polarisierung von Makrophagen in den M2-Phänotyp, Aktivierung von Fibroblasten und Akkumulation von extrazellulärer Matrix ein [13, 161, 162]. Unter nephritischen Bedingungen regt CCL2 intrinsische Nierenzellen dazu an, TGF- β zu produzieren [162]. Dieser intrinsische profibrotische Mechanismus wird durch die Sekretion von TGF- β durch einwandernde Leukozyten [62], insbesondere Makrophagen [163, 164], verstärkt. Der Rekrutierung leukozytärer Effektorzellen, unter anderem CCR2-vermittelt, wird daher eine wesentliche Rolle in Bezug auf fibrotische Prozesse zugeschrieben.

In der vorliegenden Studie zeigten Adriamycin-behandelte Wildtyp-Tiere sowohl auf RNA-, als auch auf Protein-Ebene, letzteres gemessen im Urin, höhere Tgf- β -Spiegel als der Ccr2-defiziente Genotyp. Andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass ein Anstieg der Tgf- β -Konzentration im Blut bei der diabetischen Nephropathie mit einer höheren Proteinurie als Zeichen der vermehrten glomerulären Schädigung einhergeht [27]. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen aus der hier vorgestellten Arbeit, in der eine im Vergleich zu Ccr2-defizienten Mäusen höhere glomeruläre Tgf- β -Expression in Wildtyptieren mit vermehrter Glomerulosklerose und Proteinurie korrelierte.

Bei vielen Nierenerkrankungen werden Fibroblasten durch die Induktion verschiedener Chemokine und Zytokine wie TGF- β aktiviert und zur Proliferation angeregt. Die so aktivierten Myofibroblasten sezernieren extrazelluläre Matrixproteine. Die Ablagerung von extrazellulärer Matrix in Glomeruli und dem Interstitium ist typisch für renale Fibrose und für den Übergang von akutem zu chronischem Nierenversagen [165]. Myofibroblasten sind somit maßgeblich an der Entstehung und Ausbildung der renalen Fibrose bei chronischen Nephropathien beteiligt [106, 166]. Die Expressionshöhe von

FSP1, einem mit dem Auftreten von Fibroblasten assoziierten Marker, und die Anzahl FSP1 positiver Zellen korreliert bei Nierenerkrankungen positiv mit dem Anstieg funktioneller Parameter wie Proteinurie und Serumkreatinin und strukturellem Schaden wie Glomerulosklerose und dem Ausmaß fibrotischer Areale [110]. Die verminderte Expression von renalem Fsp1 in Ccr2-defizienten Mäusen mit Adriamycin-Nephropathie lässt auf eine geringere Akkumulation renaler Fibroblasten schließen. Passend dazu waren die Expression von α SMA und die Akkumulation von α SMA-positiven Myofibroblasten in Ccr2-defizienten Nieren deutlich geringer.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Expression extrazellulärer Matrixproteine, welche essenzieller Bestandteil von Narbengewebe sind, in der Adriamycin-Nephropathie bei Ccr2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp deutlich vermindert ist. Bei den angesprochenen Matrixproteinen mit reduzierter renaler mRNA-Expression handelt es sich um Laminin, Fibronectin, die Prokollagene 1 bis 3 sowie Prokollagen 4.

Übereinstimmend mit den hier dargestellten Ergebnissen in der Adriamycin-Nephropathie konnte die Verminderung der renalen Fibrose durch Ccr2- oder Ccl2-Defizienz oder -Blockade auch in anderen Modellen renaler Erkrankungen nachgewiesen werden. Hierbei korrelierte eine Verminderung der renalen (Myo)Fibroblastenzahl und Matrixablagerung ebenfalls mit einer verminderten Akkumulation von Leukozyten, insbesondere von Makrophagen in den geschädigten Nieren. So beschrieben Kitagawa et al., dass im Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) eine Ccr2-Defizienz bzw. Blockade von Ccr2 durch die Antagonisten Propergermanium oder RS-504393 zu einer verminderten Infiltration von Makrophagen und interstitiellen Fibrose im Vergleich zum Wildtyp führte [82]. Im Modell der murinen Streptozotosin-induzierten diabetischen Nephropathie konnte gezeigt werden, dass eine Ccl2-Defizienz zu einer geringeren Akkumulation von Makrophagen in Glomeruli und Tubulointerstitium sowie zu einer verminderten renalen Fibrose führt [167]. Die Entwicklung und Ausprägung der diabetischen Stoffwechsellage unterschied sich hierbei zwischen Ccl2-defizienten und Wildtyp-Tieren nicht [168]. Die Blockade von Ccl2 durch Transfektion mit Plasmiden einer Ccl2-Mutanten und von Ccr2 durch den Antagonisten Propagermanium zeigte bei der diabetischen Nephropathie in iNOS-überexprimierenden Mäusen einen ähnlichen Effekt, nämlich eine verminderte mesangiale Matrixexpansion und Makrophageninfiltration [155]. Durch Verabreichung von mNOX-E36-3'PEG, dem Ccl2-blockierenden Spiegelmer, konnte im db/db-Modell der diabetischen Nephropathie auch bei

bereits fortgeschrittener glomerulärer Schädigung eine Verminderung der diffusen Glomerulosklerose erreicht werden [84].

