

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Zentrum für Innere Medizin III. Medizinische Klinik und Poliklinik
(Nephrologie/Rheumatologie) – Direktor: Prof. Dr. med. Rolf A. K. Stahl

FUNKTION DES CHEMOKINREZEPTORS 5
BEI DER EXPERIMENTELLEN
MURINEN LUPUSNEPHRITIS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Philipp Bramke
aus Villingen im Schwarzwald

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 04.03.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Ulf Panzer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Oliver Steinmetz

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Sascha Ahyai

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2. Einleitung	2
2.1 Einführung.....	2
2.2 Prävalenz, Inzidenz und klinische Manifestation des SLE	4
2.3 Lupusnephritis.....	5
2.4 Pathogenese des SLE	6
2.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	10
2.5.1 Chemokine	10
2.5.2 Die CC-Chemokinrezeptoren unter besonderer Berücksichtigung von CCR5	11
3. Material und Methoden	13
3.1 Versuchstiere	13
3.2 Genotypisierung	13
3.3 Erfassung des Körpergewichtes.....	14
3.4 Urindiagnostik.....	14
3.4.1 Gewinnung des Mäuserins	14
3.4.2 Bestimmung der Albuminausscheidung im Urin.....	15
3.4.3 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	16
3.5 Genexpression.....	16
3.5.1 RNA-Isolation aus dem Nierengewebe	16
3.5.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	18
3.5.3 RTQ-PCR (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction)	18
3.6 Histologie.....	20
3.6.1 Fixierung des Nierengewebes	20
3.6.2 Einbettung	20
3.6.3 Schneiden, Backen und Deparaffinierung	20
3.6.4 Histologische und immunhistologische Färbungen	21
3.6.5 Auswertungsverfahren	21

3.7 Zellsuspension	22
3.7.1 Milzeinzelzellsuspension.....	22
3.7.2 Niereneinzelzellsuspension.....	22
3.8 Durchflusszytometrie	24
3.8.1 FACS-Analysen	24
3.8.2 Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper	25
3.9 Zytokin – ELISA	26
3.10 Statistische Auswertung	27
4. Ergebnisse	28
4.1 Generierung und Charakterisierung der CCR5 ^{-/-} MRL/lpr Maus	28
4.2 Die Lupusnephritis ist aggraviert in CCR5 ^{-/-} MRL/lpr Mäusen	29
4.3 Infiltration von T-Zellen	31
4.4 Infiltration von Monozyten	33
4.6 Humorale Immunantwort bei CCR5 ^{-/-} MRL/lpr-Mäuse.....	37
4.7 Die Expression von Chemokinen bei CCR5 ^{-/-} MRL/lpr-Mäusen	38
4.8 Die Bedeutung von Apoptose und Proliferation	39
4.9 Auswirkung des renalen und systemischen CCR5 ^{-/-} Mangels auf die CCR5/CCR1- Liganden	41
4.10 CCR5/CCR1-Ligandenproduktion und Clearance bei CCR5 ^{-/-} C57BL/6-Mäusen	43
5. Diskussion	45
6. Zusammenfassung	49
7. Literaturverzeichnis	50
8. Abkürzungsverzeichnis	64
9. Publikation	65
10. Danksagung	66
11. Eidesstattliche Erklärung	67

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine schubweise verlaufende, chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung, die nahezu jedes Organsystem betreffen kann. Aufgrund seiner vielfältigen Symptome und sehr unterschiedlichen Ausprägungen gilt der SLE immer noch als „medizinisches Chamäleon“. Einer der prognostisch wichtigsten Faktoren ist die Nierenschädigung, meist als Folge der Lupusnephritis.

Dabei stellt die Infiltration von T-Zellen und Monozyten ein charakteristisches Merkmal der humanen und der experimentellen Lupusnephritis dar. Insbesondere der Th₁-Immunantwort wird eine zentrale Rolle bei der Regulation renaler Entzündungsprozesse zugeschrieben. Generell spielt die Molekülfamilie der Chemokine und der Chemokin-Rezeptoren eine zentrale Funktion bei der zielgerichteten Migration von Leukozyten. In dieser Arbeit wird im etablierten Mausmodell der Lupusnephritis (MRL-FAS lpr) der Verlauf von Chemokin-Rezeptor-5-gendefizienten MRL Mäusen mit MRL „Wildtyp Tieren“ hinsichtlich der T-Zellinfiltration, Nierenfunktion, Proteinurie, histologischen Parametern und der systemischen Immunantwort verglichen. Ziel dieser Untersuchungen ist es, ein besseres Verständnis der in vivo Bedeutung des CCR5 bei Glomerulonephritiden zu erzielen.

2. Einleitung

2.1 Einführung

Die Nierenbeteiligung (Lupusnephritis) im systemischen Lupus erythematoses (SLE) ist für die Patienten von prognostisch ungünstiger entscheidender Bedeutung, da sie erheblichen Einfluss auf die Mobilität und Mortalität hat. Sie betrifft etwa 70% der SLE-Patienten (Cameron, 1999; Schwarting, 2008) und hat ein breites Spektrum an Verlaufsformen: von asymptomatischer Mikrohämaturie bis hin zum rapidprogressiven akuten Nierenversagen (Schwarting, 2008). Histologisch unterscheidet man beim SLE zwischen glomerulären, tubulointerstitiellen und vaskulären Manifestationen.

Dabei stehen die glomeruläre Veränderungen, bedingt durch die Immunkomplex-Ablagerungen, im Vordergrund (Schwarting, 2008). In diesem Zusammenhang wird den einwandernden T-Helferzellen (CD4+) eine besondere Rolle zugeschrieben (Tipping et al., 2006). Bei den T-Helferzellen kann man zwischen Th1- und Th2-Zellen unterscheiden. Die Th1-Antwort kennzeichnet sich durch die Produktion von $\text{INF } \gamma$, IL2 und TNF-alpha aus, bei der Th2-Antwort ist es die Produktion von IL4 und IL13 (Sallusto et al., 2000). Darüber hinaus wird noch ein Einfluss von IL17 produzierenden TH17-Zellen diskutiert (Steinman, 2007). Beim SLE wird angenommen, dass gerade die eingewanderten Th1-Zellen den Entzündungsprozess verstärken und somit letztendlich den glomerulären Gewebsschaden vorantreiben (Tipping et al., 2005). Bevor es aber zu einer Ausweitung der Entzündungsreaktion kommt, müssen die Th1-Zellen mittels Chemotaxis in das entsprechende Gewebe navigiert werden.

Die zielgerichtete Migration von Leukozyten zu den Entzündungsherden, wird durch die Molekülfamilien der Chemokine und Chemokinrezeptoren reguliert. Es konnte bereits in Tiermodellen gezeigt werden, dass die Expression von Chemokin mit der Infiltration von Leukozyten assoziiert ist. Durch Chemokinneutralisation bzw. bei Chemokindefizienten Tieren kam es zu einer verminderten renalen Infiltration von Entzündungszellen (Panzer et al., 2001; Lloyd et al., 1997; Tesch et al., 1999) und entsprechend zu geringeren glomerulären Läsionen (Lloyd et al., 1997, Schneider et al., 1999).

Chemokinrezeptoren werden differentiell in unterschiedlichen Effektor-T-Zellen exprimiert. Th1-Zellen exprimieren vorwiegend die Rezeptoren CXCR3, CXCR6, CCR1 und CCR5 auf ihrer Oberfläche, demgegenüber exprimieren Th2-Zellen CCR3, CCR4 und CCR8 (Sallusto et al., 2000). Der genaue Ein-

fluss der einzelnen Chemokinrezeptoren bei der Rekrutierung und Regulation der verschiedenen T-Zell-Populationen in der Niere und letztendlich ihre genaue Bedeutung bei der glomerulären Schädigung ist bisher nicht vollständig geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des Chemokinrezeptors CCR5 in MRL/MpJ-FAS lpr (MRL/lpr) Mäusen – einem etablierten Maus-Modell für die Lupusnephritis – zu untersuchen.

2.2 Prävalenz, Inzidenz und klinische Manifestation des SLE

Der Lupus erythematoses ist eine systemische Autoimmunerkrankung. Die Prävalenz wird in der Literatur für Europa mit ca. 50 pro 100.000 Einwohnern angegeben (divergiert je nach der ethnischen Zugehörigkeit), die jährliche Inzidenz mit 5 bis 10 pro 100.000 Einwohnern, wobei im Verhältnis deutlich mehr Frauen als Männer (Verhältnis 10:1) betroffen sind (Herold, 2010).

Die Diagnose wird nach den Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) gestellt. Für eine entsprechende Diagnose müssen mindestens 4 der 11 Kriterien simultan oder in Serie erfüllt sein (Tan et al., 1982; Hochberg., 1997).

Klassifikationskriterien sind:

1. Schmetterlingsexanthem
2. Diskoides Exanthem
3. Photosensibilität
4. Orale Ulcera (Orale und / oder nasopharyngeale Ulcera)
5. Arthritis (Non-erosive Arthritis, von mindestens 2 Gelenken)
6. Serositis (Pleuritis, Perikarditis)
7. Nephropathie (Proteinurie, > 0,5 g/d oder zelluläre Zylinder)
8. ZNS-Beteiligung (Psychosen, zerebrale Anfälle)
9. Hämatologische Veränderungen
(hämolytische Anämie, Leukopenie, Lymphopenie, Thrombozytopenie)
10. Immunologische Störungen (Anti-dsDNA, Anti-Sm-Antikörper)
11. Antinukleäre Antikörper (ANA)

Laborchemisch können unter anderem noch folgende Autoantikörper nachgewiesen werden: ANA, dsDNA, SM, U1RNP, Ribosomales P, PCNA, RO, LA, RA33, Cardiolipin und Rheumafaktor. Wobei die Ausprägung sehr variabel sein kann, es können aber auch nur einzelne Autoantikörper vertreten sein (Pezzutto et al 2007). Die Bandbreite an Symptomen (siehe ACR Kriterien) und die Fülle an Labormar-

kern verdeutlicht, wie weit gefächert und komplex der SLE ist. Die Ätiologie und Pathogenese sind bisher nicht vollständig geklärt.

2.3 Lupusnephritis

Prognostisch wichtigster Faktor beim SLE ist die Nierenschädigung, meist als Lupusnephritis, die sich in Form einer Glomerulonephritis darstellt. Bereits bei Diagnosestellung findet man bei 25-50% der SLE-Patienten pathologische Veränderungen des Urinsediments oder der Nierenfunktion, die im Verlauf bei 60-80% der Patienten nachweisbar werden. Histologisch lassen sich bei 70-80% dieser Patienten bereits am Anfang Nierenveränderungen nachweisen (Pollak et al., 1964; Cameron, 1999; Schwartzing, 2008). Die Bandbreite an Verlaufsformen ist sehr breit: von asymptomatischer Mikrohämaturie bis hin zum Nierenversagen (Schwartzing, 2008). Histologisch lassen sich 6 verschiedene Formen der glomerulären Schädigungen der Lupusnephritis (LN) klassifizieren.

Klassifikation Lupusnephritis:

(International Society of Nephrology / Renal Pathology Society; Mod. nach Weening et al., 2004)

Klassifikation	Histologie
I	Minimale mesangiale LGN
II	Mesangioproliferative LGN
III	Fokale LGN (<50% der Glomeruli) aktiv / sklerosiert, segmental oder global
IV	Diffuse LGN (>50% der Glomeruli) aktiv / sklerosiert, segmental oder global
V	Membranöse LGN
VI	Sklerosierte LGN (>90% der Glomeruli)

[LGN Lupus-Glomerulonephritis]

Die histologische Beurteilung gibt einerseits Aufschluss über den Krankheitsverlauf, andererseits bestimmt sie maßgeblich den Therapieansatz.

Therapieempfehlungen

(Zusammenfassung nach Schwarting 2008)

Histologie LN-Klassifikation	Therapie
I	Keine immunsuppressive Therapie
II	Keine immunsuppressive Therapie
III	Bei klinischer Aktivität: analog zu Typ LN IV
IV	Induktion: Low-dose-Cyclophosphamid oder Mycophenolatmofetil Remission: Mycophenolatmofetil oder Azathioprin
V	Optimierte Begleittherapie (Angiotensinblockade etc.) Bei nephrotischem Syndrom und/oder Kreatininanstieg: Ciclosporin, Mycophenolatmofetil, Cyclophosphamid
VI	Keine immunsuppressive Therapie mehr, supportive Maßnahmen

Eine Prognoseabschätzung ist komplex und richtet sich nach dem Verlauf sowie dem Therapieansprechen. Auch wenn sich die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten enorm verbessert haben, ist eine kurative Therapie nicht möglich. Ziel muss es bleiben, die Krankheit in ihrer Pathogenese besser zu verstehen und somit neue Therapieansätze zu entwickeln.

2.4 Pathogenese des SLE

Die Ätiologie und Pathogenese der SLE sind im Einzelnen bisher noch nicht vollständig verstanden.

Immunologisch wird der SLE als Typ-III-Reaktion aufgefasst. Für die Pathogenese der SLE werden vier Hauptmechanismen diskutiert, hinzu kommt noch eine genetische Komponente. Dazu zählen:

- Erhöhte Mengen an nukleären Antigenen, die durch eine Fehlregulation der Apoptose entstehen sowie durch einen Defekt in der Clearance von apoptotischen Partikeln.
- Posttranslationale Modifikationen von Autoantigenen, die dadurch Neoantigene entstehen lassen, sowie die Präsentation von kryptischen Proteinpartikeln.
- Stimulation von B- und T-Lymphozyten, die zur Produktion von Autoantikörpern führt sowie „Epitope spreading“.
- Entstehung von Immunkomplexen und Ablagerung dieser in Organen mit entsprechender Entzündungsreaktion.
- Genetische Faktoren der Antigenbeseitigung, Auslösung von Toleranz und organspezifischer Ausprägungen der Autoimmunität.

Bei SLE-Patienten findet man zumeist Antikörper gegen nukleäre Strukturen: Nucleosome, snRNT und RO-Partikel (Gröne et al 2008). Die Nucleosomen bestehen aus Histonen (H2A, H2B, H3, H4) und DNA (160 Nucleotidpaare) und stellen damit eine Struktureinheit des Chromatins dar (Tax et al 1995). Bei der Apoptose einer Zelle entstehen so genannte „Bleds“, die Chromatinpartikel enthalten. Die Bleds sollten normalerweise kurz danach abgeräumt und phagozytiert werden. Bei SLE-Patienten kommt es aber zu einer Störung der Clearance apoptotischer Bleds/Partikel (Gröne et al 2008; Dieker et al 2002). Die nicht abgeräumten Zytoplasma-Bleds brechen auf und freies Chromatin kann austreten, dieses initiiert über TLRs die Reifung der dendritischen Zellen (Gröne et al 2008; Mohan et al 1993). Begünstigt wird es dabei auch durch den Verlust der CR1-Rezeptoren auf dem Erythrozyten (Wolf 2004). Dies sollte man vor dem Hintergrund einer Fehlregulation der Apoptose bei SLE-Patienten betrachten (Schiller et al., 2007; Herrmann et al., 1998; Lorenz et al., 2002).

Die bei der Apoptose entstandenen Chromatinpartikel, zum Beispiel Nucleosomen, weisen eine erhöhte Immunogenität auf (Gröne et al., 2008; Mortensen et al., 2008). Dendritische Zellen präsentieren nucleosomenassoziierte Partikel und führen so zu einer Aktivierung von T-Helferzellen.

B-Lymphozyten können ihrerseits Antigene autoreaktiver T-Zellen präsentieren, so dass es zur Ausweitung der Immunantwort, im Sinne des „Epitope spreading“, kommt (Pezzutto et al., 2007). Die aktivierten T-Zellen regen letztendlich B-Zellen zur Antikörperproduktion gegen Nucleosomen, beziehungsweise Kernbestandteilen, an. Die dabei entstehenden Antigenen-Antikörper-Komplexe zirkulieren und lagern sich in Organen ab (zum Beispiel in den Glomeruli) oder bilden sich in situ (s.u.) (Gröne et al 2008; Kalaaji et al., 2006; Kramers et al., 1994). Darüber hinaus gibt es noch die Möglichkeit, dass sich Antikörper gegen die Gewebsbestandteile direkt richten (Schiller et al., 2007; Hanrotel-Saliou et al., 2010). Des Weiteren gibt es eine eindeutige Korrelation zwischen Histonenkompatibilitäts-Antigenen-Expression auf MHC II und der Disposition zum SLE (zum Beispiel DR2, GQ β 1, AZH bei der Nephritis). Dabei wird angenommen, dass MCH II-Partikel des eigenen Organismus präsentiert und aufgrund ihrer kryptischen Struktur als Antigen erkannt werden (Gröne et al., 2008). Als eine weitere Möglichkeit wird die posttranslationale Modifikation von Proteinen bei der Apoptose diskutiert (Schiller et al., 2003; Casciola-Rosen, 1999). Im Verlauf bilden die polyklonal stimulierten B-Zellen nicht nur Antikörper gegen Kernbestandteile, sondern auch Antikörper gegen Antigene des Zytoplasma, der Zellmembran und Gerinnungsfaktoren. Dabei kommt es zu einer herabgesetzten

B-Zellantwort auf Mitogene sowie zu einer reduzierten Antikörperbildung gegen Fremddantigene (Wolf, 2004). Ebenfalls bekannt sind:

- eine veränderte T-Zellfunktion,
- Lymphopenie,
- eingeschränkte IL2-Produktionen,
- vermehrt zirkulierende IL2-Rezeptoren,
- verminderte Bildung CD8-positiver T-Zellen,
- reduzierte T-Zellantwort gegen Lektine und
- eine schlechte Toleranz-Induktion.

Autoantikörper nehmen auf unterschiedliche Weise Einfluss auf die Autoimmunität durch Immunkomplexe-vermittelte Typ-III-Reaktion, und durch die Aktivierung von Immunzellen zur Produktion von pathogenen Zytokinen wie $\text{INF}\alpha$, $\text{TNF}\alpha$ und IL1 (Wolf, 2004).

Auch regulatorischen T-Zellen wird eine Komponente in der Pathogenese des SLE zugeschrieben. FoxP3 (Forkhead-Box-Protein P3) ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für regulatorische T-Zellen, dabei ist FoxP3 spezifisch für native und peripher entstandene regulatorische T-Zellen. Im Urin (sowie im Blut) von Patienten mit aktiver Lupusnephritis konnte eine erhöhte Expression mRNA von FoxP3 gezeigt werden, im Vergleich zu Patienten mit nicht aktiven SLE. Dabei korrelierte die Expression von FoxP3 und die Schwere der Erkrankung (Wang et al., 2009).

Eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese des SLE scheinen auch plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) zu spielen, die durch zirkulierende Immunkomplexe zu $\text{INF}\alpha$ -Produktion stimuliert werden (Lövgren et al., 2004). Darüber hinaus lassen sie sich auch durch apoptotische Mikro-Partikel stimulieren (Schiller et al., 2007; Heyder et al., 2007).

Bei der Lupusnephritis ist die Art der Antikörper für die Bindung an die glomeruläre Basalmembran und die Nephritogenität der Immunkomplexe entscheidend. Antikörper können die positiven Ladungen eines Antigen-Antikörper-Komplexes steigern und somit den isoelektrischen Punkt, bei physiologischem pH-Wert erhöhen. Damit wird die Bindung des Immunkomplexes an die negativ geladene glomeruläre Basalmembran verstärkt. Bei medikamenteninduziertem Lupus ist es häufig umgekehrt: Hier wird der isoelektrische Punkt verringert und damit die Nephritogenität des Immunkomplexes (Gröne et al 2008). Autoantigene und Autoantikörper können auch getrennt durch die Basalmembran

treten und sich erst anschließend zu subepithelialen Immunkomplexen in situ formieren (Vlahakos et al., 1992). Durch eine Kreuzreaktion mit α -Actinin, einem glomerulären Zytoskeletprotein, können Anti-DNS-Antikörper direkt mit glomerulären Strukturen reagieren (Deocharan et al., 2002).

Nach Einwanderung und Bindung von Immunkomplexen und Antikörpern an die glomeruläre Basalmembran kommt es zur Aktivierung von Komplement, Freisetzung von Sauerstoffradikalen, der Steigerung der lokalen Produktion von Chemokinen und Chemotaxis (Oates et al., 2002). Zirkulierende Entzündungszellen (Monozyten, Lymphozyten) wandern ein und sorgen für die Entwicklung der glomerulären Schädigung. Neben dieser gesamten Pathogenese gibt es noch ein Lupus-Mausmodell [MRL(lpr/lpr)-Modell], mit spezifischen Genveränderungen. Unter anderem konnte in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden, dass es auch nach der Ausschaltung des Genlokus für antinukleäre Antikörperproduktion – auch ohne anti-nukleären- und anti-dsDNS-Antikörper – zu einer Nephritis kommt (Chan et al., 1999; Waters et al., 2004).

Aus der summarisch dargestellten Pathogenese lassen sich verschiedene Modelle einer Ätiologie der SLE ableiten. Unter Exazerbation eines bakteriellen oder viralen Infektes kann es durch die Erreger DNA oder RNA zu einer Aktivierung dendritischer Zellen über TLR-Rezeptoren (TLR3, TLR9) kommen, durch einen Defekt in der Clearance von (apoptotischen) Partikeln wird die Antikörperentstehung getriggert (Gröne et al., 2008). In der Epidermis der Haut können UV-Strahlen Apoptosen induzieren und dadurch Langerhans-Zellen zu einer der Antikörperbildungen gegen Nucleosome anregen, ebenfalls ist hierbei ebenfalls gestörte Clearance denkbar (Gröne et al., 2008). Bereits erwähnt wurde die Histonen-kompatibilitäts-Antigenen-Expression auf MHC II (zum Beispiel DR2, GQ β 1, AZH). Dies alles zeigt die große Komplexität der Pathogenese und Ätiologie des SLE.

2.5 Chemokine und Chemokinrezeptoren

2.5.1 Chemokine

Chemokine sind kleine Signalproteine, ihr Name leitet sich von Chemotaxis induzierende Zytokine ab, was zugleich auch einen wichtigen Teil ihrer Funktion beschreibt – Migrationsinduktion. Exprimiert werden sie von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Epithelzellen, Stromazellen, Chondrozyten, Keratinozyten und T-Zellen (Baggiolini, 1998).

Chemokine bestehen aus 75 - 125 Aminosäuren und haben ein Molekulargewicht von 7 -14 kDA. Die Tertiärstruktur von Chemokinen ist hochkonserviert. Der Hauptkörper besteht aus drei antiparallelen β -Faltblattsträngen und einer darüberliegenden α -Helix mit dem Carboxy-Terminus, der konservierte Amino-Terminus ist hingegen ungeordnet (Fernandez et al., 2002). Der Amino-Terminus trägt in der Regel vier Cysteine, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Baggiolini, 1998; Fernandez et al. 2002). Anhand der Anordnung der aminoterminalen Cysteine werden die Chemokine im Wesentlichen in zwei Untergruppen unterteilt. Bei den CC-Chemokinen (CCL) liegen die beiden Cysteine direkt nebeneinander, während sie bei CXC-Chemokinen (CXCL) die Cysteine durch eine variable Aminosäure getrennt sind. Ausnahmen bilden C-Chemokine und CX₃C-Chemokine (Murphy et al., 2000; Hüttenrauch 2004).

Chemokine sind bedingt receptorspezifisch, CC-Chemokine binden ausschließlich an CC-Chemokinrezeptoren (CCR) und CXC-Chemokine (CXCL) binden ihrerseits nur an CXC-Chemokinrezeptoren (CXCR). Dabei kann ein Chemokinrezeptor mehrere Chemokine seiner Klasse binden und ebenso können Chemokine an mehreren Chemokinrezeptoren der entsprechenden Klasse binden (Baggiolini, 1998). Neben der Klassifizierung über ihre Struktur können, Chemokine und ihre Rezeptoren auch funktionell unterteilt werden in – konstitutive sowie inflammatorische Chemokine. Dabei regulieren unter physiologischen Bedingungen die konstitutiven Chemokine Leukozytenmigration und die Sekretion inflammatorischer Chemokine wird durch Entzündungsmediatoren induziert. Durch die Aktivierung von Chemokinrezeptoren mittels Chemokine wird die zielgerichtete Migration (zum Beispiel von Leukozyten) angestrebt (s.u.) (Baggiolini, 1998; Fernandez et al. 2002). Die Chemokin-Wirkung ist nicht ausschließlich auf Migrationsinduktion beschränkt, darüber hinaus haben sie eine funktionale Beteiligung bei der Organentwicklung sowie bei der Angiogenese (Luster et al., 1998; Hüttenrauch, 04).

2.5.2 Die CC-Chemokinrezeptoren | unter besonderer Berücksichtigung von CCR5

Der CC-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) wird auf T-Lymphozyten (CD4; CD8), NKT- Zellen, Monozyten, Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen, aber auch auf Neuronen, Mikroglia, Endothelzellen, Epithelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert. Die Sequenz des humanen CCR5- Rezeptors und seiner Liganden wurde erstmals im Jahre 1996 beschrieben (Samson et al. 1996a). CCR5 zählt zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) und gehört damit zur Unterfamilie 1b innerhalb der GPCRs. Die Struktur von CCR5 entspricht dem einheitlichen Aufbau von GPCRs aus sieben Transmembrandomänen (TM), die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. In der Unterfamilie 1b der GPCRs (also CCRs) ist die Ligandbindestelle primär in den Bereichen des N-Terminus und damit an der extrazellulären Schleife lokalisiert (Bockaert et al. 1999). Der CCR5 besteht aus 352 Aminosäuren und besitzt eine errechnete molekulare Masse von 40,6 kDa (Samson et al., 1996; Raport et al., 1996). Die Transmembrandomänen sind bei GPCRs aus 20 – 27 hydrophoben Aminosäuren aufgebaut, die eine α -helikale Anordnung aufweisen (Oppermann 2004). Meistens erfolgt die Signaltransduktion von GPCRs durch die Stimulation des Rezeptors mit einem spezifischen Liganden. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Bindung von heterotrimeren G-Proteinen ermöglicht wird und es folgt die Induzierung von Aktivierung oder Inhibition verschiedener Signalwege und Effektoren. Es folgt eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C oder G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase des Rezeptors, dadurch wird die Bindung von β -Arrestin ermöglicht, die zusammen mit der Phosphorylierung für den Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins sorgt. Hierbei wird die homologe Phosphorylierung des CCR5 primär durch die Kinasen GRK2 und GRK3 vermittelt (Oppermann et al., 1999). In Folge wird der G-Protein-Komplex instabil, dadurch verändert sich die Konfiguration des heterotrimeren G-Proteins und es dissoziiert die GTP- gebundene α -Untereinheit vom membrangebundenen $\beta\gamma$ -Dimer. Das dissoziierte G-Protein kann die Signaltransduktion einleiten. Sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit wirken auf eine Reihe von Effektormolekülen als „first messenger“ (Hamm 1998). Die $G_{\alpha s}$ -Untereinheit stimuliert die Adenylatcyklase, die den „second messenger“ cAMP generiert, cAMP aktiviert seinerseits unter anderem die Proteinkinase A (PKA). Die $G_{\alpha q/11}$ - Untereinheit aktiviert die Phospholipase C. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit

stimuliert die membranständige Phospholipase C, die wiederum PIP₂ in IP₃ und DAG spaltet. IP₃ wird von Phosphatasen in Inositol umgewandelt und bewirkt die intrazelluläre Freisetzung von Calciumionen. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit zusammen mit PIP₂ sowie DAG binden jeweils an G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK), die daraufhin die Serin- und Threonin-Phosphorylierung aktivierter GPCRs bewirken (Pitcher et al., 1992; Pitcher et al., 1998). Die wichtigsten physiologischen Liganden von CCR₅ sind die Chemokine RANTES (CCL₅), MIP-1 α (CCL₃) und MIP-1 β (CCL₄) (Raport et al., 1996). Es wird vermutet, dass Chemokine sich in zwei Schritten an den CCR₅ binden. Wobei der Kern des Chemokins mit extrazellulären Domänen des CCR₅ interagiert und die zweite extrazelluläre Schleife des CCR₅ die Ligandspezifität determiniert. Anschließend bindet der Chemokin-N-Terminus an der Transmembranregion des CCR₅ und triggert so die Rezeptoraktivierung (Clark-Lewis et al., 1995; Samson et al., 1997; Hüttenrauch 2004).

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Haltung und Arbeit geschah in den Tierställen und Laboren / OPs der Versuchstierhaltung (VTH) im Campus Forschung des Universitätsklinikums Eppendorf. Die Tiere wurden in Käfigen vom Typ 1284L Eurostandard Typ II long (Firma: Tecniplast) gehalten, je nach Verträglichkeit wurden 1 bis maximal 5 Tiere in einem Käfig gehalten. Einzeltiere hatten zusätzlich noch ein Mouse House (Firma: Tecniplast) in ihrem Käfig. Es gab einen festen hell-dunkel Zyklus von 12 Stunden mit stets freiem Zugang zu Futter und Wasser. Die Temperatur lag bei 21°- 22° Grad, mit einer Luftfeuchtigkeit von 50-55%. Alle benötigten Techniken zum Umgang mit den Tieren wurden in dem Kurs „Tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus“ am 06.11.2008 erlernt und darüber hinaus unter Anleitung erfahrener Arbeitsgruppenmitarbeiter erworben.

Die MRL/MpJ-FAS lpr (MRL/lpr) und MRL/MpJ (MRL) Mäuse wurden vom Jackson Labor (Bar Harbor, ME) geliefert und anschließend in der Versuchstierhaltung als Kolonien weitergezüchtet und aufrechterhalten. Die CCR5^{-/-} C57BL/6 sind ebenfalls vom Jackson Labor (Bar Harbor, ME). Es wurden nur männliche Mäuse für die Versuche verwendet.

Für die genetische Erzeugung von CCR5^{-/-} MRL/lpr Mäusen wurden CCR5^{-/-} Mäuse über acht Generationen in einen MRL/lpr Hintergrund zurückgekreuzt. Um einen gleichen genetischen Hintergrund der CCR5 Wild-Typ MRL/lpr Mäuse zu gewährleisten, erfolgte deren Zucht / Ableitung ebenfalls aus dem gleichen CCR5^{-/-} MRL/lpr Stamm. Als gesunde Kontrollgruppe agierten MRL-Mäuse. Die Tierexperimente wurden entsprechend der nationalen und institutionellen Tierhaltung sowie unter Einhaltung der ethischen Richtlinien durchgeführt und durch ein entsprechendes Komitee genehmigt.

3.2 Genotypisierung

Zur Feststellung des gewünschten CCR5-Status wurde den Tieren kurz nach Geburt von den Tierpflegern eine Schwanzbiopsie genommen. Aus dieser Biopsie wurde genomische DNA isoliert, anschließend mittels PCR die entsprechende Sequenz vervielfältigt und per Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Genotypisierungen wurden von Frau Anett Peters (MTA, UKE, Hamburg) und Frau Sabrina Benn-

stein (BTA, UKE, Hamburg) durchgeführt. Zur Extraktion wurde das XNAT2 Extract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma) gemäß des Protokolls des Herstellers verwendet. Folgende Primer der Firma Invitrogen wurden für die Genotypisierung verwendet:

CCR5 -/- Mäuse: 20µM

mCCR5.1	CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC
mCCR5.2	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC
mCCR5.3	CAG GCA ACA GAG ACT CTT GG
mCCR5.4	TCA TGT TCT CCT GTG GAT CG

MRL/MPJ - Lupusmäuse: 20µM

mLPR 1	GTA AAT AAT TGT GCT TCG TCA G
mLPR 2	TAG AAA GGT GCA CGG GTG TG
mLPR 3	CAA ATC TAG GCA TTA ACA GTG

3.3 Erfassung des Körpergewichtes

Zur Verlaufskontrolle wurde bei allen Versuchstieren das Körpergewicht wöchentlich erfasst. Die Werte wurden in einer Tabelle zusammengeführt und wöchentlich miteinander verglichen.

3.4 Urindiagnostik

3.4.1 Gewinnung des Mausurins

Als funktionaler Marker der renalen Schädigung im Verlauf der Versuche diente der Albumin / Kreatinin-Quotient aus dem Urin (Ginsberg et al., 1983; Cottiero et al., 1995). Für die Uringewinnung wurden die Mäuse einmal wöchentlich für maximal 5 Stunden in Stoffwechselkäfige gesetzt. Die Stoffwechselkäfige wurden eigens für dieses Projekt von Dipl.-Ing. Uwe Dührkopp und dem Verfasser dieser Dissertation entwickelt und durch die Firma TBS GmbH (Hamburg) aus Flugzeugaluminium gebaut. In den Boden der Stoffwechselkäfige wurden 96-Well- Mikrotiterplatten (Microtest Plate 96-Well, Sarstedt, USA) eingesetzt, um den Mausurin aufzufangen. Die Tiere hatten in den Stoffwechselkäfigen stets freien Zugang zu Trinkwasser. Der in dieser Zeit abgesonderte Urin wurde mit einer Pipette in vorbereitete Eppis (Eppendorf-Tubes) überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass weder mit

Faeces noch mit Wasser vermischter Urin verwendet wurde. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.

3.4.2 Bestimmung der Albuminausscheidung im Urin

Wie bereits erwähnt, diente der Albumin/Kreatinin-Quotient zur Quantifizierung der Albuminurie, dies geschah in Rücksichtnahme der Versuchstiere, da ein 24-h-Sammelurin mit einer sehr hohen Belastung für die Tiere verbunden ist.

Die Bestimmung der Kreatinin-Konzentration erfolgte durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums-Hamburg-Eppendorf (UKE). Dafür wurden die erforderlichen Urinproben für 10 Minuten bei 4°C und 12000 RpM in einer Zentrifuge (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany) zentrifugiert, um unerwünschte Verunreinigungen zu pelletieren. Vom Überstand wurden 150 Mikroliter für das Zentrallabor zur Messung abpipettiert. Bei der späteren Organentnahme wurde zusätzlich Blut abgenommen und aus dem Plasma der BUN durch das UKE Zentrallabor bestimmt.

Mittels ELISA wurde die Albumin-Konzentration im Urin bestimmt (s.u.). Zur semiquantitativen Einschätzung des Proteingehalts im Urin wurden Urinsticks (Multistix 10 SG, Bayer, Germany) verwendet. Mit Hilfe dieser groben Orientierung war es möglich, die nötigen (Urin-) Verdünnungen für den ELISA herzustellen. Der Urine wurden dann mit *sample dilution buffer* (100ml *postcoat-solution* + 0.5ml *tween*) nach dem entsprechenden Schema verdünnt (s.u.).