Neben ortsständigen renalen Zellen tragen infiltrierende CD45⁺CD11b⁺ Zellen aus dem Knochenmark zum fibrotischen Gewebeumbau in der Niere bei. Diese Fibrozyten können durchflusszytometrisch durch Expression von CD45, CD11b und Kollagen-1 charakterisiert werden [113, 169]. Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass Fibrozyten selbst CCR2 exprimieren [107, 113, 170] und ihre Rekrutierung in geschädigtes Gewebe über Aktivierung des CCL2-CCR2-Signalweges erfolgen könnte. Im Modell der murinen Ureterobstruktion konnte beispielsweise gezeigt werden, dass es bei Ccr2-Depletion zu einer reduzierten Migration von Fibrozyten in die Niere und daraus resultierend zu einer geringeren Expression renalen Kollagens kommt [107, 113]. In dieser Arbeit führte die Ccr2-Defizienz in der Adriamycin-Nephropathie ebenfalls zu einer deutlich geringeren Akkumulation von Fibrozyten in der Niere. Wie oben beschrieben lag zudem eine verminderte renale Fibrose vor. Hieraus lässt sich ein möglicher direkt antifibrotischer Effekt einer Blockade von Ccr2 bzw. des Ccl2-Ccr2-Signalweges durch eine verminderte renale Rekrutierung aktivierter Fibrozyten ableiten. Anhand der Daten der vorliegenden Arbeit kann jedoch nicht abschließend geklärt werden, zu welchem Anteil die detektierte Fibrose an Tag 28 der Adriamycin-Nephropathie auf die Gewebeschädigung durch proentzündliche Monozyten und Makrophagen oder auf die Beteiligung infiltrierender Fibrozyten zurückzuführen ist.

Zusammenfassend zeigte der Ccr2-defiziente Genotyp im Vergleich zum Wildtyp neben der verminderten Glomerulosklerose auch eine signifikant geringere renale Fibrozytenakkumulation, tubulointerstitielle Fibrose und damit und kompartimentübergreifend einen deutlichen Schutz in Bezug auf fibrotischen Gewebeumbau in der Niere.

5.4 Konklusion und Ausblick

Im FSGS-Modell der Adriamycin-Nephropathie führen die vernarbenden Veränderungen im Glomerulus zu maßgeblichen Einschränkungen der renalen Filtrationsfunktion. Tiere im Ccr2-defizienten Hintergrund zeigten sich bezüglich glomerulärer Funktion und Filtration im Vergleich zum Wildtyp deutlich geschützt. Zudem entwickelte die Ccr2-defiziente Gruppe eine signifikant geringere Leukozyteninfiltration, tubulointerstitielle Schädigung und renale Fibrose als die Wildtyp-Gruppe. Als zugrundeliegender Mechanismus wurde die verminderte Einwanderung von Entzündungszellen, darunter vor allem Monozyten, und die verminderte Akkumulation von Fibrozyten durch die Inhibition des CCL2-CCR2 Signalweges identifiziert.

In Zukunft sollten weitere tierexperimentelle Studien im Modell der Adriamycin-Nephropathie oder anderen FSGS-Modellen mit pharmakologischer Blockade von Ccr2 oder seines Liganden CCL2 durchgeführt werden, um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu verifizieren. Tatsächlich wurden zeitgleich mit dem Abschluss der vorliegenden Arbeit protektive Effekte einer Ccr2-Blockade mit dem kleinmolekularen Antagonisten CCX872 im FSGS-Modell der Adriamycin-Nephropathie und der 5/6-Nephrektomie publiziert [171]. Übereinstimmend mit den hier vorgestellten Daten in Ccr2-defizienten Mäusen führte die Ccr2-Blockade in beiden Modellen zu einer verminderten Albuminurie, verbesserter Nierenfunktion und geringerem renalen Gewebeschaden [171].

Längerfristig könnten daher klinische Antagonistenstudien im Rahmen der FSGS geplant werden. Die Firma Chemocentryx führte bereits klinische Studien mit humanen CCR2-Antagonisten durch. Der CCR2-Antagonist CCX140B zeigte in einer randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Phase II-Studie bei der diabetischen Nephropathie therapeutische Effekte. Im Rahmen der Studie war die Albuminurie im Morgenurin bei Patienten mit diabetischer Nephropathie nach Behandlung mit CCX140B zusätzlich zur Standardbehandlung mit ACE-Hemmern bzw. Angiotensinrezeptorantagonisten um bis zu 16% im Vergleich zu Placebo vermindert. Die Autoren schließen in diesem Zusammenhang auf einen additiven renoprotektiven Effekt durch die Antagonisierung von CCR2 [86]. In einer weiteren randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Phase IIa-Studie an Patienten mit diabetischer Nephropathie wurden die Effekte einer dreimonatigen Hemmung von CCL2 durch das Spiegelmer Emapticap pegol (NOX-E36) beschrieben. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion des HbA1c bei Behandlung mit NOX-E36 im Vergleich zum Placebo. Insbesondere zeigte sich eine signifikante Reduktion der Albuminurie im Studienverlauf unter Behandlung mit NOX-E36 um 29%. Aufgrund der Sicherheit und der guten Verträglichkeit von NOX-E36 und des potentiellen krankheitsmodifizierenden Effektes betonten die Autoren die Notwendigkeit weiterer Studien zur genaueren Charakterisierung von NOX-E36 bei Nierenerkrankungen [87].