Teststreifenergebnisse mit korrespondierenden Verdünnungsfaktoren

Ergebnis Urinstick	Verdünnungsfaktor
Spur	1 : 100
+	1 : 500
+ / ++	1 : 1.000
++	1 : 10.000
++ / +++	1 : 20.000
+++	1 : 50.000
+++ / ++++	1 : 100.000
++++	1 : 200.000

3.4.3 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Die quantitative Bestimmung der Albumin-Konzentration im Urin erfolgte mit der ELISA-Technik über den Sandwich-ELISA. Hierfür wurde das *Mouse Albumin ELISA Quantitation Set* (E90-134, Bethyl Laboratories, USA) nach Hersteller-Protokoll verwendet. Das Coating einer 96-Well-Immunsorbent-Platte erfolgte mit 100µL 1:100 in Coating Buffer verdünntem monoklonalen Anti-Mausalbumin- Antikörpern (Goat anti-Mouse Albumin Antibody Affinity, Bethyl Laboratories, USA) über Nacht bei 4 C. Nach dem Coating wurde die 96-well Platte dreimal mit 200µL Waschpuffer gewaschen. Die freien Bindungsstellen wurden nun mit 200µL Postcoat Buffer (*postcoat-solution*) 30 Minuten bei RT geblockt, und wieder dreimal mit 200µL Waschpuffer gewaschen. Nun wurde eine Verdünnungsreihe aus *Mouse Reference Serum* (Bethyl Laboratories, USA) mit steigender Albuminkonzentration als Standard mit den Konzentrationen: 1000ng/ml, 500ng/mL, 250ng/mL, 125ng/mL, 62,5ng/mL, 31,25ng/mL, 15,625ng/mL und 7,8ng/mL erstellt. Standardreihe, Blankwerte (nur Diluent) und Proben in entsprechender Verdünnung wurden nun zur Doppelbestimmung mit je 100µL in die 96-well Platte pipettiert und für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgten fünf Waschgänge mit je 200µL Waschpuffer. Nun wurde 100µL HRP-konjugierter Sekundärantikörper pro Well hinzupipettiert und ebenfalls für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach weiteren fünf Waschgängen mit je 200µL Waschpuffer, wurde pro Well ein 100µL Substratmix (TMB/H₂O₂) zugegeben. Die Platte wurde anschließend für ca. 10-15 Minuten bei RT im dunkeln gelagert, also bis der letzte Standard einen Farbumschlag andeutete. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100µL 2M Schwefelsäure abgestoppt. Die Messung der Konzentrationen erfolgte photometrisch bei 450nm.

3.5 Genexpression

3.5.1 RNA-Isolation aus dem Nierengewebe

Zur Analyse der Chemokinverteilung und deren Rezeptoren wurde die RNA aus der Nierenrinde isoliert. Mit einem Skalpell wurde die Nierenrinde vom Mark getrennt und anschließend zerkleinert. Die Gewebstücke wurden in einen Homogenisator gegeben und mit einem Glasdouncers unter 5ml Guanidinthiocyanatlösung (GTC-Lösung) homogenisiert. Der Glasdouncers wurde zuvor mit 80% Ethanol (J.T.Baker) behandelt. Die GTC-Lösung bestand aus: 88g 4M Guanidiniumthiocyanat (Guanidine thio-

cyanate, Serva, Germany), 1g 0,5% N-Lauroylsarcosin (N-Lauroylsarcosine, Sigma, USA), 150ml RNase-freien H₂O (Baxter, Belgium), 5ml 1M NaCitrat pH7 (tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Roth, Germany) und 210 µl β-Mercaptoethanol (2-Mercaptoethanol 98%, Sigma, USA). Die GTC-Lösung diente neben der Lysierung des Nierengewebes auch einer Inaktivierung von RNasen und einer Denaturierung von freigegebenen Proteinkomplexen.

Das Homogenat wurde mit einer Pipette in ein 50ml-Reaktionsgefäß (PP-Testtubes 50ml sterile, Greiner, Germany) pipettiert und zur Lyse für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zur Trennung der DNA sowie zur denaturierten Proteinen und Zerstörung von Nukleoproteinkomplexen jeder Probe ein 6,5ml Gemisch aus 300µl Natrium-Acetat 2M pH4 (Sodium Acetate, Roth, Germany), 600 µl Chloroform/Isoamylalkohol 1:50 (Chloroform, Isoamylalkohol, Merck, Germany) und 3ml wassergesättigtem Phenol (Rothi-Aqua-Phenol, Roth, Germany) zugegeben. Durch Hinzufügen von Natrium-Acetat und den Isoamyl wurde die RNA ausgefällt. Der Ansatz wurde gevortext, in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und für 15-20 Minuten bei 9500 UpM (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany) zentrifugiert. Die obere wässrige nukleinsäurehaltige Phase wurde abpipettiert und in ein RNase-freies Gefäß gegeben. Der nukleinsäurehaltigen Lösung wurde das 1-1,5 fache Volumen an eiskaltem Isopropanol zugesetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert, dabei bilden DNA und RNA unlösliche Präzipitate.

Nach der Inkubation wurden die Proben für 45 Minuten bei 9500 UpM (SS34-Rotor) zentrifugiert und der sich gebildete Überstand abpipettiert und verworfen. Das verbliebene Pellet, mit der RNA, wurde mit 1ml 80%igem Ethanol (J.T Baker, Holland) zur Reinigung suspendiert und in ein RNase-freies 1,5ml-Reaktionsgefäß (Reagiergefäß 1,5ml, PP, Sarstedt, Germany) gegeben und für 10 Minuten bei 10000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, das Pellet erneut in 500 µl 80%igem Ethanol resuspendiert und anschließend erneut für 10 Minuten bei 10000 UpM zentrifugiert (dieser Schritt wurde zweimal ausgeführt) und der Überstand wurde wieder abpipettiert und verworfen. Im Anschluss wurde die RNA in einer Vakuumzentrifuge (DNA SpeedVac, Savant, USA) für 10 Minuten getrocknet. Das Ganze wurde nun mit einem Gemisch aus 50 µl 1 H₂O/DEPC (Diethylpyrocarbonate treated water, Invitrogen, USA) und 0,5 µl RNasin (*RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor 200 U/µl*, Invitrogen, USA) für 30 Minuten resuspendiert. RNasin fungierte hierbei als ein RNasen-Inhibitor. Die gelöste RNA wurde kurz zentrifugiert und der Überstand in ein neues Cup pi-

pettiert. Eine UV-Absorptionsmessung wurde zur Bestimmung der RNA-Konzentration und Reinheit durchgeführt. Hierfür wurde eine Verdünnung von 1: 100 (1 µl RNA + 99 µl RNase-freien H₂O) angesetzt. Die Messung der Extinktion der Lösung erfolgte im Photometer (GeneQuant pro, Gene Quant, England) bei 260/280nm Wellenlänge. Dabei diente 100 µl DEPC-Wasser als Leerwert zur Kalibrierung des Photometers. Die Konzentration der RNA wurde aus der Extinktion der Nukleinsäuren (260nm) und der Proteine (280nm) berechnet. Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäure galt der Quotient aus OD₂₆₀/OD₂₈₀ zwischen 1,8 und 2,0. Eine verringerte Ratio spricht für Proteinverunreinigungen, da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280nm liegt.

3.5.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um mit der Real-time PCR die isolierte RNA quantitativ auswerten zu können, musste diese zuerst in eine komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden.

Dafür wurden in ein 0,5ml-Eppendorf Tube (Reagiergefäß 0,5ml, PP, Sarstedt, Gennany) 4 µl verdünnte RNA (100ng/µl), 16 µl RNase-freies-H₂O (Baxter, Belgium), 2 µl dNTPs (100 µlM dNTP Set PCR Grade, Invitrogen, Canada) sowie 2 µl eines mit RNase-freien-H₂O verdünnten Hexamer Primer 1:30 (Random Primer 31 µg/µl, Invitrogen, Canada) zusammen pipettiert. Der Ansatz wird für 5 Minuten bei 65°C im Thennocycler erhitzt und anschließen wieder bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Temperaturerhöhung dient dabei der Aufschmelzung der RNA-Sekundärstrukturen und die Abkühlung auf Raumtemperatur der optimalen Hybridisierung („*annealing*“) der Hexamer-Primer an die RNA. Zur Generierung der cDNA wurden dem Ansatz 8 µl *5x first strand buffer* (*5x first strand buffer*, Invitrogen, Canada), 4 µl DTT (0,1M Dithiothreitol, Invitrogen, Canada), 2 µl M-MLV-RTase (M-MLV *reverse transcriptase* 200U/µl, Invitrogen, USA) und 2 µl „RNaseOut“ (*RNaseOut recombinant ribonuclease inhibitor* 200U/µl, Invitrogen, USA) hinzu pipettiert. Zum Umschreiben der RNA in doppelsträngige DNA mittels M-MLV Reverse Transcriptase wurde der Ansatz für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.5.3 RTQ-PCR (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction)

Als Expressionsanalyse wurde zur Quantifizierung der Nucleinsäuren der zu untersuchenden Chemokine und deren Rezeptoren die Methode der quantitativen real-time PCR verwendet.

Die Real-time-PCR stellt eine Erweiterung der herkömmlichen PCR dar, es ist eine gleichzeitige Quantifizierung der entstandenen Produkte mit Hilfe von Fluoreszenzmarkern möglich, die mit der doppelsträngigen DNA interkalieren (SYBR Green: Extinktion bei 488nm, Emission bei 520nm). Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zur Menge doppelsträngiger DNA in der jeweiligen Messprobe. Die Sensitivität der Polymerase-Kettenreaktion ist hoch und es genügen geringe Mengen an Ausgangsmaterial für eine erfolgreiche Amplifikation. Da aber prinzipiell nicht zwischen den PCR-Produkten unterschieden werden kann, ist die Spezifität gering. Ausgeglichen wurde dies mit einer Schmelzpunktanalyse, um die gewünschte Spezifität zu bestätigen.

Als Ausgangsmaterial diente cDNA aus der cDNA-Synthese (s.o.) welche zuvor aus 1 µl Gesamt-RNA erschlossen wurde. Als Rechengrundlage wurde für alle Proben die Expression eines konstitutiv exprimierten Gen (house-keeping gene) zusätzlich bestimmt. Als *house-keeping gene* wurde 18S verwendet, dabei handelt es sich um ribosomale RNA. Nachdem die Primer auf eine Molarität von 1 µM gebracht wurden, wurde folgender Ansatz erstellt:

1,5 µl cDNA

+ Mastermix	6,25 µl SYBR-Green TaqMix (Platinum® SYBR Green®) + 1,25 µl Vorwärtsprimer (0,9 µM, Invitrogen, Canada) + 1,25 µl Rückwärtsprimer (0,9 µM, Invitrogen, Canada) + 2,25 µl ddH ₂ O (Baxter, Belgium)
-------------	--

Für die Bestimmung der 18S-Expression wurde die cDNA jeweils mit ddH₂O 1:500 verdünnt. Die Proben wurden einzeln im Doppelansatz in eine 96-Well-Platte (MicroAmp, Applied Biosystems, USA) pipettiert. PCR erfolgte im ABI Prism 7000. Das RTQ-PCR Programm startete mit einem 10 minütigen initialen Denaturierungsschritt bei 95°C, zur Trennung der Template DNA Stränge. Es folgten 40 Zyklen aus einer 15 sekundigen Denaturierung bei 95°C, einem 1 minütigen Annealingschritt bei 60°C (Anlagern der Primer an die einsträngige Template DNA) sowie einer 1 minütigen Elongation bei 60°C (Verlängerung durch die Taq-DNA-Polymerase mit dNTPs). Zur photometrischen Auswertung der PCR-Amplifikate wurde das Programm AbiPrism Sequence Detection 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) verwendet. Die angewandte Berechnungsmethode war die $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

3.6 Histologie

3.6.1 Fixierung des Nierengewebes

Sörensen-Puffer / PBS wird durch das Lösen von 3,0290g Natrium-hydrogenphosphat-1- hydrat und 14,1365g Natrium-hydrogenphosphat-2-hydrat in 1000mL destilliertem Wasser hergestellt.

Zur Organentnahme wird eine 4%ige Formalinlösung aus Sörensen-Phosphat-Puffer (pH 7,4) mit 37%igem Formalin im Verhältnis 1:8 frisch angesetzt. Unmittelbar nach der Organentnahme werden die Präparate auf Höhe des Nierenhilus in circa 0,2cm dicke Scheiben zurecht geschnitten und für 24 Stunden in jeweils 4mL des 4%igen Formalins bei 4°C fixiert. Nach der Fixierung werden die Nierenscheiben 3 x 30 Minuten lang mit jeweils 5mL PBS bei Raumtemperatur gewaschen, dabei werden die Präparate auf einer Wippe kontinuierlich bewegt. Die Nierenscheiben werden nun der Waschlösung entnommen, mit 5mL frischem PBS komplett bedeckt und bis zur Einbettung in der Histologie bei 4°C aufbewahrt.

3.6.2 Einbettung

Die Nierenscheiben weichen für 2h in 50%igem Ethanol (EtOH) ein, anschließend folgt das standardisierte Programm über Nacht der Citadelle:

- Ethanolreihe: 2,5h 60%, 1h 70%, 2x 1h und 1x 1,5h 96%, 2x 1h und 1x 1,5 h 100% Ethanol
- Xylol: 2 x 1h und 1 x 1,5h
- Paraffin (warmes flüssiges): 1h und 1,5h

Anschließend werden die in Paraffin schwimmenden Nierenscheiben in Blöcke gegossen und nach dem Abkühlen aus den Formen herausgebrochen.

3.6.3 Schneiden, Backen und Deparaffinierung

Mit dem Mikrotom werden die eingebetteten Nieren in 1,5µm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger überführt. Die Objektträger werden anschließend über Nacht bei 40°C im Ofen gebacken. Danach werden die Objektträger für je 5 Minuten in folgenden Flüssigkeiten gebadet:

dreimal in Xylol, je zweimal in 100%igem, 96%igem, 75%igem Ethanol und zweimal in Aqua dest.. Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte mit einem Pap Pen von Roche umrandet und dreimal 10 Minuten in PBS inkubiert.

3.6.4 Histologische und immunhistologische Färbungen

Folgende histologische und immunhistologische Färbungen sind nach den standardisierten Protokollen, durch die laboreigenen histologischen Abteilung der Pathologie des UKE, zur Anwendung gekommen: CD3 (A0452, Dako, Hamburg, Deutschland), F4/80 (BM8, BMA, Deutschland), Mac-2 (M3/38, Cedarlane Laboratories, Kanada), PAS, KI67 (Klon TEC-3 m7249, Dako Germany), Fibrinogen (Atlas Antibodies AB, Schweden), Caspase 3 (Cappel Laboratories Inc., Organon Teknika Corp., USA) und FoxP3 (eBioscience, USA).

3.6.5 Auswertungsverfahren

Die Histologien wurden mit einem LSM 510 beta Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung der Zeiss LSM-Software analysiert. Die Auswertung der Histologien erfolgte verblindet und wurde von unterschiedlichen Personen wiederholt.

Für die glomeruläre Schädigung (Sklerose) wurde in PAS-Schnitten 50 Glomeruli ausgezählt. Dabei wurde die Schädigung eines jeden Glomerulums auf einer Skala von null (keinerlei Schädigung) bis vier (maximale Schädigung) bestimmt, anschließend multipliziert und zum Maximalwert von 200 in Bezug gesetzt. Zur Bestimmung der Halbmonde wurden je Schnitt 30 Glomeruli ausgezählt. Die Zellzahlbestimmung der Immunhistologien wurde in 20-facher Vergrößerung entweder 20 Gesichtsfelder für das Tubulointerstitium oder 30 Glomeruli für die glomeruläre Auswertung ausgezählt.

Die interstitielle Fibrose wurden mit Hilfe von Fotos von PAS-Schnitten in 20-facher Vergrößerung bestimmt, anschließend wurde ein Gitterfeld mit 40 festgelegten Punkten aufgelegt und die Lage der Punkte bestimmt. Es waren dabei glomeruläre, interstitielle, tubuläre, vaskuläre oder nicht auswertbare Regionen möglich. Aus den gesamten 40 Punkten wurde ein Prozentsatz ermittelt.

3.7 Zellsuspension

3.7.1 Milzeinzelzellsuspension

Die Präparation der Suspension, fand bis auf die Erythrozytenlyse, durchgehend auf Eis und mit gekühlten Lösungen statt. Die Milz wurde aus dem HBSS entnommen und auf einer in Eis gebetteten Petrischale mit einem Skalpell von nekrotischem Material sowie Fettgewebe befreit und grob zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in ein Zellsieb mit 70µm Porengröße gegeben, welches auf ein auf einem 50mL Plastikgefäß lag. Die Petrischale wurde mit einem Milliliter HBSS gespült und ebenfalls auf das Sieb gegeben. Anschließend wurde das Milzgewebe mit einem 1mL Spritzenstempel sorgfältig durch das Sieb gedrückt und mit HBSS gespült, so dass das Gewebe in 20mL HBSS vorlag. Der Ansatz wurde bei 300g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1,5mL Lysispuffer, für die Erythrozytenlyse, resuspendiert. Die Lyse wurde nach fünfminütiger Inkubation bei RT mit 20mL HBSS gestoppt und erneut für 7 Minuten bei 300g und 4°C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes und Resuspension des Pellets in 5mL HBSS. Anschließend wurde das gesamte Material zur mechanischer Reinigung mit einer serologischen 5 mL Pipette aufgenommen und langsam wieder abpipettiert, so dass sich der Zellschrott an die Pipettenwand ansetzen konnte. Der Ablauf aus Zentrifugation und mechanischer Reinigung wurde insgesamt 3 mal durchgeführt und im letzten Schritt wurde der Ansatz über ein Zellsieb mit 40µm Porengröße gegeben. Die Zellzahl wurde bestimmt oder es wurden die Zellen nach erneuter Zentrifugation in den entsprechenden weiter zu verwendenden Puffer gegeben.

3.7.2 Niereneinzelzellsuspension

Es wurden jeweils 1,5 Nieren in einer in Eis gebetteten Petrischale von ihrer Kapsel befreit und in kleine Stücke geschnitten. Das Gewebe wurde in 5mL RPMI-Vollmedium gegeben und 20µL CollagenaseD und 10µL DNaseI hinzupipettiert und für 40 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Nierengewebe mit einem 1mL Spritzenstempel durch ein 70µm Zellsieb gedrückt und in insgesamt 30µL Vollmedium aufgenommen. Danach wurde auf die gleiche Weise diese Suspension durch ein 40µm Zellsieb getupft und in insgesamt 40µL Vollmedium aufgenommen. Der Ansatz wurde für 8 Minuten bei 300g und 10°C zentrifugiert, anschließend wurden die Ansätze in

50mL HBSS aufgenommen und noch einmal für 8 Minuten bei 300g und 10°C zentrifugiert. Die vor Organverarbeitung angesetzten 70%igen und 40%igen Percoll®-HBSS Lösungen wurden bei RT gelagert, jeweils 6,5 mL der 70%igen Lösung wurde in 15mL Sarstedttubes vorgelegt. Der Überstand nach der letzten Zentrifugation wurde verworfen und das Zellpellet in 5mL 40%iger Lösung aufgenommen und jenes anschließend vorsichtig auf die vorgelegte 70%ige Lösung gegeben. Es folgte nun eine Zentrifugation für 25 Minuten bei 1400g und 20°C unter langsamst möglicher Beschleunigung und Abbremsung.

Die oberste Fettphase wurde vorsichtig abgenommen, anschließend wurden mit einer manuell bedienbaren 5mL Glaspipette die Interphase und die restliche Oberphase als Leukozytenfraktion komplett abgenommen, diese in ein neues Tube überführt und mit 50mL kaltem HBSS aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 300g und 10°C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde unter sanftem Vortexen in 10mL HBSS aufgenommen und auf 50mL mit HBSS aufgefüllt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 300g und 10°C. Der Überstand wurde ebenfalls verworfen, das Pellet wurde in 5mL X- Vivo (oder einem alternativem Medium) aufgenommen und für 10 Minuten bei 300g und 10°C gewaschen. Anschließend folgte die Aufnahme in X-Vivo (oder einem alternativem Medium) entsprechend der geplanten Weiterverwendung und/oder Zellzahlbestimmung.

3.8 Durchflusszytometrie

3.8.1 FACS-Analysen

Bei der FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) handelt es sich um ein Verfahren zur Klassifikation von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mit Hilfe an Fluoreszenzfarbstoffen gebundener Antikörper. Dabei werden die Emissionen von optischen Signalen einer Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert, analysiert.

Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension aus einem Probenröhrchen gesaugt und mit hoher Geschwindigkeit durch eine Stahlkapillare geführt. Dabei wird ein laminarer Hüllstrom mit der Trägerflüssigkeit FACSFlow® erzeugt und durch hydrodynamische Fokussierung an einem gebündelten Laserstrahl ($\lambda=488\text{nm}$) vorgeführt. Die Emission von optischen Signalen, einer den Laserstrahl kreuzenden Zelle, werden über Linsen, Spiegel und Filter auf Photodetektoren geleitet und verstärkt. Mit der Detektion des seitlichen Streulichts im *side scatter* (90° , SSC) wird die Granularität der Zelle gemessen, mit Vorwärtsstreulicht-Detektor (*forward light scatter*, $0-10^\circ$, FSC) misst man die Größe der Zelle. Zusätzlich lassen sich extra- und intrazelluläre Antigene fluoreszenzmarkierter Antikörper markieren und sind somit detektierbar. Durch den monochromatischen Laserimpuls werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau gehoben. Die Elektronen fallen anschließend wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück, dabei geben sie wieder die gewonnene Energie in Form von Photonen höherer Wellenlänge ab. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge gebundener Antikörper pro Zelle und kann mit den Photodetektoren erfasst werden. Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe verfügen über unterschiedliche charakteristische Emissionsspektren, lassen sich aber mit einer Wellenlänge anregen und erlauben auf diese Weise eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Farbstoffen. Die optischen Signale werden für die computergestützte Analyse digitalisiert. Zum Teil überlagern sich die Emissionsspektren der fluoreszenzmarkierten Antikörper, dies kann bei Detektion über benachbarte Detektoren zu Messfehlern führen. Daher wird das FACS-Gerät mit Hilfe von Partikeln (beads) vor jedem Versuch kalibriert, an diese sind die gleichen Farbkongugate gebunden. Durch Fluoreszenzverstärkung kann das Signal von unspezifischen Bindungen extrahiert werden. Ebenso kann durch prozentuale Subtraktion eines Fluorochromsignals die Messung von einer anderen Überstrahlung verringert werden. Vor der Mes-

sung mit dem FACS-Gerät wurden sofern vorhanden Luftblasen aus dem System entfernt. Nach dem Primen der Stahlkapillare wurde vor der Messung 5 Minuten mit FACS-Clean®, 5 Minuten mit FACS-Rinse® und anschließend 5 Minuten mit ddH₂O gespült. Nach Anlage der entsprechenden Messpunkte und Worksheets wurde eine Kalibrierung (s.o.) und anschließend die Messung durchgeführt. Vor der Messung wurden die Proben leicht gevortext und bei 4°C in Dunkelheit verwahrt.

3.8.2 Färbung mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper

Die FACS-Färbungen und FACS-Messungen wurden von Herrn Dr. med. Jan-Eric Turner und Herrn Dr. rer. nat. Hans-Joachim Paust durchgeführt. Dies erfolgte nach den Standardprotokollen von Becton & Dickinson (USA). Die Messungen erfolgten mit einem Becton & Dickinson BD LSR II System (USA) unter der Verwendung der BD FACSDiva 6.13 Software. Folgende Antikörper wurden zur Färbung verwendet:

Niere nach Stimulation		Monozyten nach Differenzierung		Lymphknoten & Milz	
Marker	Antikörper	Marker	Antikörper	Marker	Antikörper
CD45	<i>PerCP</i> (DB, USA)	CD45	<i>APC-H7</i> (DB, USA)	CD45	<i>PerCP</i> (DB, USA)
CD4	<i>APC-H</i> (DB, USA)	CD11c	<i>PE</i> (DB, USA)	CD4	<i>APC-H</i> (DB, USA)
CD8	<i>V500</i> (DB, USA)	MCH II	<i>PE-Cy7</i> (DB, USA)	CD8	<i>V500</i> (DB, USA)
CD3	<i>APC</i> (DB, USA)	F4/40	<i>APC</i> (DB, USA)	CD25	<i>PE-Cy7</i> (DB, USA)
IFN γ	<i>V450</i> (DB, USA)	CD86	<i>V450</i> (DB, USA)	FoxP3	<i>FITC</i> (DB, USA)
		Ly6C	<i>PerCP-Cy5.5</i> (DB, USA)		

Für die Färbung der extrazellulären Epitopen wurden die Zellen nach der Zählung und möglicher Stimulation zu 1×10^6 Zellen in 1mL FACS-Puffer in ein FACS-Messgefäß gegeben und für 5 Minuten bei 300g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt, so dass es noch einen bewussten Rücklauf von ca. 100 μ L gab.

Nach 5 Minuten Resuspension der Zellen in diesem Volumen wurde der Ansatz 10 μ L Fc-Block (Anti-Fc γ RIII/CD16 Antikörper) geblockt. Nach der Inkubation von 25 Minuten bei 4°C, wurden je Ansatz 1 μ L bis 2 μ L der gewünschten festgelegten fluoreszenzmarkierten Antikörper hinzupipettiert und für 25 Minuten bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden je 1mL FACS-Puffer hinzugegeben und

für 10 Minuten bei 300g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und anschließend zweimal mit je 1mL Cell-Wash gewaschen. Abschließend erfolgten die Aufnahme in 400µL PBS und die Messung am Gerät.

Zur Färbung intrazellulärer Epitope wurden 1×10^6 Zellen pro FACS-Messgefäß, ebenfalls nach extrazellulärer Färbung und Waschen mit Cell-Wash, nach leichtem vortexen resuspendiert und 100µL frisch angesetzte Fixations-/Permeabilisations-Lösung (1 Teil Konzentrat zu 3 Teilen Diluent) dazu pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 4°C in Dunkelheit wurde die Suspension zweimal mit je 2mL 1xPermeabilization- Puffer für 10 Minuten bei 300g bei 4°C gewaschen und der Überstand jeweils vorsichtig abpipettiert und verworfen. Der Blockierungsschritt entfällt hierbei, da dieser schon bei der Extrazellulärfärbung durchgeführt wurde und es folgte die Färbung der intrazellulären Epitope. Nach der Zugabe von 1µL der entsprechenden fluorochrommarkierten Antikörper inkubierte der Ansatz lichtgeschützt für 30 Minuten bei 4°C. Darauf folgten zwei Waschschrte nach dem obigen Muster und die Aufnahme in 400µL PBS zur Messung am Gerät.

3.9 Zytokin – ELISA

Zur Bestimmung der IFN γ und IL-17 Produktion in den Überständen von restimulierten Lymphknoten die isolierten Zellen ausplattiert, kultiviert und mit ConA und sIgG restimuliert. Zwischen den folgenden einzelnen Schritten erfolgten je vier Waschschrte mit 200µL PBS/0,5% Tween. Das Coating einer 96-Well-Platte erfolgte mit 100µL je Well Erstantikörper in der Konzentration 5µL/mL und wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die freien Bindungsstellen wurden nun mit 200µL Blockierlösung zwei Stunden bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Es erfolgte die Proben- sowie Standardauftragung mit je 50µL pro Well. Die Standards hatte eine Spannweite von 10 bis 2000pg/mL, die Proben für die IFN γ Messung wurden in einer 1:10 Verdünnung und für die IL-17 Messung in einer 1:2 Verdünnung aufgetragen. Inkubiert wurde wieder über Nacht bei 4°C. Zum Tracen wurde je Well 100µL Zweitantikörper in der Konzentration 5µL/mL pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Es erfolgte 100µL pro Well Streptavidin-HRP gekoppeltem Antikörper in einer 1:200 Verdünnung sowie eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT. Danach folgte 100µL Substratlösung pro Well und wurde ca. 20 Minuten im Dunklen bei RT inkubiert, bis der unterste Standard gerade eben einen Farbum-

schlag zeigte. Das Abstoppen erfolgte mit 50µL 1M Schwefelsäure pro Well, die photometrische Messung erfolgte bei 450nm. Es wurden Duo Sets (IL-17/ IFN γ Mouse) von R&D Systems (USA) verwendet.

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test, dem Mann-Whitney-Test, dem T-Test, dem ANOVA-Test sowie dem Log-Rank-Test nach Kaplan-Meier. Dies erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.bTM für Macintosh (GraphPad Software, Inc, USA). Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen, das Konfidenzintervall lag bei 95%. Diagramme zeigen entweder den Median oder den Mittelwert und den Standardfehler des Mittelwertes.

4. Ergebnisse

4.1 Generierung und Charakterisierung der CCR5^{-/-} MRL/lpr Maus

Das abfotografierte Gel in Abb1, welches nach Präparation genomischer DNA und der PCR mit den spezifischen Primer angefertigt wurde, zeigt am Beispiel von MRL/lpr-Tieren den erfolgreichen CCR5 Knockout sowie die MRL/lpr-Genotypisierung. Die Knockout-spezifischen-Bande des CCR5 ist nur auf einer Höhe von 280 bp, die Wildtyp-spezifischen-Bande bei 203 bp, bei heterozygoten Tieren sind beide Banden vorhanden. Bei der Genotypisierung von MRL/lpr ist die Knockout-spezifischen-Bande bei 217 und die Wildtyp-spezifischen Bande bei 179 bp.

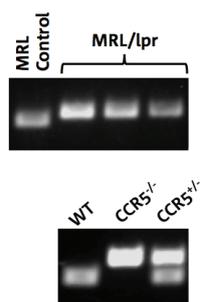


Abbildung 1: Gelelektrophorese zur Genotypisierung (WT, CCR5^{-/-}, CCR5^{+/-})

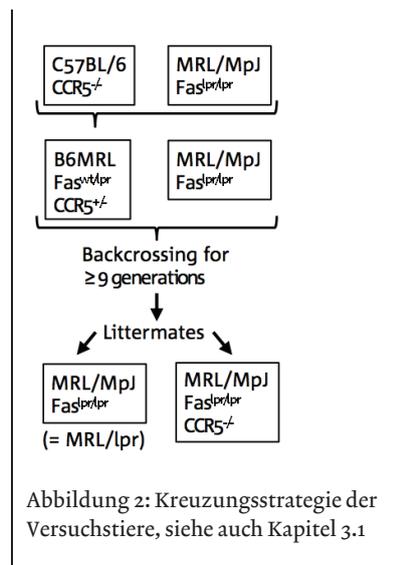


Abbildung 2: Kreuzungsstrategie der Versuchstiere, siehe auch Kapitel 3.1

4.2 Die Lupusnephritis ist aggraviert in $CCR5^{-/-}$ MRL/lpr Mäusen

Wie bereits erwähnt, diente als funktionaler Marker der renalen Schädigung der Albumin / Kreatinin-Quotient aus dem Urin. Bei der Lupusnephritis korreliert der Albumin / Kreatinin-Quotient sehr gut mit dem Ausmaß an renaler Schädigung und eignet sich damit, den zeitlichen Verlauf und den Schweregrad der Glomerulonephritis zu erfassen. In Abb 3 ist der zeitliche Verlauf der Krankheitsentwicklung, von Knockout- und Wildtyp-Mäusen, gezeigt.

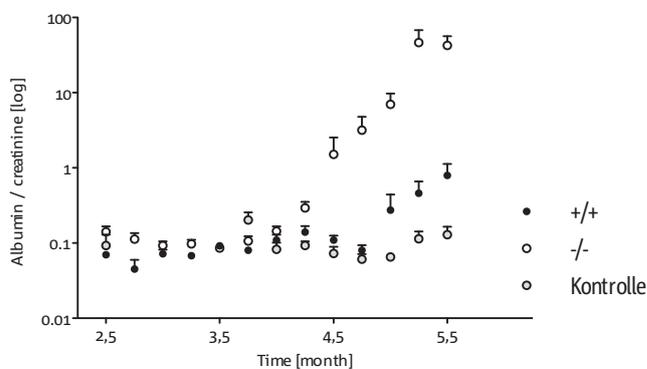


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf des Albumin / Kreatinin-Quotienten bei Knockout- Wildtyp- sowie Kontroll-Mäusen

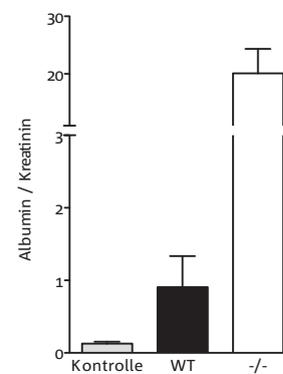


Abbildung 4: Albumin / Kreatinin-Quotienten nach 6 Monaten bei Knockout- Wildtyp- sowie Kontroll-Mäusen

In den ersten 16 Wochen ist kein wesentlicher Unterschied erkennbar. Erst mit den progredienten Einsätzen der Lupusnephritis zeigt sich, im Gegensatz zu den Wildtypen, bei den $CCR5^{-/-}$ MRL/lpr -Mäusen ein aggravierter Krankheitsverlauf. Im T-Test ist $p = 0,05$ (Abb. 4).

Histologisch ist die Korrelation aus dem Albumin / Kreatinin-Quotient und der morphologischen Schädigung leicht zu sehen und bestätigt erneut diese Annahme. In den histologischen Färbungen (Abb. 5) sind jeweils ein Glomerulus in einer PAS- sowie in einer Fibrin-Färbung der jeweiligen Gruppe gezeigt.

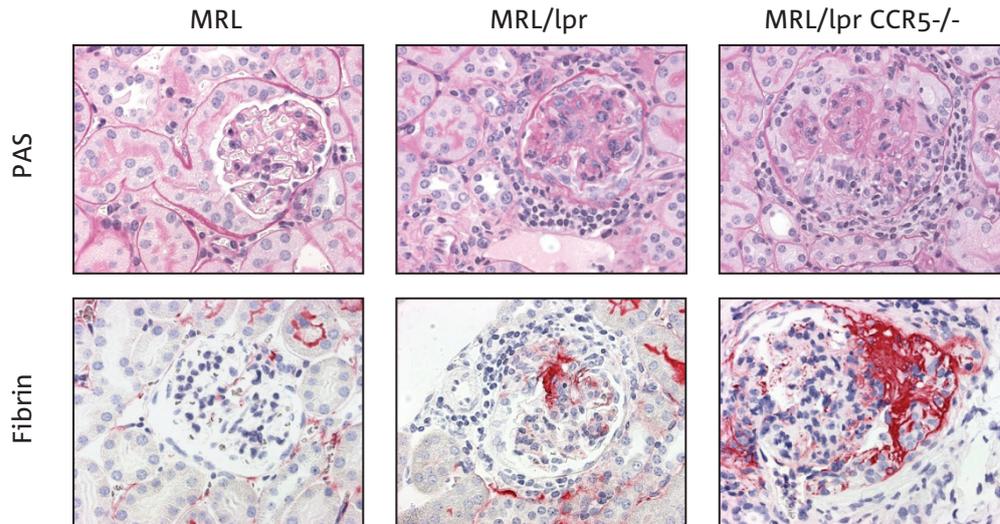


Abbildung 5: Histologien von Glomeruli in PAS- sowie Fibrin-Färbung der jeweiligen Gruppe (MRL, MRL/lpr, MRL/lpr CCR5^{-/-}), (Originalvergrößerung 400fach)

4.3 Infiltration von T-Zellen

Als immunhistologischer Marker einer T-Zell-Infiltration diente die CD3 Färbung des Nierengewebes. Dabei wurde zwischen interstitiellen und der glomerulären T-Zell-Infiltration unterschieden. Für die regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) diente der Transkriptionsfaktor FoxP3 als immunhistologischer Marker. In Abbildung 6 ist die histologische Auswertung interstitiellen T-Zell-Infiltration und in Abbildung 7 die der glomerulären T-Zell-Infiltration gezeigt. Die Auswertung FoxP3 positiver Zellen ist in Abbildung 8 gezeigt.