Diese präklinischen und klinischen Daten weisen zusammenfassend darauf hin, dass eine pharmakologische CCR2-Blockade auch in der FSGS einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz darstellen kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen daher die Rationale, verfügbare humane CCR2- oder CCL2-Antagonisten in klinischen Studien zur primären FSGS zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Jahresbericht Datenanalyse Dialyse für den Gemeinsamen Bundesausschuss. Medical Netcare GmbH, 2013.
2. Schlieper G, Hess K, Floege J, Marx N. The vulnerable patient with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31.
3. Segerer S, Nelson PJ. Chemokines in renal diseases. *Sci World J.* 2005;5.
4. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Robert Koch Institut; Statistisches Bundesamt; 2015.
5. Frei U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland. *QuaSi-Niere.* 2008.
6. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenlehrbuch Histologie. 3. Auflage. Thieme, Stuttgart; 2009.
7. Kitching AR, Hutton HL. The Players: Cells Involved in Glomerular Disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2016;11.
8. Daehn I, Casalena G, Zhang T, Shi S, Fenninger F, Barasch N, Yu L, D'Agati V, Schlondorff D, Kriz W, Haraldsson B, Bottinger EP. Endothelial mitochondrial oxidative stress determines podocyte depletion in segmental glomerulosclerosis. *J Clin Invest.* 2014;124.
9. Eremina V, Baelde HJ, Quaggin SE. Role of the VEGF-a signaling pathway in the glomerulus: evidence for crosstalk between components of the glomerular filtration barrier. *Nephron Physiol.* 2007;106.
10. Brosius FC, Coward RJ. Podocytes, signaling pathways, and vascular factors in diabetic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2014;21.
11. Bierzynska A, Soderquest K, Koziell A. Genes and podocytes - new insights into mechanisms of podocytopathy. *Front Endocrinol* 2014;5.
12. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010;327.
13. Wang Y, Harris DC. Macrophages in renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22.
14. Kawakami T, Lichtnekert J, Thompson LJ, Karna P, Bouabe H, Hohl TM, Heinecke JW, Ziegler SF, Nelson PJ, Duffield JS. Resident renal mononuclear phagocytes comprise five discrete populations with distinct phenotypes and functions. *J Immunol.* 2013;191.

15. Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol.* 2014;5.
16. Kinsey GR. Macrophage dynamics in AKI to CKD progression. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25.
17. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22.
18. Korbet SM, Schwartz MM, Lewis EJ. Primary focal segmental glomerulosclerosis: clinical course and response to therapy. *Am J Kidney Dis.* 1994;23.
19. Korbet SM. Treatment of primary FSGS in adults. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23.
20. Swaminathan S, Leung N, Lager DJ, Melton LJ, 3rd, Bergstralh EJ, Rohlinger A, Fervenza FC. Changing incidence of glomerular disease in Olmsted County, Minnesota: a 30-year renal biopsy study. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1.
21. Bose B, Cattran D. Glomerular diseases: FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9.
22. Chapter 6: Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in adults. *Kidney Int Suppl (2011).* 2012;2.
23. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 2007;71.
24. Kriz W. The pathogenesis of 'classic' focal segmental glomerulosclerosis-lessons from rat models. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18 Suppl 6.
25. D'Agati VD. Pathobiology of focal segmental glomerulosclerosis: new developments. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012;21.
26. Chen YM, Liapis H. Focal segmental glomerulosclerosis: molecular genetics and targeted therapies. *BMC Nephrol.* 2015;16.
27. Hathaway CK, Gasim AM, Grant R, Chang AS, Kim HS, Madden VJ, Bagnell CR, Jr., Jennette JC, Smithies O, Kakoki M. Low TGFbeta1 expression prevents and high expression exacerbates diabetic nephropathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112.
28. Stokes MB, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati VD. Cellular focal segmental glomerulosclerosis: Clinical and pathologic features. *Kidney Int.* 2006;70.