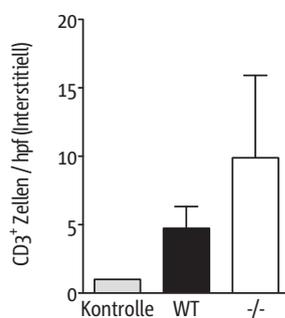


Abbildung 6: Immunhistologische Auswertung der interstitiellen T-Zell Infiltration anhand einer CD3 Färbung (hpf = high power fields)

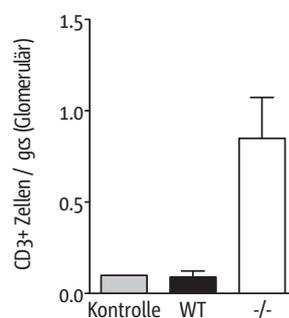


Abbildung 7: Immunhistologische Auswertung der glomerulären T-Zell Infiltration anhand einer CD3 Färbung (gcs = glomerular cross sections)

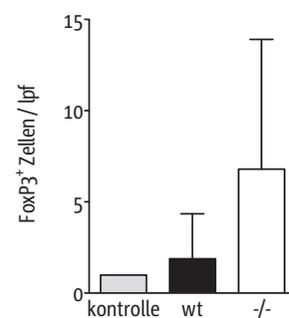


Abbildung 8: Immunhistologische Auswertung FoxP3 positiver Zellen im Nierengewebe (hpf = high power fields)

Überraschenderweise kam es zu einer erhöhten Ansammlung von CD3 positiven Zellen interstitiell sowie glomerulär bei den CCR5^{-/-} MRL/lpr-Mäuse. Bei der interstitiellen T-Zell-Infiltration liegt der p-Wert im Mann Whitney Test, zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen, bei $p = < 0,01$ und der glomerulären Infiltration bei $p = 0,0104$. Ähnlich verhält es sich mit FoxP3, im Mann Whitney Test zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen, ist $p = 0,0033$.

In der Expressionsanalyse zur Quantifizierung der mRNA der zu untersuchenden Chemokine im Nierengewebe diente die real-time PCR. Untersucht wurden hierbei $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ sowie IL-10. In den Abbildungen 9 bis 11 ist die Auswertung dieser Analysen zu sehen.

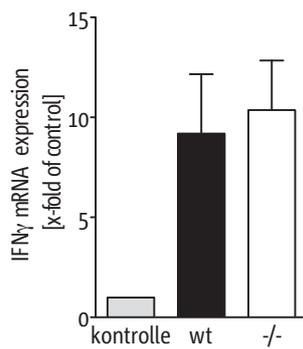


Abbildung 9: Expressionsanalyse zur Quantifizierung der mRNA von IFN γ im Nierengewebe mittels real-time PCR

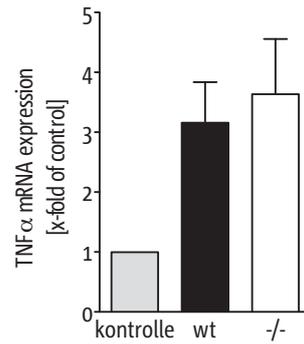


Abbildung 10: Expressionsanalyse zur Quantifizierung der mRNA von TNF α im Nierengewebe mittels real-time PCR

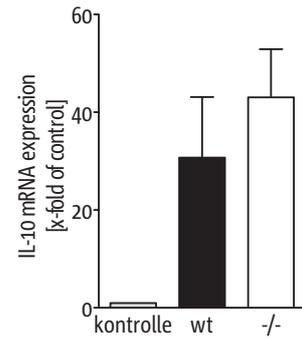


Abbildung 11: Expressionsanalyse zur Quantifizierung der mRNA von IL-10 im Nierengewebe mittels real-time PCR

Im Mann Whitney Test ergibt sich keine Signifikanz bei allen drei Analysen zwischen den Wildtyp- und Knockout-Mäusen.

In der FACS-Analyse wurden entsprechend CD4⁺ Zellen mit IFN γ sowie CD8 Zellen mit IFN γ detektiert. Diese Analyse ist in den Abbildungen 12 bis 13 gezeigt.

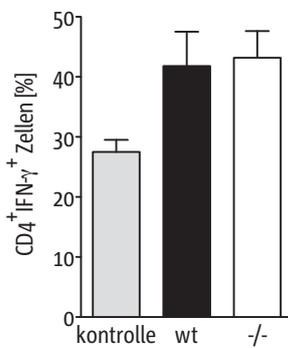


Abbildung 12: FACS-Analyse von CD4⁺ Zellen mit IFN γ des Nierengewebes

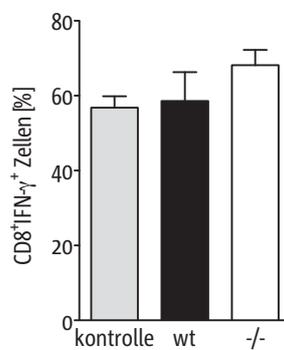


Abbildung 13: FACS-Analyse von CD8⁺ Zellen mit IFN γ des Nierengewebes

Der Mann Whitney Test ergibt keine Signifikanz zu den beiden Analysen zwischen den Wildtyp- und Knockout-Mäusen.

4.4 Infiltration von Monozyten

Der monoklonale *F4/80* Antikörper bindet an Maus-Monozyten und wurde zur immunhistologischen Erfassung der interstitiellen Monozyten-Infiltration des Nierengewebes verwendet. Die glomerulären Makrophagen-Infiltration wurde histologisch mit *Mac-2* Antikörpern dargestellt. In der Abbildung 14 ist die Auszählung der interstitiellen Infiltration von Monozyten erfasst. Die Auswertung der glomerulären Makrophagen Infiltration ist in Abbildung 15 gezeigt.

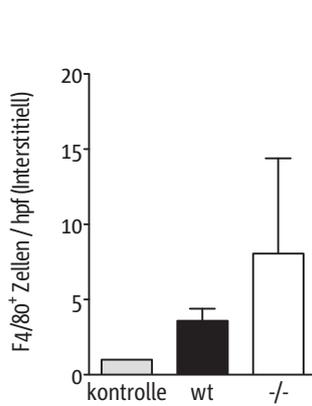


Abbildung 14: Auswertung der interstitiellen Infiltration von Monozyten in einer immunhistologischen *F4/80* Färbung des Nierengewebes (hpf = high power fields)

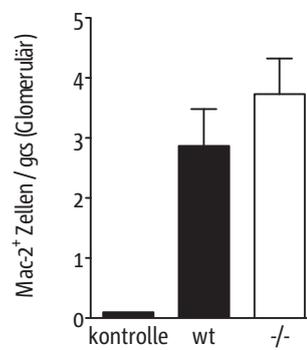


Abbildung 15: Immunhistologische Auswertung der glomerulären Makrophagen-Infiltration anhand einer *Mac-2* Färbung (gcs = glomerular cross sections)

Die erhöhte Infiltration von Monozyten im Niereninterstitium bei den *CCR5*^{-/-} MRL/lpr-Mäusen ist in Abbildung 14 zu sehen. Statistisch zeigt sich dieses im Mann Whitney Test, zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen, mit $p = 0,0271$. Die glomeruläre Makrophagen-Infiltration stellt sich mit einem p -Wert von $p = 0,5779$ im Mann Whitney Test dar.

Die Komplement-Rezeptoren *CD11b* und *CD11c* wurden in entsprechenden FACS-Analysen untersucht. Beide Rezeptoren sind unter anderem auf Monozyten und Makrophagen vertreten und dienen der Stimulation zur Phagozytose. In der Abbildung 16 und 18 sind *CD11b*⁺ / *CD11c*⁺ positive Zellen gezeigt, die Abbildung 17 zeigt *CD11b*⁺ / *CD11c*⁻ positive Zellen jeweils im Nierengewebe. In Abbildung 19 ist

die Expression von MHC II und Ly6C auf CD11c⁺ CD11b⁺ dendritischen Zellen P1 sowie CD11c⁺ CD11b⁺ Monozyten / Makrophagen (P2) bei MRL/lpr und MRL/lpr CCR5^{-/-} Mäusen dargestellt.

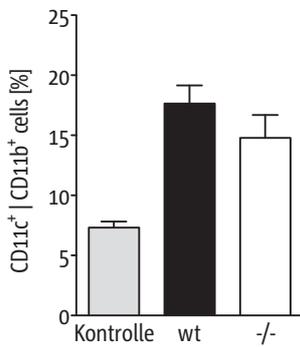


Abbildung 16: Auswertung der FACS-Analyse CD11b⁺ / CD11c⁺ positive Zellen des Nierengewebes

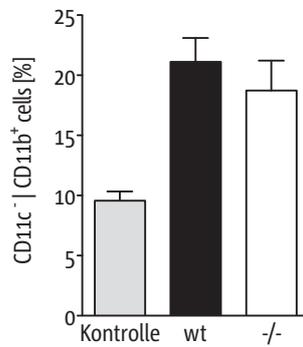


Abbildung 17: Auswertung der FACS-Analyse CD11b⁺ / CD11c⁻ positive Zellen des Nierengewebes

Es ergeben sich keine Signifikanzen zu zwischen den Wildtyp- und Knockout-Mäusen in den jeweiligen Analysen.

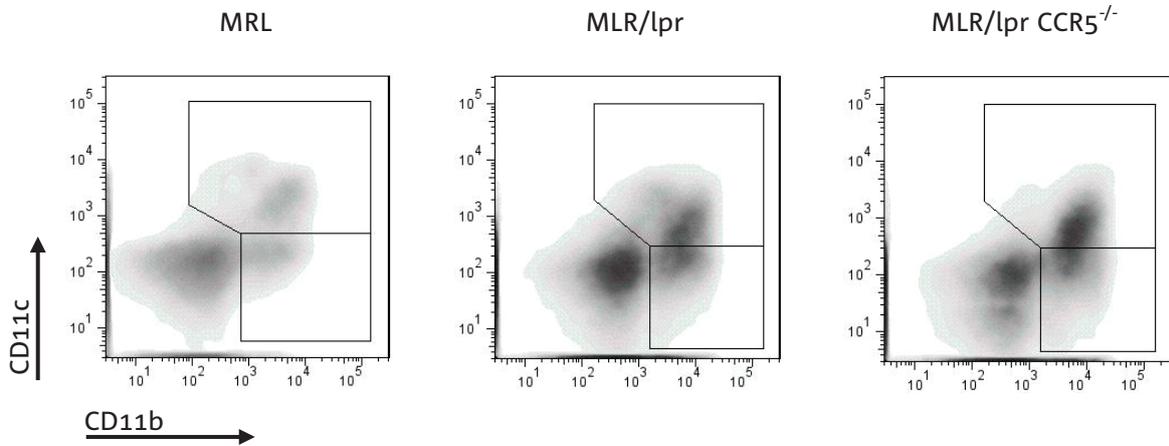


Abbildung 18: FACS-Analyse CD11c⁺ und CD11b⁺ positiver Zellen der Niere

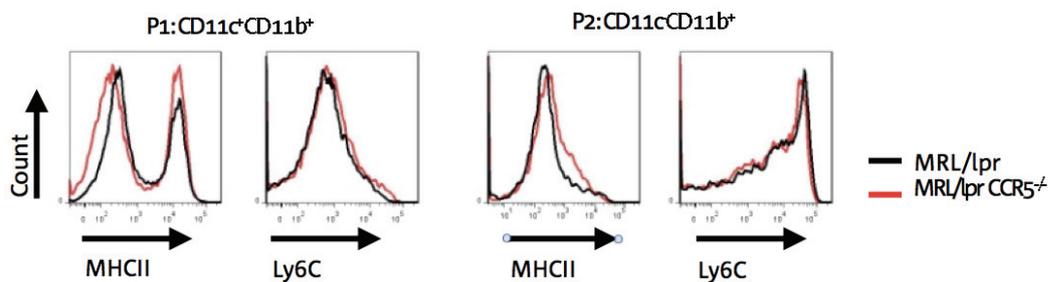


Abbildung 19: Expression von MHC II und Ly6C auf CD11c⁺ CD11b⁺ dendritischen Zellen P1 sowie CD11c⁺ CD11b⁺ Monozyten / Makrophagen (P2) bei MRL/lpr und MRL/lpr CCR5^{-/-} Mäusen.

4.5 Die systemische zelluläre Immunantwort

Als morphologisches Kriterium einer systemischen zellulären Immunantwort diente das Gewicht von Milz und renaler Lymphknoten. In Abbildung 20 und Abbildung 21 sowie Abbildung 22 ist die Auswertung der Wiegungen von Milz und Lymphknoten gezeigt.

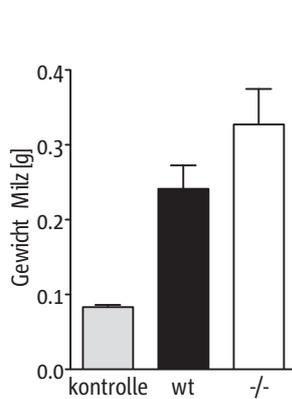


Abbildung 20: Auswertung der Wiegungen der Milzen nach Organentnahme

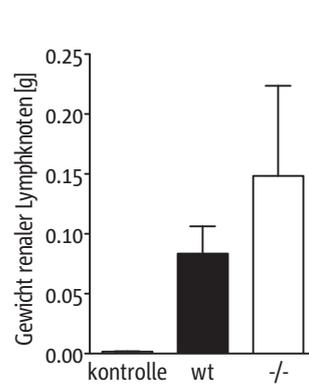


Abbildung 21: Auswertung der Wiegungen renaler Lymphknoten nach Organentnahme



Abbildung 22: Fotografie entnommener Milzen und renaler Lymphknoten zum makroskopischen Vergleich (Lineale in cm)

Dabei ergeben sich in beiden Analysen keine Signifikanzen zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen.

Bei den zugehörigen FACS-Analysen wurde in den Milzen die Kombination CD4⁺ und IFN γ ⁺ untersucht, bei den Lymphknoten war es die Kombination aus CD4⁺, CD25⁺ und FoxP3.

In den Abbildungen von 23 bis 26 sind die Auswertungen und die Analysen gezeigt. Es ergeben sich keine Signifikanzen.

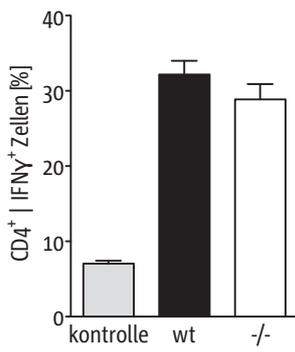


Abbildung 23: Auswertung der FACS-Analyse CD4⁺ und IFN γ ⁺ positiver Zellen der Milz

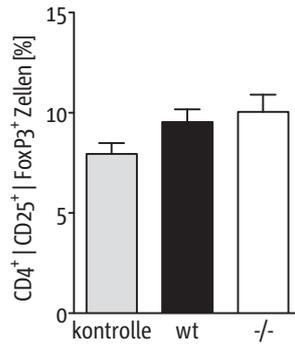


Abbildung 24: Auswertung der FACS-Analyse CD4⁺, CD25⁺ und FoxP3 positiver Zellen aus Lymphknoten

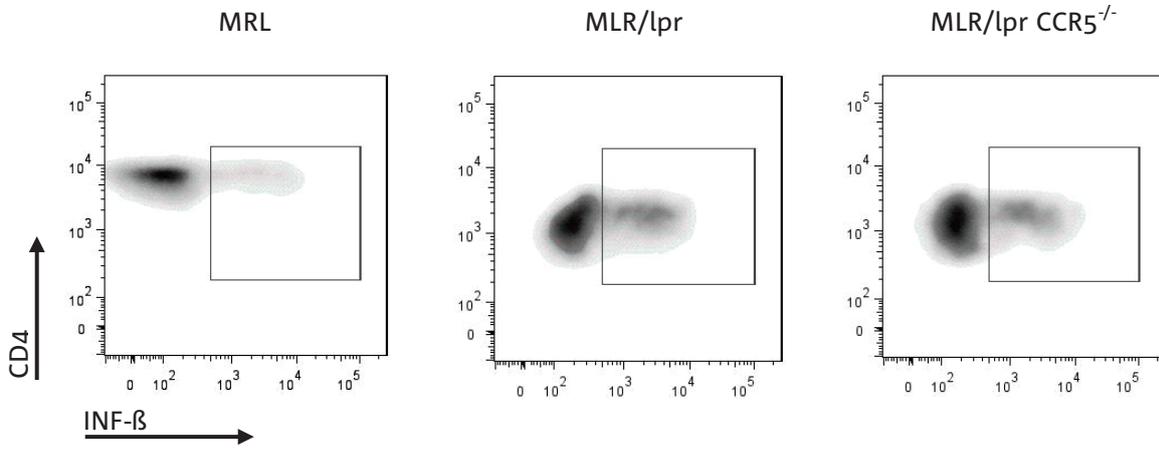


Abbildung 24: FACS-Analyse CD4⁺ und IFN γ ⁺ positiver Zellen der Milz

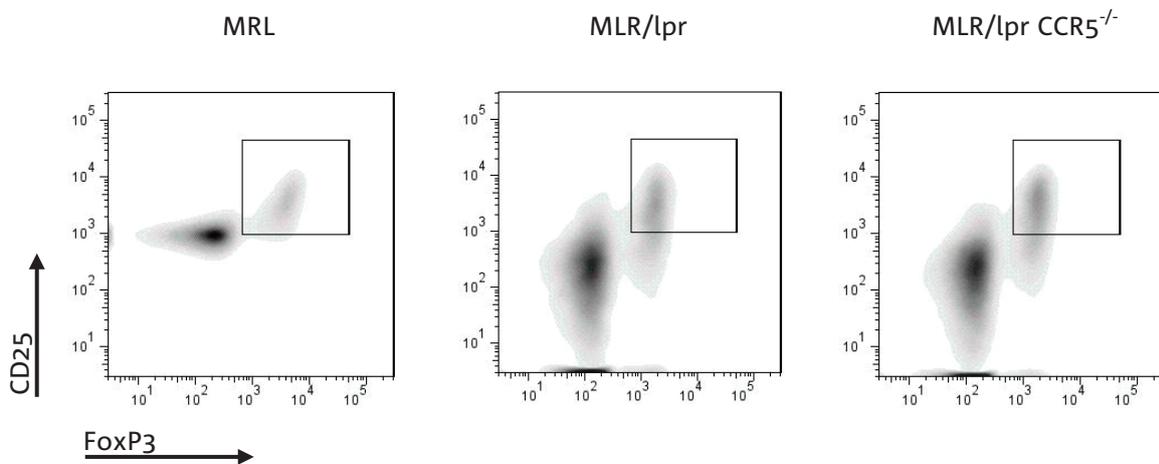


Abbildung 26: FACS-Analyse von CD25⁺ und FoxP3 positiver Zellen aus Lymphknoten

4.6 Humorale Immunantwort | bei CCR5^{-/-} MRL/lpr-Mäuse

dsDNA-Antikörper können als spezifische Marker des SLE angesehen werden und stellen damit ein diagnostisches Kriterium dar (siehe ACR Kriterien). Etwa 50% der Seren bei Patienten mit aktivem SLE enthalten dsDNA-Antikörper. Es gibt einen Zusammenhang zwischen Anti-dsDNA Titer und der Krankheitsaktivität, insbesondere der Nierenbeteiligung. Dabei kann der Anti-dsDNA Titer auch als Ausdruck der humoralen Immunantwort gesehen werden.

In der Abbildung 27 ist die Auswertung des Anti-dsDNA ELISA 's aus dem Plasma der einzelnen Gruppen dargestellt.

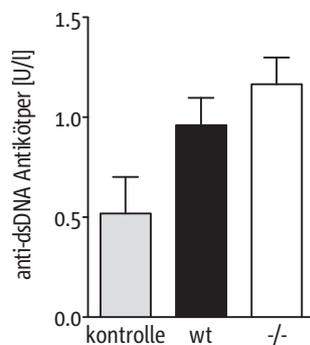


Abbildung 25: Auswertung des Anti-dsDNA ELISA aus Serum

Es ergeben sich keine Signifikanzen unter den beiden erkrankten Gruppen.

4.7 Die Expression von Chemokinen | bei CCR5^{-/-} MRL/lpr-Mäusen

Die Expression von Chemokinen wurde durch eine Real-Time-quantitative-PCR ermittelt. Dabei wurden die Chemokine CCL2-CCL5 untersucht. Die entsprechenden Analysen sind in den Abbildungen 28 bis 31 zu sehen.

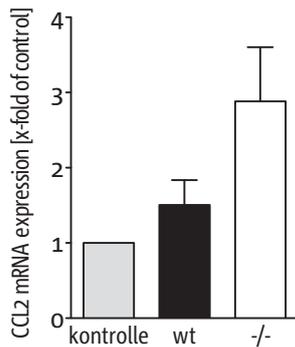


Abbildung 26: Auswertung der Expression von CCL2 mittels RTq-PCR aus Nierengewebe

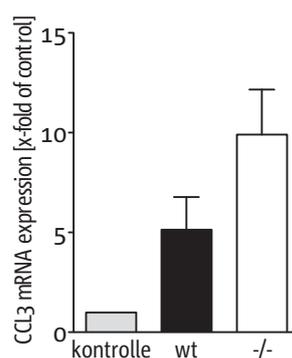


Abbildung 27: Auswertung der Expression von CCL3 mittels RTq-PCR aus Nierengewebe

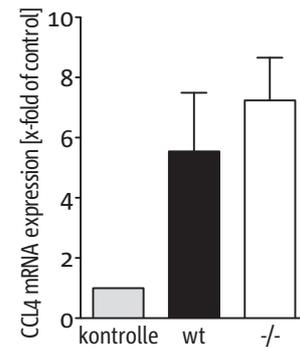


Abbildung 28: Auswertung der Expression von CCL4 mittels RTq-PCR aus Nierengewebe

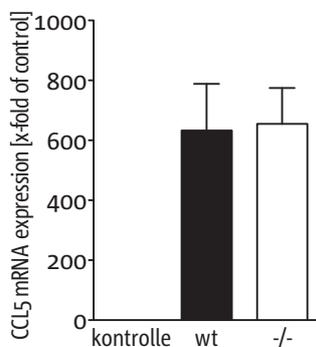


Abbildung 29: Auswertung der Expression von CCL5 mittels RTq-PCR aus Nierengewebe

Es ergeben sich keine Signifikanzen zwischen den Wildtyp- und Knockout-Mäusen in den jeweiligen Analysen.

4.8 Die Bedeutung von Apoptose und Proliferation

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten glomerulären Akkumulationen von T-Zellen bei CCR5^{-/-} MRL/lpr-Mäuse wäre ein Defekt in der Chemokinrezeptor-induzierten Apoptose von CCR5^{-/-} Immunzellen. Als Marker für die Apoptose galt positiv gespaltenes Caspase-3. Allerdings lies sich dieses bei der immunhistochemischen Quantifizierung der glomerulären Zellen nicht zeigen, die apoptotischen Zellzahlen waren bei CCR5^{-/-} Mäusen nicht verringert (Abb. 34 und 32). Mit den erhöhten glomerulären Schäden waren apoptotischen Zellen in den Glomeruli der CCR5^{-/-} Mäuse sogar deutlich, im Vergleich zu ihren Wildtyp-Tieren, erhöht. Der Grad der glomerulären Schädigung, der glomerulären Zellinfiltrate sowie die intraglomeruläre Proliferation, wurde mit Ki-67⁺ Zellen innerhalb der Glomeruli beurteilt, tendenziell zeigte sich bei CCR5^{-/-} MRL/lpr-Mäusen, im Verglichen zu den Wildtypen, eine Erhöhung (Abb. 33 und 32).

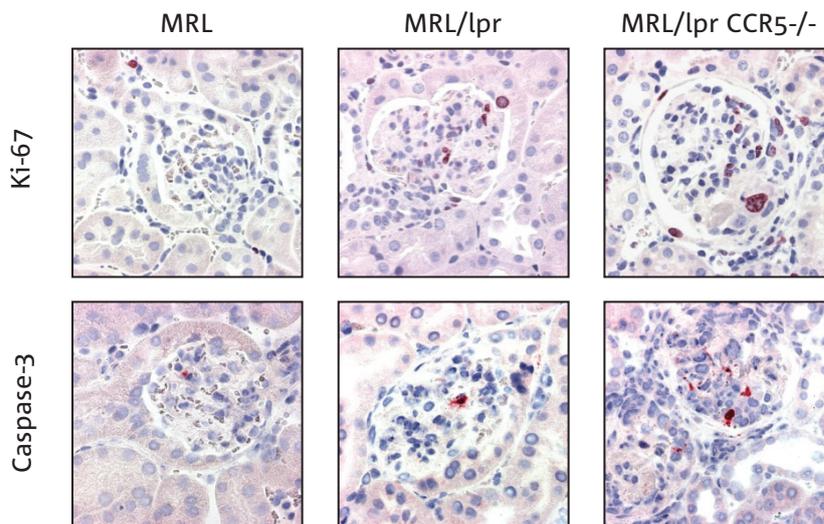


Abbildung 30: Histologien von Glomeruli in Ki-67 - sowie Caspase-3 Färbung der jeweiligen Gruppe (MRL, MRL/lpr, MRL/lpr CCR5^{-/-}), (Originalvergrößerung 400fach)

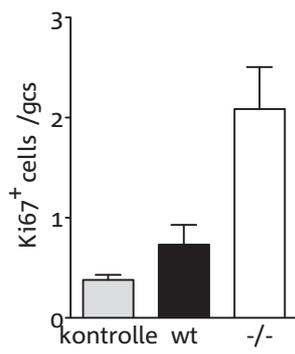


Abbildung 31: Immunhistologische Auswertung der glomerulären Infiltration der Ki-67⁺ Färbung (gcs = glomerular cross sections)

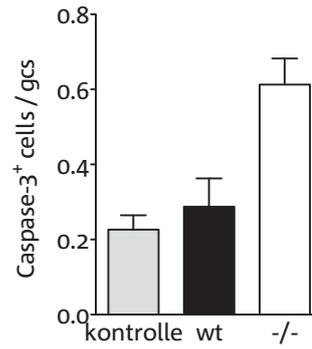


Abbildung 32: Immunhistologische Auswertung der glomerulären Infiltration der Caspase-3⁺ Färbung (gcs = glomerular cross sections)

4.9 Auswirkung des renalen und systemischen CCR5^{-/-} Mangels auf die CCR5/CCR1- Liganden

Es gibt Hinweise, dass eine Überproduktion von CCR5/CCR1-Liganden in CCR5^{-/-} Mäusen zu einer vermehrten Immunzellen-Infiltration über CCR1 führen könnte, was zu einer Verschlechterung der immunvermittelten Gewebeschädigung führen würde. Entsprechend wurde in den Nieren der MRL/lpr-Mäuse sowie bei MRL-Kontrollmäusen die mRNA-Expression und der Eiweißgehalt von CCL3, CCL4, CCL5 und CXCL9 als CCR5 unabhängiges Chemokin analysiert (Abb. 35, A und B). Die RT-PCR-Analyse des renalen Cortex zeigte, dass CCL3, CCL4, CCL5 und CXCL9 mRNA bei nephritischen Tieren in beiden Gruppen hochreguliert war, aber es zeigte sich keine Differenzierung zwischen Wildtyp- und CCR5^{-/-} Lupus-Mäusen auf mRNA-Ebene (Abb. 35A). Die intrarenalen Proteinspiegel dieser Chemokine wurden mittels CBA-Analyse der Nieren-Homogenate gemessen, diese waren bei MRL/lpr-Mäusen, im Vergleich zu der MRL-Kontrollgruppe, erhöht (Abb. 35B). Es zeigte sich eine erhebliche Erhöhung von CCL3-Proteinen in CCR5^{-/-} MRL/lpr- Nieren, im Gegensatz zu den Nieren von Wildtypen (Abb. 35B; $P < 0,05$). Bei den Protein-Spiegeln von CCL4, CCL5 und CXCL9 in der Niere zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen CCR5^{-/-} und Wildtyp-MRL / lpr-Mäusen. Interessanterweise waren im Serum von CCR5^{-/-} MRL/lpr-Mäusen die Konzentrationen aller drei CCR5/CCR1-Liganden deutlich höher als bei MRL/lpr-Wildtyp-Mäusen (Abb. 35C). Bei CXCL9 gab es hingegen keinen Unterschied.

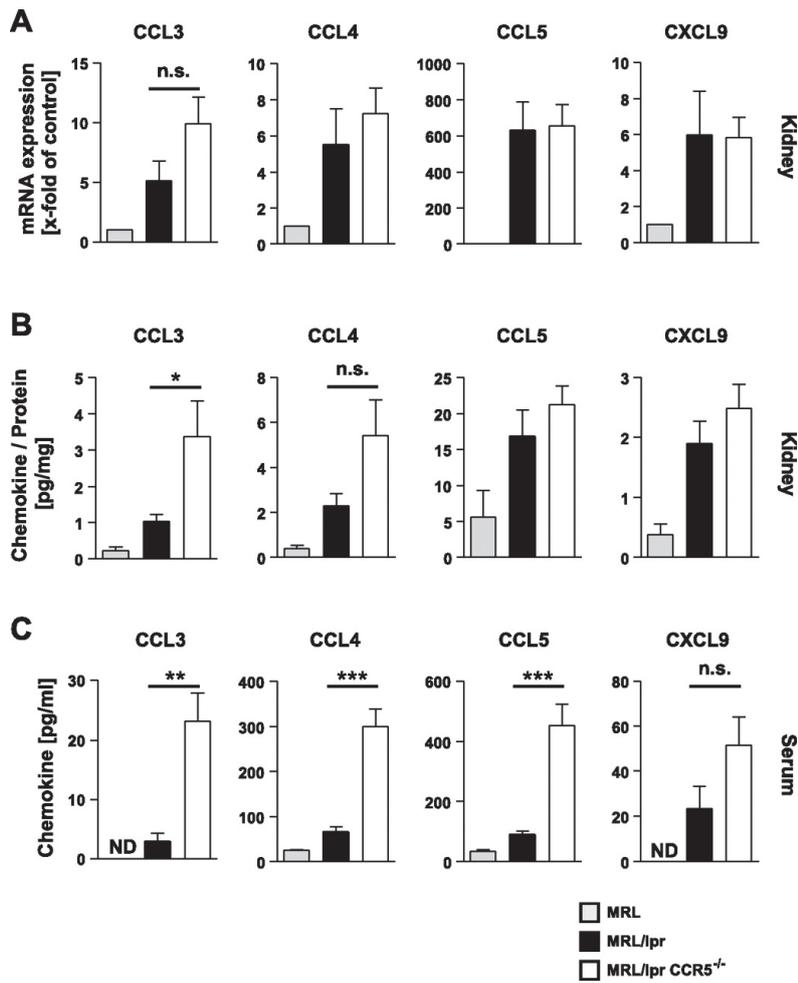


Abbildung 33:

A: mRNA-Expression der gemeinsamen CCR5/CCR1-Liganden sowie CXCL9 als CCR5-unabhängiges Chemokin, in der Nierenrinde von der MRL-Kontrollgruppe (n = 5), MRL/lpr (n = 12), und MRL/lpr CCR5^{-/-} Mäusen (n = 21) nach 6 Monaten.

B: Proteinexpression insgesamt von den jeweiligen Chemokinen der Nierenrinden-Homogenaten von der MRL-Kontrollgruppe (n = 5), MRL/lpr-Mäusen (n = 7), und MRL/lpr CCR5^{-/-} Mäusen (n = 22) nach 6 Monaten.

C: Serum Chemokin-Spiegel der jeweiligen Gruppen von Mäusen (Gruppe bezeichnet wie in A). Die Werte sind Mittelwerte ± SE. * P < 0,05. ** P < 0,01. *** P < 0,001.

4.10 CCR5/CCR1-Ligandenproduktion und Clearance bei CCR5^{-/-} C57BL/6-Mäusen

Es wurde untersucht, ob die erhöhten Serumspiegel von CCR5/CCR1-Liganden in CCR5^{-/-} MRL/lpr-Mäusen ausschließlich auf die gesteigerte entzündliche Reaktion in autoimmunanfälligen Mäusen beruhen oder ob die erhöhten CCR5-Chemokinliganden ein allgemeines Phänomen sind, das durch CCR5-Mangel verursacht wird. Um auszuschließen, dass eine Autoimmunerkrankung den Chemokinpiegel beeinflusst, wurden die folgenden Studien bei nicht autoimmunanfälligen Wildtyp- und CCR5^{-/-} C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Die CCR5/CCR1-Ligandenspiegel im Serum von Wildtyp- und CCR5^{-/-} C57BL/6-Mäusen wurden durch CBA-Analyse (siehe Abb. 36A) gemessen. Wie im MRL/lpr-Stamm zeigten die CCR5^{-/-} C57BL/6-Mäuse eine signifikante Erhöhung der CCL4 und CCL5 Serumspiegel (beide $P < 0,005$ vs. C57BL/6-Wildtyp), während die CXCL9-Werte ähnlich wie bei den Wildtyp-Mäusen waren. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der MRL-Kontrollmäuse, waren die CCL3-Serumspiegel bei Wildtyp-Mäusen sowie bei CCR5^{-/-} C57BL/6 Mäusen unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Abb. 35C). Um der Frage nachzugehen, ob die erhöhten CCR5/CCR1-Liganden auf die hochregulierte Produktion zurückzuführen sind, wurde die mRNA-Expression von CCL3 in LPS-stimulierten Splenozyten von C57BL/6-Mäusen analysiert (siehe Abb. 36B). Dabei zeigten CCR5-defiziente Splenozyten keine Überproduktion von CCL3 als Antwort auf LPS, sondern vielmehr verminderte CCL3-mRNA-Spiegel. Ein weiterer Grund für die erhöhten Chemokinpiegel könnte der mangelnde Verbrauch über ihre entsprechenden Rezeptoren sein. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde eine Kurzzeitinkubation (20 Min.) von Splenozyten, die aus naiven Wildtyp- und CCR5^{-/-} Mäusen isoliert wurden, mit CCL3 und CXCL9 als CCR5-unabhängige Kontrolle durchgeführt. Die ChemokinKonzentrationen wurden im Überstand beurteilt (siehe Abb. 36c). Die Überstände von CCR5^{-/-}-Splenozyten zeigten signifikant erhöhte Konzentrationen an CCL3, aber nicht an CXCL9. Dies zeigte, dass die Zellen nicht in der Lage waren, CCR5-Liganden zu binden und zu internalisieren. Um diese Gegebenheit in vivo zu beurteilen, wurde die Clearance von exogenen CCL3 und CXCL9 in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen und CCR5^{-/-}-Mäusen bewertet (siehe Abb. 36D und E). Nach gleichzeitiger i.v. Injektion von rekombinantem murinen CCL3 und CXCL9, wurde eine markante Erhöhung der Serumspiegel beider Chemokine beobachtet. Der CCL3-Peak war bei CCR5^{-/-}-Mäusen nach 10 Minuten ($P < 0,05$) deutlich erhöht, während es hingegen bei CXCL9 keinen signifikanten Unterschied zwischen

den Gruppen gab ($p = 0,49$ bei 10 Min.). In nachfolgenden Messungen verringerte sich CCL3 schnell und wurde in CCR5^{-/-} und Wildtyp-Mäusen adaptiert. Dies weist darauf hin, dass auf einer längeren Zeitskala andere CCR5-unabhängige Mechanismen Chemokin-Clearance herbeiführen.

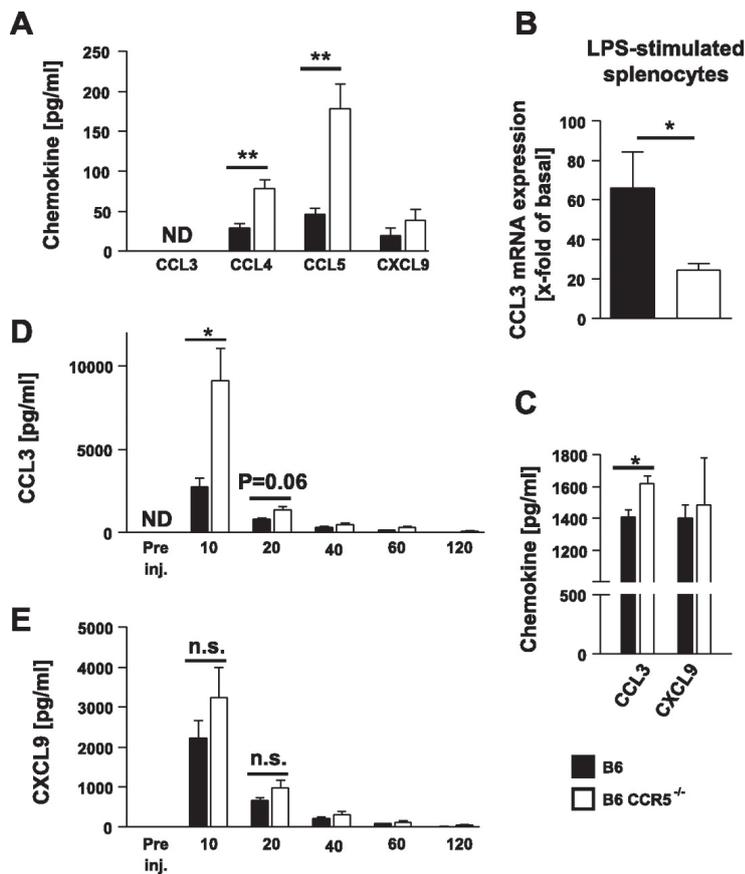


Abbildung 34:

A: Serum Chemokin-Spiegel der normalen C57BL/6-Wildtypen (B6, n = 5) und C57BL/6 CCR5^{-/-} (B6 CCR5^{-/-}, n = 6) Mäuse.