29. Fogo AB. Minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 6.
30. Romagnani P, Remuzzi G, Glassock R, Levin A, Jager KJ, Tonelli M, Massy Z, Wanner C, Anders HJ. Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3.
31. Himer L, Vannay Á, Sziksz E, Tulassay T. Immunological and Molecular Mechanisms Leading to Fibrosis: Origin of Renal Myofibroblasts. IntechOpen; 2012.
32. Gbadegesin R, Lavin P, Foreman J, Winn M. Pathogenesis and therapy of focal segmental glomerulosclerosis: an update. *Pediatr Nephrol*. 2011;26.
33. Franceschini N, Hogan SL, Falk RJ. Primum non nocere: Should adults with idiopathic FSGS receive steroids? *Semin Nephrol*. 2003;23.
34. Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Agraz-Pamplona I, Carnicer-Caceres C, Ramos-Terrades N, Ostos-Roldan E, Quiles-Perez MT, Arbos-Via MA. Treatment of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis: options in the event of resistance to corticosteroids and calcineurin inhibitors. *Nefrologia*. 2013;33.
35. Zhao M, Li M, Li X, Shao C, Yin J, Gao Y. Dynamic changes of urinary proteins in a focal segmental glomerulosclerosis rat model. *Proteome Sci*. 2014;12.
36. de Mik SM, Hoogduijn MJ, de Bruin RW, Dor FJ. Pathophysiology and treatment of focal segmental glomerulosclerosis: the role of animal models. *BMC Nephrol*. 2013;14.
37. Schnaper HW. Idiopathic focal segmental glomerulosclerosis. *Semin Nephrol*. 2003;23.
38. Ponticelli C. Recurrence of focal segmental glomerular sclerosis (FSGS) after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25.
39. Cravedi P, Kopp JB, Remuzzi G. Recent progress in the pathophysiology and treatment of FSGS recurrence. *Am J Transplant*. 2013;13.
40. Howard OM, Ben-Baruch A, Oppenheim JJ. Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol*. 1996;14.
41. Yamasaki R, Liu L, Lin J, Ransohoff RM. Role of CCR2 in immunobiology and neurobiology. *Clin Exp Neuroimmunol*. 2012;3.

42. Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol.* 2002;283.
43. Rollins BJ. Chemokines. *Blood.* 1997;90.
44. Segerer S, Schlondorff D. Role of chemokines for the localization of leukocyte subsets in the kidney. *Semin Nephrol.* 2007;27.
45. Rajagopalan L, Rajarathnam K. Structural Basis of Chemokine Receptor Function—A Model for Binding Affinity and Ligand Selectivity. *Biosci Rep.* 2006;26.
46. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29.
47. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.* 2006;354.
48. Rajagopalan L, Rajarathnam K. Ligand selectivity and affinity of chemokine receptor CXCR1. Role of N-terminal domain. *J Biol Chem.* 2004;279.
49. Vielhauer V, Anders H-J, Schlöndorff D. Chemokines and Chemokine Receptors as Therapeutic Targets in Lupus Nephritis. *Semin Nephrol.* 2007;27.
50. Weber C, Weber KSC, Klier C, Gu S, Wank R, Horuk R, Nelson PJ. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and TH1-like/CD45RO+T cells. *Blood.* 2001;97.
51. Ley K. Pathways and bottlenecks in the web of inflammatory adhesion molecules and chemoattractants. *Immunol Res.* 2001;24.
52. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol.* 1997;139.
53. Fong AM, Robinson LA, Steeber DA, Tedder TF, Yoshie O, Imai T, Patel DD. Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* 1998;188.
54. Segerer S, Nelson PJ, Schlondorff D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11.
55. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood.* 2002;100.

56. Tsuboi N, Yoshikai Y, Matsuo S, Kikuchi T, Iwami K, Nagai Y, Takeuchi O, Akira S, Matsuguchi T. Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol.* 2002;169.
57. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lindenmeyer MT, Vielhauer V. Distinct contributions of TNF receptor 1 and 2 to TNF-induced glomerular inflammation in mice. *PLoS One.* 2013;8.
58. Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Strutz F, Stangassinger M, Luckow B, Grone HJ, Schlondorff D. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12.
59. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, Klar-Mohamad N, Gerritsen AF, Bruijn JA, Daha MR, van Es LA. Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant protein-1 by human proximal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* 1995;48.
60. Rovin BH, Yoshiumura T, Tan L. Cytokine-induced production of monocyte chemoattractant protein-1 by cultured human mesangial cells. *J Immunol.* 1992;148.
61. Satriano JA, Hora K, Shan Z, Stanley ER, Mori T, Schlondorff D. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol.* 1993;150.
62. Anders HJ, Vielhauer V, Kretzler M, Cohen CD, Segerer S, Luckow B, Weller L, Grone HJ, Schlondorff D. Chemokine and chemokine receptor expression during initiation and resolution of immune complex glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12.
63. Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlondorff D. Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12.
64. Panzer U, Steinmetz OM, Stahl RA, Wolf G. Kidney diseases and chemokines. *Curr Drug Targets.* 2006;7.

65. Tesch GH, Maifert S, Schwarting A, Rollins BJ, Kelley VR. Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Exp Med.* 1999;190.
66. Saccani A, Saccani S, Orlando S, Sironi M, Bernasconi S, Ghezzi P, Mantovani A, Sica A. Redox regulation of chemokine receptor expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97.
67. Dubois PM, Palmer D, Webb ML, Ledbetter JA, Shapiro RA. Early signal transduction by the receptor to the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 in a murine T cell hybrid. *J Immunol.* 1996;156.
68. Neel NF, Schutyser E, Sai J, Fan G-H, Richmond A. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. *Cytokine and Growth Factor Reviews.* 16.
69. Israel F, Charo RH, Richard Horuk, Kouji Matsushima, Philip M. Murphy, Joost J. Oppenheim. Chemokine receptors: CCR2. *IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY.* 2017.
70. White GE, Iqbal AJ, Greaves DR. CC chemokine receptors and chronic inflammation- therapeutic opportunities and pharmacological challenges. *Pharmacol Rev.* 2013;65.
71. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003;19.
72. Tarabra E, Giunti S, Barutta F, Salvidio G, Burt D, Deferrari G, Gambino R, Vergola D, Pinach S, Perin PC, Camussi G, Gruden G. Effect of the monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine receptor 2 system on nephrin expression in streptozotocin-treated mice and human cultured podocytes. *Diabetes.* 2009;58.
73. Lee EY, Chung CH, Khoury CC, Yeo TK, Pyagay PE, Wang A, Chen S. The monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 loop, inducible by TGF-beta, increases podocyte motility and albumin permeability. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2009;297.
74. You H, Gao T, Raup-Konsavage WM, Cooper TK, Bronson SK, Reeves WB, Awad AS. Podocyte-specific chemokine (C-C motif) receptor 2 overexpression mediates diabetic renal injury in mice. *Kidney Int.* 2017;91.

75. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* 2007;117.
76. Si Y, Tsou CL, Croft K, Charo IF. CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest.* 2010;120.
77. Fujimura N, Xu B, Dalman J, Deng H, Aoyama K, Dalman RL. CCR2 inhibition sequesters multiple subsets of leukocytes in the bone marrow. *Sci Rep.* 2015;5.
78. Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AE, Plachy J, Bruhl H, Frink M, Anders HJ, Vielhauer V, Pfirstinger J, Stangassinger M, Schlondorff D. Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol.* 2001;166.
79. Eardley KS, Zehnder D, Quinkler M, Lepenies J, Bates RL, Savage CO, Howie AJ, Adu D, Cockwell P. The relationship between albuminuria, MCP-1/CCL2, and interstitial macrophages in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2006;69.
80. Segerer S, Cui Y, Hudkins KL, Goodpaster T, Eitner F, Mack M, Schlondorff D, Alpers CE. Expression of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 and its receptor chemokine receptor 2 in human crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11.
81. Perez de Lema G, Maier H, Franz TJ, Escribese M, Chilla S, Segerer S, Camarasa N, Schmid H, Banas B, Kalaydjiev S, Busch DH, Pfeffer K, Mampaso F, Schlondorff D, Luckow B. Chemokine receptor Ccr2 deficiency reduces renal disease and prolongs survival in MRL/lpr lupus-prone mice. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16.
82. Kitagawa K, Wada T, Furuichi K, Hashimoto H, Ishiwata Y, Asano M, Takeya M, Kuziel WA, Matsushima K, Mukaida N, Yokoyama H. Blockade of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *Am J Pathol.* 2004;165.
83. Seok SJ, Lee ES, Kim GT, Hyun M, Lee JH, Chen S, Choi R, Kim HM, Lee EY, Chung CH. Blockade of CCL2/CCR2 signalling ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice. *Nephrol Dial Transplant.* 2013;28.
84. Ninichuk V, Clauss S, Kulkarni O, Schmid H, Segerer S, Radomska E, Eulberg D, Buchner K, Selve N, Klussmann S, Anders HJ. Late onset of Ccl2 blockade

- with the Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG prevents glomerulosclerosis and improves glomerular filtration rate in db/db mice. *Am J Pathol.* 2008;172.
85. Kulkarni O, Pawar RD, Purschke W, Eulberg D, Selve N, Buchner K, Ninichuk V, Segerer S, Vielhauer V, Klusmann S, Anders HJ. Spiegelmer inhibition of CCL2/MCP-1 ameliorates lupus nephritis in MRL-(Fas)lpr mice. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18.
 86. de Zeeuw D, Bekker P, Henkel E, Hasslacher C, Gouni-Berthold I, Mehling H, Potarca A, Tesar V, Heerspink HJ, Schall TJ. The effect of CCR2 inhibitor CCX140-B on residual albuminuria in patients with type 2 diabetes and nephropathy: a randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015;3.
 87. Menne J, Eulberg D, Beyer D, Baumann M, Saudek F, Valkusz Z, Wiecek A, Haller H. C-C motif-ligand 2 inhibition with emapticap pegol (NOX-E36) in type 2 diabetic patients with albuminuria. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32.
 88. Wu H, Wang Y, Tay Y-C, Zheng G, Zhang C, Alexander SI, Harris D. DNA vaccination with naked DNA encoding MCP-1 and RANTES protects against renal injury in adriamycin nephropathy. *Kidney Int.* 2005;67.
 89. Boring L, Gosling J, Chensue SW, Kunkel SL, Farese RV, Broxmeyer HE, Charo IF. Impaired monocyte migration and reduced type 1 (Th1) cytokine responses in C-C chemokine receptor 2 knockout mice. *J Clin Invest.* 1997;100.
 90. Wang YM, Wang Y, Harris DC, Alexander SI, Lee VW. Adriamycin nephropathy in BALB/c mice. *Curr Protoc Immunol.* 2015;108.
 91. Boonsanit D, Kanchanapangka S, Buranakarl C. L-carnitine ameliorates doxorubicin-induced nephrotic syndrome in rats. *Nephrology (Carlton).* 2006;11.
 92. Deman A, Ceysens B, Pauwels M, Zhang J, Houte KV, Verbeelen D, Van den Branden C. Altered antioxidant defence in a mouse adriamycin model of glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16.
 93. Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, Onoyama K, Fujimi S, Fujishima M. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int.* 1986;29.
 94. Lichtnekert J, Kawakami T, Parks WC, Duffield JS. Changes in macrophage phenotype as the immune response evolves. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13.

95. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, Lundkvist A, Johansson BR, Saito Y, Betsholtz C. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol.* 2002;161.
96. Andersen K, Eltrich N, Lichtnekert J, Anders HJ, Vielhauer V. The NLRP3/ASC inflammasome promotes T-cell-dependent immune complex glomerulonephritis by canonical and noncanonical mechanisms. *Kidney Int.* 2014;86.
97. Wang Y, Wang YP, Tay YC, Harris DC. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int.* 2000;58.
98. Tryggvason K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10.
99. Benzing T. Signaling at the slit diaphragm. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15.
100. Han M, Li Y, Liu M, Li Y, Cong B. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat. *BMC Nephrol.* 2012;13.
101. Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, Kaskel FJ, Moore LC, Devarajan P. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int.* 2003;63.
102. Han WK, Bailly V, Abichandani R, Thadhani R, Bonventre JV. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.* 2002;62.
103. Schmid M, Wege AK, Ritter U. Characteristics of "Tip-DCs and MDSCs" and Their Potential Role in Leishmaniasis. *Front Microbiol.* 2012;3.
104. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164.
105. Meng XM, Tang PM, Li J, Lan HY. TGF-beta/Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol.* 2015;6.
106. Sun YB, Qu X, Caruana G, Li J. The origin of renal fibroblasts/myofibroblasts and the signals that trigger fibrosis. *Differentiation.* 2016;92.
107. Xia Y, Entman ML, Wang Y. CCR2 regulates the uptake of bone marrow-derived fibroblasts in renal fibrosis. *PLoS One.* 2013;8.
108. Eddy AA. Overview of the cellular and molecular basis of kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl (2011).* 2014;4.

109. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002;115.
110. Nishitani Y, Iwano M, Yamaguchi Y, Harada K, Nakatani K, Akai Y, Nishino T, Shiiki H, Kanauchi M, Saito Y, Neilson EG. Fibroblast-specific protein 1 is a specific prognostic marker for renal survival in patients with IgAN1. *Kidney Int.* 2005;68.
111. Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1994;1.
112. Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol.* 1998;160.
113. Reich B, Schmidbauer K, Rodriguez Gomez M, Johannes Hermann F, Gobel N, Bruhl H, Ketelsen I, Talke Y, Mack M. Fibrocytes develop outside the kidney but contribute to renal fibrosis in a mouse model. *Kidney Int.* 2013;84.
114. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol.* 2008;214.
115. Anders HJ, Vielhauer V, Schlondorff D. Current paradigms about chemokines as therapeutic targets. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19.
116. Fogo AB, Kon V. Pathophysiology of progressive renal diseases - an overview. *Immunologic renal diseases.* 2nd Edition 2001.
117. Risdon RA, Sloper JC, De Wardener HE. Relationship between renal function and histological changes found in renal-biopsy specimens from patients with persistent glomerular nephritis. *Lancet.* 1968;2.
118. Kimura M, Takahasi H, Ohtake T, Sato T, Hishida A, Nishimura M, Honda N. Interstrain differences in murine daunomycin-induced nephrosis. *Nephron.* 1993;63.
119. Zheng Z, Schmidt-Ott KM, Chua S, Foster KA, Frankel RZ, Pavlidis P, Barasch J, D'Agati VD, Gharavi AG. A Mendelian locus on chromosome 16 determines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102.
120. Zheng Z, Pavlidis P, Chua S, D'Agati VD, Gharavi AG. An ancestral haplotype defines susceptibility to doxorubicin nephropathy in the laboratory mouse. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17.
121. Papeta N, Zheng Z, Schon EA, Brosel S, Altintas MM, Nasr SH, Reiser J, D'Agati VD, Gharavi AG. Prkdc participates in mitochondrial genome

- maintenance and prevents Adriamycin-induced nephropathy in mice. *J Clin Invest.* 2010;120.
122. Luckow B, Hanggli A, Maier H, Chilla S, Loewe RP, Dehmel S, Schlondorff D, Loetscher P, Zerwes HG, Muller M. Microinjection of Cre recombinase protein into zygotes enables specific deletion of two eukaryotic selection cassettes and enhances the expression of a DsRed2 reporter gene in *Ccr2/Ccr5* double-deficient mice. *Genesis.* 2009;47.
123. Vielhauer V, Berning E, Eis V, Kretzler M, Segerer S, Strutz F, Horuk R, Grone HJ, Schlondorff D, Anders HJ. CCR1 blockade reduces interstitial inflammation and fibrosis in mice with glomerulosclerosis and nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2004;66.
124. Hulkko J, Patrakka J, Lal M, Tryggvason K, Hultenby K, Wernerson A. Neph1 is reduced in primary focal segmental glomerulosclerosis, minimal change nephrotic syndrome, and corresponding experimental animal models of adriamycin-induced nephropathy and puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron Extra.* 2014;4.
125. Tavoloni N, Guarino AM. Disposition and metabolism of adriamycin in the rat. *Pharmacology.* 1980;21.
126. Ohtake T, Kimura M, Nishimura M, Hishida A. Roles of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in murine daunomycin-induced nephropathy. *J Lab Clin Med.* 1997;129.
127. Tesch GH. Diabetic nephropathy - is this an immune disorder? *Clin Sci.* 2017;131.
128. Wada J, Makino H. Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12.
129. Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C, Muros de Fuentes M, Garcia-Perez J. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2011;7.
130. Patsouris D, Cao JJ, Vial G, Bravard A, Lefai E, Durand A, Durand C, Chauvin MA, Laugerette F, Debard C, Michalski MC, Laville M, Vidal H, Rieusset J. Insulin Resistance is Associated with MCP1-Mediated Macrophage Accumulation in Skeletal Muscle in Mice and Humans. *PLoS One.* 2014;9.
131. Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K,

- Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem.* 2006;281.
132. Banba N, Nakamura T, Matsumura M, Kuroda H, Hattori Y, Kasai K. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2000;58.
133. Yang M, Gan H, Shen Q, Tang W, Du X, Chen D. Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with microinflammation in patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy uremia. *Inflammation.* 2012;35.
134. Awad AS, You H, Gao T, Cooper TK, Nedospasov SA, Vacher J, Wilkinson PF, Farrell FX, Brian Reeves W. Macrophage-derived tumor necrosis factor- α mediates diabetic renal injury. *Kidney Int.* 2015;88.
135. Awad AS, Kinsey GR, Khutsishvili K, Gao T, Bolton WK, Okusa MD. Monocyte/macrophage chemokine receptor CCR2 mediates diabetic renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;301.
136. Sassy-Prigent C, Heudes D, Mandet C, Belair MF, Michel O, Perdereau B, Bariety J, Bruneval P. Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 2000;49.
137. Reichel CA, Khandoga A, Anders HJ, Schlondorff D, Luckow B, Krombach F. Chemokine receptors Ccr1, Ccr2, and Ccr5 mediate neutrophil migration to postischemic tissue. *J Leukoc Biol.* 2006;79.
138. Peired A, Angelotti ML, Ronconi E, la Marca G, Mazzinghi B, Sisti A, Lombardi D, Gicaliere E, Della Bona M, Villanelli F, Parente E, Ballerini L, Sagrinati C, Wanner N, Huber TB, Liapis H, Lazzeri E, Lasagni L, Romagnani P. Proteinuria impairs podocyte regeneration by sequestering retinoic acid. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24.
139. Sullivan T, Miao Z, Dairaghi DJ, Krasinski A, Wang Y, Zhao BN, Baumgart T, Ertl LS, Pennell A, Seitz L, Powers J, Zhao R, Ungashe S, Wei Z, Boring L, Tsou CL, Charo I, Berahovich RD, Schall TJ, Jaen JC. CCR2 antagonist CCX140-B provides renal and glycemic benefits in diabetic transgenic human CCR2 knockin mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305.

140. Lee VW, Harris DC. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology (Carlton)*. 2011;16.
141. Mulay SR, Linkermann A, Anders HJ. Necroinflammation in Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27.
142. Nam BY, Paeng J, Kim SH, Lee SH, Kim DH, Kang HY, Li JJ, Kwak SJ, Park JT, Yoo TH, Han SH, Kim DK, Kang SW. The MCP-1/CCR2 axis in podocytes is involved in apoptosis induced by diabetic conditions. *Apoptosis*. 2012;17.
143. Taneda S, Honda K, Ohno M, Uchida K, Nitta K, Oda H. Podocyte and endothelial injury in focal segmental glomerulosclerosis: an ultrastructural analysis. *Virchows Arch*. 2015;467.
144. Hakrrouch S, Cebulla A, Schaldecker T, Behr D, Mundel P, Weins A. Extensive podocyte loss triggers a rapid parietal epithelial cell response. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25.
145. Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin Alters Glomerular Endothelium to Induce Proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20.
146. Bakos E, Thaiss CA, Kramer MP, Cohen S, Radomir L, Orr I, Kaushansky N, Ben-Nun A, Becker-Herman S, Shachar I. CCR2 Regulates the Immune Response by Modulating the Interconversion and Function of Effector and Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2017;198.
147. Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke*. 2007;38.
148. Tang WW, Qi M, Warren JS. Monocyte chemoattractant protein 1 mediates glomerular macrophage infiltration in anti-GBM Ab GN. *Kidney Int*. 1996;50.
149. Anders HJ, Vielhauer V, Schlondorff D. Chemokines and chemokine receptors are involved in the resolution or progression of renal disease. *Kidney Int*. 2003;63.
150. Wang Y, Wang Y, Cao Q, Zheng G, Lee VW, Zheng D, Li X, Tan TK, Harris DC. By homing to the kidney, activated macrophages potentially exacerbate renal injury. *Am J Pathol*. 2008;172.
151. Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R. Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. *J Exp Med*. 1997;186.

152. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N. Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94.
153. Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol*. 2003;15.
154. Okuma T, Terasaki Y, Kaikita K, Kobayashi H, Kuziel WA, Kawasuji M, Takeya M. C-C chemokine receptor 2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuation of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases. *J Pathol*. 2004;204.
155. Kanamori H, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Nagai K, Takahashi T, Abe H, Iehara N, Fukatsu A, Okamoto H, Kita T, Doi T, Arai H. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;360.
156. Li L, Huang L, Sung SS, Vergis AL, Rosin DL, Rose CE, Jr., Lobo PI, Okusa MD. The chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 mediate monocyte/macrophage trafficking in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*. 2008;74.
157. Devi S, Li A, Westhorpe CL, Lo CY, Abeynaike LD, Snelgrove SL, Hall P, Ooi JD, Sobey CG, Kitching AR, Hickey MJ. Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus. *Nature Medicine*. 2013;19.
158. Anders HJ, Ryu M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int*. 2011;80.
159. Serbina NV, Pamer EG. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol*. 2006;7.
160. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2008;180.

161. Schnaper HW, Hayashida T, Hubchak SC, Poncelet AC. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284.
162. Wolf G, Jocks T, Zahner G, Panzer U, Stahl RA. Existence of a regulatory loop between MCP-1 and TGF-beta in glomerular immune injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002;283.
163. Diamond JR, Ricardo SD, Klahr S. Mechanisms of interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *Semin Nephrol.* 1998;18.
164. Zeisberg M, Strutz F, Muller GA. Role of fibroblast activation in inducing interstitial fibrosis. *J Nephrol.* 2000;13 Suppl 3.
165. Jiang C, Shao Q, Jin B, Gong R, Zhang M, Xu B. Tanshinone IIA Attenuates Renal Fibrosis after Acute Kidney Injury in a Mouse Model through Inhibition of Fibrocytes Recruitment. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
166. Kimura S, Asaka M, Atsumi H, Imura J, Fujimoto K, Chikazawa Y, Nakagawa M, Okuyama H, Yamaya H, Yokoyama H. Circulating fibrocytes in ischemia-reperfusion injury and chronic renal allograft fibrosis. *Nephron Clin Pract.* 2012;121.
167. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney Int.* 2006;69.
168. Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia.* 2007;50.
169. Mack M, Yanagita M. Origin of myofibroblasts and cellular events triggering fibrosis. *Kidney Int.* 2015;87.
170. Xu J, Lin SC, Chen J, Miao Y, Taffet GE, Entman ML, Wang Y. CCR2 mediates the uptake of bone marrow-derived fibroblast precursors in angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301.
171. Miao Z, Ertl LS, Newland D, Zhao B, Wang Y, Zang X, Campbell JJ, Liu X, Dang T, Miao S, Krasinski A, Punna S, Zeng Y, McMahon J, Zhang P, Charo IF, Schall TJ, Singh R. CCR2 antagonism leads to marked reduction in

Literaturverzeichnis

proteinuria and glomerular injury in murine models of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS). PLoS One. 2018;13.

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mir das Erstellen dieser Arbeit ermöglicht haben, insbesondere bei den Nachfolgenden:

PD Dr. med. Volker Vielhauer danke ich für die hervorragende Betreuung, die großartige Unterstützung und Hilfsbereitschaft und die motivierende Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. In der Zeit, die ich in seinem Labor verbringen durfte, habe ich fachliche und persönliche Erfahrungen von unschätzbarem Wert gemacht.

Bei Nuru Eltrich für seine Hilfsbereitschaft, Ruhe und Geduld bei der Einarbeitung in verschiedene Methoden und allen anderen, hier nicht namentlich genannten, Mitarbeitern der Klinischen Biochemie, unter denen ich liebe Freunde gefunden habe, für die Unterstützung.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für die kollegiale Unterstützung und den Zusammenhalt, die bereichernde gemeinsame Zeit und die vielen wertvollen Diskussionen und Ideen.

Unschätzbbarer Dank geht an meine Eltern. Ihr seid die Basis von Allem was ich bin und erreicht habe.

Julian Marschner danke ich für die bedingungslose Unterstützung und Motivation in allen Phasen meiner Promotion.

Dank geht außerdem an das Förderprogramm für Forschung und Lehre der Ludwig-Maximilians-Universität für die strukturelle und finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Eidesstattliche Versicherung

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

„Identifizierung einer pathophysiologischen Rolle des Chemokinrezeptors CCR2 bei
der fokal segmentalen Glomerulosklerose“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe. Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21.02.2019

Anja Wilkening

Publikationen

1. Wilkening A, Eltrich N, Luckow B, Vielhauer V. The chemokine receptor CCR2 mediates glomerular injury and interstitial fibrosis in focal segmental glomerulosclerosis. Abstract-USB-Stick Kongress für Nephrologie 2018. (10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin 27.09.-30.09.2018. Freier Vortrag FV31)
2. Wilkening A, Eltrich N, Luckow B, Vielhauer V. Deficiency for the chemokine receptor CCR2 protects from glomerular injury and interstitial fibrosis in adriamycin-induced glomerulosclerosis. J Am Soc Nephrol. 2018; 29 (Abstract Suppl): 696 (Kidney Week 2018, American Society of Nephrology, San Diego 23.10.-28.10.2018. Poster FR-PO1058)
3. Wilkening A, Krappe J, Mühe AM, Lindenmeyer MT, Eltrich N, Luckow B, Vielhauer V. C-C chemokine receptor type 2 mediates glomerular injury and interstitial fibrosis in focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant. Epub 2018 Dec 28.