B: CCL3 mRNA-Expression von Milzzellen aus normalen B6 und B6 isoliert aus CCR5^{-/-} Mäusen (n = 6 für beide Gruppen), stimuliert mit LPS.

C: CCL3 und CXCL9-Konzentrationen aus dem Überstand von naiven Wildtypen und CCR5^{-/-} Splenozyten nach 20 Min. Inkubation mit rekombinanten Proteinen (2 ng / ml, n = 4-6/Gruppe).

D und E: Messung der in-vivo-Clearance von CCL3 und CXCL9 nach intravenöser Injektion von rekombinanten Proteinen. Dargestellt sind CCL3 und CXCL9 Proteinspiegel im Serum von B6 (n = 4) und B6 CCR5^{-/-} Mäusen (n = 4) kurz vor und bei den angegebenen Zeitpunkten nach der Chemokin-Injektion (1 µg je Chemokin/Maus). Die Werte sind Mittelwerte ± SE. * P < 0,05. ** P < 0,01.

5. Diskussion

Der Chemokinrezeptor CCR5 wird auf einer breiten Palette von Lymphozyten, einschließlich CD4+ Th1-Zellen, CD8+ T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen sowie dendritischen Zellen exprimiert und hat somit einen Einfluss auf entzündliche Reaktionen. Bei Patienten mit einer Autoimmunkrankheit samt Nierenbeteiligung (einschließlich der Lupusnephritis) konnte, in früheren Studien, folgendes gezeigt werden: Die CCR5-Expression auf T-Zellen und Monozyten in einer inflammatorischen Niere ist relativ zu den im Blut zirkulierenden T-Zellen und Monozyten erhöht (Segerer et al. 1999, Wada et al. 1999, Furuichi et al. 2000, Segerer et al. 2004).

Diese Ergebnisse passen zu den Beobachtungen aus vorigen Studien, dass die drei großen CCR5-Liganden CCL3, CCL4 und CCL5 in entzündeten Geweben hoch exprimiert werden. (Rantes et al. 2007, Wada et al. 1999, Furuichi et al. 2000, Liu et al. 2003, Chen et al. 2002). Die vermehrte renale Expression der CCR5-Liganden CCL3, CCL4 und CCL5 scheint also pathogene Effektor-T-Zellen und Monozyten in einer entzündeten Niere zu haben. Im etablierten MRL/lpr-Modell der murinen Lupusnephritis konnte gezeigt werden, dass die CCL3-5 Expression der Infiltration CCR5-exprimierender Entzündungszellen und konsekutiver Gewebeschädigung vorangeht (Perez de Lema et al. 2001).

CCR5 Targeting bei Autoimmunerkrankung könnte daher eine attraktive therapeutische Strategie sein. Für die Therapie von HIV steht bereits der erste Chemokin-Rezeptor-Antagonist CCR5-Blocker (Maraviroc®) zur Verfügung. Bisher fehlen jedoch Daten über die funktionelle Bedeutung der CCR5-Signalkaskaden bei der menschlichen und experimentellen Lupusnephritis. In dieser Doktorarbeit wurde daher die Funktion von CCR5 bei MRL/lpr-Mäusen untersucht.

Das wichtigste Ergebnis dieser Doktorarbeit war, dass das Fehlen des CCR5-Rezeptors einen progressiven Einfluss auf den Verlauf der Lupusnephritis hatte, sowohl im zeitlichen Verlauf als auch im Ausmaß der Schädigung. Das CCR5-Defizit wirkte verstärkend auf die Rekrutierung mononukleärer Zellen und bedingte damit die glomeruläre Schädigung sowie der Proteinurie. Bei nephritischen CCR5^{-/-} Mäusen wurden Nieren- und systemische Proteine von CCL3, CCL4, und CCL5 auffallend hochreguliert, dieses spiegelte sich aber nicht auf der mRNA-Ebene wieder. Darüber hinaus war nach intravenöser Injektion des rekombinanten Proteins die Plasmaprotein-Konzentration von CCL3 bei CCR5^{-/-} Mäusen, im Vergleich zu denen von Wildtyp-Tieren, signifikant erhöht. Die verzögerte

Clearance des CCL₃-Protein bei CCR5-Rezeptor-Mangel lies vermuten, dass CCR5-positive Zellen die CCR5-Liganden abräumen und sich dadurch eine geringere lokale CCL₃₋₅ Konzentration einstellt. Die erhöhten Konzentrationen von CCL₃ und CCL₅ im Gewebe bei CCR5^{-/-} Mäusen können zu einer weiteren Rekrutierung von pathogenen Monozyten und T-Zellen eben über den alternativen Weg des CCR1 führen (Bromley et al. 2008). Über diesen alternativen Weg der verstärkt induzierten CCR1-abhängigen Infiltration von Immunzellen, kann es zu einem erhöhten Gewebsschaden kommen. In Modellen der Leber- und Nierenentzündung konnte diese bereits gezeigt werden (Tuner et al. 2008, Moreno et al. 2005).

Die Bedeutung der Chemokin-Clearance konnte durch die Entdeckung und Charakterisierung der atypischen Chemokinrezeptoren D6, DARC, CCX-CKR und CXCR7 verdeutlicht werden (Graham et al. 2009, Naumann et al. 2010). Diese Unterklassen von Non-Signaling-Chemokin-Rezeptoren werden durch die Fähigkeit charakterisiert, Chemokinliganden zu internalisieren und zu reduzieren und somit lokale Chemokin-Konzentration zu senken. Weitere Studien konnten zeigen, dass die Clearance der Chemokine durch diese atypischen Rezeptoren eine wichtige regulatorische Rolle bei der Inhibition sowie bei der Induktion des Abbruchs der Entzündungsreaktion spielt (Thelen & Stein 2008, Tuner et al. 2008).

Dabei ist es weitgehend unbekannt, ob es noch zusätzliche Mechanismen gibt, die zur Inhibierung der Immunantwort des „Host“ mittels Chemokin-Verbrauch (d.h. Bindung - Internalisierung - Abbau) durch klassische "proinflammatorische" Chemokinrezeptoren, die nicht der Non-Signaling-Familie der Scavenger-Rezeptoren wie CCR5 angehören, beitragen (Segeer et al. 2010). Bisher wurden einige Studien veröffentlicht, die dieses Konzept unterstützen. In einer neueren Studie beobachtete Ulrich A. Maus et al. folgendes: Bei CCR2-defizienten Mäusen zeigte sich, nach Inhalation intratrachealen LPS (Lipopolysaccharide), eine erhöhte CCL₂-Konzentration in Verbindung mit einer reduzierten Monozytenrekrutierung in der bronchialen Lavage Flüssigkeit. Bei bestrahlten CCR2-defizienten Mäusen wurde Knochenmark von Wildtyp-Mäusen substituiert, dieses führte zu einer Normalisierung der Monozytenrekrutierung und zu einem CCR2-abhängigen Verbrauch von CCL₂ und hämatopoetischen Zellen in der Lunge (Maus et al. 2005).

In einer Studie von Zhang et al. wurde angenommen, dass im Rattenmodell der LPS-induzierten Lungenschädigung, die Infiltration von CXCR2-positiven neutrophilen Zellen, die lokalen Konzentration

nen von CXCR2-Liganden MIP-2 und CINC erniedrigt (Zhang et al. 2001). Die Arbeitsgruppe von Serhan und Luster beschrieb bei CCR5-defizienten Mäusen eine langanhaltende Entzündungsreaktion nach Induktion einer Peritonitis, die als Folge der lokal erhöht anhaltenden CCL3 und CCL5-Konzentrationen betrachtet wurde. In einer in-vitro-Studie von Ariel et al. wurde gezeigt, dass die CCR5-Expression auf apoptotischen neutrophilen Zellen und aktivierten apoptotischen T-Zellen (in entzündeten Geweben), durch die CCR5-Liganden eine wichtige Funktion für die Clearance dieser Zellen gegeben ist („chemokine-scavenging devices“) (Ariel et al. 2006). Diese Ergebnisse liefern damit erste Hinweise darauf, dass der Verbrauch von CCL3 durch seinen "klassischen" Chemokinrezeptor CCR5 als negativer Regulator für Chemokin-Signalkaskaden, bei Mäusen mit Lupusnephritis, fungiert und dadurch die Nierenentzündung inhibiert. Dieser negative Feedback-Mechanismus kann ein wichtiger Mechanismus zur Inhibierung der inflammatorischen Reaktion im Zielgewebe sein.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden auch andere Möglichkeiten in Betracht gezogen, die den schweren Verlauf der Nephritis bei CCR5^{-/-} Mäusen erklären könnten. Jedoch war kein potenzieller andere Mechanismen in der Literatur beschrieben worden:

- einschließlich der Verringerung der Infiltration der alternativ aktivierten Makrophagen,
- beeinträchtigte Infiltration Tregs (Yurchenko et al. 2006) und damit Veränderungen im T-Effektorzellen Gleichgewicht,
- Störung der humoralen Immunantwort oder
- ein Defekt bei der Apoptose

waren bei CCR5^{-/-} MRL/lpr-Mäusen nicht nachweisbar.

Ein anderer Ansatz zur Untersuchung der Bedeutung der CCR5-Signalkaskade bei SLE-Patienten entstand durch die Entdeckung einer Mutation mit einer 32-Basenpaar-Deletion im menschlichen CCR5-Gen (CCR5 Δ 32), diese führt zu einem nicht-funktionalen CCR5-Rezeptor (Samson et al. 1996).

Etwa 10% - 20% der Kaukasier sind heterozygot und etwa 1% bis 2% sind homozygote Träger der CCR5 Δ 32 Mutation. In einer Studie aus 469 Fällen von SLE-Patienten, aus drei geographisch unterschiedlichen Kohorten, war der CCR5 Δ 32 Haplotyp mit einem erhöhten Risiko zur einer SLE-Entwicklung assoziiert (Mamtani et al. 2008).

Dieser Befund steht im Einklang mit den Ergebnissen aus dieser Doktorarbeit. Die MRL/lpr-Mäuse, die heterozygot für das CCR5 Deletion waren, zeigten mittleren Verlauf mit moderater Verschärfung

der Nephritis im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren (Daten nicht gezeigt). In einer anderen Studie mit 276 spanischen Patienten konnte der CCR5-Polymorphismus nicht mit einer Anfälligkeit für SLE assoziiert werden. Allerdings postulierten die Autoren dieser Studie einen geringen Beitrag der CCR5 Delta 32 Mutation auf die Entwicklung der Lupusnephritis sowie einem erhöhten Schweregrad der Erkrankung (Aguilar et al. 2003). Im Gegensatz zu dieser Studie hat eine aktuelle Untersuchung aus den Niederlanden mit 113 Patienten nebst Lupusnephritis, keine signifikante Wirkung der CCR5Delta32 Deletion auf die Schwere der Erkrankung gezeigt (Martens et al. 2010). Dabei ist aber zu beachten, dass bei allen drei oben genannten Studien nur eine sehr geringe Anzahl von homozygoten CCR5Delta32 Allelträgern aufgenommen wurden. Der Grund hierfür ist, dass die allgemeine Häufigkeit der CCR5Delta32 Mutation sehr gering ist. Daher wurde auf eine statistische Auswertung der absolut CCR5-defizienten Gruppe verzichtet.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich bei der murinen Lupusnephritis die Abwesenheit von CCR5 aggravierend auswirkt. Dies zeigt die Gefahr einer selektiven CCR5-Blockade bei der Lupusnephritis, obwohl sich diese Therapie als ein erfolgreicher neuer Ansatz für die Behandlung von HIV-Infektion etabliert hat. CCR5 hat bei HIV aber auch eine andere Funktion als bei SLE, so dass die Vergleichbarkeit auch nur eingeschränkt gegeben ist.

Die schlechtere Nierenfunktion und die systemischen CCL3-CCL5 Protein-Konzentrationen sowie die verzögerte CCL3-Clearance bei CCR5-defizienten Mäusen legen nahe, dass CCR5 als „Fänger“ für die eigenen Chemokinliganden dienen könnte. Bei dieser Feedback-Schleife könnte es sich um einen Inhibitor bei der Rekrutierung von T-Zellen und Makrophagen in der Niere handeln. Damit könnte die Feedback-Schleife eine überschießende Entzündungsreaktion verhindern und in der Folge die Gewebsschädigung regulieren. CCL3 könnte dabei den alternativen Rezeptor CCR1 aktivieren und so weiteren Einfluss auf die Entzündungsreaktion nehmen.

Ausblick: Ein möglicher Ansatz für künftige Studien wäre neben der Blockade von CCR5 auch den alternativ Rezeptor CCR1 parallel zu blockieren, um das Verständnis der Rezeptor-Interaktion untereinander besser zu verstehen. Vielleicht ließe sich dann daraus ein mögliches Therapiekonzept entwickeln.

6. Zusammenfassung

Die Leukozyten-Infiltration ist ein charakteristisches Merkmal der menschlichen und der experimentellen Lupusnephritis. Die Leukozyten-Infiltration steht dabei in enger Relation zu dem Verlust der Nierenfunktion. Der Chemokin-Rezeptor CCR5 wird auf Monozyten und auf T-Zellen exprimiert. Eine wichtige Funktion von CCR5 besteht darin, diese Zellen in entzündeten Organen zu rekrutieren. Um die funktionelle Rolle von CCR5 bei Lupusnephritis zu untersuchen, wurden Mäuse ohne CCR5 zu einem MRL-Fas (lpr) (MRL/lpr) genetischen Hintergrund zurückgekreuzt. Unerwarteter Weise entwickelten die CCR5 (-/-) MRL/lpr-Mäuse bezüglich der glomerulären Gewebsschädigung und der Albuminurie einen gravierenderen Verlauf der Lupusnephritis.

Die Verschlechterung der Nephritis war mit einem Gesamtanstieg der mononukleären Zell-Infiltration in der Niere assoziiert. Dagegen waren die T-Zellantwort, die Bildung von Autoantikörpern sowie das renale Leukozyten-Subtypen Gleichgewicht von dem CCR5-Mangel unabhängig. Der renale und systemische Proteingehalt des CCR5-Liganden CCL3, welcher auch Leukozyten rekrutiert und dabei den alternativen Rezeptor CCR1 aktivieren kann, war bei nephritischen CCR5(-/-) MRL/lpr-Mäusen ebenfalls deutlich erhöht. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die systemische Zunahme der CCR5/CCR1-Liganden auch in nicht immunisierten CCR5 (-/-) C57BL/6- Mäusen stattfand. Dieser Anstieg war auf eine verringerte Clearance zurückzuführen und nicht auf eine Überproduktion von CCL3. Zusammengefasst unterstützen diese Daten die Hypothese, dass in entzündeten Geweben der CCR5-abhängige Verbrauch seiner eigenen Liganden als eine negative Feedback-Schleife hemmend auf die lokalen Chemokin-Ebenen wirkt, was wiederum die Rekrutierung weiterer Entzündungszellen hemmt.

7. Literaturverzeichnis

Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17:593-623

Aguilar F, Nunez-Roldan A, Torres B, Wichmann I, Sanchez-Roman J, Gonzalez-Escribano MF: Chemokine receptor CCR2/CCR5 polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2003, 30:1770-1774

Amano H, Bickerstaff A, Orosz CG, Novick AC, Toma H, Fairchild RL: Absence of recipient CCR5 promotes early and increased allospecific antibody responses to cardiac allografts. *J Immunol* 2005, 174:6499-6508

Anders HJ, Frink M, Linde Y, Banas B, Wornle M, Cohen CD, Vielhauer V, Nelson PJ, Grone HJ, Schlondorff D: CC chemokine ligand 5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration. *J Immunol* 2003, 170:5658-5666

Austin HA, Balow JE. (1999) Natural history and treatment of lupus nephritis. *Semin Nephrol.* 1999 Jan;19(1):2-11

Ariel A, Fredman G, Sun YP, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, Serhan CN: Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol* 2006, 7:1209-1216

Baggiolini M (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568

Belnoue E, Kayibanda M, Deschemin JC, Viguier M, Mack M, Kuziel WA, Renia L (2003) CCR5 deficiency decreases susceptibility to experimental cerebral malaria. *Blood* 101:4253- 4259

Bockaert J, Pin J P (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18(7): 1723-9

Cameron JS (1999), Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol* 10:413-424

Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D et al. (1999) Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med* 190: 815–826

Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ (1999). A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* (1999) vol. 189 (10) pp. 1639-48

Chen S, Liu Z, Chen H, Zhou H, Wang J, Li L: Glomerular chemokine expression and the effect of steroid and cyclophosphamide pulse therapy in human crescentic glomerulonephritis. *Chin Med J (Engl)* 2002, 115:1301-1307

Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong J H, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, Sykes BD (1995) Structure-activity relationships of chemokines. *J Leukoc Biol* 57(5): 703-11.

Cottiero RA, Madaio MP, Levey AS (1995) Glomerular Filtration Rate and Urinary Albumin Excretion Rate in Systemic Lupus erythematosus. *Nephron* 1995;69:140-146

Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ (1996): Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273:1856-1862

- Deocharan B, Qing X, Lichauco J, Putterman C. (2002) Alpha-actinin is a cross-reactive renal target for pathogenic anti-DNA antibodies. *J Immunol.* 2002 Mar 15; 168(6): 3072-8
- Dieker JW, Vlag J van der, Berden JH (2002) Triggers for anti-chromatin autoantibody production in SLE. *Lupus* 11: 856-864
- Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC et al. (2005) Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 52: 3337-3348
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW (1996) A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85:1149-1158
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667-673
- Duan RS, Chen Z, Bao L, Quezada HC, Nennesmo I, Winblad B, Zhu J (2004) CCR5 deficiency does not prevent Po peptide 180-199 immunized mice from experimental autoimmune neuritis. *Neurobiol Dis* 16:630-637
- Eis V, Luckow B, Vielhauer V, Siveke JT, Linde Y, Segerer S, Perez de Lema G, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Horuk R, Murphy PM, Gao JL, Hudkins KL, Alpers CE, Gröne HJ, Schlöndorff D, Anders HJ (2004) Chemokine receptor CCR1 but not CCR5 mediates leukocyte recruitment and subsequent renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction. *J Am Soc Nephrol* 15:337-347
- Farzan M, Choe H, Martin KA, Sun Y, Sidelko M, Mackay CR, Gerard NP, Sodroski J Gerard C (1997) HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1beta-mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5. *J Biol Chem* 272(11): 6854-7

Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H (1999) Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 96(5): 667-76

Fernandez EJ, Lolis E (2002) Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469-499

Furuichi K, Wada T, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi K, Takasawa K, Kida H, Takeda SI, Mukaida N, Matsushima K, Yokoyama H: Distinct expression of CCR1 and CCR5 in glomerular and interstitial lesions of human glomerular diseases. *Am J Nephrol* 2000, 20:291-299

Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RA, Garella S (1983) Use of Single Voided Urine Samples to Estimate Quantitative Proteinuria, *N Engl J Med* 1983; 309:1543-1546

Gulick RM, Lalezari J, Goodrich J, Clumeck N, DeJesus E, Horban A, Nadler J, Clotet B, Karlsson A, Wohlfeiler M, Montana JB, McHale M, Sullivan J, Ridgway C, Felstead S, Dunne MW, van der Ryst E, Mayer H: Maraviroc for previously treated patients with R5 HIV-1 infection. *N Engl J Med* 2008, 359:1429-1441

Graham GJ: D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *Eur J Immunol* 2009, 39:342-351

Gröne EF, Gröne HJ (2008) Pathologie der Lupus-Nephritis. *Der Nephrologe* · 3:195–202 DOI 10.1007/s11560-008-0176-5

Hamm HE (1998). The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* 273(2): 669-72

Hanrotel-Saliou C, Segalen I, Le Meur Y, Youinou P, Renaudineau Y (2010) Glomerular Antibodies in Lupus Nephritis. *Clinic Rev Allerg Immunol* DOI 10.1007/s12016-010-8204-4

Herold G (2010) Innere Medizin 2011. (ASIN: B00442K7RQ)

Herrmann M, Voll RE, Zoller OM et al. (1998) Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocytederived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41: 1241–1250

Heyder P, Bekeredjian-Ding I, Parcina M et al. (2007) Purified apoptotic bodies stimulate plasmacytoid dendritic cells to produce IFN- α . *Autoimmunity* 40: 331–332

Hochberg MC (1985) The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970–1977. *Arthritis Rheum* 1985;28(1):80–86

Hochberg MC. (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus [letter]. *Arthritis Rheum* 1997;40:1725

Hopkinson ND, Doherty M, Powell RJ: The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Nottingham, UK, 1989–1990. *Br J Rheumatol* 1993;32(2):110–115

Hüttenrauch F, Ligand induzierte Phosphorylierung des Chemokin Rezeptors CCR5: strukturelle Analyse und Funktion. Dis. 2004

Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA: The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum* 1995;38(4):551–558

Kalaaji M, Mortensen E, Jorgensen L et al. (2006): Nephritogenic lupus antibodies recognize glomerular basement membrane-associated chromatin fragments released from apoptotic intraglomerular cells. *Am J Pathol* 168: 1779–1792

Kohem CL, Brenol JC, Xavier RM, Bredemeier M, Brenol CV, Dedavid e Silva TL, et al (2007). The chemokine receptor CCR5 genetic polymorphism and expression in rheumatoid arthritis patients. *Scand J Rheumatol* 36:359 – 364

Kramers C, Hylkema MN, Bruggen MC van et al. (1994) Antinucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J Clin Invest* 94: 568–577

Libert F, Cochaux P, Beckman G, Samson M, Aksenova M, Cao A, Czeizel A, Claustres M, de la Rua C, Ferrari M, Ferrec C, Glover G, Grinde B, Guran S, Kucinskas V, Lavinha J, Mercier B, Ogur G, Peltonen L, Rosatelli C, Schwartz M, Spitsyn V, Timar L, Beckman L, Parmentier M, Vassart G (1998) The delta-CCR5 mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe. *Hum Mol Genet* 7:399-406

Lindner E, Nordang GB, Melum E, Flato B, Selvaag AM, Thorsby E, et al (2007). Lack of association between the chemokine receptor 5 polymorphism CCR5D32 in rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis. *BMC Med Genet* 8:33

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR (1996) Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-377

Liu ZH, Chen SF, Zhou H, Chen HP, Li LS: Glomerular expression of C-C chemokines in different types of human crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2003, 18:1526-1534

Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, Gutierrez-Ramos JC (1997). RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of

crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *J Exp Med.* vol.7;185(7):1371-80

Lorenz HM, Grunke M, Hieronymus T et al. (2002) Hyporesponsiveness to gamma chain cytokines in activated lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus leads to accelerated apoptosis. *Eur J Immunol* 32: 1253–1263

Lövgren T, Eloranta ML, Båve U et al. (2004) Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum* 50: 1861–1872

Luster MD, Andrew D (1998) Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *N Engl J Med* ; 338:436-445

Mack M, Cihak J, Simonis C, Luckow B, Proudfoot AE, Plachy J, Brühl H, Frink M, Anders HJ, Vielhauser V, Pfirstinger J, Stangassinger M, Schlöndorff D (2001) Expression and characterization of the chemokine receptors CCR2 and CCR5 in mice. *J Immunol* 166:4697- 4704

Mamtani M, Rovin B, Brey R, Camargo JF, Kulkarni H, Herrera M, Correa P, Holliday S, Anaya JM, Ahuja SK: CCL3L1 gene-containing segmental duplications and polymorphisms in CCR5 affect risk of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2008, 67:1076-1083

Martens HA, Gross S, van der Steege G, Brouwer E, Berden JH, de Sevaux R, Derksen RH, Voskuyl AE, Berger SP, Navis GJ, Kallenberg CG, Bijl M: Lack of association of C-C chemokine receptor 5 Delta32 deletion status with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, and disease severity. *J Rheumatol* 2010, 37:2226-2231

Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB (1997) Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 16:100-103

Maus UA, Wellmann S, Hampl C, Kuziel WA, Srivastava M, Mack M, Everhart MB, Blackwell TS, Christman JW, Schlondorff D, Bohle RM, Seeger W, Lohmeyer J: CCR2-positive monocytes recruited to inflamed lungs downregulate local CCL2 chemokine levels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005, 288:L350-358

McCarty DJ, Manzi S, Medsger TA, Jr., Ramsey-Goldman R, LaPorte RE, Kwok CK: Incidence of systemic lupus erythematosus. Race and gender differences. *Arthritis Rheum* 1995;38(9):1260-1270

Mohan C, Adams S, Stanik V, Datta SK (1993) Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. *J Exp Med* 177: 1367–1381

Moreno C, Gustot T, Nicaise C, Quertinmont E, Nagy N, Parmentier M, Le Moine O, Deviere J, Louis H: CCR5 deficiency exacerbates T-cell-mediated hepatitis in mice. *Hepatology* 2005, 42:854-862

Mortensen ES, Fenton KA, Rekvig OP (2008) The central role of nucleosomes revealed. *Am J Pathol* 172: 275–283

Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, Hamada H, Asakura H, Ishikawa H, Matsushima K (2003) Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nat Immunol* 4:154-160

Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52(1): 145-76

Oates JC, Gilkeson GS. (2002) Mediators of injury in lupus nephritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 Sep;14(5): 498-503

Oppermann, M., Mack, M., Proudfoot, A. E. und Olbrich, H. (1999). Differential effects of CC chemokines on CC chemokine receptor 5 (CCR5) phosphorylation and identification of phosphorylation sites on the CCR5 carboxyl terminus. *J Biol Chem* 274(13): 8875-85

Oppermann M (2004). Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation. *Cell Signal* 16(11): 1201-10

Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleswar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M: CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One* 2010, 5:e9175

Panzer U, Thaiss F, Zahner G, Barth P, Reszka M, Reinking R, Wolf G, Helmchen U, Stahl RAK (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 and osteopontin differentially regulate monocytes recruitment in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 59:1762-1769

Perez de Lema G, Maier H, Nieto E, Vielhauer V, Luckow B, Mampaso F, Schlöndorff D (2001) Chemokine expression precedes inflammatory cell infiltration and chemokine receptor and cytokine expression during the initiation of murine lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 12:1369-1382

Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* 257(5074): 1264-7.VI

Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* 67: 653-92

Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G-R, Wirth J. (2007) Taschenatlas der Immunologie. Thieme Verlag; Auflage: 2., ISBN-10: 3131153822, ISBN-13: 978-3131153821: 200-201

- Pollak VE, Pirani CL, Schwartz FD. (1964) The natural history of the renal manifestations of systemic lupus erythematosus. *J Lab Clin Med.* 1964 Apr;63:537-50
- Prahalad S (2006). Negative association between the chemokine receptor CCR5-Delta32 polymorphism and rheumatoid arthritis: A meta-analysis. *Genes Immun* 7:264 – 268
- Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF (1996) Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 271(29): 17161-6
- Sallusto F, Lanzavecchia A (2000). Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* vol. 177 pp. 134-140
- Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M (1996) Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 35:3362- 3367
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M (1996b) Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-725
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M: Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996, 382:722-725
- Samson M, LaRosa G, Libert F, Paindavoine P, Detheux M, Vassart G, Parmentier M. (1997) The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity. *J Biol Chem* 272(40): 24934-41

Schiller M, Lorenz H-M, Blank N (2007), Neue Aspekte zur Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes, *Z Rheumatol* 2007 · 66:505–509 DOI 10.1007/s00393-007-0212-2

Schneider A, Panzer U, Zahner G, Wenzel U, Wolf G, Thaiss F, Helmchen U, Stahl RAK (1999). Monocyte chemoattractant protein-1 mediates collagen deposition in experimental glomerulonephritis by transforming growth factor- β . *Kidney Int* 56:135-144

Schwarting A (2007) Lupusnephritis - Neue therapeutische Ansätze. *Der Nephrologe* Volume 2, Number 1, 33-36, DOI: 10.1007/s11560-006-0059-6

Schwarting A (2008) Die Nierenbeteiligung beim systemischen Lupus erythematodes. *Der Nephrologe* Volume 3, Number 6, 471-475, DOI: 10.1007/s11560-008-0247-7

Segerer S, Mac KM, Regele H, Kerjaschki D, Schlondorff D: Expression of the C-C chemokine receptor 5 in human kidney diseases. *Kidney Int* 1999, 56:52-64

Segerer S, Banas B, Wornle M, Schmid H, Cohen CD, Kretzler M, Mack M, Kiss E, Nelson PJ, Schlondorff D, Grone HJ: CXCR3 is involved in tubulointerstitial injury in human glomerulonephritis. *Am J Pathol* 2004, 164:635-649

Segerer S, Jedlicka J, Wuthrich RP: Atypical chemokine receptors in renal inflammation. *Nephron Exp Nephrol* 2010, 115:e89-95

Stasikowska O, Danilewicz M, Wagrowska-Danilewicz M: The significant role of RANTES and CCR5 in progressive tubulointerstitial lesions in lupus nephropathy. *Pol J Pathol* 2007, 58:35-40

Steinman L (2007): A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nature Medicine* 13, 139 - 145

Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Kanavakis E, Claustres M, Kambouris M, Ostrer H, Duff G, Baranov V, Sibul H, Metspalu A, Goldman D, Martin N, Duffy D, Schmidtke J, Estivill X, O'Brien SJ, Dean M (1998): Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 62:1507-1515

Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. (1982): The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25:1271-7

Tax WJ, Kramers C, Bruggen MC van, Berden JH(1995): Apoptosis, nucleosomes, and nephritis in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 48: 666–673

Tesch, GH, Maifert, S, Schwarting, A, Rollins, BJ, Kelley, VR (1999): Monocyte chemoattractant protein 1-dependent leukocytic infiltrates are responsible for autoimmune disease in MRL-Faslpr mice. *J Exp Med* 190:1813-1824.

Thelen M, Stein JV: How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol* 2008, 9:953-959

Tipping PG, Kitching AR (2005). Glomerulonephritis, Th1 and Th2: what's new? *Clinical & Experimental Immunology*, vol.142, n. 2, 207-215(9)

Tipping PG, Holdsworth SR (2006). T Cells in Crescentic Glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17: 1253-1263

Turner JE, Paust HJ, Steinmetz OM, Peters A, Meyer-Schwesinger C, Heymann F, Helmchen U, Fehr S, Horuk R, Wenzel U, Kurts C, Mittrucker HW, Stahl RA, Panzer U: CCR5 deficiency aggravates crescentic glomerulonephritis in mice. *J Immunol* 2008, 181:6546-6556

Vlahakos DV, Foster MH, Adams S, Katz M, Ucci AA, Barrett KJ, Datta SK, Madaio MP. (1992) Anti-DNA antibodies form immune deposits at distinct glomerular and vascular sites. *Kidney Int.* 1992 Jun; 41(6): 1690-700

Volin MV, Shah MR, Tokuhira M, Haines GK, Woods JM, Koch AE (1998). RANTES expression and contribution to Mo chemotaxis in arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 89: 44–53

Wada T, Furuichi K, Segawa-Takaeda C, Shimizu M, Sakai N, Takeda SI, Takasawa K, Kida H, Kobayashi KI, Mukaida N, Ohmoto Y, Matsushima K, Yokoyama H: MIP-1 α and MCP-1 contribute to crescents and interstitial lesions in human crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999, 56:995-1003

Wang G, Lai F, Tam L-S, Li K-M, Kwan B C-H, Chow K-M, Li P K-T, Szeto C-C (2009). Urinary FOXP3 mRNA in patients with lupus nephritis—relation with disease activity and treatment response. *Rheumatology* 48:755–760

Waters ST, McDuffie M, Bagavant H, Deshmukh US, Gaskin F, Jiang C, Tung KSK, Fu SM (2004). Breaking tolerance to double stranded DNA, nucleosome, and other nuclear antigens is not required for the pathogenesis of lupus glomerulonephritis. *J Exp Med* vol. 199 (2) pp. 255-64

Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M, Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M (2004) International Society of Nephrology Working Group on the Classification of Lupus Nephritis; Renal Pathology Society Working Group on the Classification of Lupus Nephritis. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Kidney Int* 2004; 65(2):521–30. Review. Erratum in: *Kidney Int* 2004; 65(3):1132.

Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB, Balow JE, Bruijn JA, Cook T, Ferrario F, Fogo AB, Ginzler EM, Hebert L, Hill G, Hill P, Jennette JC, Kong NC, Lesavre P, Lockshin M,

Looi LM, Makino H, Moura LA, Nagata M. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(2):241–50. Erratum in: *J Am Soc Nephrol* 2004; 15(3):835–6

Wolf G (2004) Pathogenese des systemischen Lupus erythematosus. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 33: 50-56

Wysocki CA, Burkett SB, Panoskaltis-Mortari A, Kirby SL, Luster AD, McKinnon K, Blazar BR, Serody JS (2004) Differential roles for CCR5 expression on donor T cells during graft-versus-host disease based on pretransplant conditioning. *J Immunol* 173:845-854

Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA: CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med* 2006, 203:2451-2460

Zhang P, Bagby GJ, Kolls JK, Welsh DA, Summer WR, Andresen J, Nelson S: The effects of granulocyte colony-stimulating factor and neutrophil recruitment on the pulmonary chemokine response to intratracheal endotoxin. *J Immunol* 2001, 166:458-465

8. Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Radiology
ANA	antinukleärer Antikörper
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CCR	Chemokin-Rezeptor
CXCL	Chemokine (C-X-C motif) ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DARC	Duffy antigen / chemokine receptor
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsRNA	Double-stranded Ribonucleic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
GN	Glomerulonephritis
GPCRs	G protein coupled receptors
GRK	G-protein-coupled receptor kinase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	Inositol trisphosphate
LGN	Lupus glomerulonephritis
LN	Lupusnephritis
MHC	major histocompatibility complex
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
PCMA	peripheral cell nuclear antigen
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate or PtdIns(4,5)P ₂
RANTES	regulated and normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonucleic acid
SLE	systemischer Lupus erythematoses
snRNA	small nuclear ribonucleic acid
Th	T-Helferzelle
TLR	toll like receptor
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

9. Publikation

Turner JE, Paust HJ, Bennstein SB, Bramke P, Krebs C, Steinmetz OM, Velden J, Haag F, Stahl RA, Panzer U. Protective role for CCR5 in murine lupus nephritis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012 Jun;302(11):F1503-15

10. Danksagung

Ich bedanke mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. Ulf Panzer für die Überlassung des Promotions-themas, für die motivierende Unterstützung und die ausgezeichnete Betreuung.

Unter anderem für die FACS-Analysen möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Hans-Joachim Paust und bei Herrn Dr. med. Jan-Eric Turner bedanken.

Für die experimentelle Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich besonders bei Frau Sabrina Bennstein und Frau Anett Peters sowie bei allen nicht namentlich genannten Institutsmitgliedern für ihre Hilfsbereitschaft und Zusammenarbeit bedanken.

Für das Lektorat und die geduldige Unterstützung bedanke ich mich besonders bei Andrea Kossinna.

11. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Philipp Bramke